



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 128 948**

② Número de solicitud: 009601785

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/53

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **26.07.1996**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.1999**

Fecha de concesión: **30.11.1999**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2000**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.02.2000

⑰ Titular/es: **Universidad de Zaragoza
Ciudad Universitaria. Plza. San Francisco, s/n
50009 Zaragoza, ES**

⑱ Inventor/es: **Lampreave Palacios, Fermín;
Alava Martínez de Contrasta, María Angeles;
González Ramón, María Nieves y
Piñeiro Antón, Andrés**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Método de diagnóstico de las enfermedades del cerdo y en la evaluación de la calidad de su carne.**

㉑ Resumen:

Método de diagnóstico de las enfermedades del cerdo y en la evaluación de la calidad de su carne. El método se basa en la determinación inmunoquímica de la proteína Pig-MAP. La Pig-MAP es una proteína de fase aguda porcina cuya concentración plasmática aumenta de 20 a 30 veces en la inflamación experimental provocada por la inyección de aceite de trementina. Muestra una movilidad electroforética de $\alpha 2$ y un peso molecular aparente de 120,000. Pertenece a la familia del inhibidor de tripsina inter-alfa. La concentración de Pig-MAP determinada por métodos inmunoquímicos aumenta en las patologías más frecuentes del cerdo. Estas alteraciones afectan negativamente a la calidad de la carne. La determinación inmunoquímica de la Pig-MAC tiene aplicación, como marcador de bienestar, de la salud y de la calidad de la carne porcina.

ES 2 128 948 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Método de diagnóstico de las enfermedades del cerdo y la evaluación de la calidad de su carne.

La presente invención se enmarca dentro del campo de los métodos de diagnóstico inmunoquímicos utilizables en Medicina Veterinaria y en el control de calidad de alimentos.

Estado de la técnica.a) *Proteínas de fase aguda. Pig-MAP.*

En numerosos procesos fisiopatológicos (inflamación, infecciones, quemaduras, lesiones graves y estrés agudo, entre otros) el patrón de las proteínas plasmáticas se modifica considerablemente (Baumann y Gauldie, *Immunology Today*, (1994), 15, 74-80). Para un grupo de estas proteínas, denominadas de fase aguda, la concentración plasmática aumenta mucho, respecto de los valores normales, horas después de la iniciación del proceso patológico. La determinación de las proteínas de fase aguda tiene valor diagnóstico. Por ejemplo, el aumento en la concentración de la proteína C-reactiva en el suero sanguíneo humano es un marcador clínico de los procesos inflamatorios. El tipo de las proteínas de fase aguda, utilizables como marcadores clínicos, es distinto según las especies (Gruys, Obwolo y Toussaint, *Veterinary Bulletin*, (1994), 64, 1009-1018). En el caso del cerdo, se han observado aumentos en la concentración de la haptoglobina relacionados con rinitis atróficas, con infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, o después de la inyección de aceite de trementina (Gruys, Obwolo y Toussaint, *Veterinary Bulletin*, (1994), 64, 1009-1018; Lampreave, González-Ramón, Martínez-Ayensa, Hernández, Lorenzo, García-Gil y Piñeiro, *Electrophoresis*, (1994), 15, 672-676). La proteína C-reactiva es también de fase aguda en los cerdos (Lampreave, González-Ramón, Martínez-Ayensa, Hernández, Lorenzo, García-Gil y Piñeiro, *Electrophoresis*, (1994), 15, 672-676; Bürger, Fennert, Pohle y Wesemeir, *Journal of Veterinary Medicine Series A*, (1992), 39, 635-638).

En general, el estrés y los procesos inflamatorios, independientemente de sus causas, afectan a la calidad de la carne porcina. En particular, la denominada carne "pálida, blanda y exudativa" que afecta a un porcentaje superior al 25 % de los cerdos de matadero, se debe a esas situaciones patológicas (Adeola y Ball, *Journal of Animal Science*, (1992), 70, 1888-1894; Bendall y Swatland, *Meat Science*, (1988), 24, 85-126).

Sin embargo, la proteína plasmática porcina cuya concentración aumenta más en procesos inflamatorios experimentales es una nueva proteína denominada Pig-MAP (González-Ramón, Alava, Sarsa, Piñeiro, Escartín, García-Gil, Lampreave y Piñeiro, *FEBS Letters*, (1995), 371, 227-230). Esta proteína, cuya determinación inmunoquímica aplicada al diagnóstico es el objeto de esta patente, se caracteriza:

- i) porque en la inflamación experimental inducida por la inyección subcutánea de aceite de trementina en cerdos o por trauma quirúrgico, su concentración plasmática aumenta a las 24-48 horas de

esos tratamientos (Lampreave, González-Ramón, Martínez-Ayensa, Hernández, Lorenzo, García-Gil y Piñeiro, *Electrophoresis*, (1994) 15, 672-676; González-Ramón, Alava, Sarsa, Piñeiro, Escartín, García-Gil, Lampreave y Piñeiro, *FEBS Letters*, (1995), 371, 227-230). La concentración de la proteína en los animales de experimentación antes del tratamiento varía entre 0.3 y 0.6 mg/ml. En los animales tratados, la concentración de Pig-MAP se eleva entre 20 y 30 veces respecto de los valores normales. La concentración plasmática de la proteína alcanza de nuevo los valores basales a los 10 o 12 días después de la iniciación del proceso inflamatorio o quirúrgico.

- ii) por presentar un peso molecular aparente próximo a 120,000, determinado por electroforesis reductora en geles de poliacrilamida (6-10 % de monómero) en presencia de 0,1 % de dodecil sulfato sódico (SDS). En sueros sanguíneos envejecidos se detectan fragmentos de la proteína de pesos moleculares entre 80,000 y 30,000.
- iii) por tener una movilidad electroforética α_2 , determinada por inmunolectroforesis cruzada en geles de agarosa (1 %) preparados en tampón 4.48 g/L TRIS, 5.05 g/L veronal sódico, 0.11 g/L lactato cálcico, pH 8.4. Esa movilidad es prácticamente coincidente con la de la variante lenta de la α_2 -macroglobulina porcina.
- iv) porque la secuencia NH₂-terminal de aminoácidos conocida (González-Ramón, Alava, Sarsa, Piñeiro, Escartín, García-Gil, Lampreave y Piñeiro, *FEBS Letters*, (1995), 371, 227-230) muestra homología moderada (50 %) con la cadena pesada H2 de otra proteína plasmática humana denominada "Inhibidor de tripsina inter-alfa" (SWISS-PROT Protein DataBase). La Pig-MAP es además la proteína de cerdo homóloga de la proteína humana denominada PK-120 (Nishimura, Kakizaki, Muta, Sasaki, Pu, Yamashita y Nagasawa, *FEBS Letters*, (1995), 357, 207-211) o IHRP (Saguchi, Tobe, Hashimoto, Sano, Nakano, Miura y Tomita, *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, (1995), 117, 14-18).

b) *Métodos inmunoquímicos de cuantificación*

La cuantificación de una proteína individual en una mezcla compleja, por ejemplo en el suero sanguíneo, puede realizarse por métodos inmunoquímicos si se dispone de moléculas ligadoras que reconozcan de forma específica a la proteína a determinar. Entre estas moléculas ligadoras destacan los anticuerpos, ya sean policlonales (antisueros) o monoclonales. Los antisueros o los anticuerpos monoclonales, se consiguen inyectando, en condiciones apropiadas, en un animal distinto al del origen de la proteína, la proteína purificada, fragmentos de ella o péptidos sintéticos con la misma secuencia que en la proteína. Los anticuerpos específicos o los anticuerpos monoclonales se pueden purificar y aislar mediante

técnicas de afinidad, utilizando la proteína purificada o no, fragmentos de ella o péptidos sintéticos como moléculas ligadoras.

Entre los métodos inmunoquímicos cuantitativos cabe mencionar los siguientes:

- La inmunodifusión radial (Mancini, Carbonara y Heremans, *Immunochemistry*, (1965), 2, 235-254), que se basa en la utilización de geles de espesor uniforme que contienen las moléculas ligadoras (por ejemplo, antisueros, anticuerpos específicos o mezclas de anticuerpos monoclonales). Los geles se pueden preparar con agar-agar, agarosa o con otros polímeros naturales o sintéticos en tampones de pH próximos a la neutralidad. Cuando muestras que contienen la proteína a cuantificar se aplican en pocillos practicados en el gel, al difundir la proteína se producen círculos de precipitación cuya área es proporcional a la concentración de la proteína.

- La electroinmunodifusión (Laurell, *Analytical Biochemistry*, (1966), 15, 45-52) se basa en la difusión forzada eléctricamente en geles preparados como en el apartado anterior. En este caso se producen cohetes o triángulos de precipitación, cuya área es también proporcional a la concentración de la proteína en las muestras.

- Métodos basados en la dispersión de la luz (Price y Newman, *Principles and practise of immunoassay*, (1991), Ed. Stockton Press, Nueva York). Estos métodos consisten en la formación de complejos antígeno, (proteína a cuantificar) - moléculas ligadoras (mencionadas poco antes), cuando se mezclan soluciones de estas moléculas ligadoras con muestras que contienen la proteína a cuantificar. La proteína y las moléculas ligadoras, por ejemplo los anticuerpos, pueden estar inicialmente en forma soluble o asociados con partículas, preferiblemente de látex. La formación de inmunocomplejos se puede detectar por turbidimetría, midiendo la pérdida de la intensidad de la luz incidente debida a la dispersión; por nefelometría, en la que se determina la luz dispersada mediante un fotodetector situado a un determinado ángulo respecto de la luz incidente; y por contaje de partículas, seleccionando apropiadamente los ángulos de dispersión de la luz.

- Métodos inmunoenzimáticos en fase sólida. Cuando se requiere mayor sensibilidad se pueden utilizar métodos inmunoenzimáticos en fase sólida, como el denominado ELISA (Ternyinc y Avrameas, *Técnicas Inmunoenzimáticas*, (1989), Grupo Editorial Iberoamérica, México). Estos métodos se basan en la insolubilización de las moléculas ligadoras, preferentemente los anticuerpos, o de los antígenos mediante su adsorción sobre superficies, preferiblemente de plástico. La formación de los inmunocomplejos (después de la adición del antígeno, en el presente caso las muestras que contengan la proteína Pig-MAP, o del anticuerpo, en su caso) se pueden medir mediante la adición de una segunda molécula ligadora, frecuentemente un anticuerpo, unida covalentemente a una enzima. La actividad enzimática asociada con la molécula ligadora que se ha unido específicamente, es proporcional a la cantidad de antígeno (en el presente caso, la proteína Pig-MAP) en la muestra.

Del mismo modo que en la inflamación expe-

rimental o en el trauma quirúrgico, la concentración plasmática o sérica de la Pig-MAP aumenta mucho en procesos patológicos de la especie porcina, tales como: infección por el virus de Aujeszky, síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), infección por bacterias como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, abortos patológicos, estrés agudo, y otros. Todos ellos afectan a la salud de los animales, al rendimiento en la producción y a la calidad de la carne. La determinación de la Pig-MAP en muestras de plasma o suero sanguíneo, en otros fluidos fisiológicos o exudados orgánicos y en tejidos sólidos o en extractos tisulares es, por consiguiente, de utilidad como marcador clínico-sanitario tanto de los procesos patológicos como de la calidad de la carne.

La aplicación descrita en esta invención se basa en utilizar métodos inmunoquímicos en la determinación de la mencionada proteína, Pig-MAP, en muestras de origen porcino. Para ello, es preciso disponer de moléculas ligadoras de la proteína, que como ya se ha mencionado pueden ser antisueros, anticuerpos específicos o anticuerpos monoclonales contra la proteína Pig-MAP, fragmentos de ella o péptidos sintéticos derivados de su secuencia.

Los antisueros o los anticuerpos monoclonales se preparan inyectando la proteína purificada, Pig-MAP, fragmentos de ella o péptidos sintéticos, en animales de otra especie.

Para purificar Pig-MAP se puede partir de plasma o de suero sanguíneo porcino, preferentemente de fase aguda.

El aislamiento de la Pig-MAP se puede realizar mediante la combinación de varias técnicas, una de las cuales se menciona a continuación (González-Ramón, Alava, Sarsa, Piñeiro, Escartín, García-Gil, Lampreave y Piñeiro, *FEBS Letters*, (1995), 371, 227-230): a) se obtiene una fracción del material de partida de peso molecular de alrededor de 120,000 utilizando cromatografía en geles filtrantes; b) la Pig-MAP presente en la fracción anterior se adsorbe en azul de Cibacrón insolubilizado y se eluye aumentando la concentración salina del sistema; c) la fracción eluida del azul de Cibacrón se somete a cromatografía de intercambio iónico con resinas que contengan el grupo dietilaminoetil (DEAE), y d) las fracciones que contienen únicamente Pig-MAP se seleccionan después de su análisis por electroforesis en geles de poli(acrilamida) con SDS.

- La medida inmunoquímica de la concentración de la Pig-MAP puede llevarse a cabo utilizando antisueros o anticuerpos específicos por los métodos siguientes: inmunodifusión radial, electroinmunodifusión, métodos de dispersión de la luz o por métodos inmunoenzimáticos en fase sólida, cuyos fundamentos se han descrito poco antes en este texto.

Ejemplo.

En una realización preferida de esta invención que se acaba de describir, la Pig-MAP se aísla de suero sanguíneo de cerdo en fase aguda. Esta se provocó inyectando a los cerdos por vía subcutánea aceite de trementina en la proporción de 0.2 a 0.3 ml/kg de peso corporal. Los cerdos se sangraron, bajo anestesia, a las 24-48 horas

de la inyección. La sangre se dejó coagular espontáneamente y el suero se obtuvo después de la centrifugación moderada de la sangre coagulada. Alícuotas del suero sanguíneo se fraccionaron por filtración en Sephadex G-150, equilibrado en tampón 0.05M TRIS-HCl, 0.02M NaCl, pH 7.5. Se seleccionó la fracción de peso molecular alrededor de 120,000. Esta se somete a cromatografía de afinidad con el colorante Azul de Cibacrón insolubilizado en Sepharose-4B. La proteína Pig-MAP se fija al colorante en estas condiciones, mientras que otras proteínas séricas se excluyen. Después de lavar con el tampón mencionado, la Pig-MAP se separa del colorante aumentando la concentración salina del tampón hasta 0.5M NaCl. La fracción obtenida, enriquecida en Pig-MAP, se dializa frente a 0.05M TRIS-HCl, 0.02M NaCl, pH 7.5 y se somete a cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex-A50. Las proteínas se eluyen mediante un gradiente salino. Las fracciones eluidas se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS para seleccionar las que únicamente contienen la banda de peso molecular 120,000.

La proteína purificada, previamente emulsionada con un volumen igual de adjuvante completo de Freund, se inyecta subcutáneamente en varios puntos de la región dorsal en conejos, a una do-

sis de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal. Después de 3-4 semanas, se realizan inyecciones de recuerdo con la misma cantidad de proteína, emulsionada con adjuvante incompleto de Freund. A las dos semanas se sangran los animales para obtener los antisueros específicos.

Para determinar la concentración de la proteína Pig-MAP en muestras de suero o plasma se utiliza, por ejemplo, inmunodifusión radial. Para ello, se preparan geles de agarosa al 1% y de espesor uniforme en un tampón de pH neutro, que contienen una cantidad apropiada del antisuero específico anti-Pig-MAP. En los geles se practican pocillos, preferentemente de unos 3 mm de diámetro, separados entre sí al menos 1.5 cm. En cada pocillo, se introducen de 5 a 10 μl de muestras patrón (la proteína purificada o un suero de fase aguda, previamente valorado), que contengan Pig-MAP a concentraciones, preferentemente entre 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se aplican, asimismo, muestras problema a diluciones apropiadas, que para la mayor parte de los casos varían entre 1/10 y 1/300. Los geles se mantienen en posición horizontal y en cámara húmeda, preferentemente durante 24 a 48 horas. Se forman círculos de precipitación cuya área es proporcional a la concentración de la proteína.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico de las enfermedades del cerdo y la evaluación de la calidad de su carne, **caracterizado** por la determinación inmunoquímica de la proteína Pig-MAP, fragmentos de ella o péptidos sintéticos derivados de su secuencia ó que se base en el uso de moléculas ligadoras de la proteína Pig-MAP, o de fragmentos de ella o de péptidos sintéticos derivados de la secuencia de Pig-MAP.

2. Método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1^a, en el que el método inmunoquímico es la inmunodifusión radial.

3. Método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1^a, en el que el método inmunoquímico es la electroinmunodifusión cuantitativa.

4. Método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1^a, en los que el método inmunoquímico se base en la medida directa o indirecta de la dispersión de la luz (turbidimetría,

nefelometría o conteaje de partículas, preferiblemente de látex) después de la formación de complejos de la Pig-MAP con moléculas ligadoras.

5. Método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1^a, basado en la formación o en la inhibición del complejo antígeno (Pig-MAP)/moléculas ligadoras, siempre que uno de ellos se haya insolubilizado previamente en soportes sólidos, y en los que la cantidad del complejo antígeno-moléculas ligadoras se determina en una segunda fase mediante la adición de moléculas ligadoras, el propio antígeno, o moléculas secundarias (avidina, streptavidina, u otras) acoplados químicamente a enzimas (peroxidasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, y otras).

6. Uso de métodos de diagnóstico de acuerdo con las reivindicaciones 1^a a 5^a, aplicados a la determinación de Pig-MAP en fluidos fisiológicos, exudados orgánicos, extractos de tejidos o en tejidos sólidos, de cerdos sanos, enfermos o con alteraciones fisiológicas transitorias.

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/53

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	WO 9309142 A1 (UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN) 13.05.1993, todo el documento.	1-6 1-6
X Y	TOUSSAINT, M.J.M. et al. "Implication of Clinical Pathology in Assessment of Animal Health and in Animal Production and Meat Inspection". COMP. HAEMATOL. INT. Vol. 5. 1995. Páginas 149-157. Todo el documento, especialmente la discusión.	1-6 1-6
Y	GONZALEZ-RAMON, N. et al. "The major acute phase serum protein in pigs is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120". FEBS LETTERS. Vol. 371. 1995. Páginas 227-230. Todo el documento.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
30.03.99

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/1