



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 185 476**

⑫ Número de solicitud: 200100315

⑬ Int. Cl.⁷: G01N 33/53

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **13.02.2001**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2003**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.04.2003

⑱ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD MIGUEL
HERNANDEZ DE ELCHE**
Edificio Helike. Avda. del Ferrocarril, s/n
03202 Elche, Alicante, ES

⑲ Inventor/es: **Belmonte Martínez, Carlos;**
Sáez Valero, Javier;
Gallar Martínez, Juana;
Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, José Manuel y
Brun Torres, Alejandro

⑳ Agente: **Fernández Prieto, Angel**

㉑ Título: **Método para la detección de proteína PrP en animales vivos.**

㉒ Resumen:

Método para la detección de proteína PrP en animales vivos.

El método para la detección de proteína PrP en una muestra biológica extraída de un animal vivo comprende extraer una muestra de tejido ocular de dicho animal y ensayar la presencia de proteína PrP en dicha muestra. El método permite desarrollar un test in vivo y detectar la enfermedad en sus estadios más tempranos lo que permite prevenir la entrada en la cadena alimenticia para el consumo humano de animales infectados y sacrificar los animales infectados.

ES 2 185 476 A1

DESCRIPCION

Método para la detección de proteína PrP en animales vivos.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método para la detección de proteína PrP en una muestra biológica extraída de un animal vivo que comprende extraer una muestra de tejido ocular de dicho animal y ensayar la presencia de proteína PrP en dicha muestra.

10 **Antecedentes de la invención**

Las encefalopatías espongiformes transmisibles incluyen a un grupo de enfermedades neurodegenerativas de evolución letal en animales (vacas, corderos y otros) y seres humanos, que pueden ser transmitidas entre especies y que aparecen tras un largo período de incubación. Los signos clínicos en los seres humanos incluyen la demencia y la pérdida de coordinación motora. Morfológicamente, en las necropsias del cerebro se observa astrogliosis, cambios espongiformes (vacuolización) y a menudo, depósitos amiloides. En los animales, los signos incluyen alteraciones de la marcha y movimientos incoordinados. La enfermedad parece estar producida por un agente infeccioso al que se denominó **Aprión®** (prión) (partícula infecciosa constituida exclusivamente por proteínas), que contiene una proteína de 27-30 kDa resistente a proteasas. Esta proteína es un elemento común encontrado en estas enfermedades y aparece acumulada en el tejido nervioso donde causa las lesiones típicas de la enfermedad. Se trata de una isoforma anormal con un núcleo resistente a proteasa de la proteína prión presente normalmente en el huésped. La isoforma normal de la proteína, sensible a proteasa, ha sido denominada PrP^C mientras que la isoforma anormal, resistente a proteasas, se denomina PrP^{Sc} de **Ascrapie®** (scrapie) nombre en inglés que recibió la enfermedad presente en las ovejas.

El diagnóstico de la encefalopatía espongiforme transmisible tanto en el hombre como en los animales se ha basado en el cuadro clínico (diagnóstico clínico) y posterior confirmación anatomopatológica *post-mortem* de las lesiones cerebrales típicas de la enfermedad.

En los tejidos de los animales infectados se ha encontrado siempre la proteína prión específica de la enfermedad y, por tanto, la presencia de ésta puede considerarse un método diagnóstico fiable. Los niveles más altos de PrP^{Sc} en bovinos se han encontrado en el cerebro y en la médula espinal. La evidencia disponible sugiere que la infectividad está presente en el cerebro aproximadamente medio año antes de que se presenten los síntomas típicos de la enfermedad. Consecuentemente, se han desarrollado métodos basados en la detección de la proteína prión específica de la encefalitis espongiforme bovina (EEB) en animales sacrificados en matadero mediante técnicas inmunocitoquímicas y, más recientemente, a través del desarrollo de anticuerpos monoclonales que identifican la proteína prión. Estos anticuerpos reconocen tanto a la PrP^{Sc} patológica como a la PrP^C normal. Sin embargo, como la PrP^{Sc} es estable en presencia de enzimas de degradación, lo que no ocurre con la proteína prión normal, se han empleado enzimas proteolíticas (proteasas) para destruir la proteína normal conservando en la mezcla de reacción el fragmento de PrP^{Sc} resistente a proteasas, el cual se une posteriormente a un anticuerpo marcado que es detectado mediante, por ejemplo, técnicas fluorimétricas.

Los tests disponibles hasta la fecha para el diagnóstico de la EEB [Schaller, O. et al. (1999) Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrP^{Sc} detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathologica*, 98:437-443; The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. (8. July 1999). European Commission, DG24, Directorate B, Unit B3; Doherr M.G. et al. (1999) Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record* 145: 672; Oesch, B. et al. (2000). Application of Prionics Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs. *Archives of Virology*, Supp. 16: 189-195] sólo son capaces de detectar la enfermedad en el animal sacrificado, pero no en el animal vivo. Los expertos coinciden en que el máximo riesgo de transmisión aparece cuando el animal está en fase de presentación de síntomas clínicos o unos meses antes. El objetivo de cualquier test de diagnóstico es, por tanto, detectar la enfermedad lo más tempranamente posible o en el peor de los casos en los meses que preceden a la aparición de síntomas. Al ser necesario llevarlo a cabo en animales asintomáticos, la necesidad de un test in vivo resulta clave para evitar el sacrificio indiscriminado de animales, permitiendo distinguir a los infectados y sacarlos de la cadena alimentaria.

Las implicaciones económicas derivadas de la necesidad del sacrificio de animales para la confirmación

de la patología, son también importantes. En la actualidad, las normativas europeas, para intentar controlar la EEB, establecen la obligatoriedad y necesidad de sacrificar, además, de los ejemplares infectados, todas las cabezas de ganado de las granjas dónde los tests han sido positivos. Incluso se ha propuesto que, ante la limitación de los tests actuales, sería conveniente sacrificar todas las reses (en teoría sanas) mayores de 24-30 meses, lo que arruinaría la industria ganadera europea.

Por estos motivos, sería muy conveniente poder diagnosticar este tipo de enfermedades en animales vivos.

La córnea del ojo es el tejido más densamente innervado del organismo de los mamíferos, recibiendo fibras nerviosas sensoriales del ganglio trigémino que terminan libremente en las capas más superficiales del epitelio corneal. La conjuntiva del ojo también recibe una muy abundante innervación sensorial y simpática. Existe evidencia indirecta de que el ojo es uno de los órganos infectados por el prión. Sin embargo, nunca se ha utilizado el tejido ocular para el diagnóstico de la enfermedad en animales vivos.

Compendio de la invención

La invención se enfrenta con el problema de desarrollar un método para la detección de proteína PrP en seres vivos, en particular, proteína PrP relacionados con las encefalopatías espongiformes transmisibles tanto en animales como en seres humanos vivos.

Ahora se ha encontrado que puede detectarse la presencia de proteína PrP en tejido ocular. La solución proporcionada por la invención se basa en el hallazgo inesperado de que la accesibilidad del epitelio corneal para su extracción con mínimo trauma y la rica innervación del epitelio y el estroma superficial por las fibras nerviosas, proporciona una densidad muy alta de tejido nervioso en un volumen muy pequeño en el que es posible detectar proteína PrP.

Por consiguiente, un objeto de esta invención lo constituye un método para la detección de proteína PrP de una muestra biológica procedente de tejido ocular de un animal vivo.

Una ventaja del método proporcionado por esta invención radica en que permite distinguir entre animales de una cabaña que padecen la enfermedad y los que no la padecen evitándose de este modo el sacrificio indiscriminado e innecesario de toda la cabaña.

Otra ventaja del método proporcionado por la invención radica en que permite conocer si la enfermedad neurodegenerativa de un paciente o de un animal es debida a una encefalopatía espongiforme transmisible causada por proteína PrP o es debida a otras causas, sin necesidad de tener que realizar una biopsia de tejido cerebral. La realización del ensayo para detectar la presencia de proteína PrP en tejido ocular, en particular, en tejido corneal, presenta la ventaja adicional de que la córnea es un tejido que cicatriza generalmente sin secuelas con gran velocidad, lo que evita un daño tisular permanente como consecuencia de la toma de la muestra.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para detectar la presencia de proteína PrP en una muestra biológica extraída de un animal vivo, en adelante método de la invención, que comprende extraer una muestra de tejido ocular de dicho animal y ensayar la presencia de proteína PrP en dicha muestra. El método de la invención se caracteriza, por tanto, porque el ensayo para la detección de los PrP se realiza en una muestra biológica procedente de tejido ocular de un animal vivo.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término Aanimal@ (animal) incluye a cualquier animal vertebrado, preferentemente, mamífero, incluido el ser humano.

En una realización particular, los PrP a detectar son los PrP relacionados con la encefalitis espongiforme bovina (EEB), es decir, PrP^{Sc} y PrP^C.

La muestra biológica donde se ensaya la presencia de proteína PrP es una muestra procedente del tejido ocular de un animal vivo. En una realización particular, dicho tejido ocular se selecciona del tejido de la superficie anterior del ojo y sus anejos, por ejemplo, la córnea, la conjuntiva bulbar y la conjuntiva palpebral.

La extracción de la muestra de tejido ocular se puede realizar por cualquier método convencional,

sin necesidad de aplicarle anestesia general, aunque, preferentemente, bajo anestesia local, utilizando cualquier aparato apropiado que permita recoger muestras de tejido de la superficie anterior del ojo y de la conjuntiva ocular en un animal.

- 5 La detección de los PrP en la muestra de tejido ocular se puede realizar mediante cualquier método analítico convencional, por ejemplo, inmunocitoquímico o serológico utilizando los anticuerpos monoclonales, las proteasas y los marcadores (incluyendo anticuerpos) adecuados.

- 10 En una realización particular, la extracción de la muestra de tejido ocular se puede realizar mediante un aparato que permite extraer una capa de tejido superficial de la córnea o de la conjuntiva bulbar o palpebral del ojo de un animal vivo en la que pueda realizarse la determinación de proteína PrP, por ejemplo, PrP^{Sc} y PrP^C, con los métodos analíticos existentes.

- 15 A modo ilustrativo, el aparato para recoger muestras de tejido corneal en la superficie ocular está compuesto por un cilindro de diámetro variable (entre 2 y 15 mm) terminado en un borde afilado que constituye un trépano corneal y cuyo borde externo posee una pestaña que limita la penetración del trépano. En el interior del cilindro se mueve un émbolo, cuyo extremo inferior, dirigido hacia el borde en trépano del cilindro, posee una superficie circular ajustada al diámetro interno del cilindro, pudiendo moverse en dirección ascendente o descendente. La cara inferior de la superficie circular inferior del émbolo
20 puede llevar, adheridos a la misma, unos pelos de metal o de plástico rígido de longitud y diámetro variables, que forman un cepillo que cubre dicha superficie y que gira al girar el mango que posee el extremo opuesto del émbolo. Alternativamente, la superficie inferior del émbolo puede estar cubierta por una lija rugosa de grano variable o bien por un tejido de papel u otra fibra, empapado o cubierto por una sustancia adhesiva. El cilindro puede contener dos orificios, uno frente al otro, encima de la
25 pestaña que limita la penetración del trépano, y, acoplados a dichos orificios, se pueden encontrar dos tubos conectados mediante una válvula de una sola dirección a sendos depósitos de paredes laxas. Al aplicar el trépano sobre la córnea, penetra en dicho tejido y al descender el émbolo y girarlo se produce una lesión superficial de la córnea causada por los pelos o por la superficie rugosa del mismo. En caso de que el cilindro posea dichos orificios, el ascenso del émbolo succiona líquido del depósito lateral cuya
30 válvula se abre por presión negativa en el interior del cilindro, que diluye el tejido obtenido de la córnea, mientras que el descenso del émbolo inyecta el contenido líquido en el segundo depósito, conectado al cilindro por una válvula que se abre por presión positiva dentro del cilindro. El líquido contenido en el depósito es una solución adecuada para la determinación de proteína PrP en tejidos de animales.

- 35 Alternativamente, la extracción del tejido corneal se puede realizar con un material adherido a la superficie inferior del émbolo al que se le aplica un adhesivo que, en contacto con la córnea, arranca el tejido superficial corneal, quedando éste adherido al émbolo.

- 40 La extracción de tejido corneal también se puede realizar con un eje terminado en un cilindro macizo de diámetro y altura variables, en cuya superficie inferior se incluye un material absorbente sobre el que se aplica un adhesivo que, en contacto con la córnea, arranca el tejido superficial corneal quedando éste adherido al émbolo. El cilindro puede poseer un paso de rosca tallado en su superficie lateral que se enrosca en un depósito que contiene una solución adecuada para mantener bañado al tejido y para la ulterior determinación de proteína PrP en el material adherente que contiene el tejido, en la solución o
45 en ambos.

- La extracción de tejido de la conjuntiva bulbar se puede realizar, a modo de ejemplo, mediante el empleo de un aparato similar al descrito previamente pero que carece de dichos orificios laterales y posee un paso de rosca que permite enroscar la parte inferior del cilindro, de la que sobresale su superficie
50 inferior que comprende un cepillo, lija o adhesivo, en un depósito que contiene una solución adecuada para mantener bañado al tejido y para la ulterior determinación de proteína PrP en el tejido adherido al cepillo, en la solución o en ambos. Este aparato y método de extracción de tejido ocular puede utilizarse también para extraer tejido de la conjuntiva.

- 55 El método de la invención presenta numerosas ventajas puesto que permite desarrollar un test *in vivo* y detectar la enfermedad en sus estadios más tempranos, lo que permite no sólo prevenir la entrada en la cadena alimenticia para el consumo humano de las vacas infectadas sino también sacrificar sólo aquella parte de la explotación ganadera infectada y no la de la totalidad de las reses, cómo es necesario actualmente.

- 60 La técnica utilizada para la puesta en práctica del método de la invención es técnicamente sencilla y accesible a cualquier veterinario sin apenas necesidad de entrenamiento específico. Además, no es inva-

siva y permite, con sólo la aplicación de un anestésico local en el ojo, la extracción de una muestra de tejido. Tras la intervención, de unos minutos de duración en su totalidad, el animal no necesita cuidados especiales de recuperación ya que el procedimiento no provoca, en principio, problemas post-operatorios debido a que la epitelización corneal se produce normalmente en un período de alrededor de 72 horas.

El diámetro de la zona lesionada en el ojo del animal, normalmente entre 5 y 7 mm, y su localización periférica en la córnea o en la conjuntiva, evita que haya problema alguno de visión. En este sentido, debe tenerse en cuenta, además, que la extracción de tejido se limita a un sólo ojo. Las características de la toma de muestras por el método de la invención permiten su repetición a tiempos variables, si ello fuera necesario.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Detección de PrP^C en la córnea y en la conjuntiva del ojo de vaca

1.A Extracción de los tejidos

Se empleó tejido obtenido de 2 ojos de vaca, recién enucleados, sumergidos en solución salina fisiológica. Para la obtención de la muestra de tejido se utilizó un trépano corneal de 7 mm de diámetro. Se tomaron muestras de:

1) Epitelio corneal, obtenido mediante raspado de la zona dentro del área marcada con el trépano.

2) Epitelio corneal y estroma superficial, extraídos mediante un bisturí dentro del área marcada con el trépano.

3) Conjuntiva bulbar, cortada previa marcación con el trépano y ayuda de tijeras de iris en la cara externa del ojo.

4) Conjuntiva bulbar limbal y tejido corneal limbar, juntos, aplicando el trépano en un área que cubre mitad y mitad la conjuntiva y la córnea, divididas por el limbo.

5) Retina, disecando ésta por apertura del globo y tomando una pieza cuadrada de 10 mm de lado mediante tijera.

Las muestras de tejido se guardaron en tubos Ependorf conteniendo volúmenes variables de PBS (tampón fosfato-salino) (Tabla 1).

1.B Técnica de determinación

Para la detección de la proteína del prión celular PrP^C se trataron las córneas y demás tejidos con un volumen (equivalente al peso de la muestra de córnea) de solución Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; Ditiotretitol 100 mM, 2 % de SDS (dodecil sulfato sódico), 0,1 % de azul de bromofenol y 10 % de glicerol. La muestra se calentó a 100°C durante 5 minutos y se centrifugó durante 1 minuto a 20.000 x g. El sobrenadante se aplicó a un gel de poliacrilamida para la separación electroforética de las proteínas de la muestra. Las proteínas se transfirieron posteriormente a membranas de PVDF (immobilon-P) a 400 mA (constante) durante 1 hora con refrigeración (4°C), empleando tampón de transferencia (glicina 192 mM, Tris 25 mM, 10 % de metanol).

La inmunodetección de la proteína PrP^C se realizó mediante el empleo del anticuerpo monoclonal 2A11, obtenido en el CISA frente a la región carboxi-terminal (entre los aminoácidos 160-185) de la proteína PrP, utilizando técnicas convencionales de inmunoblotting. Brevemente, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 5 % leche desnatada en solución salina con fosfatos (PBS). La incubación del anticuerpo 2A11 se efectuó a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación tras la que la membrana se lava 5 veces empleando 5 % leche-PBS con 0,05 % de Tween 20. Un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa se utilizó para detectar los inmunocomplejos formados, mediante técnicas de quimioluminiscencia.

1.C Resultados

La Tabla 1 muestra los resultados iniciales obtenidos en 15 muestras de los ojos 1 y 2 [entre paréntesis en la columna (n° de vaca)]. La columna señalada como Atejido@ (tejido) indica la procedencia de la muestra y las características anatómicas de ésta y, a su lado, el volumen en el que fue diluido originalmente el tejido.

Los resultados obtenidos indican que cuando el volumen de tejido obtenido de la superficie del ojo es suficiente, es posible detectar PrP^C tanto en la córnea como en la conjuntiva del ojo de vaca.

TABLA 1

Tubo (n1 vaca)	Tejido (Hunidad corte)	Presencia de PrP ^C	Volumen PBS (μl)
1 (1)	Córnea raspado superficial (1)	negativo	500
2 (1)	Córnea raspado superficial (1)	negativo	100
3 (1)	Córnea + estroma (1)	positivo	100
4 (1)	Córnea + estroma (1)	positivo	50
5 (1)	Córnea completa (1)	positivo	100
6 (1)	Retina	negativo	100
7 (2)	Córnea raspado superficial (3)	positivo	100
8 (2)	Conjuntiva (1)	positivo	300
9 (2)	Córnea botón central + estroma (1)	positivo	100
10 (2)	Conjuntivo no pigmentado (1)	positivo	300
11 (2)	Retina	positivo	300
12 (3)	Córnea raspado superficial (3) (1 toma central + 2 tomas periféricas)	positivo	100
13 (3)	Córnea + limbo (1)	positivo	100
14 (3)	Córnea + estroma (1)	positivo	100
15 (3)	Córnea completa (1)	positivo	100

Los experimentos se han repetido con muestras de córnea y conjuntiva en 8 vacas más con resultados análogos.

Ejemplo 2

Detección de PrP^C en la córnea y la conjuntiva del ojo de ratón

2.A Extracción de los tejidos

Se emplearon empleó córneas procedentes de 6 ratones híbridos (129/01a x CBA) Tras anestesiar al animal con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg) se enuclearon ambos ojos que fueron colocados en una placa de Petri conteniendo PBS. Con ayuda de una lupa binocular se cortó con bisturí y tijeras de iridectomía la cornea completa en el borde limbal.

2.B Técnica de determinación

Para la detección de la proteína del prión celular PrP^C se trataron las córneas y demás tejidos con un volumen (equivalente al peso de la muestra de córnea) de solución Tris-HCl 50 mM (pH 6,8); ditiotretiol 100 mM, 2 % de SDS, 0,1 % de azul de bromofenol y 10 % de glicerol. La muestra se calentó a 100°C durante 5 minutos y se centrifugó durante 1 minuto a 20.000 x g. El sobrenadante se aplicó a un gel de poliacrilamida para la separación electroforética de las proteínas de la muestra. Las proteínas se transfirieron posteriormente a membranas de PVDF (immobilon-P) a 400 mA (constante) durante 1 hora con refrigeración (4°C), empleando tampón de transferencia (glicina 192 mM, Tris 25 mM, 10 % de metanol).

La inmunodetección de la proteína PrP^C se realizó mediante el empleo del anticuerpo monoclonal 2A1, obtenido en el CISA frente a la región carboxi-terminal (entre los aa 160-185) de la proteína PrP, utilizando técnicas convencionales de inmunoblotting. Brevemente, las membranas se bloquearon durante

1 hora a temperatura ambiente con 5 % leche desnatada en PBS. La incubación del anticuerpo 2A11 se efectúa a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación tras la que la membrana se lava 5 veces empleando 5 % leche-PBS con 0,05 % de Tween 20. Un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa se utilizó para detectar los inmunocomplejos formados, mediante técnicas de quimioluminiscencia.

2.C Resultados

En las córneas de los 6 animales estudiados (12 muestras) se detectó el patrón de inmunorreacción característico de PrP^C.

Ejemplo 3

Detección de PrP^C en la córnea y la conjuntiva del ojo de cerdo

3.A Extracción de los tejidos

En 5 cerdos Large White x Landrace, se extrajeron ambos ojos tras el sacrificio del animal. Los ojos se colocaron en un depósito con PBS y las córneas fueron disecadas con un bisturí. Se tomaron muestras del tejido por corte de las mismas con tijera.

3.B Técnica de determinación

Para la detección de la proteína del prión celular PrP^C se trataron las córneas y demás tejidos con un volumen (equivalente al peso de la muestra de córnea) de solución Tris-HCl 50 mM (pH 6,8); ditiotretitol 100 mM, 2 % de SDS, 0,1 % de azul de bromofenol y 10 % de glicerol. La muestra se calentó a 100°C durante 5 minutos y se centrifugó durante 1 minuto a 20.000 x g. El sobrenadante se aplicó a un gel de poliacrilamida para la separación electroforética de las proteínas de la muestra. Las proteínas se transfirieron posteriormente a membranas de PVDF (immobilon-P) a 400 mA (constante) durante 1 hora con refrigeración (4°C), empleando tampón de transferencia (glicina 192 mM, Tris 25 mM, 10 % de metanol).

La inmunodetección de la proteína PrP^C se realizó mediante el empleo del anticuerpo monoclonal 2A11, obtenido en el CISA frente a la región carboxi-terminal (entre los aa 160-185) de la proteína PrP, utilizando técnicas convencionales de inmunoblotting. Brevemente, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 5 % leche desnatada en PBS. La incubación del anticuerpo 2A11 se efectúa a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación tras la que la membrana se lava 5 veces empleando 5 % leche-PBS con 0,05 % Tween 20. Un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa se utilizó para detectar los inmunocomplejos formados, mediante técnicas de quimioluminiscencia.

3.C Resultados

En las córneas de los 5 animales estudiados (10 muestras) se detectó el patrón de inmunorreacción característico de PrP^C.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de priones en una muestra biológica extraída de un animal vivo, que comprende extraer una muestra de tejido ocular de dicho animal y ensayar la presencia de priones en dicha muestra.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho animal es un mamífero.

3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho animal se selecciona entre bóvidos, óvidos y seres humanos.

4. Método según la reivindicación 1, en el que dichos priones a detectar son los priones relacionados con la encefalitis espongiforme bovina (ESB), PrP^{Sc} y PrP^{C} .

5. Método según la reivindicación 1, en el que dicho tejido ocular se selecciona del tejido de la superficie anterior del ojo y sus anejos.

6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho tejido ocular se selecciona entre córnea, conjuntiva bulbar y conjuntiva palpebral.

7. Método según la reivindicación 1, en el que la extracción de la muestra de tejido ocular se realiza utilizando un aparato que permita recoger muestras de tejido de la superficie anterior del ojo y de la conjuntiva ocular en un animal.

8. Método según la reivindicación 1, en el que la detección de los priones en la muestra de tejido ocular se realiza mediante un método analítico que comprende incubar las proteínas presentes en dicha muestra con un anticuerpo que reconoce la proteína PrP bajo condiciones que permiten la formación de un inmunocomplejo anticuerpo-PrP y revelar la formación de dicho inmunocomplejo.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 185 476
⑫ N.º solicitud: 200100315
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 13.02.2001
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: G01N 33/53

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	OESCH, B. et al.: "Application of prionics western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs", Arc. Virol., (2000), [Suppl.] Vol. 16, páginas 189-195.	
A	SCHALLER, O. et al.: "Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE)", Acta Neuropathol., (1999), Vol. 98, páginas 437-443.	
A	FOSTER, J. et al.: "Immunolocalization of the prion protein in scrapie affected rodent retinas", Neurosciences Letters, (1999), Vol. 260 (1), páginas 1-4, ISSN:0304-3940.	
A	MASANORI, K. et al.: "Distribution of prion protein in scrapie-infected mice by detection using inoculation and immunohistochemistry", Bulletin of the National Institute of Animal Health, (1995), n° 101, páginas 25-29, ISSN:0388-2403, resumen.	

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°:

Fecha de realización del informe 20.03.2003	Examinador A. Maquedano Herrero	Página 1/1
--	------------------------------------	---------------