

Najnowsze informacje nt. laboratoryjnej diagnostyki gąbczastych encefalopatii (transmissible spongiform encephalopathies – TSE)

MIROSLAW P. POLAK, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

Zakład Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Polak M. P., Żmudziński J. F.

The latest information concerning laboratory diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies – TSEs

Summary

The review describes the European Commission's report concerning the evaluation of tests used for diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. Four kits already available on the market or in the final stage of being released onto market were tested. The following parameters were examined: specificity, sensitivity and the ability to detect small quantities of PrP as well as reproducibility of the results. Three kits were 100% sensitive and specific, while only one of them detected the smallest quantity of PrP. All the tests are for post-mortem diagnosis of BSE.

Keywords: BSE, TSEs, laboratory diagnosis.

W dniu 8 lipca 1999 r. Komisja Europejska – XXIV Dyrektoriat Generalny (DG XXIV), Wydział Polityki Wobec Konsumenta i Ochrony Zdrowia Konsumenta – udostępniła w sieci Internet raport pt. „Ocena testów diagnostycznych do rozpoznawania gąbczastej encefalopatii u bydła” (1, 2). Autorami raportu są Jim Moynagh z DG XXIV oraz Heinz Schimmel i G. Kramer z Instytutu Materiałów Referencyjnych i Miar (IRMM) w Geel w Belgii. IRMM jest instytutem Centrum Połączonych Badań Naukowych Komisji Europejskiej.

Parlament Europejski uznał, że dostępność dobrego testu diagnostycznego stanowi zasadniczy krok naprzód w dziedzinie zwalczania gąbczastej encefalopatii bydła (z ang. bovine spongiform encephalopathy – BSE) i gąbczastych encefalopatii w ogóle (TSEs).

Celem badań była ocena wartości diagnostycznej testów do wykrywania TSE u bydła już dostępnych oraz będących w końcowej fazie przygotowania do wprowadzenia na rynek. Badania zostały zaprojektowane i były kierowane przez DG XXIV Komisji Europejskiej – Wydział Polityki Wobec Konsumenta i Ochrony Zdrowia Konsumenta we współpracy z grupą ekspertów oraz Instytutem Materiałów Referencyjnych i Miar (IRMM), gdzie przygotowywano i kodowano próbki do badania.

Określano następujące parametry testów diagnostycznych:

1. specyficzność – jest to odsetek wyników negatywnych danego testu w grupie zwierząt niezakażonych co określa zdolność prawidłowej identyfikacji zwierząt niezakażonych; badano 1064 próbki pochodzące od 1000 zwierząt;

2. czułość – jest to odsetek wyników dodatnich danego testu w grupie zwierząt chorych na BSE co określa zdolność prawidłowej identyfikacji zwierząt zakażonych wykazujących objawy kliniczne choroby; badano 336 próbek pochodzących od 300 zwierząt;

3. zdolność wykrywania małych ilości białka PrP tj. białka uznawanego za czynnik etiologiczny TSE. Celem tego badania było określenie granicznych wartości wykrywalności co dałoby pewne wskazania odnośnie zdolności danego testu do wykrywania przedklinicznych przypadków BSE (faza bezobjawowa choroby). Badano homogenat mózgowia zwierzęcia chorego na BSE (diagnoza potwierdzona histopatologicznie) w rozcieńczeniach o postępie 0,5 log w zakresie 1 do 5. Miano czynnika BSE w homogenacie tkanki nerwowej przedstawionej do badania, określone na myszkach, wynosiło 3,1 log i.c./i.p. LD50/g tkanki. Badano po 20 prób z każdego rozcieńczenia;

4. powtarzalność wyników – badano podwójne próbki pobrane od tego samego zwierzęcia; badano 36 próbek dodatnich oraz 64 ujemne.

Jest rzeczą normalną w badaniach biologicznych, że żaden test diagnostyczny nie wykazuje 100% dokładności przy różnicowaniu zwierząt zakażonych i niezakażonych. Określenie powyższych parametrów ma szczególne znaczenie gdy na podstawie wyniku testu podejmowana jest decyzja administracyjna mająca wpływ na zdrowie publiczne. Wszystkie testy diagnostyczne cechuje pewien określony poziom wykrywalności przy czym mogą występować wyniki fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne. Najlepsze testy są tak opracowane, aby zakres wyników fałszywie dodatnich jak i fałszywie ujemnych był jak najmniejszy. Jest to szczególnie istotne w przypadku chorób o niezbyt dużym natężeniu występowania w populacji, ale o dużym oddziaływaniu na zdrowie publiczne. Chorobą taką jest BSE. Ponieważ nasilenie przypadków klinicznych BSE w populacji bydła nie jest duże, zatem nawet niski odsetek wyników fałszywie dodatnich może przewyższać wskaźnik zwierząt rzeczywiście dodatnich (rzeczywiście zakażonych). Tak długo jak długo nie będzie dostępny test potwierdzający, sytu-

acja taka może powodować zamieszanie i z ekonomicznego punktu widzenia test taki jest bezużyteczny. Z drugiej strony niska czułość, której skutkiem są wyniki fałszywie ujemne będzie powodować przedstawianie się do łańcucha żywieniowego człowieka zwierząt chorych ze wszystkimi negatywnymi następstwami dla zdrowia publicznego. Czułość i specyficzność testów może być regulowana przez różne ustawienie tzw. wartości odcięcia (określanych też jako wartości progowe), które ustalają czy wynik jest dodatni, czy ujemny. Trzeba jednak mieć świadomość, że podwyższanie czułości testu obniża jego specyficzność. Stąd dla testów przedstawionych do oceny przyjęto wartości odcięcia zaproponowane przez wytwórców tych testów.

Proces oceny testów obejmował następujące etapy:

1. ocena wstępna możliwości wykonania badań,
2. opracowanie protokołu badań,
3. rozstrzygnięcie, czy istnieje potrzeba wybrania najbardziej zaawansowanego technologicznie i szybkiego testu diagnostycznego,
4. wyselekcjonowanie testów najbardziej technologicznie zaawansowanych,
5. wyselekcjonowanie źródła dużych ilości tkanki nerwowej od zwierząt zakażonych i niezakażonych,
6. przygotowanie próbek tkanek od zwierząt zakażonych i niezakażonych w laboratorium P3 IRMM w Belgii i ich zakodowanie,
7. badanie kodowanych próbek przez uczestników – producentów testów,
8. analiza wyników.

Wybór zestawów diagnostycznych

19 maja 1998 r. opublikowano w Official Journal of the European Commission komunikat skierowany do firm pracujących nad zestawami diagnostycznymi do rozpoznawania gąbczastych encefalopatii. Trzydziestu potencjalnych uczestników poprosiło o szczegółowe informacje nt. warunków oceny. Chęć uczestnictwa w ocenie zgłosiło 9 firm, które przedstawiły do oceny 10 zestawów diagnostycznych. Selekcji otrzymanych zgłoszeń dokonał zespół ekspertów: prof. J. Almond i prof. G. Hunsmann oraz dr M. Groschup i dr E. Sprengers kierując się następującymi kryteriami: 1. podstawy naukowe testu, 2. dostępne wyniki dotychczasowych badań eksperymentalnych, 3. łatwość przygotowania materiału do badań i wykonania testu, 4. stopień zaawansowania prac nad komercjalizacją zestawu. Dla zabezpieczenia szerokiej dostępności testów po uzyskaniu pozytywnego wyniku oceny firmy zgłaszające się do oceny musiały podpisać stosowne zobowiązanie. Wybrano cztery zestawy diagnostyczne następujących firm: 1. E. G. & G. Wallac Ltd. z Wielkiej Brytanii, 2. Prionics A. G. ze Szwajcarii, 3. Enfer Technology Ltd. z Irlandii, 4. Commissariat a l'Energie Atomique (CEA) z Francji.

Materiał do badań

Próbki dodatnie stanowił materiał pochodzący z pnia mózgu oraz rdzenia kręgowego bydła wykazującego

objawy kliniczne BSE, u którego rozpoznanie kliniczne potwierdzono badaniem histopatologicznym. Próbki pochodziły z Central Veterinary Laboratory (obecnie Veterinary Laboratories Agency – VLA), Weybridge, Wielka Brytania.

Próbki ujemne pochodziły od bydła w wieku przynajmniej 4 lat hodowanego w Nowej Zelandii. Kraj ten został wybrany jako źródło materiału negatywnego, ponieważ nigdy nie występowała tam BSE i jest to kraj uznawany za wolny od gąbczastych encefalopatii. Po uboju wyselekcjonowanych zwierząt otwierano czaszkę, wyjmowano mózgowie i rdzeń przedłużony. Pobierano tkankę mózgową z okolicy tzw. zasuwki (*obex*), sporządzano preparaty histopatologiczne i badano je w mikroskopie. Nie było przypadków eliminacji mózgow z powodu dodatniego badania histopatologicznego.

Próbki materiału dodatniego i negatywnego przetransportowano do IRMM w Geel w Belgii. Tutaj pobrano fragmenty o wielkości 0,7-3 cm z pnia mózgu tj. najwyżej 2 do 2,5 cm od okolicy zasuwki. Następnie próbki homogenizowano, z części przygotowywano rozcieńczenia w zakresie 1-5 log, zamrażano, kodowano i wysyłano na suchym lodzie do firm uczestniczących w ocenie swoich testów. Badania były wykonywane pod nadzorem urzędników Komisji Europejskiej, a firmy wykonujące je zobowiązane były do codziennego udostępniania wyników. Wartości odcięcia (progowe) przy określaniu czułości i specyficzności poszczególnych testów przyjęto na podstawie wcześniejszych wstępnych badań przeprowadzonych przez poszczególnych producentów.

Charakterystyka poszczególnych zestawów diagnostycznych

Test A: E. G. & G. Wallac Ltd. Test ten wykorzystuje dwa przeciwciała monoklonalne (MoAb), a wykrycie PrP odbywa się metodą DELFIA (fluorescencja pod wpływem lantanowców). Badanie trwa niecałe 24 godziny ale może być skrócone przez wprowadzenie automatyzacji.

Test B: Prionics A. G. Do wykrywania fragmentu białka PrP opornego na proteinazę, określanego też jako PrP 27-30, wykorzystywane jest MoAb 6H4, a detekcja odbywa się metodą chemiluminescencji. Badanie trwa 7-8 godzin. Proces rejestracji próbek wykorzystuje kod paskowy, co pozwala na wprowadzanie danych do bazy danych. Umożliwia to łatwe śledzenie poszczególnych zwierząt. System ten określany jako Prionics Check używany jest w Szwajcarii do rutynowego badania bydła ubijanego w rzeźniach jak również do badania zwierząt padłych.

Test C: Enfer Technology Ltd. Zestaw ten wykorzystuje test ELISA z użyciem chemiluminescencji. Czas badania wynosi do 4 godzin. Zastosowano przeciwciała poliklonalne dla PrP oraz unikalną procedurę szybkiej ekstrakcji próbki połączoną z techniką ELISA. Jako pierwsze stosowane są przeciwciała poliklonalne dla PrP, następnie koniugat znakowany perok-

sydazą chrzanową oraz odczynnik chemiluminescencyjny wzmacniający sygnał reakcji.

Test D: Commissariat a l'Energie Atomique (CEA). Jest to test immunoenzymatyczny typu „sandwich” wykorzystujący dwa MoAb. Wykonanie testu trwa mniej niż 24 godziny i także może zostać skrócone w wyniku automatyzacji.

Wyniki

Zbiórcze wyniki badań poszczególnych testów dla poszczególnych parametrów przedstawia tabela 1. Analiza powtarzalności wyników wskazuje, że testy B, C i D poprawnie identyfikowały próbki zduplikowane. Wysoka czułość tych testów wskazuje na ich przydatność do pośmiertnych badań przesiewowych w rzeźniach. Testy A i B są testami jakościowymi dającymi wynik albo dodatni albo ujemny. Wyniki oceny testów C i D wskazują, że wartości odcięcia (progowe) ustalone przez obie firmy zbliżone są do wartości optymalnych. Jednakże w przypadku tych testów kilka próbek wypadło wątpliwie, gdyż odczyt wyniku układał się w pobliżu wartości odcięcia. Testy C i D badają tę samą próbkę dwukrotnie (w powtórzeniu), natomiast test A trzykrotnie. Test A (E. G. & G. Wallac) wykorzystywał próbkę o masie 100 mg, co, jak skomentował sam producent, było raczej ilością niewystarczającą. Efektem było obniżenie czułości testu i uzyskiwanie wyników fałszywie ujemnych. Firma zaproponowała 5-krotny wzrost masy próbki. Test B (Prionics A. G.) – ponieważ informacje wpisywane są do bazy danych, łatwo jest śledzić wyniki testu w stosunku do miejsca pochodzenia zwierząt. Prionics wykonuje około 200 testów dziennie w ramach regularnego monitorowania BSE dla służby weterynaryjnej Szwajcarii. Wszystkie nierozcieńczone próbki badanych homogenatów zostały zidentyfikowane prawidłowo, ale natężenie sygnału reakcji dodatniej było różne dla różnych próbek. Mogło to być wynikiem niezbyt dokładnej homogenizacji próbki. Ustalono eksperymentalnie, że próbka dająca silny sygnał dodatni może

być rozcieńczona 100-krotnie i interpretacja wyniku dodatniego nie następuje trudności. Test C (Enfer Technology Ltd.) jest nowoczesną wysokowydajną ELISĄ chemiluminescencyjną, która dostarcza wynik w ciągu 4 godzin. To powoduje, że wynik badania jest używany przed wprowadzeniem tuszy do łańcucha żywieniowego człowieka. Test ten opracowywany był przez cztery lata i wprowadzony do handlu w 1997 r. Jego zaletą jest to, że:

- wykorzystuje odczynniki rutynowo dostępne w laboratoriach diagnostycznych,
- odczynniki są stabilne,
- procedura wykonania testu nie wymaga specjalistycznego sprzętu, wystarczy standardowe wyposażenie laboratorium,
- system badania może być całkowicie zautomatyzowany eliminując czynnik ludzki jako źródło błędów,
- jest w pełni przystosowany do produkcji w postaci zestawu diagnostycznego,
- przeszedł intensywne badania terenowe (3000 próbek zbadano w 1997 r. i 15 000 w 1998 r.),
- uzyskano pozytywne wyniki w przypadku bydła nie wykazującego objawów klinicznych, u którego później potwierdzono BSE badaniem histopatologicznym,
- wykrywa również scrapie owiec,
- system badania zgodny jest z normą ISO 9002,
- czułość i specyficzność wynosi 100%.

Test D (Commissariat a l'Energie Atomique – CEA) wykorzystuje dwie techniki dla zapewnienia optymalnej czułości i specyficzności, a mianowicie specjalne przygotowanie próbki oraz dwustronny immunometryczny pomiar rozpuszczalnego i opornego na trawienie proteazami białka PrP. Podpisana została umowa z firmą Sanofi Pasteur na adaptację tego testu do produkcji handlowej. Celem tych działań jest także automatyzacja procesu przygotowywania próbek do badania i redukcja czasu immunometrycznego pomiaru wyniku tak, aby czas wykonania testu zamknął się w 6 godzinach.

W podsumowaniu należy podkreślić, że chociaż oceniano cztery testy to tylko dwa (Prionics A. G. oraz Enfer Technology Ltd.) dostępne są w handlu. Pozostałe testy wymagają jeszcze szeregu adaptacji przed ich ostateczną komercjalizacją. Należy również podkreślić, że testy te, chociaż wysoce czułe i specyficzne, są testami pośmiertnymi. Brak informacji o korelacji pomiędzy progresją objawów klinicznych a koncentracją białka PrP opornego na trawienie proteazami w okresie inkubacji choroby nie pozwala na wysuwanie jakichkolwiek wiążących wniosków odnośnie możliwości przyżyciowego laboratoryjnego diganozowania gąbczastych encefalopatii.

Piśmiennictwo

1. Raport Wstępny Komisji Europejskiej, 8 lipca 1999 r.; adres internetowy: http://europa.eu.int/comm/dg24/health/bsc/bse12_en.html.
2. Moynagh J., Schimmel H.: Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy (letter), Nature 1999, 400, 105.

Adres autora: dr Mirosław Polak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: ppolak@piwet.pulawy.pl

Tab. 1. Wyniki zbiórcze analizy czterech zestawów diagnostycznych

| Parametr | Test A: E. G. & G. Wallac Ltd. | Test B: Prionics AG | Test C: Enfer Ltd. | Test D: CEA |
|--------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------|
| Czułość | 69,8% | 100% | 100% | 100% |
| Specyficzność | 89,8% | 100% | 100% | 100% |
| Zawiesina mózgu | nierozcień. | 6/6 | 6/6 | 6/6 |
| | 10 ⁻¹ | 0/20 | 15/20 (+2*) | 20/20 |
| | 10 ^{-1.5} | | 0/20 | 20/20 |
| | 10 ² | | 0/20 | 20/20 |
| | 10 ^{2.5} | | | 18/20 |
| | 10 ⁻³ | | | 1/20 |
| | | | | 0/20 |

Objaśnienie: * wynik wątpliwy