

# Rola krwi w transmisji chorób prionowych

MAGDALENA LARSKA, MIROSLAW P. POLAK

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

Larska M., Polak M. P.

## Role of blood in the transmission of prion diseases

### Summary

Transmissible spongiform encephalopathies are a group of rare, neurodegenerative diseases occurring in both humans and animals. Prions play a leading role in their development and pathogenesis. PrP<sup>Sc</sup> can be found in lymphatic tissue and, according to the latest reports, in skeletal muscles as well as urine. Therefore it is suspected that blood can theoretically be infectious. Research is being carried out to discover the markers of prion diseases in blood which could lead to devising diagnostic tests in-vivo. New technologies and methodologies in blood transfusion have been introduced to minimise the theoretical risk of transmission of prion diseases by blood and blood products. In the face of the uncertainty surrounding the risk of haematogenic transmission of prions, blood transfusion services in many countries have implemented new precautionary measures and modified their regulations regarding blood transfusion.

**Keywords:** prion diseases, blood transmission, transfusion, leucodepletion

Pasażowalne gąbczaste encefalopatie (z ang. TSEs) stanowią grupę rzadkich neurodegeneracyjnych chorób wywołanych według obecnego stanu wiedzy przez zmodyfikowane białko prionowe. Choroby te występują zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Niektóre z nich (śmiertelna rodzinna bezsenność, choroba Gerstmana-Strausslera-Scheinkera) mają podłoże genetyczne (dziedziczne). Inne, jak kuru, prawdopodobnie wariant choroby Creutzfeldta-Jakoba (vCJD), czy gąbczasta encefalopatia bydła (BSE) przenoszone są drogą alimentarną. Brak testu przyżyciowego uniemożliwia wczesną diagnostykę, a niemożność wykluczenia krwi, jako drogi zakażenia zmusiła wiele krajów do zaostreżenia przepisów dotyczących transfuzji.

Potwierdzenie jatrogennego zakażenia czynnikiem pasażowalnych gąbczastych encefalopatii przez transplantację opony twardej (12) i rogówki (21), używanie zakażonych instrumentów chirurgicznych (elektrody do badania EEG), czy też stosowanie hormonu wzrostu i gonadotropin (13) pozyskiwanych od chorych na chorobę Creutzfeldta-Jakoba (CJD), spowodowało wzrost podejrzeń, że krew oraz jej produkty mogą być potencjalnym źródłem tych chorób. Ponieważ białko prionowe, oprócz tkanki nerwowej, można także wykryć w tkance limfatycznej (9), podejrzewa się, iż krew może być zakaźna. Badania zespołu naukowców pod kierownictwem Prusiner opublikowane w marcu 2002 r. wykazały, iż także niektóre partie mięśni szkieletowych myszy mogą gromadzić znaczną ilość zmodyfikowanego białka prionowego (7). Gabizon i współpracownicy (35) wykazali, że białko PrP<sup>Sc</sup> (UPrP<sup>Sc</sup>) jest obecne w moczu chomików, bydła i ludzi chorych na pasażowalne encefalopatie gąbczaste. Autorzy badań sugerowali, że niezwiązane PrP<sup>Sc</sup> o masie 33-35 kDa, uwalniane z tkanki mózgowej lub innych narządów podczas inkubacji choroby, drogą krwi trafia do nerek, gdzie

podlega procesowi filtracji (naczynia w kłębuszkach nerkowych mogą przepuszczać cząsteczki o masie do około 40 kDa). Koncentracja cząsteczek PrP<sup>Sc</sup> w przesączu może być 120 razy większa niż we krwi, co w przyszłości może zaowocować opracowaniem metod badania przyżyciowego chorób prionowych.

Trwają prace nad opracowaniem testu przyżyciowego do diagnostyki chorób prionowych opartego na badaniu krwi. Pod koniec 2000 r. zespół Aguzziego opisał możliwość wiązania białka prionowego PrP<sup>Sc</sup> przez plazminogen otrzymany w procesie frakcjonowania ludzkiej krwi (11). Inna grupa naukowców z instytutu w Genewie opracowała metodę mogącą służyć do diagnostyki, a polegającą na tzw. cyklicznej amplifikacji białka PrP<sup>Sc</sup> (z ang. protein misfolding cyclic amplification – PMCA), w trakcie której następuje szybka konwersja PrP<sup>C</sup> do formy patologicznej w obecności niewielkiej ilości chorobotwórczego białka PrP<sup>Sc</sup> jako matrycy (34). Ta metoda pozwoliłaby na zwiększenie ilości zakaźnego białka, które może występować w materiale badanym (krew, mocz) w ilościach nie pozwalających na jego wykrycie w rutynowym badaniu (zwłaszcza zwierząt klinicznie zdrowych). Kolejnego ciekawego odkrycia dokonał zespół Clintona z Roslin Institute w Midlothian w Szkocji i jego współpracowników (30). Wykryli oni zależność między ekspresją czynnika związanego z różnicowaniem komórek erytroidalnych (z ang. erytroid differentiation related factor – EDRF) a wystąpieniem trzęsawki (scrapie) u owiec, czy gąbczastej encefalopatii bydła u krów.

Badania nad infekcyjnością krwi można podzielić na dwie grupy. Jedna opiera się na ukierunkowanych testach biologicznych polegających na zakażeniu zwierząt krwią lub jej produktami pochodzącymi od osobników tego samego lub innego gatunku. Drugą grupę stanowią analizy laboratoryjne krwi na obecność biał-

ka prionowego jako markera zakażenia. Obecność białka prionowego PrP<sup>C</sup> we krwi została udokumentowana przez szereg naukowców, choć jego zawartość w poszczególnych frakcjach podlega ciągłej dyskusji. Rozkład PrP<sup>C</sup> w elementach morfotycznych krwi jest zróżnicowany i zależy nie tylko od ich typu, ale także od gatunku zwierzęcia (4). Największą ekspresję normalnego białka prionowego związanego z komórkami wykazują leukocyty (10). Odnaczają się one także najwyższą infekcyjnością (wysoka zawartość zmodyfikowanego białka prionowego) w porównaniu z innymi frakcjami krwi (20). Analiza za pomocą cytometrii przepływowej i badania typu immunoblot wykazały, że leukocyty jednojądrzaste (22) i płytki krwi obwodowej posiadają na swojej powierzchni białko prionowe, natomiast leukocyty polimorfonuklearne (wielojądrzaste) i erytrocyty albo go nie posiadają, albo ekspresja ta jest niewielka (3). MacGregor i wsp. na podstawie testu fluoroimmunologicznego typu DELFIA (z ang. dissociation-enhanced fluoro-immunoassay) zbadali poszczególne frakcje krwi ludzkiej na obecność PrP<sup>C</sup> (25). Wykazali, że komórkowe białko prionowe związane jest także w dużej części z płytkami krwi (zawierają 26,5% PrP<sup>C</sup> znajdującego się we krwi) oraz surowicą (68,5%). Inna jeszcze analiza krwi przy użyciu cytometrii przepływowej i RT-PCR (z ang. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) przeprowadzona na owcach zdrowych i zakażonych czynnikiem trzęsawki, nie wykazała obecności mRNA odpowiedzialnego za syntezę białka prionowego w płytkach krwi, granulocytach i erytrocytach owiec (16). Natomiast jednojądrzaste komórki krwi obwodowej tych owiec były zdolne do produkcji i ekspresji na swojej powierzchni białka prionowego wrażliwego na trawienie proteinazą K, choć nie zawierały chorobotwórczego PrP<sup>Sc</sup>. Ostatnie doniesienie zespołu Rohwera i wsp. wyklucza rolę płytek krwi jako ewentualnego źródła zakażenia czynnikiem pasażowalnych encefalopatii gąbczastych u chomików, potwierdzając jednocześnie dużą infekcyjność jednojądrzastych komórek krwi (17).

W 1978 r. Manuelidis i wsp. wykazali, że istnieje możliwość przeniesienia choroby przez zakażenie zwierząt elementami komórkowymi krwi pobranej od świńek morskich zakażonych czynnikiem choroby Creutzfeldta-Jakoba (27). To sugerowało możliwość przeniesienia choroby drogą hematogenną, co miałoby ogromny wpływ na bezpieczeństwo transfuzji. W 1997 r. doświadczenie szwajcarskich naukowców wskazało na limfocyty B i komórki dendrytyczne grudek chłonnych (z ang. FDC – follicular dendritic cells) jako komórki mające największe znaczenie w patogenezie tej choroby i przenoszeniu chorobotwórczych prionów w organizmie (19). Eksperymentalne zakażenie owiec czynnikiem trzęsawki wykazało, że infekcyjne PrP<sup>Sc</sup> gromadzi się początkowo w tkance limfatycznej kępek Peyera i tkance limfatycznej związanej z przewodem pokarmowym, głównie jelit (z ang. gut associated lymphoid tissue – GALT), wcześniej niż jest wykrywane w centralnym układzie nerwowym (2,14). Komórki FDC myszy zakażonych zmodyfikowanym białkiem prionowym są jego źródłem i podane drogą dożylną mogą wywoływać chorobę (29). Obserwowano, że niektóre transgeniczne myszy pozbawione genów odpo-

wiedzialnych za produkcję czynnika martwicy nowotworu (TNF) oraz pewnych limfotoksyn (LT), które mają wpływ na funkcje FDC w pozanerwowej patogenezie chorób prionowych, mogą być częściowo niewrażliwe na zakażenie białkiem PrP<sup>Sc</sup> (32). Jednakże to samo doświadczenie pokazało, że mimo nieobecności komórek dendrytycznych u niektórych zwierząt, PrP<sup>Sc</sup> wykrywane było w węzłach chłonnych, a rolę tych komórek w patogenezie procesu chorobowego przejmowały subpopulacje makrofagów. Kluczowa rola dojrzałych komórek dendrytycznych w początkowych etapach patogenezy pasażowalnych encefalopatii gąbczastych sugeruje możliwość wykorzystania ich supresji jako potencjalnego celu w terapii (24). Inne doświadczenia sugerują także istotną funkcję dopełniacza w regulacji ekspresji białka prionowego na FDC w pierwszych dniach po zakażeniu. Niedobór komponentu C3 dopełniacza może powodować zahamowanie procesu neuroinwazji (23).

Ostatnio grupa innych naukowców przy użyciu techniki immunohistochemicznej nie potwierdziła obecności białka PrP<sup>Sc</sup> w leukocytach krwi obwodowej owiec chorych na trzęsawkę (15). W 1998 r. Brown i wsp. określili, że zakaźność ludzkiej krwi związana jest głównie z jej frakcją komórkową, natomiast w surowicy niewielką infekcyjnością odznacza się głównie krioprecypitat i czynniki krzepnięcia krwi I, II oraz III (8). Poziom endogennej zakaźności związanej z frakcją leukocytarną, osoczem, krioprecypitatem oraz czynnikami I, II i III we krwi myszy zakażonych ludzkim czynnikiem pasażowalnej encefalopatii gąbczastej był znacznie obniżony. Opisano także udaną próbę eksperymentalnego zakażenia domózgowego myszy krwią osobnika chorego na CJD, u których w następstwie rozwinęła się ta choroba (28). W lipcu 2002 r. grupa angielskich naukowców pod kierownictwem Nory Hunter (18) ogłosiła wyniki doświadczenia nad rolą transfuzji krwi w transmisji chorób prionowych. Z 21 owiec zakażonych czynnikiem trzęsawki, 4 zachorowały, co potwierdzono badaniem immunohistochemicznym i metodą western blot. Pozytywnym wynikiem zakończyła się także próba domózgowego zakażenia lemurków myszowatych (*Microcebus murinus*) tzw. „kożuszkami” leukocytów (z ang. buffy coat) pochodzącym z krwi makaków zakażonych czynnikiem BSE. W tym przypadku po raz pierwszy użyto zwierząt naczelnych bliżej spokrewnionych z człowiekiem (6).

Nowe dane nt. możliwości zarażenia się chorobami prionowymi drogą krwi lub produktów krwiopochodnych wymuszają wprowadzenie zmian do istniejących przepisów dotyczących transfuzji krwi. Wielka Brytania (www.doh.gov.uk), Francja, Irlandia, Portugalia (5) i Włochy (1) wprowadziły w 1998 r. programy usuwania leukocytów z krwi dawców (z ang. leucodepletion – leukodeplecja), jako jeden ze środków zapobiegających możliwości rozprzestrzenienia się wariantu choroby Creutzfeldta-Jakoba (vCJD) poprzez transfuzję krwi. Proces leukodeplecji polega na filtracji krwi, podczas której usuwane jest 95% leukocytów. Leukodeplecja pozwala na zmniejszenie ilości frakcji leukocytarnej krwi poniżej  $5 \times 10^6$  leukocytów na 300 ml. Istnieje kilka technik usuwania leukocytów, ale najpopularniejszą jest filtracja przy użyciu trzech generacji filtrów



antyleukocytarnych (31). W naszym kraju nie istnieją jednak przepisy prawne określające zasady ochrony krwi przed zakażeniem pasażowalnymi encefalopatiami gąbczastymi (33, 36). Oprócz leukodeplecji prowadzone są prace nad procesami usuwania czynnika pasażowalnych encefalopatii gąbczastych za pomocą nanofiltracji, precypitacji, technik chromatografii oraz frakcjonowania etanolem krwi i produktów krwiopochodnych ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scmp/out40\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scmp/out40_en.pdf)). W 1999 r. w Wielkiej Brytanii wszedł w życie zakaz używania surowicy pochodzącej od dawców z tego kraju do produkcji albumin, czynników krzepnięcia krwi i przeciwciał ([www.shot.demon.co.uk](http://www.shot.demon.co.uk)). Podobne przepisy obowiązują już w większości krajów Unii Europejskiej i Ameryki Północnej. Kraje członkowskie Unii Europejskiej, Stany Zjednoczone Ameryki ([www.fda.gov/ober/gdlns/cjdcjd.pdf](http://www.fda.gov/ober/gdlns/cjdcjd.pdf)), Kanada (26) i Nowa Zelandia wprowadziły również przepisy ścisłego monitorowania dawców krwi. Osoby, które przebywały w Wielkiej Brytanii lub w innym kraju o wysokim ryzyku geograficznego zagrożenia wariantem choroby Creutzfeldta-Jakoba przez okres sześciu miesięcy lub dłużej od 1980 r., czy też osoby wojskowe przebywające na terenie Europy w latach 1980-1996 oraz osoby, które otrzymały transfuzję krwi, lub którym podawano insulinę bydłą w tym okresie czasu, nie mogą być dawcami krwi. Władze Zjednoczonego Królestwa nakazują wykorzystywanie importowanych białek krwi do produkcji preparatów medycznych, stosowanych u chorych na hemofilię.

Do dziś brak bezpośredniego, epidemiologicznego dowodu na transmisję chorób prionowych poprzez transfuzję krwi. Jednakże udane doświadczalne przeniesienie prionów drogą hematogenną sugeruje taką możliwość. Należy pamiętać jednak, że większość badań wykluczyło możliwość jatrogennej transmisji przez krew lub jej produkty. Czy wyniki świadczące o niskiej prevalencji (częstości występowania) pasażowalnych encefalopatii gąbczastych w świecie związane są z niską infekcyjnością krwi, czy z rozcieńczeniem patogenu w puli krwi od wielu dawców, czy też z usuwaniem ewentualnego zagrożenia przez zabiegi tj. leukodeplecja, nie jest aktualnie możliwym do określenia. Istnieje duża potrzeba opracowania i wprowadzenia do użycia przyżyciowego testu diagnostycznego pozwalającego na monitorowanie dawców, co pozwoliłoby na znaczne ograniczenie teoretycznego ryzyka zachorowania na pasażowalne encefalopatie gąbczaste związanego z transfuzją krwi.

### Piśmiennictwo

- Accorsi P., Iacone A.: Selective or universal leukodepletion: the Italian experience. *Transfusion Sci.* 2000, 22, 65-67.
- Andreoletti O., Berthon P., Marc D., Sarrafin P., Groseloude J., van Keulen L., Schelcher P., Elsen J. M., Lantier F.: Early accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 2000, 81, 3115-3126.
- Barclay G. R., Hope J., Birkeitt C. R., Turner M. L.: Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry. *British J. Haematol.* 1999, 107, 804.
- Barclay G. R., Houson E. F., Halliday S. I., Farquhar Ch. F., Turner M. L.: Comparative analysis of normal prion protein expression on human, rodent and ruminant blood cells by using a panel of prion antibodies. *Transfusion* 2002, 42, 517.
- Birchard K.: Tree countries to start leucocyte depletion of donated blood. *Lancet* 1998, 351, 1112.
- Bons N., Lehmann S., Mestre-Frances N., Dormont D., Brown P.: Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*. *Transfusion* 2002, 42, 513.
- Bosque P. J., Ryou C., Telling G., Peretz D., Legname G., DeArmond S. J., Prusiner S. B.: Prions in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 3812-7.
- Brown P., Rohwer R. G., Dunstan B. C., MacAuley C., Gajdusek D. C., Drohan W. N.: The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 1998, 38, 810-6.
- Bruce M. E., McDonnell I., Will R. G., Ironside J. W.: Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet* 2001, 358, 208-209.
- Dodelet V. C., Cashman R.: Prion expression in human leucocyte differentiation. *Blood* 1998, 91, 1556-1561.
- Fischer M. B., Roeckl Ch., Parizek P., Schwarz P. H., Aguzzi A.: Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* 2000, 408, 479-483.
- Hannah E. L., Belay E. D., Gambetti P., Krause G., Parchi P., Capellari S., Hoffman R. E., Schonberger L. B.: Creutzfeldt-Jakob disease after receipt of a previously unimplicated brand of dura mater graft. *Neurology* 2001, 56, 1080-1083.
- Healy D. L., Evans J.: Creutzfeldt-Jakob disease after pituitary gonadotrophins. *Br. Med. J.* 1993, 307, 517-518.
- Heggeba R., Press C. M., Gunnes G., Lie K. J., Tranulis M. A., Ulyund M., Groschup M. H., Landsverk T.: Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to scrapie agent. *J. Gen. Virol.* 2000, 81, 2327-2337.
- Herrmann L. M., Baszler T. V., Knowles D. P., Cheevers W. P.: PrP<sup>Sc</sup> is not detected in peripheral blood leukocytes of scrapie-infected sheep: determining the limit of sensitivity by immunohistochemistry. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002, 9, 499-502.
- Herrmann L. M., Davis W. C., Knowles D. P., Wardrop K. J., Sy M. S., Gambetti P., O'Rourke K. I.: Cellular prion protein is expressed on peripheral mononuclear cells but not platelets of normal and scrapie-infected sheep. *Haematologica* 2001, 82, 146-153.
- Holada K., Vostal J. G., Theisen P. W., MacAuley C., Gregori L., Rohwer R. G.: Scrapie infectivity in hamster blood is not associated with platelets. *J. Virol.* 2002, 76, 4649-4650.
- Hunter N., Foster J., Chong A., McCutcheon S., Parnham D., Eaton S., MacKenzie C., Houston F.: Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.* 2002, 83, 2897-2905.
- Klein M. A., Frigg R., Fleischig E., Raeber A. J., Kalinke U., Bluethmann H., Bootz F., Suter M., Zinknagel R. M., Aguzzi A.: A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 1997, 390, 687-690.
- Kuroda Y., Gibbs C. J. Jr., Amyx H. L., Gajdusek D. C.: Creutzfeldt-Jakob disease in mice: persistent viremia and preferential replication of virus in low-density lymphocytes. *Infect. Immunol.* 1983, 41, 154-61.
- Liberski P. P., Yanagihara R., Gibbs C. J., Gajdusek D. C.: Spread of Creutzfeldt-Jakob disease virus along visual pathways after intra ocular inoculation. *Arch. Virol.* 1990, 111, 141-147.
- Li R., Liu D., Zanusso G., Liu T., Fayen J. D., Huang J. H., Petersen R. B., Gambetti P.: The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell. Immunol.* 2001, 207, 49-58.
- Mabbott N. A., Bruce M. E., Botto M., Walport M. J., Pepys M. B.: Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nature Med.* 2001, 7, 485-487.
- MacGregor I. R., Drummond O.: Species differences in the blood content of the normal cellular isoform of prion protein, PrP<sup>C</sup>, measured by time-resolved fluoroimmunoassay. *Vox Sanguinis* 2001, 81, 236-240.
- MacGregor I., Hope J., Barnard G., Kirby L., Drummond O., Pepper D., Hornsey V., Barclay R., Bessou H., Turner M., Prowse C.: Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components. *Vox Sanguinis* 1999, 77, 88-96.
- MacKenzie D.: Blood feud. *New Scientist* 1999, 162, 20.
- Manuelidis E. E., Gorgacz E. J., Manuelidis L.: Viremia in experimental Creutzfeldt-Jakob disease. *Science* 1978, 200, 1069-1071.
- Manuelidis E. E., Kim J. H., Mericangas J. R., Manuelidis L.: Transmission to animals of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood. *Lancet* 1985, 325, 896-897.
- McBride P., Eikelenboom P., Kraal G., Fraser H., Bruce M. E.: PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J. Pathol.* 1992, 168, 413-418.
- Miele G., Manson J. C., Clinton J. A.: A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nature Med.* 2001, 7, 361-364.
- Pietersz R. N. L., van der Meer P. F., Seghatchian M. J.: Update on leucocyte depletion of blood components by filtration. *Transfusion Sci.* 1998, 19, 321-328.
- Prinz M., Montrasio F., Klein M. A., Schwarz P., Priller J., Odermatt B., Pfeiffer K., Aguzzi A.: Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 919-924.
- Sablinski J., Lętowska M.: Krwiodawstwo i Krwiolecznictwo, Ministerstwo Zdrowia, Krajowe Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, Instytut Hematologii, Warszawa 2000.
- Saborio G. P., Permanne B., Soto C.: Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 2001, 411, 810-813.
- Shaked G. M., Shaked Y., Kariv-Inbal Z., Halimi M., Avraham I., Gabizon R.: A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 31479-82.
- Ustawa o prawie farmaceutycznym z dnia 6.09.2001 r., Dz. U. Nr 126, poz. 1381.