

**Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona**

**ESTUDI DE L'EXCRECIÓ I ESTABILITAT
DE PRIONS EN EL MEDI**

Tesi Doctoral

Carlos Maluquer de Motes i Porta

Barcelona, Gener 2007

*Scientist should be very reticent to accept new ideas.
99% of new ideas are wrong.*

Stanley B. Prusiner

Índex

Índex	I
Abreviatures i anglicismes	V
Capítol I: Introducció	2
1.1. Les malalties prioniques	2
1.1.1. Característiques generals	2
1.1.2. Malalties prioniques humanes	3
1.1.2.1. Esporàdiques	4
1.1.2.2. Hereditàries	5
1.1.2.3. Infecioses	6
1.1.3. Malalties prioniques animals	8
1.1.3.1. Tremolor ovina o <i>scrapie</i>	8
1.1.3.2. Encefalopatia espongiforme bovina (EEB)	10
1.1.3.3. Malaltia caquectitzant crònica (CWD)	11
1.2. L'agent infeccios o prió	12
1.2.1. La hipòtesi de <i>tan sols proteïna</i>	12
1.2.2. El gen <i>prnp</i>	14
1.2.3. La proteïna prionica cel·lular	16
1.2.4. La isoforma patògena	19
1.2.5. Soques de prions	22
1.2.6. Barrera de transmissió	24
1.2.7. Mecanismes d'invasió i proliferació de la malaltia	24
1.3. Els prions i el medi ambient	29
1.3.1. La contaminació animal en el medi	29
1.3.2. Presència de prions en el medi	30
1.3.2.1. Excreció	30
1.3.2.2. Aigües residuals	32
1.3.2.3. El sòl	33
1.3.2.4. Altres rutes de contaminació	34
1.3.3. Transmissió de les EET a través del medi	35
1.3.4. Inactivació i estabilitat dels prions	36
1.4. Plantejament i objectius de la tesi	37

Capítol II: Detecció d'adenovirus animals com a marcadors de contaminació fecal 41

2.1. Antecedents i objectius	41
2.2. Materials i Mètodes	44
2.2.1. Femtes animals	44
2.2.2. Aigües residuals urbanes	45
2.2.3. Efluent d'escorxador	45
2.2.4. Concentració de virus a partir d'aigües residuals	45
2.2.5. Concentració de virus a partir de mostres fecals	46
2.2.6. Extracció d'àcids nucleics	46
2.2.7. Desenvolupament d'un protocol de PCR niada	46
2.2.8. Seqüenciació i anàlisi de genomes virals	47
2.3. Resultats	48
2.3.1. Detecció d'adenovirus porcins en mostres fecals	48
2.3.2. Detecció d'adenovirus bovins en mostres fecals	50
2.3.3. Detecció d'adenovirus ovins en mostres fecals	52
2.3.4. Detecció d'adenovirus en aigua residual	53
2.3.5. Especificitat dels oligonucleòtids dissenyats	53
2.4. Discussió	54
2.5. Annex: Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination	58

Capítol III: Estudi de la contaminació per prions en efluent d'escorxador 59

3.1. Antecedents i objectius	59
3.2. Materials i mètodes	63
3.2.1. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en efluent d'escorxador	63
3.2.1.1. Teixits infectats per EET	63
3.2.1.2. Efluent d'escorxador	64
3.2.1.3. Contaminació experimental i centrifugació dels efluent	65
3.2.1.4. Homogeneïtzació dels <i>pellets</i> i tractament amb PK	66
3.2.1.5. Validació per a altres efluent i per a EEB	66
3.2.1.6. Avaluació de la sensibilitat de la tècnica ELISA respecte el WB en efluent d'escorxador	67
3.2.1.7. Optimització de la concentració de PK	67
3.2.1.8. Quantificació de PrP ^{sc}	68
3.2.2. Sensibilitat del mètode de detecció	68
3.2.3. Anàlisi de mostres d'aigua d'escorxador	69
3.3. Resultats	70
3.3.1. Caracterització dels inòculs i dels efluent emprats	70
3.3.2. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en efluent d'escorxador	72
3.3.3. Sensibilitat del mètode de detecció	81
3.3.4. Anàlisi de mostres d'efluent d'escorxador	83
3.4. Discussió	84
3.5. Annex: Assessing the presence and persistence of BSE and scrapie in slaughterhouse wastewater	90

Capítol IV: Avaluació de l'excreció de prions en models murins 107

4.1. Antecedents i objectius	107
4.2. Materials i mètodes	109
4.2.1. Estudis d'immunoprecipitació	109
4.2.1.1. Virus i teixits infectats per EET	109
4.2.1.2. Anticossos i boles magnètiques	110
4.2.1.3. Eficiència de la immunoprecipitació de virus	111
4.2.1.4. Eficiència i especificitat de la immunoprecipitació de PrP ^{sc}	111
4.2.2. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en femtes animals	112
4.2.2.1. Teixits afectats per EET	112
4.2.2.2. Femtes animals	112
4.2.2.3. Contaminació experimental i extracció de la PrP ^{res}	113
4.2.2.4. Efecte de la proteïnasa K	113
4.2.2.5. Immunoprecipitació	114
4.2.2.6. Interacció mAb-PrP ^{res} en la matriu fecal	115
4.2.3. Sensibilitat del mètode de detecció	115
4.2.4. Anàlisi de mostres	116
4.2.4.1. Ratolins infectats oralment	116
4.2.4.2. Ratolins incubant <i>scrapie</i>	117
4.2.4.3. Anàlisi de mostres de femta i intestins	117
4.3. Resultats	117
4.3.1. Estudis d'immunoprecipitació	117
4.3.2. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en femtes animals	120
4.3.3. Sensibilitat del mètode de detecció	127
4.3.4. Anàlisi de mostres	128
4.4. Discussió	131
4.5. Annex: <i>Shedding of prions in mice stool after ingestion of scrapie and BSE agents</i>	135
Capítol V: Estabilitat dels prions en mostres ambientals	153
5.1. Antecedents i objectius	153
5.2. Materials i Mètodes	154
5.2.1. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en aigua residual	154
5.2.1.1. Teixits afectats per EET	154
5.2.1.2. Aigua residual	155
5.2.1.3. Elució per detergents i per tampó alcalí	155
5.2.1.4. Tractament amb proteïnasa K i anàlisi per <i>western blotting</i>	156
5.2.2. Sensibilitat del mètode de detecció	156
5.2.3. Estudis d'estabilitat	157
5.2.3.1. Teixits afectats per EET	157
5.2.3.2. Estabilitat d'EEB i d' <i>scrapie</i> en efluents d'escorxador	158
5.2.3.3. Estabilitat d' <i>scrapie</i> salvatge en aigua residual i aigua de mar	158
5.2.3.4. Estabilitat d'EEB i d' <i>scrapie Dawson</i> en aigua residual	159
5.2.3.5. Quantificació de PrP ^{res} i anàlisi estadístic	159
5.2.4. Bioassajos	160
5.3. Resultats	161
5.3.1. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en aigua residual	161

5.3.2. Sensibilitat del mètode de detecció _____	165
5.3.3. Estudis d'estabilitat _____	166
5.3.3.1. Estabilitat d'EEB i d' <i>scrapie</i> en efluent d'escorxador _____	166
5.3.3.2. Estabilitat d' <i>scrapie</i> salvatge en aigua residual i aigua de mar _____	169
5.3.3.3. Estabilitat d'EEB i d' <i>scrapie</i> en aigua residual _____	170
5.4. Discussió _____	172
5.5. Annex: <i>Survival of prion proteins in aquatic environments</i> _____	176
Capítol VI: <i>Conclusions</i> _____	189
Capítol VII: <i>Bibliografia</i> _____	191
Capítol VIII: <i>Annex de Materials i Mètodes</i> _____	217
8.1. Concentració de partícules víriques a partir d'aigües residuals _____	217
8.2. Concentració de partícules víriques a partir de mostres fecals _____	218
8.3. Extracció d'àcids nucleics a partir de partícules víriques _____	218
8.4. Amplificació enzimàtica _____	220
8.5. Electroforesi en gel d'agarosa _____	221
8.6. Seqüenciació dels productes amplificats _____	221
8.7. Preparació d'homogenats encefàlics _____	222
8.8. Purificació de SAF a partir d'homogeneïtzats encefàlics _____	223
8.9. Purificació de SAF mitjançant el <i>Bio-Rad TeSeE-Purification kit</i> _____	224
8.10. Determinació del contingut de PrP ^{Sc} en homogeneïtzats encefàlics i efluent d'escorxador _____	225
8.11. Determinació del contingut de proteïna total en efluent d'escorxador _____	226
8.12. Lligació del mAb a boles magnètiques recobertes d'estreptavidina _____	226
8.13. Lligació del mAb a boles magnètiques recobertes de grups <i>tosyl</i> _____	227
8.14. PCR quantitativa _____	228
8.15. Precipitació de proteïnes amb metanol _____	228
8.16. Immunoprecipitació de PrP ^{Sc} _____	229
8.17. Assaig immunoenzimàtic (EIA) _____	230
8.18. <i>Bio-Rad TeSeE EIA Detection kit</i> _____	231
8.19. Electroforesi SDS-PAGE i <i>Western blotting</i> _____	232
8.20. Taula d'iniciadors emprats en aquest estudi _____	235
8.21. Taula d'anticossos emprats en aquest estudi _____	235
8.22. Números d'accés al <i>GenBank</i> _____	236

Abreviatures i anglicismes

aa	aminoàcid
AFSSA	<i>Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments</i>
ATNC	agents transmissibles no convencionals
BAdV	adenovirus bovins
BASE	<i>Bovine Amyloidotic Spongiform encephalopathy</i>
BM	boles magnètiques
BPyV	poliomavirus bovins
BSA	albúmina bovina sèrica (<i>bovine seric albumin</i>)
CDF	cèl·lules dendrítiques foliculars
CEA	<i>Commissariat a l'Energie Atomique</i>
CISA	Centro de Investigaciones en Sanidad Animal
CReSA	Centre de Recerca en Sanitat Animal
CWD	Malaltia caquetitzant crònica (<i>Chronic Wasting Disease</i>)
DNA	àcid desoxiribonucleic
DL ₅₀	dosi letal 50
DO	densitat òptica
DOC	àcid deoxicòlic
DTT	dithiotreitol
EDS	virus de la caiguda de la posta (<i>egg drop syndrome virus</i>)
EEB	encefalopatia espongiforme bovina (<i>BSE, bovine spongiform encephalopathy</i>)
EET	encefalopaties espongiformes transmissibles
EEUU	Estats Units d'Amèrica
ELISA	assaig immunoenzimàtic (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ENVT	<i>Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse</i>
FSE	Encefalopatia espongiforme felina (<i>Feline Spongiform encephalopathy</i>)
GALT	Teixits limfoides associats a intestins (<i>Gut-associated Lymphoid Tissues</i>)
GPI	grup glicanfosfatidilinositol
HAdV	adenovirus humans
i.c.	intracerebral
IFF	Insomni fatal familiar
IgG	immunoglobulina tipus G
IgM	immunoglobulina tipus M

INIA	Instituto Nacional de Investigaciones Agroalimentarias
INRA	<i>Institute Nationale de la Recherche Agronomique</i>
IP	immunoprecipitació
ITR	repeticions terminals invertides (<i>inverted terminal repeats</i>)
KO	<i>knock-out</i>
MBM	farines de carn i ós (<i>meat and bone meal</i>)
MCJ	Malaltia de Creutzfeldt-Jakob
MER	material especificat de risc
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
OAdV	adenovirus ovins
ON	over night
ORF	pauta de lectura oberta
OTMS	<i>Over Thirty Month Scheme</i>
PAdV	adenovirus porcins
pb	parell de bases
PBS	tampó fosfat sòdic (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	polymerase chain reaction
PK	proteïnasa K
PMSF	<i>phenilmethylsulphonyl fluoride</i>
p/p	pes per pes
p/v	pes per volum
ROS	espècies reactives amb l'oxigen (<i>reactive oxygen species</i>)
RNA	àcid ribonucleic (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	temperatura ambient
RU	Regne Unit
SAF	Fibres associades a <i>scrapie</i> (<i>Scrapie-associated fibrils</i>)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SK	n-lauroil-sarcosine (<i>sarkosyl</i>)
SN	sobrenedant
SNC	sistema nerviós central
SOD	superòxid dismutasa
TC	tampó de càrrega
Tg	transgènic
TME	Encefalopatia transmissible de visó (<i>Transmissible Mink encephalopathy</i>)
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UE	Unió Europea
vMCJ	variant de la Malaltia de Creutzfeldt-Jakob
WB	transferència western (<i>western blotting</i>)
xg	força centrífuga

Capítol I: Introducció

1.1. Les malalties priòniques

1.1.1. Característiques generals

Les malalties priòniques, també conegudes com encefalopaties espongiformes transmissibles (EET), agrupen un conjunt de malalties neurodegeneratives fatals que afecten tant a humans com a animals. Es caracteritzen per una degeneració progressiva i letal del sistema nerviós central (SNC) al llarg d'una curta fase clínica (de 2 a 14 mesos) a la que precedeix un llarg període d'incubació de fins a 40 anys en el cas de l'home (Mead *et al.*, 2003), en el qual no s'observa cap resposta inflamatòria ni immunològica.

Des d'un punt de vista clínic, la malaltia s'associa a un estat de demència lligat a alteracions neurològiques com mioclònies (moviments involuntaris), atàxia cerebel·lar (pèrdua de coordinació i inestabilitat motriu) i declivi cognitiu. Des d'un punt de vista patològic, 3 lesions en el SNC han estat característicament descrites: vacuolació progressiva en la matèria gris de l'encèfal, pèrdua neuronal i proliferació de les cèl·lules glials, normalment astrogliosi (Beck i Daniel, 1987). A aquesta triada clàssica s'hi pot afegir en la major part de síndromes descrits la presència de plaques amiloides extracel·lulars que consisteixen en l'acumulació d'una isoforma alterada, coneguda com PrP^{Sc}, d'una proteïna expressada per l'hoste anomenada proteïna del prió i coneguda com PrP^C (Fig.1.1).

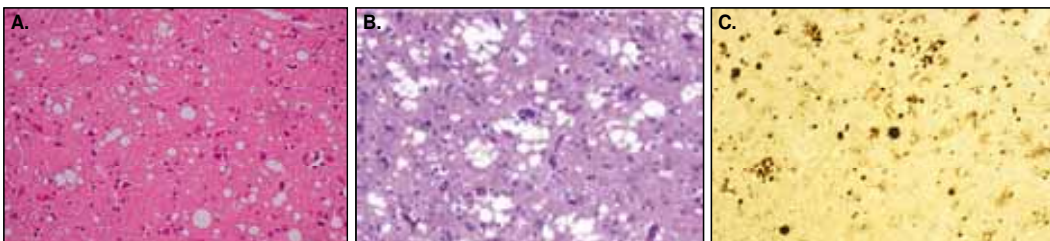


Fig. 1.1. Talls histològics mostrant neuropatologies associades a malalties priòniques. **A.** Encefalopatia espongiforme bovina. **B.** Malaltia de Creutzfeldt-Jakob. **C.** Deposició de PrP^{sc} en la variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob.

Les malalties priòniques podrien agrupar-se amb altres desordres neurodegeneratius, com la malaltia de Parkinson o la síndrome d'Alzheimer, les quals estan també associades a agregacions de proteïnes expressades constitutivament que es relacionen amb la patogènesi de la malaltia (Walsh *et al.*, 2002). No obstant, la característica més significativa de les EET és la seva transmissibilitat intra- i inter-espècie, tant experimental com natural (via oral i via parenteral) (Weissmann *et al.*, 2002). La natura de l'agent transmissible és objecte d'un agitat debat des de fa anys. La consideració inicial d'un virus de progressió lenta ha estat pràcticament descartada, bàsicament per la manca d'eficàcia dels tractaments d'inactivació d'àcids nucleics i pels fracassos en la demostració directa de la seva presència, o com a mínim d'una resposta immunològica associada. D'altra banda, cap altre patògen convencional ha pogut ser identificat. La hipòtesi més acceptada en l'actualitat considera la molècula PrP^{sc} com el propi agent infecciós capaç de provocar la conversió de la isoforma cel·lular o PrP^c en la seva pròpia conformació (Prusiner, 1982). Per tot plegat, els agents causants de les EET són inclosos dins el grup d'agents transmissibles no convencionals (ATNC).

1.1.2. Malalties priòniques humanes

Les malalties priòniques humanes han estat tradicionalment classificades en la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), la síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) i el Kuru; no obstant, poden també dividir-se en 3 categories etiològiques: esporàdiques, hereditàries o familiars, i infeccioses.

Malaltia	Etiologia	Edat	Freqüència	Clínica	Genètica
Malaltia de Creutzfeldt-Jakob (MCJ)	Esporàdica	60-70 anys	85%; 1-2 casos per 10 ⁶ individus per any	Demència (més tardana en casos esporàdics) i signes neurològics (atàxia, mioclònies...)	Mutacions espontànies no heredables en el gen <i>prnp</i>
	Familiar	50-60 anys	10-15%		Autosòmica dominant. Cosegrega amb mutacions en <i>prnp</i> (>25)
	Infecciosa (transmissió iatrogènica)	Variable	-	En funció de la ruta d'inoculació	-
Síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS)	Familiar	40-50 anys	1-10 casos per 100·10 ⁶ individus per any	Disfunció cerebel·lar crònica, demència	Autosòmica dominant. Cosegrega amb mutacions en <i>prnp</i> , especialment P102L
Insomni familiar fatal (IFF)	Familiar	50 anys	-	Insomni i trets de MCJ o GSS segons el polimorfisme en codó 129	Mutació D178N + polimorfisme en codó 129
Kuru	Infecciosa (via oral per canibalisme)	12-15 anys (4-40)	Epidèmica en illes de l'est de Papua-Nova Guinea	Atàxia cerebel·lar progressiva i demència tardana	Polimorfimes en codó 129
Variant de la MCJ (vMCJ)	Infecciosa (via oral per consum d'aliments contaminats)	29 anys (16-51)	~180 casos (160 al RU, 14 al França)	Atàxia, demència, desordres psiquiàtrics	100% casos homozigots 129MM, excepte un heterozigot 129MV

Taula 1.1. Encefalopaties espongiformes humanes.

1.1.2.1. Esporàdiques

Les EET esporàdiques inclouen gairebé el 90% dels casos de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob. Aquesta va ser definida per Spielmeyer l'any 1922 basant-se en els casos prèviament descrits per Creutzfeldt (1920) i Jakob (1921) i es tracta d'una demència fatal, de progressió força ràpida (mort en 2-3 mesos), sovint lligada a atàxia cerebel·lar i mioclònies. Afecta normalment a persones grans, amb un pic entre els 60-65 anys, en una proporció d'1-2 casos per milió de persones a l'any (Brown *et al.*, 1994).

No s'ha pogut determinar cap lligam epidemiològic entre la MCJ esporàdica i altres malalties priòniques ni s'han identificat mutacions en la línia germinal, de manera que es creu que està causada per mutacions somàtiques i/o conversions espontànies que donen lloc a l'aparició de PrP^{sc}. Això es corrobora pel fet que la infectivitat sembla estar restringida al SNC, tot i que recentment ha estat identificada també en teixits limfoides (Glatzel *et al.*, 2003), en la mucosa olfactiva (Zanusso *et al.*, 2003) i en múscul esquelètic (Glatzel *et al.*, 2003).

1.1.2.2. Hereditàries

Gairebé un 15% de les malalties priòniques són hereditàries i totes elles poden ser diagnosticades mitjançant l'anàlisi del gen *prnp*, el gen codificador de la proteïna del prió, la isoforma alterada de la qual s'acumula característicament en el SNC de pacients afectats. Les mutacions produïdes en aquest gen es transmeten de forma autosòmica dominant i predisposen a la generació de PrP^{sc} i, en gran probabilitat, a l'aparició de diferents patologies, que presenten de forma clàssica atàxia cerebel·lar amb demència en la darrera fase de la malaltia.

La MCJ familiar correspon a un 5-10% dels casos de MCJ. Està lligada a mutacions en el gen *prnp*, entre les quals la E200K és la més representativa. S'ha observat, però, que el fenotip final pot no correspondre amb les mutacions determinades, suggerint l'existència d'altres factors determinants de l'aparició de la malaltia (Goldfarb *et al.*, 1991).

La síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker té una incidència de 1-10 casos per cada 100 milions d'individus per any. Afecta individus relativament joves (edat mitja de 40-50 anys), amb un temps d'incubació d'uns 5 anys, que mostren a més plaques amiloides multicèntriques. La primera i una de les més comuns mutacions del gen *prnp*, P102L, està lligada a GSS (Hsiao *et al.*, 1989).

L'insomni familiar fatal (IFF) es caracteritza per una profunda disrupció del cicle del son en individus d'uns 50 anys causada per una forta neurodegeneració en el tàlem. Està lligada a la mutació D178N (Medori i Tritschler, 1993) que ja havia estat descrita en MCJ familiar. Es creu que el fenotip final està determinat pel polimorfisme en el codó 129, un dels més importants en el desenvolupament de les malalties priòniques. Així, quan una metionina es troba en la posició 129 (129M), GSS segrega amb la mutació, mentre que quan s'hi troba una valina (129V), és la MCJ familiar la que apareix (Goldfarb *et al.*, 1992).

1.1.2.3. Infecioses

Les formes infeccioses de les EET humanes inclouen el Kuru, la MCJ d'origen iatrogènic i, més recentment, la variant de MCJ.

El Kuru és una atàxia cerebel·lar progressiva, amb demència tardana com en MCJ de caràcter esporàdic, amb plaques amiloides florides (envoltades de vacuoles espongiformes), d'una durada clínica mitja de 12 mesos. Va ser descrita per Gajdusek l'any 1957 en la ètnia *Fore* de les illes de l'est de Papua-Nova Guinea (Gajdusek, 1977). La malaltia va arribar a dimensions d'epidèmia mitjançant la transmissió de l'agent patògen al llarg de generacions, probablement produït per un cas de MCJ esporàdic, a través de rictus caníbals. De forma significativa, a més, l'al·lel 129V presenta en aquella regió la freqüència més elevada (0.55) observada arreu (Mead *et al.*, 2005).

La MCJ iatrogènica és la versió de la malaltia adquirida en el procés mèdic degut a transplantament de còrnia, transplantament de dura-mare, l'ús de material quirúrgic contaminat, o arrel de tractaments amb preparacions hormonals derivades d'hipòfisis de cadàvers humans (Gibbs *et al.*, 1993; Huillard *et al.*, 1999). Cal destacar que les inoculacions oculars o intracerebrals es manifesten clínicament com a MCJ clàssic, mentre que les inoculacions perifèriques mostren més aviat el fenotip del Kuru. Així, és lògic que el temps d'incubació en el primer cas sigui curt (14-46 mesos) respecte al segon cas (12-15 anys).

La variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) va ser descrita per primer cop per Will i cols. (1996) al Regne Unit com una malaltia força diferent a les altres formes de MCJ, que afectava a gent jove (16-51 anys), de promig 29 anys, d'una forma particularment agressiva. A més dels signes clàssics d'atàxia i demència, els pacients mostraven desordres psiquiàtrics i de comportament greus al llarg del període inusualment llarg de durada de la malaltia (promig de 14 mesos) (Ziedler *et al.*, 1997). A nivell neuropatològic s'observa la clàssica triada, més severa en els ganglis basals i en el tàlem, i la presència abundant de plaques amiloides florides en el còrtex cerebral i cerebel·lar. En el cas de la vMCJ, es produeix una colonització generalitzada d'òrgans limfoides que donen lloc a l'acumulació de PrP^{sc} en estadis preclínics en les amígdales

(Hilton *et al.*, 2002; Ironside *et al.*, 2000) i en altres teixits limfoides perifèrics (Wadsworth *et al.*, 2001), permetent un diagnòstic específic i sensible, alhora que *ante-mortem*, mitjançant biòpsies de les amígdales (Hill *et al.*, 1999). Cal destacar que gairebé el 100% dels casos de vMCJ corresponen a genotips homozigots per a la metionina en la posició 129 de la PrP, genotip considerat com el més sensible. En general, a jutjar pels signes clínics i les propietats neuropatològiques, la vMCJ s'assembla més al Kuru que a la MCJ esporàdica, la qual cosa podria estar lligada a la via de transmissió oral.

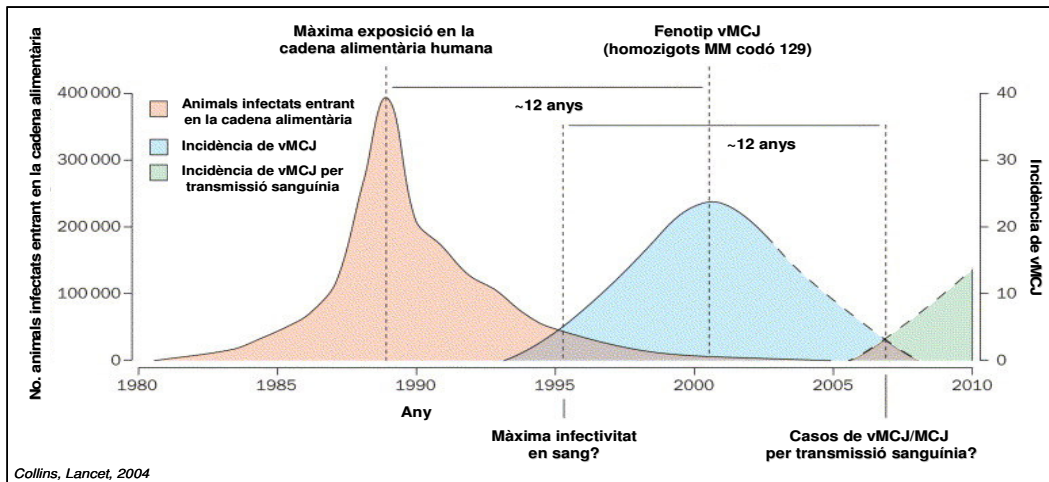


Fig. 1.2. Evolució de la vMCJ al llarg del temps d'acord amb l'entrada d'animals infectats d'encefalopatia espongiforme bovina (EEB) en la cadena alimentària humana i el temps d'incubació de la malaltia.

La malaltia ha causat fins ara 188 casos, dels quals 160 s'han diagnosticat al Regne Unit, mostrant un màxim l'any 1999 amb 29 casos (Will, 2006). Actualment sembla que la incidència de la malaltia s'ha estabilitzat i tendeix a descendir (Valleron *et al.*, 2001). No obstant, la destacada disseminació en teixits limfoides ha generat noves consideracions sobre una possible transmissió home a home de la vMCJ degut a transplantaments d'òrgans i transfusions sanguínies. Aquesta darrera via, que ja havia estat diagnosticada en alguna EET animal (Houston *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2002), ha estat confirmada per la publicació recent de 2 casos de contaminació en humans amb vMCJ (Llewelyn *et al.*, 2004; Peden *et al.*, 2004), un dels quals és a més heterozigot per al codó 129. Tot plegat ha induït a hipotetitzar una segona onada de vMCJ (Fig. 1.2).

D'altra banda, diversos estudis en ratolins han determinat la no correlació entre l'acumulació de PrP^{sc} i l'expressió de la malaltia, provocant la reconsideració del concepte d'infecció subclínica o latent (Race *et al.*, 2001; Thacray *et al.*, 2002). Aquest estat clínic podria estar present també en els humans d'acord amb l'estudi retrospectiu publicat per Hilton i cols. (2004). Analitzant teixits d'amígdals i apèndixs procedents de més de 10,000 individus en el Regne Unit, aquests autors han estimat una prevalença de 237 casos per milió d'individus, dels que es desconeix quins són portadors preclínic i quins seran portadors permanentment asimptomàtics.

1.1.3. Malalties priòniques animals

Les malalties priòniques animals inclouen principalment la tremolor ovina o *scrapie*, l'encefalopatia espongiforme bovina (EEB) i la malaltia caquetitzant crònica (CWD). Es considera que altres encefalopaties espongiformes, com les que afecten a visons (encefalopatia transmissible del visó, TME) (Marsh, 1992) i a diferents espècies de felins (encefalopatia espongiforme felina, FSE) (Pearson *et al.*, 1992), estan associades a la ingesta d'aliments contaminats –a vegades no directament relacionats amb l'agent EEB- i/o la manca de barrera interespecífica. Un resum de les principals característiques de les malalties priòniques animals es descriu en la Taula 1.2.

Malaltia	Etiologia	Edat	Freqüència	Clínica	Genètica
Scrapie	Infecciosa. Trasmisió horitzontal (aliments, fluids) i perinatal	2-4 anys	1-5% segons el ramat	Canvis temperamentals, atàxia, tremolors	Polimorfismes en codons 136, 154 i 171
Encefalopatia espongiforme bovina (BSE)	Infecciosa. Via oral (consum MBM)	4-5 anys	~300.000 casos confirmats	Canvis temperamentals, atàxia	No s'han descrit polimorfismes susceptibles
Malaltia caquetitzant crònica (CWD)	Infecciosa. Trasmisió horitzontal (medi, fluids)	2-7 anys (1.5-17)	1-5% en regions endèmiques	Pèrdua de pes, apatia, atàxia	No s'han descrit polimorfismes susceptibles
Encefalopatia transmissible de visó (TME)	Infecciosa. Trasmisió desconequada	>1 any	brots en granges dels EEUU	Pèrdua de pes, canvis temperamentals	No s'han descrit polimorfismes susceptibles
Encefalopatia espongiforme felina (FSE)	Infecciosa. Via oral (consum aliments contaminats amb BSE)	-	~110 casos	Similar a l'BSE	No s'han descrit polimorfismes susceptibles

Taula 1.2. Encefalopaties espongiformes animals.

1.1.3.1. Tremolor ovina o *scrapie*

La encefalopatia espongiforme d'ovelles i cabres o *scrapie* és un desordre neurodegeneratiu del SNC reconegut des de fa més de 200 anys (McGowan, 1922) i endèmic gairebé arreu del món amb l'excepció d'Austràlia i Nova Zelanda. La simptomatologia és molt variable en cada animal afectat, però inclou generalment canvis de temperament, pèrdua de coordinació muscular i pes, tremolors i, finalment, la mort, en un termini mig de 14 a 22 mesos. Neurològicament, s'observen els trets habituals de pèrdua neuronal, vacuolització intracel·lular i astrogliosi.

Arrel de diversos estudis fets sobre la raça d'ovelles Cheviot (Hunter *et al.*, 1996; Goldmann *et al.*, 1994), s'infereix que els polimorfismes en els codons 136, 154 i 171 determinen amb escreix la susceptibilitat a la malaltia. Així, els genotips que presenten una glutamina (Q) en la posició 171 són altament susceptibles, mentre els genotips A₁₃₆R₁₅₄R₁₇₁/ARR en són resistent (Elsen *et al.*, 1999). Tot i que altres factors determinants de la malaltia no són en cap cas descartables (Hunter *et al.*, 1997), aquest fenomen permet seleccionar genèticament les races per tal d'incrementar la resistència a la malaltia, tal com s'està realitzant actualment a França (Vitezica *et al.*, 2005).

Es creu que l'*scrapie* pot generar-se de forma esporàdica (freqüència d'1-5% segons ramat) i transmetre's de forma natural entre els animals. S'han descrit transmissions horitzontals per contacte directe (Woolhouse *et al.*, 1998), per contacte amb la placenta i altres líquids placentals (Andréoletti *et al.*, 2002), o per contaminació accidental, com en el cas de la vacuna ovina contra l'encefalomielitis ovina preparada a partir extractes encefàlics d'ovella tractats amb formaldehid (Gordon, 1946). A més, es creu que és l'origen de l'epidèmia d'encefalopatia espongiforme bovina degut a la modificació del procés de fabricació dels pinsos complementats amb proteïnes d'origen animal (Wilesmith *et al.*, 1988). L'alta transmissibilitat de l'*scrapie* respecte a altres EET és probablement causada per l'ample distribució de l'agent infeccios pel sistema nerviós central i perifèric, els òrgans limfoides, la melsa i la placenta. Recentment, s'ha descrit la seva presència en miòcits (Andréoletti *et al.*, 2004) i en glàndules mamàries (Ligios *et al.*, 2005), tot i que la infecciositat en la llet no s'ha arribat mai a demostrar. La demostració de la transmissió preclínica de l'*scrapie* i de l'EEB inoculada en ovella mitjançant transfusions sanguínies indica que, a part dels nuclis de replicació, l'agent infeccios circula de forma significativa per l'organisme probablement associat a limfòcits B (Houston *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2002).

1.1.3.2. Encefalopatia espongiforme bovina (EEB)

L'encefalopatia espongiforme bovina o EEB, més comunament coneguda com a *malaltia de les vaques boges*, va aparèixer per primer cop al Regne Unit en 1986 (Wells *et al.*, 1987) i es va estendre com una epidèmia afectant principalment aquest país, però també Suïssa, Portugal, Irlanda, etc. Se n'han detectat fins ara més de 280.000 casos, dels quals el 80% corresponen a vaques lleteres. Es tracta d'una neurodegeneració que afecta individus de 4-5 anys amb simptomatologia semblant a l'*scrapie* d'ovelles sense presència de tremolors. La neuropatologia és també molt semblant a la de l'*scrapie* (Wells *et al.*, 1992) i, a nivell genètic, la seqüència del gen *prnp* boví varia tan sols en 7 o 8 punts a la d'ovella, induint tot plegat a creure en un origen comú. Sorprenentment, l'acumulació i distribució de la PrP^{sc} en els casos d'EEB difereix bastant en comparació a l'*scrapie* i es restringeix quasi totalment a l'encèfal, la medul·la espinal, les amígdales i la retina, sense presència destacable de plaques amiloides. Els estudis d'inoculació experimental realitzats a Anglaterra n'han manifestat també la presència en la paret de l'intestí prim inferior, concretament a l'íleon distal (Wells *et al.*, 1994).

Els primers estudis epidemiològics desenvolupats ja van determinar l'origen de l'epidèmia d'EEB en el consum d'aliments contaminats (Wilesmith *et al.*, 1992). Sembla que va sorgir de l'alimentació dels animals amb pinsos d'origen animal contaminats amb farines de carn i ós derivats de bestiar oví, boví, porcí, aviar, etc., la variació del mètode de preparació de les quals va permetre sobreviure a l'agent infeccios procedent presumiblement d'ovelles afectades d'*scrapie*, o d'animals salvatges infectats amb algun tipus d'EET. Efectivament, l'entrada de la prohibició de l'ús de farines de carn i ós o *MBM* (de l'anglès, *meat and bone meal*) per a l'alimentació del bestiar en 1996 ha provocat un descens del nombre de casos declarats, tot i que alguns han estat encara detectats en vaques *barb* (de l'anglès, *born after the real ban*).

La hipòtesi de la contaminació alimentària sembla també la més plausible per desxifrar l'origen de la vMCJ en humans, doncs l'agent infeccios causant de la vMCJ sembla indistingible del causant de l'EEB (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997). L'enorme adaptabilitat observada per l'agent infeccios de l'EEB per a infectar a altres

espècies ha suggerit la possibilitat d'una nova transmissió al bestiar oví que podria manifestar-se en els pròxims anys o mantenir-se de forma subclínica (Kao *et al.*, 2002; Schreuder i Somerville, 2003; Eloit *et al.*, 2005).

1.1.3.3. Malaltia caquectitzant crònica (CWD)

També coneguda com CWD (de l'anglès, *chronic wasting disease*), es tracta d'una malaltia rara caracteritzada per una pèrdua de pes, apatia i atàxia, que condueix a la mort en uns 16 mesos (Williams, 2005). Es diagnostica principalment en diverses espècies de cérvols i ants dels EEUU (Fig. 1.3). No sembla estar relacionada amb l'EEB i, tot i els estudis d'infectivitat que s'han realitzat (Raymond *et al.*, 2000), el seu origen no està clar (Race *et al.*, 2002). La malaltia s'ha descrit en animals captius i animals en llibertat i, degut a l'ampli grup de cèrvids afectats, sembla que una contaminació horitzontal i indirecta és la ruta més important de transmissió (Miller i Williams, 2003). En aquest sentit s'ha suggerit la transmissibilitat de l'agent entre diferents espècies de cèrvids (Williams *et al.*, 2002), el contagi per contacte directe entre els animals (Miller *et al.*, 2000) i el paper del medi ambient com a reservori per al manteniment de l'epidèmia (Miller *et al.*, 2004), fenomen sobre el que s'incideix més endavant.

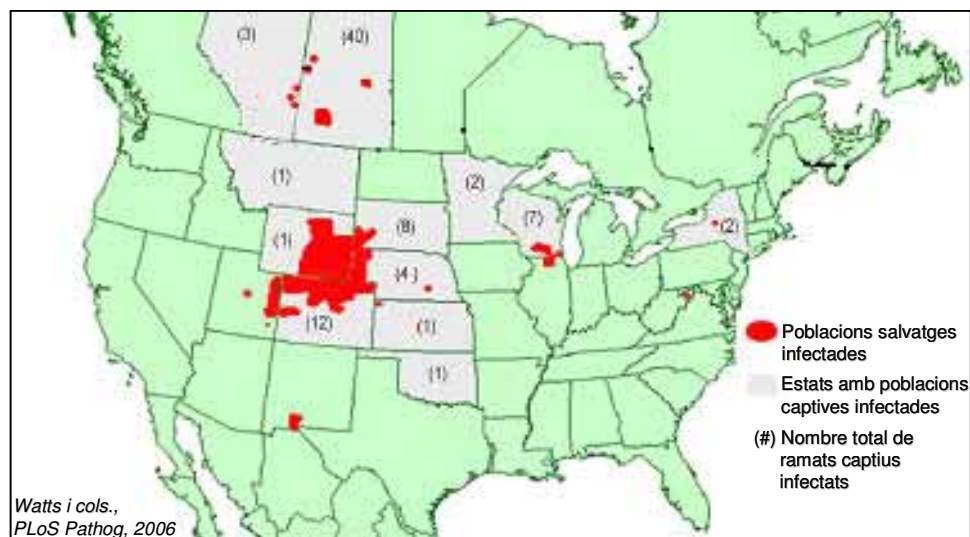


Fig. 1.3. Epidemiologia de CWD a Nord Amèrica.

1.2. L'agent infeccios o prió

Tot i que l'*scrapie*, la primera EET identificada, va ser focus de certes investigacions principalment a causa del seu origen, no ha estat fins el reconeixement que les malalties priòniques són transmissibles i afecten els humans de la mateixa manera que els animals que s'ha produït un increment extraordinari en la recerca i l'interès científic sobre la natura dels agents causants d'aquestes malalties.

1.2.1. La hipòtesi de *tan sols proteïna*

L'encefalopatia espongiforme transmissible prototípica és l'*scrapie*, una malaltia que es produïa de forma natural afectant ovelles i cabres. La transmissibilitat de l'agent *scrapie* va ser demostrada per primera vegada l'any 1936 mitjançant inoculació en ovelles (Cuillé i Chelle, 1939). Es va assumir aleshores que alguna mena de virus n'era el causant, i es va definir el terme d'infecció viral lenta degut al llarg temps d'incubació observat. En la dècada dels 50, va tenir lloc l'epidèmia de Kuru entre individus de l'ètnia *Fore*, conduint Hadlow i altres a remarcar les similituds existents a nivell neuropatològic i clínic entre la nova malaltia i l'*scrapie* (Klatzo *et al.*, 1959; Hadlow *et al.*, 1959). La transmissió per inoculació intracerebral en ximpanzés del Kuru (Gajdusek *et al.*, 1966) i de la MCJ (Gibbs *et al.*, 1968) van dur a generar el concepte de demències transmissibles.

A finals dels anys 60, Alper i cols. (1967) ja van remarcar l'elevada resistència de l'agent infeccios al tractament amb radiació ultraviolada, suggerint a que havia d'estar desprovist d'àcid nucleic. Això va dur a Griffith a hipotetitzar per primera cop la seva natura proteica i autoreplicativa (1967). Arrel de l'espectre d'inactivació i de l'aïllament en homogeneïtzats d'encèfal d'una proteïna resistent a proteases (Bolton *et al.*, 1982), Prusiner va reformular la hipòtesi de Griffith donant lloc al que es coneix com la hipòtesi de *tan sols proteïna* (Prusiner, 1982). En ella, es defineix el terme prió (de les primeres lletres de *proteinaceous infectious particle*, amb les vocals invertides) com a '*small proteinaceous infectious particles that resist inactivation by procedures which modify nucleic acids*' per tal de diferenciar-lo completament de virus i viroids. Bàsicament, la hipòtesi de *tan sols proteïna* proposa que el prió, també denominat PrP

per *prion protein* o *protease-resistant protein*, consisteix en una isoforma conformacional d'una proteïna normal codificada per l'hoste, denominada PrP^c (c, per cel·lular), que es troba en la superfície de les neurones (Oesch *et al.*, 1985; Basler *et al.*, 1986). La isoforma alterada, coneguda com PrP^{sc} (sc, per *scrapie*), seria capaç d'induir el canvi conformacional de la isoforma nativa en la patògena en un procés autocatalític que condueix a la formació d'agregats amiloides que són reconeguts com a fibres sota un microscopi, conegudes com SAF (de l'anglès, *scrapie-associated fibrils*). Així doncs, els prions poden actuar com a veraders elements infecciosos, sense tenir un àcid nucleic associat, en el sentit que es poden autoreplicar i ser transmissibles. La proteïna del prió que s'observa en els extractes d'homogeneïtzats encefàlics després del tractament amb proteases mesura entre 27 i 30 kDa, de manera que també s'ha descrit com a PrP^{res} o PrP²⁷⁻³⁰. En contraposició, la isoforma no alterada és clarament sensible a proteases i és coneguda també com PrP^{sen}. Per tal de diferenciar entre els diferents desordres produïts, s'utilitza sovint la nomenclatura PrP^{EEB}, PrP^{CWD}, etc., encara que últimament s'ha introduït la forma generalitzadora PrP^d (de l'anglès *disease causing o disease-associated*).

Segle XVIII	Primeres descripcions d' <i>scrapie</i> en ovelles (McGowan, 1922)
1920	Descripció dels primers casos de MCJ (Creutzfeldt, 1920) i Jakob (1921)
1937	Contaminació amb <i>scrapie</i> en ovelles vacunades a partir de teixits encefàlics (Gordon, 1946)
1939	Transmissió experimental d' <i>scrapie</i> en cabres (Cuillé i Chelle, 1939)
1957	Descripció del Kuru en ètnies de les illes de Papua-Nova Guinea (Gajdusek, 1957)
1959	Similaritats entre <i>scrapie</i> i kuru (Hadlow <i>et al.</i> , 1959; Klatzo <i>et al.</i> , 1959)
1963	Transmissió experimental del kuru en ximpanzés (Gajdusek <i>et al.</i> , 1966)
1966	Observacions de la resistència de l'agent <i>scrapie</i> a la radiació ultraviolada (Alper <i>et al.</i> , 1967)
1967	Formulació de la hipòtesi de <i>tan sols proteïna</i> (Griffith, 1967)
1968	Transmissió experimental de la MCJ en ximpanzés (Gibbs <i>et al.</i> , 1968)
1982	Identificació d'una proteïna hidrofòbica i resistent a proteases en homogeneïtzats enriquits amb <i>scrapie</i> (Bolton <i>et al.</i> , 1982)
	Definició del concepte prió i reformulació de la hipòtesi de <i>tan sols proteïna</i> (Prusiner, 1982)
1985	Clonatge del gen codificador de la PrP ^c (Chesebro <i>et al.</i> , 1985; Oesch <i>et al.</i> , 1985)
1986	Tant la PrP ^c com la PrP ^{sc} provenen del mateix gen (Basler <i>et al.</i> , 1986)
1987	Primeres descripcions de casos d'BSE (Wells <i>et al.</i> , 1987)
1989	Primera mutació descrita a una EET hereditària (Hsiao <i>et al.</i> , 1989)
1990	La PrP ^{sc} prové de modificacions post-traduccionals de la PrP ^c (Borchelt <i>et al.</i> , 1990; Caughey i Raymond, 1991)
1993	Ratolins <i>knock-out</i> per al gen <i>prnp</i> són resistent a <i>scrapie</i> (Büeler <i>et al.</i> , 1993; Sailer <i>et al.</i> , 1994)
	Descripció de les diferències de conformació entre PrP ^{sc} i PrP ^c (Pan <i>et al.</i> , 1993)
1994	Conversió acel·lular de PrP ^c en PrP ^{res} (Kocisko <i>et al.</i> , 1994)
1996	Primera descripció d'un cas de vMCJ (Will <i>et al.</i> , 1996)
1997	Establert el lligam entre la vMCJ i l'BSE (Bruce <i>et al.</i> , 1997; Hill <i>et al.</i> , 1997)
1999	Identificació de la proteïna Doppel, un homòleg de la PrP (Moore <i>et al.</i> , 1999)
2000	Transmissió d'BSE en ovella per transfusió sanguínia (Houston <i>et al.</i> , 2000)
2001	Conversió de PrP ^c en PrP ^{res} per amplificació cíclica (Saborio <i>et al.</i> , 2001)
2003	Primers casos atípics d' <i>scrapie</i> descrits (Benestad <i>et al.</i> , 2003)
2004	Transmissió de vMCJ en humans per transfusió sanguínia (Llewelyn <i>et al.</i> , 2004; Peden <i>et al.</i> , 2004)
2004	Generació de prions infecciosos <i>in vitro</i> (Legname <i>et al.</i> , 2004)
2005	Prions generats <i>in vitro</i> són capaços d'infectar hàsters salvatges (Castilla <i>et al.</i> , 2005)

Fig. 1.4. Cronologia de les encefalopaties espongiformes transmissibles (EET).

En l'actualitat, se sap que no existeix cap diferència en la estructura primària de la PrP^{sc} i la PrP^c i que la primera deriva de la segona per modificació post-traducciona (Borchelt *et al.*, 1990; Caughey i Raymond, 1991). S'ha demostrat que ratolins deficients pel gen codificador de la proteïna del prió són completament resistent a l'*scrapie* i no transmeten la malaltia (Büeler *et al.*, 1993; Sailer *et al.*, 1994), però, en canvi, recuperen la susceptibilitat quan el transgèn torna a ser introduït (Fischer *et al.*, 1996). Tot i aquestes evidències, la hipòtesi de *tan sols proteïna* no acaba de ser completament acceptada per la comunitat científica, fonamentalment perquè és difícil de justificar l'existència de diverses soques o aïllats no explicables per diferències genètiques. En aquest sentit, diverses consideracions, incloent virus o cofactors, han estat introduïdes (Weissmann, 1991; Manuelidis, 2006). D'altra banda, experiments recents han demostrat la transformació d'una PrP obtinguda *in vitro* per amplificació cíclica a partir d'una mínima dosi de PrP^{sc} i la capacitat d'infecció d'aquests prions artificials en hámsters salvatges (Castilla *et al.*, 2005). Aquest principi ja havia estat demostrat per Legname i cols. (2004), si bé la capacitat d'infecció quedava restringida a ratolins transgènics. Aquests treballs donen un fort recolzament a la hipòtesi de *tan sols proteïna*, ja que demostren la creació *de novo* d'agents infecciosos a partir de PrP, resolent una de les condicions fortament exigides per a la validació d'aquesta hipòtesi.

1.2.2. El gen *prnp*

La proteïna priònica cel·lular es troba codificada en el gen *prnp* localitzat en el cromosoma 20 del genoma humà. Es tracta d'un gen força conservat entre els mamífers que generalment està format per 3 exons. Els dos primers no es tradueixen i queden units per *splicing* al tercer que conté la regió codificant d'uns 750 nucleòtids aproximadament, si bé el fet que el codó d'iniciació es troba a 3' del lloc d'*splicing* impossibilita l'existència de formes alternatives.

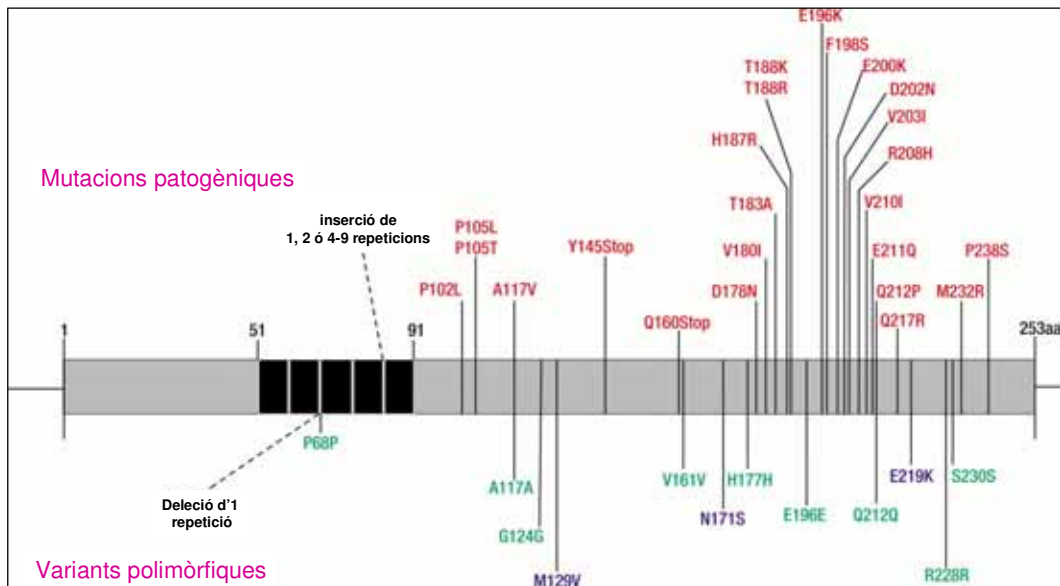


Fig. 1.5. El gen *prnp* i les mutacions descrites en humans.

El gen *prnp* és relativament poc polimòrfic, si bé existeixen polimorfismes clarament determinants de la susceptibilitat a desenvolupar EET en totes les espècies de mamífers (Fig. 1.5). En el cas dels humans s'ha pogut observar la relació directa entre l'heterozigotisme en el codó 129 i la susceptibilitat a MCJ. Així, el 75% dels casos de MCJ esporàdica i tots els casos de vMCJ, excepte un de transfusió sanguínia, presenten homozigosi per metionina en la posició 129, sent doncs l'heterozigosi per valina un genotip clarament protector. Cal destacar que tenint en compte els llargs temps d'incubació de les EET és encara possible l'aparició de casos en els genotips actualment no afectats (Peden *et al.*, 2004). Altres genotips han estat també associats a neurodegeneracions humanes: s'han descrit més de 25 mutacions lligades a la MCJ d'etiologia familiar, així com la mutació P102L, i altres bastant menys freqüents, associades a GSS.

En el cas de les EET animals, cal destacar la dependència del *scrapie* del polimorfisme dels codons 136 (alanina (A) o valina (V)), 154 (arginina (R) o histidina (H)) i 171 (arginina (R) o glutamina (G)), de manera que els genotips portadors dels al·lels VRQ i ARQ són altament sensibles i els homozigots per ARR són resistent tant a l'*scrapie* com a l'EET experimental. Aquesta última consideració ha estat posada en dubte recentment arran d'un cas atípic d'*scrapie* i pot suposar un handicap per als programes de selecció genètica en bestiar oví (Buschmann *et al.*, 2004).

Pel que fa a CWD, es disposa de poques dades sobre la influència genètica en CWD, però les disponibles indiquen que tots els genotips en cérvols en són susceptibles, si bé l'homozigosi per metionina en el codó 132 i l'homozigosi G/G en posició 96 en confereixen un grau superior (Williams, 2005; O'Rourke *et al.*, 2004).

1.2.3. La proteïna priònica cel·lular

El producte traduït a partir de l'RNA missatger és una cadena polipeptídica d'uns 250 aminoàcids en la que es pot distingir:

- un pèptid senyal de 22 aminoàcids que permet la translocació de la proteïna dins el reticle endoplasmàtic cel·lular (RE) i que és processat post-traduccionament,

- una regió amino-terminal desestructurada d'uns 80-90 aminoàcids que conté un segment de cinc repeticions d'un octapèptid de seqüència PHGGGWGQ; aquesta regió té capacitat per acoblar fins a 4 ions Cu^{2+} i es creu que podria adquirir estructura un cop unida al core (Jackson *et al.*, 2001),

- una regió carboxi-terminal hidrofòbica, altament estructurada, que conté segments intramoleculars molt conservats (109-122, 129-140, 178-191, 202-218). Aquesta regió rep diferents modificacions post-traduccionals: l'addició d'un grup glicanfosfatidilinositol (GPI) en l'últim aa (normalment una serina en posició 231), l'establiment d'un pont disulfur intramolecular (Cys₁₇₉-Cys₂₁₄) i la glicosilació de dos residus asparragina (Asn₁₈₁-Asn₁₉₇). De fet, el motiu Asn-X_{aa}-Thr rep la transferència de la seqüència glucídica Glc₃Man₉GalNAc₂ (motiu de reconeixement de calnexina, una xaperona) que es va modificant formant antenes de glúcids, de manera que s'hi han arribat a trobar fins a 52 sucres diferents (Rudd *et al.*, 2001). La presència de dos punts de glicosilació provoca la identificació de 3 bandes de mobilitat electroforètica diferent segons si la proteïna es troba diglicosilada, monoglicosilada o no glicosilada.

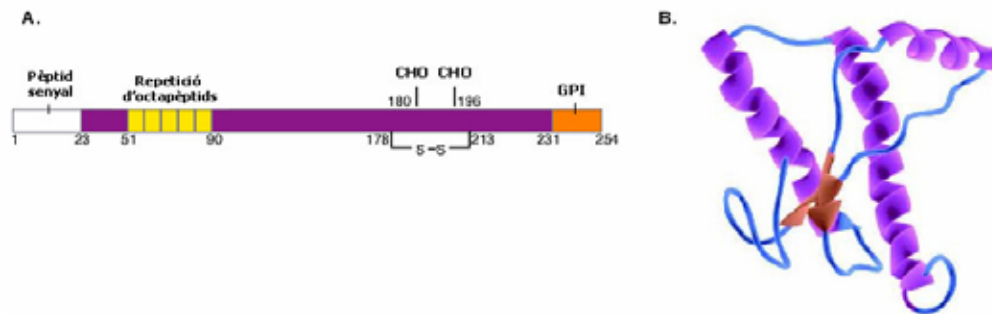


Fig. 1.6. A. Estructura primària de la proteïna priònica murina. B. Estructura secundària i terciària de la proteïna priònica cel·lular o PrP^C.

L'estructura de la PrP^C no ha estat encara determinada mitjançant cristal·lografia, no obstant les dades obtingudes a partir de molècules recombinants permeten de fer-ne una aproximació (Fig. 1.6). Gairebé 2/3 de la molècula –el segment carboxi-terminal– s'estructuren en un domini globular en forma de 3 hèlix α i una petita làmina β (Donne *et al.*, 1997). La proteïna no presenta formes intermèdies en el procés de plegament, de manera que és improbable que la PrP^{Sc} es generi a partir d'un intermediari proteic -com s'hipotetitza per a altres malalties amb formacions amiloides, com ara la malaltia d'Alzheimer-, sinó que més aviat es crearia d'una forma no plegada (Wildegger *et al.*, 1999).

La proteïna priònica cel·lular és una proteïna d'expressió constitutiva, però significativament superior en el SNC. Es tracta d'una sialoproteïna de 33-35 kDa de pes molecular que resta ancorada mitjançant el seu grup glicanfosfatidilinositol a la membrana cel·lular. No obstant, Lingappa i cols. han identificat dues formes transmembrana procedents d'una translocació accidental en el reticle endoplasmàtic: la denominada ^{Ntm}PrP, que mostra l'extrem amino-terminal en el lumen reticular, i la ^{Ctm}PrP, que hi mostra l'extrem carboxi-terminal (Hegde *et al.*, 1999). Aquesta última és neurotòxica i es creu que pot estar lligada a certes formes de malalties priòniques, car algunes mutacions en el *prnp* associades a formes hereditàries acumulen alts nivells de ^{Ctm}PrP.

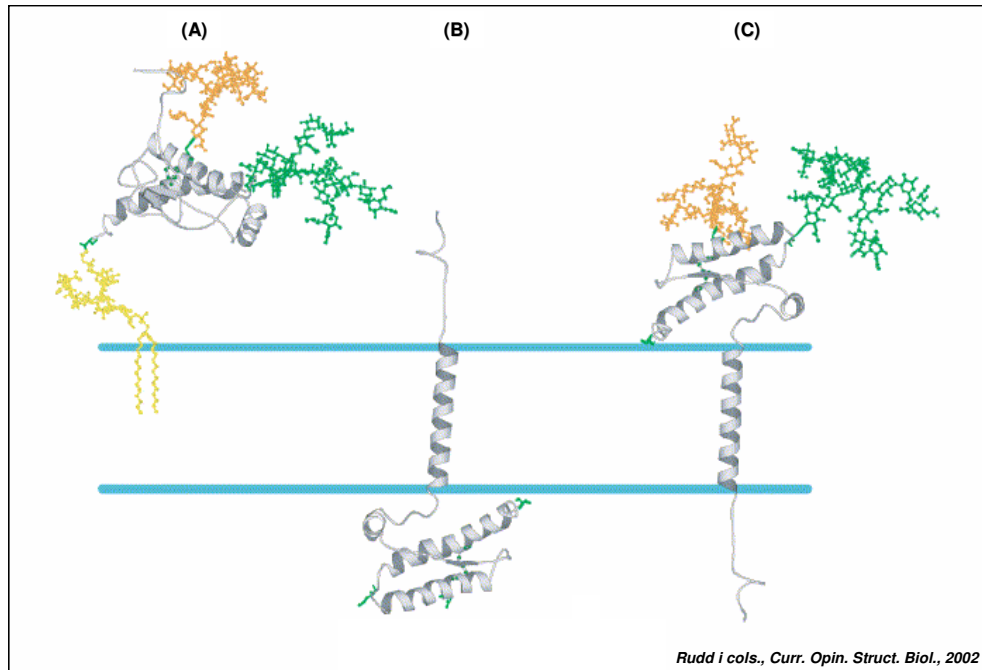


Fig. 1.7. Les 3 formes topològiques de PrP: (A) proteïna priònica cel·lular, (B) N^{tm} PrP, i (C) C^{tm} PrP.

La funció de la PrP^c continua sent bastant desconeguda tot i la gran quantitat de treballs versats sobre aquest tema. En termes generals, sembla que no presenta una funció essencial per l'organisme (Bueler *et al.*, 1992); no obstant, s'han proposat 4 grans línies per a discernir el seu paper fisiològic:

a) receptor neuronal implicat en sinapsi. Els alts nivells d'expressió de PrP en el SNC, en particular en associació amb membranes sinàptiques, i en cèl·lules del sistema immunitari, pressuposen la idea d'un receptor neuronal. Ratolins transgènics *prnp*^{-/-} presenten anomalies en la fisiologia sinàptica i alteracions en el son i els ritmes circadians (Collinge *et al.*, 1994).

b) receptor neuronal implicat en apoptosi. Diferents treballs han suggerit la transmissió de senyals de supervivència neuronal per part de la PrP^c (Kuwahara *et al.*, 1999; Chiarini *et al.*, 2002; Solforosi *et al.*, 2004), però potser el descobriment del gen *prnd* i la proteïna *doppel*, un homòleg de PrP, és el més significatiu (Moore *et al.*, 1999).

c) metal·loproteïna. Bastants investigadors argumenten que la proteïna priònica cel·lular actua com a metal·loproteïna *in vivo* per la seva capacitat d'unir coure, de manera que podria presentar una funció d'internalització i metabolisme d'aquest ió en la cèl·lula (Jackson *et al.*, 2001).

d) antioxidant. S'ha vist que la PrP^c té acció superòxid dismutasa (SOD) i, en cèl·lules *prnp*^{-/-}, s'incrementa l'estrès oxidatiu com a resultat del descens en l'activitat SOD1 (Brown i Besinger, 1998). Es creu, doncs, que pot protegir les neurones contra espècies reactives d'oxigen o ROS (de l'anglès, *reactive oxygen species*).

1.2.4. La isoforma patògena

La PrP^{sc} és la isoforma alterada, patògena, de la proteïna priònica cel·lular. Les dues isoformes són indistingibles, però mitjançant espectroscopia infrarroja transformada de Fourier s'ha observat que la PrP^{sc} presenta un alt contingut en làmina β (43%) per detriment del contingut en hèlix α (30%) (Pan *et al.*, 1993; Stahl *et al.*, 1993). Es aquesta riquesa en làmines β la que confereix a la PrP^{sc} propietats característiques úniques i completament diferents a les del seu isòmer conformacional:

- mentre la PrP^c és completament sensible al tractament amb proteïnasa K, la PrP^{sc} n'és parcialment resistent, perdent tan sols el seu extrem amino-terminal i generant un nucli o core de pes molecular d'entre 27 i 30 kDa.
- La PrP^{sc} és clarament hidrofòbica i insoluble en medi aquós, però soluble en certs detergents orgànics.
- L'agrupació de làmines β hidrofòbiques implica la generació d'agregats en forma de fibres o SAF, clarament visibles en talls histològics, típicament refringents a la tinció amb vermell Congo.
- Els SAF resisteixen la inactivació per tractaments físico-químics com ara aldehids, calor, llum ultraviolada, àcid fòrmic, i són parcialment resistents a altres com la sosa o l'hipoclorit sòdic (Taylor, 2000).

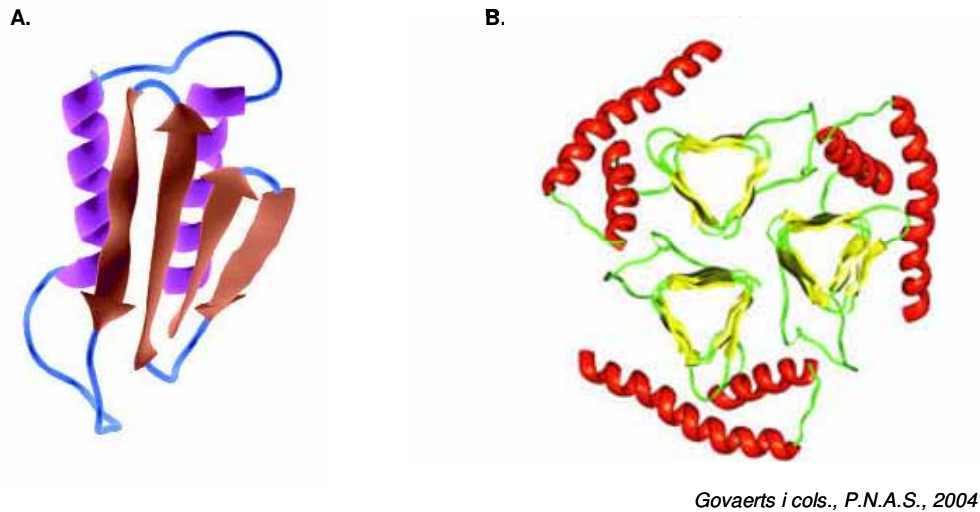


Fig. 1.8. A. Estructura secundària i terciària de la PrP^{Sc}. B. Model hipotètic d'estructura en forma de trímers.

Des que Prusiner (1982) va postular la hipòtesi de *tan sols proteïna*, s'han realitzat molts esforços per dilucidar el paper de la PrP^{Sc} en les malalties priòniques. Si bé no es pot admetre definitivament que la PrP^{Sc} és *per se* l'agent infeccios de les EET, es pot afirmar que la seva presència correlaciona amb infectivitat (Bueler *et al.*, 1993; McKinley *et al.*, 1983; Meyer *et al.*, 1986; Prusiner *et al.*, 1982; Somerville *et al.*, 1986) i que és l'únic marcador inqüestionable de la infecció (Farquhar *et al.*, 1989, 1993; Ikegami *et al.*, 1991; Katz *et al.*, 1992; Muramatsu *et al.*, 1994; Mohri *et al.*, 1992). Cal dir que existeixen casos d'infectivitat en absència de PrP^{res} detectable (Collinge *et al.*, 1995; Wille *et al.*, 1996; Lasmezas *et al.*, 1997), si bé en alguns d'ells hi podria estar implicada la presència de formes transmembrana.

Els mecanismes involucrats en la conversió de la PrP^c en l'agent infeccios continuen actualment sent desconeguts. D'acord amb la hipòtesi formulada per Prusiner, el model general postulat es basa en la idea que existeix un equilibri entre la conformació nativa i la conformació patològica, presentant aquesta última la capacitat d'autoassociar-se ordenadament i produir una superestructura estable. A partir d'aquesta mena de llavor estructural, les molècules de PrP serien segrestades i successivament transformades en molècules en PrP^{Sc}. Així, el sistema seria extremadament sensible a la concentració de PrP^c (Bueler *et al.*, 1993; Prusiner *et al.*, 1990, Telling *et al.*, 1995), a

l'equilibri entre les dues isoformes i a la complementaritat superficial entre els isòmers, essent clau la regió 96-167 (Prusiner *et al.*, 1990; Palmer *et al.*, 1991). Dins d'aquest model, s'han postulat principalment dues possibles variants respecte a com es produeix el segrest i la transformació (Fig. 1.9).

- El model de desnaturalització i renaturalització catalitzada assumeix el canvi conformacional com l'etapa clau i, alhora, limitant, doncs la compara a una reacció enzimàtica. Una forta barrera energètica evita la conversió espontània i la PrP^c d'una altra espècie actuaría com a inhibidor competitiu (Prusiner *et al.*, 1997).
- El model de polimerització nucleada estableix la coexistència en equilibri intracel·lular i reversible de les dues isoformes, fins que es produeix l'estabilització de la forma patològica en un procés llarg que justifica el temps d'incubació de la malaltia. Un cop trencat l'equilibri es facilita el reclutament de noves molècules (Kocisko *et al.*, 1995; Silveira *et al.*, 2005).

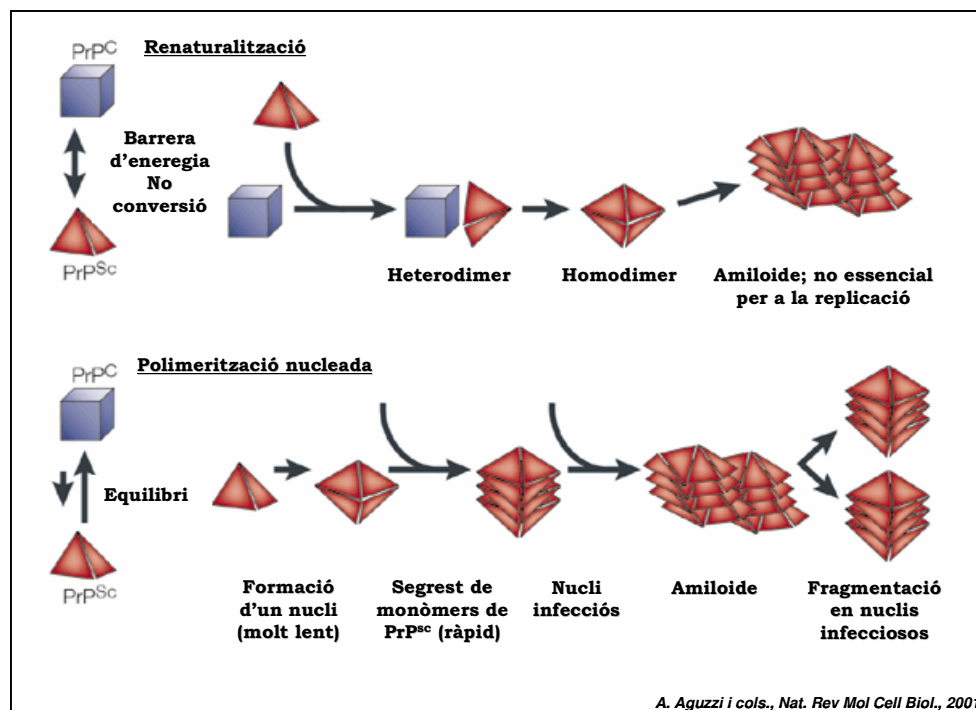


Fig. 1.9. Models de conversió de PrP^{sc}.

1.2.5. Soques de prions

El concepte de soca en les EET es defineix, per analogia a les soques clàssiques microbianes, com els aïllats capaços de conferir les seves característiques fenotípiques a la descendència. En el cas dels prions, en tractar-se d'una proteïna sense àcid nucleic associat, es parla sovint d'herència conformacional (Chien *et al.*, 2004). És a dir, es tracta de conformacions lleugerament diferents de la PrP^{sc} que confereixen trets diferencials a la molècula. Aquests trets s'avaluen principalment mitjançant inoculació experimental en ratolins silvestres o transgènics, concretament el temps d'incubació, els símptomes clínics desenvolupats i el patró de lesions induïdes en l'SNC (Bruce, 2003). Cada soca es caracteritza, doncs, per donar lloc a un fenotip diferent de la malaltia, tot i que aquest depèn en gran part d'altres factors com, la dosi aplicada, la via d'inoculació o la genètica de l'hoste.

A tall d'exemple, existeix una gran homogeneïtat en el fenotip expressat per la soca causant de l'EEB, tant en condicions experimentals en ratolins o primats no humans, com en les condicions naturals que generen la vMCJ en humans o la FSE en felins. Per contra, es poden descriure més de 20 soques d'*scrapie*, moltes de les quals han estat identificades després de ser adaptades a ratolins. Totes elles poden replicar-se de forma seriada en ratolins amb el mateix genotip, indicant que la mateixa cadena polipeptídica media diversos fenotips.

Les conformacions de la PrP^{sc} també confereixen un perfil molecular lleugerament variable, detectable per tècniques moleculars. Tot i que existeixen tècniques que diferencien la PrP^{sc} a partir de la seva conformació (immunoassaig dependent de conformació) (Safar *et al.*, 1998) o de la seva afinitat per certs lligands (*Seprion ligand*), majoritàriament s'acostuma a aplicar un tractament previ amb proteases per tal de diferenciar-la de la PrP^c, tal com succeeix en les anomenades proves ràpides de detecció. El perfil molecular es determina així per la resistència relativa a la PK, la mobilitat electroforètica obtinguda en WB, el perfil de glicosilació o proporció relativa de les 3 glicofomes de la proteïna, i l'afinitat per diferents anticossos. Aquest tipatge de soques ha dut, per exemple, Collinge i cols. (1996) a descriure 3 tipus de

PrP^{res} entre els casos de MCJ esporàdica i iatrogènica, i un quart en els casos de vMCJ que mostra una banda no glicosilada de 19 kDa i una predominància de la banda diglicosilada, com en el cas de l'EEB.

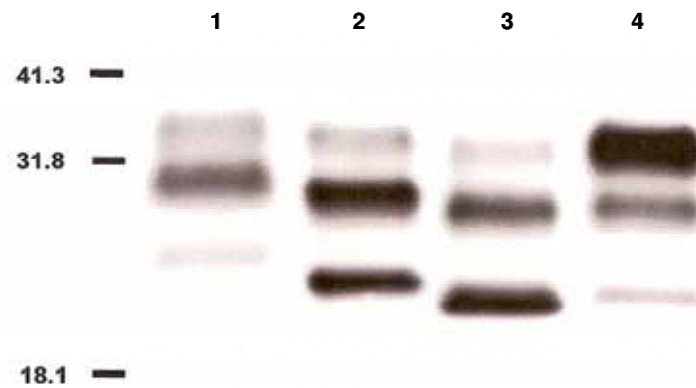


Fig. 1.10. Esquema dels tipus de MCJ descrits per Collinge i cols. en funció del patró electrofòretic de PrP^{res}.

Mitjançant les proves de detecció ràpida, en els últims anys s'han descrit casos d'EET discordants que han estat anomenats casos atípics. Van ser inicialment detectats en ovelles noruegues a partir de l'any 1998, raó per la qual es coneixen com casos Nor98 (Benestad *et al.*, 2003). Respecte a les soques clàssiques, es caracteritzen principalment per presentar una menor resistència al tractament amb PK, després del qual poden identificar-se fins a 5 bandes de mobilitat electroforètica diferent, una de les quals mesura 12 kDa. Se n'han trobat pràcticament arreu, algunes d'elles en races d'ovelles de genotip considerat resistent (Buschmann *et al.*, 2004).

Recentment, s'ha definit una segona soca d'EEB a Itàlia, anomenada BASE (de l'anglès, *Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy*) (Casalone *et al.*, 2004). S'ha descrit com a variant amiloidòtica arrel de la forta presència de dipòsits de PrP^{res} en forma de plaques d'amiloide, sent aquest un tret no característic de l'EEB clàssica. Altres autors han identificat variants d'EEB significativament similars a l'*scrapie*, doncs presentaven una banda no glicosilada de major pes molecular, també anomenada tipus H (de l'anglès, *high*) en contraposició al tipus L (de l'anglès, *low*) (Yamakawa *et al.*, 2003; Biacabe *et al.*, 2004).

1.2.6. Barrera de transmissió

Tot i que les malalties priòniques no són típicament infeccioses, la transmissió de prions dins de la mateixa espècie animal és considerablement eficient, mostrant un període d'incubació uniforme i consistent. Per contra, la transmissió entre animals de diferents espècies sovint es tradueix en una infecció abortiva. Aquesta resistència comparativa a la infecció és coneix comunament com barrera d'espècie. Darrerament, el concepte s'ha denominat de forma més genèrica, barrera de transmissió, ja que diferents soques de prions procedents de la mateixa espècie poden comportar-se de forma variable en relació a la seva capacitat d'infecció sobre altres espècies (Supattapone *et al.*, 1999; Hill i Collinge, 2003).

De forma general, les barreres de transmissió s'avaluen a partir d'experiments d'inoculació en ratolins salvatges o transgènics per a *prnp*. Hi intervé clarament la complementaritat entre les molècules de PrP invasores i les receptores, i, per tant, la genètica que codifica la PrP de l'hoste infectat. Ara bé, altres factors, com la via de transmissió i la dosi inoculada juguen un paper sovint més important que la mateixa interacció molecular.

1.2.7. Mecanismes d'invasió i proliferació de la malaltia

Els mecanismes d'invasió i proliferació de les malalties priòniques varien en relació a l'origen de la infecció i la via d'entrada dels prions. De forma general i considerant una contaminació per via oral, la patogènesi pot dividir-se temporalment i espacial en 3 grans fases: la infecció i la replicació perifèrica, la migració des de la perifèria al SNC, i replicació cel·lular i la neurodegeneració.

La infecció i la replicació perifèrica

Els primers òrgans afectats per l'entrada de prions per via oral són les plaques de Peyer i el teixit limfoide associat a l'intestí o GALT (de l'anglès, *gut-associated lymphoid tissue*), concretament a la regió de l'fleum distal (Beekes *et al.*, 2000). Sembla

que la PrP^{sc} franqueja l'epiteli intestinal gràcies a les cèl·lules M –cèl·lules epitelials de l'intestí encarregades de la transferència d'antígens- que la transportarien des de la superfície apical al compartiment basolateral de l'epiteli (Heppner *et al.*, 2001). Es desconeix quin tipus cel·lular media el pas de la mucosa intestinal a les plaques de Peyer i el teixit limfoide, on els prions s'acumulen i repliquen. S'ha demostrat que les cèl·lules dendrítiques fol·liculars (CDF) acumulen PrP^{sc} i juguen un paper crucial en la patogènesi, doncs ratolins que presenten una maduració i una activació alterada de CFD són resistent o mostren un retard significatiu en el desenvolupament de la malaltia (Kitamoto *et al.*, 1991; Mabbott *et al.*, 2002; Montrasio *et al.*, 2000), la qual cosa lliga amb els nivells d'expressió de PrP^c observat en aquest tipus cel·lular, que són similars als de les pròpies neurones. De la mateixa manera, els limfòcits B, que poden no expressar PrP^c, són també crucials, car són responsables de la maduració de les CDF (Klein *et al.*, 1997).

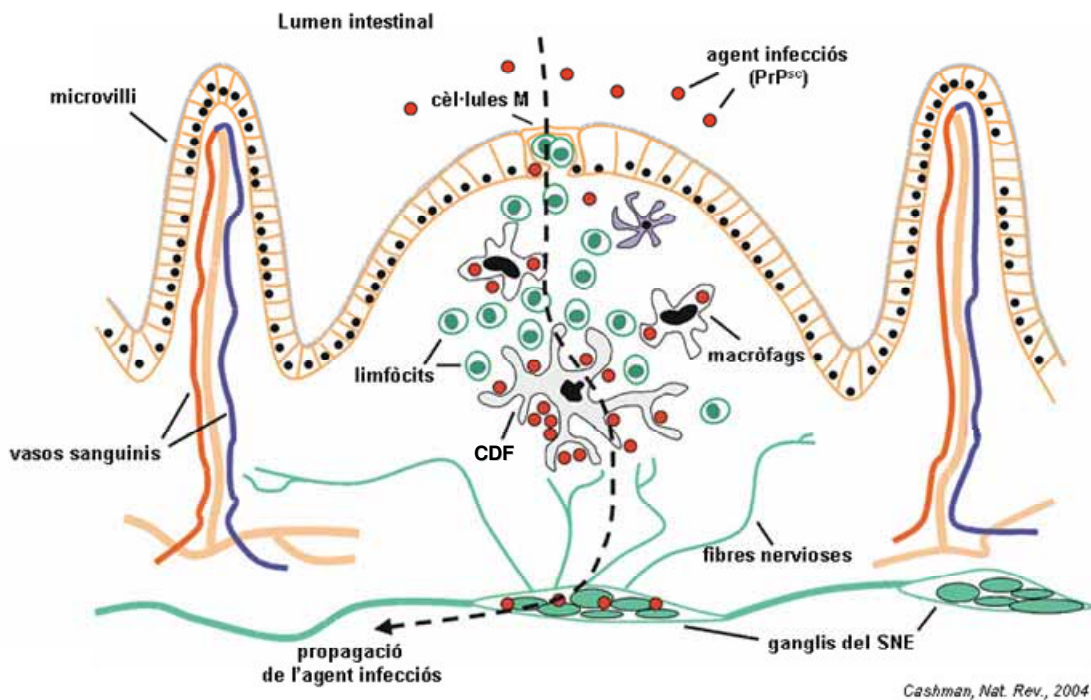


Fig. 1.11. Pas dels prions de l'intestí al sistema nerviós.

Sembla clar, doncs, que els fol·licles limfoides suposen un punt òptim per a la replicació perifèrica dels prions. En aquest sentit, el grup del Dr. Aguzzi ha demostrat que la formació d'aquestes estructures en teixits no involucrats en la patogènesi dels prions, com a conseqüència, per exemple, de processos d'inflamació, suposen una

acumulació de PrP^{Sc}. Així, nefritis cròniques indueixen excreció de prions en orina, o inflamacions en les glàndules mamàries donen lloc a la presència de prions en la llet (Seeger *et al.*, 2005; Ligios *et al.*, 2005).

La migració des de la perifèria al SNC

Degut a la seva condició de cèl·lules immòbils, les CDF són difícilment responsables del transport dels prions al SNC. Es desconeix si la neuroinvasió depèn d'algun tipus cel·lular mòbil (limfòcits B, macròfags) o bé es tracta d'un procés de difusió passiva, mediat per exemple pel complement. De fet, diversos estudis han demostrat una major resistència a la infecció perifèrica en ratolins sense alguns factors de complement (Klein *et al.*, 2001).

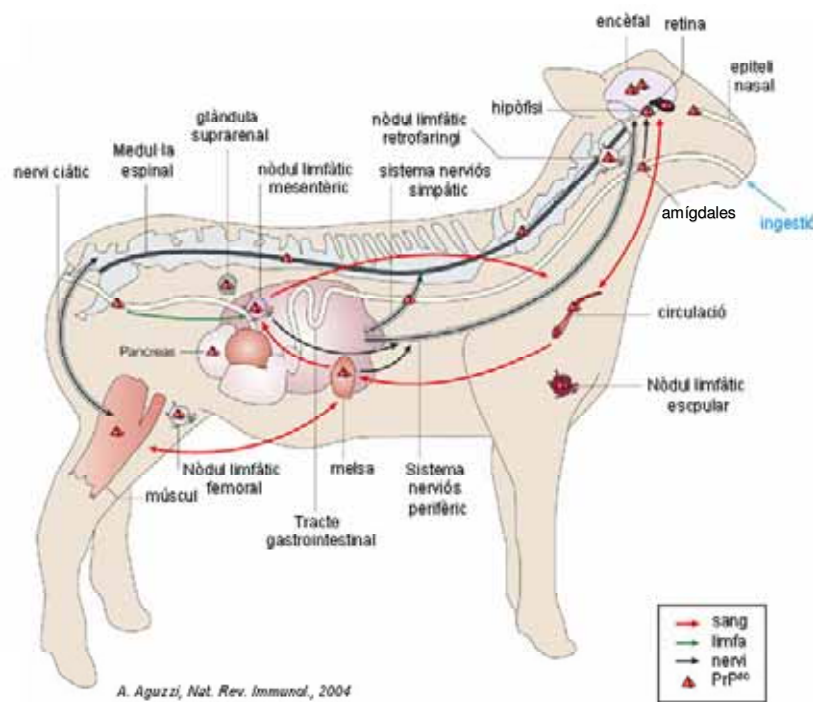


Fig. 1.12. Propagació de l'agent *scrapie* en ovelles.

El primer punt del sistema nerviós on es detecta PrP^{Sc} és els ganglis dels plexes ileals (Beekes *et al.*, 2000). Mitjançant el nervi vague (sistema parasimpàtic) i el nervi esplàncnic (sistema ortosimpàtic), els prions són capaços d'arribar a l'SNC per la

medul·la oblonga i per la medul·la espinal a l'alçada del tòrax (Beekes *et al.*, 1998; Haik *et al.*, 2003). De totes maneres, el mode de propagació dels prions a través dels mateixos nervis és completament desconegut.

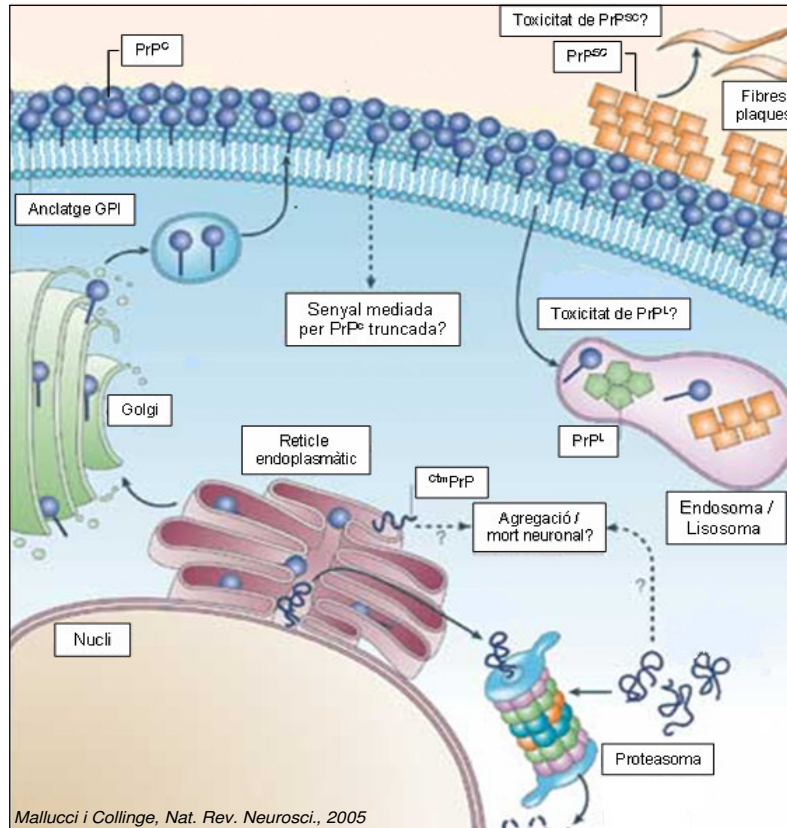
La replicació cel·lular i la neurodegeneració

Es desconeixen els possibles llocs de conversió de la PrP^c en PrP^{sc}, un cop aquesta última arriba a la superfície cel·lular. No obstant, tres compartiments semblen tenir un paper destacat: la membrana plasmàtica, els endolisosomes i el reticle endoplasmàtic. El primer contacte entre totes dues molècules sembla produir-se en els *rafts* revestits de clatrina de la membrana plasmàtica, on la PrP^c es troba ancorada després de ser sintetitzada i transportada en el reticle i l'aparell de Golgi, successivament (Campana *et al.*, 2005). La internalització d'aquestes vesícules es produeix tant per una via dependent com independent de caveolina i es considera un pas crucial, doncs permet la transformació conformacional en els endosomes precoços. Sembla que un transport retrògrad de la PrP^{sc} cap el reticle endoplasmàtic involucra també aquest compartiment cel·lular en l'amplificació i acumulació de PrP^{sc} (Beranger *et al.*, 2002), tot i que el seu paper és quantitativament i qualitativa més destacat en el cas de les EET d'origen genètic (Harris, 2003).

Un cop s'han generat les molècules de PrP^{sc} en els endolisosomes, aquestes no poden ser degradades i són acumulades en l'espai intercel·lular o expulsades a l'exterior mitjançant exosomes. Les noves molècules de PrP^{sc} poden, així, començar el cicle o acumular-se de forma ordenada produint agregats amiloides i, finalment, fibres reconegudes al microscopi com SAF.

La mort de les neurones forma part de les lesions que caracteritzen les EET. Els esdeveniments lligats a aquest tipus cel·lular han estat, doncs, considerats centrals degut a la forta neurodegeneració observada sobretot en les malalties priòniques humanes. No obstant, de forma significativa, l'expressió de PrP^c en astròcits de ratolins KO per a aquest gen recupera la susceptibilitat a la malaltia, de la mateixa manera que també ho fa l'expressió en neurones (Race *et al.*, 1995; Raeber *et al.*, 1997). No, en canvi, l'expressió en oligodendròcits i cèl·lules de Schwann (Prinz *et al.*, 2004). En general, es considera que la PrP^{sc} és *per se* l'entitat tòxica responsable de l'apoptosi neuronal i la

neurodegeneració. Però, tot i que és cert que està associada a la infectivitat i s'ha pogut demostrar la neurotoxicitat *in vitro* del fragment 106-126 de la proteïna (Forloni *et al.*, 1993), cada cop sembla més clar el paper clau de la PrP^c en el procés neurotòxic.



Mallucci i Collinge, Nat. Rev. Neurosci., 2005

Fig. 1.13. Possibles causes de mort neuronal induïdes per les diferents formes de proteïna prionica.

En general, la mort cel·lular programada consisteix en un procés actiu, dependent d'energia, que no genera resposta inflamatòria, la regulació del qual és força complexa i implica un equilibri entre factors de supervivència i de mort cel·lular. Els canvis espongiiformes que distingeixen les malalties prioniques consisteixen en vacúols derivats de la dilatació d'òrgànuls intracel·lulars (mitocondris, reticle endoplasmàtic) induïda per processos de mort cel·lular programada. Existeixen moltes evidències sobre el paper d'aquests processos tant en *scrapie* (Giese *et al.*, 1995), en EEB (Theil *et al.*, 1999) com en MCJ (Jesionek-Kupnicka *et al.*, 1997). El desencadenant podria ser la pèrdua de l'activitat neuroprotectora senyalitzada per la PrP^c a causa del seu segrest per oligòmers de PrP^{Sc} a nivell de la superfície de la cèl·lula (Solforosi *et al.*, 2004). De la mateixa manera, les topologies anormals o un tràfic intracel·lular alterat de la PrP^c

podrien ser les responsables de la neurotoxicitat observada en casos de mínima acumulació de PrP^{res}. S'ha descrit inclús una forma de PrP citosòlica que causa neurodegeneració (Ma *et al.*, 2002). No obstant, totes les consideracions al voltant del rol de la PrP^c s'enfronten al fet que ratolins transgènics *prnp*^{0/0} presenten un desenvolupament normal sense evidències de cap trastorn neurològic destacable.

Recentment, un nou model centrat en la formació d'un intermediari conformacional, PrP^L (L, de *lethal*), associa la neurotoxicitat als nivells d'aquest conformer generat a partir del segrest de PrP^c i que dóna lloc finalment a PrP^{sc}, que podria no tenir efectes neuropatològics (Mallucci i Collinge, 2005).

1.3. Els prions i el medi ambient

1.3.1. La contaminació animal en el medi

Fruit de l'activitat industrial, agrícola i domèstica, el medi ambient pot ser contaminat amb substàncies d'origen químic (metalls pesants, compostos orgànics...) i microorganismes, alguns dels quals són patògens. Aquesta contaminació comporta un risc sanitari potencial per a la població i importants costos econòmics en funció de les zones afectades (camps i zones de cultiu, zones pesqueres...). En aquest sentit, la detecció de la contaminació microbiològica d'origen fecal en ambients aquàtics representa un dels reptes més importants, doncs implica l'aportació de microorganismes patògens (*Vibrio cholerae*, *Salmonella*, virus de l'hepatitis A, Norovirus...) i la seva vehiculació a través de l'aigua. La identificació directa de patògens en aquest tipus d'ambients es veu sovint dificultada per la seva baixa concentració i els requeriments metodològics necessaris. Per tal de mesurar la càrrega de contaminació fecal i els risc sanitari associat s'utilitzen normalment paràmetres microbiològics indicadors. Aquests, idòniament, han d'estar associats al patògen -en concentració superior i amb una correlació quantitativa estimable- i han de presentar un comportament semblant. Alguns d'ells permeten, a més, distingir l'origen de la contaminació.

De forma general, la detecció d'indicadors microbiològics es classifica en mètodes dependents o independents de bases de dades de referència. Els primers

depenen d'una matriu de resultats procedents de l'anàlisi d'un elevat nombre de mostres –la fiabilitat del mètode depèn de la mida de la matriu-, normalment laborios i relatiu a l'àrea geogràfica estudiada (Field, 2005). Dins els mètodes independents de bases de dades basats en una identificació específica per mètodes moleculars, els virus entèrics han estat suggerits com una de les eines més prometedores degut sobretot a l'alta estabilitat i especificitat d'hoste que mostren (Fong i Lipp, 2005).

1.3.2. Presència de prions en el medi

Tot i que els prions no són típicament transmissibles com és el cas dels virus, existeixen diferents vies de contaminació mitjançant les quals aquests agents podrien arribar al medi ambient. A causa de la seva elevada resistència als processos d'inactivació i a la manca de coneixement sobre alguns dels processos de transmissió implicats, aquestes vies de contaminació suposen la creació de reservoris d'EET que desafien el control i l'eradicació d'aquestes malalties.

1.3.2.1. Excreció

Es disposa de molt poca informació sobre l'excreció de prions en l'orina i la femta d'individus afectats, tot i que aquesta esdevé una de les vies de contaminació més importants del medi ambient especialment en patògens que poden entrar en l'organisme gastrointestinalment.

L'orina

L'any 2001, el grup de recerca de la Dra. Ruth Gabizon va descriure per primera vegada l'existència consistent d'una proteïna priònica resistent al tractament amb proteïnasa K en l'orina de hámsters, vaques i humans afectats d'EET, anomenada UPrP^{sc} (Shaked *et al.*, 2001). Aquesta proteïna no era infecciosa, però es detectava poc després de l'inoculació de ratolins i s'excretava consistentment a partir dels 60 dies post-inoculació, donant lloc a la possibilitat de creació d'un test *pre-mortem* no invasiu fiable i sensible. Posteriorment, aquests resultats han estat posats en dubte per diferents grups, degut a la irreproductibilitat dels mateixos (Head *et al.*, 2005) i a la detecció

d'altres proteïnes contaminants en mostres típiques d'orina. Així, s'ha vist immunoreactivitat dels anticossos usats en la detecció contra proteïnes de membrana externa resistents a PK de bacteris força comuns en infeccions del tracte urinari (Furukawa *et al.*, 2004), així com contra aglomeracions de cadenes lleugeres d'immunoglobulines, generalment conegudes com proteïnes Bence-Jones (Serban *et al.*, 2004).

La presència d'infectivitat en mostres d'orina d'animals inoculats experimentalment ha estat recentment demostrada arrel de l'estudi fet amb ratolins transgènics infectats per via intracerebral amb scrapie que mostraven diferents patologies no lligades amb la malaltia priònica. Ratolins afectats de nefritis renals associades a processos inflamatoris presentaven una prionúria independent del curs de l'EET, en contraposició a ratolins que mostraven desordres renals no inflamatoris o desordres inflamatoris no renals (hepatitis) (Seeger *et al.*, 2005). Sembla clar, doncs, que, en certes circumstàncies, es pot produir una excreció de prions en l'orina que podria representar un factor per a la propagació horitzontal de les malalties priòniques. De la mateixa manera, alteracions funcionals inflamatòries no diagnosticades en l'aparell renal podrien explicar observacions recents (Gregori i Rohwer, 2006), així com resultats discrepants, com ara la inducció de MCJ a partir d'orines humanes en ratolins (Tateishi *et al.*, 1980) però no en primats (Gajdusek *et al.*, 1967).

La femta

Per la seva banda, la presència d'infectivitat en femtes ha estat suggerida en el cas de soques de prions amb alta capacitat de difusió en el sistema limforeticular com un mètode de contribució indirecta a la transmissió horitzontal de la malaltia. En el cas d'*scrapie*, la distribució de PrP^{Sc} en el teixit limfoide, particularment en el GALT, incrementa proporcionalment al progrés de la malaltia i pot dur a l'excreció de certa infectivitat al medi ambient (Andréoletti *et al.*, 2000; Heggebo *et al.*, 2002). L'acumulació de PrP associada a la malaltia en teixit limfoide precedeix en gairebé 5 mesos l'aparició de símptomes clínics en ovelles exposades a *scrapie* natural (van Keulen *et al.*, 2000). En model murí, la infecció amb l'agent *scrapie* per via oral ha mostrat acumulació de PrP^{Sc} des de l'estòmac fins al colon, incloent l'íleon desproveït de plaques de Peyer, indicant que la majoria de PrP^{Sc} es diposita tant en el GALT com

en els plexes del sistema nerviós entèric (Maignen *et al.*, 1999). Aquesta distribució no coincideix en el cas de l'EEB on, tant en model murí (Maignen *et al.*, 1999) com en bovins infectats experimentalment (Wells *et al.*, 1998), la infectivitat s'acumula principalment en el SNC i, en segona instància, en l'íleum i el sistema nerviós perifèric. El fet que ovelles inoculades experimentalment amb EEB mostrin una major grau de disseminació sembla indicar que la fisiologia i el component genètic de l'organisme podrien determinar la possible excreció de prions (Foster *et al.*, 1996).

Molt més semblant al cas de l'*scrapie* és el de CWD. Tant en les espècies de cérvols afectades com en ants, la deposició de PrP associada a CWD es produeix de forma àmplia en teixits limfoides (Sigurdson *et al.*, 1999), i tan sols en un 10-15% dels casos en ants es detecta presència de PrP^{sc} en encèfal en absència d'acumulació limfoide (Williams, 2005). La forta disseminació de l'agent CWD suggereix la transmissió de la patologia a través del medi ambient per contaminació fecal tal com ha estat demostrat amb cérvols sans exposats a ambients contaminats per femtes d'individus afectats (Miller *et al.*, 2004). Curiosament, s'ha demostrat l'absència de CWD en la placenta (Spraker *et al.*, 2002).

Experimentalment, no s'ha demostrat la presència de prions en femtes d'individus afectats d'EET. Es considera que diversos factors metodològics, com la insolubilitat de la matriu, l'elució de la infectivitat potencial i el volum de material a analitzar, dificulten el disseny de qualsevol assaig experimental, tot i que l'estudi d'aquesta via de propagació mereix ser curosament analitzada (Weissmann *et al.*, 2002).

1.3.2.2. Aigües residuals

Arran de l'aparició dels primers casos d'EEB, es van instaurar a Catalunya, així com a la resta de l'Estat i de la Unió Europea, plans de vigilància activa de les EET animals en remugants, que resten vigents en l'actualitat. Entre altres, s'obliga als escorxadors a realitzar un test de diagnòstic validat per a EET en els caps de bestiar boví majors de 30 mesos. Aquests tests s'anomenen *proves ràpides* i acostumen a proporcionar un diagnòstic en un termini de 24 hores. Ara bé, tots ells són de caràcter *post-mortem*, de manera que el resultat del test es coneix un cop tot el processat de

l'animal s'ha ja produït, fet que permet una potencial contaminació de les aigües residuals de l'escorxador amb fluids animals i petits fragments que poguessin haver estat despresos durant la manipulació. Tres barreres, no obstant, eviten l'entrada de prions en la xarxa d'aigües residuals: en primer lloc, els animals ja simptomàtics no són sacrificats en l'escorxador; en segon lloc, els òrgans que contenen infectivitat, com encèfal, medul·la espinal i certes despulles (ulls, amígdals), són tractats com a materials específicats de risc (MER) i eliminats normalment per incineració directa sense tractament previ; i, en tercer lloc, els efluent són filtrats en malles de baix diàmetre de porus que retenen fragments superiors a 0.1g i el material retingut es tractat com a MER (Gale *et al.*, 1998).

Davant l'epizootia d'EEB i el seu caràcter zoonòtic, diversos estudis de valoració de risc han tractat la possibilitat d'una contaminació de camps i zones de cultiu per l'ús d'efluents i llots procedents d'escorxadors on s'havien detectat casos positius d'EEB (Gale *et al.*, 1998; Gale i Stanfield, 2001, Yamamoto *et al.*, 2006). Certament no existeixen dades experimentals sobre el comportament de l'agent EEB en l'ambient aquàtic.

1.3.2.3. El sòl

Els prions poden arribar al sòl a partir d'una contaminació natural en zones de pastura produïda pels propis ramats infectats o a partir de la dispersió d'efluents procedents d'escorxadors, tal com s'ha descrit anteriorment. Tanmateix, també suposen fonts de contaminació l'enterrament de carcasses d'individus infectats, la dispersió de residus procedents de plantes de *rendering*, i l'ús de fertilitzants que incorporen farines de carn i ós (Revault *et al.*, 2005).

L'acumulació de prions en el sòl suposa un risc epidemiològic considerable degut a l'elevada persistència d'aquests agents en el medi. De fet, la seva supervivència durant més de 3 anys en el sòl ha estat ja demostrada (Gajdusek i Brown, 1991). La retenció de prions en els diferents tipus de partícules presents en els terres incrementa el risc d'infecció de diferents espècies de ruminants per pastura en zones contaminades i suposa un risc de contaminació de les aigües superficials per partícules minerals

transportades per l'erosió, així com de les aigües subterrànies degut a la percolació de col·loides a través dels espais porals en sòls poc estratificats (Rigou *et al.*, 2006; Vasina *et al.*, 2005).

En els últims anys, doncs, diferents estudis han analitzat les interaccions que es produeixen entre aquests agents infecciosos i els diferents components del sòl. El patró d'aquestes interaccions és força variable en funció del tipus de terra i de la molècula de proteïna priònica usada com a model (PrP^{sc} d'homogeneïtzats encefàlics, PrP plegada en làmina β , PrP recombinant), ja que els ponts s'estableixen a partir dels residus disponibles en superfície i són sovint de caràcter electrostàtic. Així, el grau d'adsorció en la mica depèn en gran mesura d'unions iòniques, si bé s'estableixen també certes interaccions hidrofòbiques (Vasina *et al.*, 2005). Per contra, en argiles dilatables, el grau d'adsorció és tan fort que tan sols solucions al 10% d'SDS a 100°C alliberen la molècula de PrP^{sc} (Johnson *et al.*, 2006). Remarcablement, aquesta forta unió no suposa una reestructuració de la molècula que suprimeixi la seva capacitat d'infecció, doncs models murins inoculats intracerebrament amb el complex PrP^{sc}-argila exhibeixen períodes d'incubació inclús menors als dels controls desproveïts d'argiles (Johnson *et al.*, 2006)

1.3.2.4. Altres rutes de contaminació

Existeixen també altres entrades de prions en el medi ambient:

- l'expulsió de la placenta i altres líquids placentals al voltant del naixement en ovelles i cabres suposa un mecanisme de transmissió lateral de la malaltia a la descendència (Andréoletti *et al.*, 2002);
- l'enterrament i eliminació de carcasses infectades per EET és, tal com s'ha citat anteriorment, una font de deposició de prions en el medi, el patró de supervivència i biodisponibilitat està sent actualment estudiat amb major profunditat (Rapp *et al.*, 2006);

- cendres o residus provinents de processos d'incineració. Actualment, tots els residus MER són destruïts en incineradors, ja que s'assumeix que aquest procés inactiva la infectivitat remanent. No obstant, Brown i cols. (1999) han demostrat que teixits de hámster infectats amb la soca 263K poden no ser completament inactivats a 600°C i que és necessària una temperatura de fins a 1000°C per tal d'assegurar una destrucció total.

1.3.3. Transmissió de les EET a través del medi

L'entrada de prions en el medi ambient pot provocar una transmissió alternativa de les EET que suposa un grau de dificultat major en el control i eradicació d'aquests agents patògens. En aquest sentit, l'*scrapie* d'ovelles i cabres i la malaltia caquectitzant de cèrvids representen casos especials, doncs les epizoòties que causen poden mantenir-se mitjançant transmissió horitzontal entre individus. Aquesta observació ja havia estat proposada anteriorment en estudis epidemiològics sobre *scrapie* (Greig, 1940; Hourrigan, 1979; Pálsson, 1979) i, més recentment, sobre CWD (Miller *et al.*, 1998; Williams i Young, 1980). Les rutes exactes involucrades no són, actualment, prou clares, però existeixen evidències sobre una transmissió per contacte directe (Woolhouse *et al.*, 1998; Miller i Williams 2003) i una transmissió a través del medi ambient, tal com han demostrat Miller i cols. (2004) induint CWD en cèrvols sans sense cap relació amb la malaltia criats posteriorment en recintes contaminats prèviament amb carcasses o femtes d'animals afectats.

Soca d'EET	Malaltia	Espècies afectades	Genètica implicada	Rutes de transmissió			Control possible
				Natural	Ruta principal	Experimental	
EEB	EEB	Bestiar boví	?	No	Alimentació (reciclatge)	Sí	Sí
EEB	FSE	Felins	?	No	Alimentació (reciclatge)	Sí	Sí
EEB	vCJD	Humans	Sí	No	Aliments	Sí	Sí
EEB	EET	Petits remugants	Sí	Sí	Ambiental	Sí	Difícil
Kuru	Kuru	Humans	Sí	No	Oral (canibalisme)	Sí	Sí
<i>Scrapie</i>	EET	Petits remugants	Sí	Sí	Ambiental i vertical	Sí	Difícil
<i>Scrapie atípic</i>	EET	Petits remugants	Sí	?	?	Sí	?
CWD	CWD	Cèrvids	?	Sí	Ambiental	Sí	Difícil

Taula 1.5. Comparació de diferents paràmetres epidemiològics en varies EET que afecten humans, bestiar boví, petits remugants, felins i cèrvids. Taula modificada a partir de Doherr (2006).

El risc de transmissió de les malalties priòniques per exposició en ambients prèviament contaminats suposa un paper clau del sòl com a reservori per a les EET. Estudis recents han demostrat que el sòl és capaç de retenir partícules priòniques infeccioses en la superfície del terra (Johnson *et al.*, 2006), de manera que la ruta més plausible podria involucrar l'alimentació de vegetals crescuts en zones properes a la deposició de matèria contaminada, o el consum directe de partícules de sòl (Miller *et al.*, 2004). A més, es creu que l'arribada de la CWD a espècies fins el moment no afectades, com ara els ants, podria involucrar en certa mesura aquesta via de transmissió.

Existeixen altres hipòtesis per explicar la transmissió ambiental de *scrapie* i CWD que involucren diferents tipus de portadors asimptomàtics, com són els àcars del farratge (Carp *et al.*, 2000) o les mosques de la carn (Post *et al.*, 1999). El grau d'importància d'aquestes vies de transmissió és, no obstant, difícil de determinar en condicions naturals.

1.3.4. Inactivació i estabilitat dels prions

La supervivència de l'agent EEB als processos de tractament de les carcasses i despulles animals, o *rendering*, practicats en els anys 70 o la transmissió iatrogènica a partir d'instrumental quirúrgic de la MCJ demostren clarament l'elevada dificultat d'inactivació dels prions. Mètodes físics, com la radiació o les condicions estàndards d'autoclau, i productes químics, com agents alquilants, solvents orgànics, agents oxidants i la majoria de detergents, tenen un efecte mínim sobre la infectivitat de les EET (Taylor, 2000). Se sap que l'assecat i fixació de teixits infectats augmenta la seva termorresistència (Asher *et al.*, 1987). Tot i així, teixits frescos d'algunes soques suporten exposicions de fins a 200°C 1h –com la soca 263K, una soca d'*scrapie* adaptada a ratolí, o la soca 301V, una soca d'EEB adaptada a ratolí– (Taylor, 2000) i inclús a 600°C 15 min -263K- (Brown *et al.*, 1999). En l'actualitat, per a la completa inactivació, es recomana exposició durant 1h en hipoclorit sòdic o en una solució amb un mínim de 20,000 ppm de clor lliure (Kimberlin *et al.*, 1983), o exposició durant 1h en hidròxid sòdic i posterior autoclau a 121°C (Taguchi *et al.*, 1991; Ernst i Race, 1993).

L'extraordinària resistència dels agents priònics incrementa, de la mateixa manera, el risc de transmissió a través del medi ambient. A més dels estudis realitzats sobre l'efecte del *rendering* (Taylor *et al.*, 1995), es disposa de poca informació sobre la supervivència i persistència dels prions en la natura. Brown i Gajdusek (1991) van ser els primers en demostrar el manteniment de la infectivitat per prions en el sòl després de romandre-hi durant més de 3 anys. Actualment, s'estan duent a terme altres experiments per determinar el temps de residència i la inactivació d'aquests agents en els terres (Fernie *et al.*, 2006). D'altra banda, la supervivència de prions en llocs anaeròbics provinents de reactors de laboratori ha estat determinada recentment sota diferents condicions de temperatura (Kyrchmayr *et al.*, 2006). Significativament, l'EEB bovina es va mostrar més resistent que la soca 301V –una soca d'EEB adaptada a ratolí- i que la soca 22A –una soca d'*scrapie* adaptada a ratolí-, i la reducció en el títol de PrP^{res} en condicions termofíliques es va quantificar en un logaritme després de 302 hores d'incubació.

1.4. Plantejament i objectius de la tesi

L'estudi proposat en aquesta tesi s'emmarca dins el context generat en els darrers anys per l'aparició de la variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob i la seva associació amb l'epizootia d'EET bovina, que ha dut a la Unió Europea i altres països al desenvolupament de normatives per al control i tractament d'aquestes malalties, exemplificades en la instauració dels Plans de Vigilància Activa sobre les EET animals. L'objectiu general d'aquesta tesi fou, doncs, establir una aproximació a l'estudi dels prions com a potencials contaminants en el medi ja sigui per l'excreció en animals infectats o per la contaminació resultant dels processos de manipulació aplicats a carcasses i despulles. Aquesta línia de recerca s'ha concretat en un seguit de treballs duts a terme per aconseguir els següents objectius:

1. Dissenyar traçadors moleculars de la presència de contaminació fecal bovina en el medi.
2. Desenvolupar una metodologia per a la detecció de proteïnes priòniques en efluents d'escorxadors.

3. Avaluar la possible presència de prions en efluents d'escorxador on es processen animals de risc
4. Establir un mètode per a la identificació de prions en femtes animals.
5. Estudiar l'excreció d'aquests agents infecciosos en models murins.
6. Determinar l'estabilitat i supervivència de diferents soques de prions en diversos tipus de matrius ambientals.

Per tal de desenvolupar aquests objectius, la present tesi doctoral s'ha estructurat en quatre capítols de recerca experimental, complementats amb un anàlisi introductori sobre la situació actual de la problemàtica científica. Cada capítol de recerca experimental consta d'una revisió acurada sobre els antecedents existents, d'un llistat dels materials i mètodes emprats, d'una explicació extensa dels resultats obtinguts i d'una discussió sobre el seu significat i el grau d'importància dels mateixos, així com d'un annex en anglès en forma d'article que engloba la majoria de la informació exposada en els apartats precedents. Finalment, es recullen les conclusions majors de l'estudi, la bibliografia que ha estat consultada i una ampliació detallada dels materials i mètodes que han estat utilitzats.

Capítol II: Detecció d'adenovirus animals com a marcadors de contaminació fecal

2.1. Antecedents i objectius

La contaminació fecal arriba al medi i a les aigües mitjançant residus líquids urbans o rurals, drenatge a partir d'aigües residuals urbanes i clavegueram, deposició directa o per contaminació a partir d'emissaris i efluents d'escorxadors. La quantitat de microorganismes que són aportats al medi és considerable i molt diversa, incloent fins a a 100 tipus diferents de virus patògens (Melnick, 1984). Els virus excretats en femtes, col·lectivament coneguts com a virus entèrics, inclouen típicament membres de la família *Picornaviridae*, *Adenoviridae*, *Caliciviridae* i *Reoviridae*, a més d'alguns grups que són considerats en l'actualitat patògens aquàtics emergents com circovirus, parvovirus i poliomavirus. En general, els virus entèrics són excretats en femtes humanes i animals en rangs entre 10^5 i 10^{11} partícules víriques per gram (Cliver, 1984). Tot i que poden causar infeccions greus, normalment s'associen a gastroenteritis i desordres gastrointestinals de curta durada. No obstant, el risc de contaminació és molt més elevat a causa de la seva baixa dosi infecciosa, que pot arribar a ser entre 10 i 10,000 cops major que l'associada a bacteries patògenes en condicions similars (Haas *et al.*, 1993), i es consideren responsables de gran part dels brots de gastroenteritis no bacterianes (Lopman *et al.*, 2004).

Actualment, la qualitat microbiològica de les aigües està fonamentalment basada en regulacions i normatives que inclouen indicadors bacterians com enterococs i coliforms fecals i totals. No obstant, aquests indicadors no reflecteixen el risc real

d'infecció amb altres patògens importants com virus, bacteris patògens en situació d'estrès o protozous (Geldenhuis i Pretorius, 1989; Jiang *et al.*, 2001). Això és principalment degut a que sofreixen processos d'inactivació més ràpids, tant en ambients naturals com en plantes de tractament d'aigües. Certament, virus entèrics infecciosos han estat aïllats d'ambients aquàtics que es trobaven dins els límits establerts per a indicadors bacterians en les normatives vigents (Craun, 1991; McAnulty *et al.*, 1993).

En els últims anys, diversos grups de fags que infecten bactèries entèriques han estat proposats com a indicadors de la contaminació fecal, com ara fags que infecten coliformes a través dels pilis (F-RNA) (Havelaar *et al.*, 1993) o fags que infecten *Bacteroides fragilis* (Duran *et al.*, 2002). Les seves taxes d'inactivació són teòricament semblants a les dels virus entèrics i altres patògens i són clarament incapaces de multiplicar-se en el medi. No obstant, el seu aïllament és sovint metodològicament i quantitativa difícil i l'especificitat d'algun dels grup establerts ha estat posada en dubte (Schapper *et al.*, 2002). Justament, l'especificitat d'hoste, a més de l'estabilitat i supervivència en el medi, és el que fa dels virus excretats al medi una de les eines més prometedores per avaluar la qualitat de l'aigua, així com per determinar les fonts majoritàries de la contaminació fecal en el medi. En aquest sentit, la detecció molecular d'adenovirus ha estat proposada en diversos estudis com a índex de la contaminació fecal d'origen humà en ambients aquàtics, doncs s'ha vist que tenen una major capacitat de resistència i són més prevalents que els enterovirus en aigües residuals i mol·luscs bivalves (Irving i Smith, 1981; Pina *et al.*, 1998). La importància, però, de disposar d'eines per a identificar la contaminació fecal d'origen animal en el medi suggereix l'aplicabilitat dels adenovirus que infecten animals de granja com indicadors vàlids.

Els adenovirus són virus no embolcallats, de 70-100 nm de diàmetre amb genoma d'ADN de 30-40 Kb. La càpside icosaèdrica està constituïda de 252 unitats estructurals conegudes com capsòmers, de les quals 12 són pentons i constitueixen els vèrtexs de l'icosaèdre i 240 són hexons i en constitueixen les cares. De cada un dels vèrtex en sorgeix una fibra involucrada en les funcions d'adsorció i penetració en la cèl·lula. El genoma d'ADN de doble cadena es troba flanquejat per repeticions invertides de mida variable en posició terminal (ITR, *inverted terminal repeat*) i s'estructura en 11 pautes de lectura oberta (ORF; *open reading frame*) dividides en dues

regions segons el moment d'expressió dels seus gens: regió *early* i regió *late*. Constitueixen la família *Adenoviridae*, que clàssicament ha estat dividida en el gènere *Mastadenovirus*, per incloure els aïllats procedents de mamífers, i el gènere *Aviadenovirus*, per incloure aquells procedents d'aus. Recentment, dos gèneres nous han estat admesos per tal d'agrupar soques amb organitzacions genòmiques clarament diferents, aïllades a partir de mamífers i aus, però també de rèptils, peixos i amfibis (Benkö i Harrach, 1998). Es tracta del gènere *Atadenovirus*, anomenat així en referència a l'alt contingut en adenina i timina present en els genomes dels seus membres, i el gènere *Siadenovirus*, anomenat així en referència a la identificació d'una proteïna d'elevada homologia amb sialidases en la regió del genoma on clàssicament es troba la pauta de lectura oberta (ORF) coneguda com E1A.

En l'actualitat, doncs, el gènere *Mastadenovirus* inclou, entre altres, 51 serotips d'adenovirus humans (HAdV), 5 serotips d'adenovirus porcins (PAdV) i 6 serotips d'adenovirus ovins (OAdV). Els HAdV es troben separats en 6 subgèneres (A-F) segons l'homologia dels pèptids virals interns i dels patrons de migració proteics (Wadell *et al.*, 1980). Els adenovirus d'origen boví (BAdV) ja havien estat dividits en dos subgrups fonamentalment a causa de la manca de l'antigen de fixació del complement en els membres del subgrup II (Bartha, 1969). Així, el subgrup I està constituït pels serotips 1, 2, 3 i 10 i pertanyen al gènere *Mastadenovirus*, mentre el subgrup II, format pels serotips 4-8, s'agrupa en el gènere *Atadenovirus*, que també inclou algun adenovirus oví atípic, com l'aïllat 287 (OAdV287), i membres antigament classificats en el gènere *Aviadenovirus*, com el virus de la caiguda de la posta (EDS, *egg drop syndrome virus*) (Harrach *et al.*, 1997).

Des d'un punt de vista clínic, els adenovirus humans presenten una moderada significança com a patògens. Cal destacar el serotip 7 -capaç de causar la mort en nens immunodeprimits-, els membres del subgènere F -que són considerats la segona causa de gastroenteritis en infants darrere els rotavirus- i el serotip 5 -que provoca infeccions respiratòries i conjuntivitis-. De la mateixa manera, els adenovirus animals no produeixen normalment patologies greus. Tanmateix, s'han descrit casos de pneumoenteritis i encefalitis causades per PAdV i queratoconjuntivitis i episodis febrils causats per BAdV (Ishibashi i Yasue, 1984). Cal destacar que el serotip 10 dels BAdV provoca una enteritis hemorràgica ben caracteritzada, aguda i fatal, en bestiar boví

d'entre 6 mesos i 1 any d'edat (Smyth *et al.*, 1996) i és responsable, juntament amb el subgrup II, de les pèrdues econòmiques causades per infeccions adenovirals, particularment en bestiar destinat a la cria intensiva.

En aquest estudi es descriu la identificació i prevalença d'adenovirus d'origen porcí i d'origen boví en femtes animals i en aigües residuals procedents de diferents escorxadors i de plantes de tractament urbanes. La concentració i detecció de les partícules víriques a partir de les matrius ambientals es va realitzar mitjançant una metodologia prèviament aplicada per a l'aïllament de diversos tipus virals amb una sensibilitat tan elevada com d'una partícula vírica. S'avalua, doncs, la idoneïtat de la detecció d'aquests virus com a traçador de l'origen de la contaminació en el medi.

2.2. Materials i Mètodes

2.2.1. Femtes animals

L'estudi de la presència d'adenovirus animals es va iniciar analitzant mostres fecals de diferents orígens que van ser cedides per la Dra. Margarita Martín (Centre de Recerca en Sanitat Animal, CReSA, UAB). En primer lloc, es van recollir femtes animals d'origen porcí de 7 granges diferents. Les mostres corresponien a animals adults escollits aleatòriament, però, en els casos en que es disposava de la informació adequada, van ser dividides segons si es tractaven porcs d'engreix (de 5 a 6 mesos) i truges (de 6 mesos fins 4 anys). Totes les mostres van ser analitzades en forma de *pool* de fins a 5 animals i mantingudes a -80°C fins al seu processament.

D'altra banda, es van recollir femtes d'origen boví de 2 granges diferents. Les mostres procedents de la primera granja procedien d'animals joves (de 3 a 18 mesos) destinats a l'engreix i a la recria, mentre que les mostres de la segona granja procedien tant d'animals joves (vedells de 2 a 5 mesos) com d'animals adults. Totes les mostres van ser analitzades en forma de *pool* de fins a 5 animals i mantingudes a -80°C fins al seu processament.

Per últim, es van recollir femtes d'origen oví procedents d'una mateixa granja que disposava d'animals adults majors d'un any i animals joves de cria menors d'un any d'edat. En aquest cas, es van establir *pools* de 2 individus que van ser mantinguts a -80°C fins al seu posterior anàlisi.

2.2.2. Aigües residuals urbanes

Un total de 12 mostres d'aigua residual urbana van ser recollides de forma mensual des d'Agost de l'any 2000 fins Juliol de l'any 2001. Les mostres van ser recollides a l'entrada de la planta de tractament d'aigües de l'àrea de la ciutat de Barcelona, que rep uns 670,000 m³ per dia d'aigua residual procedent d'una població aproximada de 1,800,000 habitants, sense una presència significativa de contaminació d'origen animal.

2.2.3. Efluents d'escorxador

Es van analitzar mostres d'aigua residual procedents de dos escorxadors diferents recol·lectades quinzenalment durant un període aproximat de 3 mesos. El primer escorxador, localitzat a Argentona, processa gran nombre d'espècies (bovins, ovins, cabrum, equins, etc.) amb l'excepció de porcins. Les mostres van ser preses del tanc general d'homogeneïtzació que rebia les aigües residuals procedents de tota la planta incloent les d'origen humà, abans que s'apliqués cap procés de floculació. D'altra banda, el segon escorxador, localitzat a Cornellà del Terri, processa majoritàriament bestiar porcí i, en segon terme, boví. Les mostres van ser preses del tanc general d'homogeneïtzació, que incloïa igualment l'aigua procedent dels utilitaris del personal, o un cop s'havien aplicat els diferents processos de floculació i sedimentació.

2.2.4. Concentració de virus a partir d'aigües residuals

L'elució i concentració de les partícules víriques presents en 40 ml d'aigua residual, procedent tant de la planta depuradora urbana com dels escorxadors, es va realitzar seguint el protocol descrit en l'apartat 8.1 de l'annex de Materials i Mètodes,

fins a obtenir un concentrat final de 100 µl. Breument, les mostres van ser directament concentrades per ultracentrifugació i els virus continguts van ser separats de la matèria particulada en suspensió mitjançant una elució en tampó alcalí i una breu centrifugació. La solució final que contenia els virus eluïts va ser finalment concentrada per ultracentrifugació.

2.2.5. Concentració de virus a partir de mostres fecals

La elució i concentració de les partícules víriques presents en aproximadament 1 g de les mostres fecals, tant d'origen porcí com d'origen boví, es va realitzar seguint el protocol descrit en l'apartat 8.2 de l'annex de Materials i Mètodes, fins a obtenir un concentrat final de 100 µl. En aquest protocol s'utilitza el mateix principi de desadsorció dels virus i posterior concentració que s'ha citat anteriorment, de manera que després d'una elució en tampó alcalí de les mostres, les partícules víriques son ultracentrifugades i resuspeses en PBS.

2.2.6. Extracció d'àcids nucleics

Els àcids nucleics de les partícules víriques concentrades van ser extrets usant el mètode descrit per Boom i cols. (1990), tal com es descriu en l'apartat 8.3 de l'annex de Materials i Mètodes. Aquest protocol es basa en la lisi de les càpsides virals i l'adsorció dels genomes alliberats en un suport sòlid, com són les partícules de sílice, a partir del qual són eluïts després de diferents rentats en un reduït volum de tampó adequat per al posterior anàlisi per amplificació enzimàtica. Aquest mètode mostra una elevada sensibilitat i una eliminació eficient dels inhibidors de la tècnica de PCR presents de forma habitual en mostres ambientals. La solució final va ser conservada a -20°C.

2.2.7. Desenvolupament d'un protocol de PCR niada

Per a la detecció específica dels adenovirus animals, tant porcins com bovins, es van dissenyar oligonucleòtids específics a partir de l'alineament dels genomes disponibles en el *GenBank* dels serotips identificats. Després de descartar altres regions

utilitzades en la bibliografia per a la detecció d'adenovirus per PCR (polimerasa de DNA), es va seleccionar la regió de l'hexò per al disseny d'oligonucleòtids per a la detecció de BAdV i PAdV. De la mateixa manera, es van establir oligonucleòtids en la regió de la proteasa viral per a una posterior confirmació de la identificació de PAdV i dels BAdV pertanyents al gènere *Atadenovirus*. Les característiques de cada oligonucleòtid utilitzat es troben resumides en l'apartat 8.20 inclòs en l'annex de Materials i Mètodes.

Per a l'amplificació específica de fragments de genomes d'adenovirus continguts en la suspensió general d'àcids nucleics, es va aplicar un protocol habitual de PCR niada (Sambrook i Russell, 2001) descrit en l'apartat 8.4 de l'annex de Materials i Mètodes. Per a cada tipus d'adenovirus i cada regió a analitzar es va aplicar un joc d'oligonucleòtids diferent. Les condicions d'amplificació generals van ser, en tots els casos, una desnaturalització inicial a 94°C de 4 min, 30 cicles dividits en 3 passos: una desnaturalització inicial a 92°C durant 60 sec, una hibridació a la temperatura idònia segons cada joc d'oligonucleòtids durant 60 sec i una extensió a 72°C durant 75 sec, i, en darrer lloc, una extensió final a 72°C durant 7 min. La temperatura d'hibridació utilitzada en cada cas s'indica en la Taula 8.20.

Els productes resultants de l'amplificació enzimàtica van ser analitzats per electroforesi en gel d'agarosa i tinció amb bromur d'etidi, tal com s'especifica en l'apartat 8.5 de l'annex de Material i Mètodes.

2.2.8. Seqüenciació i anàlisi de genomes virals

Els amplicons obtinguts en els diferents tipus de mostres van ser purificats i seqüenciats mitjançant el protocol detallat en l'apartat 8.6 de l'annex de Material i Mètodes. L'anàlisi de seqüències es realitzava en la Unitat de Genòmica dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

Les seqüències resultants van ser alineades mitjançant el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). En els alineaments de nucleòtids (nt), les posicions de les possibles insercions i delecions van ser corregides manualment d'acord als alineaments

d'aminoàcids (aa). La construcció d'arbres filogenètics es va establir utilitzant el paquet de programes Phylip en comparació amb les seqüències disponibles en els bancs de dades. Concretament, es va utilitzar el mètode de *neighbor joining* (Saitou i Nei, 1987) aplicant un *bootstrap* de 100 rèpliques.

En la taula inclosa en l'apartat 8.22 de l'annex de Materials i Mètodes s'especificuen els números d'accés al *GenBank* de les seqüències obtingudes en aquest estudi.

2.3. Resultats

2.3.1. Detecció d'adenovirus porcins en mostres fecals

Un total de 23 mostres en forma de *pool* procedents de 7 granges diferents van ser estudiades per a la presència d'adenovirus porcins mitjançant els oligonucleòtids dissenyats sobre la regió de l'hexò. Cinc *pools* de les dues primeres granges van ser analitzats i, en ambdós casos, 3 d'ells van ser positius per PAdV. De la mateixa manera, es van analitzar 5 *pools* de la tercera granja –2 procedents d'animals d'engreix i 3 procedents d'animals de cria-, dels quals 1 i 2 van ser positius, respectivament. Finalment, es van estudiar 2 *pools* de cadascuna de les 4 altres granges i totes van ser positives. En conjunt, 17 mostres de les 23 estudiades van mostrar presència de PAdV, indicant una prevalença de gairebé un 75% en el conjunt de *pools* analitzats.

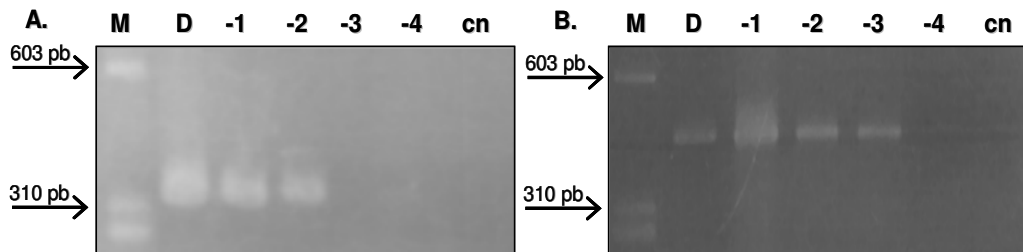


Fig. 2.1. Sensibilitat de la detecció d'adenovirus porcins (A) i bovins (B) en mostres fecals mitjançant PCR niada sobre dilucions decimals límit (dilució directa (D) i dilucions decimals: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , i 10^{-4}). La figura mostra en cada cas el control negatiu sense DNA viral (carrils cn) i el marcador de pes molecular.

Per tal d'estimar la quantitat de virus que eren excretats en les femtes, es van analitzar amb el mateix joc d'oligonucleòtids dilucions decimals límit de diferents mostres fecals positives. Així, es va establir una taxa de 10^1 - 10^3 equivalents genòmics detectables per gram de contingut fecal (Fig. 2.1). En cap cas es va poder establir una relació entre els nivells d'excreció de PAdV i les característiques dels animals (sexe, edat) o la finalitat comercial a la que estaven destinats.

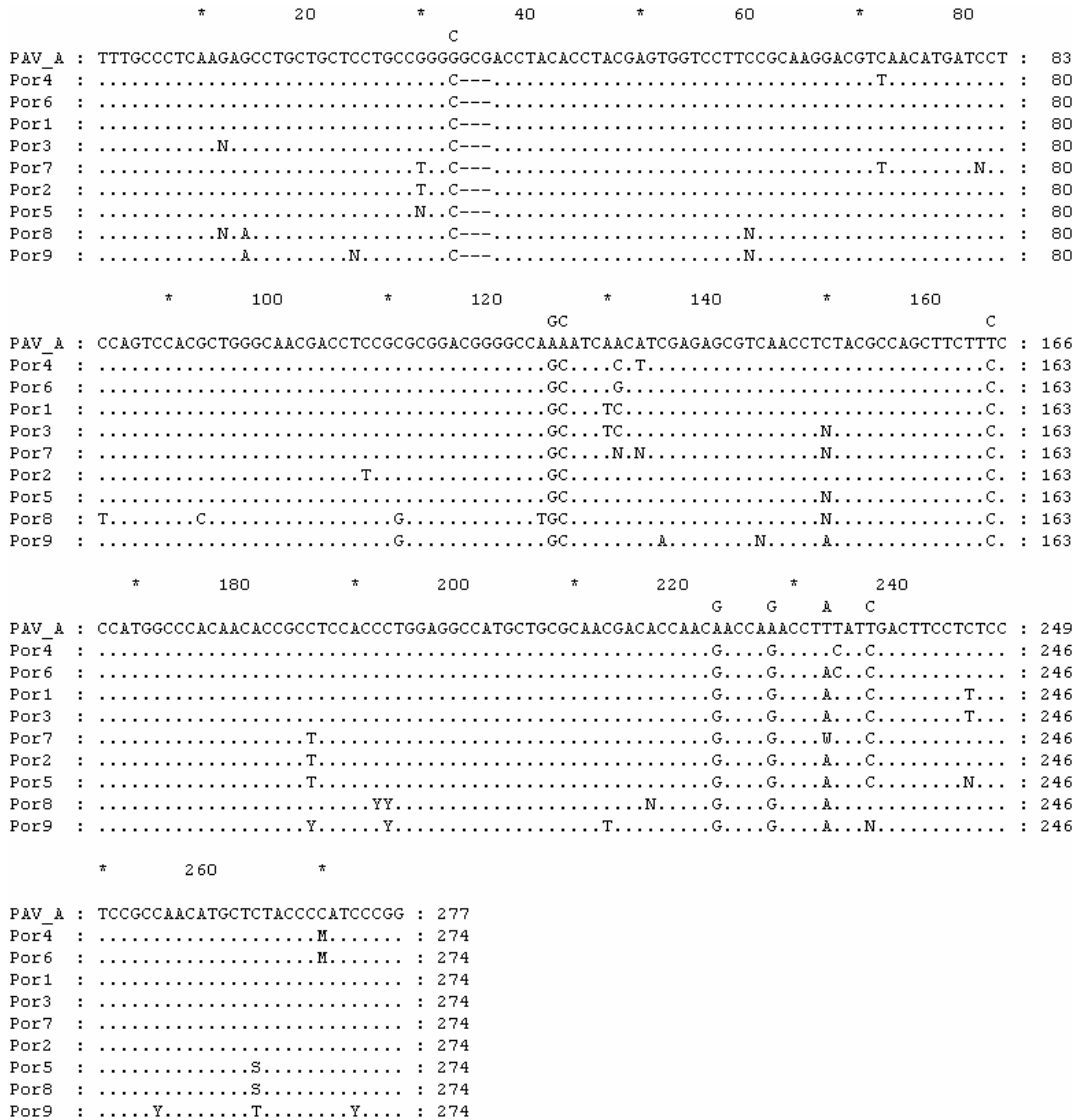


Fig. 2.2. Alineament de les seqüències obtingudes sobre la regió codificadora de l'hexò de 9 mostres positives per a PAdV, en comparació amb la soca de referència IAF del serotip 3 (PAV·A). Els punts indiquen identitats nucleotídiques i els guions indiquen manca de nucleòtids. M = A + C, Y = C + T, W = A + T, i N = nucleòtid.

Els amplímers de 344 pb de 9 de les 17 mostres positives van ser seqüenciats i les seqüències obtingudes, anomenades Por1-Por9. L'alineament de les mateixes es mostra en la figura 2.2. En aquest s'observa com tots els aïllats estan molt relacionats entre si i amb la soca IAF del serotip 3 dels PAdV, compartint entre elles un 93-98% de similitud nucleotídica. Aquesta elevada homologia va ser confirmada estudiant la regió de la proteasa del virus en diverses mostres. En tots els casos, la similitud nucleotídica va ser d'un 98% amb la mateixa soca de referència

2.3.2. Detecció d'adenovirus bovins en mostres fecals

Un total de 12 mostres en forma de *pool* procedents de dues granges diferents van ser estudiades per a la presència d'adenovirus bovins mitjançant els oligonucleòtids dissenyats sobre la regió de l'hexò. Per a la primera granja, 3 de les 4 mostres van resultar ser positives per a BAdV, mentre que en la segona granja tan sols ho van ser 3 de les 8 mostres analitzades. Cal destacar que en aquest últim cas 6 mostres provenien de vedells d'entre 2 i 5 mesos d'edat, de les quals tan sols una va presentar adenovirus bovins, i les altres dos mostres provenien d'animals adults, en ambdues de les quals es va identificar el mateix aïllat, que era, però, diferent del detectat en els vedells (veure més endavant). Es va establir, doncs, una prevalença del 50% en els *pools* de mostres fecals de totes dues granges. En aquest cas, totes les mostres que procedien d'animals adults i la meitat de les corresponents a animals joves van presentar BAdV. Tal i com s'havia realitzat amb els PAdV, es van analitzar dilucions decimals límit de mostres fecals positives per determinar la sensibilitat del test establert. Pels BAdV, l'assaig va detectar concentracions de 10^4 equivalents genòmics per gram de mostra (veure Fig. 2.1).

Els amplímers de les 6 mostres positives van ser seqüenciats i anomenats BovA-BovF. En realitzar l'alineament amb les seqüències de referència presents en els bancs de dades, es va poder determinar l'elevada variabilitat identificada en aquestes mostres (Fig. 2.3). Els aïllats BovD i BovE, que procedien de la mateixa granja, foren idèntics entre ells (100%) i tan sols van mostrar un 82% de similitud nucleotídica amb el subtipus A de l'adenovirus boví tipus 2 (BAdV2), un membre inclòs en el gènere *Mastadenovirus*. Els aïllats BovA, BovC i BovF van mostrar una elevada similitud

(92%) amb la soca THT/62 del BAdV4, mentre que l'aïllat BovB va ser idèntic (100%) a la soca Fukuroi del serotip 7 (BAdV7), de manera que tots ells es van mostrar propers als membres del subgrup II d'adenovirus bovins i, per tant, al gènere *Atadenovirus*.

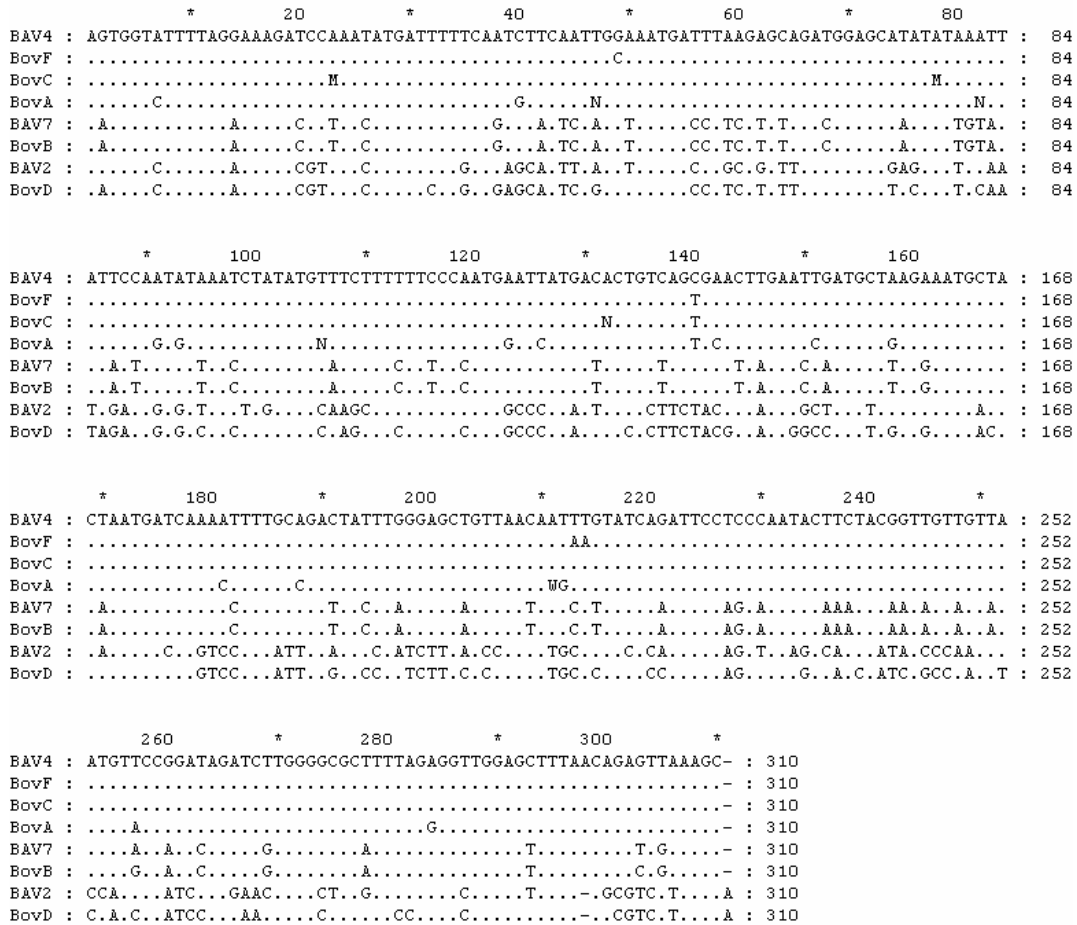


Fig. 2.3. Alineament de les seqüències obtingudes sobre la regió codificadora de l'hexò de 6 mostres positives per a BAdV, en comparació amb les soques de referència de major homologia. Els punts indiquen identitats nucleotídiques i els guions indiquen manca de nucleòtids. M = A + C, Y = C + T, W = A + T, i N = nucleòtid.

Per tal de confirmar la classificació dels aïllats propers al gènere *Atadenovirus*, es va amplificar la regió codificadora de la proteasa viral. Les seqüències dels amplimers de 525 pb obtinguts per als aïllats BovA i BovC van ser idèntics al serotip 4 soca THT/62, mentre l'obtingut per a l'aïllat BovB va mostrar 98% de similitud amb la soca Fukuroi del serotip 7 (Fig. 2.4). La proteasa dels adenovirus és una proteïna de 201 residus que presenta una triada catalítica altament conservada definida pel motiu His₅₁-

Glu₇₁-Cys₁₂₂. Tan sols en el serotip 2 i 5 dels adenovirus humans, l'àcid glutàmic (Glu, [E]) es troba substituït per l'àcid aspàrtic (Asp, [D]) (Ding *et al.*, 1996). En tots els aïllats es va identificar aquest motiu catalític. De manera similar, el residu Cys₁₀₃, descrit com a punt d'unió del pèptid cel·lular pVI (Mangel *et al.*, 1997), es va mostrar conservat en totes les seqüències. No obstant, el residu prolina en la posició 137, que està involucrat en el tràfic intracel·lular, va ser identificat en les seqüències porcines, però no en cap de les bovines. Aquest residu ha estat descrit en les proteases del membres del gènere *Mastadenovirus*, però no es troba present en les dels membres del gènere *Atadenovirus* ni *Aviadenovirus* (Harrach *et al.*, 1997). L'absència d'aquest residu en els nostres aïllats confirmava la seva classificació dins el nou gènere.

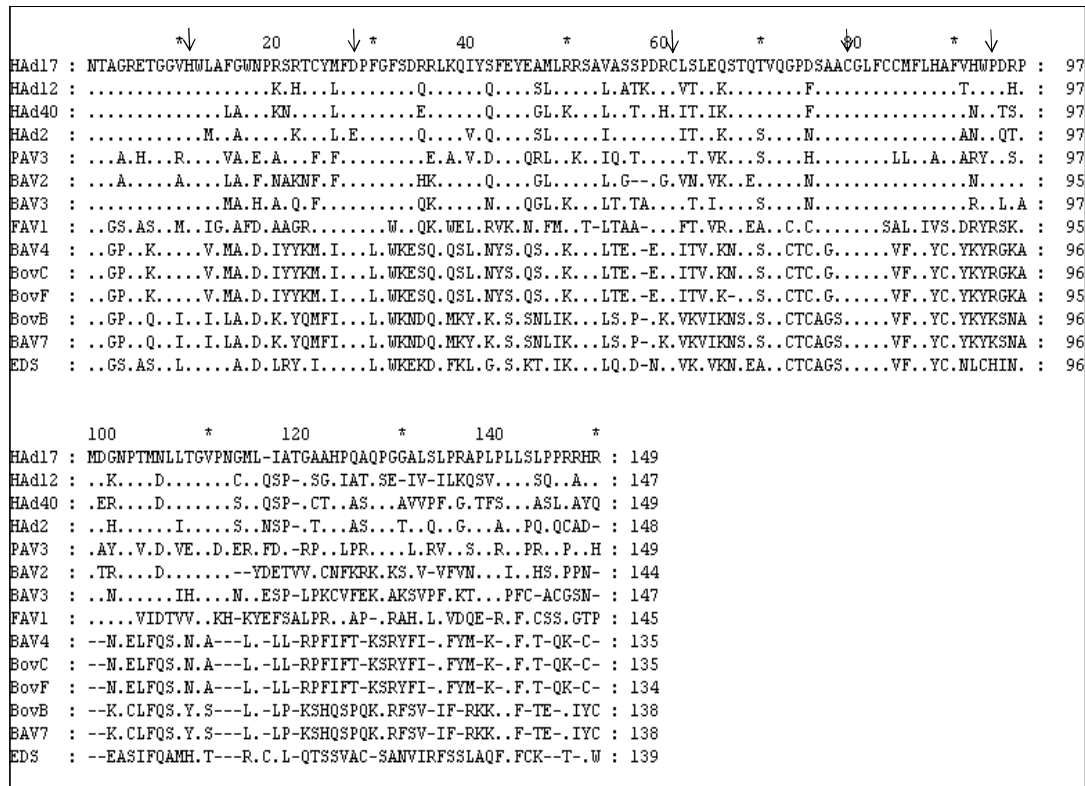


Fig. 2.4. Alineament de les seqüències de la regió codificadora de la proteasa viral dels aïllats similars als membres del gènere *Atadenovirus*, en comparació amb diverses soques de referència. Les fletxes mostren residus rellevants en l'estructura i funció de la proteïna.

2.3.3. Detecció d'adenovirus ovins en mostres fecals

Un total de 4 mostres en forma de *pool* de 2 animals van ser analitzades per a la presència d'adenovirus ovins (OAdV) usant els oligonucleòtids dissenyats per a l'estudi

de la presència de BAdV. D'acord als alineaments realitzats, aquest joc d'oligonucleòtids permetia la detecció d'OAdV, però, en canvi, cap de les mostres testades va mostrar la presència d'adenovirus.

2.3.4. Detecció d'adenovirus en aigua residual

Un cop avaluada la prevalença d'ambdós tipus de virus en mostres fecals, es va estudiar la presència dels virus en aigües residuals amb contaminació d'origen humà i d'origen animal i poder determinar, així, la seva idoneïtat com a traçadors específics de contaminació porcina i/o bovina en el medi. Una col·lecció de 12 mostres d'aigua residual urbana, recollides mensualment comprenent un any, van ser analitzades per a la presència d'adenovirus porcins, bovins i humans. En cap d'elles es van identificar PAdV ni BAdV, tal com era d'esperar tenint en compte el baix nivell de contaminació fecal animal potencialment present en aquestes mostres. En canvi, 11 de les 12 van mostrar presència d'HAdVs, la qual cosa està en consonància amb estudis anteriors reportant una alta prevalença d'adenovirus humans en aigües residuals (Pina *et al.*, 1998).

Posteriorment, es van avaluar 10 mostres d'efluents procedents de 2 escorxadors diferents. Per tal de establir una correlació entre els dos indicadors proposats, es va triar un escorxador que presentés un alt nivell de contaminació d'origen boví -processava bestiar boví, però no porcí-, i un altre que presentés contaminació d'origen porcí -processava majoritàriament bestiar porcí i, en segon terme, bestiar boví. En el primer cas, tan sols una de les mostres va mostrar presència de BAdV, mentre que en el segon, totes les mostres van mostrar presència de PAdV, però cap de BAdV (A. Hundesa, comunicació personal; Hundesa *et al.*, 2006).

2.3.5. Especificitat dels oligonucleòtids dissenyats

L'especificitat dels diferents jocs d'oligonucleòtids dissenyats s'havia inicialment establert per anàlisi de totes les seqüències disponibles en els bancs de dades. Posteriorment, els oligonucleòtids dissenyats sobre la regió codificadora de l'hexò dels PAVs i BAVs van ser testats sobre suspensions d'adenovirus humà tipus 2,

5, 12 i 41 a concentracions de 10^7 partícules víriques i en tots els casos no es va observar amplificació creuada. Finalment, un cop es va disposar d'un grup de mostres fecals amb presència d'adenovirus de diferents orígens, es va testar experimentalment la potencial detecció d'aquests amb jocs d'oligonucleòtids no corresponents amb l'origen de la mostra. Així, tots els aïllats bovins identificats i dos mostres representatives dels aïllats porcins van ser testades amb tots 3 jocs. Tal com s'observa en la figura 2.5, en cap mostra es van observar casos d'amplificació creuada i tots els aïllats van ser amplificats amb el joc d'oligonucleòtids corresponent.

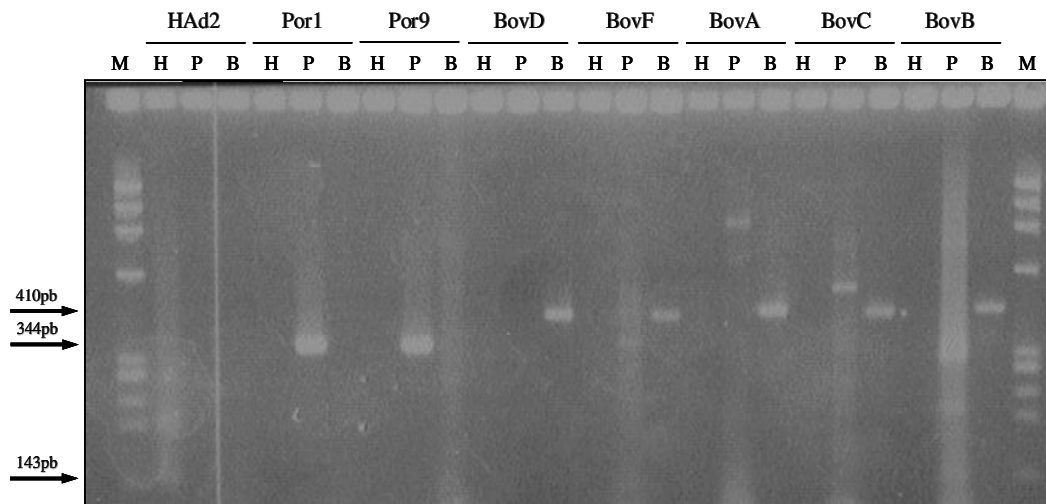


Fig. 2.5. Assajos d'especificitat dels oligonucleòtids dissenyats per a la detecció d'adenovirus humans (H), porcins (P) i bovins (B) en una col·lecció de mostres fecals que contenien aïllats d'adenovirus porcins o bovins identificats prèviament.

2.4. Discussió

Els virus entèrics són considerats bons candidats com a indicadors de la presència de contaminació fecal en el medi principalment a causa de la seva gran especificitat d'hoste i les elevades taxes de supervivència que mostren sota condicions variables (Fong i Lipp, 2005). Els adenovirus humans han estat proposats anteriorment com a índex de virus humans, ja que la seva detecció molecular per PCR ha permès demostrar la seva correlació amb la presència de virus humans en aigües i mol·luscs bivalves (Formiga-Cruz *et al.*, 2003). A més, el fet que presenten un genoma constituït de DNA, la seva uniforme distribució geogràfica i estacional (Pina *et al.*, 1998), i la seva estabilitat en un ampli rang de condicions ambientals (Enriquez *et al.*, 1995; Meng

i Gerba, 1996) en suggereixen la seva idoneïtat. En aquest estudi, s'ha desenvolupat una eina per identificar la presència de contaminació d'origen animal a l'ambient, concretament detectant adenovirus porcins i bovins com a traçadors de contaminació fecal del mateix origen.

La metodologia utilitzada per a la identificació d'aquests virus en els diferents tipus de mostres ambientals ha estat fonamentada en tècniques i protocols d'elució i concentració de virus prèviament avaluades en el nostre laboratori (Puig *et al.*, 1994; Pina *et al.*, 1998) i en l'aplicació de la tècnica de PCR niada, la sensibilitat de la qual permet detectar fins a un equivalent genòmic en cada reacció de PCR usant jocs d'oligonucleòtids adequats. El disseny d'oligonucleòtids específics per a la identificació d'adenovirus bovins i porcins es va centrar en el gen que codifica per a una proteïna estructural del virus, la proteïna de l'hexò, doncs aquesta regió és força conservada entre les espècies, permetent la detecció dels diferents aïllats d'una espècie per mitjà dels mateixos oligonucleòtids. L'hexò dels adenovirus està compost per una superfície triangular de seqüència variable codificada per 3 fragments gènics entre els que es troben 2 regions conservades riques en làmines β , anomenades P1 i P2. Els oligonucleòtids dissenyats per a la detecció tant de PAdV com BAdV estan localitzats en una regió compartida per un fragment P1 i un fragment P2. El disseny dels mateixos es va establir sobre l'estudi comparatiu de les seqüències disponibles en els bancs de dades. En aquest sentit, segons els estudis computacionals, els oligonucleòtids dissenyats sobre la seqüència de l'hexò dels BAdV permetrien la identificació tant d'adenovirus bovins com ovins, tot i que aquesta possibilitat no ha pogut ser avaluada experimentalment.

L'especificitat dels diferents tests desenvolupats en aquest estudi ha estat àmpliament demostrada sometent els jocs d'oligonucleòtids a amplificació sobre mostres fecals d'origen diferent al corresponent, així com sobre inòculs d'HAdV provinents de cultiu cel·lular. L'especificitat dels oligonucleòtids utilitzats per a la detecció d'HAdVs ja havia estat testada anteriorment sobre una col·lecció de 9 mostres d'efluents escorxador que contenien únicament contaminació fecal animal (Pina *et al.*, 1998). No obstant, és important ampliar el número de mostres i l'àrea geogràfica de l'estudi per tal d'avaluar l'aplicabilitat dels paràmetres descrits com a marcadors de contaminació d'àmplia utilització.

Els adenovirus porcins aïllats en aquest estudi van ser altament similars al PAdV3, concretament a la soca IAF. Es tracta d'una soca derivada de la soca 6618, adaptada a cèl·lules de ronyó porcí, que ha estat identificada en diversos països, sense estar relacionada amb patologies severes (Derbyshire i Grown, 1978). El fet que els diferents aïllats mostressin major similitud entre ells que respecte a la soca de referència, fins al punt de mostrar una deleció comuna, indicava la possibilitat de l'existència d'una soca nova localitzada en la regió estudiada. No obstant, l'anàlisi de la regió codificadora de la proteasa va confirmar clarament la identificació inicial.

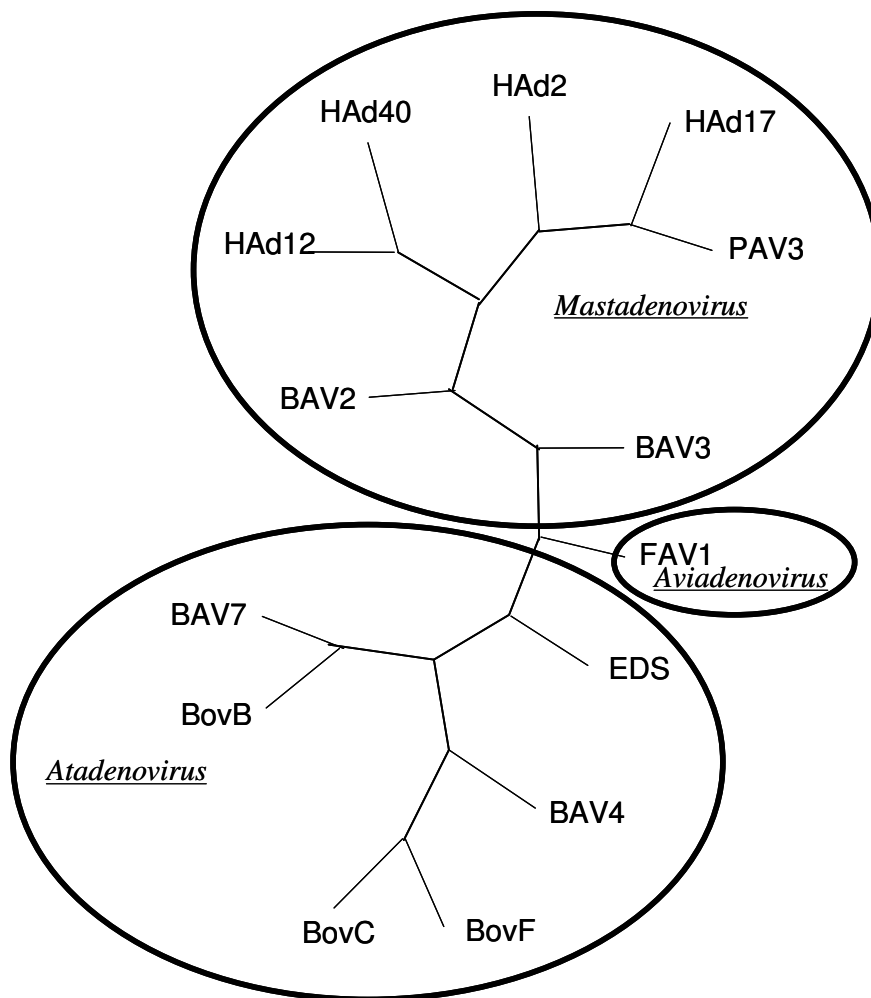


Fig. 2.6. Reconstrucció filogenètica de diferents espècies d'adenovirus, incloent els aïllats obtinguts en aquest estudi.

Els adenovirus bovins aïllats van mostrar, en canvi, una elevada variabilitat, incloent soques properes als dos gèneres en els que estan dividits actualment. Així, es van detectar aïllats molt similars o idèntics als serotips 4 i 7, considerats membres del subgrup II de BAdVs i inclosos en el gènere *Atadenovirus*. L'anàlisi de la regió de la proteasa va confirmar aquestes identificacions. El serotip 4 no s'ha associat a malalties greus i tan sols experimentalment ha provocat broncopneumònies lleus. No obstant, el serotip 7 ha estat aïllat en sang de bestiar que patia episodis febrils (Inaba *et al.*, 1968), la qual cosa confirma la major patogenicitat d'aquest subgrup que inclou sovint processos de virèmia temporal. D'altra banda, es va detectar també un aïllat similar a serotip 2 i, per tant, inclòs en el gènere *Mastadenovirus*. Fonamentalment a causa de diversos estudis d'hemoaglutinació i dels patrons de restricció observats, aquest serotip ha estat dividit en dues subespècies (A i B) que agrupen la variabilitat pròpia de la espècie (Belak *et al.*, 1983). L'aïllat detectat en aquest estudi va mostrar-se similar en un 82% al subtipus A segons la regió amplificada en l'hexò del virus. No es va poder, però, amplificar la regió de la proteasa viral, la qual cosa recolza l'alta variabilitat present en el BAdV2. Tot i que l'estudi es va realitzar sobre *pools* de femtes, aquesta variabilitat va ser identificada en un nombre relativament baix de mostres, indicant que diversos serotips poden conviure en un reduït nombre d'individus.

L'estudi filogenètic basat en la seqüència de la proteasa viral va mostrar clarament la formació de dos *clusters* diferents (Fig. 2.6). En el primer, s'agrupen entre altres els HAdVs, PAdVs i els membres del subgrup I dels BAdVs. En el segon, s'inclouen aïllats atípics d'OAdVs i d'adenovirus aviars, així com els membres del subgrup II dels BAdVs, de manera que constitueixen un nou gènere. L'evolució de la família *Adenoviridae* sembla estar clarament exemplificada per l'evolució dels adenovirus bovins, en el sentit en que segueixen els dos models que han estat proposats: una evolució exclusiva amb l'espècie afectada (cas dels *Mastadenovirus*) o una ampliació major en el nombre d'hostes susceptibles (cas dels *Atadenovirus*), fet que hauria permès el salt a altres espècies com l'ovella (Belak i Rusvai, 1986; Barbezange *et al.*, 2000), cérvols (Lehmkuhl *et al.*, 2001) i ants (Shilton *et al.*, 2002).

L'elevada prevalença observada tant per adenovirus porcins com bovins en mostres fecals va conduir a l'estudi de la prevalença en aigües residuals per tal de poder determinar la seva idoneïtat com a traçadors específics de contaminació porcina i/o

bovina en el medi. La detecció de PAdVs en efluent d'escorxadors on sacrificaven bestiar porcí va ser d'un 100%, la qual cosa està en consonància amb la seva taxa d'excreció segons aquest mateix estudi. No es van pràcticament detectar, en canvi, BAdVs en els efluent d'ambdós escorxadors, tot i que processaven bestiar boví en major o menor mesura. Aquest resultat pot estar condicionat per la menor taxa d'excreció de BAdV observada en aquest estudi en comparació amb els PAdV, encara que s'hauria de disposar de dades de poblacions més grans d'individus per poder establir relacions consistents.

En aquest sentit, durant el desenvolupament d'aquest estudi es va treballar en el grup de recerca en la identificació d'un altre potencial marcador de la contaminació fecal d'origen boví. En un treball dut a terme per Ayalkibet Hundesa, s'ha descrit la utilització de poliomavirus bovins (BPyV) com a indicadors, doncs la seva presència va ser identificada en totes les mostres d'efluent i en cap de les mostres d'aigua residual urbana analitzades en aquest estudi (Hundesa *et al.*, 2006). Aquest fet demostra l'existència de contaminació bovina en els efluent dels escorxadors on es processava bestiar boví, que no va poder ser identificada utilitzant els BAdV com a traçadors. Algunes d'aquestes mostres van ser posteriorment analitzades per a la presència de prions, doncs van ser recollides poc després del diagnòstic d'un cas d'EET en algun d'aquests escorxadors.

2.5. Annex: Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=368300&blobtype=pdf>

Capítol III: Estudi de la contaminació per prions en efluent d'escorxador

3.1. Antecedents i objectius

Els primers casos d'una nova encefalopatia, l'encefalopatia espongiforme bovina (EEB), diagnosticada al Regne Unit a mitjans dels anys 80, ja van permetre als investigadors d'establir-ne una associació amb l'*scrapie* de les ovelles degut a la singularitat de la patogènia d'ambdues malalties. Es va establir, aleshores, com a lligam més factible entre les dues malalties, una contaminació en la via alimentària causada per la supervivència dels agents infecciosos en els suplementes càrnics aplicats de forma habitual en els pinsos. Aquests suplementes consisteixen en farines de carn i ós (MBM, de l'anglès *meat and bone meal*) procedents del processat de les carcasses i altres teixits animals (un procés de cocció conegut com a *rendering*) descartats de la cadena alimentària humana. Aquesta és una sortida habitual per a aquesta mena de residus, dels quals s'origina una fase aquosa, una fase de greix -que s'utilitza com a combustible i en certes indústries- i una tercera fase fonamentalment proteica també coneguda com a farines càrniques, així com un llot residual final que es descarta al medi.

Ja a principis dels anys 90, l'ús de farines de carn i ós en la cadena alimentària va ser prohibit en diversos països de la Unió Europea, entre ells França i Suïssa. Aquesta prohibició es va estendre a la resta de països membres de la UE a finals de l'any 2000 (Fontaine i Winberg, 2001). Poc després es van instaurar els Plans de Vigilància Activa, encara vigents, que obliguen a l'anàlisi sistemàtic de les EET en tots els bovins majors de 30 mesos que entren en la cadena alimentària, així com els ovins

majors de 12 mesos. Tan sols, el Regne Unit va quedar-ne exclòs, doncs es trobava des de l'any 1996 sota l'OTMS (*Over Thirty Month Scheme*) que disposava, entre altres, noves regles pel processat dels animals majors de 30 mesos, així com la seva completa exclusió de la cadena alimentària humana. Val a dir que des de l'any 2006 el Regne Unit ja es troba inclòs en l'esquema general de la UE. L'anàlisi sistemàtic de les EET en els escorxadors es realitza mitjançant proves ràpides, que substitueixen a la identificació de la triada de lesions en el SNC. Aquestes suposen un diagnòstic de la malaltia en aproximadament 24 hores i es fonamenten en la immunodetecció de la PrP^{Sc} o dels seus agregats, els SAF o *scrapie-associated fibrils*, gràcies a la seva resistència parcial al tractament per proteases. En aquest temps, certs residus animals de risc que haguessin estat despresos de l'animal durant el processat del mateix podrien ser potencialment drenats cap a la xarxa d'aigües residuals i arribar a contaminar els llots finals derivats dels tractaments d'aquests efluent, que són sovint dipositats en camps i zones de cultiu com a fertilitzants.

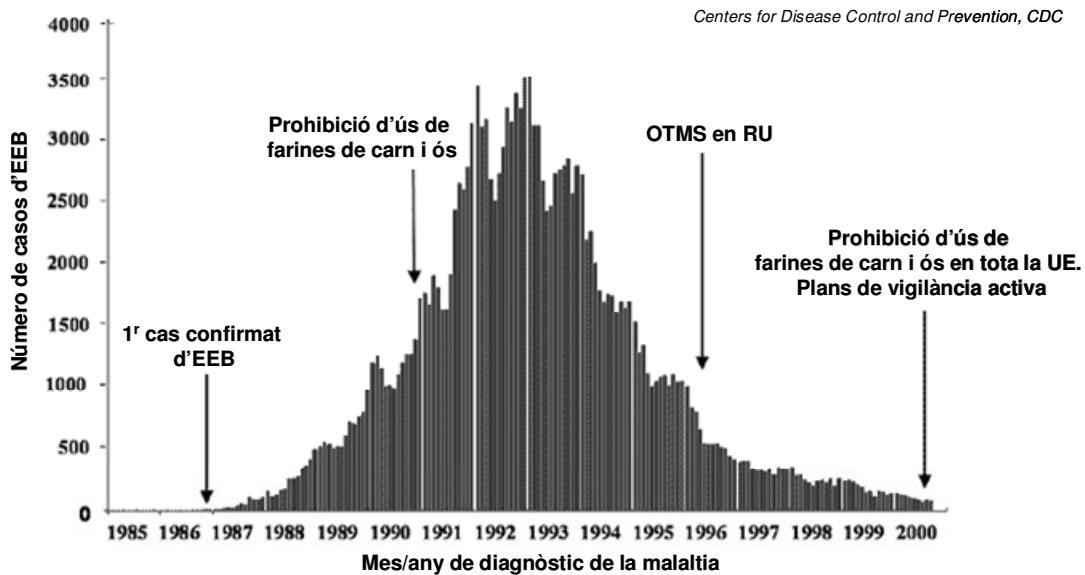


Fig. 3.1. Epidemiologia de l'EEB en relació a les diferents mesures preses en els darrers anys en la Unió Europea.

De forma general, quan els caps de bestiar arriben als escorxadors són estabornits per tal d'insensibilitzar-los mantenint el cor en funcionament de cara al posterior sagnat. Aquest consisteix en recollir mitjançant secció o punció dels vasos sanguinis de major calibre la quantitat més gran possible de sang a fi de provocar la

mort de l'animal. Un cop l'animal és mort, es procedeix al seu escorxament o retirada de la pell, a l'evisceració i a la retirada del cap, si bé aquest últim pas pot realitzar-se en estadis anteriors. Prèvia retirada de la medul·la espinal, es procedeix a la fenedura de les carcasses, que són pesades i congelades per a la seva comercialització. Certament, durant totes aquestes manipulacions existeix un risc associat als òrgans susceptibles de contenir infectivitat o PrP^{res} en els que la seva estructura anatòmica o el mode en el que son tractats fa possible un contacte de les parts més internes i el medi exterior. Aquests són, doncs, l'encèfal, la medul·la espinal i les amígdales. Per a altres òrgans on s'ha detectat certa infectivitat, la situació és diferent i suposa menor risc, ja que l'òrgan en si es troba protegit per una càpsula de teixit fibrós (cas de la melsa) o bé la seva manipulació no suposa un contacte directe amb l'exterior (cas dels intestins).

Com a punts de màxim risc, cal destacar la retirada del cap, on la desintegració de part del tronc cerebral i la manipulació del cap encara no congelat poden provocar la pèrdua de fragments de teixit del SNC. La retirada de la medul·la espinal, freqüentment per aspiració, pot permetre també que certs teixits restants puguin ser canalitzats cap a la xarxa d'aigües residuals durant els posteriors rentats de les carcasses. L'estaborniment no suposa un procés de risc a no ser que alguns fragments de teixit nerviós puguin ser expulsats pel forat de trepanació. En aquest sentit, alguns mètodes aplicats fins ara han estat prohibits per la Comissió Europea per la seva agressivitat i disrupció del SNC. A nivell quantitatiu es fa realment difícil determinar l'acumulació de teixits que poden desprendre's de les carcasses. Gale i Stanfield (2001) han enumerat amb detall els possibles punts de risc i han considerat que fins a un 1% del MER de cada animal podria arribar a la xarxa d'aigua residual, si bé, tal com suggereixen els mateixos autors, considerar 0.01% fora més realista atenent-nos a les normatives i disposicions introduïdes en els últims anys. En un estudi semiquantitatiu realitzat sobre 6 escorxadors diferents publicat per l'AFSSA (*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*¹) l'any 2003, es van recollir els fragments de SNC dispersats en els diferents punts de risc i es va determinar una mitja de 2.73 g/carcassa de boví. D'altra banda, la disseminació hipotètica dels prions durant el procés d'escorxament ha estat també estudiada de forma indirecta. Mitjançant la inoculació d'un agent marcador en

¹ *Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments concernant les risques sanitaires, au regard de l'ESB, liés au rejet dans l'environnement des efluent et boues issus d'abattoirs et d'equarrisages, 30 Octobre 2003.*

l'encèfal boví durant el procés d'estaborniment, Daly i cols. (2002) han observat la presència del microorganisme marcador en diferents òrgans i en l'entorn immediat a la zona de manipulació.

Les aigües utilitzades en tots els processos duts a terme en els escorxadors han de sotmetre's obligatòriament a una etapa de pretractament abans d'arribar a la planta de tractament pròpiament dita. Aquest pretractament té com a objectiu l'eliminació dels materials més grollers i d'aquells que poguessin dificultar l'aplicació dels tractaments posteriors. Es tracta, doncs, de processos de filtració que, en primer pas, eliminen plàstics, etiquetes d'identificació, unglots, teixits conjuntius, etc., i, en un segon pas, eliminen residus sòlids la mida dels quals depèn del diàmetre de la malla, normalment entre 4 i 6 mm. Els efluent filtrats poden aleshores ser abocats cap a una xarxa d'aigües residuals superiors, típicament la del centre urbà més proper, o ser tractats en una planta situada normalment en sèrie respecte el propi escorxador. En aquestes plantes, de forma general, s'estableix un tractament primari dels efluent, freqüentment processos de floculació i sedimentació, i un tractament secundari basat en digestió aeròbica o anaeròbica. D'aquests processos s'obté una fase aquosa canalitzada cap a una planta depuradora i un llot que és abocat directament al medi.

En general, els diferents estudis de valoració de risc no assumeixen cap tipus d'inactivació d'aquests agents infecciosos durant els diferents tractaments que reben les aigües residuals, ja que es pressuposa la seva elevada resistència a la inactivació. Únicament s'ha establert un estudi sobre el nivell de degradació dels prions en experiments de digestió anaeròbica. Kirchmayr i cols. (2006) han determinat la pèrdua d'un logaritme de PrP^{res} després d'una incubació de 302 hores en condicions termofíliques, en un procés d'inactivació clarament depenent de la matriu i no pas de la càrrega microbiològica.

En aquest capítol es descriu el desenvolupament d'una metodologia sensible i fiable per a la detecció de prions, tant els causants de l'encefalopatia espongiforme bovina com els causant d'*scrapie*, en efluent procedents d'escorxadors. Per mitjà d'aquesta metodologia, s'ha establert un seguiment de la presència potencial d'aquests patògens en les aigües residuals de diferents escorxadors de Catalunya on s'han identificat casos de malalties priòniques.

3.2. Materials i mètodes

3.2.1. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en efluent d'escorxador

3.2.1.1. Teixits infectats per EET

La metodologia per a la detecció de prions en aigües residuals d'escorxador va ser posada a punt tant per a *scrapie* com per a EEB. Per a tota la sèrie d'experiments de dopatge establerts, es van preparar inòculs (20%, p/v) consistents en homogeneïtzat d'encèfal afectat d'*scrapie* (anomenat aquí homogeneïtzat positiu scrapie, HP·Sc), d'homogeneïtzat d'encèfal afectat d'EEB (homogeneïtzat positiu EEB, HP·EEB), d'homogeneïtzat d'encèfal d'ovella no afectat (homogeneïtzat negatiu, HN·Ove) i d'homogeneïtzat d'encèfal de vaca no afectat (homogeneïtzat negatiu, HN·Vaca). La preparació dels mateixos es descriu en l'Annex de Materials i Mètodes, apartat 8.7.

De la mateixa manera, es va disposar d'inòculs infectats que havien estat prèviament titulats en ratolí i que van ser utilitzats per expressar els resultats en forma de dosis infeccioses letals 50 (DL₅₀). D'una banda, un inòcul (20% p/v) procedent d'un *pool* d'encèfals infectats per la soca Dawson d'*scrapie* va ser cedit pel Dr. Olivier Andréoletti (*Institute Nationale de la Recherche Agronomique*, INRA/ENVT, Toulouse, France). Aquest inòcul havia estat prèviament titulat en termes d'infectivitat per inoculació intracerebral (i.c.) en ratolins transgènics (Tg 338) en 10^{7.5} DL₅₀ per gram de teixit. De l'altra, un inòcul (20% p/v) infectat d'EEB (Moynagh i Schimmel, 1999) va ser cedit pel Dr. Jacques Grassi (*Commissariat a l'Energie Atomique*, CEA/Saclay, France). Aquest inòcul havia estat titulat en 10^{3.1} DL₅₀ i.c. en ratolí per gram de teixit.

Es van determinar les concentracions de PrP^{Sc} i PrP^C en els inòculs utilitzats en els experiments de dopatge, tant en el HP·Sc com en el HN·Ove. El contingut en PrP^{Sc} va ser analitzat mitjançant el kit de purificació de SAF per a teixits biològics comercialitzat per la casa Bio-Rad (*Bio-Rad TeSeE-Purification Kit*). El principi del kit es basa, de forma genèrica, en l'homogeneïtzació del teixit a analitzar, l'aplicació d'un tractament amb proteïnasa K (PK) i la precipitació i concentració de les proteïnes

resistents per a una posterior detecció molecular. Els passos concrets es detallen en l'apartat 8.9 de l'annex de Materials i Mètodes.

La determinació del contingut en PrP^c en ambdós inòculs es va realitzar seguint el protocol que es detalla en l'apartat 8.10 de l'annex de Materials i Mètodes. En ambdós casos, la detecció final es va realitzar per ELISA mitjançant el *Bio-Rad TeSeE-Sheep/Goat EIA Detection kit*, el mode d'utilització del qual es detalla en l'apartat 8.18 de l'annex de Materials i Mètodes.

3.2.1.2. Efluent d'escorxador

Els efluent d'escorxador emprats en els experiments de dopatge provenien de dos escorxadors diferents. El primer escorxador, denominat A, es troba en la localitat d'Argentona (Catalunya) i processa bàsicament bestiar oví i boví. En aquest escorxador, l'aigua provinent de tota l'estació, incloent-hi la dels sanitaris utilitzats pel personal, es filtra a través d'una malla de 4 mm de diàmetre de porus i drenada en un tanc d'emmagatzematge. A partir d'aquí l'aigua es conduïda cap un tanc de floculació al mateix temps que diversos floculants comercials són afegits. Un cop rebut aquest tractament primari, l'aigua es abocada al sistema general de depuració de la localitat. Les mostres utilitzades en aquest estudi van ser obtingudes del tanc d'emmagatzematge d'aigua crua, anomenada aquí 'Arg'.

El segon escorxador correspon al situat en la localitat de Montauban (*Midi-Pyrénées, France*) i va ser obtingut gràcies a la Prof. Geneviève Benard (*École Nationale Vétérinaire de Toulouse, ENVT, Toulouse, France*). Es tracta d'un escorxador multiespècie, doncs s'hi processen tot tipus d'ungulats domèstics: bovins, ovins, alguns caprins, porcins i, fins i tot, equins. L'aigua que arriba a la planta de depuració representa també en aquest cas tota l'aigua emprada tant en el processament dels animals com la de les instal·lacions del personal, i suposa un volum aproximat d'uns 140 m³ en una jornada normal de treball. El tractament de l'aigua residual consisteix en una primera filtració grollera en filtres de 6 mm de diàmetre de porus i un posterior tractament primari que comprèn diverses etapes de floculació, on s'afegeixen diferents floculants, com ara clorur fèrric, i de decantació. L'aigua és, finalment, filtrada

en malles de baix diàmetre de porus (<1 mm) i canalitzada cap a la planta general de tractament d'aigua de la localitat. En aquest cas, es van obtenir mostres d'aigua després del procés de filtració grollera i abans del tractament primari, anomenada aquí 'AT', i aigua ja sotmesa al procés de floculació, abans d'entrar en la planta depuradora de la localitat, anomenada aquí 'E'.

Les tres mostres d'aigua residual d'escorxador, anomenades 'Arg', 'AT' i 'E', van ser analitzades per a la presència de PrP^c adaptant el protocol de detecció aplicat per a la detecció de PrP^c en els inòculs de treball (apartat 8.10 de l'annex de Materials i Mètodes).

De la mateixa manera, es va determinar el contingut en proteïna total present en les dues mostres d'aigua residual d'escorxador no tractada ('Arg', 'AT') per adaptació del kit de detecció per àcid biquinònic (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce), tal com es descriu en l'annex de Materials i Mètodes, apartat 8.11.

3.2.1.3. Contaminació experimental i centrifugació dels efluent

Per tal de desenvolupar una metodologia fiable i sensible, es va assajar tot un seguit de condicions experimentals en mostres d'aigua residual d'escorxador no tractada, tal com s'especifica en cadascun dels successius apartats. Les mostres van ser contaminades experimentalment amb homogenat d'encèfal d'ovella infectat (HP·Sc) i homogenat sa (HN·Ove). De forma general i si no s'especifica el contrari, alíquotes de 30 ml d'aigua residual van ser contaminades amb 50 µl d'inòcul. En els casos en que es va necessitar major quantitat d'aigua dopada es van mantenir aquestes proporcions. Un cop afegit l'inòcul, la mostra es mantenia entre 20 i 30 min a RT amb certa agitació manual per tal de simular, en la mesura possible, condicions naturals abans de procedir a la manipulació.

Inicialment, les mostres contaminades experimentalment eren centrifugades per tal de concentrar els fragments de teixits introduïts en el procés de dopatge. Es van assajar diferents condicions de centrifugació, com són 4,000 xg durant 30 min, 7,000 xg durant 45 min, i ultracentrifugació a 33,500 xg durant 30 min. Els *pellets* obtinguts van

ser pesats, eluïts en 1 ml HN·Ove i homogeneïtzats en tubs de ribolyzer amb boles de ceràmica per mitjà d'un TeSeE[®] Precess (BioRad). Els SAF presents en alíquotes de 500 µl dels *pellets* homogeneïtzats i dels sobrenedants restants van ser preparats mitjançant el *Bio-Rad TeSeE-Purification Kit* (apartat 8.9 de l'annex de Materials i Mètodes) i els resultats van ser analitzats mitjançant el TeSeE[®] EIA Detection kit (apartat 8.18).

3.2.1.4. Homogeneïtzació dels *pellets* i tractament amb PK

Un cop determinades les condicions de centrifugació més òptimes es van avaluar diferents estratègies per tal d'homogeneïtzar els *pellets* resultants. Aquests *pellets* van ser pesats (0.25 g \pm 0.05, de forma general) i posteriorment homogeneïtzats amb HN·Ove segons 2 volums (p/p), 1 volum (p/p), i 2 volums (p/v).

La solució homogeneïtzada i filtrada va ser tractada d'acord al *Bio-Rad TeSeE-Purification Kit* (apartat 8.9 de l'annex de Materials i Mètodes) i analitzada per ELISA de Bio-Rad (apartat 8.18). Posteriorment, un cop optimitzada l'homogeneïtzació dels *pellets* generats per centrifugació, es va determinar la quantitat de proteïna K adequada per a la purificació de PrP^{Sc}. Així, es va utilitzar la concentració de PK recomanada en el kit (1X), així com la meitat (0,5X), el doble (2X) i el quàdruple (4X). Aquests resultats van ser també analitzats per ELISA.

3.2.1.5. Validació per a altres efluents i per a EEB

Per tal de confirmar els resultats obtinguts en la mostra 'Arg', es van contaminar dues alíquotes de les mostres 'AT' i 'E'. Les mostres van ser centrifugades (7,000 xg durant 45 min), els *pellets* homogeneïtzats en HN·Ove (20%) i diverses alíquotes processades (apartat 8.9 de l'annex de Materials i Mètodes) amb concentracions variables de PK. Quan les mostres van ser analitzades mitjançant ELISA (apartat 8.18), es van aplicar concentracions de 0,5X, 1X i 2X respecte a la concentració de PK recomanada per a aquesta tècnica en la purificació de PrP^{Sc} prèvia. De la mateixa manera, quan les mostres van ser analitzades per *western blotting* (apartat 8.19), es van

aplicar concentracions de 0,5X, 1X i 2X respecte a la concentració de PK recomanada per a aquesta tècnica en la purificació de PrP^{sc} prèvia.

Per tal de confirmar la idoneïtat de totes les condicions assajades fins al moment per a la soca EEB, es van dopar alíquotes de 50 ml de la mostra 'AT' amb 300 µl, 150 µl i 75 µl de HP·EEB i de HN·Vaca. Totes les mostres van ser tractades tal com s'ha descrit anteriorment i els *pellets* van ser homogeneïtzats en HN·Vaca (20%). Alíquotes de 500 µl van ser processades (apartat 8.9 de l'annex de Materials i Mètodes) amb la concentració de PK recomanada, i finalment analitzades tant per ELISA (apartat 8.18) com per *western blotting* (apartat 8.19).

3.2.1.6. Avaluació de la sensibilitat de la tècnica ELISA respecte el WB en efluent d'escorxador

Sis alíquotes de 25 ml d'aigua residual 'AT' van ser dopades amb 30 µl, 7.5 µl, 1.5 µl, 0.6 µl i 0.3 µl de HP·Sc, i amb 30 µl de HN·Ove. Les mostres van ser centrifugades (7,000 xg, 45 min) i els *pellets* mesurats i homogeneïtzats en 2 volums (p/v) de HN·Ove. Una rèplica de 250 µl de cada un dels dopatges va ser purificada (apartat 8.9 de l'annex de Materials i Mètodes) i analitzada per ELISA (apartat 8.18), mentre que una altra va ser purificada i analitzada per WB (apartat 8.19).

3.2.1.7. Optimització de la concentració de PK

Finalment, es va ajustar la concentració de proteïnasa K a aquella mínima suficient per a produir la degradació completa de la molècula de PrP^c i de l'extrem amino-terminal de la molècula de PrP^{sc}. Per aquest motiu, es van contaminar 30 ml d'aigua residual 'Arg' amb 100 µl de HP·Sc. La mostra va ser centrifugada (7,000 xg, 45 min), el *pellet* mesurat i posteriorment homogeneïtzat en 2 volums d'una solució de Glucosa 5% complementada amb BSA 20%, en substitució d' un homogeneïtzat no infectat al 20%. Les alíquotes obtingudes van ser analitzades (*Bio-Rad TeSeE-Purification Kit*, apartat 8.9 de l'annex de Materials i Mètodes) sota diferents concentracions de PK: 0.04 mg/ml, 0.08 mg/ml, 0.16 mg/ml, 0.2 mg/ml, i 0.4 mg/ml, i sense PK. Totes les alíquotes van ser analitzades per *western blotting* (apartat 8.19).

3.2.1.8. Quantificació de PrP^{sc}

La quantitat de PrP^{res} existent en els inòculs no titulats d'*scrapie* i d'EEB (HP·Sc i HP·EEB) va ser calibrada respecte a la que contenen els inòculs titulats de *scrapie Dawson* i d'EEB. Així es va poder establir un paral·lelisme entre els nivells de PrP^{res} en els inòculs no titulats respecte als nivells existents en els inòculs titulats. Tot i que el títol de PrP^{res} és una mesura aproximada de la infectivitat present en un inòcul, aquest paral·lelisme va permetre establir una estimació de les dosis infeccioses presents en els inòculs no titulats usats en aquest treball. Els *blots* van ser digitalitzats i la intensitat de les bandes analitzada per densitometria (*Kodak image station 2000MM*, amb el suport del *software* Kodak MI).

3.2.2. Sensibilitat del mètode de detecció

La sensibilitat del protocol definit es va determinar contaminant dues sèries de 10 alíquotes de 30 ml d'efluents crus de cadascun dels escorxadors, 'Arg' i 'AT', amb dilucions dels inòculs que no estaven titulats en termes d'infectivitat, és a dir, HP·Sc (20%) i HP·EEB (20%). Concretament, es van contaminar amb dilucions seriades 1:2 de cada inòcul des de 25 µl fins a 0.05 µl, de manera que es van afegir quantitats d'homogeneïtzat encefàlic equivalents a 5 mg (25 µl) fins a 10 µg (0.05 µl). Totes les mostres van ser processades d'acord al protocol desenvolupat i optimitzat al llarg de tots els experiments de dopatge i recuperació, fins a ser eluïdes en tampó de càrrega, 5 µl dels quals van ser finalment analitzats per *western blotting* tal com es descriu en l'apartat 8.19 de l'annex de Materials i Mètodes. Aquest protocol s'especifica a continuació:

1. Centrifugar les mostres 45 min a 7,000 xg
2. Descartar el sobrenedant i mesurar els *pellets* obtinguts (0.25 g ± 0,05)
3. Transferir els *pellets* a tubs ribolyzer que contenen boles de ceràmica i afegir 2 volums (p/v, 500 µl) d'una solució de Glucosa 5% complementada amb BSA 20%
4. Homogeneïtzar els *pellets* en un TeSeE Precess i recuperar la fase aquosa per aspiració en xeringues de diàmetre 25

5. Sobre un volum de mostra de 500 µl, afegir un volum (500 µl) de tampó desnaturalitzant (solució A, *Bio-Rad TeSeE Purification kit*) complementat amb 80 µg de proteïnasa K
6. Incubar 10 min 37°C
7. Afegir 1 volum (500 µl) de tampó de precipitació (solució B, *Bio-Rad TeSeE Purification kit*) i centrifugar 5 min a 20,000 xg
8. Descartar completament el SN i afegir 100 µl de tampó de càrrega sense agents desnaturalitzants
9. Incubar 5 min a temperatura ambient i, posteriorment, 10 min a 100°C
10. Vortexar bé i centrifugar 11 min 20,000 xg
11. Transferir el SN en tub nou i congelar a -20°C.

3.2.3. Anàlisi de mostres d'aigua d'escorxador

Una col·lecció de 17 mostres d'aigua residual de diferents escorxadors localitzats a Catalunya, recollides entre Març 2004 i Juny 2005, van ser analitzades per a la presència de PrP^{res} mitjançant la metodologia desenvolupada. Les mostres van ser obtingudes tant dels tancs generals d'homogeneïtzació com després de rebre tractaments primaris de floculació, i, en algun cas, del tanc on es realitzaven tractaments de digestió aeròbica. Totes elles van ser preses i mantingudes a 4°C fins a 48 h fins a ser aliquotades i conservades a -80°C. Nou d'aquestes mostres van ser recollides pels veterinaris del PrioCat en les 24-48 hores posteriors a la identificació d'un cas sospitós d'EET en l'escorxador, que posteriorment va ser confirmat com a cas positiu d'EEB.

Totes les mostres van ser analitzades seguint el protocol descrit en la secció anterior. No obstant, els concentrats de totes les mostres van ser dividits en 3 rèpliques. Una va ser tractada sense PK i les altres dos van ser tractades amb PK tal com s'ha descrit, si bé una d'elles havia estat prèviament dopada amb 0.2 µl de HP·Sc (20%). Totes les mostres van ser concentrades a 50 µl de TC er tal d'incrementar al màxim la sensibilitat del test. Per a les rèpliques no dopades, 25 µl van ser carregats en els gels SDS-PAGE, mentre que per a les dopades es van carregar 10 µl. Els resultats es van, doncs, analitzar per *western blotting* (apartat 8.19 de l'annex de Materials i Mètodes).

3.3. Resultats

3.3.1. Caracterització dels inòculs i dels efluent emprats

Al llarg d'aquest estudi s'han utilitzat dos soques de prions, una causant d'EEB i l'altra d'*scrapie*, amb els quals s'han contaminat experimentalment les diferents mostres d'aigua d'escorxador i s'han valorat les recuperacions obtingudes després de cada procés experimental. Per raons de bioseguretat, moltes de les proves es van realitzar preferentment amb l'agent *scrapie* i van ser validades posteriorment amb l'agent EEB. Es va caracteritzar, doncs, de forma acurada l'homogenat d'encèfal provinent d'una ovella sana, HN·Ove, i en l'homogenat encefàlic, concretament de la regió del òbex, provinent d'un animal afectat per l'agent *scrapie*, HP·Sc.

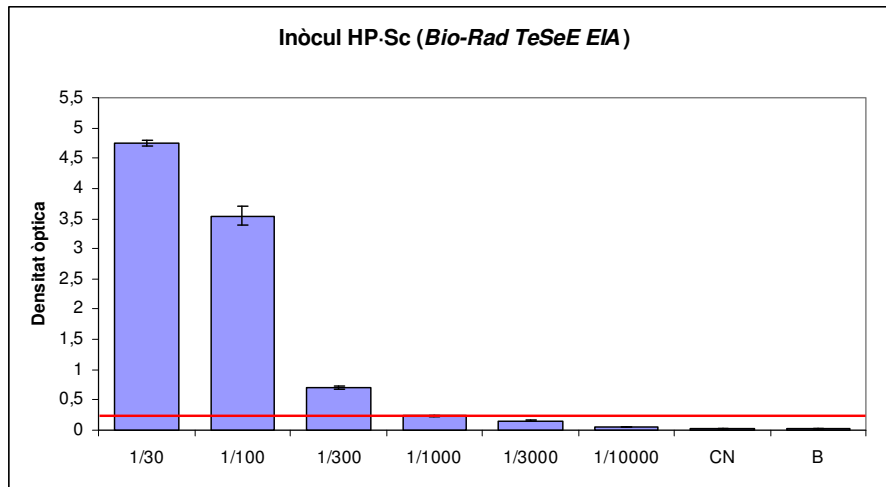


Fig. 3.2. Valors de densitat òptica obtinguts amb el *Bio-Rad TeSeE-Sheep/Goat EIA Detection kit* per a una sèrie de dilucions de l'inòcul (20%) infectat per *scrapie* purificades segons el *Bio-Rad TeSeE-Purification Kit*. Els valors superiors a la mitja dels valors dels controls negatius (0.03095) + 0.210 (0.24095) es consideren positius (línia roja). Els valors CN corresponen al mateix homogenat d'encèfal d'ovella no infectat, mentre que el valor B es considera com el soroll de fons de la tècnica.

En l'inòcul afectat per *scrapie*, es va determinar la concentració relativa de PrP^{Sc} per ELISA establint un banc de dilucions en HN·Ove. En la figura 3.2 es mostren els valors representatius d'una detecció positiva de PrP^{Sc} mitjançant el *Bio-Rad TeSeE-Sheep/Goat EIA Detection kit*. En aquest cas i d'acord amb aquesta tècnica, l'inòcul fou positiu fins a la dilució 1/1000. La dilució 1/3000 mostra un valor remarcablement

superior als valors dels controls negatius i podria ser considerada una mostra sospitosa en cas d'un estudi de camp.

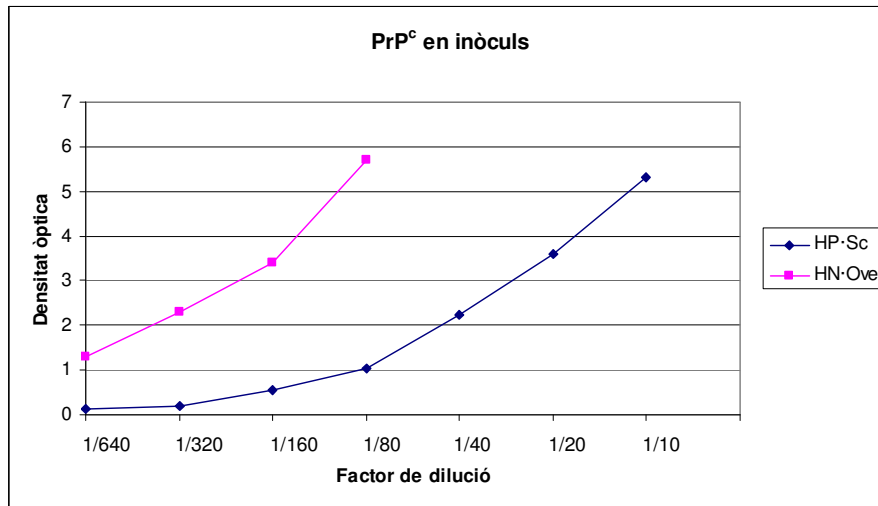


Fig. 3.3. Determinació del contingut en PrP^c en l'inòcul infectat per *scrapie* (HP·Sc) i l'inòcul no infectat (HN·Ove). Diferents diluïons de cada inòcul van ser analitzades mitjançant el *Bio-Rad TeSeE EIA Detection kit*.

Els continguts relatius de PrP^c en cadascun dels homogenats utilitzats van ser analitzats per comprovar que la concentració en l'inòcul positiu es mantingués inferior a la de l'inòcul negatiu, evitant així la detecció de falsos positius. Aquesta dada és important, ja que la fiabilitat de les dades obtingudes en un test ELISA sobre una mostra positiva depèn directament dels valors obtinguts per a una mostra negativa de mateixa concentració processada en la mateixa manipulació. Un conjunt de valors poden ser considerats fiables tan sols quan la detecció de PrP és negativa en els controls negatius, sempre i quan la concentració de PrP^c en aquests sigui superior a la de la mostra positiva. De ser a la inversa, restes de PrP^c no digerida per la PK en la mostra positiva falsejarien els resultats, essent els valors dels controls negatius correctes. La figura 3.3 mostra clarament com els nivells de PrP^c en l'inòcul HP·Sc són inferiors als del HN·Ove.

Els continguts relatius de PrP^c també van ser avaluats en les mostres d'aigua residual d'escorxador. La presència de PrP^c havia ja estat detectada en algunes mostres probablement provinent de la sang i d'altres líquids biològics dels animals sacrificats (S. Simon, comunicació personal) i concorda amb l'expressió constitutiva d'aquesta

proteïna en mamífers. No obstant, cap de les mostres utilitzades per al desenvolupament de la metodologia va mostrar-ne uns nivells significatius.

La concentració de proteïna total va ser considerada en les aigües d'escorxador, ja que podia afectar a l'eficiència del tractament amb proteïnasa K (Taula 3.1). En els tests comercials de purificació de SAF, el tractament amb proteïnasa K és proporcional a la concentració de proteïna total, és a dir a la concentració de les mostres biològiques a testar (20%). Mitjançant el *BCA Protein Assay Kit*, el contingut en proteïna de les mostres es va mesurar en la fracció sobrenedant i en la fracció *pellet*, obtingudes ambdues per centrifugació a velocitat de 7,000 xg que havia estat prèviament determinada com la òptima (veure secció següent). La mitja dels valors corregits segons cada dilució indicava una concentració de proteïna de 1.6233 i 1.8023 mg/ml en el sobrenedant, i de 11.6019 i 10.08 mg/ml en el *pellet* de la mostra Arg i AT, respectivament.

	Arg (mg/ml)		AT (mg/ml)	
	SN	Pellet	SN	Pellet
1/2	0,7215	4,4815	0,7711	4,1348
1/4	0,3652	2,5928	0,3884	2,2608
1/8	0,1985	1,3714	0,2110	1,2266
1/16	0,1094	0,7404	0,1129	0,6419
1/32	0,0518	0,4028	0,0617	0,3364
1/64	0,0287	0,2277	0,0352	0,1924

Taula 3.1. Concentració de proteïna total en la fracció SN i la fracció pellet de dues aigües residuals d'escorxador centrifugades a 7,000 xg durant 45 min.

3.3.2. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en efluent d'escorxador

Els efluent d'escorxador constitueixen un medi altament heterogeni. La seva composició varia enormement des del moment en que diferents tipus de teixits, incloent sang, són abocats en diferents quantitats en la xarxa d'aigua residual al llarg de les successives jornades de treball. El desenvolupament d'un mètode de detecció de PrP^{sc} en un medi com aquest s'enfronta a aquesta enorme heterogeneïtat. En aquest treball, hem considerat que la via quantitativament més important de contaminació dels efluent amb prions prové de la presència de petits fragments de teixit nerviós del SNC,

principalment medul·la espinal, i hem descartat l'aportació d'altres tipus de teixits animals. A més, aquests teixits són els que contenen majors nivells d'infectivitat en totes les EETs. No obstant, no es disposen de dades sobre l'excreció de prions en la femta d'individus portadors asimptomàtics, que, si bé és clarament inferior a jutjar per les dades disponibles sobre orina, pot constituir una segona via de contaminació dels efluent.

El primer pas de la nostra metodologia consisteix en una centrifugació que permet recol·lectar tots aquests hipotètics teixits del SNC i descartar la presència d'infectivitat en els sobrenedants (SN). A partir d'aquest *pellet* groller s'han determinat les condicions òptimes per a la seva homogeneïtzació, l'extracció de la PrP^{Sc} i la digestió mitjançant proteases de la PrP^C, així com la tècnica de detecció molecular més sensible i fiable. Totes aquestes condicions han estat desenvolupades per raons òbvies en mostres contaminades experimentalment, al llarg d'un seguit d'experiments de dopatge i recuperació duts a terme amb dues soques de prions –EEB i *scrapie*- en aigües residuals de dos escorxadors diferents.

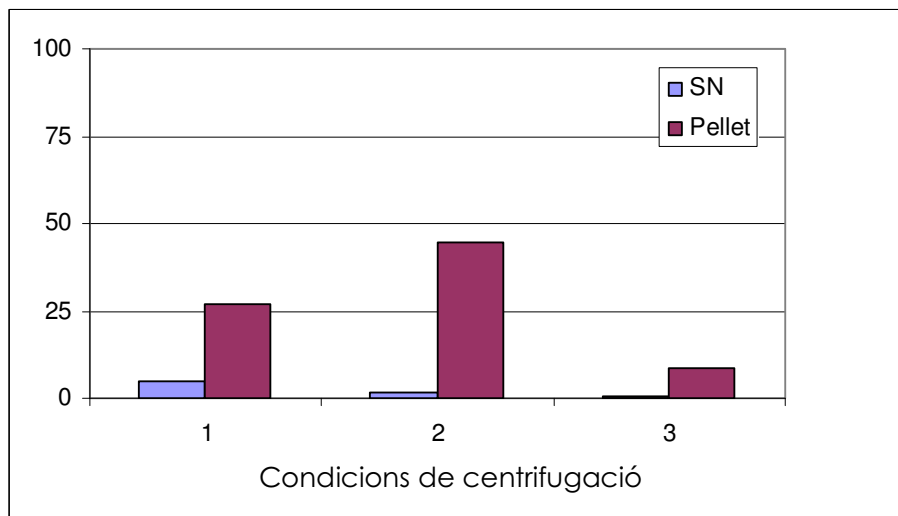


Fig 3.4. Percentatge de recuperació de PrP^{Sc} amb diferents forces de centrifugació mesurat amb el test ELISA de Bio-Rad. Les mostres d'aigua contaminades amb *scrapie* es va concentrar a (1) 4,000 xg durant 30 min, (2) 7,000 xg durant 45 min, i (3) 33,500 xg durant 30 min, i els sobrenedants i els *pellets* obtinguts van ser valorats amb el *Bio-Rad TeSeE sheep/goat EIA Detection kit*. Els resultats estan expressats en percentatge respecte al senyal obtingut amb la mateixa quantitat d'homogenat infectat amb *scrapie* directament processat sense ser sotmès als passos de dopatge i posterior centrifugació. Les columnes blaves representen els SNs i les morades representen els *pellets*.

Inicialment, les mostres contaminades experimentalment van ser centrifugades per tal de concentrar el material en suspensió. Diverses velocitats i temps de centrifugació van ser avaluats, produint millors resultats la centrifugació a 7,000 xg durant 45 min (Fig. 3.4). Tot i que se suposava que la ultracentrifugació havia de donar els millors resultats, va ser descartada degut a problemes metodològics, bàsicament la dificultat observada en la recuperació de PrP^{Sc} a partir de *pellets* generats a velocitats de centrifugació tan elevades. Val a dir que les dades mostrades en la figura 3.4 no reflexen el rendiment del procés, doncs van ser obtingudes mitjançant el test ELISA de Bio-Rad i aquest presentava un problema de sensibilitat (veure més endavant).

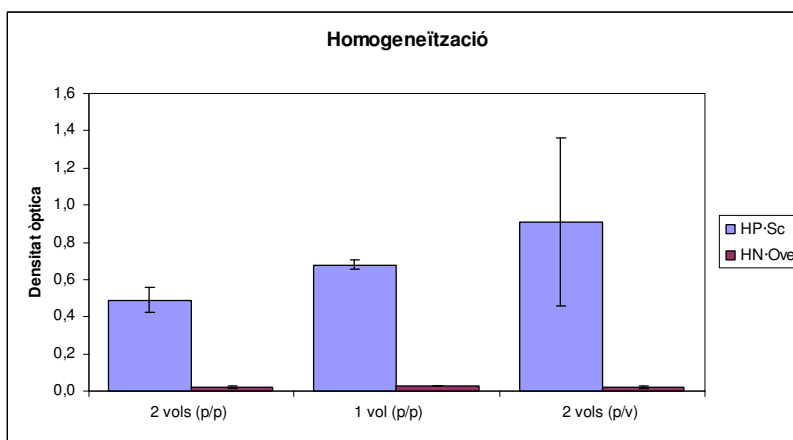


Fig 3.5. Variació en la recuperació de PrP^{Sc} en els *pellets* d'aigua residual d'escorxador homogeneïtzats segons diferents estratègies. Un cop les mostres van ser contaminades amb HP-Sc i HN-Ove, aquestes van ser centrifugades i els *pellets* homogeneïtzats i analitzats segons el test ELISA (Bio-Rad).

El volum de tampó adequat per a la correcta homogeneïtzació dels *pellets* va ser també considerat (Fig. 3.5). Degut a l'heterogeneïtat observada entre les mostres, va ser impossible referenciar aquest volum al volum inicial d'aigua manipulada; es va optar per referir-lo al pes del *pellet*. Els *pellets* provinents de la centrifugació a 7,000 xg van ser pesats (0.25 g \pm 0.05, aproximadament) i es van homogeneïtzar amb 2 volums (p/v, 500 μ l) d'homogeneïtzat no afectat d'ovella al 20%, ja que aquest volum va generar la millor recuperació i volums inferiors no permetien la correcta solubilització del *pellet*. Remarcablement, el tractament amb 1 volum (p/p, 1.25 ml) va mostrar sovint valors

absoluts semblants, tot i suposar la dilució del material en un volum més de 2 cops superior.

En mostres biològiques, com ara encèfal, els *pellets* obtinguts després d'aplicar la purificació Bio-Rad corresponen, en gran part, a proteïnes residuals que han resistit el tractament PK. Tenint en compte això, vam mirar de reduir la mida dels *pellets* a tractar induint una major degradació de proteïnes en incrementar la concentració de PK, doncs una variació entre 0.5X i 2X en la concentració final no suposa una variació considerable de la lectura EIA posterior. Sorprenentment, els resultats obtinguts van mostrar una correlació inversament proporcional entre les lectures de densitat òptica de les mostres dopades i les concentracions de PK utilitzades (Fig. 3.6).

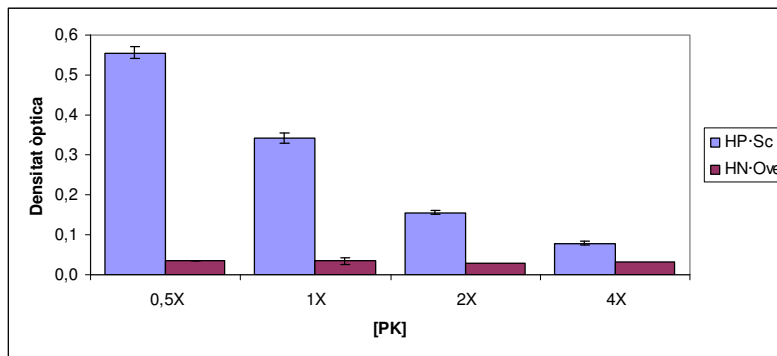


Fig. 3.6. Recuperació de PrP^{Sc} segons la variació de la concentració de PK. Efluent contaminat amb HP-Sc i HN-Ove van ser centrifugats i els *pellets* obtinguts processats mitjançant el *Bio-Rad TeSeE Purification kit* afegint la meitat (0.5X), el doble (2X) i el quàdruple (4X) de PK respecte a la recomanada (1X) en el kit per a un posterior anàlisi amb el *Bio-Rad TeSeE Detection kit*.

Aquests resultats van ser confirmats analitzant dos tipus de mostres d'aigua d'escorxador diferents (mostres 'AT' i 'E') una de les quals havia estat sotmesa a un tractament primari. Ambdues mostres van presentar una variació en les lectures de densitat òptica proporcional a la quantitat de PK assajada, si bé en la mostra 'E' la sensibilitat del test va ser força més baixa. No obstant, aquestes variacions en la recuperació de PrP^{Sc} no van poder ser corroborades segons l'anàlisi per *western blotting*. Tal com es mostra en la figura 3.6, la digestió de la proteïna priònica cel·lular va ser completa tant en les mostres contaminades amb HN-Ove com en les contaminades amb

HP·Sc, incloent-hi el tractament amb la meitat de la concentració de PK recomanada per a un protocol de WB. De la mateixa manera, en la detecció de PrP^{Sc}, aquesta es va mostrar perfectament digerida i el seu patró de migració va ser consistent en totes les concentracions de PK analitzades. A més, la diferència de sensibilitat observada entre les dues mostres segons l'anàlisi per ELISA no va semblava estar en consonància amb les intensitats observades en els films de WB.

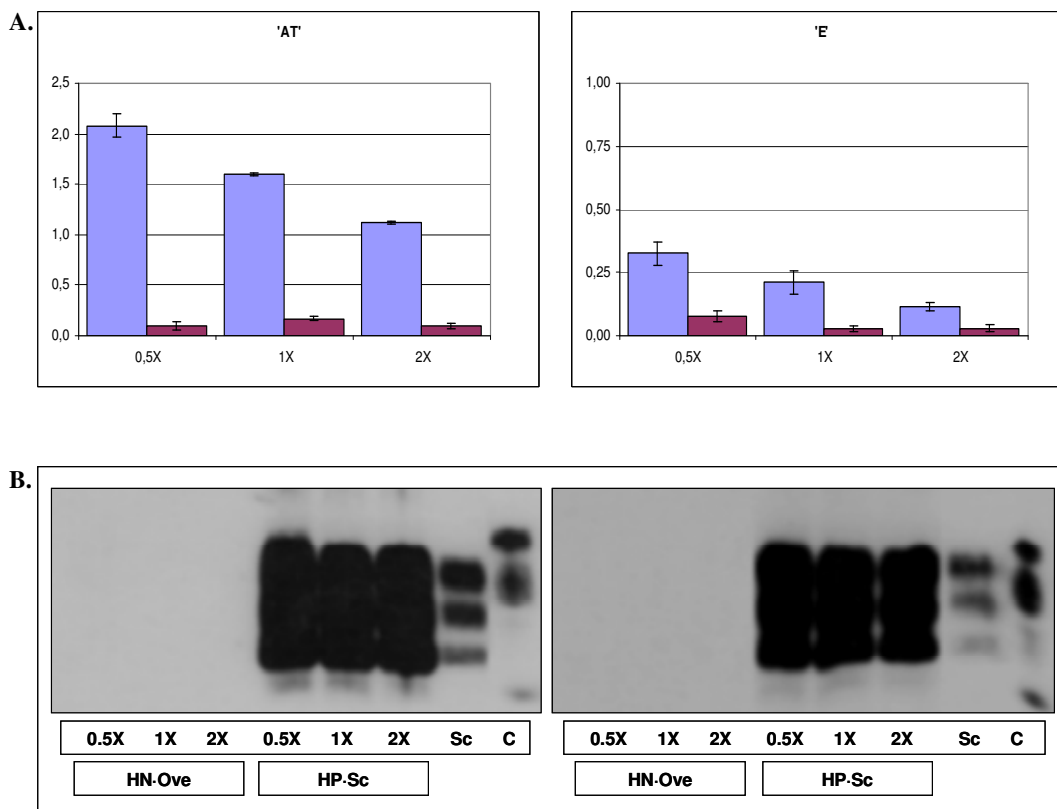


Fig. 3.7. Anàlisi de la variació en la recuperació de PrP^{Sc} en els *pellets* de dues mostres d'aigua d'escorxador, AT i E, en funció de la concentració de proteïnasa K. Efluent prèviament contaminat amb HP·Sc o HN·Ove van ser centrifugats i processats d'acord amb el *Bio-Rad TeSeE Purification kit* modificant les concentracions de PK respecte a la recomanada (1X) en funció de la tècnica de detecció molecular emprada: *Bio-Rad TeSeE EIA* (A), o *western blotting* (B). Sc correspon a homogeneïtzat infectat tractat amb PK, mentre C correspon a homogeneïtzat sa no tractat.

Tot i que el *western blot* no és una tècnica quantitativa, l'anàlisi mitjançant WB no va semblar estar influenciat per la variació en la concentració de PK durant el processament de les mostres tal com era observable usant la tècnica ELISA. Aquesta diferència aparent de sensibilitat del test immunoenzimàtic respecte al *western blot* es

va fer encara més evident alhora de treballar amb aigües dopades amb EEB. Contaminant experimentalment la mostra 'AT' amb quantitats d'inòculs superiors a la proporció habitual, la recuperació de PrP^{EEB}, purificada a la concentració de PK recomanada, a jutjar pels valors del test ELISA, semblava ser molt més baixa. Això podia ser degut a un títol de PrP^{EEB} molt més baix en l'inòcul HP-EEB; en canvi, però, les intensitats dels films de WB mostraven una recuperació alta i consistent (Fig. 3.8) semblant a l'obtinguda amb l'inòcul *scrapie*.

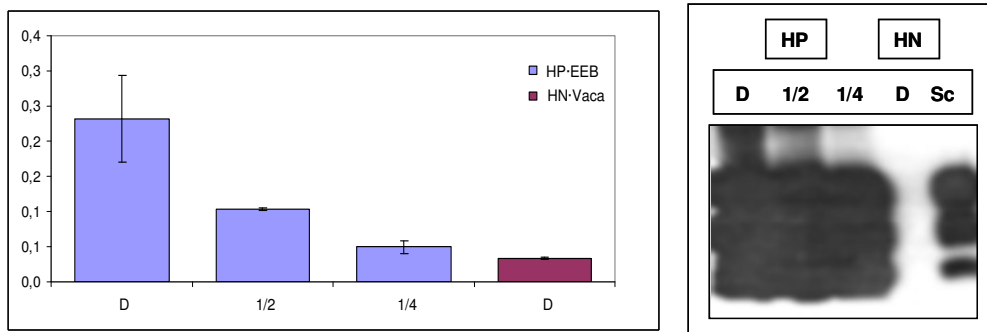


Fig. 3.8. Recuperació de PrP^{EEB} a partir d'efluents contaminats experimentalment segons els valors obtinguts per ELISA o les intensitats observades per *western blotting*. Aigües residuals dopades amb l'inòcul HP-EEB a raó de 300 µl (D), 150 µl (1/2) i 75 µl (1/4), així com 300 µl (D) de l'inòcul HN-Vaca, van ser centrifugades i processades amb la concentració de PK recomanada per a l'anàlisi posterior mitjançant el *Bio-Rad TeSeE Detection kit* o mitjançant *western blotting*.

La baixa recuperació d'EEB respecte a *scrapie* en mostres contaminades amb quantitats semblant d'ambdós inòculs, que presentaven a més nivells similars de PrP^{sc}, podia estar causada per la pròpia natura de l'agent EEB. Se sap que l'EEB mostra una menor resistència als processos proteolítics -com ara el tractament amb PK inclòs en el procés de purificació- i podria ser més susceptible a l'acció proteolítica present en l'aigua residual. Per tal de discernir això, es va comparar per *western blotting* la degradació soferta per la PrP^{EEB} incubada en efluent d'escorxador en relació a la no incubada, representada en aquest cas per dilució de l'inòcul HP-EEB en aigua residual i en homogenat de cervell sa, respectivament. Rèpliques d'ambdós casos experimentals van ser sotmeses a un procés de purificació amb la concentració de PK usada en la detecció per ELISA (4 µl/ml tampó A) i amb la usada en la detecció per WB (20 µl/ml tampó A). Tal com es mostra en la figura 3.9, tant en presència com en absència d'una incubació en aigua residual, en aplicar la concentració de PK recomanada en un

protocol de WB tan sols s'observa el nucli de PrP resistent a PK, de migració electroforètica més baixa degut a la digestió del fragment aminoterminal. Per contra, quan l'inòcul es troba en homogenat sa, la concentració de PK usada en la purificació per a ELISA no és suficient per a mostrar únicament el nucli de 27-30 kDa i el patró electroforètic observat és similar inclús al dels controls sans no tractats amb PK. En canvi, quan es troba en l'aigua residual, la purificació amb la mateixa concentració de PK mostra un patró de migració força similar a l'obtingut amb concentracions altes de PK, en el que la regió n-terminal de la PrP^{sc} està gairebé digerida. La diferència observada en el patró de migració observat en presència o absència d'efluent indica l'existència d'una activitat proteolítica pròpia de l'aigua residual d'escorxador que afecta els extrems amino-terminals de la proteïna.

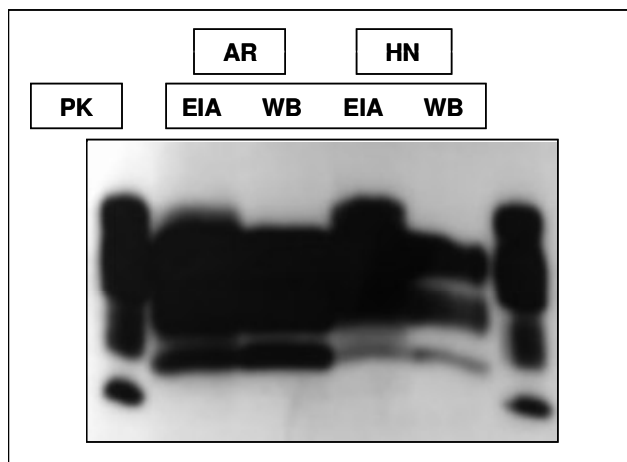


Fig. 3.9. Degradació de la PrP^{sc} en presència o absència d'aigua residual d'escorxador. L'inòcul HP·Sc va ser incubat en presència d'aigua residual (AR) i en homogenat d'encèfal no infectat (HN), i rèpliques de cada condició van ser processades amb la concentració de PK recomanada tant per a l'anàlisi per ELISA (4 µl/ml) com per WB (20 µl/ml). En els extrems del film es mostra homogeneïtzat sa no tractat amb PK.

Es va, aleshores, contaminar experimentalment aigua residual d'escorxador amb diverses dilucions d'HP·Sc (20%) i rèpliques de cada dilució van ser analitzades comparativament mitjançant ELISA i WB, per tal de determinar les sensibilitats d'ambdues tècniques en aquesta matriu. En la figura 3.10 es mostra com, mitjançant el *Bio-Rad TeSeE EIA Detection kit*, la mostra contenint l'equivalent a 1.2 mg de teixit afectat va ser l'única clarament positiva, tot i que la que contenia 0.3 mg es podria considerar en el llindar. Les dilucions inferiors representen resultats negatius segons

l'ELISA que, en canvi, mostraven de forma inequívoca PrP^{res} en els films de *western blot*. Aquesta tècnica va arribar, en aquest experiment, a detectar fins a l'equivalent a 12 µg de teixit. Considerant el límit de detecció per ELISA en aquesta mostra com a 300 µg, el WB mostrà una sensibilitat 25 cops superior. D'altra banda, mentre en la mostra dopada amb homogenat negatiu no infectat no es van detectar restes de PrP per WB, la lectura ELISA va mostrar un valor significativament alt, indicatiu del soroll de fons causat pels efluent. Aquest fenomen es deu segurament al propi format sàndwich del test Bio-Rad en el que la deposició de la mostra sobre els pous de la placa pot induir l'aparició de reaccions inespecífiques entre l'anticòs de captura i alguna substància present en la mateixa mostra.

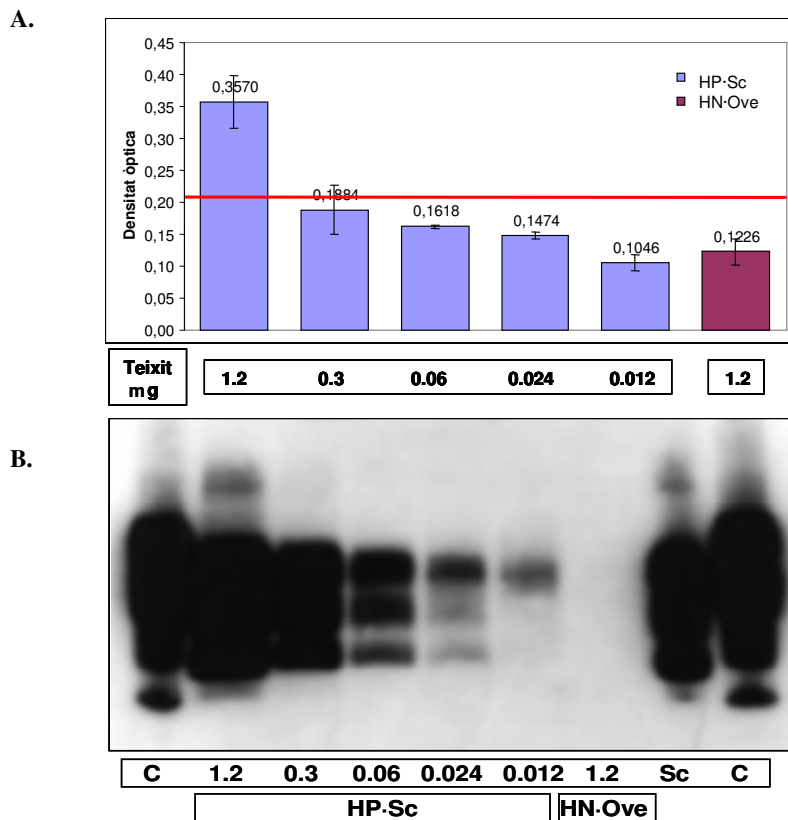


Fig. 3.10. Sensibilitat en la detecció de PrP^{sc} mitjançant el *Bio-Rad TeSeE EIA Detection kit* respecte al *western blotting* en efluent d'escorxadador. **A.** els valors d'ELISA corresponents a dilucions dopades amb quantitats inferiors a 300 µg de teixit encefàlic infectat es troben per sota el llindar (línia roja) de detecció positiva. **B.** les mateixes rèpliques analitzades per WB mostren presència de PrP^{res}. Sc correspon a homogeneïtzat infectat tractat amb PK, mentre C correspon a homogeneïtzat sa no tractat.

La detecció de PrP^{sc} en mostres biològiques, com ara teixits encefàlics, teixits limfoides (melsa, amígdals, nòduls limfàtics) o en teixit muscular, es realitza normalment mitjançant un procés de purificació que inclou un tractament amb proteases (usualment, proteïnasa K) en condicions optimitzades que permetin una proteòlisi completa de la PrP^c i de part de la molècula de PrP^{sc}. Els nivells de PK s'ajusten, doncs, segons la quantitat de teixit a analitzar, ja que en les mostres biològiques la concentració de proteïna total es manté relativament constant. Per contra, els efluent d'escorxador són un medi altament heterogeni degut a la constant aportació de teixits i residus animals. La quantitat de proteïna total present és, per tant, considerablement variable i dificulta el disseny d'un mètode estandarditzat, sobretot en el tractament en proteases, que permeti un anàlisi fiable d'un conjunt de mostres de camp.

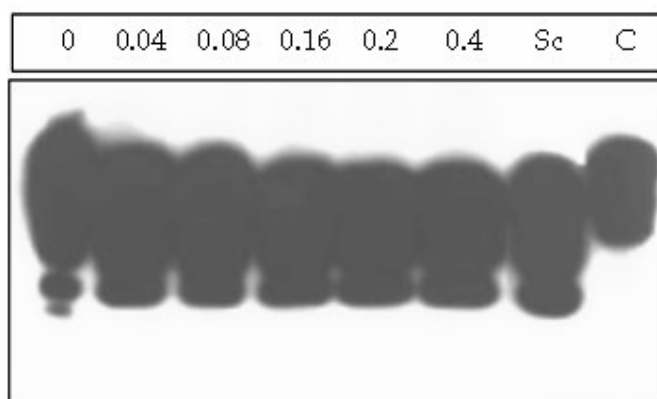


Fig. 3.11. Ajustament de la concentració de proteïnasa K en mostres d'efluent d'escorxador contaminades amb *scrapie*. El *pellet* obtingut de la centrifugació d'una aigua residual va ser homogeneïtzat en glucosa 5% complementada amb BSA 20% i diferents rèpliques van ser tractades amb PK a concentracions de 40, 80, 160, 200 i 400 µg/ml, i sense PK. L'homogeneïtzat infectat amb *scrapie* tractat amb PK (carril Sc) i homogeneïtzat sa no tractat amb PK (carril C) també es mostren.

En aquest estudi, es va determinar el contingut en proteïna total de les dues aigües d'escorxador no tractada que disposàvem i es va establir en 10 mg/ml aproximadament (Taula 3.1). La concentració de proteïnasa K va lligada al contingut proteic present en una solució. Degut a la impossibilitat de determinar sistemàticament el contingut en proteïna total de mostres ambientals, es va optar per afegir una quantitat elevada i constant de proteïna sobre la que ajustar la concentració de PK. Inicialment, això es va aconseguir mitjançant l'ús d'homogenat d'encèfal no afectat (HN) al 20%, de

manera que per a la detecció específica de PrP^{sc} s'afegien els nivells de proteïnasa K recomanats per a cada tipus de detecció molecular (ELISA o WB). Però, posteriorment, l'homogeneïtzació del material centrifugat va ser substituïda per una solució de glucosa (5%) complementada amb BSA (20%), per tal d'ajustar la concentració de PK a la mínima necessària per a mostrar la PrP^{res}. Això suposa un contingut en proteïna de 20 mg/ml, és a dir, el doble que el detectat originàriament en les aigües. Es van testar, doncs, diferents nivells de PK i es va determinar una concentració de 0.16 mg/ml com a la mínima necessària per a hidrolitzar completament la PrP^c i mostrar específicament el nucli de 27-30 kDa de la PrP^{sc} (Fig. 3.11). Remarcablement, la rèplica tractada sense PK ja va mostrar un patró de migració semblant a les rèpliques tractades amb proteïnasa K, a jutjar sobretot pel pes molecular de la banda no glicosilada que es troba en una alçada similar a la banda no glicosilada de les mostres tractades amb presència de PK. Això indicava la presència d'una activitat proteolítica pròpia en els efluent d'escorxador.

3.3.3. Sensibilitat del mètode de detecció

A la fi de tots els experiments descrits, es va establir un protocol de manipulació reproducible basat en la centrifugació de les mostres, l'homogeneïtzació i el tractament amb proteïnasa K dels respectius *pellets*, la precipitació de les proteïnes residuals i la posterior desnaturalització per a l'anàlisi mitjançant *western blotting*. La sensibilitat d'aquest protocol es va assajar tant per a *scrapie* com per a EEB en les dues mostres d'aigua residual crua, no tractada, que havien estat recol·lectades, anomenades 'Arg' i 'AT', procedents de l'escorxador A i de l'escorxador B, respectivament. Tal com s'observa en la figura 3.12, la metodologia aplicada va recuperar l'equivalent a 2 µg de teixit infectat per EEB en les mostres analitzades de tots dos escorxadors model. Pel que fa a *scrapie*, el test va detectar l'equivalent a 3.9 µg de teixit infectat en la mostra 'Arg' i fins a 2 µg en la mostra 'AT', respectivament. Les diferències en l'eficiència de recuperació observades entre cada dilució, sobretot en la mostra de l'escorxador A, van ser causades per la variabilitat pròpia dels efluent d'escorxadors, sobretot en la presència d'una major proporció de matèria sòlida en el *pellet* de cadascuna de les alíquotes analitzades.

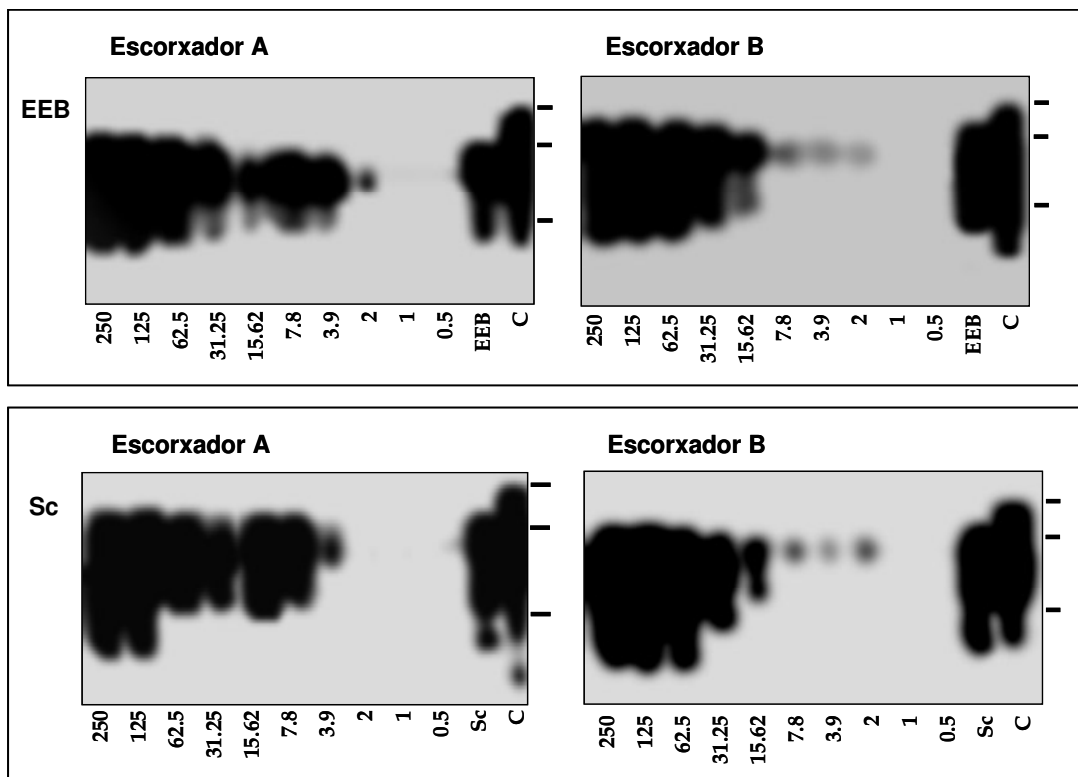


Fig. 3.12. Avaluació de la sensibilitat del mètode per a *scrapie* i EEB en efluent d'escorxador. Rèpliques de cada mostra van ser dopades amb dilucions seriades 1:2 d'HP-Sc i d'HP-EEB, i processades fins a 100 µl de TC, 5µl dels quals van ser carregats en els gels de WB. Així, es mostren quantitats de proteïna equivalents a les contingudes en 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8, 3.9, 2, 1, i 0.5 µg d'inòcul. Es mostra també l'inòcul de PrP^{Sc} tractat amb PK (carrils EEB o Sc) i homogeneïtzat sa no tractat (carril C).

Aquests valors van ser obtinguts a partir de 0.0125 g de material sedimentat en la centrifugació de les mostres, tal i com es dedueix dels volums utilitzats per a la determinació de la sensibilitat de la tècnica (veure Materials i mètodes). No obstant, aquest valor hagués pogut ser incrementat eluint els *pellets* finals en 50 µl de TC i carregant 25 µl en els gels de *western blot*, tal com es va fer per a les mostres de camp, la qual cosa hagués correspost a 0.125 g de material o, de forma equivalent, a 15 ml d'aigua residual. Aquests límits de detecció suposen un *ratio* mg de teixit afectat / mg de matèria present en aigua d'escorxador equivalent a una dilució 1:62,500.

Els continguts en PrP^{res} presents en els homogenats encefàlics usats en els experiments de dopatge i recuperació havien estat prèviament calibrats respecte als continguts presents en els inòculs titulats en termes d'infectivitat en una sèrie d'experiments de dilució límit analitzats per *western blotting* i quantificats per

densitometria (veure Materials i mètodes). Així, es va fer una estimació dels límits de detecció del mètode en termes de dosis infeccioses. Tot i que el títol de PrP^{res} no és sempre correlatiu a la infectivitat continguda en un inòcul, la utilització de dosis infeccioses com a unitats és més representatiu i estandarditzable que tractar de pes (mg) de teixit. D'acord amb això, el límit de detecció de la tècnica per a l'agent EEB va ser equivalent a $6 \cdot 10^{-3}$ dosis letals 50 i.c. en ratolí, i el límit de detecció per a l'agent *scrapie*, a $10^{1.5}$ to $10^{1.8}$ DL₅₀ i.c. en ratolí.

3.3.4. Anàlisi de mostres d'efluents d'escorxador

Un total de 17 mostres d'aigua residual d'escorxador van ser analitzades per a la presència de PrP^{sc} (Taula 3.2). Procedien de diferents escorxadors on es sacrificaven caps de bestiar boví, a més d'altres tipus d'animals, i on les aigües residuals generades durant el processament d'aquests animals eren sotmeses a tractaments primaris i/o secundaris. Nou d'aquestes mostres van ser recollides el mateix dia o el dia posterior a la identificació d'un putatiu cas d'EET, que van ser posteriorment confirmats com a casos d'EEB.

Mostra	Presa de mostra	Escorxador	Bestiar sacrificat	Cas d'EET	Tractament
A040506R	06/05/2004	Argentona	Boví, oví, cabrum, equí	no	no
A040506F	06/05/2004	Argentona	Boví, oví, cabrum, equí	no	floculació
A040525	25/05/2004	Argentona	Boví, oví, cabrum, equí	no	no
A040525F	25/05/2004	Argentona	Boví, oví, cabrum, equí	no	floculació
A040629	29/06/2004	Argentona	Boví, oví, cabrum, equí	no	no
A040629F	29/06/2004	Argentona	Boví, oví, cabrum, equí	no	floculació
B040506R	06/05/2004	Fricorsa	Porcí, boví	no	floculació
B040519R	19/05/2004	Fricorsa	Porcí, boví	no	floculació
B040616R	16/06/2004	Fricorsa	Porcí, boví	no	floculació
AB040818	18/08/2004	Carnissers d'Osona	Porcí, boví	EEB	no
D040818	18/08/2004	Carnissers d'Osona	Porcí, boví	EEB	floculació
835/04.1	21/09/2004	Fricorsa	Porcí, boví	EEB	no
835/04.2	21/09/2004	Fricorsa	Porcí, boví	EEB	biològic
AB323/05	17/03/2005	Fricorsa	Porcí, boví	EEB	no
D323/05	17/03/2005	Fricorsa	Porcí, boví	EEB	biològic
A1141/03	14/07/2005	Fricorsa	Porcí, boví	EEB	no
D1141/03	14/07/2005	Fricorsa	Porcí, boví	EEB	biològic

Taula 3.2. Llistat de les mostres d'aigua d'escorxador analitzades i les seves principals característiques.

Cap de les mostres testades va mostrar presència de PrP resistents a PK (veure Fig. 3.13, per a 3 mostres representatives), tot i que algunes d'elles havien estat preses 24 hores després de la identificació d'un cas confirmat d'EEB. Com era d'esperar, les

rèpliques no tractades amb PK van mostrar més soroll de fons, en alguns casos degut a la presència de PrP^c o de fragments digerits de PrP^c. Les rèpliques que havien estat prèviament dopades amb petites quantitats d'*scrapie* van ser analitzades per comprovar que la hipotètica detecció de prions no hagués estat emmascarada per qualsevol factor o reacció pròpia de l'heterogeneïtat existent entre mostres analitzades. En tots els casos, es van observar les bandes de PrP^{res} corresponents a 8 µg de teixit infectat.

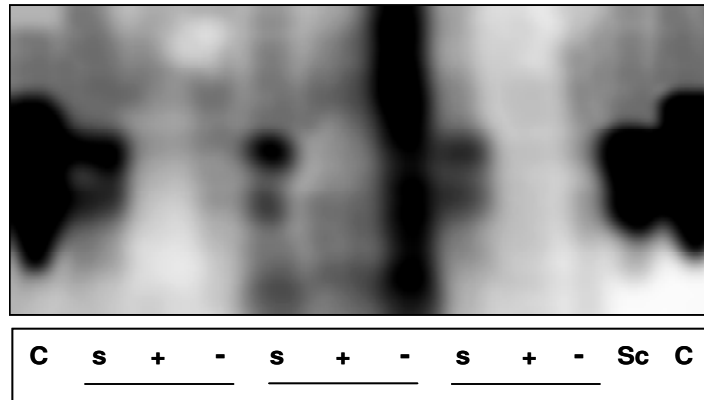


Fig. 3.13. Anàlisi de la presència de PrP^{res} en 3 mostres d'efluents d'escorxador. Tres rèpliques de cada mostra van ser processades: una en absència de PK (-), en presència de PK (+) i en presència de PK després d'afegir-hi 0.2 µl d'homogenat afectat d'*scrapie* 20% (s). Sc correspon a homogeneïtzat infectat tractat amb PK, mentre C correspon a homogeneïtzat sa no tractat.

Cal destacar que totes les mostres d'efluents analitzades per a la presència de prions van ser analitzades per a la presència de contaminació fecal d'origen boví mitjançant els marcadors de contaminació desenvolupats i descrits en el capítol anterior. Totes elles van mostrar presència de poliomavirus bovins (BPyV), un traçador que ha demostrat tenir una elevada prevalença en aigües residuals d'escorxador (Hundesca *et al.*, 2006). Així, doncs, tot i contenir contaminació d'origen boví, cap de les mostres testades va mostrar nivells detectables de prions.

3.4. Discussió

En aquest estudi, s'ha desenvolupat una metodologia per a la detecció de prions en efluent d'escorxador. Degut al successiu sacrifici de caps de bestiar a processar, aquest efluent contenen una quantitat variable de residus i teixits animals, la proporció relativa dels quals és impossible de conèixer. Des del punt de vista de la hipotètica

contaminació de les aigües residuals amb prions procedents d'aquest processament continu, diferents òrgans i teixits de MER poden ser considerats com a potencials fonts de contaminació. Així mateix, cal destacar la possibilitat d'una contaminació a causa de l'excreció en animals infectats. No obstant, a causa del tipus de manipulació a que estan subjectes, hem considerat quantitativament més destacable la pèrdua de fragments de medul·la espinal i, en segon terme, de teixits encefàlics al llarg del processament dels caps de bestiar. Prenent com a base aquesta hipòtesi de treball, s'ha desenvolupat una sèrie d'experiments en mostres contaminades experimentalment per establir un test de detecció fiable que permetés la valoració de la presència i la persistència dels prions en aquest tipus de medi.

Originàriament, es va partir dels protocols de purificació de PrP^{Sc} comercialitzats per Bio-Rad (*TeSeE & TeSeE Sheep/Goat Purification Kit*), ja que permeten una detecció sensible mitjançant tests immunoenzimàtics (*Bio-Rad TeSeE[®] EIA Detection kit*). El principi del kit de purificació es basa en l'homogeneïtzació d'una quantitat determinada (mg) d'una mostra biològica, típicament encèfal, a partir de la qual s'efectua la purificació de PrP^{Sc} en forma de SAF per elució en detergents i tractament amb PK, sota condicions perfectament calibrades i estandarditzades. Per tal d'aplicar aquest principi de forma anàloga, les mostres contaminades es van sotmetre a centrifugació -es va descartar, així, la presència de PrP^{Sc} detectable en la fracció del sobrenedant- i el *pellet* resultant va ser mesurat i homogeneïtzat en una solució d'homogeneïtzat encefàlic no infectat. D'aquesta manera, s'establien les condicions que permeten realitzar la detecció molecular mitjançant els tests immunomètrics. Degut a la reproductibilitat, sensibilitat i rapidesa de la tècnica, totes les proves inicials van ser avaluades per EIA. Aquesta tècnica, en el format comercialitzat per Bio-Rad, presenta una sensibilitat similar a la dels bioassajos en models murins (Grassi *et al.*, 2001), és capaç d'avançar la detecció de la malaltia varis mesos abans de l'aparició de símptomes clínics (Grassi *et al.*, 2001) i la seva aparició al mercat ha permès la identificació sistemàtica de noves soques de prions com els casos d'*scrapie* atípic.

Tot i que el test d'ELISA presenta una sensibilitat major que la d'altres tècniques emprades en la detecció de PrP^{Sc}, en els nostres experiments amb efluent d'escorxador es va observar un fort descens en les lectures de DO obtingudes arrel de modificar lleugerament les concentracions de proteïnasa K usades en el procés de

purificació. Aquests resultats no van, però, poder ser correlacionats amb els resultats obtinguts per *western blotting*, que, tot i no ser quantitatiu, mai va mostrar un descens en la intensitat de senyal equiparable al descens de les lectures d'absorbància. La diferència aparent de sensibilitat entre totes dues tècniques es va fer més evident en dopar amb EEB. Finalment, en un experiment de dilució límit, el WB es va mostrar fins a 25 cops més sensible que l'EIA per a aquest tipus de mostres.

Inicialment, es va pensar que les DO observades fossin falsos positius causats per una variació significativa dels nivells de PrP^c en els inòculs infectats respecte als no infectats, però, per contra, aquests nivells van mostrar-se superiors en els inòculs sans (Fig. 2.2). Així, doncs, tan sols podria tractar-se d'un fenomen de degradació de la PrP^{sc} en aigües d'escorxador que afectés a la detecció per EIA i no pas a la detecció per WB. La degradació de la molècula de PrP^{sc} en aquesta matriu havia estat notada en observar el patró de migració en WB de la PrP^{sc} purificada sense presència de proteïnasa K a partir d'efluents contaminats; però va ser experimentalment confirmada en purificar amb baixes dosis de PK un inòcul sotmès, de forma comparativa, a la incubació en presència i absència d'aigua residual d'escorxador.

El test ELISA (*Bio-Rad TeSeE EIA Detection kit*) és una tècnica immunoenzimàtica, de format sàndwich, en la que s'usen dos anticossos monoclonals per a la detecció de la proteïna priònica anormal, resistent al tractament amb proteïnasa K. El mAb que es troba fixat en la base de la placa presenta una diana en la regió dels octapèptids en la part aminoterminal de la molècula de PrP (Lezmi *et al.*, 2004), mentre el mAb conjugat amb peroxidasa detecta la regió central de la proteïna o *core*. Una de les propietats principals de la PrP^{sc} és la seva elevada agregabilitat. En presència de detergents i agents caotròpics, aquesta tendència s'accentua dificultant l'accessibilitat de la proteïnasa K, mentre que la PrP^c resta com a monòmer i resulta altament digerible. L'ús conjunt del sistema de purificació de SAF i del sistema de detecció de SAF per EIA permet la detecció específica de PrP^{sc} en condicions en que la PrP^c resta digerida. De forma contrària, la detecció per *western blotting* es realitza amb un únic mAb, SHa31, que presenta la diana GNDYEDRY, situada en la posició 145-152 de la molècula de PrP (núm. d'accés NP898902; Morel *et al.*, 2004) de la regió c-terminal de la molècula. La baixa sensibilitat del test EIA és, doncs, probablement causada per una pèrdua de la diana present en l'extrem aminoterminal com a conseqüència d'una

degradació d'aquesta regió en l'aigua residual d'escorxador. Els SAF purificats a partir d'aigua residual amb una dosi de PK molt baixa migren gairebé sobre els 27-30 kDa en WB, la mateixa mida que s'obté purificant els SAF a partir d'homogenat d'encèfal amb una concentració de PK cinc cops superior (Fig. 8). Aquest resultat clarament demostra l'acció proteolítica existent en l'aigua residual sobre l'extrem N-terminal de la PrP^{Sc}, fet que incapacita el *TeSeE EIA Detection kit* com a sistema de detecció fiable en aquest tipus de mostres.

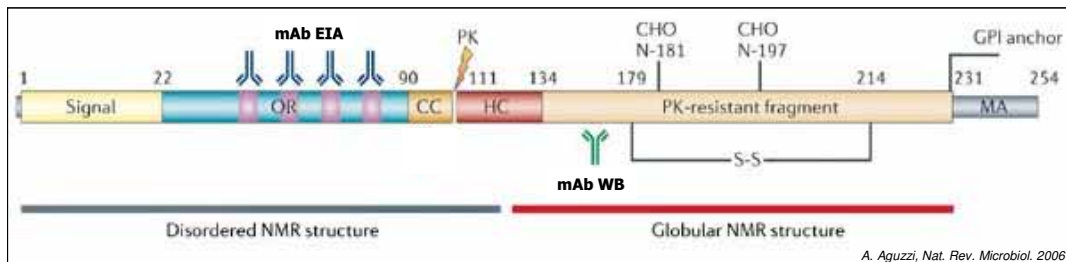


Fig. 3.14. Localització dels anticossos emprats per a la detecció de PrP^{Sc}.

En contraposició a la impossibilitat d'utilitzar els tests immunoenzimàtics, el *western blot* es mostrarà fiable i altament sensible. A més, degut a l'exigència d'un patró d'electroforesi determinat, no dona lloc a l'aparició de falsos positius, una circumstància que podria *a priori* produir-se per problemes d'accessibilitat de la PK en mostres ambientals especialment carregades de matèria. A més, l'acció proteolítica de l'aigua residual sobre la PrP^{Sc} permet l'ús de concentracions més baixes de PK en el procés de purificació. Aquesta condició podria afavorir la detecció de proteïnes priòniques de baixa resistència als tractaments de PK com ara els casos atípics d'*scrapie* generalment coneguts com Nor98 i Nor98-like (Benestad *et al.*, 2003; Buschmann *et al.*, 2004; De Bosschere *et al.*, 2004; Onnasch *et al.*, 2004; Orge *et al.*, 2004). Amb aquest objectiu, en el pas d'homogeneïtzació dels *pellets* obtinguts per centrifugació dels efluent es va substituir l'homogeneïtzat d'encèfal no infectat per una solució amb una quantitat coneguda de proteïna que no presentés immunoreactivitat amb el SHa31. La concentració d'aquesta proteïna és suficientment elevada per a considerar com no significatives les variacions en la càrrega proteica presents en les mostres ambientals, de manera que s'estandarditza el contingut en proteïna total sense haver de determinar-lo en cada mostra d'efluent susceptible d'anàlisi. Així, la concentració de PK es va optimitzar a 0.16 mg/ml.

En general, les aigües residuals generades en els escorxadors durant el sacrifici dels animals són filtrades a través de malles d'uns quants mil·límetres de diàmetre de porus per tal de retenir material groller de gran mida. Aquestes aigües acostumen a rebre algun tipus de tractament primari, típicament floculació i/o sedimentació, per tal de reduir la càrrega de material orgànic present. De forma opcional, en alguns escorxadors, l'aigua floculada és un altre cop filtrada en malles de diàmetre sensiblement inferior, <1mm, que permeten la retenció de fragments superiors a 0.1 g. Finalment, les aigües són tractades per un sistema de fangs actius, normalment centrats en processos de digestió aeròbica o anaeròbica, o bé avocats directament a la xarxa general d'aigües residuals. La sensibilitat del protocol definit per a la purificació de PrP^{sc} en aigües d'escorxador va ser avaluada en mostres obtingudes després de la primera filtració i abans de l'aplicació de cap dels tractaments descrits, car són les aigües que presenten un major contingut orgànic derivat dels processos aplicats als animals sacrificats. Dues mostres, procedents de dos escorxadors diferents, van ser testades i els límits de detecció es van determinar en 2 µg de teixit infectat per EEB i en 2-4 µg de teixit infectat per *scrapie*, en 0.125 g de matèria present en 15 ml d'aigua residual. La concordança dels límits de detecció, aproximadament 2 µg, per als dos agents infecciosos en els dos escorxadors estudiats és indicatiu de la fiabilitat del test dissenyat, que és, a més, independent de les característiques físico-químiques pròpies de cada soca de prions.

Existeix una forta variació en la concentració de PrP^{sc} existent entre les diferents regions de l'encèfal d'un mateix animal, entre diferents animals i, òbviament, entre soques de prions diferents. En els experiments de dopatge i recuperació, les sensibilitats estan, doncs, molt influïdes pels títols inicials dels inòculs emprats. Una forma de minimitzar aquestes variacions és expressar els llindars de detecció en forma de dosis infeccioses, tot i que aquesta extrapolació és de caràcter aproximatiu i pot no ser representativa de la infectivitat d'un inòcul. En aquest estudi, els inòculs d'*scrapie* i d'EEB van ser calibrats respecte a soques de referència prèviament titulades en termes d'infectivitat. Així, els límits de detecció del test es van establir en $6 \cdot 10^{-3}$ i de $10^{1.5}$ a $10^{1.8}$ DL₅₀ intra cerebrals en ratolí per a EEB i per a *scrapie*, respectivament. Deslys i cols. (2001) han descrit una DL₅₀ en ratolí per a cada 0.5 mg de cervell boví infectat. S'infereix que $6 \cdot 10^{-3}$ equivaldria a 0.003 mg de teixit infectat, la qual cosa s'adequa perfectament al llindar de detecció establert experimentalment en aquest estudi (2 µg).

En aquest estudi no s'ha detectat PrP^{Sc} en cap de les mostres d'efluent d'escorxador analitzades, ni tan sols les recollides després de la declaració d'un cas positiu d'EEB. Aquest resultat era previsible tenint en compte la baixa proporció de teixits del SNC que són potencialment despresos i drenats cap a la xarxa d'aigües residuals, el volum d'aigua que s'utilitza en la manipulació de les carcasses i la mínima incidència d'EEB en els escorxadors. Tot i això, diferents mostres d'efluents procedents d'escorxadors catalans han estat recol·lectades i analitzades per tal de verificar experimentalment aquesta hipòtesi. Algunes d'elles han mostrat la presència de PrP^c, la qual cosa lliga amb la seva expressió constitutiva (Basler *et al.*, 1986). De forma gràfica, la detecció de PrP^{Sc} en una de les tres rèpliques analitzades per a cada mostra proporciona un marcador molecular precís i assegura la potencial identificació dels prions en aquestes matrius, evitant la possibilitat de falsos negatius o d'incompatibilitat dels reactius utilitzats amb el contingut de les mostres.

En els estudis de valoració del risc de contaminació amb EEB dels efluent dels escorxadors, s'ha establert que, tenint en compte les directives actuals, aproximadament un 0.01% del MER per animal infectat d'EEB podria arribar a la xarxa general d'aigua residual de l'escorxador, la qual cosa equivaldria a 0.1 g de teixit (Gale i Stanfield, 2001). De forma experimental, un estudi realitzat sobre 6 escorxadors diferents ha quantificat en 2.73 g per animal els teixits de SNC alliberats en diferents punts de la cadena de sacrifici dels animals, com ara durant la retirada de la medulla, l'escissió del cap, el moment d'estabornir l'animal i/o la fenedura de la carcassa (AFSSA, 2003). Si bé part d'aquest material és retingut durant els processos de filtració posteriors i tractat com a MER, aproximadament entre 0.75 i 1 g per carcassa podria ser transportat pels efluent de l'escorxador. D'acord amb l'estudi d'infectivitat publicat per Deslys i cols., això seria equivalent a unes 1,500 DL₅₀ i.c. en ratolí. Assumint que el material infecciós es troba homogèniament distribuït en l'aigua i considerant que el nostre test detecta 6·10⁻³ DL₅₀ i.c. en ratolí a partir d'aproximadament 15 mL d'aigua residual, els teixits procedents de cada animal afectat podrien estar diluïts en 3,750 L d'aigua d'escorxador i ser potencialment encara detectables. Si 1 m³ d'aigua és normalment usat per cada animal, 1 de cada 4 animals sacrificats en un mateix dia en un escorxador hauria d'estar afectat per EEB per tal d'introduir suficient quantitat de MER per a detectar prions en els efluent. Tot i assumir una dilució homogènia del material en l'aigua, això és

clarament inviable tenint en compte la incidència d'EEB en els escorxadors. D'acord amb la sensibilitat del test dissenyat en aquest estudi, la única forma factible d'avaluar la hipotètica presència de prions en les aigües residuals dels escorxadors seria el sacrifici experimental sota condicions controlades d'un animal afectat i el posterior anàlisi dels efluent generats.

D'altra banda, els resultats negatius obtinguts representen una concentració de PrP^{EEB} menor a $6 \cdot 10^{-3}$ DL₅₀ i.c. en ratolí per cada 15 mL d'efluent. Considerant una magnitud de l'ordre de 10^5 per a la transmissió de l'EEB en ratolí així com la barrera de transmissió entre la vaca i l'home, Gale i Stanfield (2001) han quantificat la dosi infecciosa 50 en humans per via oral com a 6 g d'encèfal boví infectat mostrant símptomes clínics. D'acord amb aquesta dada, el test desenvolupat seria capaç de detectar fins a $3 \cdot 10^{-7}$ LD₅₀ orals en humans. Així doncs, la disseminació potencial de prions en el medi a causa de l'ús d'efluent contaminats no suposa un risc epidemiològic considerable per a l'espècie humana d'acord a les dades obtingudes en aquest estudi. Tanmateix, és difícil valorar el risc epidemiològic lligat a altres espècies, doncs les barreres de transmissió involucrades no han estat extensivament estudiades com en el cas dels humans.

3.5. Annex: Assessing the presence and persistence of BSE and scrapie in slaughterhouse wastewater

(sotmès a *Applied and Environmental Microbiology*)

Assessing the presence and persistence of BSE and scrapie in slaughterhouse wastewater

Carlos Maluquer de Motes¹, Stephanie Simon², Jacques Grassi², Juan Maria Torres³,
Martí Pumarola⁴ and Rosina Girones^{1*}

Little is known about behaviour of transmissible spongiform encephalopathies (TSE) causing agents, or prions, in the environment. Some risk assessment studies have proposed a potential environmental route of prion contamination in the abattoirs through sewage sludge and fertilisers, as prions are highly resistant to inactivation procedures and because TSE testing is performed post mortem after the completion of all slaughtering processes. In this work, a reliable and simple method has been described for evaluating the presence of the proteinase K resistant form of the prion protein (PrP^{res}) in slaughterhouse wastewater. Samples collected from different abattoirs were spiked with either scrapie or BSE agents and PrP^{res} was detected by Western blotting technique. The methodology has been shown to detect 2 µg of infected brain tissue in 15 ml of sewage for both BSE and scrapie agents. As expected, no PrP^{res} was identified in the real sewage samples tested. Prion survival was analyzed in two different points of the abattoir watercourse and the degradation curves showed an inactivation clearly dependent on sewage medium rather than prion strain.

¹ Department of Microbiology, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, Barcelona 08028, Spain

² CEA, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Ivette cedex, France

³ Centro de Investigación en Sanidad Animal, CISA-INIA, Crta. Algete a El Casar, sn, Valdeolmos 28130, Madrid, Spain

⁴ PRIOCAT Laboratory, CReSA, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain

*For correspondence: E-mail: rgirones@ub.edu Telephone number: +34 934021483. Fax number: +34 934039347.

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are fatal neurodegenerative disorders affecting both humans and animals. Commonly known as prion diseases, they are mainly characterised by the accumulation of a protein isoform, called PrP^{sc} (for scrapie PrP), in affected brains causing the typical spongiform pattern. PrP^{sc}, which is rich in β -sheet structures, markedly insoluble in presence of detergents and partially resistant to protease treatments, is originated from the normal form of the prion protein, called PrP^c (for cellular PrP), through conformational modifications (Caughey et al., 1991; Prusiner, 1982). PrP^{sc} presence correlates with infectivity and it is considered the only direct molecular marker for TSEs (Bolton et al., 1982). Most of available PrP^{sc} detection tests include a proteinase K (PK) treatment step, as few monoclonal antibodies (mAbs) have been described for distinguishing PrP^{sc} from its partner PrP^c (Korth et al., 1997; Paramithiotis et al., 2003; Curin et al., 2004; Zou et al., 2004). Proteinase K treatment removes the N-terminal part of PrP^{sc} and the remaining C-terminal fragment is called PrP^{res}. Animal TSEs mainly comprises scrapie in sheep and goat, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, and chronic wasting disease (CWD) in deer and elk. Since BSE was found in the United Kingdom in 1986 and a new variant of CJD (vCJD) was thought to be linked to the consumption of BSE infected tissues by human (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997), the control and eradication of prion diseases have been a major concern for public health authorities during the last twenty years. Several measures have been taken either at farms and slaughterhouses to identify TSE-positive cases and to provide management strategy for animal processing and elimination of brain, spinal cord and other specified offal's, also referred as specified risk material (SRM). These materials are systematically removed for human consumption and incinerated, most of time, after being transformed in meat and bone meal (MBM). MBM, which are supposed to be responsible for the spreading of the BSE epidemics, were prohibited in many European

countries as soon as the beginning of the 90's (including France and Switzerland). This ban was reinforced and expanded in 1996 after the first mad cow crisis and became mandatory for European member states at the end of 2000 while systematic testing was implemented at slaughterhouses for animals older than 30 months with the exception of United Kingdom which was under the Over Thirty Month Scheme since 1996 (OTMS, excluding for human consumption all animals older than 30 months)¹.

While prion transmission through food-chain seems to be progressively controlled, concerns about prion fate in the environment are still present, mainly due to its high persistence. Scrapie agent is resistant to UV radiation (Bellinger-Kawahara et al., 1987). Complete destruction of hamster TSE infectivity requires temperatures as high as 1000°C (Brown et al., 2000), whereas BSE is only 98% inactivated by rendering processes (Taylor et al., 1995). In relation to the environment, scrapie agent seems to persist in the environment for years in certain conditions (Palsson, 1979) and has been proven to survive degradation by soil microorganisms for over 3 years (Brown and Gadjusek, 1991). Particularly significant is the case of Chronic Wasting disease, where a horizontal transmission through contaminated environments has been proposed to maintain the epidemics in the USA (Miller et al., 2004). In contrast, BSE does not appear to be directly transmitted through the environment, though its wide geographical distribution forces to be cautious. Even more, its impact on the sheep and goat populations, which is called 'BSE in sheep', remains unknown (Kao et al., 2002).

To date, only post-mortem tests are available for TSE detection, which means that all slaughtering processes are finished when the TSE case is confirmed, raising the possibility of prion contamination of sewage and sludge in the abattoirs by some SRM infectivity. In a quantitative risk assessment study, Gale and

¹ It is worth noting that, since 2006, UK is now under the general scheme including systematic testing for over 30 months animals which can now enter into the human food chain.

Stanfield (2001) have summarised in detail the possible routes of prion contamination of slaughterhouse sewage and have assumed that 1% of the total SRM content of each carcass could pass to the sewage drain system. In Japan, Yamamoto et al. (2006) have also indicated a possible waste water contamination route by SRM infectivity associated with stunning, pithing and splitting. Another qualitative risk assessment study have also been reported by the AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments²) which underline the lack of scientific information about the potential risk of BSE-contamination via sewage sludge fertilizer procedures.

Slaughtering processes usually comprise animal stunning and exsanguination, evisceration and splitting of the carcass up the spinal cord before the carcass is washed and weighted. Because of their anatomic structure or the processing to which animals are subjected to, the spinal cord and, in a lesser extent, brain are certainly the more susceptible organs, among those carrying high infectivity, to be spread out during slaughterhouse manipulations. When splitting of the carcass and cutting of the head, some particles of spinal cord may be released. The removal of the spinal cord, frequently by aspiration, represents also a risky practice as remaining fragments could be dropped off during the following washings. No contamination has to occur in the stunning process unless few particles of Central Nervous System (CNS) are expelled by the hole made by the captive bolt. Recently, some stunning methods have been prohibited by European Commission for their aggressiveness and disruption of the CNS, such as captive bolt stunning followed by posterior pithing. However, some others are still widely used. Experimentally, amounts of CNS collected during all slaughtering processes have been quantified in the AFSSA report as to represent 2.73 g/cattle. By simulating the spread of Central Nervous System by inoculation of a

marker organism into cattle brain during stunning process, Daly et al. (2002) have reported on the detection of the marker in different animal organs and in the immediate environment.

In the abattoirs, wastewaters containing organic material derived from all slaughtering processes are subjected to filtration through 4-mm mesh screens preventing fragments of tissue greater than 0.1 g entering the sewer. However, as no information is known about the size and adsorption properties of PrP rods in this matrix, the efficiency of this step remains undetermined. Gale and Stanfield have assumed no loss of infectivity during sewage treatment works or during the conventional treatment of sewage sludge. The stability and behaviour of different prion strains under anaerobic conditions have been recently assessed (Kirchmayr et al., 2006). Within 302 hours, the decay of PrP^{Sc} signal under thermophilic conditions was quantified in one order of magnitude. This reduction has proven to be matrix dependent in a not clearly identified way yet.

The objectives of this work were to develop a sensitive methodology for evaluating the possible presence of prions in waste waters after processing of TSE-infected animals in the abattoirs, as well as studying the PrP^{Sc} persistence in these matrices.

Material and Methods

TSE-affected tissues

The methodology for detection of prions in slaughterhouse wastewater was developed for scrapie and BSE agents. Scrapie-affected and BSE-affected, as well as non-affected, brain samples were homogenized (20% w/v) in glucose 5% using a TeSeE Precess (Bio-Rad) and used for all the spiking experiments reported.

In addition, a pool of brains infected by the Dawson strain and previously titrated in terms of infectivity by intra cerebral inoculation (i.c.) in transgenic mice (tg338) was kindly provided by Dr. Olivier Andreoletti (INRA/ENVT, Toulouse, France). Titer was $10^{7.5}$ LD₅₀/g of tissue i.c. Another BSE-affected brain homogenate titrated as containing $10^{3.1}$ mouse

² Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments concernant les risques sanitaires, au regard de l'ESB, liés au rejet dans l'environnement des effluents et boues issus d'abattoirs et d'équarrisages, 30 Octobre 2003

i.c. LD₅₀/g of tissue (Moynagh and Schimmel, 1999) was also used. These inocula were calibrated to the non titrated ones by densitometry (see below).

Sewage samples

Sewage samples used for spiking experiments were collected from two different slaughterhouses. The abattoir A is located in Catalonia (Spain) and processes mainly cattle and sheep. Basically, raw wastewater drained through traps with 4-mm mesh sizes is stored in a general tank before being conducted to a precipitation tank. Commercial flocculants are then added and water is discharged to urban watercourses. Samples were collected from the general water tank.

The abattoir B is located in the Midi-Pyrénées region (France) and processes a wide range of species including cattle, sheep, swine and even equine. Wastewater from all slaughtering processes is, in this case, subjected to filtration through 6-mm mesh size screens and, then, treated by several steps of flocculation and decantation. Sewage is finally strained through sieves with diameters beyond 1mm and drained to a water treatment plant. Samples were collected before application of flocculation treatments.

Concentration and recovery of prions from sewage samples

Both scrapie and BSE-affected brain homogenates were spiked into sewage, typically 30 ml, and kept at RT for at least 20 min with some manual mixing prior to application of several different experimental conditions. The ones giving best recoveries (see 'Methodology for PrP^{Sc} detection in slaughterhouse sewage' in Results, for detailed explanations) led to a general protocol applied to the sensitivity curves. In general terms, the spiked samples were first centrifuged in order to pellet PrP^{Sc}-containing tissues fragments. Several centrifugation forces were evaluated such as 4,000g for 30 min, 7,000g for 45 min, and 33,500g for 30 min. Both supernatants and pellets were analyzed for the presence of PrP^{Sc}. Then, the pellets were weighted, mixed with 2 volumes of 'homogenization solution' and

homogenised using a TeSeE Precess (Bio-Rad). Initially, non-infected brain homogenate 20% was used as "homogenization solution". In this case, the proteinase K concentration recommended in the Bio-Rad TeSeE-Purification Kit was applied to detect specifically PrP^{Sc}, as results were analyzed by EIA. However, since these initial centrifugation steps were adjusted, brain homogenate was substituted by a solution of 5% Glucose supplemented with BSA 20%. The resulting elution was filtered through a 25 gauge needle and stored at -80° as a sample concentrate.

Scrapie-associated fibrils (SAFs) were prepared from the ribolyzed samples using the procedure recommended in the Bio-Rad TeSeE-Purification Kit with some minor modifications. Solution A, B and C used for these processes are those provided in the kit. Briefly, 500 µl of sample concentrate were incubated, for 10 min at 37°, with 500 µl of solution A containing PK. Different concentrations of PK were assayed such as 0.04 mg/ml, 0.08 mg/ml, 0.16 mg/ml, 0.2 mg/ml, and 0.4 mg/ml. After PK treatment, 500 µl of buffer B was then added and the sample was mixed using a vortex and immediately centrifuged for 5 min at 20,000g. Pellets were finally denatured at 100°C for 10 min with 50 µl of Laemmli buffer (LB) without reducing agents for WB analysis or with 25 µl of C-reagent for ELISA analysis.

Sensitivity of the method

The sensitivity was determined by using the non titrated scrapie- and BSE-infected brain homogenates which contained similar amounts of PrP^{Sc} as seen in WB experiments (data not shown). Ten 30-ml aliquots of each sewage sample were spiked with 2-fold serially-diluted brain homogenate (20%, i.e. 200 mg/ml of brain tissue) for both scrapie and BSE, so that brain homogenate amounts corresponding to 25 µl (5 mg) until 0.05 µl (10 µg) were added. The samples were then concentrated by centrifugation at 7,000g for 45 min and the supernatant discarded. A known amount of pellets were weighted (0.25 g ± 0.05) and subsequently 2 volumes (w/v, i.e. 500 µl) of Glucose 5% supplemented with BSA 20% were added before being transferred to a clean

ribolyzer tube containing ceramic beads. After two runs of homogenization, homogenates were calibrated by passage to needle of 25 gauges and stored at -80° as sample concentrates. SAFs were prepared by mixing 500 μ l aliquots of sample concentrate, obtained from 30 ml of sewage, with a volume (500 μ l) of solution A containing 80 μ g of PK. The samples were incubated 10 min at 37° and, after addition of a volume (500 μ l) of solution B, mixing and centrifugation, the corresponding pellets were solubilised and denatured for 10 min at 100°C with 100 μ l of LB before being analyzed by Western blot (usually 5 μ l).

Analysis of slaughterhouse sewages

Seventeen waste water samples were collected between March 2004 and July 2005 from three different slaughterhouses located in Catalonia (Spain). All samples were gathered in sterile 1 L polyethylene containers and kept at 4°C for less than 48 h before being aliquoted and subsequently stored at -80°C . Nine of them were collected among 6-24 hours after the detection of a possible TSE case, which were later confirmed as BSE cases.

In the abattoirs studied, raw sewage is generally filtered through drain traps with 4-mm mesh size and stored in a general tank. A primary treatment consisting in flocculation and sedimentation is usually applied. The wastewater is then discharged to the sewer or treated by an activated sludge method consisting in an aerobic or anaerobic digestion. Waste water was sampled from either the raw sewage tank and after primary treatment process.

Samples were analyzed as described in the previous section. However, sample concentrates were divided in three replicates. One was processed without addition of PK in the solution A. The others were treated with PK as mentioned, but one of them was previously spiked with 0.2 μ l of scrapie-affected brain homogenate (20%). Samples were concentrated to 50 μ l of LB. Twenty-five μ l for non-spiked samples and 10 μ l for the spiked ones were loaded onto Western blotting gels.

PrP^{sc} persistence experiments

Two different points of the abattoir B watercourse were sampled in order to test the persistence of PrP^{sc} in slaughterhouse sewage. Samples were collected after 6-mm filtration step but before being flocculated (raw wastewater), and after flocculation treatments and 1-mm filtration (treated wastewater). Two sterile beakers containing 400 ml of each sample and another containing 400 ml of PBS were spiked with 333 μ l of scrapie-affected brain homogenate (20%). The same experimental design was applied for studying the BSE persistence. All the samples were kept under slight agitation (80 rpm) at 20° ($\pm 2^{\circ}$) until the experience was ended. Thirty ml aliquots were sequentially removed and stored at -80°C before being analyzed for the presence of PrP^{sc} within a 50-day period starting on days 0 (30 min after spiking), and subsequently on day 1, 4, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50. The aliquots were concentrated to 100 μ l of LB as previously described before being tested by Western blot.

ELISA detection

For ELISA detection, the Bio-Rad TeSeE and TeSeE-Sheep/Goat EIA Detection kits were used following manufacturer's instructions. Briefly, the C-denatured pellets are diluted 1:5 in R6 reagent and 100 μ l/well are dispensed onto the microtiter plate and reacted for 1h 15 at 37°C . After 3 washes, with R2 washing solution, 100 μ l of R7 anti-PrP conjugate is dispensed in each well and reacted for 1h at 4°C . After 5 washes, 100 μ l of colour development solution are distributed into each well, and the plate is incubated at room temperature for 30 min. Reaction is stopped by addition of 100 μ l of stop solution to each well. The optical density is determined at 450-620 nm.

Western blotting

Samples were loaded onto sodium-dodecyl-sulfate polyacrilamide gels (SDS-PAGE, 13.5%) and proteins fractionated for 1h at 200 V. The gel proteins were then blotted onto PVDF-membranes at 100 V for 1h, and probed with the mAb SHa31 diluted 1:2000. The mAb SHa31 recognizes a linear epitope sequence (GNDYEDRY) located between residues 145-

152 (GenBank accession number NP898902) (Morel et al., 2004). Immunoreactive bands were visualized by the ECL-Plus developer kit (GE Healthcare).

PrP^{sc} quantification

In order to express PrP^{sc} amounts in terms of mouse LD₅₀, calibration curves were established using scrapie and BSE stocks used for the spiking experiments. Films were transformed into digital pictures and band intensities analyzed by densitometry (Kodak image station 2000MM, with the software Kodak MI). For the persistence experiments, intensities of PrP^{sc} bands were analyzed by Image J, an open source image-processing and analysis software distributed by the National Institutes of Health (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Results

Methodology for PrP^{sc} detection in slaughterhouse sewage

The detection of PrP^{sc} in slaughterhouse sewage is a very challenging objective and is fronted to several difficulties different of those usually encountered for the detection of PrP^{sc} in tissues like brain, peripheral lymphoid tissues (spleen, lymph nodes, tonsils) or muscles. In these tissues, the more currently applied strategy involves the treatment of a known amount of tissue homogenate with PK, in conditions achieving the complete proteolysis of PrP^c while most of the PrP^{sc} is preserved. For a given tissue the amount of PK is empirically adjusted to achieve this task. This is possible because the total amount of protein is more or less constant. In contrast, slaughterhouse sewage is a very heterogeneous medium and its composition can vary greatly since it contains variable amounts of different tissues (including blood) which are released from the slaughterhouse process at different times of the day. In consequence, it is much more difficult to design a single procedure allowing a specific determination of PrP^{sc} in this very complex mixture. In this work, we have considered that the main source of possible TSE related infectivity comes from the presence of fragments (particles) of central nervous tissues (mainly spinal cord) in these sewages and we have neglected the other soluble components.

As a consequence, the first step of our approach consists in a centrifugation step aimed to collect those fragments in a pellet. For obvious reasons, the optimization of the method was conducted on spiked samples.

Consequently, scrapie and BSE-affected brain were spiked into slaughterhouse sewage samples and several different conditions were assayed in order to develop an optimized methodology for PrP^{sc} detection which is described in 'Material and Methods' (see 'Sensitivity of the method'). Firstly, the spiked samples were centrifuged. Applying 7,000g for 45 min was enough to ensure no detectable PrP^{sc} remaining in the supernatant (Fig. 1). Although ultracentrifugation was supposed to produce the highest recoveries, it has been avoided due to the difficulties encountered in recovering PrP^{sc} from high speed pellets. These first results, especially those recorded in Fig. 1, may lead to consider the recovery of the test never better than 50% (when referred to the PrP^{sc} amount contained in the brain homogenate used for spiking). This low efficiency could be related either to a degradation of PrP^{sc} in sewage medium (see Discussion) or to an underestimation of PrP^{sc} in the supernatant or pellet. Our effort to clarify this point were unsuccessful and we kept the optimal conditions (7,000g for 45 min) considering that a recovery of 50% is acceptable taking into account the difficulties of analysing the PrP^{sc} content of these media. It is interesting to notice that the WB assays further applied to the PrP^{res} detection provided higher recoveries, so that WB technique was onwards used in all the experiments showed.

Since the pellet can contain variable amounts of tissues, we decided to add systematically a known an important amount of protein in order to keep almost constant this parameter which directly conditions the efficacy of the PK treatment. For the first experiments, once the pellets were weighted (usually 250 mg, see 'Methods'), 2 volumes (500 µl) of a 20% non infected brain homogenate were added before transferring into the ribolyser tube. This ratio (500 µl of homogenate for 250 mg of pellet) was found to give the best results, as smaller volumes have been shown insufficient to

solubilise the sample pellets. In further experiments and for the sake of simplicity, the non infected brain homogenate was replaced by the same volume of a 5% glucose solution containing 20% BSA, which corresponds approximately to the same amount of protein. According to that and after the homogenisation step, several PK concentrations were compared. A PK-concentration of 0.16 mg/ml was enough to show only the PK-resistant protein core (Fig. 2). After precipitation and centrifugation, final pellets were dissolved in Laemmli buffer and analysed by Western blot.

Sensitivity of the method

In order to evaluate the sensitivity of the designed test, experiments spiking serial dilutions of scrapie and BSE brain homogenates (containing approximately the same amount of PrP^{res}) were done in each slaughterhouse sewage sample (see methods and Fig. 3). The test has been able to detect until 2 µg of BSE-infected tissue spiked in 30 ml of sewage from either the abattoir A or from abattoir B, and until 3.9 µg and 2 µg of scrapie-infected tissue from the abattoir A and from the abattoir B, respectively. Natural variability in the sample content may have produced some heterogeneity in the recoveries of the spiked material observed in some samples, especially in some dilutions of the abattoir A. As it may be inferred from the volumes used for processing the samples for the evaluation of the sensitivity of the method, these thresholds of detection were obtained from 12.5 mg of raw initial matter. However, they could have been increased eluting pellets into 50 µl LB and loading 25 µl onto Western-blot gels, as done for the real sewage samples, which would have corresponded to 0.125 g of sewage matter or, equally, 15 ml of wastewater.

PrP^{res} amounts contained in brain homogenates used for the spiking experiments had been previously calibrated to those contained in titrated brain homogenates in a series of end-point dilution experiments analyzed by western-blotting and quantified by densitometry (see 'Methods'), so that detection limits could have been compared to infectious units. Even though we are aware that infectivity is not always proportional to PrP^{res} accumulation, we have

considered that the use of this terminology for expressing the test sensitivity is more representative than tissue amounts (mg), as well as more useful in terms of risk assessment data. Assuming that, BSE detection limit would be equivalent to $6 \cdot 10^{-3}$ mouse i.c. LD₅₀, and scrapie detection limit would correspond from and $10^{1.5}$ to $10^{1.8}$ mouse i.c. LD₅₀.

Analysis of slaughterhouse sewage samples

None of the 17 samples studied were found to contain PrP^{sc} (see figure 4, for three representative sewages), though nine of them were qualified as 'TSE-susceptible' for being collected within 24 hours after the identification of a confirmed BSE case in the slaughterhouse. As expected, replicates not treated with PK showed higher background, in some cases due to the presence of PrP^c or fragments of naturally degraded PrP^c. Scrapie-spiked replicates were also analyzed to ensure that the hypothetical presence of PrP^{sc} would have been detected and not masked by any environmental factor or reaction. Spiked PrP^{sc} immunoreactive bands corresponding to 8 µg of tissue are shown (Fig. 4).

PrP^{sc} persistence in slaughterhouse sewage

The PrP^{sc} persistence curves at 20°C have been obtained for two different points of the slaughterhouse watercourse as well as for PBS. Both scrapie- and BSE-affected brain homogenates were spiked resulting in a final concentration of 0.016 % (w/v) brain in abattoir sewage (Fig. 5). 'Raw' wastewater was sampled after filtration with 6-mm mesh size screens but before the application of any primary treatment, whereas 'treated' wastewater was collected when the flocculation treatments were already applied. Scrapie-associated PrP^{res} was shown to be detectable in raw water until the end of the experiment at day 50. However, in the treated water, signal disappeared at day 30. In raw water, BSE-associated PrP^{res} was also still detectable until the end of the experiment, while disappeared at day 35 in treated water. No significant loss of signal was observed in the PBS control neither for scrapie or BSE.

In order to obtain the estimated t_{90} and t_{99} (times required for 90% and 99% reductions of PrP^{sc}

titer), a linear regression model has been computed for every analysis. For scrapie-associated PrP^{res} in raw waste water, a t_{90} of 65.70 days and a t_{99} of 72.26 days have been estimated, whereas in treated waste water these values have been reduced to 28.84 and 31.73 days for t_{90} and t_{99} , respectively. Likewise, BSE-associated PrP^{res} showed a t_{90} of 60.40 days and a t_{99} of 66.44 days in raw water, but a t_{90} of 31.35 days and a t_{99} of 34.50 days in treated water. No parameters have been estimated for the PBS controls as the short length of the study would not give any representative data.

In all cases, PrP^{sc} amounts loaded into the t_0 samples corresponded to the quantity contained in 250 µg of affected tissue which is equivalent to 0.755 mouse LD₅₀ for BSE, and 10^{3.6} LD₅₀ for scrapie, according to BSE-titrated and Dawson-titrated calibration curves. In treated wastewater there were no PrP^{res} signals after 35 days for both scrapie and BSE, indicating that PrP^{res} levels were lower than the detection limits which were previously established in 6·10⁻³ and 10^{1.5} mouse LD₅₀ for BSE and scrapie respectively. Assuming that PrP^{res} titer correlates quite well with infectivity when dealing with the same prion strain, prion infectivity was at least reduced about two orders of magnitude in the course of an incubation of 35 days in wastewater subjected to primary treatment.

Discussion

Several scientific sources have reported on the possible prion contamination of sewage and sludge at abattoirs due to the slaughtering processes applied to TSE-affected animals. As some of these processes are highly disrupting and all TSE identification tests are post-mortem so far, it may be considered that some SRM scattered residues could have entered the sewer escaping rendering plants and being spread out via fertilisers. Here we describe a simple and sensitive procedure for the detection of PrP^{sc} in slaughterhouse sewage.

In this work we have considered that the main potential source of PrP^{sc} in sewage is the small fragments of central nervous tissues (mainly spinal cord) released from the slaughtering process. In our experimental test, low

centrifugation forces were enough to ensure no detectable PrP^{sc} remaining in the supernatant. The pellets obtained by centrifugation were subsequently treated with PK and concentrated to be analyzed by Western blot. The PK treatment has been considered as a critical point since various PrP^{sc} strains have been lately described to be only slightly resistant to proteinase K digestion, especially the ovine Nor98 and Nor98-like strains (Benestad et al., 2003; Buschmann et al., 2004; De Bosschere et al., 2004; Onnasch et al., 2004; Orge et al., 2004) observed in Europe during the last years. For this reason, PK concentration was adjusted to the minimum level where whole PrP^c and PrP^{sc} N-terminal were completely hydrolysed showing the characteristic PrP^{sc} 27-30 kDa resistant core. It is worth noting that even when the spiked samples were not PK-treated, the migration pattern was surprisingly similar to that of PK-treated PrP^{sc}, indicating a natural proteolytic activity in sewage samples, as shown by the presence of the shifted unglycosylated band (Fig. 2). This was further confirmed when the same inoculum was comparatively incubated in presence and absence of sewage and subsequently treated with low amounts of PK (Fig. 6, see legend). In mild PK digestion, PrP^{sc} clearly migrated downwards after incubation in sewage, but consistently showed protease resistant core in stringent PK digestion conditions. These results suggest that PrP^{res} was not affected by proteolytic activity of sewage while the N-terminal domain invariably was. We believe, in addition, that this explains the difference of sensitivity of the Bio-Rad EIA detection kit in comparison to our western-blotting designed protocol. It is well known that the capture mAb of this EIA sandwich test recognizes the octa repeat region of the PrP protein which is located in the N-terminal domain and is usually digested in commonly applied WB procedures, but not in Bio-Rad TeSeE EIA detection kit (Lezmi et al., 2004). The proteolytic activity of sewage would be responsible of hydrolysing the PrP octa repeats of those PrP^{sc} molecules that can not be, in consequence, captured by the mAb and, therefore, account for the low sensitivity of the ELISA detection in this kind of samples. It is

worth noting that sewage is also able to affect the PrP^{res} stability in the course of prolonged incubation times, as the degradation curves in both raw and treated wastewater undoubtedly showed.

Generally, since animals are sacrificed in the slaughterhouses, sewage containing scattered residues and debris is filtered through screens with 4-mm mesh size and conducted to wastewater treatment facilities. Some primary treatments, such as flocculation and sedimentation, are commonly applied and the remaining wastewater is optionally drained through filters with <1mm mesh size and definitively discharged to be processed by an activated sludge method. In the two abattoirs studied, the sensitivity of the defined test has been established in 2 µg of either scrapie- or BSE-affected tissue. In general terms, the accordance of these thresholds of detection in the two evaluated abattoirs provides an indication of the test reliability, which is, moreover, not dependent upon the surface topology of the prion protein of this PrP^{sc} detection test. In order to standardize the results obtained, spiking stocks were calibrated to scrapie Dawson-titrated and BSE-titrated strain and sensitivities were expressed as mouse LD₅₀. Thus, detection limits have been established from 10^{1.5} to 10^{1.8} mouse i.c. LD₅₀ for scrapie and to 6·10⁻³ mouse i.c. LD₅₀ for BSE. In this sense, Deslys et al. (2001) had established 1 mice i.c. LD₅₀ per 0.5 mg infected bovine brain. That means 6·10⁻³ mouse i.c. LD₅₀ would be equivalent to 0.003 mg BSE-positive bovine tissue which perfectly agrees the experimental limit of detection of 0.002 mg of BSE-affected tissue established in this study.

As expected, no slaughterhouse sewage samples are found to contain PrP^{res} in this study, even if some of the sample were collected within the 24 hours following the diagnosis of confirmed BSE cases. This is not very surprising taking into account the small amounts of CNS tissues possibly released during the slaughtering process, the large volume of water used in the process and the very low incidence of BSE. In spite of that, we have analyzed sewage sampled in different abattoirs to verify this supposition. Some of them have shown to contain PrP^c,

which agrees with its constitutive expression (Basler et al., 1986), but none PK-resistant PrP. The fact that scrapie-spiked replicates were shown positive in the test sets up the threshold over which prions, if present, would have been detected.

According to studies reported on BSE risk assessment (Gale et al., 1998; Gale and Stanfield, 2001), 1% of SRM per BSE-infected carcass could run away the rendering plant to the general abattoir wastewater stream, which is equivalent to 10 g of SRM. However, as it has been suggested by the authors, 0.01% (0.1 g) would be a more realistic approach as controls and regulations have been lately introduced. Experimentally assessing the amounts of SNC retained during several steps of the slaughtering chain in 6 abattoirs, it has been quantified 2,73 g of tissue per animal (AFSSA, 2003). Though part of them is eliminated by the 6-mm screen filtration, from 0.75 g to 1 g per animal could be drained through slaughterhouse outflows which would correspond approximately to 1500 mice i.c. LD₅₀ (for the BSE brain used in this study). We have assumed these data (0.75 g) as the worst-case scenario for epidemiological considerations, because, to our mind, they are the most representative values for risk assessment analysis despite being qualitatively subjective. Assuming that infectious material is homogeneously distributed in water and considering 6·10⁻³ mouse i.c. LD₅₀ per 15 ml of sewage as the limit of detection of the test, these 1500 mice infectious doses may be potentially diluted into 3,750 L of slaughterhouse sewage and being still detectable by the designed test. As approximately 1 m³ of water is used when processing solely one individual, 1 BSE-affected out of 4 animals should be processed in the same day in an abattoir to introduce enough amounts of SRM to detect prions in sewage. Taking into account the BSE incidence in slaughterhouses, the results to be expected would be clearly negative. If we consider that infectious particles are not homogeneously distributed in water (which more likely reflects the actual situation), then the probability to pick a water sample of a reasonable size (30 ml) containing the infectious material appears very low.

On the other hand, these negative results represent a concentration of PrP^{sc} lower than $6 \cdot 10^{-3}$ mouse i.c. LD₅₀ per 15 ml of wastewater. Considering a magnitude of the intracerebral / oral difference of about 100.000 for transmission of BSE to mice and the cow-to-man species barrier, it has been quantified that, even in the worst case, the human oral ID₅₀ would be about 6 g of bovine infected brain with clinical symptoms (Gale and Stanfield, 2001). According to that, the developed procedure would detect $3 \cdot 10^{-7}$ oral LD₅₀ in humans.

TSE agents are highly resistant agents. BSE and scrapie survives inactivation by autoclaving or exposing to standard chemical solutions, even application of rendering procedures (Taylor et al., 1998; Taylor, 2002). BSE has proven to be more resistant to heat inactivation than scrapie (Schreuder et al., 1998). However, persistence in different environments suggests an outstanding stability of the scrapie agent. According to our degradation experiments in slaughterhouse wastewater, only slight differences of persistence could be established among the two TSE agents tested. It seems that scrapie-associated PrP^{res} survives slightly better in raw wastewater. That agrees to the general consideration that scrapie is more resistant to proteolytic inactivation than BSE (Kuczius et al., 1999; Baron et al., 2004). However, the effect of the matrix is clearly observed, as persistence for both strains in treated water is almost the half of those described for not treated water. It is plausible that the elimination of concrete solutes and fine particulates during the flocculation treatment would have enhanced PrP^{res} degradation, as particulate matter tends to protect infectious agents especially those showing amphipathic nature such as prion agents. In terms of mouse LD₅₀, we have estimated this degradation in two logarithms after 30 days for scrapie and 35 days for BSE at 20°C, always considering the TSE-associated PrP^{res} as an approximate marker for infectivity. Recently, Kirchmayr et al. (2006) have observed a higher stability of bovine BSE, in comparison to mouse BSE and mouse scrapie, in degradation experiments of PrP^{sc} by anaerobic digestion. By spiking prions in

sewage sludge (0.48% brain in sludge), the decay of prion titer during the incubation have been quantified as one logarithm after 302 hours (12.5 days, approximately) under thermophilic conditions. Conversely, no significant reduction has been described under mesophilic conditions (35°C) after 382 hours (16 days, approximately). These data are not in agreement with the ones reported on this work, but the natural variability between both environmental matrices may account for this apparently disparity. To the best of our knowledge, because of the known tendency of prions to forms rods and aggregates, these differences may partly lie in the final concentration of spiked affected brain into the matrix evaluated, as higher concentrations would allow prions survive for extended periods of time.

As little is known about TSE behaviour in wastewater and sludge of slaughtering facilities, the potential presence and persistence of prions in abattoir watercourses has been experimentally assessed. A reliable and simple method has been adapted to spiked samples providing high sensitivities for both scrapie and BSE agents. Though no noticeable TSE contamination is supposed to be experimentally identifiable in abattoir watercourses, the methodology described will permit determining the efficiencies of the wastewater treatment procedures applied in abattoirs and will be a useful tool for studying prions in the environment.

Acknowledgements

The authors are greatly indebted to Dr. Enric Vidal (PRIOCAT Laboratory, Barcelona, Spain) and Professor G. Benard (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France), as well as all technical staff working in abattoirs, for providing the slaughterhouse sewage samples reported in this work. We are also grateful to Jacques Grassi and Olivier Andreoletti for supplying us with titrated brain homogenates. Carlos Maluquer de Motes is a fellow of the Spanish Government. This research was in part financed by the research project EET2001-4814-C02 from the former Spanish Ministry of Education and Science.

References

- Baron, T., Crozet, C., Biacabe, A. G., Philippe, S., Verchere, J., Bencsik, A., Madec, J. Y., Calavas, D., and Samarut, J.** (2004) Molecular analysis of the protease-resistant in scrapie and bovine spongiform encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice. *J Virol* **78**: 6243-6251.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B., and Weissmann, C.** (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**: 417-428.
- Bellinger-Kawahara, C., Cleaver, J. E., Diener, T. O., and Prusiner, S. B.** (1987) Purified scrapie prions resist inactivation by UV radiation. *J Virol* **61**: 159-166.
- Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M. A., and Bradberg, B.** (2003) Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* **153**: 202-208.
- Bolton, D. C., McKinley, M. P., and Prusiner, S. B.** (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**: 1309-1311.
- Brown, P., and Gajdusek, D. C.** (1991) Survival of scrapie virus after 3 years' internment. *Lancet* **337**: 269-270.
- Brown, P., Rau, E. H., Johnson, B. K., Bakote, A. E., Gibbs, C. J. Jr., and Gajdusek, D. C.** (2000) New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600 degrees C suggests an inorganic template of replication. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **97**: 3418-3421.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, H., Fraser, H., and Bostock, C. J.** (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**: 498-501.
- Buschmann, A., Biacabe, A.-G., Ziegler, U., Bencsik, A., Madec, J.-Y., Erhardt, G., Lühken, G., Baron, T., and Groschup, M. H.** (2004) Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods* **117**: 27-36.
- Caughey, B., and Raymond, G. J.** (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* **266**:18217-18223.
- Curin Serbec, V., Bresjanac, M., Popovic, M., Pretnar, H. K., Galvani, V., Rupreth, R., Cernilec, M., Vranac, T., Hafner, I., and Jerala, R.** (2004) Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jakob's disease-affected and normal brain tissue. *J Biol Chem* **279**: 3694-3698.
- Daly, DJ., Prendergast DM, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA.** (2002) Use of a marker organism to model the spread of central nervous system tissue in cattle and the abattoir environment during commercial stunning and carcass dressing. *Appl Environ Microbiol* **68**: 791-798.
- De Bosschere, H., Roels, S., Benestad, S. L., and Vanopdenbosch, E.** (2004) Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Vet Rec* **155**:707-708.
- Deslys, J. P., Comoy, E., Hawkins, S., Simon, S., Schimmel, H., Wells, G., Grassi, J., and Moynagh, J.** (2001) Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature* **409**: 476-478.
- Gale, P., Young, C., Stanfield, G., and Oakes, D.** (1998) Development of a risk assessment for BSE in the aquatic environment. *J Appl Microbiol* **84**:467-477.
- Gale, P. and Stanfield, G.** (2001) Towards a quantitative risk assessment for BSE in

- sewage sludge. *J Appl Microbiol* **91**: 563-9.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J., and Lantos, P.** (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**: 448-450.
- Kao, R. R., Gravenor, M. B., Baylis, M., Bostock, C. J., Chihota, C. M., Evans, J. C., Goldmann, W., Smith, A. J., and Mclean, A. R.** (2002) The potential size and duration of an epidemic of bovine spongiform encephalopathy in British sheep. *Science* **295**: 332-335.
- Kirchmayr, R., Reich, H. E., Schildorfer, H., Braun, R., and Somerville, R. A.** (2006) Prion protein: detection in 'spiked' anaerobic sludge and degradation experiments under anaerobic conditions. *Water Sci Tech* **53**: 91-98.
- Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K., and Oesch, B.** (1997) Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* **390**: 74-77.
- Kuczus, T. and Groschup, M. H.** (1999) Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol Med* **5**: 406-18.
- Lezmi, S., Martin, S., Simon, S., Comoy, E., Bencsik, A., Deslys, J.-P., Grassi, J., Jeffrey, M., and Baron, T.** (2004) Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie cases and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheep by use of western blotting and immunohistochemical methods. *J Virol* **78**: 3654-3662.
- Miller, M. W., Williams, E. S., Thompson Hobbs, N., and Wolfe, L. L.** (2004) Environmental sources of prion transmission in mule deer. *Emerging Inf Dis* **10**: 1003-6.
- Morel, N., Simon, S., Frobert, Y., Volland, H., Mourton-Gilles, C., Negro, A., Sorgato, M. C., Creminon, C., and Grassi, J.** (2004) Selective and efficient immunoprecipitation of the disease-associated form of the prion protein can be mediated by non-specific interactions between monoclonal antibodies and scrapie-associated fibrils. *J Biol Chem* **279**: 30143-30149.
- Moynagh, J., and Schimmel, H.** (1999) Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy. *Nature* **400**: 105.
- Onnasch, H., Gunn, H. M., Bradshaw, B. J., Benestad, S. L., and Basset, H. F.** (2004) Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet Rec* **155**: 636-637.
- Orge, L., Galo, A., Machado, C., Lima, C., Ochoa, C., Silva, J., Ramos, M., and Simas, J. P.** (2004) Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J Gen Virol* **85**: 3487-3491.
- Palsson, P.A.** (1979) Rida (scrapie) in Iceland and its epidemiology. In *Slow transmissible diseases of the nervous system: volume I*. Prusiner, S. B., Hadlow, W. J. (eds). New York: Academic Press, pp. 357-66.
- Paramithiotis, E., Pinard, M., Lawton, T., LaBoissiere, S., Leathers, V. L., Zou, W. Q., Estey, L. A., Lamontagne, J., Letho, M. T., Kondejewski, L. H., Francoeur, G. P., Papadopoulos, M., Haghghat, A., Spatz, S. J., Head, M., Will, R., Ironside, J., O'Rourke, K., Tonelli, Q., Ledebur, H. C., Chakrabhartty, A., and Chasman, N. R.** (2003) A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nat Med* **9**: 893-899.
- Prusiner, S. B.** (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**: 136-144.

Schreuder, B. E., Geerstma, R. E., van Keulen, L. J., van Austen, J. A., Enthoven, P., Oberthur, R. C., de Koeijer, A. A., and Osterhaus, A. D. (1998) Studies on the efficacy of hyperbaric rendering procedures in inactivating bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents. *Vet Rec* **142**: 474-480.

Taylor, D. M., Woodgate, S. L., and Atkinson, M. J. (1995) Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. *Vet Rec* **137**: 605-10.

Taylor, D. M., Fernie, K., McConell, I., Ferguson, C. E., and Steele, P. J. (1998) Solvent extraction as an adjunct to rendering: the effect on BSE and

scrapie agents of hot solvents followed by dry head and steam. *Vet Rec* **143**: 6-9.

Taylor, D. (2002) Inactivation of BSE agent. *C R Biol* **325**: 75-6.

Yamamoto, T., Kobayashi, S., Nishiguchi, A., Nonaka, T., and Tsutsui, T. (2006) Evaluation of bovine spongiform encephalopathy (BSE) infection risk of cattle via sewage sludge from wastewater treatment facilities in slaughterhouses in Japan. *J Vet Med Sci* **68**: 137-42.

Zou, W. Q., Zheng, J., Gray, D. M., Gambetti, P., and Chen, S. G. (2004) Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **101**: 1380-1385.

Figures.

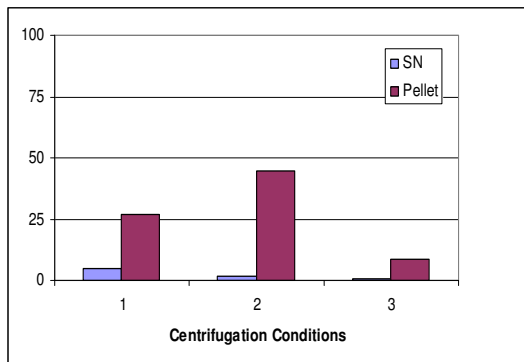


Fig. 1. Percentage of PrP^{Sc} recovery by different centrifugation forces measured by the Bio-Rad ELISA. Scrapie-spiked sewage samples concentrated at (1) 4,000 x g for 30 min, (2) 7,000 x g for 45 min and (3) 33,500 x g for 30 min. The PrP content of supernatant and pellets was determined using the Bio-Rad TeSeE sheep/goat kit as described in methods. Results are expressed in terms of percentage with regard to the signal recorded with the same amount of scrapie infected brain which was not submitted to the spiking and centrifugation processes. Open columns represent supernatants, while shaded columns, the pellets.

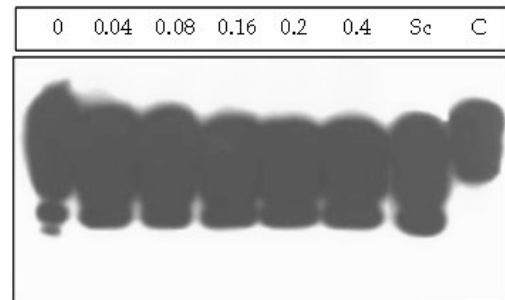


Fig. 2. Western blot for scrapie-spiked sewage concentrates treated with different PK concentrations. Pellets obtained after centrifugation of sewages were eluted with Glucose 5% supplemented with BSA 20%, homogenised with a ribolyser and treated with PK at a concentration of 0.04, 0.08, 0.16, 0.2, 0.4 mg/ml, and without PK as well (lane 0). PK-treated scrapie-affected brain (sc) and untreated non-affected sheep brain (c) are also shown.

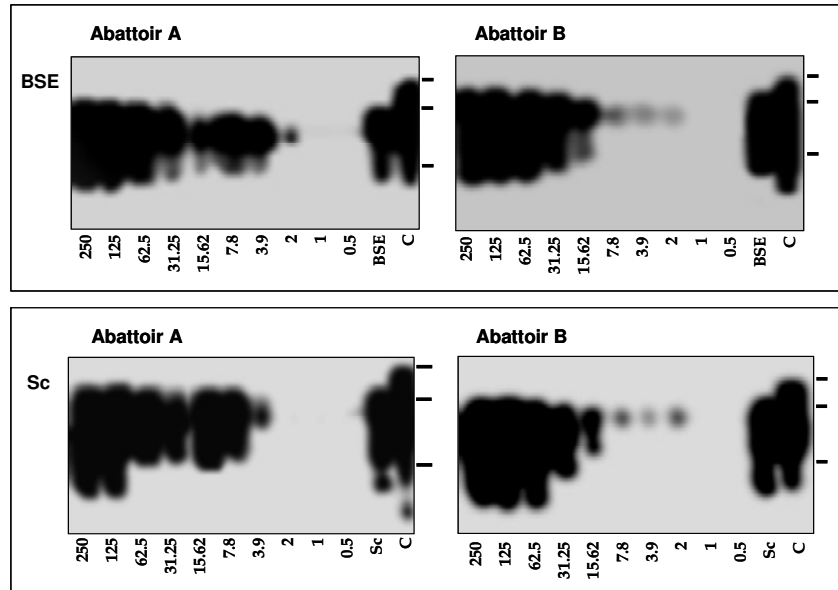


Fig. 3. Sensitivity curves for scrapie and BSE in sewage from abattoir A and B. Replicates of both sewage samples were serially spiked with 2-fold dilutions of scrapie and BSE-infected brain homogenates. Samples were processed and eluted into 100 μ l of LB. Five μ l of each, corresponding to 12.5 mg of sewage matter, were loaded onto WB in order to show protein amounts equivalent to 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8, 3.9, 2, 1, and 0.5 μ g of infected brain tissue approximately. Scrapie inocula (sc) and non-affected sheep brain (c) are also shown. The detection limits were established as 2 μ g for BSE and from 3.9 μ g to 2 μ g for scrapie.

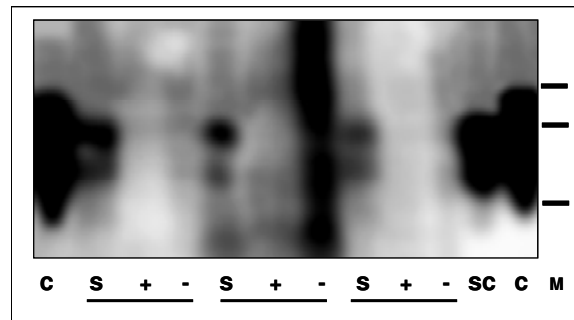


Fig. 4. Representative western blotting image of some slaughterhouse sewage samples analyzed for the presence of PrP^{Sc}. Three replicates for each sample were tested: without PK (-), with PK (+) and with PK but previously spiked with scrapie brain homogenate (s). PK-treated scrapie-affected brain (sc) and non-affected sheep brain (c) are shown, as well as a molecular marker ranging 35.1, 28.4 and 20.8 kDa.

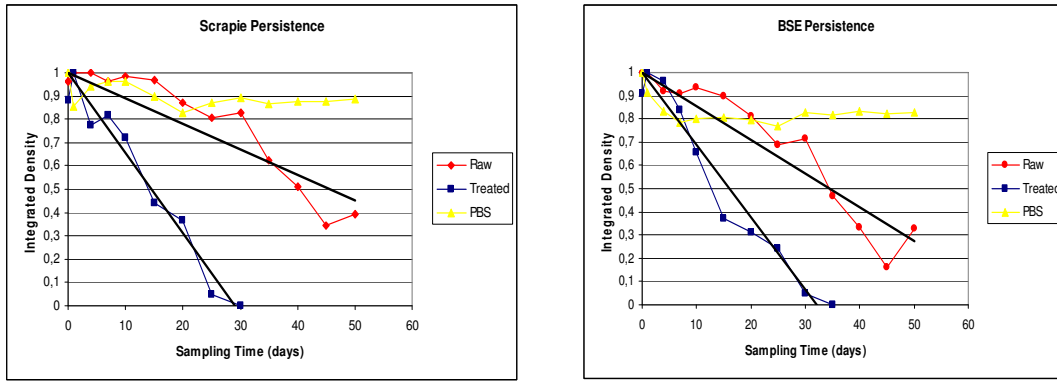


Fig. 5. Persistence of scrapie and BSE into raw and flocculated slaughterhouse wastewater samples. The graph shows the integrated density values of all 3 PrP^{Sc} bands within each well of the developed blots corrected to the highest measured value of a single sample. Five μ l were loaded for all the samples meaning t_0 values correspond to 0.250 mg of affected tissue.

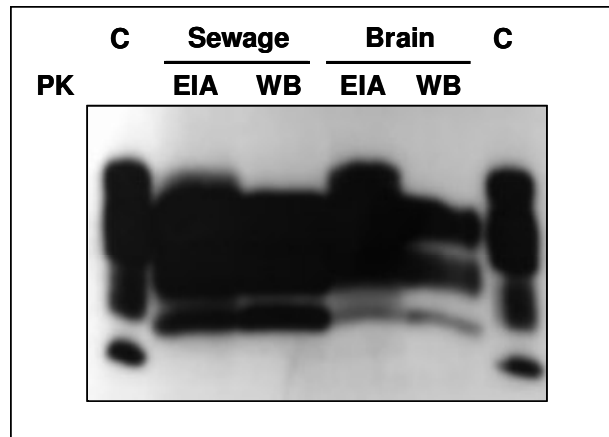


Fig. 6. Natural proteolytic activity of sewage on the prion protein. Scrapie-infected brain homogenate was spiked in sewage (Sewage) and in non-affected brain homogenate (Brain), so that PrP^{Sc} molecules were incubated in presence and absence of sewage. Then, two replicates of each were done and treated with PK in mild conditions (EIA, the PK concentration recommended in the Bio-Rad TeSeE EIA detection kit) and in stringent conditions (WB, the standard PK concentration widely used in western-blotting protocols). As it can be observed, using stringent levels of PK, only PK-resistant core is detected in sewage and also in brain, suggesting no effect of the sewage matrix. However, using mild levels of PK, PrP^{Sc} previously spiked in sewage is more intensely shifted in comparison to PrP^{Sc} spiked in brain or to untreated non-affected brain homogenates (c), clearly indicating that the N-terminal sequence of the prion protein is digested by the characteristic activity of sewage.

Capítol IV: Avaluació de l'excreció de prions en models murins

4.1. Antecedents i objectius

La transmissibilitat de les malalties priòniques per via oral ha estat àmpliament demostrada. En humans, rictus de canibalisme sobre individus infectats van donar lloc a l'epidèmia de Kuru en les illes de Papua-Nova Guinea (Alpers, 1987). L'aparició de la nova variant de MCJ té el seu origen en el consum d'aliments contaminats amb restes de l'agent causant de l'EEB (Wilesmith *et al.*, 1988), de la mateixa manera que l'aparició d'aquesta última sembla estar relacionada amb la supervivència dels agents causants de *scrapie* o d'una variant esporàdica d'EEB als tractaments de *rendering* aplicats en la fabricació de farines càrniques. No obstant, l'origen i el manteniment de l'epizootia del propi *scrapie* –el model prototípic de malaltia priònica animal, descrita fa més de 200 anys- continua sent una incògnita i moltes de les qüestions ja formulades durant el segle XIX no han estat encara resoltes.

A més de la transmissió per via oral, altres rutes de transmissió horitzontal han estat proposades per a explicar el manteniment de certes EET animals en determinades poblacions, sobretot en el cas de l'*scrapie* de petits ruminants i de la CWD de cèrvids. Existeixen moltes descripcions d'animals sans emmalaltits després de residir en zones on prèviament havien estat identificats casos d'*scrapie*, suggerint el paper del medi com a reservori de la malaltia (Grieg, 1940; Pálsson, 1979; Hourrigan, 1979). Aquesta possibilitat ha dut recentment a l'estudi de les dinàmiques d'adsorció de la PrP^{Sc} als components presents en el sòl i a la demostració que la seva capacitat infectiva es manté

invariable (Vasina *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006). Tot i aquestes evidències, no s'ha pogut determinar la font originària de prions que permeten la seva arribada i deposició en el medi. En aquest sentit, Andréoletti i cols. (2000) han demostrat la transmissió post-natal de l'*scrapie* a través de la placenta en ovelles, si bé aquesta via de contaminació explica un restringit grup de casos. En el cas de la CWD sembla que la placenta no presenta infectivitat, però, en canvi, la transmissió a través d'ambients contaminats amb femtes i carcasses d'individus afectats ha estat demostrada (Miller *et al.*, 2004). En un estudi més recent, però, no es va poder transmetre la malaltia en cérvols estabulats en contacte amb orines i femtes contaminades (Mathiason *et al.*, 2006).

La distribució dels prions en els teixits d'un individu infectat depèn del tipus, dosi i origen de la soca responsable de la infecció, així com la susceptibilitat genètica de l'hoste. Normalment, després d'una inoculació intraperitoneal o intravenosa s'observa una acumulació de PrP^{sc} en la melsa i en els nòduls limfàtics, seguida d'una invasió de la mucosa intestinal, la medul·la espinal i l'encèfal. Quan es produeix una administració intracerebral, també s'observa l'acumulació de PrP^{sc} en la melsa i els nòduls limfàtics, tot i que aquest fenomen sembla estar lligat al trencament de vasos sanguinis produïts inevitablement durant el procés d'inoculació (Radebold *et al.*, 2001). Després d'una administració oral, la PrP^{sc} es troba inicialment associada a les plaques de Peyer i als teixits GALT, especialment en l'íleon distal (Beekes *et al.*, 2000). Sembla que l'inòcul és capaç de traspasar la barrera epitelial gràcies a les cèl·lules M de l'intestí (Heppner *et al.*, 2001). Posteriorment, altres nòduls limfàtics i la melsa es veuen afectats abans d'arribar als teixits del SNC. Aquest patró de disseminació és vàlid per a l'*scrapie* d'ovelles (Heggebo *et al.*, 2002; Andréoletti *et al.*, 2000), l'*scrapie* adaptat a ratolins (Beekes *et al.*, 1998), la infecció experimental d'EEB en ovelles (Bradley, 1999), la MCC (Sigurdsson *et al.*, 1999) i la variant de la MCJ (Haik *et al.*, 2003), però no en canvi per a l'EEB en bovins, on l'infectivitat sembla estar restringida al SNC (Wells *et al.*, 1998).

La presència consistent d'infectivitat en la mucosa intestinal i, en general, en el tracte gastrointestinal ha estat àmpliament descrita i, fins i tot, estudiant les dinàmiques de propagació dels agents causants d'*scrapie* i EEB en models murins, Maignen i cols. (1999) van identificar PrP^{res} de forma continuada des de l'estómac fins al colon en el

cas d'*scrapie*, inclús quan les plaques de Peyer havien estat retirades dels teixits. La disseminació de PrP^{Sc} durant la incubació de CWD es produeix d'una manera semblant a la de l'*scrapie*, de manera que està present en gairebé totes les seccions del tracte gastrointestinal dels animals afectats (Williams, 2005). Tot aquest conjunt d'evidències sobre la distribució de prions en els teixits intestinals suggereix la possibilitat d'una excreció d'aquest agents en el medi a través del contingut fecal. Certament, al llarg del lumen intestinal es produeixen fenòmens d'exfoliació que podrien induir l'alliberament de cèl·lules infectades en l'excreta dels individus infectats.

La contribució indirecta de prions al medi per deposició podria ser, doncs, responsable de la contaminació dels ambients on han pasturat o han estat estabulats animals infectats i explicar els casos de transmissió observats en condicions naturals. Existeix una associació clara entre el nivell de disseminació que mostra l'agent infecciós en els hostes afectats i la contagiositat aparent de la malaltia. En el cas de l'*scrapie* i de la CWD, aquesta elevada transmissibilitat dificulta el control i l'eradicació d'aquestes patologies.

Tot i la importància de conèixer el rol que té l'excreció de prions en la propagació de les EET, en l'actualitat no existeixen estudis sobre la potencial presència i prevalença de prions en l'excreta d'animals infectats. En aquest treball s'ha avaluat, doncs, l'excreció de prions en femtes de models murins infectats tant per EEB com per *scrapie* mitjançant el desenvolupament d'una metodologia per a la detecció específica de PrP^{Res} validada en femtes d'ovella i de ratolí.

4.2. Materials i mètodes

4.2.1. Estudis d'immunoprecipitació

4.2.1.1. Virus i teixits infectats per EET

Un inòcul consistent en teixit encefàlic afectat d'*scrapie* homogeneïtzat al 20% (p/v) en PBS pH 7,4 complementat amb inhibidors de proteases (Roche) va ser cedit pel

Dr. Martí Pumarola (Laboratori PrioCat, Centre de Recerca en Sanitat Animal, CReSA, UAB). De la mateixa manera també es va homogeneïtzar teixit encèfalic no afectat d'ovella (20%).

D'altra banda, es va disposar d'un estoc d'adenovirus humà serotip 2 (HAdV2). Aquests virus havien estat crescuts en la línia cel·lular A549 i concentrats en un estoc de $8.28 \cdot 10^7$ partícules víriques per ml.

4.2.1.2. Anticossos i boles magnètiques

Es van estudiar 2 anticossos monoclonals anti-PrP, anomenats 15B3 i β S36, així com un anticòs comercial anti-adenovirus humans, anomenat 8052 (Sigma). El mAb 15B3 va ser obtingut de la casa comercial Prionics i es tracta d'una IgG que reconeix específicament la molècula de PrP^{sc} per mitjà d'un epítop conformacional format per 3 segments diferents de la molècula (Korth *et al.*, 1997). Per la seva banda, el mAb β S36 va ser cedit pel Dr. Jacques Grassi (*Comissariat a l'Energie Atomique*, CEA/Saclay, France) i es tracta d'una IgM d'epítop desconegut capaç d'immunoprecipitar selectivament la molècula de PrP^{sc}, però no la PrP^c (Morel *et al.*, 2004). La taula 8.21 de l'annex de Materials i Mètodes recull les informacions específiques de cadascun d'ells.

Es van avaluar dos estratègies de captura d'un determinat lligand mitjançant anticossos units a boles magnètiques (BM). Per una banda, molècules d'anticòs van ser unides a la molècula de biotina i el conjunt va ser acoblat a boles magnètiques recobertes amb estreptavidina. Per una altra, l'anticòs va ser directament lligat a boles magnètiques recobertes de grups sulfonil ester. Aquests grups provenen de l'activació dels grups hidroxil propis de la superfície de les boles amb clorur de *p*-toluè-sulfonil, de forma que els grups sulfonil ester resultants poden reaccionar covalentment amb qualsevol proteïna o lligand que contingui grups amino. Per aquest motiu, aquest tipus de boles magnètiques també s'anomenen boles *tosyl*-activades. Ambdós procediments es troben detallats en els apartats 8.12 i 8.13, respectivament, de l'annex de Materials i Mètodes.

4.2.1.3. Eficiència de la immunoprecipitació de virus

Per tal d'avaluar l'eficiència d'ambdues estratègies de captura, es va usar l'anticòs anti-adenovirus sobre un estoc viral conegut, de manera que les recuperacions van poder ser mesurades de forma ràpida i quantitativa mitjançant PCR quantitativa. Concretament, es va partir de 50 µl de l'estoc d'HAdV2 que van ser sotmesos a immunoprecipitació (IP) amb 20 µl dels dos tipus de BM lligades al mAb 8052. La mescla va ser incubada durant 2h a RT en agitació orbital. Posteriorment, la fracció aquosa va ser separada de les BM i aquestes es van rentar 3 cops amb PBS complementat amb BSA (0.1%) i, finalment, es van eluir en 50 µl d'aigua ultrapura. Els àcids nucleics de les partícules víriques capturades per les BM i els de les no capturades (restant en la solució aquosa), així com un control del mateix volum no sotmès a IP, van ser extrets mitjançant el protocol descrit en l'apartat 8.3 de l'annex de Materials i Mètodes. La solució d'àcids nucleics extrets de cada condició va ser mesurada mitjançant una PCR quantitativa basada en la tecnologia TaqMan® usant dos oligonucleòtids i una sonda fluorogènica específics per a adenovirus humans (apartat 8.14 de l'annex de Materials i Mètodes).

4.2.1.4. Eficiència i especificitat de la immunoprecipitació de PrP^{Sc}

Per als experiments d'immunoprecipitació de PrP^{Sc}, es va seguir de forma general el procediment descrit en l'apartat 8.16 de l'annex de Materials i Mètodes, introduint les modificacions que s'especifiquen a continuació. Concretament, per tal d'avaluar l'eficiència i l'especificitat dels mAbs anti-PrP^{Sc}, alíquotes de l'inòcul infectat d'*scrapie* i de l'inòcul normal, van ser processades amb un tractament intermedi de proteïnasa K (30 µg/ml durant 60 min a 37°C), amb un tractament intensiu (50 µg/ml durant 90 min a 37°C), o sense presència de PK. Després de realitzar la IP tant amb BM lligades al mAb 15B3 (BM-15B3) com al mAb βS36 (BM-βS36), rèpliques de les mostres tractades sense PK o amb el tractament intermedi van ser sotmeses al tractament intensiu amb PK, per tal de verificar si havien capturat PrP^{res}. Finalment, totes les condicions van ser desnaturalitzades en TC i analitzades per *western blotting* seguint el protocol detallat en l'apartat 8.19 de l'annex de Materials i Mètodes.

4.2.2. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en femtes animals

4.2.2.1. Teixits afectats per EET

Es van preparar inòculs (veure apartat 8.7, annex de Materials i Mètodes) consistents en homogeneïtzats de teixit encefàlic sa (homogeneïtzat negatiu, HN·Ove) i afectat d'*scrapie* (homogeneïtzat positiu scrapie, HP·Sc) al 20% (p/v) en glucosa 5% (p/v). De la mateixa manera, teixit encefàlic de vaca sana (homogeneïtzat negatiu, HN·Vaca) i de vaca afectada d'EEB (homogeneïtzat positiu EEB, HP·EEB) van ser també preparats. Aquests inòculs van ser usats en els experiments dissenyats per a desenvolupament d'una metodologia per a la detecció de prions en femtes animals. Tant en els teixits encefàlics d'ovella com en els de vaca, es va verificar que els nivells de PrP^c en els homogeneïtzats sans no fossin inferiors que en els homogenats afectats (apartat 8.10, annex de Materials i Mètodes).

D'altra banda, aquests inòculs van ser calibrats per densitometria respecte a dos inòculs de referència que havien estat prèviament titulats en termes de dosis infeccioses, tal com s'ha descrit en el capítol anterior. L'homogeneïtzat d'encèfal (20%, p/v) de la soca *Dawson* d'*scrapie* va ser cedit pel Dr. Olivier Andréoletti (*Institute Nationale de la Recherche Agronomique*, INRA/ENVT, Toulouse, France) i havia estat prèviament titulat en termes d'infectivitat per inoculació intracerebral (i.c.) en ratolins transgènics (Tg338) en $10^{7.5}$ DL₅₀ per gram de teixit. Per la seva banda, l'inòcul (20%, p/v) infectat d'EEB (Moynagh i Schimmel, 1999) va ser cedit pel Dr. Jacques Grassi (*Commissariat a l'Energie Atomique*, CEA/Saclay, France) i havia estat titulat en $10^{3.1}$ DL₅₀ i.c. en ratolí per gram de teixit.

4.2.2.2. Femtes animals

La metodologia per a la detecció de prions en femtes animals va ser desenvolupada per a l'anàlisi de mostres procedents de ratolins i d'ovelles. D'una banda, femtes d'ovelles adultes (de diferents edats), sense presentar símptomes de cap anomalia, procedents de diferents granges de Catalunya, van ser recollides i cedides per la Dra. Margarita Martin (CReSA, UAB). De l'altra, femtes de ratolins *balb/c*, de 3-4

setmanes d'edat, mantinguts sota alimentació estàndard, van ser recollides i cedides per la Dra. Karine Patient (*Institute Nationale de la Recherche Agronomique*, INRA, France).

4.2.2.3. Contaminació experimental i extracció de la PrP^{res}

Per tal de desenvolupar un mètode per a la detecció de PrP^{res} en femtes animals, es va establir una sèrie d'experiments de dopatge i recuperació en mostres procedents d'ovella i ratolí. De forma general, alíquotes de 0.125 g de les mostres van ser contaminades experimentalment amb l'inòcul HP·Sc i HN·Ove a raó de 30 µl d'inòcul 20% (p/v). Posteriorment, van ser incubades a RT durant un mínim de 15 min abans de procedir a l'aplicació de les condicions experimentals que s'especifiquen.

Inicialment, es va avaluar l'eficiència de l'extracció de la PrP^{res} inoculada en les mostres fecals. Per això, una sèrie de rèpliques van ser homogeneïtzades mitjançant un TeSeE-Precess (Bio-Rad) al 10% en PBS complementat amb diferents concentracions de detergents. Concretament, es van assajar concentracions d' SDS del 0.25 i 0.5%, de sarkosil (SK) del 1 i 2%, així com combinació d'ambdós (SK 2% + SDS 0.25%, SK 2% i SDS 0.5%). Alíquotes de 500 µl van ser aleshores processades d'acord amb el *Bio-Rad TeSeE-Purification kit* (apartat 8.9, annex de Materials i Mètodes), però complementant el tampó desnaturalitzant (solució A) amb 100 µg/ml de la solució de proteïnasa K. Els *pellets* finals van ser dissolts tant en tampó de resolució (solució C) per al posterior anàlisi amb el *Bio-Rad TeSeE-Sheep/Goat EIA Detection kit* (apartat E4, annex Material i Mètodes), com en tampó de càrrega (TC) per al posterior anàlisi per *western blotting* (apartat E6, annex Material i Mètodes).

4.2.2.4. Efecte de la proteïnasa K

Es va determinar l'efecte de la concentració de PK tant durant el procés de purificació dels SAF com directament durant el procés d'homogeneïtzació de la mostra. Així, mostres contaminades experimentalment amb HP·Sc van ser homogeneïtzades en PBS complementat amb concentracions de 0.25% i 0.5% d' SDS; una alíquota de cada tipus va ser incubada, a més, durant el procés d'homogeneïtzació a 37°C durant 30 min

per tal d'afavorir l'extracció. Tots els concentrats van ser aleshores dividits en 3 rèpliques que van ser purificades segons el *Bio-Rad TeSeE-Purification Kit* amb concentracions de PK de 100 µg, 50 µg i 0 µg per cada ml de tampó desnaturalitzant (solució A), i finalment analitzades per *western blotting* (apartat E6, annex Material i Mètodes).

D'altra banda, mostres contaminades amb HP·Sc van ser homogeneïtzades en PBS complementat amb 0.25% SDS i PK a diferents concentracions (mg/ml): 0.4, 0.2, 0.1 i 0. Diferents rèpliques van ser seguidament purificades segons el *Bio-Rad TeSeE-Purification Kit*, complementant el tampó desnaturalitzant (solució A) amb la mateixa concentració de PK usada per a cada mostra durant l'homogeneïtzació, excepte per a la mostra homogeneïtzada sense PK, sobre la qual es van establir 3 rèpliques que van ser purificades amb 100 µg, 50 µg i 0 µg PK per ml de tampó desnaturalitzant. Una mostra va ser contaminada amb HN·Ove i homogeneïtzada en PBS complementat amb SDS 0.25% i purificada sense PK. Els *pellets* finals de totes les mostres es van dissoldre en TC i van ser analitzats per *western blotting* (apartat 8.19 de l'annex de Materials i Mètodes).

4.2.2.5. Immunoprecipitació

La PrP^{res} extreta de les mostres fecals va ser precipitada mitjançant boles magnètiques lligades al mAb βS-36 introduint diferents modificacions sobre el protocol general per a homogeneïtzats encefàlics detallat en l'apartat 8.16 de l'annex Material i Mètodes. Així, mostres contaminades van ser homogeneïtzades en PBS complementat amb 2% SK, 1% SK, i 2% SK + 0.25% SDS, per a les tres mostres dopades amb HP·Sc, i amb PBS complementat amb 2% SK per a la dopada amb HN·Ove. Totes les solucions d'homogeneïtzació duien també 100 µg PK/ml tampó. Un cop aturada la reacció, aquests concentrats van ser immunoprecipitats prèvia dilució 1:5, 1:10 i 1:20 (v/v) en PBS.

Per tal de determinar l'eficiència de la tècnica d'immunoprecipitació respecte a la purificació dels SAF, una rèplica de cada concentrat va ser tractada segons el *Bio-Rad TeSeE-Purification Kit*. Per una altra banda, per tal de distingir l'efecte causat per la

matriu, es van sotmetre al protocol d'immunoprecipitació diferents alíquotes control d'inòcul que havien estat homogeneïtzades en les mateixes concentracions de detergents descrites anteriorment i que no contenien femta animal. Finalment, totes les mostres van ser desnaturalitzades en tampó C i analitzades mitjançant l'assaig immunoenzimàtic (EIA) descrit en l'apartat 8.17 de l'annex de Materials i Mètodes.

4.2.2.6. Interacció mAb-PrP^{res} en la matriu fecal

Es va establir la dinàmica de la interacció de l'anticòs β S36 a la PrP^{res} extreta a partir de femtes d'origen murí i oví. Mostres de femta murina i ovina contaminades amb l'inòcul de referència *Dawson* d'*scrapie* (20%) van ser homogeneïtzades en PBS complementat amb 2% SK, 0.25% SDS i PK (100 μ g/ml tampó). Un cop afegit el PMSF, fins a 7 rèpliques de 150 μ l de cada concentrat van ser diluïdes 1:10 (v/v) en PBS i sotmeses a immunoprecipitació d'acord amb el protocol descrit en l'apartat 8.16 de l'annex de Materials i Mètodes amb concentracions creixents (de 10 μ l fins 70 μ l) de boles magnètiques recobertes de β S36. Finalment, les boles magnètiques van ser desnaturalitzades en tampó de resolució i analitzades per EIA (apartat 8.17).

4.2.3. Sensibilitat del mètode de detecció

La sensibilitat del mètode definit es va analitzar per a femtes d'origen oví i d'origen murí. Sèries de 10 mostres (0.125 g) van ser contaminades experimentalment amb l'inòcul *Dawson* d'*scrapie* (20%) i l'inòcul HP-EEB (20%). Concretament, es van contaminar amb dilucions seriades 1:2 de cada inòcul des de 25 μ l fins a 0,05 μ l, de manera que es van afegir quantitats d'homogeneïtzat encefàlic equivalents a 5 mg (25 μ l) fins a 10 μ g (0.05 μ l). Totes les mostres van ser processades d'acord al protocol desenvolupat i optimitzat al llarg de tots els experiments de dopatge i recuperació descrits, fins a ser eluïdes en tampó de càrrega i analitzades per *western blotting* (apartat 8.19 de l'annex de Materials i Mètodes). Així, aquest protocol es basa en,

1. en un tub *ribolyzer* que contingui boles de ceràmica, diluir les mostres (0.125 g) al 10% (p/v) en PBS complementat amb SK (2%), SDS (0.25%) i PK (100 μ g/ml),

2. homogeneïtzar-les en un TeSeE[®] Precess (Bio-Rad),
3. incubar les mostres 5 min a 37°C i, després d'un petit pols de centrifugació, recuperar la fase aquosa per aspiració en xeringues de diàmetre 25
4. inactivar la proteïnasa K amb PMSF a concentració final de 3mM,
5. diluir 150 µl del concentrat 1:10 (v/v) amb PBS,
6. afegir 50 µl de la solució de boles magnètiques lligades a βS36 (concentració inicial de la solució 2·10⁹ BM/ml),
7. incubar la barreja 2h a temperatura ambient en agitació orbital,
8. disposar els tubs en un iman durant 1 min i retirar la fase aquosa,
9. rentar dos cops les boles magnètiques amb 1 ml de PBS complementat amb Tween20 (0.1%),
10. eluir les boles amb 50 µl de tampó de càrrega sense agents reductors i incubar 5 min a 100°C,
11. disposar la barreja en l'iman 1 min i analitzar la fase aquosa (12.5 µl) per *western blotting*.

4.2.4. Anàlisi de mostres

4.2.4.1. Ratolins infectats oralment

En el laboratori del Dr. Juan Maria Torres (CISA, INIA), ratolins transgènics BoTg110 que sobreexpressen la PrP^c bovina (Castilla *et al.*, 2003) van ser infectats oralment per via intragàstrica amb 50 µl d'EEB al 10% (p/v) (n=3) o 50 µl de la soca *Langlade* d'*scrapie* al 10% (p/v) (n=3). Mostres fecals de cadascun dels animals van ser recollides al cap de 24h, 48h, 72h i 96h, i disposades en forma de *pool* d'acord al moment de recollida i l'inòcul administrat i, finalment, conservades a -80°C. , un per als ratolins EEB i un altre per als ratolins *Langlade*. Un cop passades 96h, els ratolins van ser sacrificats i els intestins dividits segons duodè, jejú i íleum, i conservats a -80°C. Es van recollir també mostres fecals de ratolins no inoculats i ratolins *knock-out* per a *prnp*.

4.2.4.2. Ratolins incubant *scrapie*

Per tal d'avaluar l'excreció de prions en animals terminals, es va dur a terme en el CISA la inoculació intracerebral de ratolins transgènics Tga20 que sobreexpressen PrPc murina (Fischer *et al.*, 1996) de 90 dies d'edat (n=4) amb 20 µl d'homogeneïtzat encefàlic 20% (p/v) de la soca 22L d'*scrapie* (Kim *et al.*, 1990). Els ratolins van ser observats diàriament i el seu estat va ser avaluat setmanalment per a més de 10 paràmetres neurològics tal com ha estat prèviament descrit (Castilla *et al.*, 2003). Quan la presència de malaltia fou evident, els ratolins van ser sacrificats per raons ètiques seguint les recomanacions del comitè d'ètica del centre. Diverses mostres (femtes, duodè, jejú, íleum) van ser aleshores recollides i conservades a -80°C.

4.2.4.3. Anàlisi de mostres de femta i intestins

Les mostres fecals van ser analitzades per IP seguint el protocol descrit en l'apartat 4.2.3. d'aquest capítol amb algunes petites modificacions per tal d'incrementar al màxim la sensibilitat de la detecció. Una quantitat de 0.2 g de matèria fecal va ser homogeneïtzada al 10% en tampó d'homogeneïtzació i una alíquota de 500 µl d'aquest concentrat va ser purificada per IP mediada per BM-βS36 (1 µl de BM per cada µl de mostra) i concentrada a 100 µl de tampó de càrrega, dels quals 25 µl van ser analitzats per *western blotting* (apartat 8.19 de l'annex de Materials i Mètodes).

Alíquotes de 500 µl de les mostres d'intestins van ser purificades d'acord amb el *Bio-Rad TeSeE Purification kit* i concentrades a 50 µl de tampó de càrrega, tal com està descrit en l'apartat 8.9, i, finalment, analitzades per *western blotting* (apartat 8.19).

4.3. Resultats

4.3.1. Estudis d'immunoprecipitació

Es van avaluar dues estratègies de captura d'un determinat lligand mitjançant boles magnètiques (BM). La primera estratègia es basa en la unió biotina-estreptavidina, de manera que l'anticòs prèviament biotinitat s'uneix a molècules d'estreptavidina

presentes en la superfície de les boles magnètiques. En la segona, l'anticòs s'uneix directament a les boles magnètiques que estan recobertes de grups sulfonil ester activats idonis per unir proteïnes. Tots dos sistemes van ser assajats usant un anticòs monoclonal comercial no relacionat amb la PrP^{sc}, concretament un mAb anti-adenovirus. Un estoc d'HAdV2 va ser, aleshores, immunoprecipitat usant els dos tipus de BM (en proporcions similars) i l'eficiència de la captació va ser mesurada per PCR quantitativa. Considerant el total de virus presents com la suma dels retinguts per les BM i els restants en la fase aquosa, es van establir eficiències d'un 71.40 % i d'un 87.20 % de recuperació per a les boles recobertes d'estreptavidina i de grups sulfonil ester, respectivament. Tot i que aquests valors són relatius i s'hauria d'establir un major nombre d'assajos per establir-los com a significatius, les diferències observades es poden considerar generades en el procés físic d'acoblament i fixació del mAb a les BM, degut al fet que es va usar un mateix mAb i un mateix inòcul. En aquest sentit, partint de la mateixa quantitat d'anticòs, el major nombre de passos necessaris per l'acoblament del mAb a les boles recobertes per estreptavidina (biotinilació del mAb i unió a estreptavidina) pot conduir a una menor eficiència expressada en la recuperació de genomes de partícules víriques capturades.

Principalment a causa de la menor necessitat de manipulació, les boles magnètiques *tosyl*-activades van ser utilitzades per establir l'eficiència i l'especificitat de la immunoprecipitació mediada per dos mAb utilitzats en la bibliografia per capturar PrP^{sc} procedent d'homogeneïtzats de teixit encefàlic (Korth *et al.*, 1997; Morel *et al.*, 2004). Per aquest motiu, boles magnètiques lligades a tots dos anticossos (BM-15B3 i BM-βS36) van ser sotmeses a IP sobre l'homogeneïtzat d'*scrapie* no tractat amb proteïnasa K (assaig de l'especificitat del mAb), tractat amb una concentració baixa de PK (assaig de l'especificitat del mAb en condicions favorables) i tractat amb una concentració elevada de PK (assaig de l'eficiència de la IP). De la mateixa manera, es va sotmetre a IP l'homogeneïtzat d'ovella no tractat i prèviament tractat amb la concentració de PK més elevada. Els resultat obtinguts es mostren en la figura 4.1.

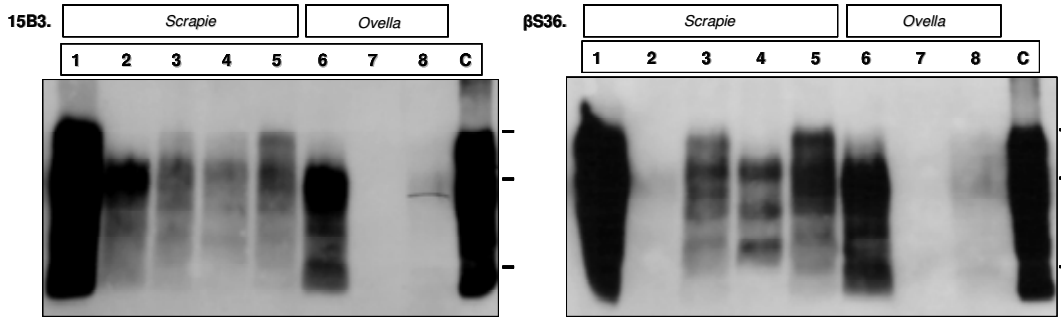


Fig. 4.1. Immunoprecipitació mediada per l'anticòs 15B3 o β S36 sobre homogeneïtat d'*scrapie* i homogeneïtat d'ovella sana. Els dos inòculs van ser immunoprecipitats en absència de PK: la meitat del contingut capturat per les BM va ser analitzada directament (carrils 1 i 6) i l'altra meitat tractada amb PK i analitzada (carrils 2 i 7). De la mateixa manera, la meitat del contingut capturat en la IP de l'homogeneïtat d'*scrapie*, prèviament tractada amb una concentració baixa de PK, va ser analitzada directament (carril 3), mentre l'altra meitat va ser tractada amb PK (carril 4). Per últim, ambdós inòculs tractats amb PK van ser immunoprecipitats i analitzats (carrils 5 i 8). Es mostra també homogeneïtat d'encèfal sa no tractat (C) i un marcador de bandes corresponents a 35.1, 28.4 i 20.8 kDa.

D'acord amb els resultats obtinguts, cap dels dos anticossos va mostrar-se específic per a la PrP^{Sc}, doncs ambdós van immunoprecipitar PrP en l'inòcul procedent d'un encèfal d'ovella no afectat d'EET. Quan es va aplicar un tractament amb PK posterior a la IP, la senyal corresponent va desaparèixer en els dos casos, indicant clarament que ambdós mAbs van immunoprecipitar PrP^C.

De la mateixa manera, cap dels dos anticossos pot ser considerat selectiu per a PrP^{Sc} en un homogeneïtat encefàlic no tractat amb PK. En aquestes condicions, el tractament amb PK posterior a la IP demostra que les molècules capturades corresponen majoritàriament a PrP^C i que tan sols una petita part correspon a PrP resistent a PK. Tot i això, el mAb 15B3 presenta una major eficiència en aquestes circumstàncies respecte al mAb β S36, que gairebé no precipita PrP^{res}. Aquesta situació canvia considerablement en realitzar un pretractament dels inòculs amb una concentració suau de PK, és a dir, en eliminar una proporció del contingut en PrP^C dels homogeneïtzats. La selectivitat de la immunocaptura per a PrP^{Sc} incrementa, aleshores, notablement en ambdós casos, ja que el tractament amb PK posterior a la IP revela que pràcticament la totalitat de les molècules capturades correspon a PrP^{res}. No obstant, en aquestes condicions, l'eficiència de la IP mediada per β S36 és força superior a la mediada per 15B3 que és, a més, inferior a la mostrada en inòculs no tractats prèviament amb PK. Finalment,

l'eficiència comparativa de la IP mediada per cada mAb es va poder mesurar tractant els inòculs abans de la IP amb una concentració de PK suficient per eliminar la gran majoria de PrP^c present en els homogeneïtzats. Així, les molècules precipitades corresponen a PrP^{sc}, tal com confirma el fet que gairebé no existeix senyal en la IP dels inòculs no infectats sota aquestes condicions. En aquest cas, el mAb β S36 va mostrar-se altre cop més eficient que el mAb 15B3.

Tenint en compte que cap dels anticossos es va mostrar específic per a la conformació patògena, l'increment de l'eficiència de la IP en inòculs sotmesos a PK és lògica en tant que el tractament amb PK elimina un competidor directe. La diferència de comportament del mAb 15B3 (menor eficiència en inòculs tractats prèviament amb PK) i del mAb β S36 (menor eficiència en inòculs no tractats amb PK) suggereix que l'especificitat i eficiència de la immunoprecipitació de PrP^{sc} depèn en alta mesura de la tècnica i les condicions emprades en la mateixa, més que no pas de l'especificitat intrínseca dels anticossos.

4.3.2. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en femtes animals

El desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en femtes presenta tot un seguit de dificultats associades a la pròpia matriu. Aquesta és insoluble i presenta gran quantitat de fibres de cel·lulosa i altres polímers biològics als quals la conformació patògena de la PrP^{sc} té tendència a unir-se. L'extracció de la PrP^{sc} està, doncs, condicionada a la dissociació de la molècula d'aquesta matriu. Per aquest motiu, inicialment es va testar l'extracció amb solucions d'homogeneïtzació que contenien detergents forts, com ara SDS. Els homogeneïtzats resultants van ser purificats mitjançant el *Bio-Rad TeSeE Purification kit* i analitzats mitjançant el *Bio-Rad TeSeE EIA Detection kit*. Els resultats negatius obtinguts en les lectures d'absorbància fetes amb aquest test (dades no mostrades) indicaven que, o bé, s'havia produït la pèrdua de la diana de l'anticòs de captura usat en el test EIA, o bé, la PrP^{sc} no era extreta de la matriu fecal en nivells detectables. Els resultats obtinguts per *western blotting* (Fig. 4.2) van demostrar, en canvi, que les 3 glicofomes de PrP^{res} es podien extreure de la matriu sense que s'alterés el patró de migració final i que aquesta extracció no semblava, a més, ser massa dependent de la concentració de detergent aplicada.

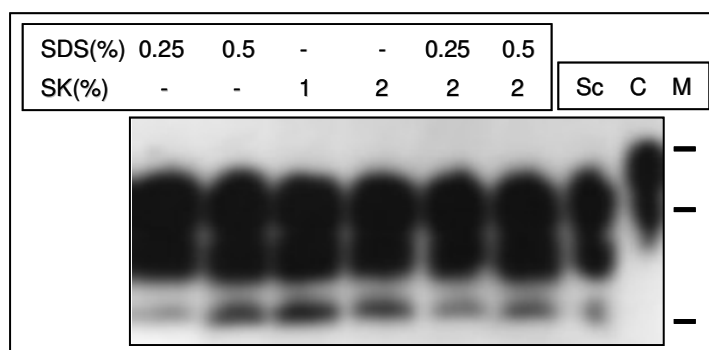


Fig. 4.2. Extracció de PrP^{res} mitjançant detergents a partir de mostres de femta d'ovella contaminades experimentalment amb *scrapie*. S'indiquen les concentracions de detergents (SDS i sarkosil (SK)) aplicades en les solucions d'homogeneïtzació. La figura mostra també homogeneïtzat encefàlic infectat i tractat amb PK (Sc), homogeneïtzat sa no tractat (C) i les bandes del marcador de pes molecular (M) corresponents a 35.1, 28.4 i 20.8 kDa.

Per tal d'optimitzar l'extracció de PrP^{res} de la matriu fecal, algunes alíquotes eluïdes amb diferents concentracions de SDS van ser sotmeses a una incubació a 37°C i tractades amb diferents concentracions de proteïnasa K (Fig. 4.3). Ni la concentració del detergent ni la incubació amb calor van semblar induir una millora en els nivells de recuperació. Però, en canvi, la recuperació de PrP^{res} sí que va augmentar a mesura que s'incrementava la concentració de PK aplicada, des de 0 µg fins a 100 µg/ml. Aquest comportament és típic de l'extracció amb proteases en teixits biològics: la quantitat de PrP^{res} extreta incrementa fins a una concentració determinada de PK, a partir de la qual disminueix a causa de la seva degradació. No obstant això, en el nostre experiment, la PK no s'afegia inicialment en la solució d'extracció, sinó posteriorment un cop la mostra havia estat homogeneïtzada i filtrada a través de xeringues de diàmetre 25. L'increment en la recuperació només s'explica, doncs, pel pas a través de la xeringa de petits fragments de fibres i/o biopolímers als quals la PrP^{sc} queda retinguda i dels quals s'allibera posteriorment gràcies al tractament amb proteïnasa K. D'altra banda, el fet que les rèpliques no tractades amb proteïnasa K mostressin ja el nucli PK-resistent de 27-30 kDa característic de la PrP^{res} suggeria l'existència d'una elevada activitat proteolítica en les mostres fecals analitzades, de manera que tant el contingut en PrP^c propi de l'inòcul afegit, així com els extrems amino-terminals de les molècules de PrP^{res}, eren degradats.

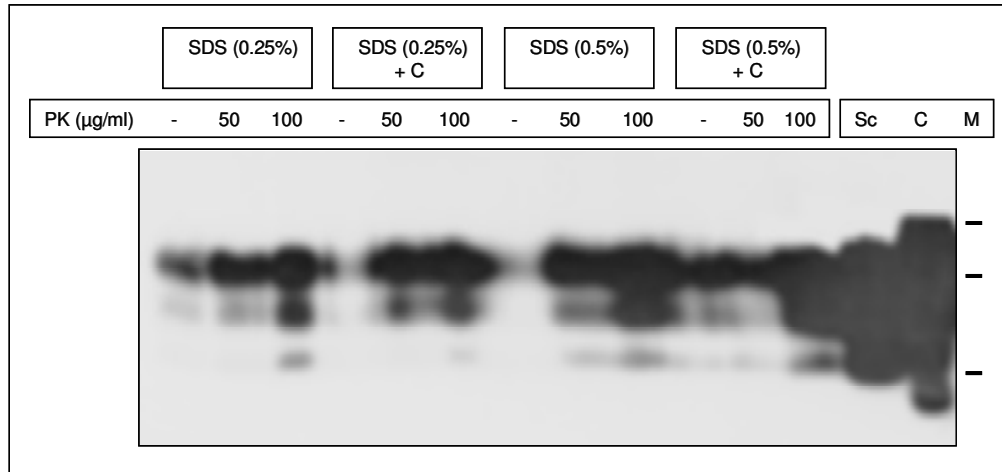


Fig. 4.3. Extracció de PrP^{res} en femtes contaminades amb *scrapie* utilitzant solucions d'extracció amb diferents concentracions d'SDS i PK. S'indiquen les concentracions de detergents (%) i de proteïnasa K (µg/ml) aplicades en les solucions d'extracció. La marca C indica que van ser sotmeses a calor (30 min 37°C) La figura mostra també homogeneïtzat encefàlic infectat i tractat amb PK (Sc), homogeneïtzat sa no tractat (C) i les bandes del marcador de pes molecular (M) corresponents a 35.1, 28.4 i 20.8 kDa.

Per tal de determinar en quin moment i quina concentració de proteïnasa K afavoria més l'extracció de PrP^{res}, diferents alíquotes de femta ovina van ser tractades amb combinacions de PK aplicades directament en la solució d'extracció o amb posterioritat en el tampó desnaturalitzant del *Bio-Rad TeSeE Purification kit* (Fig. 4.4). Els resultats van confirmar l'increment en la recuperació de PrP^{res} en augmentar la concentració de PK en el tampó de desnaturalització (solució A) posterior a l'homogeneïtzació de la mostra, si bé aquest increment s'aturava a 100 µg/ml. Curiosament, l'increment de la dosi de PK en la solució d'extracció no va repercutir en una millor extracció de la PrP^{res} i no es van observar diferències entre intervals de PK des de 100 µg/ml fins a 400 µg/ml. El tampó d'homogeneïtzació usat en aquestes mostres consistia en PBS complementat amb 0.25% SDS i cal destacar que l'ús de nivells elevats de PK en un tampó que contenia SDS no van provocar una reducció de la senyal de PrP^{res}. El detergent SDS presenta una elevada capacitat per desnaturalitzar proteïnes i es capaç de produir la solubilització i la pèrdua de la capacitat de resistència a PK de les proteïnes prioniques (Riesner *et al.*, 1996). El fet que l'ús d'SDS i SK a baixes concentracions no provoquin una reducció en el títol de PrP^{res} està en acord amb estudis anteriors (Prusiner *et al.*, 1980).

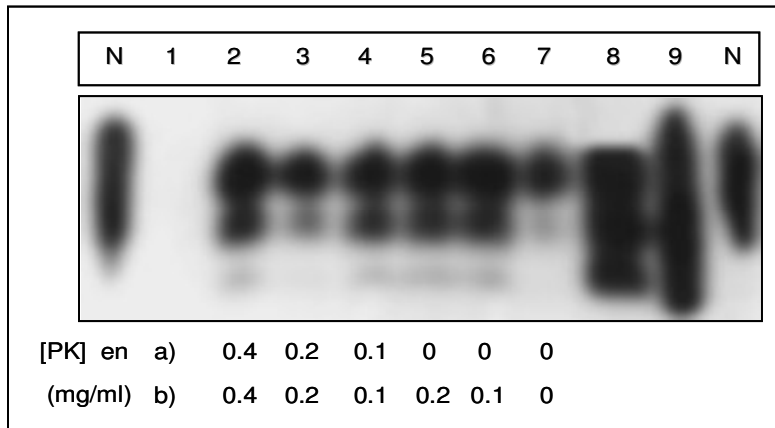


Fig. 4.4. Efecte de diferents concentracions de proteïnasa K aplicades tant en la solució d'extracció (a) com en el tampó de desnaturalització del *TeSeE Purification kit* (b), sobre l'extracció de PrP^{res} en femtes contaminades amb *scrapie*. La PrP^{res} de diferents rèpliques d'una mateixa mostra contaminada amb l'inòcul HP·Sc va ser extreta amb PBS complementat amb SDS (0.25%) i PK (concentracions indicades sota el film) (carrils 2 a 7). Una mostra contaminada amb l'inòcul HN·Ove va ser també processada amb aquesta solució d'extracció sense presència de PK (carril 1). L'inòcul HP·Sc processat directament segons el *TeSeE Purification kit* es mostra en el carril 8 i el mateix inòcul desnaturalitzat i carregat directament en WB sense tractament previ es mostra en el carril 9. Es mostra també homogeneïtzat sa no tractat (N).

En aquest experiment, es va fer també evident la no supervivència de la isoforma cel·lular de la proteïna priònica en les femtes. Aquest fenomen es va sospitar en les rèpliques tractades sense proteïnasa K on no s'observava el contingut en PrP^c inherent a l'inòcul afegit. No obstant, això es va confirmar en observar la manca de PrP^c en les mostres dopades directament amb l'inòcul HN·Ove, que, a més, presentava un major contingut en PrP^c tal com s'havia determinat amb anterioritat.

Se sap que sovint en els inòculs vells la isoforma cel·lular de la PrP es trenca i que la isoforma patògena pot inclús arribar a perdre el seu extrem amino-terminal. Per tal de verificar que no era aquest el fenomen que estava succeint, es va incloure en la figura 4.4 un carril que consistia en l'homogenat d'encèfal positiu directament desnaturalitzat en tampó de càrrega i analitzat per *western blotting*. El patró de migració obtingut incloïa els pesos moleculars de totes les glicofomes de PrP sense que s'inferís la possibilitat de fenòmens d'autòlisi en els inòculs, de manera que la degradació de la PrP^c i la pèrdua del fragment amino-terminal de la PrP^{sc} es produïa durant la incubació de les mostres. L'acció proteolítica de la matriu fecal sobre els inòculs processats en absència de PK demostra, al mateix temps, que tot l'inòcul estava en contacte amb la

matriu durant el procés de dopatge i que no s'estaven detectant agregats de prions aïllats pel propi procés experimental.

La purificació de prions en femtes basada en el *Bio-Rad TeSeE-Purification Kit* havia permès demostrar que la isoforma patògena de la proteïna priònica era extraïble de la matriu fecal; però, tot i la modificació de diversos paràmetres com ara la concentració i el tipus de detergents o els nivells de proteïnasa K, les eficiències de recuperació resultants no eren prou elevades. Els estudis previs d'immunoprecipitació havien mostrat una alta eficiència i selectivitat en la captura de PrP^{Sc} per part de l'anticòs β S36 en inòculs mostrant una reduïda càrrega proteica, en especial de PrP^C. Aquestes eren exactament les condicions en què es trobaven els inòculs afegits en mostres fecals, degut a l'acció proteolítica de la pròpia matriu. Així, es va analitzar l'eficiència d'aquesta tècnica en la recuperació de PrP^{res} a partir de femtes dopades. Es van combinar diferents solucions d'extracció que van ser posteriorment diluïdes en diversos graus per facilitar la interacció amb el mAb β S36. En la figura 4.5, es mostren els resultats obtinguts en una placa d'ELISA recoberta de l'anticòs 11C6.

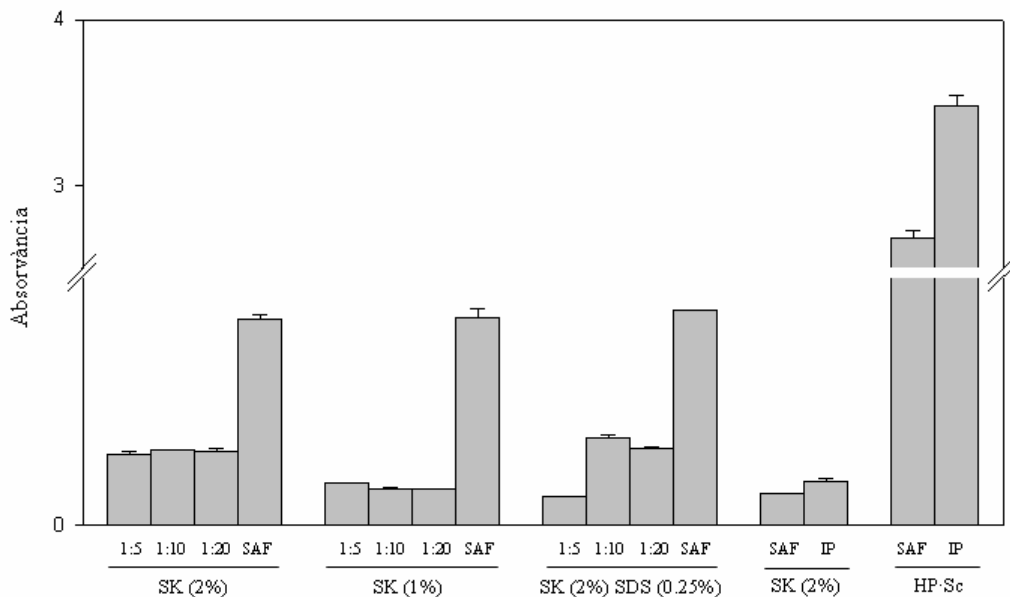


Fig. 4.5. Recuperació de PrP^{res} en femtes ovines mitjançant IP mediada per β S36. Mostres fecals contaminades amb l'inòcul HP·Sc i homogeneïtzades amb solucions contenint els detergents indicats, a més de PK (100 μ g/ml solució) van ser sotmeses a IP després de diluir-les en PBS (factors de dilució indicats) o analitzades per purificació dels SAF (columnes SAF). Així mateix, l'inòcul HN·Ove va ser afegit en mostres fecals i analitzat mitjançant IP i purificació dels SAF. Per últim, l'inòcul HP·Sc va ser directament analitzat mitjançant IP i purificació dels SAF sense haver estat afegit en mostres fecals.

Els assajos control d'IP i de la purificació dels SAF (*TeSeE[®] Purification kit*) sobre l'inòcul HN·Ove van donar resultats negatius, amb unes lectures de DO pràcticament iguals que es poden considerar com el *background* propi de les mostres fecals. Per contra, la IP mediada per β S36 sobre l'inòcul HP·Sc va proporcionar recuperacions molt elevades de PrP^{sc}. De fet, aquesta IP recupera tota la PrP^{sc} existent en una mostra concreta de teixit encefàlic, que no és pas la obtinguda mitjançant la purificació dels SAF. En aquest experiment, aquesta última tècnica va recuperar un 77.5% respecte el total recuperat per IP.

No obstant, en analitzar les mostres fecals dopades amb HP·Sc, la major recuperació es va produir en homogeneïtzar les mostres amb la solució que contenia 2% sarkosil i 0.25% SDS i en diluir 1:10 (v/v) el concentrat obtingut, és a dir, quan la IP es va produir en PBS amb una concentració de sarkosil de 0.2% i una de SDS de 0.025%. En la matriu fecal, la presència de SDS en concentracions superiors clarament afecta l'estabilitat del mAb, però la seva presència en 0.025% sempre va reportar valors més elevats de captura de PrP^{res} en relació a la mateixa solució d'extracció sense SDS. De manera semblant, concentracions de sarkosil inferiors al 0.2% final van suposar un descens considerable en la immunocaptura. Per la seva banda, la purificació dels SAF en les mateixes mostres va proporcionar resultats similars independentment de la solució d'extracció aplicada, confirmant el que ja s'havia observat en els experiments d'extracció amb detergents analitzats per WB (Fig. 4.2). El procediment de purificació dels SAF va mostrar, a més, lectures de DO doblement superiors a les de les mostres IP indicant que la viabilitat de l'aplicació de la tècnica d'immunoprecipitació requeria l'anàlisi de volums de fins a 3 cops superiors de mostra inicial.

En totes les mostres HP·Sc que havien estat dopades en femta s'hi va observar clarament l'efecte de la matriu fecal. De forma especial, en les mostres purificades per IP els valors obtinguts en femtes no foren més que el 10% dels obtinguts en absència de femtes. Aquest fet podia tractar-se d'un fenomen metodològic causat, per exemple, per una activitat proteolítica residual suplementària en les femtes que afectés l'anticòs, o bé a la presència d'inhibidors de la interacció antigen-mAb. Per tal de determinar-ho, es van realitzar experiments d'IP aplicant un nombre creixent de boles magnètiques sobre diferents alíquotes de mostres fecals d'origen oví i murí.

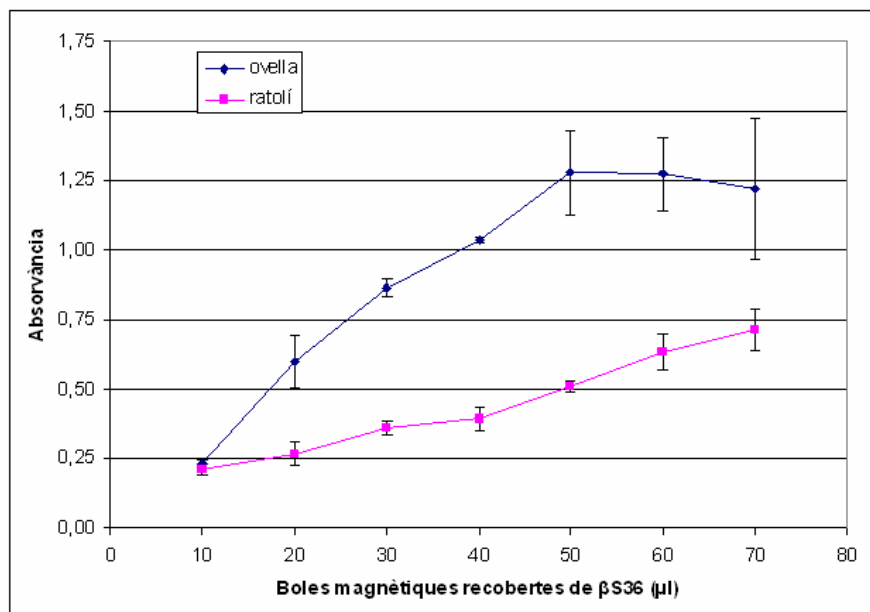


Fig. 4.6. Interacció del mAb β S36 amb la PrP^{res} en la matriu fecal.

L'increment de la concentració de boles magnètiques recobertes d'anticòs de captura va suposar un increment proporcional en la recuperació de PrP^{res} , tal com es mostra en la Fig. 4.6. Aquest fenomen es va produir en ambdós tipus de femtes animals, però amb dinàmica diferent. En les femtes ovines, l'increment va ser més pronunciat, definit per una regressió lineal d'equació $y = 0.0253x + 0.6566$ ($R^2 = 0.98$), amb límit en els 50 μ l de boles. Per cada 10 μ l de BM aplicades, l'eficiència de la IP s'incrementà un 20%. La màxima recuperació es va obtenir aplicant 50 μ l ($2 \cdot 10^7$ BM- β S36) per a cada 150 μ l de concentrat contenint 3.6 μ l de l'inòcul de la soca *Dawson* (20%) d'*scrapie*.

Per contra, en les femtes murines, l'increment va ser de pendent més suau, definit per una regressió lineal de $y = 0.0085x + 0.6877$ ($R^2 = 0.98$), sense mostrar un límit màxim de recuperació. Per cada 10 μ l de boles magnètiques aplicades, la millora de l'eficiència de la IP va ser d'un 14.25%. Així doncs, les millors condicions per a la immunocaptura de PrP^{res} en les femtes va ser un *ratio* μ l de boles magnètiques / μ l de concentrat d'1:2 per a les femtes murines, i de 1:3, per les femtes ovines.

D'altra banda, la mateixa quantitat d'inòcul va ser directament analitzada sense ser sotmesa al procés de dopatge i recuperació. Tenint en compte el valor obtingut, les eficiències de recuperació per a les mostres fecals van poder ser estimades en 70% per

les mostres fecals ovines i en 40% per a les mostres fecals murines. Aquesta última dada no sembla estar gaire en consonància amb els resultats proporcionats en el test de sensibilitat (veure més endavant), on la sensibilitat del test en la detecció de la soca *Dawson* d'*scrapie* fou lleugerament millor en femtes de ratolí que en femtes d'ovella. Aquesta aparent discordança podria estar causada per la inhibició de la detecció de PrP^{res} en el assaig immunoenzimàtic per la presència d'algun component propi de la matriu fecal murina, que, al contrari, no afectaria la detecció en la tècnica de *western blotting*.

4.3.3. Sensibilitat del mètode de detecció

Arrel de les dades obtingudes en els experiments de dopatge i recuperació, es va descriure un mètode de detecció de PrP^{res} en femtes d'origen animal. En general, les mostres eren homogeneïtzades i tractades amb proteïnasa K, alhora que diluïdes per a la posterior immunoprecipitació, i la PrP^{res} capturada era aleshores desnaturalitzada i analitzada per *western blotting*.

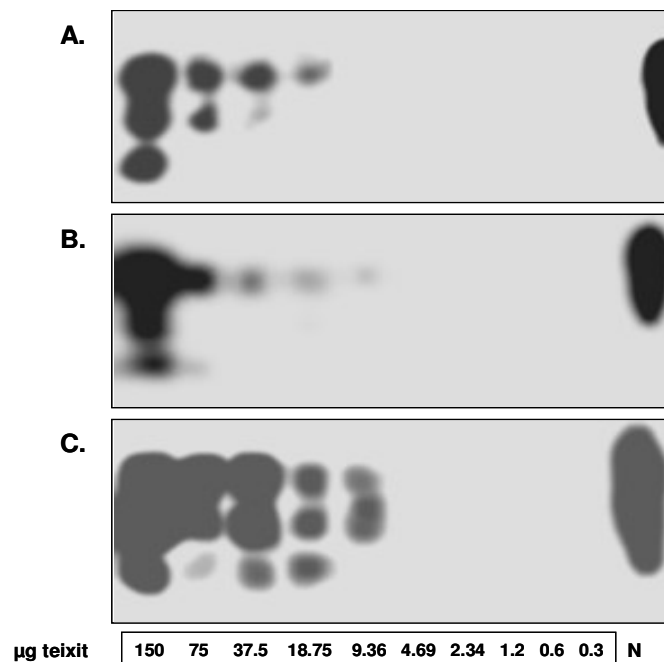


Fig. 4.7. Sensibilitat del mètode de detecció per a femtes d'ovella contaminades amb la soca *Dawson* d'*scrapie* (A) i amb l'inòcul HP-EEB (B), així com per a femtes de ratolí dopades amb la soca *Dawson* d'*scrapie* (C). S'indiquen les quantitats equivalents de teixit encefàlic analitzats en el gel de WB. Es mostra també homogeneïtzat d'encèfal sa no tractat (N).

La sensibilitat d'aquest procediment va ser avaluada en femtes d'ovella i femtes de ratolí. En la Fig. 4.7 es mostra com, en les femtes d'ovella, el mètode de detecció va recuperar, aproximadament, l'equivalent a 18.75 µg de teixit d'encèfal afectat de l'inòcul *Dawson* d'*scrapie* i de l'inòcul HP·EEB. En les femtes de ratolí, el test va detectar l'equivalent a 9.375 µg de l'inòcul *Dawson* d'*scrapie*. La sensibilitat teòrica del test podia haver estat augmentada carregant el doble (25 µl) de la mostra final en els gels de WB (veure secció 'Sensibilitat del mètode de detecció' en Material i Mètodes), tal com es va fer en l'anàlisi de les mostres reals. Això suposa establir els llimars de detecció del test en 9.375 µg de teixit afectat d'*scrapie* i d'EEB en 7.5 mg de material fecal oví, i en 4.69 µg de teixit afectat d'*scrapie* en 7.5 mg de material fecal murí. Val a dir, que en el cas d'haver usat els ratios µl BM / µl concentrat òptims de detecció per a femtes murines (1:1), la sensibilitat de la tècnica hagués incrementat en un 30%, aproximadament.

L'inòcul *Dawson* havia estat prèviament titulat en termes d'infectivitat, de manera que la sensibilitat del mètode pot expressar-se també com a dosis letals 50 intracerebrals en ratolí (ic DL₅₀). Així, el test va detectar 10^{2.47} ic DL₅₀ en mostres fecals ovines i 10^{2.17} ic DL₅₀ en mostres fecals murines. En el cas de l'inòcul HP·EEB, aquest havia estat calibrat respecte a un inòcul EEB prèviament quantificat també en termes de dosis letals 50 intracerebrals murines (veure Materials i Mètodes), de manera que la sensibilitat per a EEB en femtes ovines es va determinar en 1.18·10⁻² i.c. DL₅₀.

4.3.4. Anàlisi de mostres

Un cop el mètode de detecció havia estat validat, es va estudiar l'excreció de PrP^{res} que tenia lloc en ratolins inoculats oralment amb inòculs infecciosos. Es van analitzar mostres fecals de ratolins no inoculats (BoTg) i de ratolins infectats amb l'inòcul EEB i l'inòcul *Langlade* durant un període de 96h, tal i com es mostra en la Fig. 4.8.

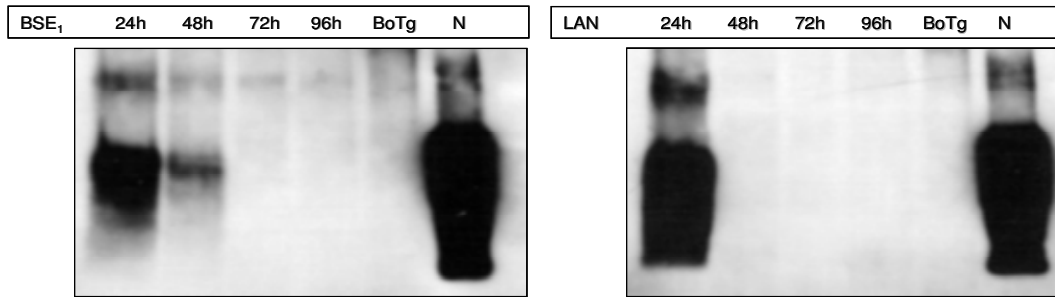


Fig. 4.8. Patró d'excreció de PrP^{res} en ratolins infectats amb l'inòcul EEB (BSE₁) i la soca *Langlade* d'*scrapie* (LAN) durant les 96h posteriors a la inoculació. Es mostren les femtes de ratolins transgènics no infectats genèticament idèntics als anteriors (BoTg), així com homogeneïtzat sa no tractat (N).

Les mostres procedents dels ratolins no inoculats no van mostrar cap senyal, però, en canvi, es van observar les bandes de les 3 glicofomes de PrP^{res} en les mostres afectades d'*scrapie* recollides a les 24h post-inoculació i en les mostres afectades d'EEB recollides a les 24h i a les 48h post-inoculació. Les senyals detectades mostraven de forma consistent les 3 glicofomes habituals de PrP^{res} sense que s'inferís cap modificació proteolítica addicional causada pel pas a través del tracte intestinal. Aquest resultat assegurava la fiabilitat i el bon funcionament de la metodologia en mostres fecals reals i permetia l'estudi del patró d'excreció en ratolins pre- o simptomàtics. Les diferències observades en el patró d'excreció de l'inòcul EEB respecte al del *Langlade* són difícilment causades per variacions metabòliques entre els animals, ja que es van analitzar *pools* de 3 individus en cada cas. És cert, tanmateix, que es va analitzar una part aleatòria de la deposició dels ratolins, de manera que tan sols l'anàlisi de la totalitat del material excretat hagués permès determinar patrons comparables entre totes dues soques.

Per una altra banda, un cop recollides les mostres fecals, els animals van ser sacrificats i els teixits intestinals van ser analitzats per tal d'estudiar la hipotètica acumulació prematura de prions en aquesta zona. En cap cas es va observar presència de proteïna priònica resistent en aquestes mostres, tot i que, aproximadament, 60 mg ± 20 van ser processats i que l'equivalent a 6 mg va ser analitzat per *western blotting* (dades no mostrades).

Es va estudiar, aleshores, la potencial excreció de PrP^{res} en femtes de ratolins infectats amb alguna EET que es trobessin en estadis terminals. Així, ratolins infectats

amb la soca 22L d'*scrapie* van ser sacrificats en el moment de mostrar els primers símptomes clínics de la malaltia i, tant el contingut fecal com els diferents teixits intestinals, van ser analitzats per a la presència de PrP^{res} (Fig. 4.9). Pel que fa a les femtes, no es va detectar PrP^{res} en els 12.5 mg de matèria fecal analitzada per a cada individu.

Contràriament, les mostres procedents dels intestins d'aquest ratolins van mostrar-se positives a la detecció de PrP^{res}. Tots els individus van presentar acumulació de PrP^{res} en el tracte intestinal, si bé el grau d'acumulació que mostraven van ser bastant diferents. Així, mentre els animals Tg04 i Tg05 van mostrar bandes clares de PrP en totes les seccions del tracte gastrointestinal en major o menor proporció, l'animal Tg02 només va presentar acumulacions en el jejú i l'animal Tg06 tan sols en el duodè de forma residual.

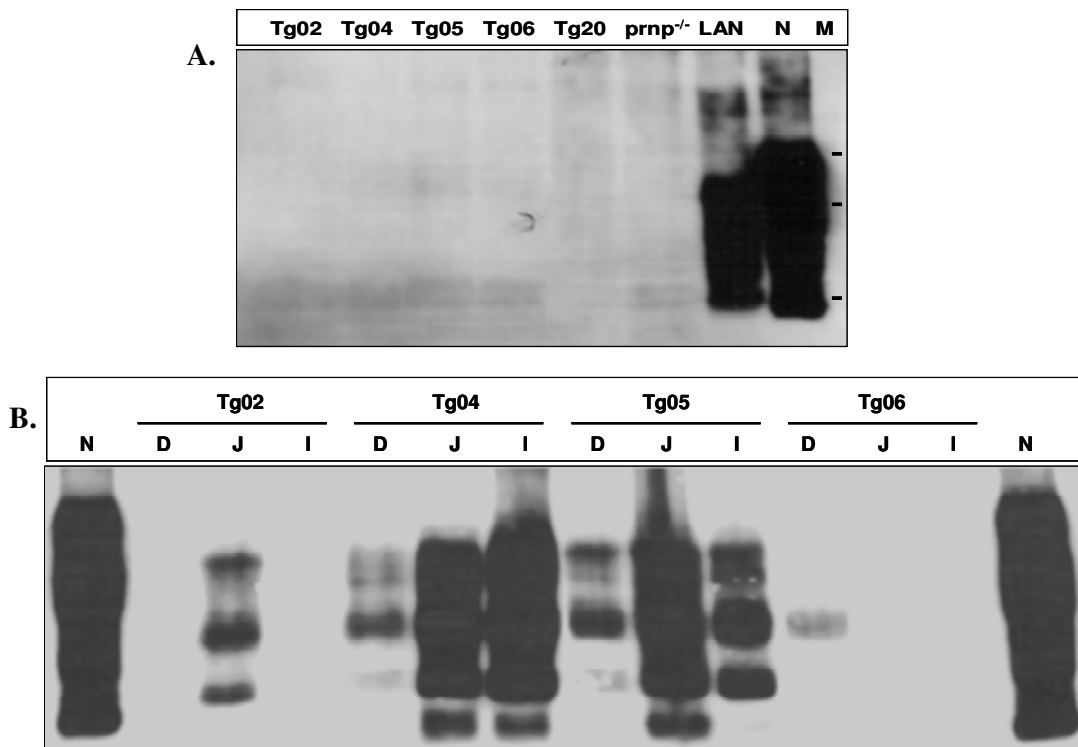


Fig. 4.9. Anàlisi de la presència de PrP^{res} en el contingut fecal (A) i en els teixits intestinals (B) de ratolins (n=4) infectats oralment amb la soca 22L d'*scrapie*. En la part superior es mostra les femtes de 4 ratolins infectats amb *scrapie* (Tg02-Tg06), de ratolins no infectats genèticament idèntics als anteriors (Tg20), de ratolins transgènics deficients pel gen *prnp* (*prnp*^{-/-}) i del *pool* de ratolins infectats amb la soca *Langlade* (LAN). En la part inferior es mostren les mostres de teixits intestinals (D, duodè; J, jejú; I, íleon) de cadascun dels animals infectats amb la soca 22L. La figura mostra també homogeneïtzat sa no tractat (N), així com marcador molecular (M) de pesos corresponents a 35.1, 28.4 i 20.8 kDa.

4.4. Discussió

La conformació rica en làmines β confereix a la isoforma patògena de la proteïna priònica característiques bioquímiques úniques, completament diferents a les que confereix la conformació rica en hèlix α . La resistència al tractament amb proteases és potser la propietat bioquímica més destacada degut al seu ús extensiu en les proves ràpides de detecció. No obstant, l'estructura en làmina β confereix també una elevada capacitat d'agregació a les molècules PrP^{sc}, tant entre elles per formar fibres conegudes com SAF com per adherir-se a la matèria particulada en certes condicions. La forta adhesivitat dels prions ja ha estat demostrada per a material quirúrgic (Taylor, 2000) o en certs ambients (cas de minerals argilosos en el sòl) (Johnson *et al.*, 2006), sense perdre, a més, la seva capacitat infectiva. En el cas de les femtes, la considerable presència de fibres de cel·lulosa i/o polímers biològics d'altra natura provoca que aquest fenomen s'intensifiqui en la matriu fecal.

Aquest comportament, la insolubilitat pròpia de les femtes i l'elevada dilució de la potencial infectivitat en grans volums de mostra són alguns dels factors metodològics que han dut als investigadors a considerar la matriu fecal com un medi no apte per a estudis moleculars de laboratori. En aquest treball, es reporta una mètode molecular que demostra que els prions són detectables en mostres fecals contaminades experimentalment i en mostres fecals d'animals inoculats oralment, és a dir, després d'haver traspasat tot el tracte gastrointestinal. En termes generals, aquest mètode es basa en una homogeneïtzació de les mostres en solucions complementades amb detergents i una immunoprecipitació de la PrP^{res} extreta, per a un posterior anàlisi mitjançant *western blotting*. L'extracció de prions requereix la presència de detergents capaços de solubilitzar, sense induir degradació de les molècules de PrP^{res}. Així, concentracions d'SDS properes a la concentració crítica micel·lar (~0.24%) van ser utilitzades (Riesner *et al.*, 1996), sense que la variació de les concentracions en aquest rang suposés modificacions destacables en el rendiment de l'extracció. Això indica que una part de la PrP^{sc} queda invariablement segrestada en la matriu fecal, limitant l'eficiència del mètode.

Per tal de permetre un anàlisi de quantitats substancials de mostres fecals, es va adaptar la tècnica d'immunoprecipitació mediada pel mAb β S36 a aquest tipus de matriu. El mAb és una IgM d'epítot no identificat, generat en ratolins immunitzats contra la PrP recombinant murina plegada en conformació β . D'acord amb els estudis de Morel i cols. (2004), dos aspectes van ser considerats com rellevants. En primer lloc, aquest mAb no immunoprecipita PrP^c en homogeneïtzats d'encèfal d'ovella sana no tractats. Els resultats obtinguts en aquest estudi (Fig. 4.1) semblen contradir aquest punt, car PrP sensible al tractament amb PK procedent d'inòculs ovins no tractats va ser capturada i detectada per WB. Val a dir, no obstant, que, tot i que el protocol d'IP emprat era molt similar al descrit en el citat estudi, la tècnica usada (boles magnètiques) proporciona una superfície d'interacció dispersa i molt activa que afavoreix interaccions de baixa afinitat.

En segon lloc, els SAF poden ser immunoprecipitats selectivament i eficient per aquest mAb. Aquesta consideració ha estat confirmada en els nostres experiments realitzats sobre homogeneïtzats encefàlics prèviament tractats amb PK, on les molècules de PrP capturades corresponien a PrP^{res}. En la matriu fecal, l'aplicació d'aquesta tècnica va topiar amb la presència de competidors, tal com es va verificar en el test d'interacció entre el mAb i la PrP^{sc}. De fet, s'ha vist que la immunoprecipitació mediada per β S36 no involucra el punt d'unió a l'antigen del mAb (paràtop) sinó, més aviat, la fracció constant de l'anticòs (Morel *et al.*, 2004). Això suposa que altres molècules, no necessàriament de natura proteica, puguin interaccionar i coprecipitar en la IP. Aquest efecte inhibidor pot ser moderat per l'eliminació directe del competidor (cas de la proteòlisi de PrP^c per tractament amb PK en inòculs infectats) o bé, incorporant més superfície d'interacció (cas d'afegir més boles magnètiques). En el cas de la matriu fecal, la identificació i posterior eliminació de les molècules competidores és realment difícil i requereix un estudi minucios que sobrepassa l'objectiu d'aquest treball. Es va optar, aleshores, per establir el ratio òptim de BM necessàries per immunoprecipitar la major quantitat de PrP^{res} prèviament extreta de mostres fecals murines i ovines. En aquestes últimes es va determinar un *plateau* en la recuperació de PrP^{res}, però, tenint en compte que les quantitats de BM aplicades van ser completament arbitràries, un *plateau* semblant hagués pogut ser assolit per a les mostres fecals murines.

Inicialment, la sensibilitat del mètode es va valorar en femtes animals contaminades experimentalment. El mètode es va mostrar específic i amb una eficiència més lligada al tipus de matriu fecal que a la soca de prions utilitzada. Posteriorment, la validesa del test es va analitzar en mostres fecals procedents de ratolins que havien estat inoculats oralment. També en aquest cas, el mètode va detectar prions de forma específica, doncs en els experiments de WB tan sols es van observar les bandes corresponents a les glicofomes de PrP. Cal destacar que l'especificitat en la detecció de PrP^{res} a partir de la matriu fecal va ser curiosament considerada tenint en compte l'abundant quantitat de proteïnes presumiblement presents en aquest tipus de mostres. Així, tres criteris van ser establerts: la capacitat de resistència al tractament amb proteïnasa K, la immunoprecipitació amb el mAb β S36 i, sobretot, la immunoreactivitat amb l'anticòs SHa31 en *western blotting*, que estava covalentment unit a l'enzim peroxidasa per tal d'evitar l'ús d'anticossos secundaris capaços de produir reaccions creuades amb immunoglobulines excretades en les femtes.

D'acord amb els resultats obtinguts en ratolins infectats amb *scrapie*, no existeix una excreció de prions en les femtes en els estadis finals de la malaltia. Tot i que el nombre d'individus estudiats fou baix, tots els animals mostraven acumulacions de PrP^{res} en el tracte intestinal (algun d'ells, inclús, en totes les seccions) i, possiblement també, en altres seccions com el recte o el colon, no analitzades en aquest estudi. Aquestes deposicions podien estar relacionades amb la presència de plaques de Peyer i nòduls limfàtics propis del sistema nerviós entèric que no havien estat retirats dels teixits prèviament. No obstant, deposicions de PrP^{res} han estat ja descrites en enteròcits desproveïts de plaques de Peyer (Maignen *et al.*, 1999). La presència de prions en el tracte alimentari donava lloc a la possibilitat d'una excreció paral·lela de PrP^{res} en el contingut fecal degut a processos d'exfoliació i altres vies de secreció. Aquesta manca de correlació pot estar causada per la quantitat inicial de material analitzat, o bé per una degradació proteolítica causada per la microbiota inherent al tracte alimentari.

Recentment, Scherbel i cols. (2006) han demostrat *in vitro* que el contingut gàstric del rumen i del colon de bestiar boví és capaç de reduir els títols de PrP^{res} a nivells indetectables en un termini inferior a 20h. Tenint en compte que el *bolus* alimentari requereix aproximadament 24h per recórrer el tracte gastrointestinal en vaques, aquestes dades posen en dubte l'arribada d'infectivitat a l'íleon distal (regió

proposada majoritàriament com la porta d'entrada dels prions en l'organisme) i ha portat als autors a considerar la llengua com a possible via d'entrada. D'acord amb els resultats obtinguts en aquest estudi, és evident que existeix una activitat proteolítica destacable en les femtes que dona lloc a la degradació, per exemple, de la isoforma de la proteïna priònica cel·lular, però aquesta no és suficientment forta com per comportar la degradació de la isoforma patògena que arriba a ser excretada en les femtes dels animals. És cert que el tracte gastrointestinal dels ratolins, en tant que monogàstrics, té una estructura i una capacitat proteolítica diferent respecte al tracte gastrointestinal dels remugants. No obstant, també és cert que la contribució de prions al lumen intestinal en aquest últim cas és quantitativament superior, car els processos d'exfoliació i descomposició afecten un tracte intestinal més llarg. Tal com declaren els mateixos autors, el model de degradació *in vitro* pot no representar les condicions reals, principalment per la manca de l'efecte protector de les femtes. Certament, els virus i altres agents patògens són excretats en títols alts en les femtes i, tot i que resisteixen els processos d'inactivació de forma suficient com per ser transmesos per la ruta oral-fecal, cap d'ells mostra l'estabilitat i resistència que presenten els prions. A més, aquest efecte protector es deu en gran part a la seva adhesió a la matèria particulada, una característica que destaca enormement en la molècula de PrP^{Sc}. Prenent en consideració, doncs, que prions inoculats oralment arriben a ser excretats en el contingut fecal en ratolins, l'íleon distal és aparentment en models murins el punt més lògic d'entrada dels prions en l'hoste, tal com ha estat suggerit per molts autors (Beekes *et al.*, 2000; Andreoletti *et al.*, 2000; Heppner *et al.*, 2001) i fa improbable, doncs, que en altres models animals aquesta ruta d'infecció estigui substituïda per altres com ara la llengua.

L'excreció de prions en animals inoculats oralment planteja la possibilitat d'una excreció de prions després de la ingesta d'aliments contaminats. És pràcticament impossible determinar les dosis d'agents infecciosos ingerits per un individu en condicions naturals. En alguns estudis de patogènesi sobre EEB, s'ha estimat que l'equivalent a 100 g de teixit encefàlic infectat haurien estat consumits pels animals afectats, ja que els períodes d'incubació observats concordaven amb els descrits durant l'epidèmia d'EEB viscuda a la Gran Bretanya (Grassi *et al.*, 2001). La deposició de prions en aquestes circumstàncies sembla bastant raonable. De la mateixa manera, es podria produir una excreció de prions en animals portadors d'EET que patissin alteracions en el seu tracte intestinal, com ara abrasions o processos inflamatoris.

Aquestes condicions són especialment reproduïbles en animals salvatges i animals de granja en contacte directe amb patògens. Així, prions dipositats per via fecal podrien contaminar el medi i aquest reservori ser determinant per a la propagació de les EET en condicions naturals. Aquests processos podrien tenir una rellevància encara major en llocs tancats, com ara granges, que permetin un contacte més proper entre els individus en si i entre ells i el medi que els envolta.

Totes aquestes consideracions són sempre quantitativament més importants en tractar de soques d'EET amb una alta capacitat de disseminació en els teixits perifèrics del individu afectat. En aquest sentit, la transmissió horitzontal a través del medi ha estat àmpliament suggerida com a explicació del contagi individu a individu en EET com ara l'*scrapie* i la CWD (Miller *et al.*, 2004). La contaminació per la descomposició de carcasses o per excreta procedent d'individus infectats ha estat considerada com la via més probable de contribució d'infectivitat al medi. Tanmateix, en un estudi recent, s'ha detectat presència d'infectivitat en la saliva, però no en les femtes, d'individus afectats de CWD posant en dubte, doncs, les consideracions anteriors (Mathiason *et al.*, 2006). Des d'un punt de vista quantitatiu, no obstant, les femtes són l'única font potencial capaç de propagar els prions de forma substancial i en àrees considerables com per ser responsables de la transmissió de la malaltia entre individus. Les dades obtingudes en aquest estudi mostren absència de prions en femtes d'animals infectats tot i presentar acumulacions considerables dels mateixos en teixits entèrics. Tanmateix, aquestes dades han de ser complementades amb l'anàlisi d'un nombre major d'individus avaluant el possible comportament diferencial de diverses soques causants d'EET.

4.5. Annex: *Shedding of prions in mice stool after ingestion of scrapie and BSE agents*

Shedding of prions in mice stool after ingestion of scrapie and BSE agents

Carlos Maluquer de Motes¹, Jacques Grassi², Stephanie Simon², Maria Eugenia Herva³,
Juan Maria Torres³, Marti Pumarola⁴ and Rosina Girones^{1*}

Environmental transmission of transmissible spongiform encephalopathies is difficult to prove. Contamination by faeces of infected animals remains the major potential source accounting for the spread and transmission of prion diseases through the environment. In this work, a new methodology has been established for the reliable detection of prions in animal stool samples. By a detergent-based extraction and an immunoprecipitation step, PrP^{res} from brain homogenates spiked in sheep and mice faeces was specifically detected with a sensibility ranging approximately from 5-10 µg of tissue according to the inoculum used. In order to analyze shedding of prions by infected animals, stools collected from mice orally infected with BSE and scrapie were processed and PrP^{res} was identified in the 24-48h after ingestion. On the other hand, faeces from terminally-sick scrapie-incubating mice were also studied. No prions were detected even though enteric tissues of these animals were shown to contain considerable amounts of PrP^{res}.

¹ Department of Microbiology, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, Barcelona 08028, Spain.

² CEA, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, 91191 Gif-sur-Ivette Cedex, France.

³ Centro de Investigacion en Sanidad Animal, CISA-INIA, Ctra. Algete a El Casar, sn, Valdeolmos 28130, Madrid, Spain.

⁴ PRIOCAT Laboratory, CReSA, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain.

*Corresponding author. Telephone number: +34 934021483. Fax number: +34 934039347. E-mail:

rgirones@ub.edu

Introduction

Prion diseases, or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), are neurological disorders affecting both humans and animals which invariably lead to neurodegeneration and death. Among others, prion diseases include Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and kuru in humans, and scrapie in sheep, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and chronic wasting disease (CWD) in mule deer and elk. The linkage between BSE and the new variant of CJD (vCJD) (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997) is in large part responsible for the enormous efforts done for understanding the unique biology of these illnesses. This relatively heterogeneous group of disorders has a similar pathology limited to the central nervous system (CNS) and they are experimentally transmissible to other species. Biochemically, they are mainly characterized by the conversion of the normal cellular prion protein (PrP^c) to a partially protease-resistant prion isoform (PrP^{sc}) which accumulates mainly in brain tissues forming readily detectable protein aggregates. The proteinase K treatment of PrP^{sc} removes its N-terminal part and the remaining C-terminal fragment is called PrP^{res}. In general terms, PrP^{sc} presence correlates with infectivity (Bolton et al., 1982; Bueler et al., 1993) and it is considered the only direct molecular marker for TSE (Muramatsu et al., 1994; Farquhar et al., 1996). PK treatment is a common previous step in TSE detection tests, as few monoclonal antibodies (mAbs) have been described for distinguishing PrP^{sc} from its partner PrP^c (Korth et al., 1997; Paramithiotis et al., 2003; Curin et al., 2004; Zou et al., 2004).

Transmission of prions is still poorly understood. While prions are not typically communicable, they are transmissible per orally and parenterally (Weissmann et al., 2002). The kuru epidemic that affected New Guinea tribes was spread out by ritualistic cannibalism of CNS-derived tissues (Alpers, 1987). The apparition of vCJD is thought to be caused by the consumption of BSE prion-contaminated foodstuff. Likewise, the BSE epidemic that emerged in the mid-1980 was caused by the

feeding of prion-contaminated meat-and-bone meal (MBM) to cattle (Wilesmith et al., 1988). However, the source of the original infectious prions is not known. Scrapie, the prototypic model for prion diseases, has been diagnosed since more than 200 years ago, but some of the questions that had already been formulated in the 19th century, such as the transmission routes involved, remain still unanswered. Many evidences suggest the existence of an environmental reservoir of infectivity that contributes to scrapie epizootics (Grieg, 1940; Pálsson, 1979; Hourigan, 1979). Indeed, prions have been shown to persist for years in some environments (Brown and Gajdusek, 1991; Pálsson, 1979). More recently, some works have assessed the adsorption patterns of PrP^{sc} to soil components and the levels of infectivity retained (Vasina et al., 2005; Johnson et al., 2006). Although the source of contamination has not been established, scrapie-infected placenta and an early lateral post-natal transmission have been suggested (Andréoletti et al., 2002), which is in compliance with previous observations arguing strongly for maternal transmission (Hoinville et al., 1996; Elsen et al., 1999). It is worth noting that direct contact have been also reported in some cases (Woolhouse et al. 1998).

Horizontal transmission has been also proposed for sustaining cervid CWD epizootics in North-America (Miller and Williams, 2003). Certainly, Miller et al. (2004) have reported that CWD can be maintained through residual environmental infectivity from excreta and decomposed carcasses. Moreover, recent identification of cross-species events could underlie this environmental pathway (Johnson et al., 2006). Curiously, the placenta has been excluded as a source of contamination (Spraker et al., 2002). The presence of infectious prions in the saliva and blood of CWD-affected deer has been lately described, thus increasing the routes implicated in CWD dissemination (Mathiason et al., 2006). In the same study, urine and faeces were reported as no containing prion infectivity, though further research is still ongoing to

discern their importance in the spread of the disease.

Tissue distribution of prions in affected individuals considerably depends on the type, dose and origin of the strain applied, as well as the genetic background of the host. Normally, after an intraperitoneal (ip) or intravenous (iv) inoculation a primary PrP^{sc} accumulation is observed in spleen and lymph nodes, which is followed by an invasion of the intestinal mucosa, the spinal cord and the brain. An early infectivity is also detected in the spleen and lymph nodes after intracerebral (ic) inoculation, although it is probably caused by the experimental manipulation (Radebold et al., 2001). After oral administration, PrP^{sc} is initially found in Peyer's patches and in gut-associated lymphoid tissues (GALT), especially in the distal ileum (Beekes et al., 2000). Then, other lymph nodes and spleen are invaded, before reaching brain tissues. This pattern of prion deposition is true for mice scrapie (Beekes et al., 1998), sheep scrapie (Heggebo et al., 2002; Andréoletti et al., 2000), experimental BSE in sheep (Bradley, 1999), CWD (Sigurdsson et al., 1999) and vCJD (Haik et al., 2003), but not in BSE in cattle where PrP^{res} accumulation almost limits to SNC (Wells et al., 1998; Buschmann and Groschup, 2005). It is not known how prions reach the immune system from the gut lumen, but membranous epithelial cells (M cells) have been proposed as the mucosal entry via transepithelial transport (Heppner et al., 2001).

In a study of the scrapie and BSE propagation by the oral route, Maignen et al. (1999) reported that the digestive tract was found to be positive for PrP^{res} from the stomach to the colon in the scrapie model only, including the ileum after removal of the Peyer's patches. Detection of PrP^{res} in rectal mucosa of scrapie has also been described (Espenes et al., 2006; Gonzalez et al., 2006), and its accumulation in lymphoid tissues increases as scrapie progresses (Andréoletti et al., 2000). Deposition of extraneural PrP^{res} also occurs during CWD incubation in a manner that closely resembles scrapie (Williams 2005). Such many evidences for prion distribution particularly in GALT suggest the shedding of infectivity to the environment contributing to

the horizontal transmission reported in natural conditions. Certainly, the more disseminated the prion agents are in affected individuals, the more contagious seems to be the pathology, as scrapie and CWD exemplifies. Whether prion-contaminated stools are substantially involved in the environmental spreading of TSE merits investigation (Weissmann et al, 2002).

Excretion of prions by urine has been demonstrated in mice suffering from lymphocytic nephritis (Seeger et al., 2005), but not in animals or humans classically incubating prion disorders (Serban et al., 2004; Furukawa et al., 2004; Head et al., 2005). However, studies of prion excretion in faeces have been hampered so far by the insolubility and the volume of material to be tested (Maignen et al., 1999; Miller et al., 2004). In the present work, we describe the development of a sensitive and specific methodology for the detection of the protease-resistant prion protein (PrP^{res}) in mice and sheep stool samples, and the subsequent analysis of different prion-infected animal faeces.

Material and Methods

TSE-affected tissues

For the development of a methodology for PrP^{res} detection in stool samples, scrapie-infected and BSE-infected, as well as non-affected, brain samples were homogenized (20%) in glucose 5% using a TeSeE Precress (Bio-Rad) and used for all the experiments reported.

In addition, a pool of brains infected by the Dawson strain and previously titrated in terms of infectivity by intra cerebral inoculation (i.c.) in transgenic mice (tg338) was kindly provided by Olivier Andreoletti (INRA/ENVIT, Toulouse, France). Titer was $10^{7.5}$ LD₅₀/g of tissue i.c. Another BSE-affected brain homogenate titrated as containing $10^{3.1}$ mouse i.c. LD₅₀/g of tissue (Moynagh and Schimmel, 1999) was also used. These inocula were calibrated to the non titrated ones by densitometry (see below).

Animal stool samples for methodological assays

Detection of prions was developed on mice and sheep stool samples. Pooled faecal samples from healthy ewes were collected and kindly

provided by Margarita Martín (CReSA, UAB, Spain). Pooled faecal samples from healthy mice were collected and kindly provided by Karine Patient (INRA, France). For the methodological assays, samples (0.125 g) were typically spiked with 30 μ l of brain homogenates (20%) and kept for 15 min at room temperature to allow prions adsorb the matrix, prior to application of experimental conditions.

Stool samples from experimental mice

BoPrP-Tg110 mice (Castilla et al., 2003) overexpressing bovine PrP were intragastrically inoculated with either 50 μ l of 10 % homogenate of BSE (n=3) or 50 μ l of 10% homogenate Langlade scrapie strain (n=3). Faeces from each animal were collected from the cage after 24, 48, 72, and 96 h post-inoculation and were pooled according to the moment of collection and the inoculum administered and subsequently stored at -80°C. Stool samples from non-inoculated mice and PrP-knock out mice were also collected.

On the other hand, Tga20 transgenic mice that overexpress murine PrP^c (Fischer et al, 1996) 90 days old (n=4) were intracerebrally inoculated with 20 μ l of a 10% homogenate in PBS of scrapie 22L strain (Kim et al, 1990). Mice were observed daily and their neurological status was assessed weekly as previously described (Scott 1989, 1993; Castilla et al., 2003). When the disease was evident, mice were sacrificed for ethical reasons following the recommendations and approval of the ethics committee. Several samples (faeces, duodenum, jejunum and ileum) were then collected and stored at -80°C.

Extraction of PrP^{res} from stool samples

In order to extract PrP^{res} previously spiked into stool samples, several solutions of homogeneization were assayed using different detergents as well as different proteinase K concentrations. Faecal material were eluted (10%) with PBS pH 7.4 supplemented either with SDS or Sarkosyl (SK) or combination of both, in concentrations ranging from 0.25% to 0.5% for SDS and from 1% to 2% for SK. The solutions were reconstituted with proteinase K in concentrations ranging from 0.4 mg/ml to 0.1

mg/ml and incubated for 10 min at 37°C. Samples were then homogenized using a TeSeE Precess (Bio-Rad), filtered through a 25-gauge needle and stored at -80° as a sample concentrates.

Immunoprecipitation of PrP^{sc} from brain samples

PrP^{sc} from brain samples was immunoprecipitated using mAb β S-36 as described by Morel et al. (2004). This mAb has been shown to immunoprecipitate PrP^{sc} but not PrP^c in human and scrapie brain homogenates. The mAb (0.5 mg) was coupled to magnetic Dynabeads M-280 tosylated (1 ml) (Dyna) following the manufacturer's instructions. The final concentration of beads was 2·10⁹.

Briefly, brain homogenates (10%) were 2-fold diluted in PBS pH 7.4 supplemented with SK 4%. 50 μ l of the diluted homogenate were treated or untreated with 0.1 μ g of PK for 30 min at 37°C. Samples were then 10-fold diluted in PBS supplemented with 3 mM Pefabloc (Roche) only when PK was previously added. Magnetic beads (10 μ l) were added and the mix was incubated for 2 h at room temperature with gentle rotation. After 3 washes with PBS supplemented with Tween (1%), the beads were heated to 100°C for 5 min with 50 μ l of Laemmli buffer (LB) without reducing agents for western blotting (WB) analysis or with 25 μ l of C-reagent (Bio-Rad TeSeE-Purification kit) for the immunometric assay.

Immunoprecipitation of PrP^{res} extracted from stool samples

Immunoprecipitation technique was adapted for detection of PrP^{res} extracted from stool samples. Generally, 150 μ l of stool sample concentrates were first diluted 10-fold in PBS pH 7.4 supplemented with 3mM Pefabloc (Roche). Then, 10 μ l of magnetic beads (1 μ l of beads for each 15 μ l of sample) were added and samples were incubated for 2 h at room temperature with gentle rotation. After 3 washes with PBS supplemented with Tween (1%), the beads were heated to 100°C for 5 min with 50 μ l of Laemmli buffer (LB) without reducing agents for western blotting analysis or with 25 μ l of C-reagent (Bio-Rad TeSeE-Purification kit) for the

immunometric assay. However, in order to enhance the efficiency of recovery, both mice and sheep scrapie-spiked stool sample concentrates were also immunoprecipitated with increasing concentrations of microbeads (from 10 μ l to 70 μ l).

For scrapie, the sensitivity of the test was determined on mice and sheep stool samples spiked with 2-fold serial dilutions of Dawson-titrated brain homogenate (20%), so that brain homogenate amounts corresponding to 25 μ l (5 mg) until 0.05 μ l (10 μ g) were added. For BSE, sheep stool samples were spiked with 2 fold-serial dilutions of BSE-infected non-titrated brain homogenate (20%) as for Dawson strain. Samples were processed as usual with the exception that 50 μ l of beads were added (1 μ l of beads for each 3 μ l of sample).

Analysis of stool samples from experimental mice

Faecal material (0.2 g) from experimental mice was homogenized (10%) with PBS containing SDS (0.25%) and SK (2%) as well as PK (0.1 mg/ml). Homogenized samples were filtrated with 25-gauge needle and stored at -80°C. Sample concentrate (0.5 ml) was immunoprecipitated as mentioned but adding 1 volume of magnetic beads (1 μ l of beads for each μ l of sample). After washes, captured proteins were eluted in 100 μ l of LB without reducing agents and 25 μ l of them were analyzed by WB analysis.

Analysis of mice intestines

Mice orally inoculated with either BSE or Langlade scrapie were culled at 96hpi and intestines were collected and stored at -80°C. Terminally-sick scrapie-incubating mice were culled and intestines from each animal were also collected and stored at -80°C. Duodenum, jejunum and ileum sections from each individual sample were carefully dissected. Samples were weighted (60 mg \pm 25.73) and eluted in 500 μ l of Glucose 5%. Afterwards, the Bio-Rad TeSeE-Purification kit was applied.

Bio-Rad TeSeE-Purification Kit

For some stool samples and for mice intestines, SAFs were prepared using the TeSeE-

Purification kit (Bio-Rad) originally designed for the purification and concentration of PrP^{Sc} extracted from brain tissues. Briefly, 500 μ l of sample homogenate were mixed with a volume of buffer A containing PK and were incubated for 10 min at 37°C. After the addition of a volume of buffer B and centrifugation for 5 min at 20,000g, remaining proteins recovered as a pellet were denatured with 50 μ l of LB without reducing agents for WB analysis.

Two-site immunometric assay

The immunometric assay was performed in 96-well maxisorb immunoplates coated with the monoclonal anti-PrP antibody 11C6. The mAb 11C6 epitope is undetermined, but it recognizes murine and ovine PrP (Féraudet et al., 2005). C-denatured pellets were diluted 1:10 in EIA buffer and 100 μ l of sample were dispensed onto the wells and reacted for 2 hours at room temperature. After 3 washes, 100 μ l of acetylcholinesterase-labeled anti-PrP BAR-224 were dispensed and reacted for 2 hours at room temperature. After 6 washes, solid-phase bound acetylcholinesterase activity was determined using the colorimetric method of Ellman (Grassi et al., 2000).

Western blotting

Typically, 12.5 μ l of each samples were loaded onto sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gels (SDS-PAGE, 13.5%) and proteins fractionated for 1h at 200 V. The gel proteins were then blotted onto PVDF-membranes (Millipore) at 100 V for 1h. Membranes were probed with the monoclonal antibody (mAb) SHa31 coupled to horseradish peroxidase, at a 1:2000 dilution. This mAb recognizes a linear epitope sequence (GNDYEDRY) located between residues 145-152 (GenBank accession number NP898902) (Morel et al., 2004). Immunoreactive bands were visualized by the ECL-Plus developer kit (GE Healthcare).

PrP^{Sc} quantification

In order to express PrP^{Sc} amounts as mouse LD₅₀, scrapie and BSE inocula used for the spiking experiments were calibrated to Dawson-titrated and BSE-titrated brain homogenates (data not shown). Films were transformed into

digital pictures and band intensities analyzed by densitometry (Kodak image station 2000MM, with the software Kodak MI).

Results

PrP^{res} can be extracted from animal stool samples

Protease-resistant prion protein adheres strongly to particulate matter and its separation requires the presence of detergents, as it has been described (Johnson et al., 2006). This also occurs for faecal particulate matter, as buffers not supplemented with detergents were unable to extract PrP^{res} in this study. We have readily extracted PrP^{res} previously spiked into animal stool samples by means of either SDS or SK. No significant differences were observed in the recoveries when using several combinations of these detergents (data not shown). The effect of proteinase K concentration was also observed (Fig. 1). Stool samples spiked with unaffected brain homogenates did not give any immunoreactive signal indicating that PrP^c did not survive in contact with faecal matrix even at room temperature for no longer than 15 min. The high proteolytic activity presumably present in the samples was confirmed by the disappearance of the N-terminal domain of PrP^{sc} molecules without the addition of PK. The loss of this fragment occurred during incubation of samples, because PrP proteins of inoculum were entirely constituted when they were directly loaded onto western blots. Detection of partially digested PrP^{sc} in the absence of PK also indicates that all the inoculum contacted the faecal matter and they were not aggregates of prions left aside by the spiking procedure.

We studied several concentrations of PK, as they may enhance efficiency of extraction. Surprisingly, PrP^{res} recoveries incremented only when increasing PK levels were added in the buffer A during the SAF-Purification manipulation and not when they were directly added in the solution of homogenization (see Fig. 1, legend). As PrP^{res} purification and concentration is done after 25-gauge needle filtration of the sample concentrate, this result may only be explained by the pass through the needle of microparticulate matter from which

trapped prions should have released in the presence of PK.

Immunoprecipitation of PrP^{res} extracted from stool samples

In order to provide a technique allowing large volumes of samples to be analyzed, β S36-mediated immunoprecipitation was adapted to detect PrP^{res} extracted from sheep and mice stool samples. Taking into account that variable concentrations of detergents showed no differences in the extraction efficiency, conditions favouring PrP^{res} detection by β S36 were selected. Homogenization of stool samples with PBS containing SDS (0.25%) and SK (2%), as well as PK (0.1 mg/ml), and subsequent 1:10 dilution in PBS gave slightly better results (Fig. 2). Higher concentrations of SDS clearly affected mAb stability, as shown in dilution 1:5, but its presence in 0.025% improved PrP^{sc} immunocapture in comparison to the same elution buffer devoid of SDS.

SAF purification in extracted sample concentrates produced similar values irrespective of the homogenization solution applied, confirming what was initially observed in western blots for extraction experiments with detergents. However, these values showed to be higher than those obtained by immunoprecipitation in the same samples. In contrast, in infected brain control samples, immunoprecipitation approximately recovered 25% more of PrP^{sc} than that detected by the SAF purification kit. This apparent contradiction led us to think about the presence of a competitor in stools. Thus, scrapie-spiked sheep and mice stool samples were incubated with increasing concentrations of magnetic beads and PrP^{sc} recoveries were determined (Fig. 3). Certainly, PrP^{sc} detection correlated to number of beads applied. In mice faecal matrix, this correlation increased and kept constant until a proportion of 1 μ l of beads for each 2 μ l of sample concentrate. On the opposite, in sheep faecal matrix the maximum recovery was achieved with 50 μ l of beads, which is equivalent to a proportion of 1 μ l of beads for each 3 μ l of sample concentrate. On the hypothesis of using these ratios, efficiencies of the methodology were reported as 70% for

sheep stool samples and as approximately 40% for mice stool samples, when referred to the PrP^{sc} amount contained in the brain homogenate used for spiking (see Fig. 3, legend). However, further assays reported better efficiencies using SHa31-mediated western blotting detection (data not shown). This was probably caused by the inhibition of PrP^{sc} detection in the immunometric assay by compounds present in faecal matrices. That is in agreement with the slightly higher sensitivity of the test in mice stool in comparison to sheep stool.

Sensitivity of the method

End-point limiting 2-fold dilutions of scrapie and BSE infected homogenates (containing approximately the same amount of PrP^{res}) were spiked into animal stool samples and analyzed in order to evaluate the sensitivity of the designed procedure (Fig. 4). In the sheep faecal matrix, the best ratio of beads to sample concentrate was applied (1 for 3, respectively) and 18.75 µg of infected tissue were recovered from both spiking series done with Dawson scrapie and BSE. In the mice faecal matrix, 9.375 µg of Dawson-infected tissue was recovered, although the use of more beads would have improved detection. At any rate, thresholds could have been half-reduced analyzing 25 µl in the blots (see Experimental procedures), so that detection limits would have been set up in 9.375 µg of Dawson tissue and 4.69 µg of BSE tissue, for each 7.5 mg of matter tested. According to the infectious titre reported for the Dawson strain, the test was able to detect 10^{2.47} mouse ic LD₅₀ in sheep stool samples and 10^{2.17} mouse ic LD₅₀ in mice stool samples. Likewise, according to the calibration of the BSE inoculum to the BSE-titrated brain homogenate, the limit of detection for BSE in sheep stool samples could have been expressed as 1.18·10⁻² mouse ic LD₅₀.

Analysis of experimental mice orally inoculated

PrP^{res} proved to be extractable and detectable from animal stool samples previously spiked. However, the procedure had to be validated in non-spiked samples before further analysis. For this reason, two groups of mice were orally

inoculated with either BSE or scrapie strain Langlade, and their faeces pooled and analyzed by the designed protocol (Fig. 5). In the case of scrapie, stool samples collected after 24 h of inoculation were shown to be positive, but not the following ones collected at 48 h, 72 h, or 96 h post-inoculation. For BSE, PrP^{res} was detected in stool samples collected 24 h and, in a lesser extent, 48 hpi. These differences could rely on metabolic variability among the individuals (although stools were pooled) or the biased analysis of a part of the faecal content. Otherwise, further experiments need to be done to find out any relationship between the temporal profiles of excretion and prion strains. Prions identified consistently presented all three glicofoms without any sign of additional proteolytic modifications caused by the passage through the gastrointestinal tract.

It was interesting to know if prion inoculum adsorbed to gut wall was already detectable. Therefore, SAF from intestines samples 96 hpi of each inoculated mice were purified. None region of none mice showed any detectable PrP^{res} accumulation by western blotting (data not shown), as expected in accordance with previous data indicating detectable replication of prions in GALT from 30 days onwards (Jeffrey et al., 2006).

Analysis of terminally-sick scrapie-incubating mice

Terminally-sick mice infected with 22L scrapie strain were culled and intestines and stool samples were collected. Intestines of each individual (n=4) were processed and blotted as shown in (Fig. 6A). As expected, PrP^{res} was found in all intestinal tissues studied. However, a great variability was observed, as for instance one individual showed uniquely slight levels of PrP^{res} in the duodenum while other showed it only in the jejunum. Two animals were found to accumulate scrapie in the three regions studied, but with significant larger deposits in both jejunum and ileum.

Presence of PrP^{res} in the intestinal tract rose possibilities of a correlative PrP^{res} shedding in the stool samples of these mice. However, no prions were detected using the developed method (Fig. 6B).

Discussion

Disease-associated prion protein presents a β -folded conformation that confers to the molecule unique biochemical properties, completely different to those of α -folded PrP. In addition to the resistance to proteolysis and other well-defined features, β -sheet structure gives prions the ability to bind among them to form aggregates and also to attach particulate matter in environmental conditions, i.e. silicate clay minerals (Johnson et al., 2006). Insolubility, adhesive behaviour and dilution in large amounts of material, among others, are factors related to prion diseases that led scientists to consider stool as a highly complex matrix for molecular laboratory purposes. In this work, it has been demonstrated that prions experimentally spiked in animal stool samples and prions having travelled the gastrointestinal tract are detectable by molecular approaches. The methodology applied for this objective is composed by a detergent-based extraction step followed by an immunocapture of the eluted prion proteins. That provides an effective concentration process that allows analysis of substantial volumes of sample. We have adapted a highly sensitive immunoprecipitation technique mediated by mAb β S36, as it is shown in Fig. 2 for brain samples, which is in addition specific for PrP^{Sc} aggregates. In the faecal matrix, the procedure was handicapped for the existence of natural competitors as it was verified in a dose-dependent adsorption test (Fig. 3). Certainly, β S36-mediated immunoprecipitation has been found not to involve the antibody binding site (paratope) but rather other parts of the antibody molecule (Morel et al., 2004). This interaction might be responsible for the coprecipitation of unrelated competitive factors not necessarily constituted of protein nature. In order to provide an inhibitor-free immunocapture assay, it could have been interesting to identify and eliminate interfering molecules with an additional incubation step. Even though that surpassed the specific objectives of the present study, it could shortly be tackled according to ongoing studies. Whatever the origin, the dynamic of inhibition changed considerably between mice and sheep

stool samples, reaching a plateau for the latter ones. It is worth noting that the volumes of microbeads used for the dose-dependent tests were completely arbitrary and a potential plateau may also be reached in mice stool samples.

Sensitivity of the developed method was initially assessed in both mice and sheep experimentally spiked stool samples. The procedure proved to be specific and the sensitivity was more related to the type of faecal matrix rather than prion strain. Then, stool samples collected from mice orally infected with BSE and scrapie strain Langlade were analyzed and also the procedure proved to detect specifically extracted prions, as no interfering bands were identified. It is worth stating that the specificity of the test was consciously primed taking into consideration the presumable abundance of proteins in this kind of samples. For that reason, three criteria were set up: resistance to PK, immunoprecipitation by mAb β S36 and, especially, immunoreactivity with mAb SHa31 in WB, which was directly labelled to avoid the need of a secondary antibody giving cross-reactivity with excreted immunoglobulins.

Terminally-sick 22L-incubating mice were shown not to shed prions through faeces according to our results. Some of them presented PrP^{res} all along the intestinal tract and probably also along the rectum and colon sections not studied in this work. Although Peyer's patches (PP) were not removed from the samples prior to analysis, deposition of PrP^{res} has been widely described in enterocytes of gut tissues wherein PP had been excised (Maignen et al., 1999). Cell exfoliation and other secreting pathways may thus provide infectivity in the intestinal lumen. To our knowledge, the lack of prions could be related to the initial amount of material analyzed in our experiment. Further research is underway in order to check larger volumes of material coming also from a larger number of individuals as well as other TSE strains.

These negative results raise the question of whether microbiota inherent to alimentary tract is able to degrade prions. Recently, Scherbel et al. (2006) have reduced scrapie PrP^{Sc} titres to

undetectable levels by incubation with rumen and colon contents of cattle in an *in vitro* experiment at 20°C for 20h. It is quite clear that some anti-PrP proteolytic activity is present in gut lumen, but not enough severe to degrade ingested prions, as it is demonstrated hereby. Although it is true that cattle and mice digestive tract varies in structure and digestion capacities, prion contribution to the excreted material is quantitatively higher in ruminants, as exfoliation and decomposing processes affecting gut walls occur more commonly regarding their longer intestinal tract. As the authors declare, the *in vitro* degradation model does not represent the real conditions, especially because they have omitted important *in vivo* factors such as the protective effect of faeces. Viruses and other pathogenic agents are excreted in high titres in stool. Furthermore, viruses typically transmitted through the oral-faecal route do not possess as high resistance to proteolytic inactivation process as prions extraordinarily show. This phenomenon is in a large part related to PrP^{sc} adhesion to particulate matter, which is a characteristic strongly enhanced in PrP^{sc}. To our mind, taking into consideration that orally-entering prions cross gastrointestinal tract until being shed in mice stool, the distal ileum rather than tongue or others promise to be, at least in rodent models, the plausible entry site for TSE diseases, as it has been suggested for many authors (Beekes et al., 2000; Andreoletti et al., 2000; Heppner et al., 2001). It is improbable that alternative infection routes may play this principal role in other animal species.

It is almost impossible to determine the doses of prion agents ingested by an individual in natural conditions. In some cases such as BSE, an estimation of approximately 100 g of a BSE-affected brain pool has been proposed in a pathogenesis study, because the range of incubation periods observed agreed with those estimated to have occurred during the epidemic in Britain (Grassi et al., 2001). Shedding of

prions in those conditions does not seem unreasonable. Neither does it when naturally-incubating animals suffer from abrasions or from inflammatory disorders affecting the gastrointestinal tract, which is quite common in wild and farm animals as they are in close contact with pathogens. In these circumstances prions could contaminate the environment and this reservoir be determinant for the natural transmission of EET.

Environmental transmission has been widely suggested to explain apparently individual-to-individual contagion in some TSE such as scrapie and CWD. Contamination by carcasses or stools has at the same time considered the most probable explanation. In a recent study, saliva, but not faeces, has been proved to contain infectivity for mule deer (Mathiason et al., 2006) raising doubts about this consideration. However, faeces remain to be the unique potential source able to be spread out in enough quantities and in considerable areas as to be responsible of cross-contamination among animals. Moreover, the high dissemination observed during the pathogenesis of scrapie and CWD including gastrointestinal tract strength this hypothesis. In this work, we report on a new methodology for reliable and specific identification of prions in animal stool samples, by means of which we have observed shedding of prions in mice after ingestion of BSE and scrapie. This developed method will be an interesting and useful tool for studying prion excretion in faeces and its importance in prion transmission through the environment.

Acknowledgements

The authors are also grateful to Jacques Grassi and Olivier Andreoletti for supplying us with titrated brain homogenates. Carlos Maluquer de Motes is a fellow of the Spanish Government. This research was in part financed by the research project EET2001-4814-C02 from the former Spanish Ministry of Education and Science.

References

- Alpers, M. P.** 1987. Epidemiology and clinical aspects of kuru. In Prusiner, S. B. and M. P. McKinley, eds. Prions: novel infectious pathogens causing scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. San Diego: Academic; 1987, pp. 451-465.
- Andréoletti, O., P. Berthon, D. Marc, P. Sarradin, J. Grosclaude, L. van Keulen, F. Schelcher, J-M Elsen, and F. Lantier.** 2000. Early accumulation of PrPsc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* **81**:3115-3126.
- Andréoletti, O., C. Lacroux, A. Chabert, L. Monnereau, G. Tabouret, F. Lantier, P. Berthon, F. Eychenne, S. Lafond-Benestad, J. M. Elsen, and F. Schelcher.** 2002. PrP(sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J. Gen. Virol.* **83**:2607-2616.
- Beekes, M. and P. A. McBride.** 2000. Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci. Lett.* **278**:181-184.
- Beekes, M., P. A. McBride, and E. Baldauf.** 1998. Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J. Gen. Virol.* **79**:601-607.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley, and S. B. Prusiner.** 1982. Identification of a protein that purifies with scrapie prion. *Science* **218**:1309-11.
- Brown, P. and D. C. Gajdusek.** 1991. Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* **337**:269-270.
- Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, H. Cousens, H. Fraser, and C. Bostock.** Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. 1997. *Nature* **389**:498-501.
- Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguët, and C. Weissmann.** 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**:1339-1347.
- Buschmann, A. and M. H. Groschup.** 2005. Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis* **192**, 934-942.
- Castilla, J., A. Gutierrez Adan, A. brun, B. Pintado, M. A. Ramirez, B. Parra, D. Doyle, M. Rogers, F. J. Salguero, C. Sanchez, J. M. Sanchez-Vizcaino, and J. M. Torres.** 2003 Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch Virol* **148**:677-691.
- Curin Serbec, V., M. Bresjanac, M. Popovic, H. K. Pretnar, V. Galvani, R. Rupreth, M. Cernilec, T. Vranac, I. Hafner, and R. Jerala.** 2004. Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jakob's disease-affected and normal brain tissue. *J. Biol. Chem.* **279**: 3694-3698.
- Elsen, J. M., Y. Amigues, F. Schelcher, V. Ducrocq, O. Andreoletti, F. Eychenne, J. V. Khang, J. P. Poivey, F. Lantier, and J. L. Laplanche.** 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch. Virol.* **144**:431-45.
- Espenes, A., C. M. Press, T. Landsverk, M. A. Tranulis, M. Aleksandersen, G. Gunnes, S. L. Benestad, R. Flugestveit, and M. J. Ulvund.** 2006. Detection of PrP(Sc) in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. *J. Comp. Pathol.* **134**:115-25.
- Farquhar, C. F., J. Dornan, R. C. Moore, R. A. Somerville, A. M. Tunstall, and J.**

- Hope.** 1996. Protease-resistant PrP deposition in brain and non-central nervous tissues of a murine model of bovine spongiform encephalopathy. *J. Gen. Virol.* **77**:1941-1946.
- Feraudet, C., N. Morel, S. Simon, H. Volland, Y. Frobert, C. Creminon, D. Vilette, S. Lehman, and J. Grassi.** 2005. Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells. *J. Biol. Chem.* **280**:11247-11258.
- Fischer M, T. Rulicke, A. Raeber, A. Sailer, M. Moser, B. Oesch, S. Brandner, A. Aguzzi, and C. Weissmann.** 1996. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15**:1255-64.
- Furukawa, H., K. Doh-ura, R. Okuwaki, S. Shirabe, K. Yamamoto, H. Udono, T. Ito, S. Katamine, and M. Niwa.** 2004. A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. *J. Biol. Chem.* **279**:23661-23667.
- Gonzalez, L., M. P. Dagleish, S. J. Bellworthy, S. Siso, M. J. Stack, M. J. Chaplin, L. A. Davis, S. A. Hawkins, J. Hughes, and M. Jeffrey.** 2006. Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. *Vet. Rec.* **158**:325-31.
- Grassi, J., C. Creminon, Y. Frobert, P. Fretier, I. Turbica, H. Rezaei, G. Hunsmann, E. Comoy, and J. P. Deslys.** 2000. Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post-mortem diagnosis of BSE. *Arch Virol Suppl* **16**:197-205.
- Grassi, J., E. Comoy, S. Simon, C. Creminon, Y. Frobert, S. Trapmann, H. Schimmel, S. A. Hawkins, J. P. Deslys, and G. A. Wells.** 2001. Rapid test for the preclinical post-mortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet Rec* **149**:577-582.
- Greig, J. R.** 1940. Scrapie observations on the transmission of the disease by mediate contact. *Vet. J.* **96**:203-206.
- Jeffrey, M., L. Gonzalez, A. Espenes, C. M. Press, S. martin, S. Chaplin, L. Davis, T. Landsverk, C. MacAldowie, S. Eaton, and G. McGovern.** 2006. Transportation of prion protein across the intestinal mucosa of scrapie-susceptible and scrapie-resistant sheep. *J. Pathol.* **209**:4-14.
- Johnson, C. J., K. E. Phillips, P. T. Schramm, D. McKenzie, J. M Aiken, and J. A. Pedersen.** 2006. Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog.* **2**:296-302.
- Kim, Y. S., R. I. Carp, S. M. Callahan, M. Natelli, and H. M. Wisniewski.** 1990. Vacuolization, incubation period and survival time analyses in three mouse genotypes injected stereotactically in three brain regions with the 22L scrapie strain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **49**:106-13.
- Korth, C., B. Stierli, P. Streit, M. Moser, O. Schaller, R. Fischer, W. Schulz-Schaeffer, H. Kretschmar, A. Raeber, U. Braun, F. Ehrensperger, S. Hornemann, R. Glockshuber, R. Riek, M. Billeter, K. Wuthrich, and B. Oesch.** 1997. Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* **390**:74-77.
- Haik, S., B. A. Faucheux, V. Sazdovitch, N. Privat, J. L. Kemeny, A. Perret-Liaudet, and J. J. Hauw.** 2003. The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat. Med.* **9**:1121-1123.
- Head, M. W., E. Kouverianou, L. Taylor, A. Green, and R. Knight.** 2005. Evaluation of urinary PrPSc as a diagnostic test for sporadic, variant, and familial CJD. *Neurology* **64**:1794-1796.
- Heggebo, R., C. M. Press, G. Gunnes, L. Gonzalez and M. Jeffrey.** 2002.

- Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. 2002. *J. Gen. Virol.* **83**:479-489.
- Heppner, F. L., A. D. Christ, M. A. Klein, M. Prinz, M. Fried, J. P. Kraehenbuhl, and A. Aguzzi.** 2001. Transepithelial prion transport by M cells. *Nat. Med.* **7**:976-977.
- Hill, A. F., M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. Sidle, I. Gowland, J. Collinge, L. J. Doey, and P. Lantos.** 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**:448-450.
- Hoinville, L. J.** 1996. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev. Sci. Tech.* **15**:827-52.
- Hourrigan, J., A. Klingsporn, W. W. Clark, and M. de Camp.** 1998. Epidemiology of scrapie in the United States. *In: Prusiner, S. B., and W. J. Hadlow, eds. Slow transmissible diseases of the nervous system: volume I.* New York: Academic Press; 1998. p. 331-356.
- Maignen, T., C. I. Lasmézas, V. Beringue, D. Dormont, and J. P. Deslys.** 1999. Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J. Gen Virol.* **80**:3035-3042.
- Mathiason, C. K., J. G. Powers, S. J. Dahmes, D. A. Osborn, K. V. Miller, R. J. Warren, G. L. Mason, S. A. Hays, J. Hayes-Klug, D. M. Seelig, M. A. Wild, L. L. Wolfe, T. R. Spraker, M. W. Miller, C. J. Sigurdson, G. C. Telling, and E. A. Hoover.** 2006. Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* **314**:133-6.
- Miller, M. W. and E. S. Williams.** 2003. Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature* **425**:35-36.
- Miller, M. W., E. S. Williams, N. T. Hobbs, and L. L. Wolfe.** 2004. Environmental sources of prion transmission in mule deer. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1003-1006.
- Morel, N., S. Simon, Y. Frobert, H. Volland, C. Mourton-Gilles, A. Negro, M. C. Sorgato, C. Creminon, and J. Grassi.** Selective and efficient immunoprecipitation of the disease-associated form of the prion protein can be mediated by non-specific interactions between monoclonal antibodies and scrapie-associated fibrils. 2004. *J. Biol. Chem.* **279**:30143-30149.
- Muramatsu, Y., A. Onodera, M. Horiuchi, N. Ishiguro, and M. Shinagawa.** 1994. Detection of PrP^{Sc} in sheep at the preclinical stage of scrapie and its significance for diagnosis of insidious infection. *Arch. Virol.* **134**:427-432.
- Pálsson, P. A.** 1979. Rida (scrapie) in Iceland and its epidemiology. *In: Prusiner, S. B., and W. J. Hadlow, eds. Slow transmissible diseases of the nervous system: volume I.* New York: Academic Press; 1998. p.357-366.
- Paramithiotis, E., M. Pinard, T. Lawton, S. LaBoissiere, V. L. Leathers, W. Q. Zou, L. A. Estey, J. Lamontagne, M. T. Letho, L. H. Kondejewski, G. P. Francoeur, M. Papadopoulos, A. Haghghat, S. J. Spatz, M. Head, R. Will, J. Ironside, K. O'Rourke, Q. Tonelli, H. C. Ledebur, A. Chakrabhartty, and N. R. Chasman.** 2003. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nat. Med.* **9**: 893-899
- Radebold, K., M. Chernyak, D. Martin, and L. Manuelidis.** 2001. Blood borne transit of CJD from brain to gut at early stages of infection. *BMC Infect. Dis.* **1**:20.
- Scherbel, C., R. Pichner, M. H. Groschup, S. Mueller-Hellwig, S. Scherer, R. Dietrich, E. Maertlbauer, and M. Gareis.** 2006. Degradation of scrapie associated prion protein (PrP^{Sc}) by the gastrointestinal microbiota of cattle. *Vet. Res.* **37**:695-703.
- Seeger, H., M. Heikenwalder, N. Zeller, J. Kranich, P. Schwarz, A. Gaspert, B. Seifert, G. Miele, and A. Aguzzi.**

2005. Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science* **310**:324-326.
- Serban, A., G. Legname, K. Hansen, N. Kovaleva, and S. B. Prusiner.** 2004. Immunoglobulins in urine of hamsters with scrapie. *J. Biol. Chem.* **279**:48817-48820.
- Sigurdson, C. J., E. S. Williams, M. W. Miller, T. R. Spraker, K. I. O'Rourke, and E. A. Hoover.** 1999. Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrP^{res} in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J. Gen. Virol.* **80**:2757-2764.
- Spraker, T. R., R. N. Zink, B. A. Cummings, M. A. Wild, M. W. Miller, and K. I. O'Rourke.** 2002. Comparison of histological lesions and immunohistochemical staining of protease resistant prion protein in a naturally occurring spongiform encephalopathy of free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) with those of chronic wasting disease of captive mule deer. *Vet. Pathol.* **39**:110-119.
- Vasina, E. N., P. Déjardin, H. Rezaei, J. Grosclaude, and H. Quiquampoix.** 2005. Fate of prions in soil: adsorption kinetics of recombinant unglycosylated ovine prion protein onto mica in laminar flow conditions and subsequent desorption. *Biomacromolecules* **6**:3425-3432.
- Weissmann, C., M. Enari, P-C. Klöhn, and D. Rossi.** 2002. Transmission of prions. *J. Infect. Dis.* **186**:S157-65.
- Wells, G. A. H., S. A. C. Hawkins, R. B. Green, A. R. Austin, I. Dexter, Y. I. Spencer, M. J. Chaplin, M. J. Stack, and M. Dawson.** 1998. Preliminary observations on the pathogenesis of the experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet. Rec.* **142**: 103-106.
- Wilesmith, J. W., G. A. Wells, M. P. Cranwell, and J. B. Ryan.** 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* **123**:638-644.
- Woolhouse, M. E., S. M. Stringer, L. Matthews, N. Hunter, and R. M. Anderson.** 1998. Epidemiology and control of scrapie within a sheep flock. *Proc. Biol. Sci.* **265**:1205-1210.
- Zou, W. Q., J. Zheng, D. M. Gray, P. Gambetti, and S. G. Chen.** 2004. Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **101**:1380-1385.

Figures

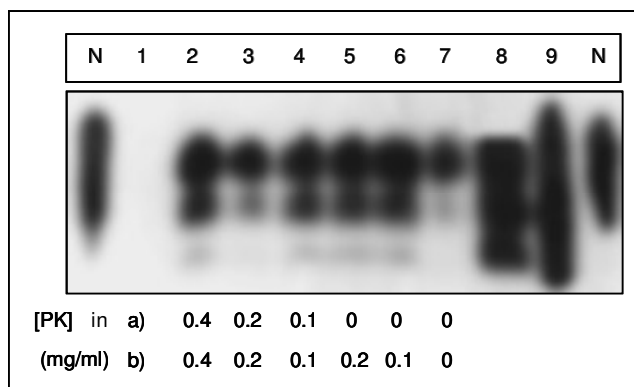


Fig. 1. PrP^{res} extraction from scrapie-spiked sheep stool samples. Replicates of a sheep fecal sample homogenized with PBS supplemented with SDS 0.25% (lanes 2 to 7) were treated with various concentrations of PK incorporated both at the moment of elution (a) and during the purification of SAF using the TeSeE Purification kit (b). No PrP^c was detected in faecal samples spiked with healthy brain homogenized without PK (lane 1). We detected partially digested PrP^{sc} in the absence of PK (lane 7), but the recovery improved as PK levels in (b) increased until 0.1 mg/ml, after of which it stopped. That means the additional PrP^{res} levels were extracted during SAF purification and should come from prions adhered to microparticulates and microfibrils having been filtered. In order to check the integrity of PrP molecules, inoculum was directly denatured in LB and no cleavage of the N-terminal domain was observed (lane 9). Scrapie-brain homogenate treated with the TeSeE-Purification kit (lane 8), as well as untreated non-affected brain homogenate (N), are also shown.

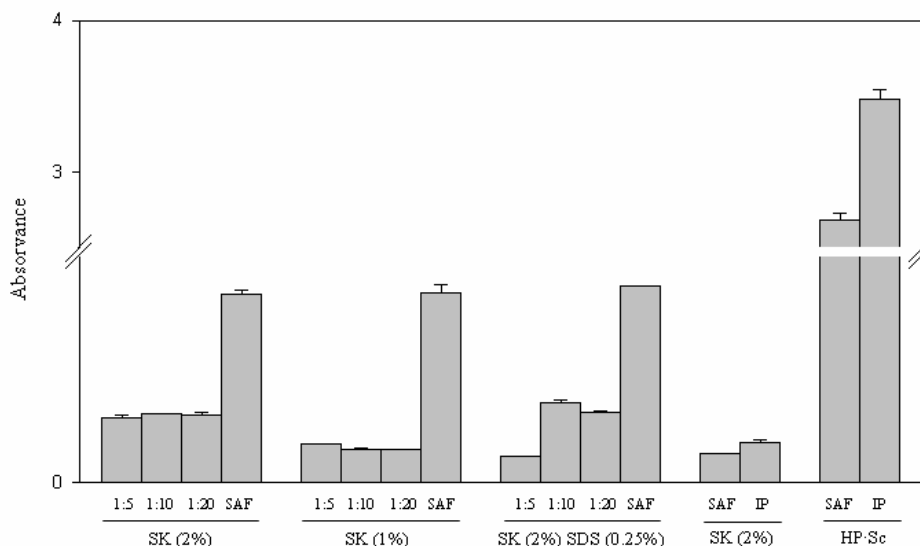


Fig. 2. Immunoprecipitation of PrP^{res} extracted from scrapie-spiked sheep stool samples using homogenization buffers based on PBS containing PK (0.1 mg/ml) as well as 2% SK, 1% SK, and 2% SK and 0.25% SDS. Each extraction was diluted 1:5, 1:10 and 1:20 in PBS and analyzed by immunoprecipitation, or else processed by TeSeE-Purification kit (lanes 'SAF'). Results were read by the immunometric assay. Normal sheep brain homogenate was also spiked, extracted and analyzed (4th group of data), and the values obtained were considered as the background of the assay. Immunoprecipitation (IP) and SAF-purification (SAF) of scrapie-affected brain homogenates not spiked in stool samples were processed as mentioned in the 'Materials and Methods' (5th group of data) and were used as controls. SAF-purification protocol detected approximately 77.5% of what had been quantified by β S36-mediated immunoprecipitation.

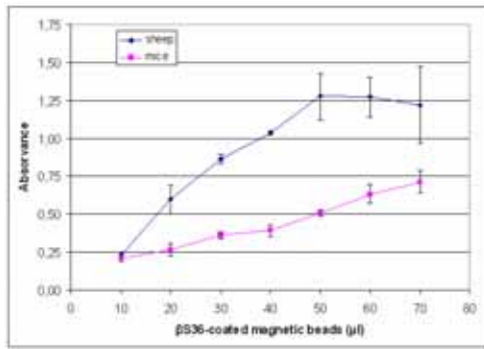


Fig. 3. Correlation between concentration of β S36-covered magnetic beads and PrP^{res} recovery from animal stool samples. Dawson-titrated brain homogenates were spiked in sheep and mice stool samples, extracted and immunoprecipitated with increasing concentrations of beads. All samples were quantified by the immunometric assay. Control aliquots of inoculum were also processed in the absence of faecal matrix reporting an $A_{450-620}$ of 1,99.

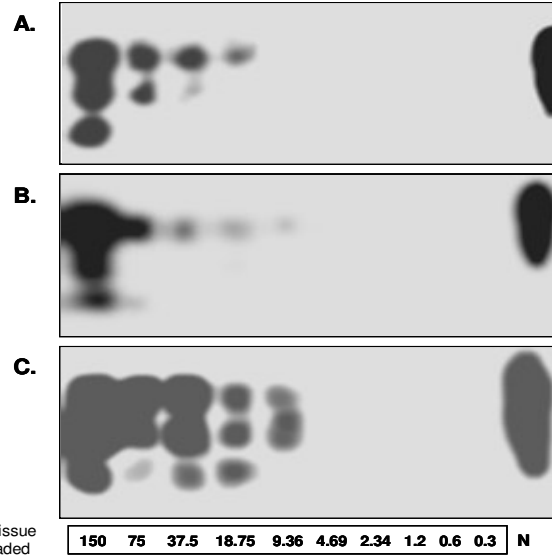


Fig. 4. Sensitivity of immunoprecipitation of PrP^{res} extracted from mice and sheep stool samples. Sheep faeces were spiked with 2-fold serial dilutions from 25 μl to 0.5 μl of Dawson-affected brain homogenate (A) and BSE-affected brain homogenate (B). Mice faeces were likewise spiked with Dawson-affected brain homogenate (C). All samples were processed as described in the 'Material and Methods'. Equivalents of μg of tissue loaded in each well are indicated at the bottom of the figure. Untreated non-affected brain homogenate (N) is shown.

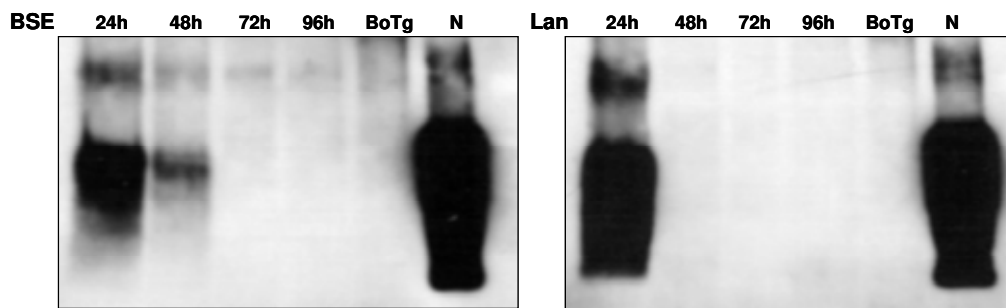


Fig. 5. Analysis of stool samples from experimental mice orally infected with scrapie strain Langlade (Lan) and BSE. Faeces were collected from the cage at 24h, 48h, 72h, and 96h days post-inoculation. Faeces from a healthy BoTg mice were also processed (BoTg). Untreated non-affected brain homogenate (N) is also shown.

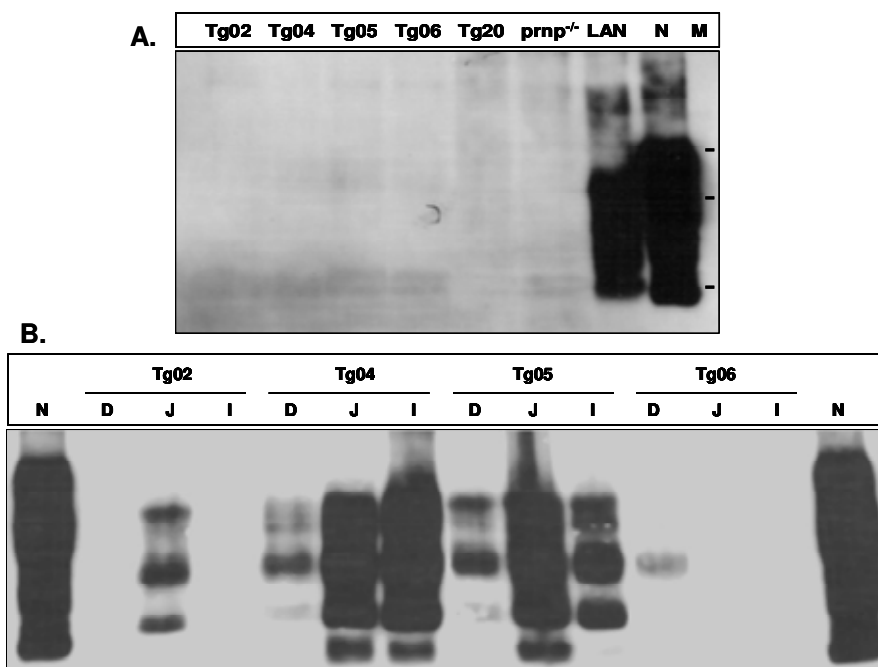


Fig. 6. Analysis of terminally-sick scrapie-incubating mice. A, stool samples from each affected individual as well as from healthy mice (Tg20) and PrP-knockout mice (*prnp*^{-/-}) were immunoprecipitated and probed with mAb SHa31 directly labelled. As molecular weight references, scrapie prions excreted in faeces of orally infected mice (LAN). B, intestines of each individual (n=4) were dissected into duodenum (D), jejunum (J) and ileum (I) and analyzed with the SAF-Purification kit. Untreated healthy brain homogenate (N) is also shown.

Capítol V: Estabilitat dels prions en mostres ambientals

5.1. Antecedents i objectius

En l'actualitat no existeixen dades sobre el comportament dels prions en medis aquàtics. Davant l'epizoòtia d'EEB detectada al Regne Unit a mitjans dels anys 80, es van desenvolupar diversos estudis epidemiològics per tal d'avaluar el possible risc de transmissió de la malaltia a humans per contaminació d'ambients relacionats en certa mesura amb el bestiar infectat. Un d'aquests riscos fou la presència de prions en ambients aquàtics procedents de plantes de *rendering*, escorxadors o per deposició directa. L'elevada resistència dels prions a la degradació indueix a creure que es produeix una caiguda relativament baixa de la infectivitat en el medi, alhora que els tractaments de desinfecció aplicats en plantes de tractament d'aigua no tindrien cap efecte significatiu.

En aquest sentit, cal destacar el primer estudi de risc epidemiològic publicat per Gale i cols. l'any 1998 (Gale *et al.*, 1998) en el que s'assumia que el possible risc de transmissió d'EEB als humans per consum d'aigua a partir d'un aquífer proper a una planta de producció de farines càrniques era certament remot. No obstant, tal com citen els mateixos autors, la manca de dades experimentals sobre el comportament dels prions en aquest tipus d'ambients suposa un obstacle considerable per al desenvolupament d'aquests tipus d'estudis. En primer lloc, es desconeix la vehiculació d'aquests agents en medis aquàtics, és a dir, si es troben lliures, associats a altres molècules o a la matèria particulada. En segon lloc, es desconeixen les barreres físiques i geològiques que poden

modificar la seva deposició, com ara la retirada dels efluent durant els processos de *rendering* o la capacitat d'adsorció als diferents components que constitueixen el sòl. I, finalment, es desconeix també la persistència d'aquests agents al llarg del temps sota aquest tipus de condicions.

Al llarg d'aquests últims anys, algunes de les incògnites esmentades han estat ja abordades. Així, el comportament i les capacitats d'adsorció dels prions en el sòl ha estat estudiada per diversos grups de recerca tal com s'ha descrit en la introducció (Vasina *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006). L'objectiu, doncs, d'aquest treball és l'estudi de l'estabilitat i la persistència dels agents infecciosos causants de l'EEB bovina i de l'*scrapie* oví al llarg del temps en diferents ambients aquàtics per mitjà del desenvolupament d'un protocol per a la seva recuperació i concentració a partir de matrius contaminades experimentalment.

5.2. Materials i Mètodes

5.2.1. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en aigua residual

5.2.1.1. Teixits afectats per EET

El disseny d'una metodologia per a l'estudi dels prions en aigües residuals es va definir a partir d'estudis realitzats amb l'agent EEB i va ser validada posteriorment per a l'agent *scrapie*. Així, es va disposar d'inòcul EEB procedent del laboratori del Dr. Juan M^a Torres (CISA, INIA), consistent en un *pool* de teixit encefàlic de 49 animals afectats homogeneïtzat al 10% (p/v) en PBS sense Ca²⁺ ni Mg²⁺, anomenat BSE₁ (Castilla *et al.* 2003). Aquest inòcul havia estat titulat en 10⁸ DL₅₀ i.c. en ratolí per gram de teixit infectat.

De la mateixa manera, es va disposar d'un inòcul d'*scrapie* oví procedent d'un cas natural detectat pels veterinaris del Priocat (CReSA) que va ser cedit pel Dr. Martí Pumarola (Departament d'Anatomia Patològica, Fac. Veterinària, CReSA, UAB). Es va

establir un homogeneïtzat al 10% (p/v) en PBS, denominat en aquest estudi *scrapie* salvatge.

El contingut de PrP^{res} de tots dos inòculs va ser determinat mitjançant el protocol que es descriu en l'apartat 8.8 de l'annex de Materials i Mètodes, tot i que la figura 5.4 que es mostra més endavant va ser obtinguda aplicant el *Bio-Rad TeSeE-Purification kit*. (apartat 8.9).

5.2.1.2. Aigua residual

En general, les mostres d'aigua residual que han estat usades per al desenvolupament de la metodologia corresponen a aquelles descrites en el primer capítol. Així, l'aigua residual urbana va ser recollida a l'entrada de la planta depuradora de l'àrea de la ciutat de Barcelona, que rep uns 670,000 m³ d'aigua residual per dia. De la mateixa manera, es va utilitzar de mode comparatiu dues mostres d'efluents dels escorxadors estudiats en el capítol I. Concretament, es va utilitzar efluent no tractat de l'escorxador d'Argentona, aquí anomenat 'E₁', i efluent floculat de l'escorxador localitzat a Cornellà del Terri, anomenat 'E₂'.

5.2.1.3. Elució per detergents i per tampó alcalí

Inicialment es va establir un estudi preliminar sobre la incubació dels prions en els diferents tipus d'aigua residual disponibles. Així, diferents alíquotes de l'inòcul BSE₁ van ser eluïdes al 5% en 5% (p/v) sarkosil i centrifugades 30 min a 20,000 xg. Posteriorment, el *pellet* obtingut contenint els SAF va ser resuspès en les diferents matrius (aigua residual urbana, efluents d'escorxador, PBS) i incubat a RT durant 1h o 2h, passades les quals les rèpliques van ser tractades en absència i presència de PK d'acord amb el protocol descrit en l'apartat 8.8 de l'annex de Materials i Mètodes. Finalment, totes les mostres van ser desnaturalitzades en tampó de càrrega i analitzades per *western blotting* (apartat 8.19).

Un cop desenvolupat aquest primer estudi, es van avaluar dos mètodes d'elució dels prions a partir de la matriu d'aigua residual urbana basats en l'ús de detergents o en

l'ús del tampó glicina 0.25 N a pH alcalí. En primer lloc, es va determinar l'efecte de l'alcalinitat del tampó glicina (pH 8 a 11) en diferents alíquotes d'aigua residual contaminades amb EEB, que van ser aleshores incubades a RT durant 30 min, sonicades i centrifugades 100,000 x g durant 1h a 4°C. Els *pellets* van ser eluïts en PBS.

Posteriorment, per tal d'avaluar comparativament l'eficiència dels dos mètodes, es van contaminar experimentalment 3 mostres de 50 ml. Una d'elles va ser directament tractada amb sarkosil (SK) al 10% (p/v), mentre les altres dues van centrifugades a 100,000 x g durant 1h a 4°C. El *pellet* generat per una d'aquestes va ser eluït en 10% SK, mentre l'altre va ser eluït en tampó glicina 0.25 N a pH 10. Ambdues mostres, així com la primera de totes, van ser sonicades i processades segons el protocol que es descriu més endavant en l'apartat 'Sensibilitat del mètode'. Per tal de poder comparar els resultats corresponents als *pellets* amb els dels sobrenedants evitant l'efecte dilució, les proteïnes presents en aquest últims van ser precipitades amb metanol (apartat 8.15, apèndix de Materials i Mètodes).

5.2.1.4. Tractament amb proteïnasa K i anàlisi per *western blotting*

Els concentrats finals de les mostres van ser tractats amb proteïnasa K d'acord amb el passos descrits en l'apartat 8.8 de l'annex de Materials i Mètodes. La concentració final de PK va ser de 20 µg/ml per a l'EEB i de 50 µg/ml per a *scrapie*. La reacció va ser aturada en afegir tampó de càrrega i, un cop desnaturalitzades, les mostres van ser analitzades per SDS-PAGE (12%) i *western blotting* usant com a anticòs primari el mAb 2A11 (Juan M^a Torres, CISA, INIA) en dilució 1:2000 o el mAb 6H4 (Prionics, Ltd) en dilució 1:5000, i una IgG anti-IgG murina marcada amb peroxidasa (Amersham Biosciences) en dilució 1:2000, com a anticòs secundari.

5.2.2. Sensibilitat del mètode de detecció

Un cop determinades les condicions experimentals més òptimes, es va descriure un protocol general per a la concentració de la PrP^{sc} a partir d'aigua residual contaminada experimentalment. Per tal d'avaluar la sensibilitat d'aquest mètode, 8 alíquotes de 10 ml d'aigua residual van ser contaminades amb dilucions seriades 1:2 de

l'inòcul d'*scrapie* salvatge des de 25 µl fins a 0.2 µl, de manera que es van afegir quantitats d'homogeneïtzat encefàlic equivalents a 5 mg (25 µl) fins a 40 µg (0.2 µl). Totes les mostres van ser processades d'acord al protocol desenvolupat fins a ser eluïdes en tampó de càrrega, 20 µl dels quals van ser finalment analitzats per *western blotting* (apartat 8.19 de l'annex de Materials i Mètodes). El protocol utilitzat es detalla a continuació.

1. Centrifugació de la mostra a 100,000 x g durant 1h a 4°C
2. Descartar el sobrenedant i eluir el *pellet* en 0.1 volum de tampó glicina 0.25N a pH 10.0
3. Incubar 30 min en gel
4. Durant la incubació, sonicar la mostra 2 cops amb 10 polsos 100% força (Bandelin Sonopuls)
5. Afegir 0.1 volum de PBS 2x
6. Centrifugar 2.000 x g durant 15 min a 4°C
7. Recuperar el sobrenedant i ultracentrifugar el sobrenedant 100,000 x g durant 1h a 4°C
8. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 100 µl PBS
9. Tractar 25 µl del concentrat amb proteïnasa K a concentració final de 10 µg/ml durant 1h a 37°C (veure apartat 8.8, annex de Materials i Mètodes)
10. Afegir 13 µl de tampó de càrrega sense agents desnaturalitzants (3x)
11. Incubar 5 min a 100°C i conservar a -20°C fins l'anàlisi per WB.

5.2.3. Estudis d'estabilitat

5.2.3.1. Teixits afectats per EET

L'estabilitat dels prions en ambients aquàtics es va avaluar mitjançant diverses soques causants d'EET. En primer lloc, es va estudiar l'inòcul d'*scrapie* salvatge descrit anteriorment, cedit pel Dr. Martí Pumarola (CReSA, UAB), així com l'inòcul BSE₁ cedit pel Dr. Juan Maria Torres (CISA, INIA). De la mateixa manera, es va disposar de l'inòcul *Dawson* d'*scrapie*, cedit pel Dr. Olivier Andréoletti (INRA, France), i de l'inòcul HP·Sc i HP·EEB, així com de l'inòcul EEB titulat en termes d'infectivitat,

cedits pel Dr. Jacques Grassi (CEA, France). Aquests últims 4 inòculs estan descrits en el capítol III d'aquest estudi descrits en el capítol III d'aquest treball, referent a l'estudi de la contaminació per prions en efluent d'escorxador.

5.2.3.2. Estabilitat d'EEB i d'*scrapie* en efluent d'escorxador

Es va analitzar la persistència de l'agent EEB i de l'agent *scrapie* en dos punts diferents de la xarxa d'aigua residual de l'escorxador B descrit en el capítol III d'aquest treball. Concretament, es va estudiar la mostra 'AT', corresponent a efluent no tractat, i la mostra 'E', corresponent a efluent tractat per floculació. Es van afegir 333 µl de HP·Sc (20%) en tres ampolles de vidre d'1L de capacitat que contenien cadascuna 400 ml de mostra 'AT', de mostra 'E' i de PBS. El mateix disseny experimental es va seguir en l'estudi de la persistència de l'agent EEB, afegint en aquest cas 333 µl de HP·EEB (20%). Totes les mostres es van mantenir sota una lleugera agitació (80 rpm) a 20°C (±2) fins al final de l'experiment. Alíquotes de 30 ml van ser seqüencialment recollides i conservades a -80°C abans de ser analitzades per a la presència de PrP^{sc} durant un període de 50 dies, concretament en els dies 0 (30 min després de la contaminació experimental de la mostra), i seguidament, en dies 1, 4, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, i 50. Totes van ser concentrades a 100 µl de TC emprant la metodologia desenvolupada i descrita en l'apartat '3.2.2. Sensibilitat del mètode de detecció' corresponent al capítol III d'aquest treball.

5.2.3.3. Estabilitat d'*scrapie* salvatge en aigua residual i aigua de mar

La supervivència de l'*scrapie* salvatge es va avaluar en dues matrius ambientals diferents. D'una banda, es va recollir aigua residual urbana de l'entrada de la planta depuradora de l'àrea de la ciutat de Barcelona, emmagatzemada en contenidors de plàstic d'1L i conservada a 4°C un màxim de 24h. Les característiques més essencials d'aquesta planta s'han descrit anteriorment. De l'altra, es va recollir també aigua de mar en la zona costera situada en front de la localitat de Gavà, que va ser igualment conservada a 4°C durant un màxim de 3 hores abans de l'inici de l'experiment per tal de mantenir intacta la microbiota natural.

Posteriorment, dues rèpliques de 300 ml de cada tipus d'aigua, així com de PBS, van ser cadascuna dopades amb 2.75 ml de l'homogenat d'*scrapie* salvatge i conservades a 20°C durant tot el desenvolupament de l'experiment. Al llarg d'aquest temps, es van recollir alíquotes de 20 ml en els dies 0 (30 min després d'afegir l'inòcul), 1, 4, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 112, 140 i 150. Les mostres d'aigua residual van ser processades tal com s'ha descrit anteriorment en l'apartat '5.2.2. Sensibilitat del mètode de detecció', mentre que les mostres d'aigua de mar van ser directament concentrades per ultracentrifugació en no presentar un contingut significatiu de matèria sòlida. Totes les alíquotes van ser concentrades a 200 µl de PBS, dels quals 25 van ser tractats amb proteïnasa K i analitzats per *western blotting* (apartat 8.19, annex de Materials i Mètodes).

5.2.3.4. Estabilitat d'EEB i d'*scrapie* Dawson en aigua residual

Sobre la mateixa mostra d'aigua residual urbana descrita anteriorment, es va determinar la supervivència de l'inòcul BSE₁ i de l'inòcul *Dawson scrapie*. Dues rèpliques de 500 ml d'aigua, així com de PBS, van ser contaminades amb 2.5 ml de l'inòcul *Dawson* al 20% (p/v) i amb 5.0 ml de l'inòcul BSE₁ al 10% (p/v), i mantingudes a 20°C durant tot l'experiment. Al llarg d'aquest temps, es van recollir alíquotes de 12 ml en els dies 0 (30 min després d'afegir l'inòcul), 7, 15, 21, 28, 45, 90, 120, 150, 180 i 265, que van ser concentrades a 100 µl PBS tal com s'ha descrit en l'apartat '5.2.2. Sensibilitat del mètode de detecció'.

5.2.3.5. Quantificació de PrP^{res} i anàlisi estadístic

Per tal de determinar la quantitat de PrP^{res} present en cada estudi, els films de *western blot* resultants van ser transformats en imatges digitals i la intensitat de les bandes de PrP^{res} analitzades mitjançant el programa *Image J*, un software per al processat i anàlisi d'imatges distribuït pel *National Institutes of Health* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). D'aquesta manera es van poder computar les corbes d'estabilitat de cada estudi en les que cada punt correspon a la intensitat de les tres bandes de PrP^{res} corregida respecte el soroll de fons.

Els resultats obtinguts van ser analitzats amb el programa SPSS 12.0 (SPSS, Inc.) per a l'anàlisi predictiu i el tractament de dades, en col·laboració amb el Dr. Miquel Calvo (Departament d'Estadística, Universitat de Barcelona). Concretament, es van definir els models de regressió que s'adaptaven millor a les corbes d'inactivació per a cada cas. Així, per als estudis en efluent d'escorxador, es van descriure models de regressió lineal, definits per $y_t = y_0 + at$, en el que y_t correspon al promig de la densitat integrada en un punt t , y_0 al valor corresponent en el punt 0 i a , la pendent de la recta. Per als estudis en aigua residual i aigua de mar, en canvi, es van descriure models de regressió lineal sobre la variable 'Densitat integrada' transformada a escala logarítmica, $\log y_t = y_0 + at$. Com a paràmetre descriptiu de la fiabilitat de la regressió, en cada gràfic es mostra el valor R^2 , així com els valors obtinguts per a la t_{90} i t_{99} , temps necessari per a la inactivació del 90% i 99% de l'indol inicial.

En segona instància, es va utilitzar l'anàlisi de la covariància per tal de comparar els pendents de les rectes de regressió de dos o més experiments simultàniament. Per exemple, en el cas dels efluent d'escorxador, el model té la forma:

$$y_t = y_{0,i} + a_i t$$

on $y_{0,i}$ i a_i són respectivament l'ordenada a l'origen i el pendent de la recta de l'experiment i -èssim. Segons el cas, el contrast de les diferents a_i permet determinar si hi han diferències significatives (amb $\alpha=0.05$) entre els patrons d'inactivació observats entre les matrius ambientals o entre les soques de prions utilitzades.

5.2.4. Bioassajos

En l'actualitat s'estan duent a terme estudis en ratolins transgènics sobre l'evolució de la infectivitat en el temps en el estudis d'estabilitat d'EEB i *scrapie Dawson* en aigua residual. Concretament, s'han pres les mostres obtingudes en els temps 0, 28, 150 i 265 dies d'incubació en presència d'aigua residual o de PBS. En cada cas, 12 ratolins transgènics han estat inoculats intracerebrament per a cada un dels temps i condicions citades. Les mostres procedents de les incubacions amb EEB han estat inoculades en ratolins transgènics que expressen la PrP bovina (BoPrP-Tg110), tasca duta a terme en el laboratori del Dr. Juan M^a Torres (CISA, INIA). Les procedents

d'incubacions amb *scrapie* han estat inoculades en ratolins transgènics que expressen la PrP ovina (Tg-ov 338) en el laboratori del Dr. Olivier Andréoletti (INRA, France).

En ambdós casos, s'està realitzant el seguiment dels animals per tal de valorar l'aparició de signes clínics causats per EET. S'utilitzen 10 criteris de diagnòstic diferents que són "caminar com un ànec", gepa prominent, pèl en mal estat, manca d'atenció, gran excitabilitat, incontinença, esquena aplanada, capacitat per beure, presència de lleganyes i pèrdua de pes. Segons els signes de progressió de la malaltia, els animals seran sacrificats seguint criteris ètics i el teixit encefàlic dels mateixos serà analitzat per a la presència de PrP^{res} mitjançant western blotting, ELISA (TeSeE[®] Bio-Rad) i mètodes immunohistoquímics habituals.

5.3. Resultats

5.3.1. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en aigua residual

Per tal de separar i concentrar els prions de la matriu ambiental, es va avaluar l'elució mitjançant detergents i l'elució mitjançant un tampó alcalí. Tal com s'ha descrit per a la detecció de virus en el capítol II d'aquest estudi, aquesta metodologia es basa en l'elució per tampó glicina i en diversos passos de concentració per ultracentrifugació. Per tal d'estudiar l'aplicabilitat d'aquesta metodologia, es va analitzar inicialment l'efecte del pH alcalí del tampó glicina sobre els agregats de prions en el procés de concentració. Així, l'inòcul BSE₁ va ser incubat amb el mateix tampó a diferents pH durant 30 min –el temps estimat d'incubació en el protocol de treball original-. Tal com s'observa en la figura 5.1, l'estabilitat de l'agent EEB va mostrar-se intacte en les solucions de pH inferior a 10.0, però no pas en la de pH 11. En aquesta s'observa la pèrdua de senyal després del tractament amb proteïnasa K, la qual cosa indica que l'estructura i resistència dels agregats es va veure afectada pel pH del tampó provocant un efecte major de la proteòlisi posterior.

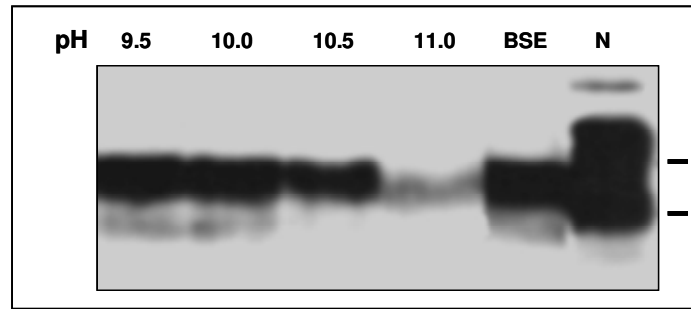


Fig. 5.1. Estabilitat d'EEB després de la incubació en tampó glicina a diferents graus d'alcalinitat. Es mostra també l'inòcul BSE₁ tractat amb PK (BSE) i homogeneïtzat d'encèfal sa no tractat amb PK (N).

Es va avaluar, aleshores, de forma comparativa, l'elució amb tampó glicina respecte a l'elució basada en detergents, concretament amb sarkosil (SK). A partir de mostres contaminades experimentalment, es va comparar la recuperació obtinguda en els *pellets* procedents d'ultracentrifugacions eluïts en tampó glicina alcalí (pH 10.0) o en sarkosil, així com després de l'elució directa de la mostra amb detergent. En tots els casos, les mostres van ser sotmeses a un procés de sonicació que induís un trencament dels agregats proteics. D'aquesta manera, es minimitza la pèrdua de prions en la centrifugació posterior, l'objectiu de la qual es l'eliminació del material groller en el que estaven adherits les proteïnes prioniques.

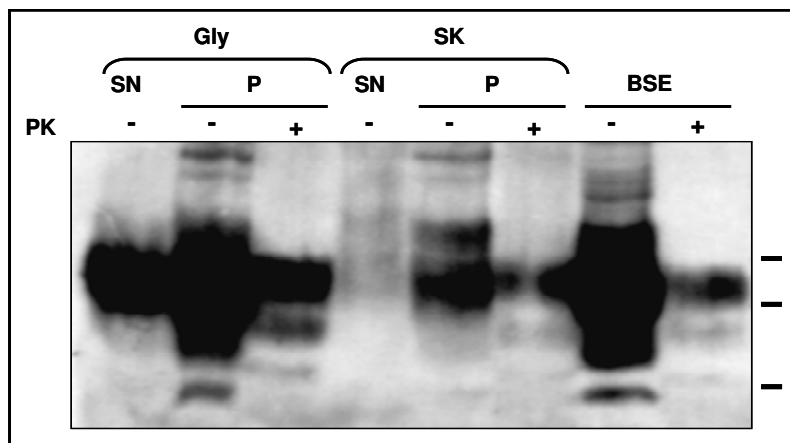


Fig. 5.2. Recuperació de PrP^{res} en la fracció sobrenedant (carrils SN) i la fracció *pellet* (carrils P) de dues mostres d'aigua residual contaminada experimentalment eluïdes mitjançant detergents (carrils SK) i el tampó glicina pH 10.0 (carrils Gly). Els carrils BSE corresponen a una concentració equivalent d'inòcul tractat en absència (-) i en presència (+) de PK sense ser sotmès al procés de dopatge i recuperació, sinó directament processat tal com es descriu en l'apartat 8.8 de l'annex de Materials i Mètodes.

L'elució amb el tampó glicina va mostrar, de forma sorprenent, una eficiència superior als altres tractaments. L'elució directa per detergent no va mostrar cap recuperació significativa de PrP^{sc}, segurament degut a l'excessiva dilució de l'inòcul, que no havia estat concentrat per centrifugació (dades no mostrades). En aquest sentit, el pas inicial d'ultracentrifugació aplicat a les altres rèpliques va permetre la concentració de l'homogeneïtzat afegit, que posteriorment va ser eluït de la matèria sòlida de forma més eficaç pel tampó glicina. Tal com s'observa en la figura 5.2, els nivells de PrP total i, més destacadament, de PrP^{res} van ser més elevats en la mostra eluïda amb tampó glicina que en la eluïda amb sarkosil, i inclús possiblement superiors al control positiu equivalent. Aquest darrer fet suggereix que la immunoreactivitat observable en el sobrenedant procedent del tractament glicina ha de consistir en PrP^c, ja que, tot i que no es va demostrar la seva sensibilitat o resistència a PK, pràcticament la totalitat de PrP^{res} es va detectar en la fracció del *pellet*.

En el cas de l'elució amb el detergent sarkosil, la baixa eficiència del mètode està marcada pel fet que cap de les fraccions analitzades mostra una quantitat considerable de PrP^{res} equiparable com a mínim al control positiu equivalent. El gruix de PrP^{res} podria aleshores haver precipitat junt amb el material particulat en el pas de centrifugació intermèdia, indicant que el detergent no va desadsorbir l'inòcul, o bé restar en el sobrenedant de l'última ultracentrifugació, cas en el que l'inòcul hauria estat detectat després de la precipitació de totes les proteïnes per metanol. Tanmateix, l'efecte antagònic del sarkosil respecte el metanol hauria pogut evitar la precipitació dels agregats més reduïts de l'inòcul.

El comportament de l'agent EEB es va analitzar en diverses solucions, concretament després de la seva incubació en aigua residual urbana, efluent d'escorxador, aigua desionitzada i PBS, tant en presència com en absència d'inhibidors de proteases. En la figura 5.3, la detecció de PrP^{res} és consistent en totes les matrius avaluades de forma independent al contingut en proteases propi de cadascuna, doncs no s'observen variacions significatives davant la presència o absència d'inhibidors de proteases ni després de perllongar la incubació fins a 2h. Cal destacar que la detecció en aigua desionitzada fou lleugerament més intensa que en les matrius ambientals i inclús

en PBS, fet que es pot interpretar com una estructuració més sòlida dels agregats PrP^{Sc} davant el tractament amb proteïnasa K.

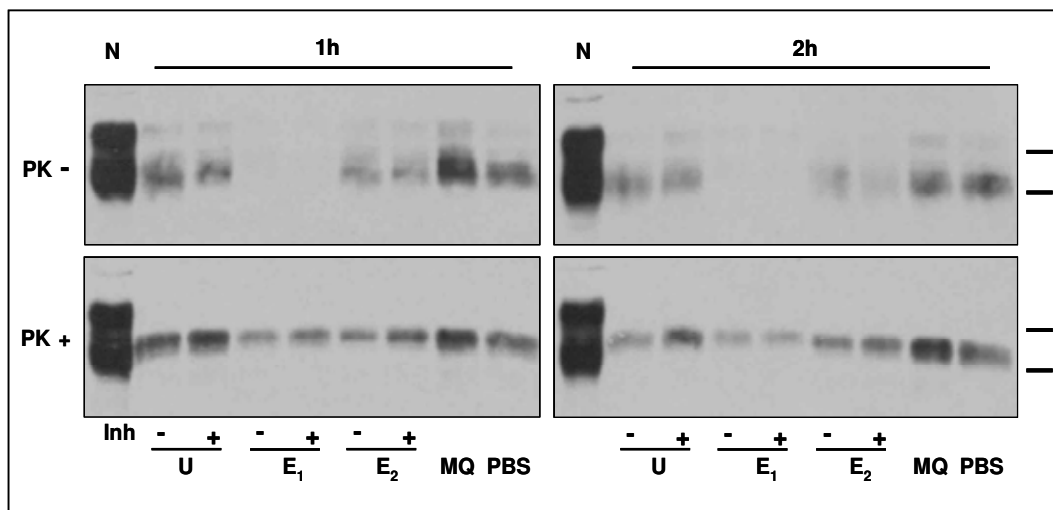


Fig. 5.3. Detecció de PrP (gels PK-) i de PrP^{res} (gels PK+) en diferents matrius (U, aigua residual urbana; E₁, efluent d'escorxador no tractat; E₂, efluent d'escorxador floculat; MQ, aigua desionitzada; PBS) en absència (Inh -) i presència (Inh +) d'inhibidors de proteases, després d'una incubació d'1h i 2h. Es mostra també homogeneïtzat sa no tractat amb PK (carrils N).

En el moment d'avaluar el contingut en PrP total, és a dir, sense aplicar un tractament previ amb PK, s'observa l'aparent desaparició de la molècula de PrP en els efluent d'escorxador no tractat i no pas en les altres matrius. Aquest fenomen es difícil d'explicar, però demostra la necessitat de l'aplicació de proteases per l'extracció de la molècula de PrP en certes matrius ambientals. Els resultats evidencien també la diferència de comportament entre l'aigua residual urbana i els efluent d'escorxador, segurament a causa de la diferència en la càrrega de matèria orgànica present en les dues mostres.

L'adhesió tan marcada dels agregats de prions a la matèria en els efluent respecte a l'aigua residual és coherent amb l'ús, en els primers, de detergents en els tampons d'elució (veure 'Capítol III: Estudi de la contaminació per prions en efluent d'escorxador'). Així, en aigua residual urbana, l'ús del tampó glicina alcalí és suficient per a l'elució dels prions, suggerint que les interaccions en aquesta matriu són més aviat de caràcter electrostàtic i no pas hidrofòbic.

Val a dir que la dificultat en l'elució de prions en aigües residuals d'escorxadador havia dut a creure que podia existir un fenomen de degradació ràpida en aquesta matriu, la qual cosa era l'objectiu d'aquest experiment. L'homogeneïtat, en tots els casos, dels resultats obtinguts en les rèpliques tant en presència com en absència d'inhibidors de proteases ja indicaven que l'activitat proteolítica de l'aigua residual no n'era la responsable, la qual cosa va ser confirmada per la manca d'una inactivació destacable després de 2h d'incubació.

5.3.2. Sensibilitat del mètode de detecció

La sensibilitat del mètode establert va ser avaluada en una mostra d'aigua residual contaminada amb l'inòcul d'*scrapie* salvatge. Per tal de determinar de forma aproximada l'eficiència de la recuperació, la quantitat de PrP^{res} continguda en aquest inòcul va ser analitzada prèviament.

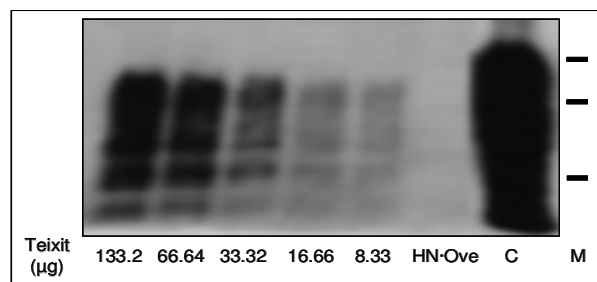


Fig. 5.4. Detecció de PrP^{res} en l'inòcul d'*scrapie* salvatge mitjançant el *Bio-Rad TeSeE-Purification Kit*. En la part inferior s'indica la quantitat de teixit (µg) analitzada en cada carril. Es mostra també homogeneïtzat encefàlic sa processat de la mateixa manera (carril HN-Ove) i homogeneïtzat sa no tractat amb PK (carril C).

Mitjançant un test de detecció estàndard, es va observar presència de PrP^{res} aproximadament fins a la dilució corresponent a 8.33 µg de teixit afectat (Fig. 5.4). Tenint en compte que aquest test presenta una elevada sensibilitat, comparable en certs casos als bioassajos en ratolins (Grassi *et al.*, 2001), aquest llindar de detecció és indicatiu del títol de PrP^{res} present en aquest inòcul

Finalment, es va avaluar la sensibilitat de la metodologia establerta, basada en l'elució mitjançant tampó glicina a pH 10.0 i concentració per ultracentrifugació, en una

bateria de rèpliques contaminades amb dilucions seriades de l'inòcul d'*scrapie* salvatge. La figura 5.5 mostra la recuperació de PrP^{res} en cadascuna de les mostres analitzades. Clarament, no es va identificar senyal de PrP en la mostra contaminada amb inòcul sa, mentre que en les contaminades amb inòcul afectat es pot establir un límit de detecció entre 10 i 5 µg. Aquest llindar correspon aproximadament al títol de PrP^{res} detectable en aquest inòcul aplicant el mètode de purificació de SAF (Bio-Rad). Els resultats suggereixen, doncs, una elevada eficiència de recuperació de PrP^{res} que s'obté segurament gràcies als passos d'ultracentrifugació utilitzats.

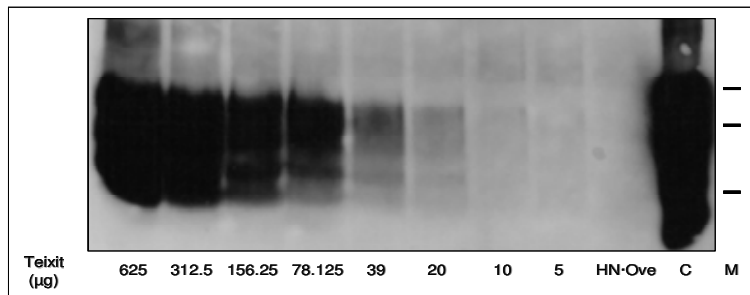


Fig. 5.5. Recuperació de PrP^{res} en una mostra d'aigua residual contaminada experimentalment amb *scrapie* salvatge mitjançant elució amb tampó glicina alcalí i ultracentrifugació. Aquesta mostra contaminada amb homogeneïtzat d'encèfal oví sa va ser processada de la mateixa manera (carril HN·Ove). Es mostra també homogeneïtzat d'encèfal sa no tractat amb PK (carril C).

5.3.3. Estudis d'estabilitat

5.3.3.1. Estabilitat d'EEB i d'*scrapie* en efluents d'escorxador

L'estabilitat de PrP^{sc} en efluents originats en els escorxadors va ser avaluada en dues mostres, 'AT' i 'E', corresponents a dos punts diferents de la xarxa d'aigües residuals, contaminades de forma experimental amb *scrapie* i EEB (concentració final d'inòcul en l'aigua, 0.016%). La supervivència d'aquest agents a 20°C va ser analitzada mitjançant la detecció de PrP^{res} al llarg d'un període de 50 dies i amb les dades obtingudes es van construir les corbes d'estabilitat (Fig. 5.6). Tant la PrP^{res} associada a *scrapie* com la associada a EEB van ser detectades en els efluents no tractats fins al final de l'experiment. No obstant, en els efluents que havien estat prèviament floculats, la caiguda de la senyal de PrP^{res} va ser més pronunciada. Concretament, la PrP^{res}

associada a *scrapie* es va detectar fins el dia 30 i l'associada a EEB, fins el dia 35. En les mostres contaminades de PBS, no es va observar cap descens significatiu en la senyal de PrP^{res} al llarg de tot l'experiment.

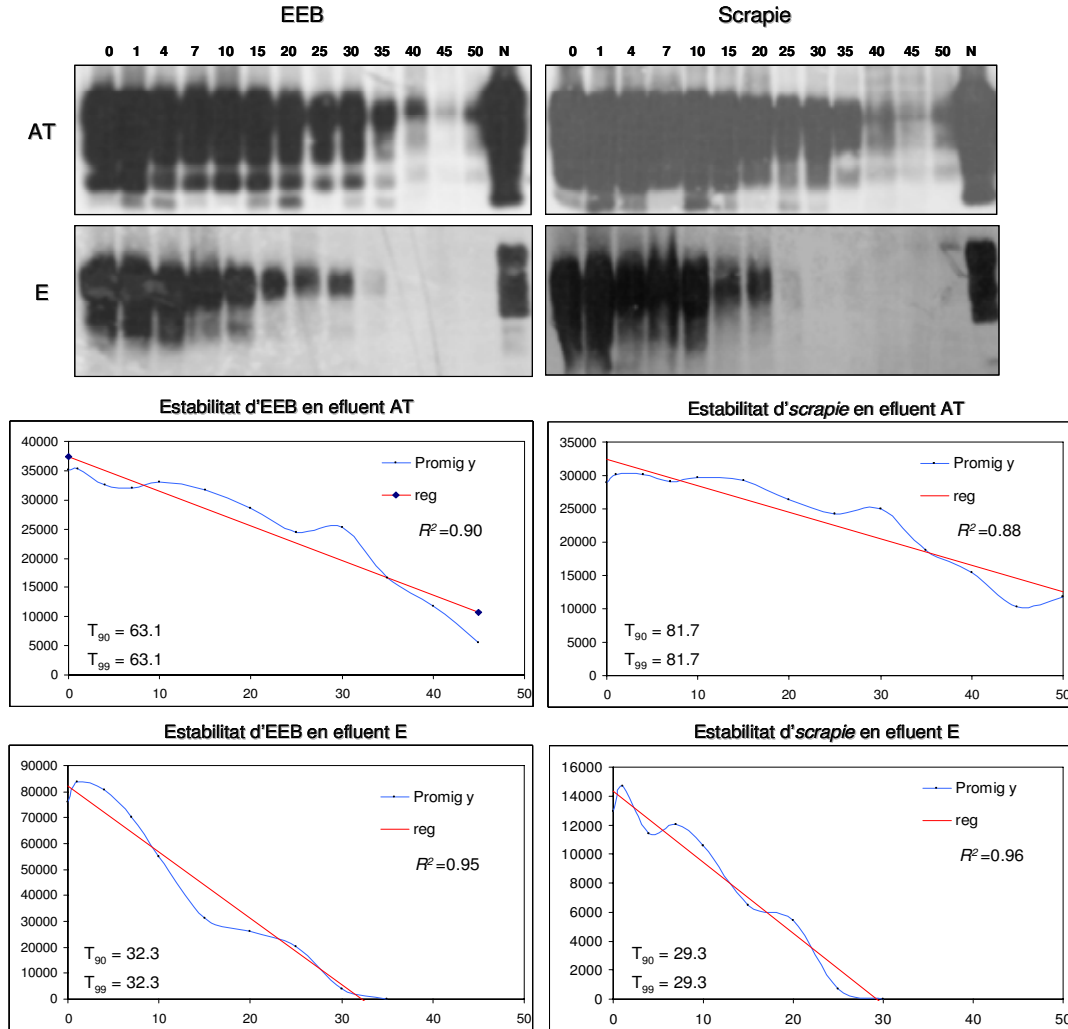


Fig. 5.6. Estabilitat de l'agent EEB i l'agent *scrapie* en efluent d'escorxador no tractat (AT) i floculat (E) durant un període de 50 dies. Es mostren els films de *western blot* i la regressió matemàtica desenvolupada en base al temps (eix d'abscisses) i a la intensitat integrada de la senyal corresponent a PrP^{res} (eix d'ordenades).

Per tal d'estimar la t_{90} i t_{99} (els temps necessaris per a la reducció d'un 90% i 99% de l'indòcul inicial), es van establir els models de regressió lineal per cada condició experimental. Les t_{90} i t_{99} d'*scrapie* en aigua residual no tractada es van estimar en 81.7 dies, mentre que en aigua residual tractada aquests valors es van reduir fins a 29.3 dies. Pel que fa a l'EEB, les t_{90} i t_{99} es van establir en 63.1 dies per a la mostra 'AT', i en 32.3

dies per a la mostra 'E'. No es van estimar les t_{90} i t_{99} per a PBS, ja que la durada de l'estudi no va permetre observar variacions significatives en la supervivència de PrP^{res}.

Els estudis de covariança realitzats sobre aquests 4 models van confirmar una variació significativa en les dinàmiques d'inactivació de cada soca de prions, representada en la comparació dels pendents de les rectes obtingudes. Així, l'agent EEB va mostrar un patró d'inactivació diferent (p-valor <0.001) en aigua residual crua (pendent -592.9) respecte a l'efluent prèviament floculat (pendent -2540). En canvi, l'agent *scrapie* va mostrar una inactivació més homogènia en les dues matrius (p-valor 0.257), doncs el pendent per a l'efluent no tractat (-396.4) fou molt similar al mostrat en efluent floculat (-488.46). Els dos agents van mostrar variacions significatives en les dinàmiques d'inactivació. En la matriu floculada, l'agent EEB s'inactivava molt més ràpidament (pendent -2540) que l'agent *scrapie* (pendent -488.46), sent la diferència altament significativa (p-valor <0.001). En la matriu no floculada, els pendents de l'agent *scrapie* (-396.4) va ser també diferent del de l'agent EEB (-592.9), si bé els p-vals indicaven una tendència menys rotunda (p-valor 0.024).

Els inòculs utilitzats en aquest estudi (HP-Sc i HP-EEB) havien estat prèviament calibrats mitjançant densitometria respecte a l'inòcul *Dawson* i un inòcul d'EEB, titulats tots dos en termes d'infectivitat, tal com es descriu en el Capítol III d'aquest treball. En concret, l'inòcul Dawson contenia $10^{7.5}$ DL₅₀ i l'inòcul EEB en contenia $10^{3.1}$. Tot i que el contingut de PrP^{res} present en un homogeneïtzat no és sempre proporcional a la infectivitat del mateix, en aquest estudi hem aproximat el descens en la intensitat de senyal de PrP^{res} a la reducció de dosis infeccioses per tal d'establir una estimació de la pèrdua del títol infecciosos durant la incubació en els efluentes. D'acord amb la concentració final d'inòcul en les diferents matrius i les quantitats carregades en WB, la quantitat de PrP^{res} present en les mostres corresponents a t_0 per a totes les condicions fou equivalent a la continguda en 250 µg de teixit afectat tant per a EEB com per a *scrapie*. Això correspon a 0.755 DL₅₀ en ratolí en el cas d'EEB i $10^{3.6}$ DL₅₀ en ratolí per a *scrapie*. En cas dels efluentes floculats, la senyal de PrP^{res} havia desaparegut transcorreguts 30 dies per a *scrapie* i 35 per a EEB. Tenint en compte que els llimars de detecció del test es van establir en $6 \cdot 10^{-3}$ i $10^{1.5}$ DL₅₀ per a EEB i *scrapie* respectivament, el títol infecciosos d'ambdues soques va ser, com a mínim, reduït en dos

logaritmes després de 35 dies d'incubació en aigua residual prèviament sotmesa a tractament primari.

5.3.3.2. Estabilitat d'*scrapie* salvatge en aigua residual i aigua de mar

A partir d'un cas d'*scrapie* oví es va establir un homogenat ric en PrP^{Sc} que va ser utilitzat per a determinar les taxes d'inactivació d'aquest agent en ambients aquàtics com ara l'aigua de mar i l'aigua residual procedent de l'entrada d'una planta de tractament d'aigües. En ambdós casos, les matrius van ser mantingudes a 20°C i els nivells de PrP^{res} van ser analitzats a diferents temps tal i com es mostra en la figura 5.7.

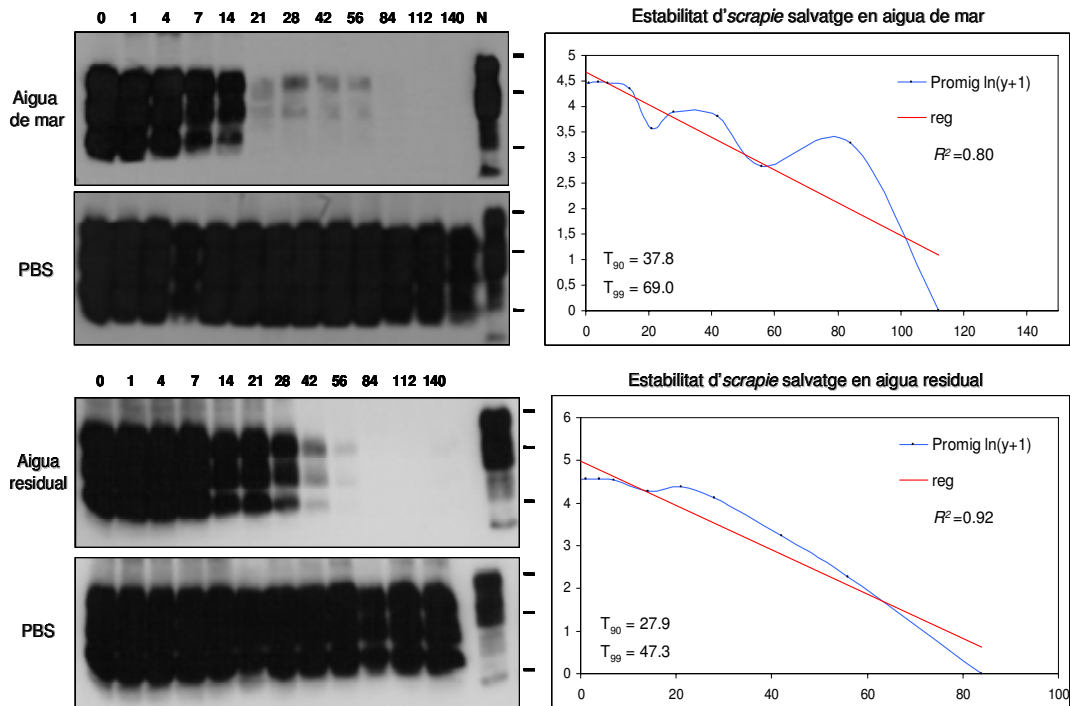


Fig. 5.7. Reducció dels nivells de PrP^{res} associada a *scrapie* salvatge en aigua residual urbana i aigua de mar durant un període de 140 dies. Es mostren els films de *western blot* i la regressió matemàtica desenvolupada en base al temps (eix d'abcisses) i a la intensitat integrada de la senyal corresponent a PrP^{res} (eix d'ordenades, escala logarítmica).

Tant en aigua residual urbana com en aigua de mar, la senyal de PrP^{res} va desaparèixer al llarg de l'estudi, mentre que es va mantenir gairebé intacta durant els 140 dies analitzats en els respectius controls duts a terme en PBS. En computar els models de regressió, la t_{90} estimada en l'aigua de mar va resultar ser 10 dies superior a la corresponent en aigua residual a causa d'una lleugera diferència en els pendents

observats: -0.032, en aigua de mar, i -0.0516, en aigua residual. Aquesta diferència, però, es va mostrar significativa en l'estudi de covariància (p-valor 0.025).

5.3.3.3. Estabilitat d'EEB i d'*scrapie* en aigua residual

D'una forma similar als estudis anteriors, es va determinar el patró d'inactivació de l'agent EEB (concretament, l'inòcul BSE₁) i de l'agent *scrapie* Dawson en aigua residual. Al llarg d'un estudi de fins a 265 dies, es van determinar els nivells de PrP^{res} de cada inòcul en la matriu ambiental i en una solució control de PBS. Els resultats obtinguts es mostren en la figura 5.8.

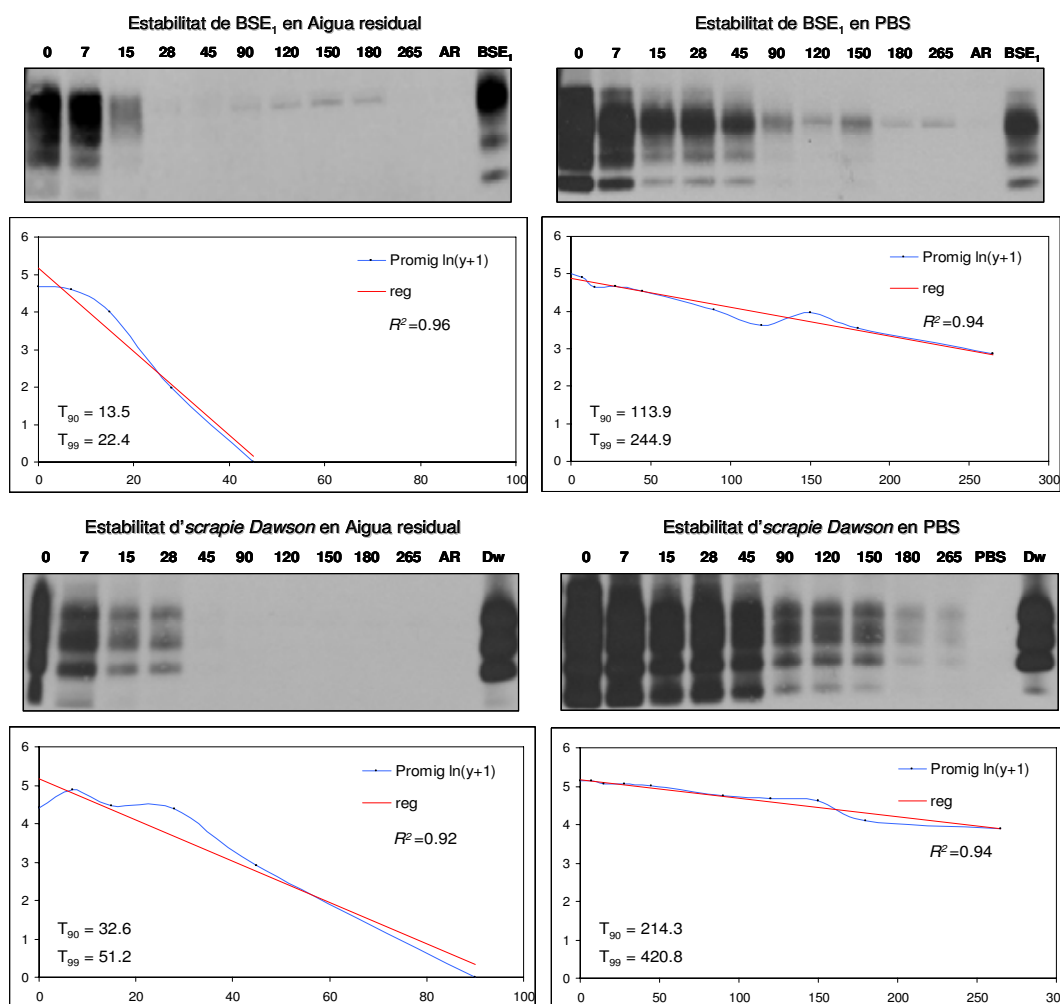


Fig. 5.8. Descens dels nivells de PrP^{res} d'EEB i d'*scrapie* Dawson en aigua residual urbana durant un període de 265 dies. Es mostren els films de *western blot* i la regressió matemàtica desenvolupada en base al temps (eix d'abscisses) i a la intensitat integrada de la senyal corresponent a PrP^{res} (eix d'ordenades, escala logarítmica).

Tant en el cas de la PrP^{res} associada a EEB com en el cas de la PrP^{res} associada a *scrapie Dawson*, les senyals van descendir fins a nivells indetectables durant l'estudi. No així, en els controls realitzats en PBS, on totes dues soques van ser detectades fins al final de l'experiment. Els models de regressió lineal van mostrar un temps d'incubació en aigua residual remarcablement reduït per a la inactivació del 90% de l'inòcul EEB, concretament 13.5 dies. Aquest va ser lleugerament superior al doble ($t_{90} = 32.6$ dies) per a *Dawson*. Aquesta proporció va correlacionar també en el cas de les incubacions en PBS, on la t_{90} per a EEB va ser estimada en 113.9 dies, i en 214.3 dies per a *Dawson*.

Tal com s'ha dit anteriorment, el número de dosis infeccioses presents en l'inòcul *Dawson* havia estat prèviament determinat en $10^{7.5}$ DL₅₀ intracerebrals en ratolí per cada gram de teixit. D'acord al disseny experimental aplicat en aquest estudi, les mostres corresponents al t_0 analitzades en el film de WB contenien uns nivells de PrP^{res} equivalents als presents en 600 µg de teixit infectat, és a dir, $10^{4.27}$ DL₅₀. La sensibilitat del test de detecció va ser determinada en l'inòcul d'*scrapie* salvatge i no pas en la soca *Dawson*. Tanmateix, assumint aquest llindar de detecció com 5-10 µg de teixit, el mètode detectaria l'equivalent a $10^{2.2}$ - $10^{2.5}$ DL₅₀ en les darreres mostres positives de les corbes d'estabilitat d'*scrapie*. Així, doncs, en aquest estudi hem estimat una reducció d'aproximadament 2 logaritmes d'infectivitat de la soca *Dawson* d'*scrapie* transcorreguts 45 dies d'incubació en aigua residual urbana. Això està en consonància amb l'estimació descrita segons el model de regressió, en el que la t_{99} ha estat calculada en 51.2 dies.

L'estudi de la covariança sobre els patrons d'inactivació de 3 soques de prions – EEB, *Dawson* i *scrapie* salvatge- en l'aigua residual urbana utilitzada va revelar diferències significatives en la supervivència de l'agent EEB i l'agent *scrapie Dawson* (p-valor <0.009) i entre l'agent EEB i l'agent *scrapie* salvatge (p-valor <0.001). No es van detectar, en canvi, diferències significatives entre els patrons de supervivència de l'*scrapie* salvatge i l'*scrapie* de referència *Dawson*, la qual cosa concorda en tractar-se de dues soques diferents del mateix agent infecciosos. Cal destacar que es va detectar una variació significativa (p-valor 0.002) de les dinàmiques d'inactivació de l'agent EEB i de l'agent *Dawson* ja en absència de la matriu ambiental comparant les dinàmiques d'inactivació de l'agent EEB, indicant ja una menor estabilitat d'aquest últim.

5.4. Discussió

L'estudi de l'estabilitat de prions en ambients aquàtics requeria del desenvolupament d'una metodologia adequada capaç de concentrar i eluir els prions a partir de mostres ambientals. Els estudis desenvolupats en el Capítol III d'aquesta tesi suggerien l'aplicació de detergents per tal de permetre el procés d'elució. Certament, l'homogeneïtzació i detecció de proteïnes priòniques en efluents d'escorxador és altament difícil sense l'ajut de detergents adequats per a aquest tipus de proteïna. Això es deu a la capacitat d'adsorció i agregació de les molècules de PrP entre elles i al material particulat (Gale i Stanfield, 2001; Johnson *et al.*, 2006). Era, doncs, lògic l'ús de detergents en el desenvolupament d'un mètode per a aigua residual urbana. No obstant, els primers assajos d'incubació i posterior detecció ja van revelar l'existència de propietats d'adsorció diferents en cada tipus de matriu ambiental (Fig. 5.3). Es va avaluar, aleshores, dues estratègies per eluir i concentrar els prions a partir d'aigua residual: la primera, basada en la separació usant un tampó alcalí i la segona, basada en l'ús del detergent sarkosil. D'acord amb les dades obtingudes en aquest estudi, l'aplicació del tampó glicina va ser el mètode més eficient (Fig. 5.2). El tampó glicina a pH alcalí és força utilitzat per a l'elució de partícules víriques a partir de matrius ambientals i ha estat àmpliament usat en el Capítol II per a la detecció d'adenovirus. El pH alcalí permet modificar les càrregues electrostàtiques presents en la superfície de la càpside dels virus induint la seva separació del material sòlid. L'eficiència d'aquest tampó indica que les interaccions dels prions en l'aigua residual urbana són també majoritàriament electrostàtiques.

El canvi de càrrega en els residus ionitzables de la proteïna priònica depèn del seu punt isoelèctric, *pI*. En diferents experiments d'electroforesi en dues dimensions, Bolton i cols. (1985) van determinar els punts isoelèctrics de diversos isòmers de PrP^{sc} en un rang situat entre pH 4.6 i 7.9. Posteriorment, Vasina i cols. (2006) han estimat el *pI* de la proteïna priònica recombinant, PrPrec, en 9.77. En el nostre experiment, l'alcalinitat del tampó glicina va ser determinat a partir d'un compromís entre el grau de modificació dels residus ionitzables (alta alcalinitat) i la pèrdua de resistència al tractament amb proteïnasa K (baixa alcalinitat). El pH establert experimentalment (pH 10.0) va ser, doncs, prou superior al *pI* com per permetre la desadsorció de la PrP^{sc}. Cal destacar que totes les determinacions sobre la força d'ionització del tampó emprat van

ser curiosament considerades a jutjar pels experiments descrits per Vasina i cols. (2006) on la PrPrec (pI 9.77) no era separada de minerals com la mica en solucions de pH des de 4.0 fins 9.0, i tan sols ho era en pH 12.5. D'altra banda, Johnson i cols. (2006) han reportat també la impossibilitat de desadsorbir la PrP^{Sc} de certs tipus de terres fins i tot usant solucions de pH tan alts o baixos respecte als pI de la PrP^{Sc} com pH 2.5 o pH 11.5, indicant que cap tampó iònic té efecte sobre la PrP quan les interaccions que s'estableixen amb la matriu són de caràcter no electrostàtic.

La sensibilitat de la metodologia desenvolupada sobre l'ús de tampó glicina va ser avaluada en un experiment de dilució límit i va mostrar-se equivalent a la detecció de SAF mitjançant el *Bio-Rad TeSeE[®] Purification kit*. Aquest resultat sorprenent sols pot explicar-se per l'ús de diversos passos d'ultracentrifugació en la nostra metodologia. Diversos estudis de diagnòstic clarament suggereixen que els mètodes que usen majors quantitats de material inicial i passos d'ultracentrifugació són més sensibles inclús que alguns dels test ràpids disponibles en el mercat (Stack, 2004). Aquest és el cas del mètode de l'OIE (*Office International des Epizooties*), desenvolupat a partir d'estudis previs (Hope *et al.*, 1988; Beekes *et al.*, 1995), que ha estat capaç de donar resultats vàlids en estudis no concloents, el més destacat dels quals ha estat el diagnòstic dels primers casos dels anomenats casos atípics d'*scrapie* (Benestad *et al.*, 2003). En el protocol OIE, forces gravitacionals de fins a 177,000 xg durant 2h 30 min són aplicades per precipitar agregats de PrP^{Sc} sonicats, indicant la gran disrupció que la sonicació produeix en els agregats de PrP^{Sc}. Aquestes dades permeten explicar, doncs, els resultats obtinguts en la Fig. 5.2 (vegeu apartat 5.3.2. Desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en aigua residual) i suggereixen que les forces de centrifugació aplicades després de l'elució dels prions amb sarcosil no van ser prou elevades com per precipitar agregats de PrP^{Sc} sonicats en presència d'aquest detergent. Aquestes proteïnes no van ser, a més, detectades en el sobrenedant romanent degut a l'efecte antagònic del sarcosil i el metanol.

En general, el desenvolupament d'un mètode per a la detecció de prions en aigua residual, junt amb el mètode per a la detecció en efluents d'escorxador (veure Capítol III), ha permès realitzar diferents estudis sobre l'estabilitat d'aquests agents infecciosos en les citades matrius ambientals. En aquests estudis, s'ha procurat establir corbes d'inactivació completes que permetin estimar acuradament les dinàmiques

d'inactivació. Això és degut a que sovint s'utilitza el pendent inicial de la corba per a predir el temps necessari per a una completa inactivació, conduint a una subestimació en corbes que, després d'un declivi inicial, es suavitzen i persisteixen en el temps, com és el cas de la soca 263K d'*scrapie* sotmesa a autoclau (Taylor *et al.*, 1996). Aquesta persistència, que en el cas de microorganismes convencionals es justifica per la heterogeneïtat de les poblacions, sembla estar causada en el cas de prions per l'efecte protector de l'agregació que pot ocórrer durant la incubació en homogenats infectats (Taylor, 1999) Per contra, en corbes d'inactivació completes, la destrucció de l'agent infecciosos sovint es produeix de forma exponencial, de manera que graficant les dades en una escala logarítmica, s'obté una línia recta indicant que la taxa d'inactivació és constant. Aquest patró constant es comparteix en tots els estudis d'estabilitat presentats en aquest capítol.

Els agents causants de les EETs són agents altament resistents. Sobreviuen a la inactivació per autoclau o a la exposició a solucions químiques i processos físics utilitzats comunament per a la inactivació de virus convencionals (Taylor, 2002). Fins i tot sobreviuen als processos de *rendering* aplicats als residus animals en les últimes dècades (Taylor *et al.*, 1998). Com a alternativa a aquests processos, Kirchmayr i cols. (2006) han estudiat la inactivació dels prions per digestió anaeròbica i han observat una major estabilitat de l'EEB bovina en comparació a l'EEB murina i a l'*scrapie* murí.

D'acord amb les dades obtingudes sobre la supervivència dels prions en efluent crús i efluent floculat d'escorxador, es van establir models de regressió lineal per a poder determinar les dinàmiques d'inactivació de cada agent. En aquests models, els patrons de degradació són comparables en les seves pendents i no pas en els valors t_{90} obtinguts, ja que aquests depenen de la variabilitat pròpia de l'ordenada a l'origen (sensibilitat de l'assaig, film de *western blot*). Prenent, doncs, els pendents de les regressions lineals, s'ha observat una major estabilitat de l'agent *scrapie* respecte a l'agent EEB, ja que la seva inactivació no depèn de manera significativa de la matriu ambiental utilitzada, tot i que sobreviu lleugerament millor en efluent no tractat. Aquesta dada està en consonància amb la consideració general que l'*scrapie* és més resistent a la proteòlisi que l'EEB (Kuczius *et al.*, 1999; Baron *et al.*, 2004). No obstant, s'ha determinat clarament l'efecte de la matriu en la inactivació d'EEB, ja que, en primer lloc, la seva estabilitat (i la d'*scrapie*) no es veu afectada en absència de la

matriu ambiental (cas PBS), i, en segon lloc, la taxa d'inactivació en l'aigua residual floculada és pràcticament el doble que la reportada en aigua residual sense tractar. Es probable que la major presència de matèria orgànica procedent dels processos de floculació i sedimentació provoqui la desestabilització de soluts i partícules de natura hidròfoba (com ara membranes i restes cel·lulars) i, en conseqüència, de les fibres de PrP^{sc}, tenint en compte l'àvida afinitat de les proteïnes prioniques per aquest tipus de partícules (Prusiner *et al.*, 1980).

En termes d'infectivitat, en aquest estudi s'ha estimat degradació en efluent floculat en dos logaritmes després de 35 dies d'incubació a 20°C. En termes de títol de PrP^{res}, s'ha estimat la pèrdua en un logaritme (t_{90}) en 32.3 dies. Per la seva banda, Kirchmayr i cols. (2006) han quantificat la caiguda en el títol de prions durant el procés de digestió anaeròbica en un ordre de magnitud després de 302 hores (12.5 dies, aproximadament) d'incubació en condicions termofliques (55°), però no han descrit cap reducció significativa després de 382 hores (16 dies, aproximadament) d'incubació sota condicions mesofliques (35°C). És possible que les diferències en els valors de supervivència mostrats en aquests dos estudis radiquin en la proporció d'inòcul respecte la matriu ambiental, que correspon a 0.016% (p/v) en el nostre experiment i a 0.48% en el de Kirchmayr i cols., ja que, a causa de l'alta tendència de les proteïnes prioniques a formar agregats, concentracions d'inòcul elevades permetrien als prions sobreviure durant períodes de temps més prolongats. No obstant, en general, doncs, tot i que no són comparables (tipus de matriu, temperatura, càrrega orgànica i microbiològica), aquestes dades denoten l'existència d'una moderada supervivència dels agents causants d'EET en les aigües residuals resultants dels processos de manipulació que reben els caps de bestiar en els escorxadors.

Pel que fa als estudis duts a terme en altres ambients aquàtics, com són l'aigua residual urbana i l'aigua de mar, els resultats es van ajustar a un model de regressió lineal a escala logarítmica. L'ús d'aquests models no permet una comparació amb les dades obtingudes en els estudis realitzats sobre efluent d'escorxadors, però permet, en canvi, una comparació de les t_{90} i t_{99} obtingudes per a cada condició, doncs tots els models van presentar valors en l'ordenada a l'origen molt similars fruit de l'aplicació del mateix disseny experimental. Així, es va produir una inactivació lleugerament més ràpida de l'agent *scrapie* salvatge testat en aquest estudi en aigua residual respecte aigua

de mar. No es va produir, en canvi, una inactivació aparent al llarg de 140 dies en PBS. Aquest patró contradiu, en part, les dades de supervivència de virus en ambients aquàtics com són l'aigua residual i de mar, on generalment en aquesta última l'acció proteolítica de les bacteries marines incideix en una menor persistència (Rzezutka i Cook, 2004). Tot plegat, reafirma la diferència de comportament entre els prions i els virus.

La diferència de comportament entre les diferents soques de prions es va evidenciar en els estudis desenvolupats en aigua residual. La inactivació d'EEB va ser més ràpida que la d'*scrapie*, tant la soca salvatge com la soca de referència *Dawson*. En absència de matriu ambiental, la inactivació per a *scrapie Dawson* fou gairebé la meitat de la estimada per a EEB. Aquesta proporció es va mantenir en presència d'aigua residual, sols que les t_{90} es van reduir en ambdós casos entre 6 i 8 cops per efecte de la matriu ambiental. Les dades corroboren de nou la major estabilitat de l'agent *scrapie* respecte a l'EEB. En aquest estudi, a partir de la detecció de PrP^{res} s'ha estimat un descens de, com a mínim, 2 logaritmes d'infectivitat associada a *Dawson* després de 45 dies d'incubació en aigua residual. L'evolució de la infectivitat en relació a la caiguda del títol de PrP^{res} està sent actualment analitzada mitjançant bioassajos en ratolins transgènics. Donat que la infectivitat present en els homogeneïtzats utilitzats està en el rang de 10^7 - 10^8 per gram de teixit, la infectivitat inicial (mostra a temps 0 sense incubar a temperatura ambient) inoculada en cada animals està en el rang de 10^3 - 10^4 , d'acord a les condicions d'inoculació emprades). Es valorarà, doncs, la taxa de desaparició de la infectivitat a partir d'aquests rangs en les mostres incubades en aigües residuals en comparació amb les incubades en PBS tant per a EEB com per *scrapie*. Aquests descens de la infectivitat es valora mitjançant la disminució en el percentatge d'animals infectats i en l'augment dels temps d'incubació dels mateixos.

5.5. Annex: Survival of prion proteins in aquatic environments

Survival of BSE and scrapie agents in aquatic environments

Carlos Maluquer de Motes¹, Maria Jesus Cano², Juan Maria Torres², Martí Pumarola.³,
and Rosina Girones^{1*}

Environmental contamination is considered as a potential mechanism of transmission of prion diseases. Sheep scrapie and cervid CWD epizootics are thought to be maintained by natural horizontal transmission through the environment. Survival of prion agents in aquatic environments are hereby evaluated as the decay of BSE and scrapie associated PrP^{res} content in spiked sewage and seawater samples, as well as PBS controls. Western blotting densitometric data were plotted in logarithmic scale against time and constant death rates were obtained for each condition. By means of the covariance analysis, BSE inactivation pattern was shown to be statistically different from those of Dawson mouse-passaged scrapie and sheep scrapie in sewage and even in PBS. Natural seawater and sewage has shown significant inactivating activity with t_{99} values of 69 and 47 days, respectively for sheep scrapie. According to the data, prions may be stable for years in buffered solution as PBS.

¹ Department of Microbiology, University de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

² Centro de Investigacion en Sanidad Animal, CISA-INIA, Crta. Algete a El Casar, sn, Valdeolmos 28130, Madrid, Spain

³ PRIOCAT Laboratory, CReSA, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain

*For correspondence: E-mail: rgirones@ub.edu Telephone number: +34 934021483. Fax number: +34 934039347.

Introduction

Prions are the causative agent of transmissible spongiform encephalopathies (TSE), such as scrapie in sheep, chronic wasting disease (CWD) in deer and elk, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, and several forms of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans. All of them are fatal neurodegenerative disorders involving accumulation of the disease-associated isoform of the prion protein known as PrP^{sc}. Whether PrP^{sc} is the essential or the unique constituent of the infectious agent remains controversial (Prusiner, 1982; Weissmann, 1991), though it is considered the only direct molecular marker for the disease (Bolton et al., 1982; Farquhar et al., 1996).

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) epidemics and the identification of a new variant of Creutzfeldt-Jakob disease (nvCJD) provoked serious concerns worldwide about food-producing animals and human feed chain. Eradication of prion proteins have become an objective of the highest priority which has led to several measures, such as the feed ban of meat and bone meal (MBM), exclusion of animal by-products for human feed chain, or incineration of suspected and confirmed TSE-cases. However, TSE infectivity is shown to noticeably resist inactivation procedures commonly applied for conventional microorganisms. Autoclaving, heating and popular chemical deactivation protocols are ineffective (Taylor 2000). Moreover, rendering procedures traditionally applied to meat and bone meal has been demonstrated not to completely destroy BSE or scrapie agents (Taylor et al., 1995), which suggests that BSE might be caused by survival of the scrapie agent in animal foodstuff. Thus, controlling and eliminating of prion proteins faces the extreme resistance of the agent and the lack of information about its transmissibility.

Transmissibility of prion agents has been widely assessed since BSE was thought to be linked to nvCJD (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997). Both epidemics seem to have been sustained by prion contamination in feed chain and no horizontal transmission has been described. Despite this, reports on the transmission of scrapie and BSE after blood transfusion in sheep

(Hunter et al., 2002) as well as transmission of vCJD from human to human (Llewelyn et al., 2004) have raised concerns about unrecognized sources of prion contamination. Conversely, animal-to-animal transmission through the environment undoubtedly contributes to maintain epizootics of scrapie in sheep and CWD in deer and elk populations (Hoinville, 1996; Miller and Williams, 2003). Miller et al. (2004) have demonstrated that healthy mule deer could be infected with CWD after inhabiting paddocks previously contaminated by excreta or decomposed carcasses of CWD-affected animals. Scrapie is known to be transmitted through contaminated environments where is able to remain for years (Woolhouse et al., 1998). Remarkably, scrapie infectivity persisted after burial in soil for at least 3 years (Brown and Gajdusek, 1991) and for years in some environments (Greig, 1940; Palsson, 1979). All these data suggest the role of the environment as a reservoir for prion diseases.

In the last years, several reports have studied the kinetics of adsorption and desorption of prions to different common soil minerals (Revault et al., 2005; Vasina et al., 2005; Rigou et al, 2006). In some of these studies, PrP^{sc} has been shown to be strongly sequestered near the soil surface while keeping all the infectious properties (Johnson et al., 2006). These data indicates that TSE agents released to the environment might be retained and come in contact with livestock and wildlife populations. The persistence of infectious prion particles in the environment for years implies also an exposure for other animal species and raises the possibility of cross-species transmission. This has been recently exemplified by a wild moose testing positive for CWD in USA (Johnson et al., 2006). As a source for environmental contamination with prions, shedding of prions after ingestion of BSE and scrapie agents has been recently demonstrated (Maluquer de Motes et al., submitted for publication), but other routes, such as burial of infected carcasses, are currently being investigated (Rapp et al., 2006). The main epidemiological implication of these collective data is the potential increase of the risk of reinfestation of ruminants grazing pastures. However, it is also worthy the

potential contamination of surface water by mineral particles transported by erosion and the vertical contamination of groundwater by colloid-facilitated transport in percolation processes (Vasina et al., 2006). In a risk assessment study, Gale et al. (1998) had already estimated a low epidemiological risk of infection with BSE in an aquifer located downwards a rendering plant. However, as the authors emphasized, extrapolations and further discussion are limited by the lack of experimental data, especially about the stability of TSE infectious agents in aquatic environments. Persistence of PrP^{sc} and PrP^{BSE} in wastewater from slaughterhouses has been evaluated in a previous study (Maluquer de Motes et al., submitted for publication). The aim of this work is, thus, to study the survival of scrapie and BSE agents in sewage and seawater, as a first approximation for evaluating the potential risk related to the persistence of prions in the environment.

Material and Methods

Brain samples

Both BSE and scrapie infected brain were used for the development of a methodology for the recovery of prions from sewage. Thus, a pool of brainstem of 49 BSE infected cattle, named BSE₁, was kindly supplied by Dr. Juan M^a Torres (CISA, INIA, Spain) (Castilla et al., 2003). This inoculum had been titrated to be 10⁸ mouse i.c. LD₅₀. As scrapie, brain from a sheep naturally incubating scrapie was homogenized (10% p/v) in PBS and used as scrapie inoculum. The PrP^{sc} content of this inoculum was analyzed using the Bio-Rad TeSeE Purification kit.

For the stability studies, another scrapie inoculum consisting in a pool of brains infected by the Dawson strain was kindly provided by Dr. Olivier Andreoletti (INRA/ENVIT, Toulouse, France). This inoculum has previously been titrated in terms of infectivity by intra cerebral inoculation (i.c.) in transgenic mice (tg338) as containing 10^{7.5} LD₅₀/g of tissue.

Sewage and seawater samples

Sewage was collected at the entry of a depuration plant receiving 670,000 m³/day from

the urban area of Barcelona, with a population of approximately 1,800,000 inhabitants. On the other hand, seawater samples were collected from the Mediterranean coastal area of Barcelona. All samples were gathered in sterile 1-L polyethylene containers and kept at 4°C for less than 4h before their use in the stability experiments.

Stability in Glycine Buffer

The stability of PrP^{sc} in glycine buffer 0.25N at different pH was analyzed. This buffer has been widely used for the recovery of viral particles from environmental sources at alkaline pH, usually pH 9.5 (Pina et al., 1998). BSE₁ samples were spiked in glycine buffer at pH ranging from 8 to 11 and incubated at RT for 30 min after a brief sonication for 10 sec (Bandelin Sonopuls). Subsequently, all samples were ultracentrifugated for 1 h at 100,000 xg at 4°C and the pellets were resuspended in PBS and analyzed by western blot as described further.

Method for recovery of prions from sewage

In order to develop a reliable methodology for recovery of prion proteins from sewage, some experimental conditions were evaluated. Briefly, 50-ml sewage samples previously spiked with 500 µl of 10% scrapie were concentrated by ultracentrifugation (100,000 x g for 1h at 4°C) to pellet all fragments of brain homogenate in suspension. Pellets obtained were eluted either with 5 ml Glycine Buffer (0,25 N, pH 10,0) or with 5 ml PBS (pH 7,2) supplemented with sarkosyl (SK) 5% (w/v). Samples were, then, kept in ice for 30 min and sonicated in order to disrupt prion aggregates. Particulate matter was separated by centrifugation at 2000 xg for 15 min at 4°C and the supernatants obtained were reconcentrated by ultracentrifugation (100,000 x g for 1h at 4°C). The final pellets were dissolved in 100 µl of PBS.

Sensibility of the method

At the end of these experiments, a methodology was defined for the recovery of prions from sewage. The sensitivity of the method was then analyzed spiking 8 replicates of 10 ml sewage replicates with 2-fold serially-diluted scrapie

brain homogenate (10%, i.e. 100 mg/ml of brain tissue), so that brain homogenate amounts corresponding to 25 μ l (5 mg) until 0.2 μ l (40 μ g) were added. Samples were then concentrated by ultracentrifugation (100,000 xg 1h 4°C) and the pellets eluted with 1 ml of glycine buffer at pH 10.0. After a brief step of sonication, samples were incubated at 4°C for 30 min and, subsequently, centrifuged at 2,000 xg for 15 min at 4°C in order to pellet all the particulate material. Supernatants were then collected and ultracentrifuged (100,000 xg 1h 4°C) and the pellets obtained were dissolved in 100 μ l PBS.

BSE and Dawson survival in sewage

Two sterile beakers containing 250 ml of sewage and two other containing 500 ml of PBS were spiked with 5.0 ml of Dawson scrapie brain homogenate (10%). The same experimental design was applied for the study of the BSE persistence. All the samples were kept at 20°C during the experience. Twelve ml of each beaker were sampled and analyzed for the presence of PrP^{res} within a 265-days period on days 0 (30 min after), 7, 15, 21, 28, 45, 90, 120, 150, 180, and 265. Samples were concentrated to 100 μ l PBS and stored at -80°C until the experience was ended.

Scrapie survival in sewage and seawater

Two sterile beakers containing 300 ml of seawater and two other containing 300 ml of PBS were spiked with 2.75 ml of 10% scrapie brain homogenate. All the samples were kept at 20°C during the experience. Twenty ml of each beaker were sampled and analyzed for the presence of PrP^{res} within a 150-days period on days 0 (30 min later), 1, 4, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 112, 140 and 150. All sewage aliquots were processed as described until a final concentration in 100 μ l. Seawater aliquots were directly concentrated to 200 μ l as no significant particulate matter was present. All concentrates were stored at -80°C until the experience was ended.

PK treatment and western blotting analysis

Twenty-five μ l of each sample concentrate were treated with proteinase K (Roche) for 1h at 37°C

at a final concentration of 20 μ g/ml. Laemmli buffer without reducing agents were then added and samples were boiled for 5 min before analysis by Western blotting.

Denatured samples were loaded onto sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gels (SDS-PAGE, 12%) and proteins fractionated for 1h at 200 V. The gel proteins were then blotted onto PVDF-membranes at 100v for 1h, and probed with the mAb SHa31 covalently linked to horseradish peroxidase at a 1:2000 dilution for 30 min at RT. The mAb SHa31 recognizes a linear epitope sequence, GNDYEDRY, located at residues 145-152, (Morel et al., 2004). Immunoreactive bands were visualized by the ECL-Plus developer kit (GE Healthcare).

PrP^{sc} quantification and analysis of results

In order to quantify the amounts of PrP^{res} detected by a non-quantitative technique such as western blotting, films were transformed into digital pictures and band intensities analyzed by means of the Image J, an open source image-processing and analysis software distributed by the National Institutes of Health (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Values corresponding to the integrated density of all 3 PrP^{res} bands within each well were analyzed with the SPSS 12.0 (SPSS, Inc.) in order to compute inactivation curves. For each experiment, we computed a linear regression model with the logarithm of the estimated concentration of PrP^{res} expressed as integrated density. More precisely, the model is $\log y_t = \log y_0 + at$, where y_t is the mean of the values of y at time t , y_0 is the value at time 0, and a is the slope of the regression curve. As a parameter of the reliability of the regression curve, R^2 value is shown in each graphic, as well as the t_{90} and t_{99} values (time of incubation necessary for the inactivation of the 90% and 99% of the initial inoculum).

In a second analysis, scopes for every condition were compared using a covariance analysis. That allowed us to identify significative differences ($\alpha=0.05$) among inactivation patterns observed between environmental matrices and/or prion strains.

Results

Methodology for PrP^{sc} detection in sewage

In order to detach and concentrate prions from the environmental matrix, two strategies were evaluated. Spiked samples were concentrated by ultracentrifugation and pellets were sonicated and eluted with either glycine buffer or with PBS supplemented with detergent sarkosyl. The alkalinity of the glycine buffer was previously selected in an experiment of incubation with different pH ranging from 8.0 to 11.0. BSE-associated PrP^{sc} was invariably detected until pH 10.0, but dramatically dropped at pH 11.0, indicating that sonicated PrP^{sc} aggregates were not stable at this pH to resist the subsequent PK treatment (Fig.1).

When both strategies for detaching PrP from sewage samples were evaluated, buffer glycine was more efficient. As it is shown in Figure 2, PrP and PrP^{res} recovery was higher in the glycine treatment in comparison to the sarkosyl treatment and even to the equivalent positive control loaded directly onto the western blot. This suggests that the immunoreactivity observed in the supernatant of the glycine buffer was constituted by molecules of PrP^c, as, although PK sensibility was not determined, the majority of PrP^{res} was detected in the pellet fraction. On the opposite, the low efficiency of the sarkosyl treatment is clearly exemplified by the fact that any of the fractions analyzed showed considerable amounts of PrP^{res} comparable to the equivalent positive control. The main PrP^{res} content might thus be precipitated with the solid material during the brief centrifugation, indicating that the detergent did not detach prions from the matrix, or alternatively prions were retained in the supernatant. Though proteins in the supernatant were precipitated with methanol to avoid the effect of dilution, the contrary behaviour of sarkosyl and methanol could have led to an underestimation of the PrP content in this fraction.

Sensitivity of the method

The sensitivity of the method was assessed using sheep scrapie brain homogenate. A serie of 8 replicates of sewage were spiked with diluted amounts of inoculum and processed as

described in Material and methods, whereas SAF contained in the same inoculum were also comparatively purified (Fig. 3). Using the TeSeE[®] rapid test, PrP^{res} was detected until dilution corresponding to 8.33 µg of infected tissue. Similarly, the limit of detection observed for the developed methodology ranged from 5 to 10 µg of infected tissue. The convergence of the thresholds suggests that the designed method was capable of recover all the PrP^{res} aggregates contained in a homogenate, at least those detectable by the more sensitive rapid tests. This high efficiency is probably achieved by the application of ultracentrifugation steps.

BSE and Dawson survival in sewage

By means of the developed methodology, the inactivation pattern of BSE and Dawson agents in sewage was assessed. During a 265-days study, levels of PrP^{res} of each inoculum were determined in presence and absence (PBS) of the environmental matrix. Subsequently, regression models for each condition were computed (Fig. 4). In both experiments, PrP^{res} detection in sewage fell down until undetectable levels during the study. That was not the case for PBS controls where PrP^{res} was detected until the end of the experiment. Regression model for BSE showed a remarkably reduced time for the 90% inactivation (t_{90} 13.5 days) in sewage, while almost the double for Dawson scrapie (t_{90} 32.6 days). This different proportion between prion strains correlated also for PBS controls, where BSE t_{90} was estimated in 113.9 days and Dawson t_{90} was estimated in 214.3 days.

As it has been mentioned, Dawson homogenate had previously been titrated as containing $10^{7.5}$ i.c. LD₅₀ per gram of infected tissue. According to the experimental design applied, Dawson-associated PrP^{res} amounts loaded into the t_0 samples corresponded to the quantity contained in 600 µg of infected tissue which is equivalent to $10^{4.27}$ LD₅₀. The sensitivity of the test was not determined for the Dawson scrapie brain homogenate, but assuming 5-10 µg of tissue as a general threshold, the method would be detected the equivalent of $10^{2.19}$ - $10^{2.5}$ LD₅₀ in the last positive samples in blots. Thus, in this study, we have estimated a decay of 2 logarithms of infectivity for Dawson scrapie after 45 days of

incubation. This is in marked agreement with the estimation done by the regression curve where t_{99} was calculated in 51.2 days.

Analysis of the covariance between the inactivation patterns of BSE and Dawson scrapie in sewage proved to be statistically significant (p -value <0.009). Interestingly, significant differences were also detected between BSE and scrapie inactivation dynamics in PBS (p -value 0.002).

Sheep scrapie survival in sewage and seawater

The survival of sheep scrapie was evaluated in two different environmental matrices, such as sewage and seawater. The levels of PrP^{res} were determined in presence and absence of the matrix during a 150-days period and regressions were computed according to the data obtained (Fig. 5). Both in sewage and seawater, scrapie-associated PrP^{res} signal disappeared during the study, but kept constant in PBS during 150 days. No regression curves were thus computed for PBS. These results are in marked contrast with data obtained for Dawson scrapie, where PrP^{res} titer was clearly reduced after this period of time. It is worth noting that the same experimental design (see Material and Methods) was applied to both experiments.

In these experiments, estimated t_{90} for seawater was 10 days longer than that for sewage according to a less pronounced slope for the former case. This difference was shown to be significant in the covariance analysis (p -value 0.025).

The comparison among the stability patterns of all three strains in sewage indicated that the slopes between the scrapie brain homogenate and BSE agent in sewage were also proved to be statistically significant according to the covariance analysis (p -value <0.001), as in the case of Dawson. However, stability patterns of the scrapie homogenate and Dawson strain did not show any significant difference, as expected being strains of the same prion agent.

Discussion

The existence of sources of prion infectivity in the environment represent a risk for the control of prion diseases since horizontal transmission

and persistence of prion agents have proved to maintain certain epidemics. Thus, behaviour of PrP^{sc} in the environment needs to be further characterized. In the past years, new research has been developed in some fields involving prion diseases and the environment, such as adsorption and desorption patterns of prion proteins from minerals (Rigou et al., 2006; Revault et al., 2005; Vasina et al., 2006), infectivity properties of trapped prions in soil (Johnson et al., 2006) or degradation of infectivity from buried carcasses in soil (Rapp et al., 2006). However, to date, no experimental data are available concerning prion proteins and aquatic environments. In a recent study, the presence of PrP^{sc} in wastewaters from slaughterhouses where BSE cases had been diagnosed was analyzed in a preliminary study (Maluquer de Motes et al., submitted for publication). We concluded that the epidemiological risk for humans is very low, confirming what was previously reported by risk assessment studies (Gale et al, 1998). In that work, the persistence of BSE and scrapie agents in slaughterhouse wastewater was also assessed.

The development of a reliable methodology for the recovery of prions from sewage faced the need of an effective elution buffer able to detach prions from this environmental matrix. Previous experiences in slaughterhouse wastewater strongly recommended the use of detergents. At the same time, viruses and other pathogens are usually desorbed from sewage by means of ionizing buffers, indicating that main interactions with the matrix are electrostatic. We comparatively studied both strategies, exemplified in the use of detergent sarkosyl and buffer glycine at pH 10.0. According to the results obtained in this work, glycine buffer was proven to be more effective, suggesting that prion protein interactions in sewage were mainly electrostatic.

The effect of glycine buffer directly depends on the ionisable residues of a protein and its isoelectric point (pI), as the buffer induces a change on the global charge of the molecule resulting in a detachment from a surface. In the case of prion proteins, Bolton et al. (1985) had already determined isoelectric points of some

charge isomers of PrP^{Sc} ranging from approximately pH 4.6 to 7.9. Vasina et al. (2006) have also estimated the pI of the recombinant prion protein in 9.77. In our experiment, alkalinity was determined as a compromise between the alteration of the ionisable residues (high alkalinity) and the loss of resistance to PK treatment (low alkalinity). The pH applied was thus enough superior to allow desorption of PrP^{Sc} solid material diluted in sewage. It is worth noting that all considerations about the ionizing power of the eluting solution were carefully analyzed taking into account reports of experiments where PrP^{Sc} was only detached using buffers at pH 12.5 (Vasina et al., 2006). However, Johnson et al. (2006) failed to desorb PrP^{Sc} from montmorillonite (an expandable silicate clay mineral) using pHs ranging 2.5 to 11.5, clearly indicating that no ionic buffer has effect when no electrostatic interactions are involved.

Sensitivity of the method was assessed in a limit dilution experiment with sheep scrapie brain homogenate. The described method was shown to be equivalent in sensitivity to the Bio-Rad TeSeE Purification kit when a brain homogenate with equivalent amounts of tissue was tested. This result could be explained by the use of ultracentrifugation steps in our protocol. Certainly, several diagnostic studies have suggested that methods that have larger amounts of starting material and ultracentrifuge steps are more sensitive than some of the more rapid tests (Stack, 2004). For instance, the Office International des Epizooties (OIE) method, developed from earlier published methods (Hope et al. 1988; Beekes et al., 1995), was able to give conclusive results in the first report of atypical scrapie cases (Benestad et al., 2003). In this protocol, gravitational forces of 177,000 xg for 2h 30 min are applied to precipitate any PrP^{Sc} aggregates previously sonicated. These results explained those reported in Fig. 2, as the applied ultracentrifugation step was not enough to pellet disrupted PrP^{Sc} aggregates in the presence of sarkosyl. Prion proteins remained, thus, in the supernatant, but were not detectable even after being methanol precipitated, because of the antagonistic effect of the sarkosyl.

In general terms, the development of a methodology for the recovery of prion proteins from sewage has allowed us to establish stability studies of BSE and scrapie agents in this matrix. In these studies, we have tried to establish full inactivation curves even analyzing samples after 265 days of incubation. That comes from the fact that if the initial steep decline in infectivity is used to predict the time necessary to achieve complete inactivation, large underestimations may be introduced, at least for tailing-type curves, which shows an initial fall and then flattens and persists with time, as is the case for 263K scrapie subjected to autoclaving (Taylor et al., 1996). In our computed models, data generated in each condition were plotted on a logarithmic scale obtaining a straight line showing a constant rate of inactivation. These regression models permit also to compare the scopes of each regression which is used to compare dynamics of inactivation among prion strains and environmental matrices.

The analysis of the covariance applied in this work has shown statistically significant differences among the inactivation patterns obtained for BSE and scrapie in sewage and even in PBS. BSE disappeared more quickly than scrapie, either sheep scrapie or the reference Dawson strain. That is in agreement with the general consideration that BSE is less stable than scrapie (Kuczius *et al.*, 1999; Baron *et al.*, 2004). Obviously, the effect of the matrix was clearly observed, as in its presence survival was approximately reduced 6-8 fold in comparison. Taking only results for sheep scrapie, the inactivation pattern was also dependent on the matrix used, as survival in sewage was estimated to be lesser than in seawater. Interestingly, that is in marked contrast with survival rates reported for other pathogens as viruses, which are thought to be less stable in marine environments due to the proteolytic activity of marine bacterial populations (Girones et al., 1989; Rzezutka and Cook, 2004).

All these considerations are in accordance with the previous studies done in slaughterhouse wastewater. Although data are not directly comparable due to the mathematical regression

models utilized, BSE was also shown to be less stable than scrapie either in raw wastewater or in flocculated wastewater. According to the covariance analysis, scrapie proved to be inactivated in the same manner in both kinds of samples, while BSE greatly reduced its survival in flocculated wastewater. In those studies, the degradation occurred in flocculated effluents were estimated as 2 logarithms for BSE after 35 days of incubation at 20°C and 30 days for scrapie. In this work, 2 logarithms of Dawson infectivity are estimated to be inactivated after 45 days of incubation. Taken together, the results indicate a limited survival of prion agents in the wastewater matrices studied.

The evolution of the infectivity in time is currently being investigated in rodent models. More precisely, in a series of ongoing experiments, sample concentrates of BSE and Dawson incubated in the presence and absence

of environmental matrix have been intracerebrally inoculated in a series of ongoing bioassays experiments. That will permit to correlate the decay of infectivity in comparison to the PrP^{res} levels reported in this work and will ensure the real time needed for the complete inactivation of prion agents in the aquatic environments studied.

Acknowledgements

The authors are greatly indebted to Olivier Andréoletti and Jacques Grassi for supplying us with Dawson titrated brain homogenate and mAb Sha31, respectively. Carlos Maluquer de Motes is a fellow of the Spanish Government. This research was financed by the research project EET2001-4814-C02 from the former Spanish Ministry of Education and Science.

References

- Baron, T., Crozet, C., Biacabe, A. G., Philippe, S., Verchere, J., Bencsik, A., Madec, J. Y., Calavas, D., and J. Samarut.** 2004. Molecular analysis of the protease-resistant in scrapie and bovine spongiform encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice. *J Virol* **78**: 6243-6251.
- Beekes, M., E. Baldauf, S. Cassens, H. Diringer, P. Keyes, A. C. Scott, G. A. Wells, P. Brown, C. J. Jr. Gibbs, and D. C. Gajdusek.** 1995. Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method. *J. Gen. Virol.* **76**:2567-2576.
- Benestad, S. L., P. Sarradin, B. Thu, J. Schonheit, M. A. Tranulis, and B. Bradberg.** 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.* **153**:202-208.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley, and S. B. Prusiner.** 1982. Identification of a protein that purifies with scrapie prion. *Science* **218**:1309-11.
- Bolton, D. C., R. K. Meyer, and S. B. Prusiner.** 1985. Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J. Virol.* **53**:596-606.
- Brown, P. and D. C. Gajdusek.** 1991. Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* **337**:269-270.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, H., Fraser, H., and Bostock, C. J.** 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**:498-501.
- Castilla, J., A. Gutierrez Adan, A. brun, B. Pintado, M. A. Ramirez, B. Parra, D. Doyle, M. Rogers, F. J. Salguero, C. Sanchez, J. M. Sanchez-Vizcaino, and J. M. Torres.** 2003. Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch. Virol.* **148**:677-691.
- Farquhar, C. F., J. Dornan, R. C. Moore, R. A. Somerville, A. M. Tunstall, and J. Hope.** 1996. Protease-resistant PrP deposition in brain and non-central nervous tissues of a murine model of bovine spongiform encephalopathy. *J. Gen. Virol.* **77**:1941-1946.

- Gale, P., Young, C., Stanfield, G., and D. Oakes.** 1998. Development of a risk assessment for BSE in the aquatic environment. *J Appl Microbiol.* **84**:467-477.
- Girones, R., J. Jofre, and A. Bosch.** 1989. Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *J. Environ Quality.* **18**:34-39.
- Greig, J. R.** 1940. Scrapie observations on the transmission of the disease by mediate contact. *Vet. J.* **96**:203-206.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J., and P. Lantos.** 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**:448-450.
- Hoinville, L. J.** 1996. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev. Sci. Tech.* **15**:827-852.
- Hope, J., L. J. Reekie, N. Hunter, G. Multhaup, K. Beyreuther, H. White, A. C. Scott, M. J. Stack, M. Dawson, and G. A. Wells.** 1988. Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein. *Nature* **336**:390-392.
- Hunter, N., J. Foster, A. Chong, S. McCutcheon, D. Parnham, S. Eaton, C. Mackenzie, and F. Houston.** 2002. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.* **83**:2897-2905.
- Johnson, C. J., K. E. Phillips, P. T. Schramm, D. McKenzie, J. M Aiken, and J. A. Pedersen.** 2006. Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog.* **2**:296-302.
- Kuczius, T. and M. H. Groschup.** (1999) Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol Med* **5**: 406-18.
- Llewelyn, C. A., P. E. Hewitt, R. S. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie, and R. G. Will.** 2004. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**:417-421.
- Miller, M. W. and E. S. Williams.** 2003. Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature* **425**:35-36.
- Miller, M. W., E. S. Williams, N. T. Hobbs, and L. L. Wolfe.** 2004. Environmental sources of prion transmission in mule deer. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1003-1006.
- Pálsson, P. A.** 1979. Rida (scrapie) in Iceland and its epidemiology. In: Prusiner, S. B., and W. J. Hadlow, eds. Slow transmissible diseases of the nervous system: volume I. New York: Academic Press; 1998. p.357-366.
- Pina, S. M. Puig, F. Lucena, J. Jofre, and R. Girones.** 1998. Viral pollution in the environment and shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3376-3382.
- Prusiner, S. B.** 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**:136-144.
- Rapp, D., P. Potier, L. Jocteur-Monrozier, and A. Richaume.** 2006. Prion degradation in soil: possible role of microbial enzymes stimulated by the decomposition of buried carcasses. *Environ. Sci. Technol.* **40**:6324-6329.
- Revault, M., H. Quiquampoix, M. H. Baron, and S. Noinville.** 2005. Fate of prions in soil: trapped conformation of full-length ovine prion protein induced by adsorption on clays. *Biochim. Biophys. Acta* **1724**:367-374.
- Rigou, P., H. Rezaei, J. Grosclaude, S. Staunton, and H. Quiquampoix.** 2006. Fate of prions in soil: adsorption and extraction by electroelution of recombinant ovine prion protein from montmorillonite and natural soils. *Environ. Sci. Technol.* **40**:1497-1503.
- Rzezutka, A., and N. Cook.** 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:441-453.
- Stack, M. J.** 2004. Western immunoblotting techniques for the study of transmissible spongiform encephalopathies. In Lehman, S., and J. Grassi, eds. Techniques in prion

- research. Birkhäuser-Verlag, Basel, 2004. p. 97-116.
- Taylor, D. M.** 2000. Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. *Vet. J.* **159**:10-17.
- Taylor, D. M., and K. Fernie.** 1996. Exposure to autoclaving or sodium hydroxide extends the dose-response curve of the 263K strain of scrapie agent in hamsters. *J. Gen. Virol.* **77**:811-813.
- Taylor, D. M., S. L. Woodgate, and M. J. Atkinson.** 1995. Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. *Vet. Rec.* **137**:605-610.
- Vasina, E. N., P. Déjardin, H. Rezaei, J. Grosclaude, and H. Quiquampoix.** 2005. Fate of prions in soil: adsorption kinetics of recombinant unglycosylated ovine prion protein onto mica in laminar flow conditions and subsequent desorption. *Biomacromolecules* **6**:3425-3432.
- Weissmann, C.** 1991. A “unified theory” of prion propagation. *Nature* **352**:679-683.
- Woolhouse, M. E., S. M. Stringer, L. Matthews, N. Hunter, and R. M. Anderson.** 1998. Epidemiology and control of scrapie within a sheep flock. *Proc. Biol. Sci.* **265**:1205-1210.

Figures

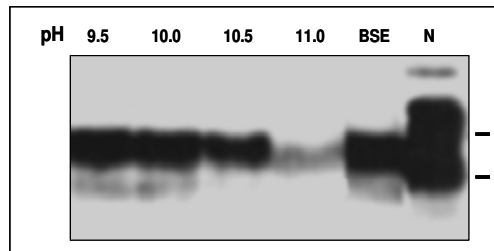


Fig. 1. Stability of BSE after incubation in buffer glycine at pH ranging from 9.5 to 11.0. Untreated non-affected cattle brain (lane N) and molecular marker bands of 35.1 and 28.4 kDa of are also shown.

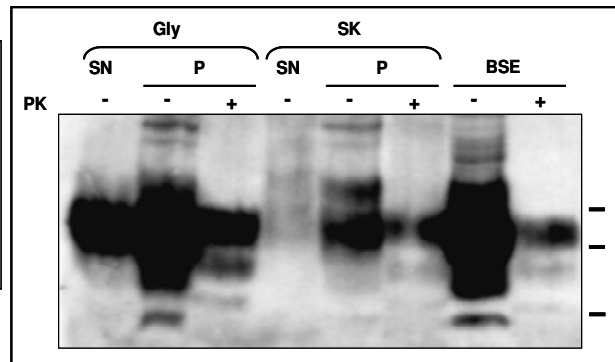


Fig. 2. Recovery of PrP^{res} in supernatant (lanes SN) and pellet (lanes P) fractions in BSE-spiked sewage concentrated by procedure using glycine buffer (lanes Gly) or using detergent sarkosyl (lanes SK). Pellets are shown either treated (PK+) or non-treated (PK-) with proteinase K.

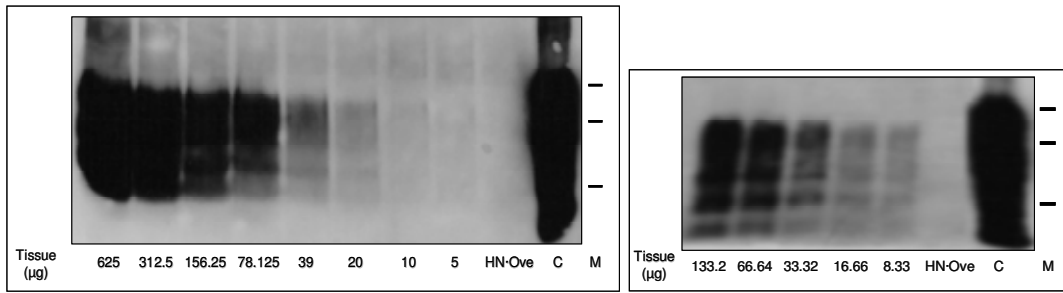


Fig. 3. Sensitivity of Glycine buffer mediated recovery of prions in sewage (A). The PrP^{res} content of the inoculum is also shown (B). Tissue amounts loaded in each line are indicated below. The figure shows molecular marker ranging 35.1, 28.4 and 20.8 kDa.

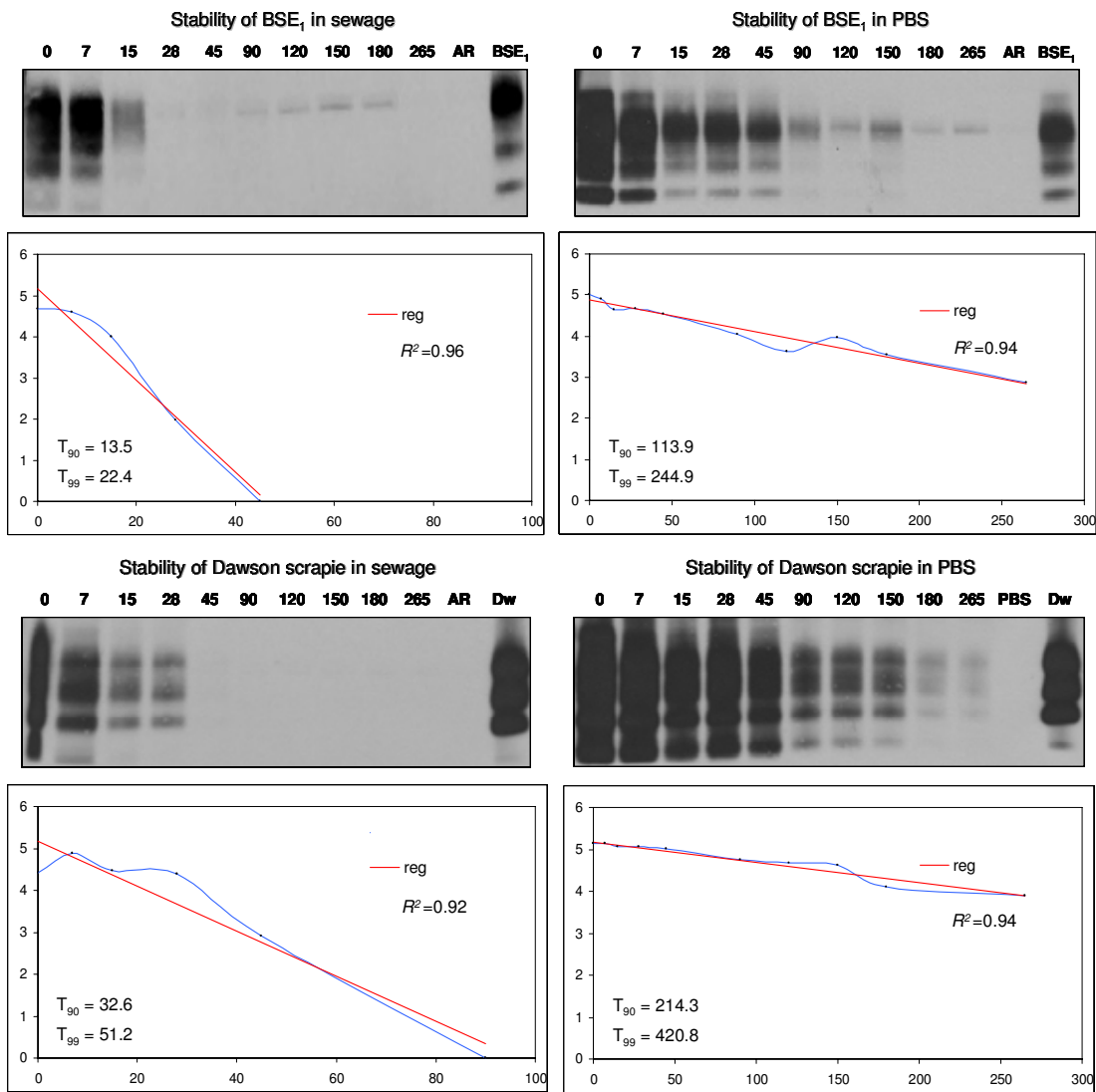


Fig. 4. Stability of BSE and Dawson scrapie in sewage and PBS measured as the reduction of PrP^{res} levels during a 265-days period. Integrated density values from western blotting analysis are plotted in logarithmic scale to time (days). Regression line, residue value and t_{90} and t_{99} are indicated.

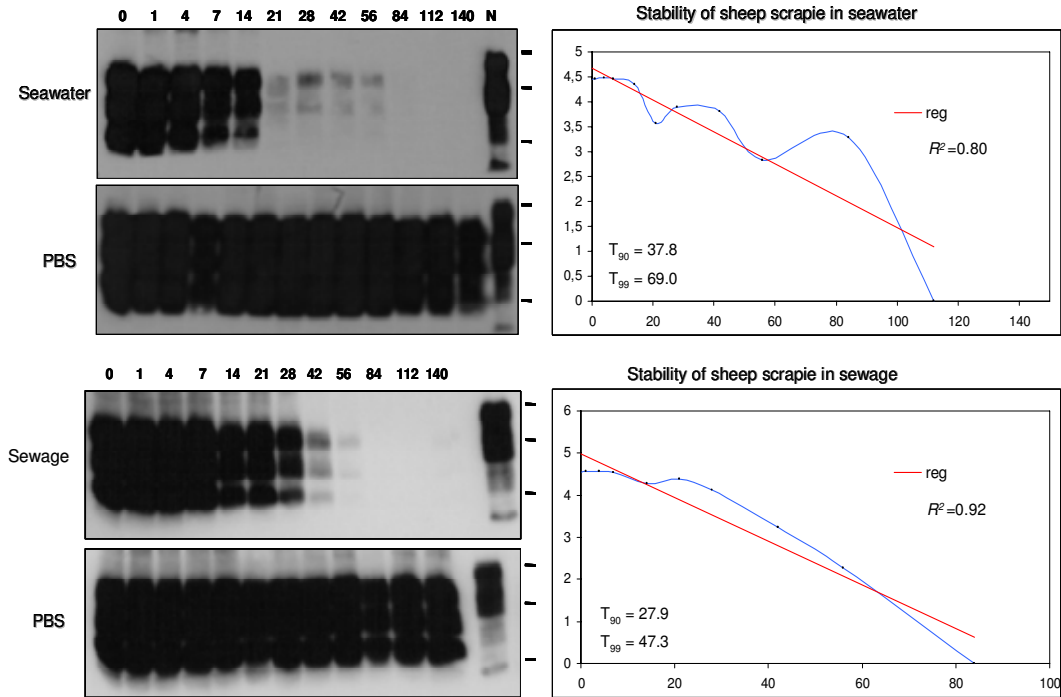


Fig. 5. Stability of scrapie brain homogenate in sewage and seawater, as well as in PBS controls, measured as the reduction of PrP^{res} levels during a 140-days period. Integrated density values from western blotting analysis are plotted in logarithmic scale to time (days). Regression line, residue value and t_{90} and t_{99} are indicated.

Capítol VI: Conclusions

Les conclusions principals d'aquest estudi són:

1. S'han dissenyat assajos específics de PCR niada per a la detecció i semiquantificació d'adenovirus porcins i bovins en mostres fecals i ambientals.
2. S'han identificat adenovirus bovins en 6/12 mostres de *pools* de femtes de bestiar boví, identificant-se virus pertanyents als dos gèneres descrits, *Atadenovirus* i *Mastadenovirus*, i s'ha realitzat un estudi filogenètic de les soques detectades.
3. L'anàlisi d'adenovirus porcins segons el protocol desenvolupat és un bon marcador de contaminació fecal d'origen porcí, donada l'elevada prevalença d'aquests virus en mostres fecals provinents de les 7 mostres estudiades. Els virus identificats van ser tipcats com adenovirus porcí tipus 3.
4. S'ha desenvolupat una metodologia per a la detecció de prions en els efluents generats en escorxadors, basada en tècniques de centrifugació, homogeneïtzació, digestió amb proteïnasa K i anàlisi per *western blotting*. El protocol descrit presenta una sensibilitat de 2-4 µg de teixit infectat per EEB o *scrapie* en 15 ml d'aigua residual, que s'ha estimat com equivalent a $6 \cdot 10^{-3}$ DL₅₀ intracerebral en ratolí en el cas d'EEB i com $10^{-1.5}$ - $10^{-1.8}$ DL₅₀ en el cas d'*scrapie*.
5. S'ha analitzat la presència de prions en els efluents generats en 3 escorxadors on es sacrificuen bovins majors de 30 mesos, incloent mostres recollides després del diagnòstic d'un cas d'EEB. Els resultats obtinguts han estat negatius,

indicant que les concentracions màximes potencialment presents serien de $<3 \cdot 10^{-7}$ DL₅₀ orals en humans considerant el model estudiat.

6. Amb l'objectiu d'avaluar l'excreció de soques d'*scrapie* que presenten una àmplia distribució en els teixits dels animals infectats, s'ha desenvolupat una metodologia per a la detecció de prions en femtes d'ovelles i ratolins. El procediment dissenyat està basat en tècniques d'immunoprecipitació amb partícules magnètiques i anàlisi per WB.
7. Utilitzant la metodologia descrita, s'ha observat l'excreció de PrP^{res} en femta durant les 24-48 hores següents a la inoculació oral de prions en els models murins estudiats.
8. S'ha estudiat l'excreció d'*scrapie* en un model murí que sobreexpressa PrP^c. En animals amb simptomatologia terminal, no s'ha detectat PrP^{res} en les mostres de 12.5 mg de matèria fecal analitzades, però se n'ha detectat en teixits de l'intestí prim.
9. Per estudiar l'estabilitat dels prions en diversos tipus de mostres ambientals, s'ha dissenyat un protocol per a la detecció de prions en aigua residual urbana, basat en ultracentrifugació i elució amb tampó glicina a pH 10 i un posterior anàlisi per WB.
10. En tots els estudis duts a terme, s'observen diferències significatives en les cinètiques d'inactivació d'*scrapie*, independentment de la soca utilitzada, i la d'EEB, sent *scrapie* més estable en l'ambient.
11. En aigües residuals d'escorxador, s'ha valorat, en funció de la recta de regressió lineal generada sobre les concentracions de PrP^{res} detectades, una reducció de 2 logaritmes d'infectivitat en aproximadament 30-35 dies, tant per a EEB com *scrapie*. En aigües residuals urbanes, la mateixa reducció s'ha estimat en aproximadament 50 dies per a la soca *Dawson* d'*scrapie*, presentant la t₉₉ d'EEB un valor de 22 dies.
12. L'aigua de mar, que es considera un medi amb elevada activitat proteolítica, presenta un valor t₉₉ de 69 dies. L'estabilitat d'*scrapie* en aigua de mar va ser superior a l'observada en aigua residual, però molt més baixa que la que es detecta en suspensions control de PBS, on en general no hi ha una inactivació apreciable en els 140 dies estudiats.

Capítol VII: Bibliografia

A

- Aguzzi, A., F. Montrasio, and P. S. Kaeser.** 2001. Prions: health scare and biological challenge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:745-749.
- Aguzzi, A., and C. J. Sigurson.** 2004. Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate? *Nat. Rev. Immunol.* **4**:725-736.
- Alper, T., W. A. Cramp, D. A. Haig, and M. C. Clarke.** 1967. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**:764-766.
- Andréoletti, O., P. Berthon, D. Marc, P. Sarradin, J. Grosclaude, L. van Keulen, F. Schelcher, J-M Elsen, and F. Lantier.** 2000. Early accumulation of PrPsc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* **81**:3115-3126.
- Andréoletti, O., C. Lacroux, A. Chabert, L. Monnereau, G. Tabouret, F. Lantier, P. Berthon, F. Eychenne, S. Lafond-Benestad, J. M. Elsen, and F. Schelcher.** 2002. PrP(sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J. Gen. Virol.* **83**:2607-2616.
- Andréoletti, O., S. Simon, C. Lacroux, N. Morel, G. Tabouret, A. Chabert, S. Lugan, F. Corbiere, P. Ferre, G. Foucras, H. Laude, F. Eychenne, J. Grassi, and F. Schelcher.** 2004. PrPsc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat. Med.* **10**:591-593.
- Asher, D. M., K. L. Pomeroy, L. Murphy, C. J. Gibbs, and D. C. Gajdusek.** 1987. Attempts to disinfect surfaces contaminated with etiological agents of the spongiform

encephalopathies. *In: Abstracts of the VIIth International Congress of Virology.* Edmonton, Canada; 1987. p. 147.

B

Barbezange, C., M. Benkö, A. Dán, and B. Harrach. 2000. DNA sequence and phylogenetic analysis of the protease gene of ovine adenovirus type 3 suggest that adenoviruses of sheep belong to two different genera. *Virus Res.* **66**:79-85.

Baron, T., C. Crozet, A. G. Biacabe, S. Philippe, J. Verchere, A. Bencsik, J. Y. Madec, D. Calavas, and J. Samarut. 2004. Molecular analysis of the protease-resistant in scrapie and bovine spongiform encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice. *J Virol* **78**: 6243-6251.

Bartha, A. 1969. Proposal for subgrouping bovine adenoviruses. *Acta Vet.* **19**:319-321.

Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Walchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner, and C. Weissmann. 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**:417-428.

Beck, E., and P. M. Daniel. 1987. Neuropathology of transmissible Spongiform Encephalopathies. In Prusiner, S. B. and M. P. McKinley, eds. Prions: novel infectious pathogens causing scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. San Diego: Academic; 1987, p. 331-385.

Beekes, M., E. Baldauf, S. Cassens, H. Diringer, P. Keyes, A. C. Scott, G. A. Wells, P. Brown, C. J. Jr. Gibbs, and D. C. Gajdusek. 1995. Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method. *J. Gen. Virol.* **76**:2567-2576.

Beekes, M. and P. A. McBride. 2000. Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci. Lett.* **278**:181-184.

Beekes, M., P. A. McBride, and E. Baldauf. 1998. Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J. Gen. Virol.* **79**:601-607.

Belak, S., G. Berenski, M. Rusvai, K. Lukacs, and I. Nasz. 1983. DNA structure and hemagglutination properties of bovine adenovirus type 2 strains which bypass species specificity. *Arch. Virol.* **77**:181-194.

Belak, S. and M. Rusvai. 1986. In utero infection of sheep. *Vet. Microbiol.* **12**:87-91.

Belay, E. D., J. J. Sejvar, W. J. Shieh, S. T. Wiersma, W. Q. Zou, P. Gambetti, S. Hunter, R. A. Madox, L. Crockett, S. R. Zaki, and L. B. Schonberger. 2004. Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Death, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:977-984.

- Benestad, S. L., P. Sarradin, B. Thu, J. Schonheit, M. A. Tranulis, and B. Bradberg.** 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.* **153**:202-208.
- Benkő, M., and B. Harrach.** 1998. A proposal for establishing a new (third) genus within the *Adenoviridae* family. *Arch. Virol.* **143**:829-837.
- Beranger, F., A. Mange, B. Goud, and S. Lehmann.** 2002. Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells. *J. Biol. Chem.* **277**:38972-38977.
- Biacabe, A. G., J. L. Laplanche, S. Ryder, and T. Baron.** 2004. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO* **5**:110-115.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley, and S. B. Prusiner.** 1982. Identification of a protein that purifies with scrapie prion. *Science* **218**:1309-11.
- Bolton, D. C., R. K. Meyer, and S. B. Prusiner.** 1985. Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J. Virol.* **53**:596-606.
- Boom R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noorda.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**:495-503.
- Borchelt, D. R., M. Scout, A. Taraboulos, N. Stahl, and S. B. Prusiner.** 1990. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell Biol.* **110**:743-52.
- Bradley, R.** 1999. BSE transmission studies with particular reference to blood. *Dev. Biol. Stand.* **99**:35-40.
- Brown, D. R.** 2004. Role of the prion protein in copper turnover in astrocytes. *Neurobiol. Dis.* **15**:534-543.
- Brown, D. R., and A. Besinger.** 1998. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.* **334**:423-429.
- Brown, P. and D. C. Gajdusek.** 1991. Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* **337**:269-270.
- Brown, P., C. J. Jr. Gibbs, P. Rodgers-Johnson, D. M. Ascher, M. P. Sulima, A. Bacote, L. G. Goldfarb, and D. C. Gajdusek.** 1994. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health Series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol.* **35**:513-29.

- Brown, P., E. H. Rau, B. K. Johnson, A. E. Bacote, C. J. Jr. Gibbs, and D. C. Cajdusek.** 1999. New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600°C suggests an inorganic template of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:3418-3421.
- Bruce, M. E.** 2003. TSE strain variation. *Br. Med. Bull.* **66**:99-108.
- Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCordle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, H. Cousens, H. Fraser, H., and C. J. Bostock.** 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**:498-501.
- Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, and C. Weissmann.** 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**:1339-1347.
- Bueler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, and C. Weissmann.** 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**:577-582.
- Buschmann, A., G. Luhken, J. Schultz, G. Erhardt, and M. H. Groschup.** 2004. Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *J. Gen. Virol.* **85**:2727-2733.

C

- Campana, V., D. Sarnataro, and C. Zurzolo.** 2005. The highways and byways of the prion protein trafficking. *Trends Cell. Biol.* **15**:102-111.
- Carp, R. I., H. C. Meeker, R. Rubenstein, S. Sigurdarson, M. Papini, R. I. Kascsak, P. B. Kozłowski, and H. M. Wisniewski.** 2000. Characteristics of scrapie isolates derived from hay mites. *J. Neurovirol.* **6**:137-144.
- Casalone, C., G. Zanusso, P. Acutis, S. Ferrari, L. Capucci, F. Tagliavini, S. Monaco, and M. Caramelli.** 2004. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:3065-3070.
- Cashman, N. R., and B. Caughey.** 2004. Prion diseases – close to effective therapy? *Nat. Rev. Drug. Discov.* **3**:874-884.
- Castilla, J., A. Gutierrez Adan, A. Brun, B. Pintado, M. A. Ramirez, B. Parra, D. Doyle, M. Rogers, F. J. Salguero, C. Sanchez, J. M. Sanchez-Vizcaino, and J. M. Torres.** 2003 Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch. Virol.* **148**:677-691.

- Castilla, J., P. Saa, C. Hetz, and C. Soto.** 2005. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**:195-206.
- Caughey, B., and G. J. Raymond.** 1991. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* **266**:18217-18223.
- Chesebro, B., R. Race, K. Wehrly, J. Nishio, M. Bloom, D. Lechner, S. Bergstrom, S. Robbins, K. Mayer, J. M. Keith, C. Garon, and A. Haase.** 1985. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**:331-333.
- Chiarini, L. B., A. R. Freitas, S. M. Zanata, R. R. Brentani, V. R. Martins, and R. Linden.** 2002. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* **21**:3317-3326.
- Chien, P., J. S. Weismann, and A. H. DePace.** 2004. Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:617-656.
- Cliver, D. O.** 1984. Significance of water and the environment in the transmission of viral disease. In Melnick, J. L., ed. *Enteric viruses in water*, vol. 15. Karger, Basel, Switzerland, p. 30-42.
- Craun, G. F.** 1991. Causes of water-borne outbreaks in the United States. *Water Sci. Technol.* **24**:17-20.
- Creutzfeldt, H. G.** 1920. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* **57**:1-19.
- Collinge, J., M. S. Palmer, K. C. Sidle, A. F. Hill, I. Gowland, J. Meads, E. Asante, R. Bradley, L. J. Doey, and P. L. Lantos.** 1995. Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* **378**:779-783.
- Collinge, J., K. C. Sidle, J. Meads, J. Ironside, A. F. Hill.** 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**:685-690.
- Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke, and J. G. Jeffreys.** 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**:295-297.
- Collins, S. J., V. A. Lawson, and C. L. Masters.** 2004. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* **363** :51-61.
- Cuillé, J. and P. L. Chelle.** 1939. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inocuable? *C. R. Acad. Sci.* **203**:1552-1554.

D

- Daly, D. J., D. M. Prendergast, J. J. Sheridan, I. S. Blair, and D. A. McDowell.** 2002. Use of a marker organism to model the spread of central nervous system tissue in cattle and the abattoir environment during commercial stunning and carcass dressing. *Appl Environ Microbiol* **68**:791-798.
- De Bosschere, H., Roels, S., Benestad, S. L., and E. Vanopdenbosch.** 2004. Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Vet Rec* **155**:707-708.
- Derbyshire, J. B., and E. G. Brown.** 1978. Isolation of animal viruses from farm livestock waste, soil and water. *J. Hyg.* **81**:295-302.
- Deslys, J. P., Comoy, E., Hawkins, S., Simon, S., Schimmel, H., Wells, G., Grassi, J., and J. Moynagh.** 2001. Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature* **409**: 476-478.
- Ding, J., W. J. McGrath, R. M. Sweet, and W. F. Mangel.** 1996. Crystal structure of human adenovirus proteinase with its amino cofactor. *EMBO J.* **15**:1778-1783.
- Doherr, M. G.** 2006. Brief review on the epidemiology of transmissible spongiform encephalopathies (TSE). *Vaccine*, in press.
- Donne, D. G., J. H. Viles, D. Groth, I. Melhorn, T. L. James, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, P. E. Wright, and H. J. Dyson.** 1997. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:13452-13457.
- Duran, A. E., M. Muniesa, X. Mendez, F. Valero, F. Lucena, and J. Jofre.** 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* **92**:338-47.

E

- Eloit, M., K. Adjou, M. Couplier, J. J. Fontaine, R. Hamel, T. Lilin, S. Messiaen, O. Andreoletti, T. Baron, A. Bencsik, A. G. Biacabe, V. Beringue, H. Laude, A. Le Dur, J. L. Vilotte, E. Comoy, J. P. Deslys, J. Grassi, S. Simon, F. Lantier, and P. Sarradin.** 2005. BSE agent signatures in a goat. *Vet. Rec.* **156**:523-524.
- Elsen, J. M., Y. Amigues, F. Schelcher, V. Ducrocq, O. Andreoletti, F. Eychenne, J. V. Khang, J. P. Poivey, F. Lantier, and J. L. Laplanche.** 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch. Virol.* **144**:431-45.
- Enriquez, C. E., C. J. Hurst, and C. P. Gerba.** 1995. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and wastewater. *Water Res.* **29**:2548-2553.

Ernst, D. R. and R. E. Race. 1993. Comparative analysis of scrapie agent inactivation. *J. Virol. Meth.* **41**:193-202.

F

Farquhar, C. F., J. Dornan, R. C. Moore, R. A. Somerville, A. M. Tunstall, and J. Hope. 1996. Protease-resistant PrP deposition in brain and non-central nervous tissues of a murine model of bovine spongiform encephalopathy. *J. Gen. Virol.* **77**:1941-1946.

Farquhar, C. F., R. A. Somerville, and L. A. Ritchie. 1989. Post-mortem immunodiagnosis of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J. Virol. Methods* **24**:215-221.

Fernie, K., A. Smith, C. Cooke, G. Shaw, J. Rodger, and R. A. Somerville. 2006. Assessment of hazards from environmental persistence of TSE infectivity. *In: Abstracts of the International Conference "Prion 2006: Strategies, advances and trends towards protection of society"*. Torino, Italy.

Field, K. G. 2005. Faecal source identification. *In: Cotruvo, J. A., A. Dufour, G. Rees, J. Bartram, R. Carr, D. O. Cliver, G. F. Craun, R. Fayer, and V. P. J. Gannon, eds. Waterborne zoonoses: Identification, causes and control.* IWA Publishing, London, p. 349-366.

Fischer, M., T. Rulicke, A. Raeber, A. Sailer, M. Moser, B. Oesch, S. Brandner, A. Aguzzi, and C. Weissmann. 1996. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* **15**:1255-1264.

Fong, T. T., and E. K. Lipp. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:357-371.

Fontaine, N, and M. Winberg. 2001. Reglamento (CE) N° 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2001 por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas eet's. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE); 2001. p. 1-37.]

Forloni, G., N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani, and F. Tagliavini. 1993. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**:543-546.

Formiga-Cruz, M., A. K. Allard, A. C. Conden-Hansson, K. Henshilwood, B. E. Hernroth, J. Jofre, D. N. Lees, F. Lucena, M. Papapetropoulou, R. E. Rangdale, A. Tsibouxi, A. Vantarakis, and R. Girones. 2003. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1556-1563.

Foster, J. D., M. Bruce, I. McConnel, A. Chee, and H. Fraser. 1996. Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *Vet. Rec.* **133**:543-548.

Furukawa, H., K. Doh-ura, R. Okuwaki, S. Shirabe, K. Yamamoto, H. Udono, T. Ito, S. Katamine, and M. Niwa. 2004. A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. *J. Biol. Chem.* **279**:23661-23667.

G

Gajdusek, D. C. 1977. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* **197**:943-960.

Gajdusek, D. C., C. J. Jr. Gibbs, and M. P. Alpers. 1966. Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**:794-796.

Gajdusek, D. C., C. J. Jr. Gibbs, and M. Alpers. 1967. Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science* **155**:212-214.

Gale, P. and G. Stanfield. 2001. Towards a quantitative risk assessment for BSE in sewage sludge. *J Appl Microbiol.* **91**:563-9.

Gale, P., Young, C., Stanfield, G., and D. Oakes. 1998. Development of a risk assessment for BSE in the aquatic environment. *J Appl Microbiol.* **84**:467-477.

Geldenhuis, J. C. and P. D. Pretorius. 1989. The occurrence of enteric viruses in polluted waters, correlation to indicator organisms and factors influencing their numbers. *Water Sci. Technol.* **21**:105-109.

Gibbs, C. J. Jr., D. M. Asher, P. W. Brown, J. E. Fradkin, and D. C. Gajdusek. 1993. Creutzfeldt-Jakob disease infectivity of growth hormone derived from human pituitary glands. *N. Engl. J. Med.* **328**:358-359.

Gibbs, C. J. Jr., D. C. Gajdusek, D. M. Asher, M. P. Alpers, E. Beck, P. M. Daniel., and W. B. Matthews. 1968. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161**:388-389.

Giese, A. M. H. Groschup, B. Hess, and H. A. Kretschmar. 1995. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol.* **5**:213-221.

Glatzel, M., E. Abela, M. Maisen, and A. Aguzzi. 2003. Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* **349**:1812-1820.

Goldfarb, L. G., P. Brown, E. Mitrova, L. Cervenakova, L. Goldin, A. D. Korczyn, J. Chapman, S. Galvez, L. Cartier, R. Rubenstein, et al. 1991. Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200Lys mutation: an analysis of 45 families. *Eur. J. Epidemiol.* **7**:477-486.

Goldfarb, L. G., R. B. Petersen, M. Tabaton, P. Brown, A. C. LeBlanc, P. Montagna, P. Cortelli, J. Julien, C. Vital, W. Pendelbury, et al. 1992. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* **258**:806-808.

Goldmann, W., N. Hunter, G. Smith, J. Foster, and J. Hope. 1994. PrP genotypes and the Sip gene in Cheviot sheep form the basis for scrapie strain typing in sheep. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **724**:296-299.

Gordon, W. S. 1946. Advances in veterinary research – looping ill, tick-borne fever and scrapie. *Vet. Rec.* **58**:516-520.

Govaerts, C., H. Wille, S. B. Prusiner, and F. E. Cohen. 2004. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:8342-8347.

Grassi, J., E. Comoy, S. Simon, C. Creminon, Y. Frobert, S. Trapmann, H. Schimmel, S. A. Hawkins, J. P. Deslys, and G. A. Wells. 2001. Rapid test for the preclinical post-mortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet. Rec.* **149**:577-582.

Gregori, L., and R. G. Rohwer. 2006. Infectivity in urine of hamsters infected with scrapie and implications on mechanisms of horizontal transmission. In: Abstracts of the International Conference “Prion 2006: Strategies, advances and trends towards protection of society”. Torino, Italy.

Greig, J. R. 1940. Scrapie observations on the transmission of the disease by mediate contact. *Vet. J.* **96**:203-206.

Griffith, J. S. 1967. Self replication and scrapie. *Nature* **215**:1043-44.

H

Haas, C. N., J. B. Rose, C. P. Gerba, and R. Regli. 1993. Risk assessment of virus in drinking water. *Risk Anal.* **13**:545-552.

Hadlow, W. J. 1959. Scrapie and kuru. *Lancet* **2**:289-290.

Haik, S., B. A. Faucheux, V. Sazdovitch, N. Privat, J. L. Kemeny, A. Perret-Liaudet, and J. J. Hauw. 2003. The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat. Med.* **9**:1121-1123.

Harrach, B., B. M. Meehan, M. Benkö, B. M. Adair, and D. Todd. 1997. Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287. *Virology* **229**:302-308.

- Harris, D. A.** 2003. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br. Med. Bull.* **66**:71-85.
- Havelaar, A. H., M. van Olphen, and Y. C. Drost.** 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2956-2962.
- Head, M. W., E. Kouverianou, L. Taylor, A. Green, and R. Knight.** 2005. Evaluation of urinary PrP^{Sc} as a diagnostic test for sporadic, variant, and familial CJD. *Neurology* **64**:1794-1796.
- Hegde, R. S., P. Tremblay, D. Groth, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and V. R. Lingappa.** 1999. Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* **402**:822-826.
- Heggebo, R., C. M. Press, G. Gunnes, L. Gonzalez and M. Jeffrey.** 2002. Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. 2002. *J. Gen. Virol.* **83**:479-489.
- Hernroth, B. E., A. C. Conden-Hanson, A. S. Rehnstam-Holm, R. Girones, and A. Allard.** 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4523-4533.
- Heppner, F. L., A. D. Christ, M. A. Klein, M. Prinz, M. Fried, J. P. Kraehenbuhl, and A. Aguzzi.** 2001. Transepithelial prion transport by M cells. *Nat. Med.* **7**:976-977.
- Hill, A. F., R. J. Butterworth, S. Joiner, G. Jackson, M. N. Rossor, D. J. Thomas, A. Frosh, N. Tolley, J. E. Bell, M. Spencer, A. King, S. Al Sarraj, J. W. Ironside, P. L. Lantos, and J. Collinge.** 1999. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* **353**:183-189.
- Hill, A. F., and J. Collinge.** 2003. Subclinical prion infection in humans and animals. *Br. Med. Bull.* **66**:161-170.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J., and P. Lantos.** 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**:448-450.
- Hilton, D. A., A. C. Ghani, L. Conyers, P. Edwards, L. McCardle, M. Penney, D. Ritchie, and J. W. Ironside.** 2002. Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples. *BMJ* **325**:633-634.

- Hilton, D. A., A. C. Ghani, L. Conyers, P. Edwards, L. McCardle, D. Ritchie, M. Penney, D. Hegazy, and J. W. Ironside.** 2004. Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J. Pathol.* **203**:733-739.
- Hope, J., L. J. Reekie, N. Hunter, G. Multhaup, K. Beyreuther, H. White, A. C. Scott, M. J. Stack, M. Dawson, and G. A. Wells.** 1988. Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein. *Nature* **336**:390-392.
- Hourrigan, J., A. Klingsporn, W. W. Clark, and M. de Camp.** 1979. Epidemiology of scrapie in the United States. *In: Prusiner, S. B., and W. J. Hadlow, eds. Slow transmissible diseases of the nervous system: volume I.* New York: Academic Press; 1979. p. 331-356.
- Houston, F., J. D. Foster, A. Chong, N. Hunter, and C. J. Bostock.** 2000. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* **356**:999-1000.
- Hsiao, K., H. F. Baker, T.J. Crow, M. Poulter, F. Owen, J. D. Terwilliger, D. Westaway, J. Ott, and S. B. Prusiner.** 1989. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* **338**:342-345.
- Huillard d'Aignaux, J., D. Costagliola, J. Maccario, T. Billete de Villemeur, J. P. Brandel, J. P. Deslys, J. J. Hauw, J. L. Chaussain, Y. Agid, D. Dormont, and A. Alperovitch.** 1999. Incubation period of Creutzfeldt-Jakob disease in human growth hormone recipients in France. *Neurology* **53**:1197-1201.
- Hundesda, A., C. Maluquer de Motes, S. Bofill-Mas, N. Albinana-Gimenez, and R. Girones.** 2006. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:7886-7893.
- Hunter, N.** 1997. PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol.* **5**:331-334.
- Hunter, N., J. Foster, A. Chong, S. McCutcheon, D. Parnham, S. Eaton, C. Mackenzie, and F. Houston.** 2002. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.* **83**:2897-2905.
- Hunter, N., J. D. Foster, W. Goldmann, M. J. Stear, J. Hope, and C. Bostock.** 1996. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch. Virol.* **141**:809-824.

I

- Ikegami, Y., M. Ito, H. Isomura, E. Momotani, K. Sasaki, Y. Muramatsu, N. Ishiguro, and M. Shinagawa.** 1991. Pre-clinical and clinical diagnosis of scrapie by detection of PrP protein in tissues of sheep. *Vet. Rec.* **128**:271-275.
- Inaba, Y., Y. Tanaka, K. Sato, H. Hito, Y. Hito, T. Omori, and M. Matumoto.** 1968. Bovine adenovirus II. A serotype, Fukuroi, recovered from Japanese cattle. *Jpn. J. Microbiol.* **12**:219-229.
- Ironside, J. W., D. A. Hilton, A. Ghani, N. J. Johnston, L. Conyers, L. M. McCardle, and D. Best.** 2000. Retrospective study of prion protein accumulation in tonsil and appendix tissues. *Lancet* **355**:1693-1694.
- Irving, L. G., and F. A. Smith.** 1981. One-year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:51-59.
- Ishibashi, M., and H. Yasue.** 1984. Adenoviruses of animals. In Ginsberg, H. S., ed. The adenoviruses. Plenum Press, New York, p.497-562.

J

- Jackson, G. S., I. Murray, L. L. Hosszu, N. Gibbs, J. P. Waltho, A. R. Clarke, and J. Collinge.** 2001. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**:8531-8535.
- Jakob, A.** Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. (Spastische Pseudoklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* **64**:147-228.
- Jeffrey, M., W. G. Halliday, J. Bell, A. R. Johnston, N. K. McLeod, C. Ingham, A. R. Sayers, D. A. Brown, and J. R. Fraser.** Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **26**:41-54.
- Jesionek-Kupnicka, D., J. Buczynski, R. Kordek, T. Sobow, I. Kloszewska, W. Papierz, and P. P. Liberski.** 1997. Programmed cell death (apoptosis) in Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *Folia Neuropathol.* **35**:233-235.
- Jiang, S. R., R. Noble, and W. P. Chui.** 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:179-184.

Johnson, C. J., K. E. Phillips, P. T. Schramm, D. McKenzie, J. M Aiken, and J. A. Pedersen. 2006. Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog.* **2**:296-302.

K

Kao, R. R., Gravenor, M. B., Baylis, M., Bostock, C. J., Chihota, C. M., Evans, J. C., Goldmann, W. Smith, A. J., and A. R. Mclean. 2002. The potential size and duration of an epidemic of bovine spongiform encephalopathy in British sheep. *Science* **295**:332-5.

Katz, J. B., J. C. Pedersen, A. L. Jenny, and W. D. Taylor. 1992. Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**:447-449.

Kim, Y. S., R. I. Carp, S. M. Callahan, M. Natelli, and H. M. Wisniewski. 1990. Vacuolization, incubation period and survival time analyses in three mouse genotypes injected stereotactically in three brain regions with the 22L scrapie strain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **49**:106-113.

Kimberlin, R. H., C. A. Walker, G. C. Millson, D. M. Taylor, P. A. Robertson, A. H. Tomlinson, and A. G. Dickinson. 1983. Disinfection studies with two strains of mouse passaged scrapie agent. *J. Neurol. Sci.* **59**:355-369.

Kirchmayr, R., Reichi, H. E., Schildorfer, H., Braun, R., and Somerville, R. A. 2006. Prion protein: detection in 'spiked' anaerobic sludge and degradation experiments under anaerobic conditions. *Water Sci. Tech.* **53**:91-8.

Kitamoto, T., T. Muramoto, S. Mohri, K. Doh-Ura, and J. Tateishi. 1991. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Virol.* **65**:6292-6295.

Kitamoto, T., R. W. Shin, K. Doh-Ura, N. Tomokane, M. Miyazono, T. Muramoto, and J. Tateishi. 1992. *Am. J. Pathol.* **140**:1285-1294.

Klatzo, I., D. C. Gajdusek, and V. Zigas. 1959. Pathology of kuru. *Lab. Invest.* **8**:799-847.

Klein, M. A., R. Frigg, E. Flechsig, A. J. Raeber, U. Kalinke, H. Bluethmann, F. Bootz, M. Suter, R. M. Zinfenagel, and A. Aguzzi. 1997. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* **390**:687-690.

Klein, M. A., P. S. Kaeser, P. Schwarz, H. Weyd, I. Xenarios, R. M. Zinkernagel, M. C. Carroll, J. S. Verbeek, M. Botto, M. J. Walport, H. Molina, U. Kalinke, H. Acha-Orbea, and A. Aguzzi. 2001. Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat. Med.* **7**:488-492.

- Kocisko, D. A., J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury, and B. Caughey.** 1994. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**:471-474.
- Kocisko, D. A., S. A. Priola, G. J. Raymond, B. Chesebro, P. T. Lansbury, and B. Caughey.** 1995. Species affinity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:3923-3927.
- Korth, C., B. Stierli, P. Streit, M. Moser, O. Schaller, R. Fischer, W. Schulz-Schaeffer, H. Kretschmar, A. Raeber, U. Braun, F. Ehrensperger, S. Hornemann, R. Glockshuber, R. Riek, M. Billeter, K. Wuthrich, and B. Oesch.** 1997. Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* **390**: 74-77.
- Kuczius, T. and M. H. Groschup.** 1999. Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol Med* **5**: 406-18.
- Kuwahara, C., A. M. Takeuchi, T. Nishimura, K. Haraguchi, A. Kubosaki, Y. Matsumoto, K. Saeki, Y. Matsumoto, T. Yokoyama, S. Itoharu, and T. Onodera.** 1999. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* **400**:225-226.

L

- Lasmezas, C. I., J. P. Deslys, O. Robain, A. Jaegly, V. Beringue, J. M. Peyrin, J. G. Fournier, J. J. Hauw, J. Rossier, and D. Dormont.** 1997. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* **275**:402-405.
- Legname, G., I. V. Baskakov, H. O. Nguyen, D. Riesner, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner.** 2004. Synthetic mammalian prions. *Science* **305**:673-676.
- Lehmkuhl, H. D., L. A. Hobbs, and L. W. Woods.** 2001. Characterization of a new adenovirus isolated from black-tailed deer in California. *Arch. Virol.* **146**:1187-1196.
- Lezmi, S., S. Martin, S. Simon, E. Comoy, A. Bencsik, J. P. Deslys, J. Grassi, M. Jeffrey, and T. Baron.** 2004. Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie cases and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheep by use of western blotting and immunohistochemical methods. *J. Virol.* **78**: 3654-3662.
- Ligos, C., C. J. Sigurdson, C. Santucciu, G. Carcassola, G. Manco, M. Basagni, C. Maestrone, M. G. Cancedda, L. Madau, and A. Aguzzi.** 2005. PrPSc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat. Med.* **11**:1137-8.
- Lopman, B., H. Vennema, E. Kohli, P. Pothier, A. Sanchez, A. Negrodo, J. Buesa, E. Schreier, M. Reacher, D. Brown, J. Gray, M. Iturriza, C. Gallimore, B. Bottiger, K. O. Hedlund, M. Torven, C. H. von Bonsdorff, L. Maunula, M. Poljsak-Prijatelj,**

J. Zimsek, G. Reuter, G. Szücs, B. Melegh, L. Svennson, Y. van Duinhoven, and M. Koopmans. 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* **363**:682-688.

LL

Llewelyn, C. A., P. E. Hewitt, R. S. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie, and R. G. Will. 2004. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**:417-421.

M

Ma, J., R. Wollmann, and S. Lindquist. 2002 Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* **298**:1781-1785.

Mabbott, N. A., G. McGovern, M. Jeffrey, and M. E. Bruce. 2002. Temporary blockade of the tumor necrosis factor receptor signaling pathway impedes the spread of scrapie to the brain. *J. Virol.* **76**:5131- 5139.

Maignen, T., C. I. Lasmézas, V. Beringue, D. Dormont, and J. P. Deslys. 1999. Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J. Gen Virol.* **80**:3035-3042.

Mallucci, G. and J. Collinge. 2005. Rational targeting for prion therapeutics. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**:23-34.

Mangel, W. F., D. L. Toledo, J. Ding, R. M. Sweet, and W. J. McGrath. 1997. Temporal and spatial control of the adenovirus proteinase by both a peptide and the viral DNA. *Trends Biochem. Sci.* **22**:393-398.

Manuelidis, L. 2006. A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Cell Biochem.*, in press.

Marsh, R. F. 1992. Transmissible mink encephalopathy. In Prusiner, S. B., J. Collinge, J. Powell, and B. Anderton, *eds.* Prion diseases of human and animals. London: Ellis Harwood Publishers; 1992, pp. 300-307.

Mathiason, C. K., J. G. Powers, S. J. Dahmes, D. A. Osborn, K. V. Miller, R. J. Warren, G. L. Mason, S. A. Hays, J. Hayes-Klug, D. M. Seelig, M. A. Wild, L. L. Wolfe, T. R. Spraker, M. W. Miller, C. J. Sigurdson, G. C. Telling, and E. A. Hoover. 2006. Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* **314**:133-6.

- McAnulty, J. M., G. L. Rubin, C. T. Carvan, W. J. Huntley, G. Grohmann, and R. Hunter.** 1993. An outbreak of Norwalk-like gastroenteritis associated with contaminated drinking water at a caravan park. *Aust. J. Public Health* **17**:36-41.
- McGowan, J. P.** 1922. Scrapie in sheep. *Scott. J. Agric.* **5**:365-75.
- McKinley, M. P., D. C. Bolton, and S. B. Prusiner.** 1983. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**:57-62.
- Mead, S., M. P. Stumpf, J. Whitfield, J. A. Beck, M. Poulter, T. Campbell, J. B. Uphill, D. Goldstein, M. Alpers, E. M. Fischer, and J. Collinge.** 2003. Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* **300**:640-3.
- Mead, S., K. Prout, and J. Collinge.** 2005. Questionnaire to reduce the risk of iatrogenic prion disease transmission. *J. Hosp. Infect.* **60**:378-379.
- Medori, R., and H. J. Tritschler.** 1993. Prion protein gene analysis in three kindreds with fatal familial insomnia (FFI): codon 178 mutation and codon 129 polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* **53**:822-827.
- Melnick, J. L.** 1984. Etiologic agents and their potential for causing water-borne virus diseases. In Melnick, J. L., ed. *Enteric viruses in water*, vol. 15. Karger, Basel, Switzerland, p. 1-16.
- Meng, Q. S., and C. P. Gerba.** 1996. Comparative inactivation of enteric adenovirus, poliovirus and coliphages by ultraviolet irradiation. *Water Res.* **30**:2665-2668.
- Meyer, R. K., M. P. McKinley, K. A. Bowman, M. B. Braunfeld, R. A. Barry, and S. B. Prusiner.** 1986. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:2310-2314.
- Miller, M. W., M. A. Wild, and E. S. Williams.** 1998. Epidemiology of chronic wasting disease in Rocky Mountain elk. *J. Wildl. Dis.* **34**:532-538.
- Miller, M. W. and E. S. Williams.** 2003. Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature* **425**:35-36.
- Miller, M. W., E. S. Williams, N. T. Hobbs, and L. L. Wolfe.** 2004. Environmental sources of prion transmission in mule deer. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1003-1006.
- Miller, M. W., E. S. Williams, C. W. McCarty, T. R. Spraker, T. J. Kreeger, C. T. Larsen, and E. T. Thorne.** 2000. Epizootiology of chronic wasting disease in free-ranging cervids in Colorado and Wyoming. *J. Wildl. Dis.* **36**:676-690.

- Mohri, S., C. F. Farquhar, R. A. Somerville, M. Jeffrey, J. Foster, and J. Hope.** 1992. Immunodetection of a disease specific PrP fraction in scrapie-affected sheep and BSE-affected cattle. *Vet. Rec.* **131**:537-539.
- Montrasio, F., R. Frigg, M. Glatzel, M. A. Klein, F. Mackay, A. Aguzzi, and C. Weissmann.** 2000. Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* **288**:1257-1259.
- Moore, R. C., I. Y. Lee, G. L. Silverman, P. M. Harrison, R. Strome, C. Heinrich, A. Karunaratne, S. H. Pasternak, M. A. Chishty, Y. Liang, P. Mastrangelo, K. Wang, A. F. Smit, S. Katamine, G. A. Carlson, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. W. Melton, P. Tremblay, L. E. Hood, and D. Westaway.** 1999. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein Doppel. *J. Mol. Biol.* **292**:797-817.
- Morel, N., S. Simon, Y. Frobert, H. Volland, C. Mourton-Gilles, A. Negro, M. C. Sorgato, C. Creminon, and J. Grassi.** 2004. Selective and efficient immunoprecipitation of the disease-associated form of the prion protein can be mediated by non-specific interactions between monoclonal antibodies and scrapie-associated fibrils. *J Biol Chem* **279**:30143-30149.
- Moynagh, J., and H. Schimmel.** 1999. Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy. *Nature* **400**:105.
- Muramatsu, Y., A. Onodera, M. Horiuchi, N. Ishiguro, and M. Shinagawa.** 1994. Detection of PrP^{Sc} in sheep at the preclinical stage of scrapie and its significance for diagnosis of insidious infection. *Arch. Virol.* **134**:427-432.
- O**
-
- Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood, et al.** 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**:735-746.
- O'Rourke, K. I., T. R. Spraker, L. K. Hamburg, T. E. Besser, K. A. Brayton, and D. P. Knowles.** 2004. Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer. *J. Gen Virol.* **85**:1339-1346.
- Onnasch, H., H. M. Gunn, B. J. Bradshaw, S. L. Benestad, and H. F. Basset.** 2004. Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet Rec* **155**: 636-637.
- Orge, L., A. Galo, C. Machado, C. Lima, C. Ochoa, J. Silva, M. Ramos, and J. P. Simas.** 2004. Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J Gen Virol* **85**: 3487-3491.

P

- Palmer, M. S., A. J. Dryden, J. T. Hughes, and J. Colline.** 1991. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **352**:340-342.
- Pálsson, P. A.** 1979. Rida (scrapie) in Iceland and its epidemiology. In Prusiner, S. B., and W. J. Hadlow, eds. *Slow transmissible diseases of the nervous system: volume I*. New York: Academic Press; 1998. p.357-366.
- Pan, K-M., M. A. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, and S. B. Prusiner.** 1993. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:10962-10966.
- Pearson, G. R., J. M. Wyatt, T. J. Gruffydd-Jones, J. Hope, A. Chong, R. J. Higgins, A. C. Scott, and G. A. Wells.** 1992. Feline spongiform encephalopathy: fibril and PrP studies. *Vet. Rec.* **131**:307-310.
- Peden, A. H., M. W. Head, D. L. Ritchie, J. E. Bell, and J. W. Ironside.** 2004. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364**:527-529.
- Pina, S. M. Puig, F. Lucena, J. Jofre, and R. Girones.** 1998. Viral pollution in the environment and shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3376-3382.
- Post, K., D. Riesner, V. Walldorf, and H. Mehlhorn.** 1999. Fly larvae and pupae as vectors for scrapie. *Lancet* **354**:1969-1970.
- Prinz, M., F. Montrasio, H. Furukawa, M. E. van der Haar, P. Schwarz, T. Rulicke, O. T. Giger, K. G. Hausler, D. Perez, M. Glatzel, and A. Aguzzi.** 2004. Intrinsic resistance of oligodendrocytes to prion infection. *J. Neurosci.* **24**:5974-5981.
- Prusiner, S. B.** 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**:136-144.
- Prusiner, S. B., D. C. Bolton, D. F. Groth, K. A. Bowman, S. P. Cochran, and M. P. Mckinley.** 1982. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* **21**:6942-6950.
- Prusiner, S. B., D. F. Groth, S. P. Cochran, F. R. Masiarz, M. P. McKinley, and H. M. Martinez.** 1980. Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* **19**:4883-4891.
- Prusiner, S. B., and M. R. Scott.** 1997. Genetics of prions. *Annu. Rev. Genet.* **31**:139-175.

Prusiner, S. B., M. Scott, D. Foster, K-M. Pan, D. Groth, C. Mirinda, M. Torchia, S. L. Yang, D. Serban, G. A. Carlson, P. C. Hoppe, D. Westaway, and S. J. DeArmond. 1990. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**:673-686.

Puig, M., J. Jofre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell, and R. Girones. 1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested-PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2963-2970.

R

Race, R. E., S. A. Priola, R. A. Bessen, D. Ernst, J. Dockter, G. F. Rall, L. Mucke, B. Chesebro, and M. B. Oldstone. 1995. Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron.* **15**:1183-1191.

Race, R. E., A. Raines, T. G. M. Baron, M. W. Miller, A. Jenny, and E. S. Williams. 2002. Comparison of abnormal prion protein glycoform patterns from transmissible spongiform encephalopathy agent-infected deer, elk, sheep, and cattle. *J. Virol.* **76**:12365-12368.

Race, R., A. Raines, G. J. Raymond, B. Caughey, and B. Chesebro. 2001. Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J. Virol.* **75**:10106-10112.

Radebold, K., M. Chernyak, D. Martin, and L. Manuelidis. 2001. Blood borne transit of CJD from brain to gut at early stages of infection. *BMC Infect. Dis.* **1**:20

Raeber, A. J., R. E. Race, S. Brandner, S. A. Priola, A. Sailer, R. A. Bessen, L. Mucke, J. Manson, A. Aguzzi, M. B. Oldstone, C. Weissmann, and B. Chesebro. 1997. Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *EMBO* **16**:6057-6065.

Rapp, D., P. Potier, L. Jocteur-Monrozier, and A. Richaume. 2006. Prion degradation in soil: possible role of microbial enzymes stimulated by the decomposition of buried carcasses. *Environ. Sci. Technol.* **40**:6324-6329.

Raymond, G. J., A. Bossers, L. D. Raymond, K. I. O'Rourke, L. E. McHolland, P. K. 3rd Bryant, M. W. Miller, E. S. Williams, M. Smits, and B. Caughey. 2000. Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *EMBO J.* **19**:4425-4430.

Revault, M., H. Quiquampoix, M. H. Baron, and S. Noinville. 2005. Fate of prions in soil: trapped conformation of full-length ovine prion protein induced by adsorption on clays. *Biochim. Biophys. Acta* **1724**:367-374.

Riesner, D., K. Kellings, K. Post, H. Wille, H. Serban, D. Groth, M. A. Baldwin, and S. B. Prusiner. 1996. Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J. Virol.* **70**:1714-1722.

Rigou, P., H. Rezaei, J. Grosclaude, S. Staunton, and H. Quiquampoix. 2006. Fate of prions in soil: adsorption and extraction by electroelution of recombinant ovine prion protein from montmorillonite and natural soils. *Environ. Sci. Technol.* **40**:1497-1503.

Rudd, P. M., M. R. Wormald, D. R. Wing, S. B. Prusiner, and R. A. Dwek. 2001. Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* **40**:3759-3766.

Rzezutka, A., and N. Cook. 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:441-453.

S

Saborio, G. P., B. Permanne, and C. Soto. 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**:810-813.

Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.

Safar, J. H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. 1998. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* **4**:1157-1165.

Sailer, A., H. Bueler, M. Fischer, A. Aguzzi, and C. Weissmann. 1994. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* **77**:967-968.

Sambrook, J., and D. W. Russell, eds. 2001. Molecular cloning. Cold Spring Harbor, New York.

Schaper, M., J. Jofre, M. Uys, and W. O. K. Grabow. 2002. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of fecal pollution in South Africa and Spain. *J. Appl. Microbiol.* **92**:657-668.

Scherbel, C., R. Pichner, M. H. Groschup, S. Mueller-Hellwig, S. Scherer, R. Dietrich, E. Maertlbauer, and M. Gareis. 2006. Degradation of scrapie associated prion protein (PrPSc) by the gastrointestinal microbiota of cattle. *Vet. Res.* **37**:695-703.

Schreuder, B. E., and R. A. Somerville. 2003. Bovine spongiform encephalopathy in sheep? *Rev. Sci. Tech.* **22**:103-120.

- Seeger, H., M. Heikenwalder, N. Zeller, J. Kranich, P. Schwarz, A. Gaspert, B. Seifert, G. Miele, and A. Aguzzi.** 2005. Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science* **310**:324-326.
- Serban, A., G. Legname, K. Hansen, N. Kovaleva, and S. B. Prusiner.** 2004. Immunoglobulins in urine of hamsters with scrapie. *J. Biol. Chem.* **279**:48817-48820.
- Shaked, G. M., Y. Shaked, Z. Kariv-Inbal, M. Halimi, I. Avraham, and R. Gabizon.** 2001. A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J. Biol. Chem.* **276**:31479-31482.
- Shilton, C. M., C. A. Smith, L. W. Woods, G. J. Crawshaw, and H. D. Lehmkuhl.** 2002. Adenoviral infection in captive moose (*Alces alces*) in Canada. *J. Zoo Wildl. Med.* **33**:73-79.
- Sigurdson, C. J., E. S. Williams, M. W. Miller, T. R. Spraker, K. I. O'Rourke, and E. A. Hoover.** 1999. Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrP^{Sc} in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J. Gen. Virol.* **80**:2757-2764.
- Silveira, J. R., G. J. Raymond, A. G. Hughson, R. E. Race, V. L. Sim, S. F. Hayes, and B. Caughey.** 2005. The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**:257-261.
- Siso, S., M. Ordoñez, I. Cordon, E. Vidal, and M. Pumarola.** 2004. Distribution of PrP^{Sc} in brains of BSE-affected cows detected by active surveillance in Catalonia, Spain. *Vet. Rec.* **155**:524-525.
- Smyth, J. A., M. Benkő, D. A. Moffett, and B. Harrach.** 1996. Bovine adenovirus type 10 identified in fatal cases of adenovirus-associated enteric disease in cattle by in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1270-1274.
- Solfrosi, L., J. R. Criado, D. B. McGavern, S. Wirz, M. Sanchez-Alavez, S. Sugama, L. A. DeGiorgio, B. T. Volpe, E. Wiseman, G. Abalos, E. Masliah, D. Gilden, M. B. Oldstone, B. Conti, and R. A. Williamson.** 2004. Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* **303**:1514-1516.
- Somerville, R. A., P. A. Merz, and R. I. Carp.** 1986. Partial copurification of scrapie-associated fibrils and scrapie infectivity. *Intervirology* **25**:48-55.
- Spielmeyer, W.** 1922. Die histopathologische forschung in der psychiatrie. *Klin. Wochen-schrift* **2**:1817-19.
- Spraker, T. R., R. N. Zink, B. A. Cummings, M. A. Wild, M. W. Miller, and K. I. O'Rourke.** 2002. Comparison of histological lesions and immunohistochemical staining of protease resistant prion protein in a naturally occurring spongiform encephalopathy of free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) with those of chronic wasting disease of captive mule deer. *Vet. Pathol.* **39**:110-119.

Stack, M. J. 2004. Western immunoblotting techniques for the study of transmissible spongiform encephalopathies. In Lehman, S., and J. Grassi, *eds.* Techniques in prion research. Birkhäuser-Verlag, Basel, 2004. p. 97-116.

Stahl, N., M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. R. Burlingame, and S. B. Prusiner. 1993. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* **32**:1991-2002.

Supattapone, S., P. Bosque, T. Muramoto, H. Wille, C. Aagaard, D. Peretz, H. O. Nguyen, C. Heinrich, M. Torchia, J. Safar, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and M. Scott. 1999. Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell* **96**:869-878.

T

Taguchi, F., Y. Tamai, K. Uchida, R. Kitajima, H. Kojima, T. Kawaguchi, Y. Ohtani, and S. Miura. 1991. Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Arch. Virol.* **119**:207-301.

Tateishi, J., Y. Sato, M. Koga, H. Doi, and M. Ohta. 1980. Experimental transmission of human subacute spongiform encephalopathy to small rodents. I. Clinical and histological observations. *Acta Neuropathol. (Berl)* **51**:127-134.

Taylor, D. M. 2000. Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. *Vet. J.* **159**:10-17.

Taylor, D. (2002) Inactivation of BSE agent. *C R Biol* **325**: 75-6.

Taylor, D. M., K. Fernie, I. McConell, C. E. Ferguson, and P. J. Steele. 1998. Solvent extraction as an adjunct to rendering: the effect on BSE and scrapie agents of hot solvents followed by dry heat and steam. *Vet Rec* **143**: 6-9.

Taylor, D. M., S. L. Woodgate, and M. J. Atkinson. 1995. Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. *Vet. Rec.* **137**:605-610.

Telling, G. C., M. Scott, J. Mastriani, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1995. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**:79-90.

Thacray, A. M., M. A. Klein, A. Aguzzi, and R. Bujdoso. 2002. Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum. *J. Virol.* **76**:2510-2517.

Theil, D., R. Fatzer, R. Meyer, M. Schobesberger, A. Zurbriggen, and M. Vandeveld. 1999. Nuclear DNA fragmentation and immune reactivity in bovine spongiform encephalopathy. *J. Comp. Pathol.* **121**:357-367.

Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.

V

Valleron, A. J., P. Y. Boelle, R. Will, and J. Y. Cesbron. 2001. Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom. *Science* **294**:1726-1728.

Van Keulen, L. J. M., B. E. C. Schreuder, M. E. W. Vromans, J. P. M. Langeveld, and M. A. Smits. 2000. Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *In*: Groschup, M. H., and H. A. Kretzschmar, eds. Prion Diseases, Diagnosis and Pathogenesis. Springer-Verlag; 2000, p. 57-71.

Vasina, E. N., P. Déjardin, H. Rezaei, J. Grosclaude, and H. Quiquampoix. 2005. Fate of prions in soil: adsorption kinetics of recombinant unglycosylated ovine prion protein onto mica in laminar flow conditions and subsequent desorption. *Biomacromolecules* **6**:3425-3432.

Vitezica, Z. J., J. M. Elsen, R. Ruup, and C. Diaz. 2005. Using genotype probabilities in survival analysis: a scrapie case. *Genet. Sel. Evol.* **37**:403-15.

W

Wadell, G., M. L. Hammarskjold, G. Winberg, T. M. Varsanyi, and G. Sundell. 1980. Genetic variability of adenoviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **354**:16-42.

Wadsworth, J. D., S. Joiner, A. F. Hill, T. A. Campbell, M. Desbruslais, P. J. Luthert, and J. Collinge. 2001. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358**:171-180.

Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan, and D. J. Selkoe. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**:535-539.

Watts, J. C., A. Balachandran, and D. Westaway. 2006. The expanding universe of prion diseases. *PLoS Pathog.* **2**:e26.

- Weissmann, C.** 1991. A “unified theory” of prion propagation. *Nature* **352**:679-683.
- Weissmann, C., M. Enari, P-C. Klöhn, and D. Rossi.** 2002. Transmission of prions. *J. Infect. Dis.* **186**:S157-65.
- Wells, G. A., M. Dawson, S. A. Hawkins, R. B. Green, I. Dexter, M. E. Francis, M. M. Simmons, A. R. Austin, and M. W. Horigan.** 1994. Infectivity in the ileum of cattle challenged with bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* **135**:40-41.
- Wells, G. A. H., S. A. C. Hawkins, R. B. Green, A. R. Austin, I. Dexter, Y. I. Spencer, M. J. Chaplin, M. J. Stack, and M. Dawson.** 1998. Preliminary observations on the pathogenesis of the experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet. Rec.* **142**:103-106.
- Wells, G. A., and I. S. McGill.** 1992. Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res. Vet. Sci.* **53**:1-10.
- Wells, G. A., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson, and R. Bradley.** 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* **121**:419-420.
- Wildegger, G., S. Liemann, and R. Glockshuber.** 1999. Extremely rapid folding of the C-terminal domain of prion protein without kinetic intermediates. *Nat. Struct. Biol.* **6**:550-653
- Wilesmith, J. W., J. B. Ryan, and W. D. Hueston.** 1992. Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bone meal inclusion in proprietary concentrates. *Res. Vet. Sci.* **52**:325-331.
- Wilesmith, J. W., G. A. Wells, M. P. Cranwell, and J. B. Ryan.** 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* **123**:638-644.
- Will, R. G.** 2006. Variant CJD: 10 years after. *In*: Abstracts of the International Conference “Prion 2006: Strategies, advances and trends towards protection of society”. Torino, Italy.
- Will, R. G., J. W. Ironside, M. Ziedler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman, and P. G. Smith.** 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**:921-925.
- Wille, H., G. F. Zhang, M. A. Baldwin, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner.** 1996. Separation of scrapie prion infectivity from PrP amyloid polymers. *J. Mol. Biol.* **259**:608-621.
- Williams, E. S.** 2005. Chronic Wasting Disease. *Vet. Pathol.* **42**:530-549.

Williams, E. S., M. W. Miller, T. J. Kreeger, R. H. Kahn, and E. T. Horne. 2002. Chronic wasting disease of deer and elk: a review with recommendations for management. *J. Wildl Manag.* **66**:551-563.

Williams, E. S. and S. Young. 1980. Chronic wasting disease of mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* **16**:89-98.

Woolhouse, M. E., S. M. Stringer, L. Matthews, N. Hunter, and R. M. Anderson. 1998. Epidemiology and control of scrapie within a sheep flock. *Proc. Biol. Sci.* **265**:1205-1210.

Y

Yamakawa, Y., K. Hagiwara, K. Nothomi, Y. Nakamura, M. Nishijima, Y. Higuchi, Y. Sato, and T. Sata. 2003. Atypical protease K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn. J. Infect. Dis.* **56**:221-222.

Yamamoto T, Kobayashi S, Nishiguchi A, Nonaka T, and T. Tsutsui. 2006. Evaluation of bovine spongiform encephalopathy (BSE) infection risk of cattle via sewage sludge from wastewater treatment facilities in slaughterhouses in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **68**:137-42.

Z

Zanusso, G., S. Ferrari, S. Cardone, P. Zampieri, M. Gelati, M. Fiorini, A. Farinazzo, M. Gardiman, T. Cavallaro, M. Bentivoglio, P. G. Righetti, M. Pocchiari, N. Rizzuto, and S. Monaco. 2003. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* **348**:711-719.

Ziedler, M., G. Stewart, S. N. Cousens, K. Estibeiro, and R. G. Will. 1997. Codon 129 genotype and new variant CJD. *Lancet* **350**:668.

Capítol VIII: Annex de Materials i Mètodes

8.1. Concentració de partícules víriques a partir d'aigües residuals

Les partícules víriques van ser generalment eluïdes i concentrades a partir de 42 ml d'aigua residual emprant una metodologia prèviament desenvolupada basada en l'ús del tampó glicina (Pina *et al.*, 1998).

1. Dispensar la mostra en alíquotes de 7 ml
2. Ultracentrifugar 1 h a 110,000 xg a 4°C
3. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* amb 3.5 volum de tampó glicina
4. Incubar 30 min en gel
5. Afegir 3.5 volum de PBS 2X
6. Centrifugar 15 min a 10,000 xg
7. Recuperar el sobrenedant i ultracentrifugar 1 h a 110,000 xg a 4°C
8. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 100 µl de PBS

Reactius necessaris:

<u>Tampó glicina</u>	Glicina.....0.25 N
	Ajustar a pH 9.5
	Esterilitzar per autoclau
	Conservar a 4°C
<u>PBS 10X</u>	NaCl.....80 g/l
	KCl.....2 g/l
	Na ₂ HPO ₄14.4 g/l
	KH ₂ PO ₄2.4 g/l
	Ajustar a pH 7.4
	Esterilitzar per autoclau
	Conservar a RT

8.2. Concentració de partícules víriques a partir de mostres fecals

Les mostres fecals van ser agrupades en forma de *pools* segons la informació disponible dels animals i els virus van ser extrets i concentrats segons el següent protocol.

1. Pesar 1 g de material (aproximadament)
2. Afegir 3.5 ml de tampó glicina 0.25 N pH 9.5
3. Homogeneïtzar en un vòrtex un mínim de 15 min
4. Incubar 30 min en gel
5. Afegir 1 volum de PBS 2X
6. Centrifugar 15 min a 10,000 xg
7. Recuperar el sobrenedant i ultracentrifugar 1 h a 110,000 xg a 4°C
8. Descartar sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 100 µl PBS

8.3. Extracció d'àcids nucleics a partir de partícules víriques

Per a l'extracció dels àcids nucleics virals es va utilitzar un protocol prèviament descrit per Boom i cols. (1990) basat en l'adsorció dels àcids nucleics provinents de les càpside víriques lisades a partícules de sílice.

1. Homogeneïtzar en un vòrtex 900 µl de tampó de lisi, 50 µl de partícules de sílice i 50 µl de mostra
2. Incubar 10 min a RT
3. Centrifugar 15 sec a 20,000 xg
4. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 1 ml de tampó de rentat
5. Centrifugar 15 sec a 20,000 xg
6. Repetir passos 4 i 5
7. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 1 ml d'etanol 70% fred
8. Centrifugar 15 sec a 20,000 xg
9. Repetir els passos 7 i 8
10. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 1 ml d'acetona
11. Centrifugar 15 sec a 20,000 xg
12. Descartar el sobrenedant i assecar el *pellet* a 56°C durant 10 min mantenint el tub obert
13. Eluir el *pellet* en 50 µl de tampó TE
14. Incubar 10 min a 56°C mantenint el tub tancat
15. Centrifugar durant 2 min i recuperar el sobrenedant

Reactius necessaris:

<u>Partícules de sílice</u>	Dissoldre 3.6 g de partícules de sílice en 30 ml d'aigua bidestil·lada i deixar sedimentar durant 24 h a RT Descartar 25.8 ml del sobrenedant i resuspendre el sediment en 30 ml d'aigua bidestil·lada Deixar sedimentar durant 5 h més Descartar 26.4 ml del sobrenedant i afegir 36 µl d'àcid clorhídric 32% Fer parts alíquotes de 100 µl Conservar a 4°C protegit de la llum
<u>Tampó Tris-HCl 100 mM</u>	Dissoldre 12.11 g de Tris en 1 L d'aigua bidestil·lada Ajustar a pH 6.4 Esterilitzar per autoclau Conservar a RT
<u>EDTA 200 mM</u>	Dissoldre 7.44 g d'EDTA x 2H ₂ O en 100 ml d'aigua bidestil·lada Ajustar a pH 8.0 Esterilitzar per autoclau Conservar a RT
<u>Tampó de lisi</u>	Isotiocianat de guanidium.....1.2 g/ml Dissoldre en 10 ml Tris-HCl 100 mM pH 6.4 Incubar a 60°C fins a una correcta dissolució Afegir 2.2 ml EDTA 0.2 M pH 8.0 Afegir 0.26 g Tritó X-100 Conservar a RT protegit de la llum
<u>Tampó de rentat</u>	Isotiocianat de guanidium.....1.2 g/ml Dissoldre en 10 ml Tris-HCl 100 mM pH 6.4 Incubar a 60°C fins a una correcta dissolució Conservar a RT protegit de la llum
<u>Etanol 70%</u>	Diluir 70 ml etanol 100% amb 30 ml d'aigua bidestil·lada estéril Fer parts alíquotes de 10 ml Conservar a -20°C

Tampó TE

Tris-HCl.....10 mM
EDTA.....1 mM
Ajustar a pH 8.0
Esterilitzar per autoclau
Conservar a RT

8.4. Amplificació enzimàtica

Es va aplicar un protocol de PCR niada amb iniciadors específics per a cada tipus de virus (veure apartat 8.20) partint de 10 µl de l'extracció d'àcids nucleics que corresponien a 4 ml d'aigua residual o 0.1 g de matèria fecal.

1. Descongelar els reactius mantenint-los sempre en fred (4°C)
2. Preparar la mescla de reacció de la primera PCR per a n+1 mostres seguint les següents proporcions:
 - i. Tampó PCR 10X.....5 µl
 - ii. MgCl₂ 25 mM.....3 µl
 - iii. dNTP 25 mM.....0.5 µl
 - iv. Oligonucleòtid específic 25 µM.....1 µl
 - v. Oligonucleòtid específic 25 µM.....1 µl
 - vi. Aigua bidestil·lada estèril.....29.1 µl
 - vii. Taq polimerasa 5U/µl.....0.4 µl
3. Mesclar els reactius i dispensar 40 µl en cada tub de 0.2 ml
4. Afegir 10 µl de mostra i incubar en un termociclador *Gene Amp PCR system 2400* (Applied Biosystems) amb el programa d'amplificació específic per a cada joc d'oligonucleòtids
5. Preparar la mescla de reacció de la PCR niada per a n+1 mostres seguint les següents proporcions:
 - i. Tampó PCR 10X.....5 µl
 - ii. MgCl₂ 25 mM.....3 µl
 - iii. dNTP 25 mM.....0.5 µl
 - iv. Oligonucleòtid específic 25 µM.....1 µl
 - v. Oligonucleòtid específic 25 µM.....1 µl
 - vi. Aigua bidestil·lada estèril.....38.1 µl
 - vii. Taq polimerasa 5U/µl.....0.4 µl
6. Mesclar els reactius i dispensar 49 µl en cada tub de 0.2 ml
7. Afegir 1 µl del producte de la primera PCR i incubar un termociclador *Gene Amp PCR system 2400* (Applied Biosystems) amb el programa d'amplificació específic per a cada joc d'oligonucleòtids

8. Conservar els tubs a 4°C fins l'anàlisi dels resultats per electroforesi en gel d'agarosa

8.5. Electroforesi en gel d'agarosa

Es va utilitzar un protocol clàssic d'electroforesi en gel d'agarosa (Sambrook i Russell, 2001). Els gels es van preparar utilitzant agarosa dissolta en TBE 1X a la concentració adequada per a visualitzar correctament els productes amplificats.

1. Mesclar 10 µl de mostra amb 2 µl de tampó de càrrega 6X
2. Carregar en el gel i córrer l'electroforesi 100 V
3. Retirar el gel i incubar 20-30 min en bromur d'etidi
4. Fotografiar el gel en un transiluminador *ImageMaster VDS*® (Pharmacia Biotech)

Reactius necessaris:

Tampó TBE 10X

Tris.....108 g/l
 Acid bòric.....55 g/l
 EDTA.....50 mM
 Ajustar a pH 8.0
 Esterilitzar per autoclau
 Conservar a RT

Tampó de càrrega 6X

Glicerol.....30% (v/v)
 Blau de bromofenol.....0.5% (p/v)
 Conservar a -20°C

Bromur d'etidi

Dissoldre 10 mg de bromur d'etidi en 0.5 ml de DMSO
 Afegir 4.5 ml d'etanol 100%
 Conservar a 4°C protegit de la llum
 Diluir 50 µl d'aquest estoc en 200 ml d'aigua destil·lada per establir la solució de treball

8.6. Seqüenciació dels productes amplificats

La seqüenciació dels productes amplificats per PCR es va dur a terme a la Unitat de Genòmica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Les molècules de DNA obtingudes van ser purificades mitjançant el *QUIAquick PCR*

Purification kit (QUIAgen) seguint les indicacions de la casa comercial. Posteriorment, es duia a terme la reacció de seqüenciació usant l'*ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit 3.1*, de la següent manera:

1. Preparar la mescla de reacció de seqüenciació:
 - i. Terminador.....2 µl
 - ii. Oligonucleòtid específic 2.5 µM.....1 µl
 - iii. DNA amplificat.....1-3 µl
 - iv. Aigua bidestil·lada estèril.....fins a 10 µl
2. Incubar en un termociclador *Gene Amp PCR system 2400* (Applied Biosystems) sota el programa d'amplificació: 10 sec a 96°C, 5 sec a la temperatura d'hibridació específica de cada oligonucleòtid (veure 8.20), 4 min a 60°C.
3. Purificació del producte amplificat per precipitació amb etanol d'acord a
 - i. Mesclar els 10 µl del producte de seqüenciació amb 64 µl d'etanol 95% i 26 µl d'aigua bidestil·lada estèril
 - ii. Agitar amb vòrtex i deixar precipitar 15 min a RT
 - iii. Centrifugar 20 min a 20,000 xg
 - iv. Eliminar el sobrenedant i afegir 200 µl d'etanol 70%
 - v. Centrifugar 5 min a 20,000 xg
 - vi. Repetir passos iv. i v. dues vegades més
 - vii. Deixar assecar el *pellet* 10 min en una *Speed-Vacuum*
4. Anàlisi de la mostra en un seqüenciador automàtic *ABI Prism 3700*
5. Anàlisi del resultat obtingut mitjançant el programa *Chromas*

8.7. Preparació d'homogenats encefàlics

Al llarg d'aquest treball s'han utilitzat diferents inòculs consistents en homogenats de teixits encefàlics a diferents concentracions finals. Per als estudis sobre efluent d'escorxadors i femtes animals es van utilitzar inòculs d'EEB i d'*scrapie* al 20% (p/v) preparats de la següent manera:

1. Pesar 350 mg de teixit encefàlic
2. Introduir el material en un tub *ribolyzer* que contingui boles de ceràmica i 1.7 ml d'una solució de glucosa al 5%
3. Homogeneïtzar el material mitjançant un TeSeE Precess (Bio-Rad) i realitzar un petit pols de centrifugació al finalitzar el cicle
4. Recuperar el sobrenedant mitjançant una xeringa de calibre 25 i conservar a -80°C

Per als estudis sobre estabilitat en aigües residuals es va utilitzar un inòcul d'*scrapie* salvatge i un inòcul d'EEB conegut com BSE₁. Ambdós van ser homogeneïtzats mitjançant un Polytron (Polytron Devices, Inc.), sometent el teixit encefàlic a tants cicles com fos necessari fins aconseguir una homogeneïtzació completa en PBS. La solució a homogeneïtzar es mantenia en gel durant tot el procés per evitar un excessiu sobreescalfament.

Reactius necessaris:

Glucosa 5% (p/v)

Dissoldre 5 g de glucosa en un volum final de 100 ml d'aigua bidestil·lada.

Conservar a 4°C

8.8. Purificació de SAF a partir d'homogeneïtzats encefàlics

Els nivells de PrPres en els homogeneïtzats encefàlics es va valorar aplicant un tractament amb proteïnasa K sobre un protocol de purificació de SAF descrit anteriorment per Castilla i cols. (2003). En detall,

1. Descongelar 100 µl al 10% (p/v) de la mostra a valorar (diluir-la a concentració final del 10%, si cal)
2. Afegir un volum de Sarkosyl al 10% (p/v) i homogeneïtzar en un vòrtex
3. Mantenir la mostra homogeneïtzada 2-3 min a RT
4. Centrifugar 5 min a 2,000 xg a 4°C
5. Recuperar el sobrenedant i dispensar-lo en dues alíquotes diferents
6. Mantenir una alíquota a 4°C i afegir PK (Roche) en un dels tubs a partir d'una solució de PK a 1 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH 7.4 fins a la concentració final desitjada d'acord amb l'inòcul a analitzar
7. Incubar aquesta segona alíquota 1h a 37°C
8. Aturar la reacció afegint PMSF fins a una concentració final de 10 mM
9. Centrifugar ambdues alíquotes 30 min a 20,000 xg a 4°C
10. Descartar el SN i resuspendre el *pellet* en tampó de càrrega
11. Incubar 10 min a 100°C i analitzar per western blotting

Reactius necessaris:

PMSF 0.1M

Dissoldre 0.435 g de PMSF en 25 ml d'isopropanol
Incubar a 80°C fins a una correcta dissolució

Fer parts alíquotes de 500 µl

Conservar a -20°C

Tampó de càrrega 3X

Tris-HCl 1.5M pH 6.8.....12.5% (v/v)
SDS.....12% (p/v)
Glicerol.....30% (v/v)
B-mercaptoetanol.....15% (v/v)
Blau de bromofenol 1%.....0.05% (v/v)
Esterilitzar per filtració
Per a condicions reductores, afegir DTT fins 150 mM (3X)
Conservar a -20°C

8.9. Purificació de SAF mitjançant el *Bio-Rad TeSeE-Purification kit*

El kit de purificació de SAF comercialitzat per Bio-Rad es basa en la detecció de SAF en mostres biològiques homogeneïtzades, preferentment al 20%, en una solució de glucosa al 5% mitjançant l'aplicació dels següents passos:

1. Disposar un volum de mostra en un tub eppendorf net (ex. 500 µl)
2. Afegir un volum (500 µl) del tampó desnaturalitzant (solució A) prèviament reconstituït amb la solució de proteïnasa K (PK) a raó de 4 µl per ml de tampó
3. Homogeneïtzar en un vòrtex i incubar immediatament 10 min a 37°C
4. Afegir un volum (500 µl) del tampó de precipitació (solució B) i centrifugar 5 min a 20,000 xg
5. Descartar el SN i dissoldre el *pellet* en 1/10 (ex. 50 µl) del volum inicial de tampó de resolució (solució C)
6. Desnaturalitzar 5 min a 100°C i analitzar per ELISA mitjançant el *Bio-Rad TeSeE EIA Detection kit*.

Aquest protocol de purificació es pot adaptar per tal de permetre una detecció posterior de SAF mitjançant la tècnica de *western blotting* realitzant les següents modificacions en els passos que es detallen a continuació.

1. Disposar un volum de mostra en un tub eppendorf net (ex. 500 µl)
2. Afegir un volum (500 µl) del tampó desnaturalitzant (solució A) prèviament reconstituït amb la solució de proteïnasa K (PK) a raó de 20 µl per ml de tampó
3. Homogeneïtzar en un vòrtex i incubar immediatament 10 min a 37°C
4. Afegir un volum (500 µl) del tampó de precipitació (solució B) i centrifugar 5 min a 20,000 xg
5. Descartar el SN i dissoldre el *pellet* en 1/10 (ex. 50 µl) del volum inicial de tampó de càrrega 1X
6. Incubar la mostra 5 min a RT i desnaturalitzar 5 min a 100°C
7. Centrifugar 11 min a 20,000 xg i transferir el sobrenedant a un tub nou

8.10. Determinació del contingut de PrP^c en homogeneïtzats encefàlics i efluent d'escorxador

Mitjançant el següent protocol es van quantificar els nivells de PrP^c existents en els homogeneïtzats encefàlics:

1. Disposar un volum de la mostra homogeneïtzada en un tub eppendorf
2. Afegir un volum de tampó desnaturalitzant (solució A, *TeSeE Purification kit*) i homogeneïtzar en un vòrtex
3. Incubar 10 min a 37°C
4. Centrifugar 5 min a 2,700 xg
5. Recuperar el SN i diluir-lo 1:10 (v/v) en tampó Tritó/DOC 1X
6. Establir un banc de dilucions seriades 1:2 en tampó Tritó/DOC 1X
7. Analitzar per ELISA mitjançant el *Bio-Rad TeSeE EIA Detection kit*

Aquest protocol va ser adaptat per tal de determinar el contingut de PrP^c de forma aproximada en els *pellets* resultants de les centrifugacions aplicades a les mostres d'aigua residual d'escorxador. Així,

1. Centrifugar 20 ml d'aigua residual durant 45 min a 7,000 xg
2. Descartar el SN i pesar el *pellet*
3. Eluir el *pellet* en 2 volums (p/v) de tampó Tritó/DOC 1X
4. Incubar 10 min a 37°C
5. Centrifugar 5 min a 2,700 xg
6. Recuperar el SN i establir un banc de dilucions seriades 1:2 en tampó Tritó/DOC 1X
7. Analitzar per ELISA mitjançant el *Bio-Rad TeSeE EIA Detection kit*

Reactius necessaris:

<u>Tampó Tritó/DOC (2X)</u>	Tris-HCl.....20 mM
	EDTA.....20 mM
	Acid deoxicòlic (DOC).....1% (v/v)
	Tritó X-100.....1% (v/v)
	Ajustar a pH 7.4
	Esterilitzar per autoclau abans d'afegir Tritó X-100
	Conservar a 4°C

8.11. Determinació del contingut de proteïna total en efluent d'escorxador

La concentració de proteïna total es va analitzar mitjançant el *BCA Protein Assay Kit* (Roche) en les dues fraccions (*pellet* i sobrenedant) obtingudes a partir de la centrifugació de les mostres d'efluent. Així es va procedir a

1. Centrifugar els efluent 45 min a 7,000 xg
2. Homogeneïtzar el *pellet* en 2 volums (p/v) de glucosa 5% en un tub *ribolyzer* amb boles de ceràmica i filtrar la solució homogeneïtzada mitjançant una xeringa de calibre 25
3. Establir un banc de dilucions seriades 1:2 en tampó Tritó/DOC 1X tant per a la fracció sobrenedant com per al *pellet* homogeneïtzat
4. Establir un banc de dilucions seriades per a un estoc d'albumina bovina sèrica (BSA) de concentració coneguda
5. Disposar 25 µl/pou de cada mostra en la placa adjunta
6. Afegir 200 µl/pou d'una mescla de reactiu A i reactiu B en proporció 50:1
7. Incubar en foscor durant 30 min a 37°C
8. Determinar la densitat òptica a 560 nm en un lector automàtic de microplaques

8.12. Lligació del mAb a boles magnètiques recobertes d'estreptavidina

Per tal d'obtenir boles magnètiques recobertes d'estreptavidina unides a un anticòs monoclonal, el mAb va ser biotinitat mitjançant el *Biotin Protein Labeling kit* (Roche) i posteriorment acoblat a les *Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles* (SA-PMP, Promega). El protocol utilitzat es detalla a continuació.

1. Prendre un volum de mAb (òptim, 500 µl) dissolt en PBS (concentració inicial mAb 1 mg/ml) i afegir biotina fins a concentració final de 0.03 mg/ml, a partir d'una dilució 1:10 en DMSO de l'estoc de Biotin-7-NHS proporcionat (òptim, 15 µl a 2 mg/ml).
2. Incubar la mescla 2h a RT en agitació orbital
3. Rentar una columna Sephadex G-25 amb 5 ml de solució de bloqueig (1 cop) i, posteriorment, amb 5ml de PBS (6 cops)
4. Passar la solució que conté el mAb per la columna i afegir-hi PBS fins a 1 volum final de 2.5 ml
5. Recollir les 40 primeres gotes de l'elut en 4 tubs eppendorf (10 gotes/tub, la fracció II conté el 80% del mAb biotinitat) i conservar a 4°C
6. Rentar les SA-PMP 3 cops en PBS
7. Prendre un volum de la fracció II (òptim, 250 µl contenint 200 µg de mAb biotinitat) i afegir SA-PMP a raó d'1 mg per 70 µg mAb (òptim, 3 mg de SA-PMP)

8. Incubar la mescla 30 min a RT en agitació orbital
9. Disposar la mescla en un iman, descartar la fase aquosa i rentar les BM 3 cops en PBS
10. Eluir les BM en PBS·BSA.

Reactius necessaris:

PBS·BSA 0.1%

Dissoldre 10 mg de BSA en 10 ml de PBS
 Conservar a 4°C

8.13. Lligació del mAb a boles magnètiques recobertes de grups *tosyl*

El mAb va ser acoblat a *Dynabeads® M-280 Tosylactivated* seguint en protocol recomanat pel fabricant.

1. Prendre un volum de boles magnètiques (òptim, 1 ml) i disposar-les en un iman
2. Descartar la fase aquosa i rentar 1 cop amb un volum de tampó fosfat
3. Afegir el mAb a la solució de BM (òptim, 0.5 mg mAb)
4. Incubar 16-24 h a 37°C en agitació orbital
5. Disposar la mescla en un iman i descartar la fase aquosa
6. Sotmetre les BM a 2 rentats de 5 min a 4°C en PBS·BSA en agitació orbital
7. Disposar les BM en un iman i descartar la fase aquosa
8. Incubar 4h a 37°C en un volum de tampó Tris·BSA en agitació orbital
9. Disposar les BM en un iman, descartar la fase aquosa i rentar, per últim cop, 5 min a 4°C en PBS·BSA en agitació orbital
10. Eluir les BM en PBS·BSA.

Reactius necessaris:

Tampó fosfat sòdic 0.1M

NaH₂PO₄ x H₂O.....2.62 g/l
 Na₂HPO₄ x 2H₂O.....14.42 g/l
 Ajustar a pH 7.4
 Conservar a RT

Tampó Tris·BSA

Tris.....200 mM
 Dissoldre en 80 ml d'aigua bidestil·lada
 Ajustar pH a 8.5
 Afegir 0.1 g de BSA
 Enrasar a 100 ml amb aigua bidestil·lada
 Conservar a 4°C

Tampó PBS-BSA

NaCl.....8.8 g/l
BSA.....1 g/l
Dissoldre en tampó fosfat sòdic 0.01 M

8.14. PCR quantitativa

El mètode usat ha estat descrit prèviament per Hernroth i cols. (2002) i està basat en la tecnologia TaqMan® i l'ús de 2 oligonucleòtids i una sonda fluorogènica que reconeixen un fragment del gen de l'hexò del genoma d'adenovirus. Concretament, els oligonucleòtids usats com a *forward* i *reverse* presentaven la seqüència 5'-C(AT)TACATGCACATC(GT)C(CG)GG-3' i 5'-C(AG)CGGGC(GA)AA(CT)TGCAC CAG-3', respectivament. La sonda utilitzada presentava la seqüència 5'-(6FAM)CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT(TAMRA)-3' La quantificació d'adenovirus es va estimar mitjançant el *Genequant pro* (Amersham Biosciences) a partir del gen de l'hexò d'HAAdV 41 clonat en pBR322, que va ser usat com estàndard de la PCR quantitativa. El plàsmid va ser linearitzat amb BamH1 segons les recomanacions del fabricant (Promega), purificat amb el *QUIAquick PCR Purification kit* (QUIAGEN, Inc.), quantificat i diluït 1:10 de forma seriada.

1. Descongelar les mostres i els estàndards de PCR
2. Preparar la mescla de reacció per a n+10% afegint 0.9 µM de cada oligonucleòtid (AdF i AdR) i 0.225 µM de la sonda fluorogènica (AdP1) en TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
3. Dispensar 15 µl/pou de la mescla de reacció en una placa de 96 pous
4. Dispensar 10 µl/pou de cada mescla o estàndard de PCR, segons correspongui
5. Incubar la placa en un termociclador ABI 7700 detector system (Applied Biosystems) amb el programa d'amplificació específic per a aquest joc d'oligonucleòtids

Es van analitzar duplicats de cada mostra en dilució 1:10 i 1:100 i triplicats de cada dilució d'estàndard, així com controls negatius d'amplificació. La quantitat de DNA corresponia a la mitja dels valors obtinguts

8.15. Precipitació de proteïnes amb metanol

La precipitació de proteïnes amb metanol es va realitzar seguint un protocol estàndard de biologia molecular (Sambrook i Russell, 2001) i el contingut va ser valorat mitjançant *western blotting*. Així,

1. Diluir la mostra a precipitar en 4 volums de metanol fred
2. Incubar 1h a -70°C o, alternativament, ON a -20°C
3. Centrifugar 30 min a 20,000 xg
4. Descartar el sobrenedant i deixar evaporar el metanol
5. Afegir tampó de càrrega i deixar la mostra entre 5 i 10 min a RT
6. Resuspendre el *pellet* i incubar el tub 10 min a 100°C
7. Centrifugar 5 min a 20,000 xg i transferir el sobrenedant en un tub nou

8.16. Immunoprecipitació de PrP^{sc}

La tècnica d'immunoprecipitació descrita es fonamenta en la publicada per Morel i cols. (2004). Està optimitzada per immunoprecipitar PrP^{sc} a partir de teixits encefàlics, de forma que les modificacions establertes per adaptar la tècnica a altres tipus de mostres estan detallades en els corresponents capítols. De forma general,

1. Diluir un volum (típicament, 25 μl) d'inòcul al 10% (p/v) en un volum de PBS complementat amb 4% d'SK
2. Afegir PK (concentració final 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mostra) i incubar 30 min a 37°C
3. Aturar la reacció amb PMSF a concentració final de 3 mM
4. Afegir PBS fins dur la solució a un volum final de 0.5 ml
5. Afegir 10 μl de Boles Magnètiques prèviament preparades (apartat 8.13)
6. Mesclar per vòrtex i incubar 2h a RT en agitació orbital
7. Disposar el tub en un iman i descartar la fase aquosa
8. Rentar les BM afegint 0.5 ml de PBS·Tween 1%, mesclant per vòrtex, disposant el tub en un iman i descartant la fase aquosa
9. Repetir 2 cops el pas 8
10. Afegir 25 μl de tampó de resolució (solució C, *TeSeE-Purification kit*) o de tampó de càrrega segons el posterior anàlisi per ELISA o per *western blotting*, respectivament
11. Incubar 5 min a 100°C
12. Disposar el tub en un iman durant 1 min i recuperar la fase aquosa

Reactius necessaris:

PBS·SK 4%

Dissoldre 4 g de N-Lauroil-Sarcosine en 100 ml de PBS 1X
 Conservar a RT

PBS·Tween 1% (v/v)

Afegir 1 ml de Tween 20 a 100 ml PBS 1X
 Conservar a RT

8.17. Assaig immunoenzimàtic (EIA)

Es va usar un assaig immunoenzimàtic de format sàndwich basat en el publicat per Morel i cols (2004) usant el mAb 11C6 com a anticòs de captura i el mAb Bar224 com a anticòs traçador. Aquest assaig està dissenyat per a l'ús de conjugats d'acetilcolinesterasa. Les concentracions d'aquest enzim estan expressades com a unitats Ellman, cadascuna de les quals correspon aproximadament a 8 ng d'enzim (25 fmol de la forma tetramèrica). El protocol emprat fou el següent.

1. Cobrir els pous de la placa d'EIA (Nunc Immuno Plate Maxisorp Surface) amb 120 µl/pou de tampó fosfat potàssic reconstituït amb el mAb 11C6 a dilució 10 µg/ml
2. Incubar un mínim de 12h a RT
3. Buidar la placa i incubar-la ON a 4°C amb 300 µl/pou de tampó EIA
4. Rentar 3 cops la placa amb tampó de rentat incloent un rentat per immersió de 3 min entre el rentat 2 i 3
5. Diluir 1:10 els *pellets* prèviament desnaturalitzats en tampó de resolució (solucióC, *TeSeE-Purification kit*) amb tampó EIA
6. Dispensar 100 µl/pou en la placa i incubar 2h a RT
7. Rentar 3 cops la placa amb tampó de rentat incloent un rentat per immersió de 3 min entre el rentat 2 i 3
8. Dispensar 100 µl/pou de tampó EIA contenint el mAb traçador Bar224 a concentració de dues unitats Ellman/ml
9. Incubar 2h a RT
10. Rentar la placa 3 cops amb tampó de rentat incloent un rentat per immersió de 3 min entre el rentat 2 i 3
11. Dispensar 200 µl/pou de la solució Ellman
12. Incubar entre 30 i 90 min a RT
13. Determinar la densitat òptica a 414 nm en un lector automàtic de plaques

Reactius necessaris:

Tampó fosfat potàssic 0.1 M

K₂HPO₄.....100 mM

KH₂PO₄.....100 mM

Ajustar a pH 7.4 afegint la solució àcida de KH₂PO₄ a la solució de K₂HPO₄

Esterilitzar per autoclau

<u>Tampó EIA</u>	NaCl.....150 mM BSA.....0.1% (p/v) Azida sòdica.....0.1% (p/v) Dissoldre en tampó fosfat potàssic 100 mM pH 7.4 Conservar a 4°C
<u>Tampó de rentat</u>	Tampó fosfat potàssic pH 7.4 10 mM Tween 20.....0.05% (v/v) Conservar a 4°C
<u>Solució d'Ellman</u>	Tampó fosfat potàssic pH 7.4 100 mM Acetilcolina.....0.75 mM Reactiu d'Ellman.....0.5 mM

8.18. Bio-Rad TeSeE EIA Detection kit

La tècnica d'ELISA comercialitzada per la casa comercial Bio-Rad tant en la seva versió per a EET com en la optimitzada per a EET de petits ruminants (*Bio-Rad TeSeE and TeSeE-Sheep/Goat EIA Detection kit*) està dissenyada per a la detecció de PrP^{Sc} eluïda en el tampó de resolució (solució C) del *Bio-Rad TeSeE-Purification kit*, tot i que altres tampons són també compatibles, com és el cas del tampó Tritó/DOC. En detall, el protocol emprat consisteix en:

1. Diluir 1:5 els *pellets* prèviament desnaturalitzats en tampó de resolució (solució C) amb tampó per a dilució de mostres (reactiu R6) i aplicar 100 µl/pou en la placa adjunta
2. Incubar 75 min a 37°C
3. Rentar 3 cops la placa amb tampó de rentat (reactiu R2)
4. Dispensar 100 µl/pou del conjugat anti-PrP (reactiu R7) i incubar 1h a 4°C
5. Rentar 5 cops la placa amb tampó de rentat (reactiu R2)
6. Distribuir 100 µl/pou de solució de revelat (reactiu R8) i incubar 30 min sota fosc a temperatura ambient
7. Afegir 100 µl/pou de solució d'aturada (reactiu R10) i determinar la densitat òptica a 450/620 nm (mode bicromàtic) en un lector automàtic de microplaques

Les mostres es consideren positives quan la diferència entre les lectures de densitat òptica a 450 nm i a 620 nm ($A_{450/620}$) és superior a la diferència mitja dels 4 controls negatius inclosos en cada assaig més 0.210, sempre que tots els valors per als controls negatius siguin inferiors a 0.150.

8.19. Electroforesi SDS-PAGE i *Western blotting*

La tècnica de WB emprada està dissenyada per a l'ús de cubetes d'electroforesi verticals Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad) per a gels de 7.5 x 10 cm. Les proteïnes eren separades per electroforesi en gels 12 % acrilamida, transferides a membranes de fluorur de polivinilidè (PVDF) en sistema humit (Mini Trans-blot® Cell, Bio-Rad) i immunodetectades amb anticossos específics (Taula anticossos).

Per a la preparació dels gels d'acrilamida, es van seguir les següents proporcions:

Reactiu	Gel de migració	Gel separador
Aigua bidestil·lada	3.5 ml	5.5 ml
Tampó de migració (4X)	2.5 ml	-
Tampó de separació (4X)	-	2.5 ml
Acrilamida 30%	4.0 ml	2.0 ml
Persulfat amònic 10%	60 µl	60 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Un cop els gels estaven preparats, es va efectuar l'electroforesi i el *western blotting* de la següent manera.

1. Omplir la cubeta d'electroforesi amb tampó de migració 1X i carregar les mostres prèviament desnaturalitzades en tampó de càrrega
2. Electroforesi a 100 V durant 1h
3. Activar la membrana de PVDF per immersió 15 sec en metanol pur (Panreac) i equilibrar-la 2 min en aigua milliQ (Millipore) i 5 min en tampó de transferència 1X
4. Retirar els gels i incubar-los 5 min en tampó de transferència 1X
5. Muntar el sistema de transferència seguint l'ordre següent
 - i. Pol positiu

- ii. Paper Whatman (x1) empapat en tampó de transferència 1X
 - iii. Membrana de PVDF marcada
 - iv. Gel d'acrilamida
 - v. Paper Whatman (x1) empapat en tampó de transferència 1X
 - vi. Pol negatiu
6. Transferir 70 min a 0.4A per cubeta
 7. Bloquejar ON a 4°C min en tampó de bloqueig a temperatura ambient
 8. Rentar 5 min en PBS·Tween
 9. Incubar 1 h a RT en tampó de bloqueig reconstituït amb la dilució corresponent d'anticòs primari
 10. Rentar 10 min en PBS·Tween (x3)
 11. Incubar 1h a RT en tampó de bloqueig reconstituït amb la dilució corresponent d'anticòs secundari marcat amb peroxidasa
 12. Rentar 10 min en PBS·Tween (x3)
 13. Rentar 5 min en PBS 1X
 14. Incubar 5 min amb 2 ml d'ECL-Plus (Amersham, GE Healthcare)
 15. Secar la membrana i exposar en Hyperfilm (Amersham, GE Healthcare)
 16. Revelar els films en un revelador automàtic

El protocol d'immunodetecció va ser adaptat per a l'ús del anticòs primari SHa31 (Jacques Grassi, CEA, France) marcat directament amb peroxidasa fent les següents modificacions en els passos que es detallen a continuació.

1. Bloquejar 30 min en BSA 5% a temperatura ambient rentar 3 cops (1 min, 5 min i 10 min) en PBS·Tween
2. Rentar 5 min en PBS·Tween
3. Incubar 30 min a RT en PBS·Tween reconstituït amb SHa31 a la dilució corresponent
4. Rentar 3 cops amb PBS·Tween durant 30 sec, 5 min i 10 min
5. Incubar 5 min amb 2 ml d'ECL-Plus (Amersham, GE Healthcare)
6. Secar la membrana i exposar en Hyperfilm (Amersham, GE Healthcare)
7. Revelar els films en un revelador automàtic

Reactius necessaris:

Tampó de migració (4X)

Tris.....1.5 M
SDS.....11.16 mM
Dissoldre en 180 ml d'aigua bidestilada

Ajustar a pH 8.8
Enrasar a 200 ml amb aigua bidestil·lada
Esterilitzar per filtració
Conservar a RT

Tampó de separació (4X)

Tris.....0.5 M
SDS.....11.16 mM
Dissoldre en 180 ml d'aigua bidestil·lada
Ajustar a pH 6.8
Enrasar a 200 ml amb aigua bidestil·lada
Esterilitzar per filtració
Conservar a RT

Persulfat amònic 10% (p/v)

Dissoldre 1 g de PSA en 10 ml d'aigua bidestil·lada
Fer parts alíquotes d'1 ml
Conservar a -20°C

Tampó de migració (10X)

Tris.....30.2 g/l
Glicina.....188 g/l
SDS.....10 g/l
Esterilitzar per autoclau
Conservar a RT

Tampó de transferència (10X)

Tris.....30.2 g/l
Glicina.....144.13 g/l
Esterilitzar per autoclau

Tampó de bloqueig

Dissoldre 5 g de llet descremada en pols en 100 ml de PBS 1X

BSA 5%

Dissoldre 5 g de BSA en 100 ml d'aigua bidestil·lada

PBS·Tween

Diluir 100 ml PBS 10X en 900 ml d'aigua bidestil·lada i afegir 1 ml Tween 20

8.20. Taula d'iniciadors emprats en aquest estudi

Virus ^a (regió)	Posició	Reacció	Iniciador	Amplificat	T ^a	Seqüència ^f
HAdV (hexò)	18858-18883 ^b	1 ^a PCR <i>left</i>	HL	301 pb	55°C	5'-GCCGAGTGGTCTTACATGCACATC-3'
HAdV (hexò)	19136-19158	1 ^a PCR <i>right</i>	HR			5'-CAGCACGCCGGGATGTCCAAAGT-3'
HAdV (hexò)	18937-18960	PCR niada <i>left</i>	NHL	143 pb	57°C	5'-GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG-3'
HAdV (hexò)	19051-19079	PCR niada <i>right</i>	NHR			5'-TGACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC-3'
PAdV (hexò)	20627-20647 ^c	1 ^a PCR <i>left</i>	PALF	612 pb	55°C	5'-GATGTCATGYAACGTCAAC-3'
PAdV (hexò)	21217-21238	1 ^a PCR <i>right</i>	PARF			5'-CACGGAGGAGTCRAACTGGATG-3'
PAdV (hexò)	20711-20733	PCR niada <i>left</i>	PALN	344 pb	55°C	5'-TACTGCMAGTTYCACATCCAGGT-3'
PAdV (hexò)	21035-21054	PCR niada <i>right</i>	PARN			5'-GGAATGGAGATGGGCAGGTT-3'
PAdV (proteasa)	18858-18883 ^c	1 ^a PCR <i>left</i>	Pr-PALF	611 pb	60°C	5'-CACCAGCCRCACMGAGCGTCATCG-3'
PAdV (proteasa)	19136-19158	1 ^a PCR <i>right</i>	Pr-PARF			5'-GGCGGTGKMGCGRAAGTASGIGGA-3'
PAdV (proteasa)	18937-18960	PCR niada <i>left</i>	Pr-PALN	312 pb	51°C	5'-CTTCCTGGGMACMTTGGACAA-3'
PAdV (proteasa)	19051-19079	PCR niada <i>right</i>	Pr-PARN			5'-TGTSGGGSYAGYKGCIAAAGG-3'
BAdV (hexò)	19235-19256 ^d	1 ^a PCR <i>left</i>	BALF	641 pb	52°C	5'-GRTGGTCIYTRGATRTRATGGA-3'
BAdV (hexò)	19852-19872	1 ^a PCR <i>right</i>	BALN			5'-CAGCACGCCGGGATGTCCAAAGT-3'
BAdV (hexò)	19347-19370	PCR niada <i>left</i>	BALN	430 pb	51°C	5'-ARGTWCCWCARAARTTTTTTGC-3'
BAdV (hexò)	19747-19769	PCR niada <i>right</i>	BARN			5'-CCWGAATAHRIAARTTKGGATC-3'
BAdVsII (proteasa)	17380-17404 ^e	1 ^a PCR <i>left</i>	BAVsII-LF	677 pb	52°C	5'-TCAGCTGGTAGTGCWRCRACATGAG-3'
BAdVsII (proteasa)	18013-18036	1 ^a PCR <i>right</i>	BAVsII-RF			5'-GAAGATGAWGAAGAMGAYTAA-3'
BAdVsII (proteasa)	17472-17494	PCR niada <i>left</i>	BAVsII-LN	525 pb	46°C	5'-ACTTTGATTGYMGATTCCAGC-3'
BAdVsII (proteasa)	17973-17996	PCR niada <i>right</i>	BAVsII-RN			5'-TTTTATTAADCCAAYTTWGTATT-3'

^a HAdV, adenovirus humans; PAdV, adenovirus porcins; BAdV, adenovirus bovins; BAsVsII, adenovirus bovins subgrup II

^b Posicions referents a la seqüència del genoma complet de l'adenovirus humà tipus 2 (num. accés AC_000007)

^c Posicions referents a la seqüència del genoma complet de l'adenovirus porcí tipus 3 (num. accés AF083132)

^d Posicions referents a la seqüència del genoma complet de l'adenovirus boví tipus 3 (num. accés NC_001876)

^e Posicions referents a la seqüència del genoma complet de l'adenovirus boví tipus 4 (num. accés NC_002685)

^f D=A+G+T, K=G+T, H=A+C+T, M=A+C, R=A+G, S=G+C, W=A+T, Y=C+T, I=inosina

8.21. Taula d'anticossos emprats en aquest estudi

Anticòs	Tipus	Aplicació	Dilució	Epítip ^a	Origen
SHa31	IgG	WB	1:2,000	145-YEDRYRE-152	Laboratori Dr. Jacques Grassi
6H4	IgG	WB	1:5,000	144-DYEDRYRE-152	Prionics, Ltd.
2A11	IgG	WB	1:2,000	163-QVYRPVDQ-171	Laboratori Dr. Juan M ^a Torres
Anti-mouse IgG	IgG	WB	1:2,000	mouse IgG	Amersham Biosciences
11C6	IgG	EIA	10 µg/ml	no identificat	Cedit pel Dr. Jacques Grassi
Bar224	IgG	EIA	2 UE/ml	141-FGSDYEDRYR-151	Laboratori Dr. Jacques Grassi
βS36	IgM	IP	-	no identificat	Laboratori Dr. Jacques Grassi
15B3	IgG	IP	-	comformacional	Prionics, Ltd.

IgG, immunoglobulina tipus G; IgM, immunoglobulina tipus M; WB, *western blotting*; EIA, assaig immunoenzimàtic; IP, immunoprecipitació

^a Posicions referents a la seqüència completa de la PrP ovina (Num. accés NP001009481)

8.22. Números d'accés al *GenBank*

Les seqüències d'adenovirus bovins i porcins identificades en aquest estudi han estat sotmeses al *GenBank* sota els següents números d'accés:

AY288805-AY288813: seqüències de la proteïna hexò d'adenovirus porcins

AY288814-AY288818: seqüències de la proteïna hexò d'adenovirus bovins

AY288819-AY288821: seqüències de la proteïna proteasa d'adenovirus bovins