

Zakaźna gąbczasta encefalopatia małp człekokształtnych (ZPSE)

ZDZISŁAW GLIŃSKI, DOROTA LUFT-DEPTUŁA, KRZYSZTOF KOSTRO

Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Gliński Z., Luft-Deptuła D., Kostro K.

Zoo Primate Spongiform Encephalopathy (ZPSE)

Summary

The expansion of fatal transmissible neurodegenerative diseases, mostly bovine spongiform encephalopathy (BSE) and a new variant of Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD), is leading to an increase in our knowledge of the zoo primate spongiform encephalopathy (ZPSE). These diseases require the combined presence of the normal prion protein (PrP) and abnormal prion protein (PrP^{Sc}). In 1996 spongiform encephalopathy was described in macaque rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) and lemurs (*Eulemur fulvus mayottensis*) living in the zoological park of Montpellier and later ZPSE was diagnosed in primates living in other French zoos. Persistent behavioral changes and neurological signs occurred in the naturally and experimentally infected animals. Spongiform changes and gliosis were discovered in the gray matter, particularly in the cerebral cortex. Immunohistochemical examination revealed a strong accumulation of PrP^{Sc} in the tonsils, brain, gastrointestinal tract, the gut associated lymphoid tissue (GALT) and the spleen in primates suffering from SPSE. The exact mechanism of transmission of PrP^{Sc} from the lymphoreticular system to the central nervous system has not been precisely defined. All sick animals showed a progressive neurological disorder with behavioral abnormalities, physical deterioration and death. The data confirmed the ability of the BSE agent to cross the species barrier and its infectivity regarding the primates after oral or intracerebral exposure.

Keywords: zoo primate, spongiform encephalopathy

Odkrycie zakaźnych gąbczastych encefalopatii u zwierząt nie udowodnionych oraz możliwość transmisji BSE z bydła na człowieka zainicjowało badania nad epidemiologią, patogenezą, charakterem i lokalizacją zmian histopatologicznych oraz objawami klinicznymi występującymi w encefalopatii gąbczastej małp człekokształtnych (8, 9, 11). Ogromną większość badań przeprowadzono na małpach trzymanyh w niewoli, ponieważ u nich po raz pierwszy zdiagnozowano chorobę, określaną następnie jako encefalopatia gąbczasta małp człekokształtnych utrzymywanych w ogrodach zoologicznych (ZPSE, Zoo Primate Spongiform Encephalopathy) lub zakaźna gąbczasta encefalopatia małp człekokształtnych (2). Małpy człekokształtne są wykorzystywane w programach testowania skuteczności i bezpieczeństwa szczepionek, badaniu charakteru wpływu czynników ryzyka odgrywających istotną rolę w zagrożeniu zdrowia człowieka, ostatnio nad mechanizmami transmisji prionów w organizmie w wariantach choroby Creutzfeldta-Jakoba (vCJD). Nie można też wykluczyć możliwości transmisji ZPSE z małp na człowieka, zwłaszcza za pośrednictwem ksenoprzeszczepów i szczepionek przeciwwirusowych otrzymywanych na hodowlach komórek małp. Sekwencja aminokwasów w PrP małp i innych ssaków sugeruje przy tym, że kodony pomiędzy 90 i 130 resztami wywierają istotny

wpływ na transmisję prionów pomiędzy gatunkami (18). Charakterystyczne zmiany do występujących u pacjentów chorych na CJD występowały w mózgu małp zakażonych domózgowo homogenatem mózgu osób zmarłych na tę chorobę. Zmiany te polegały na wakuolizacji neuronów i obecności w neuropilu kory mózgowej złogów reagujących w teście immunohistochemicznym służącym do wykrywania patologicznego białka prionowego (19). Zmiany typowe dla gąbczastej encefalopatii występowały też u małp zakażonych BSE (4).

Rys historyczny

Gąbczasta encefalopatia małp człekokształtnych (ZPSE) została opisana najpóźniej ze znanych encefalopatii gąbczastych zwierząt, bo dopiero w 1996 r. (2). Wcześniej, bo w 1990 r., opisano encefalopatie kotów domowych, w dwa lata później encefalopatie dużych kotów trzymanyh w niewoli (12, 17). Jednak u małp człekokształtnych trzymanyh w ogrodach zoologicznych opisywano już wcześniej objawy neurologiczne oraz zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym nasuwające podejrzenie gąbczastej encefalopatii. Dopiero w oparciu o badania Bansa i wsp. (2) ustanowiono nową jednostkę chorobową ZPSE i potwierdzono istnienie podobieństw pomiędzy ZPSE i BSE. U trzech rebusów (*Macaca mulatta*) w ogrodzie zoologicznym

w Montpellier, żywionych karmą z dodatkiem białka zwierzęcego, występowały postępujące zaburzenia nerwowe i zmiana zachowania oraz fizyczne wyniszczenie. Zwierzęta padły w wieku 10 lat. Badanie histopatologiczne jednej z padłych małp wykazało obecność w mózgu zmian typowych dla encefalopatii gąbczastej. Obecność patologicznej izomorfy PrP^{Sc} stwierdzono badaniem immunocytochemicznym w mózgu, przewodzie pokarmowym i narządach limfatycznych. Identyczne zmiany występowały u małp zakażonych doświadczalnie CJD (3, 5). Małpa urodzona w 1982 r. w ogrodzie zoologicznym w Ravensden (Wielka Brytania), zasiedliła zoo w Montpellier w 1986 r. a latem 1991 r., gdy miała 9 lat, wystąpiły u niej objawy neurologiczne. W 1997 r. opisano i w pełni udokumentowano dwa przypadki gąbczastej encefalopatii w ogrodzie zoologicznym u lemurów (*Eulemur fulvus mayottensis*) karmionych mięsem bydła (3).

Padnięcia 26 małp człokształtnych w zoo w Montpellier (2) w latach 1989-1998 z czego u 12 z 14 zwierząt wystąpiły przed śmiercią objawy neurologiczne, oraz padnięcia 3 małp w ogrodzie zoologicznym w Lille wśród podobnych objawów neurologicznych, a następnie w Strasburgu i Besançon zainicjowały badania nad zakażeniem naturalnym i eksperymentalnym BSE i charakterem zmian histopatologicznych, lokalizacją patologicznego PrP w mózgu, rdzeniu kręgowym, migdałkach, różnych strukturach przewody pokarmowego, jelitowych węzłach chłonnych, śledzionie, rolę komórek M i limfocytów w procesie zakażenia. Wykazano też możliwość zakażenia lemurów (*Microcebus murinus*) *per os* materiałem zawierającym PrP^{BSE} (5).

Patogeneza i zmiany immunohistochemiczne

Transmisja ZPSE, podobnie jak innych zakaźnych encefalopatii człowieka i zwierząt, odbywa się za pośrednictwem pokarmu zanieczyszczonego zakaźnymi prionami. Istnieje też możliwość doświadczalnego zakażenia bezpośrednio, podając materiał zakaźny do mózgu zwierzęcia. Efektem zakażenia jest jawna postać choroby kończąca się śmiercią. Znane są też przypadki subklinicznej postaci choroby, w których gromadzą się priony zakaźne w strukturach układu nerwowego przy braku wpływu infekcji na długość życia zwierzęcia (14).

Istotną rolę w patogenezie choroby odgrywa konwersja normalnego (fizjologicznego) prionu PrP wchodzącego w skład komórki nerwowej w białko prionowe scrapie (PrP^{Sc}). Konwersja ma charakter postranslacyjny i polega raczej na zmianie konformacji cząsteczki aniżeli na jej kowalentnej modyfikacji (13). PrP i PrP^{Sc} różnią się jedynie strukturą przestrzenną cząsteczki, ponieważ PrP^{Sc} jest izoformą normalnego prionu, większość cząsteczek ma formę β -karkki i w dużym stopniu jest niepodatny na trawienie proteazą. Patogeny prion (PrP^{Sc}) wykazuje zdolność do samoreplikacji poprzez kontakt z normalnymi prionami (PrP), indukując w efekcie ich przemianę na patogenne priony PrP^{Sc}. Hipoteza prionowa zakłada, że prion jest jedyną zakaźną przyczyną zakaźnych gąbczastych encefalopatii (1, 6, 7).

Istnieją przypuszczenia, że za efekty neurotoksyczne obserwowane w gąbczastych encefalopatiach na poziomie molekularnym odpowiada nie PrP^{Sc}, ale forma pośrednia PrP^L (L-lethal conformer of PrP), która pojawia się w procesie konwersji PrP w PrP^{Sc}. Komórka toleruje niskie stężenie PrP^L. Akumulacji dużej ilości PrP^L zapobiega częściowa jego degradacja oraz usuwanie poza komórkę (10). Tak więc wg tej hipotezy PrP^{Sc} jest tylko nieaktywnym produktem końcowym. Szybki rozwój zwyrodnienia komórek nerwowych zależy od szybkiej degradacji PrP^L przez sąsiednie komórki. Zapoczątkowane zmiany pod wpływem PrP^L w komórkach nerwowych hamują ten proces.

Drogę transmisji zakaźnego prionu w organizmie w ZPSE wyjaśniają częściowo badania przeprowadzone na lemurach. U lemurów (*Eulemur fulvus mayottensis*) zakażonych na drodze naturalnej występowała wakuolizacja neuronów z nagromadzeniem PrP^{Sc} w komórkach nabłonka gardzieli, żołądka i jelit, migdałkach i ścianie naczyń krwionośnych i limfatycznych znajdujących się pod nabłonkiem jelitowym (3). Te obserwacje znajdują potwierdzenie w badaniach eksperymentalnych na lemurach (*Microcebus murinus*) zakażonych *per os* lub domózgowo homogenatem mózgu krów chorych na BSE oraz na makakach zakażonych prionami BSE zaadaptowanymi do tego gatunku zwierząt (MBSE – macaque-adapted BSE) (5). W okresie inkubacji choroby, trwającym 3 miesiące, nagromadzenie dużych ilości PrP^{Sc} występuje w ścianie jelit w limfocytach, komórkach Panetha, kępkach Peyera, komórkach zwoju nerwowego jelitowego, kręzkowych węzłach chłonnych i w komórkach śledziony. Zmiany gąbczaste i złogi PrP^{Sc} występowały w nerwie trójdzielnym, szlaku pojedynczym pnia mózgu, wzgórzu, przegrodzie i przedkomorowej substancji szarej. Duże nagromadzenie agregatów białka Tau występowało w neuronach kory piramidowej i w pniu mózgu, a u części zwierząt też w innych obszarach mózgu. Złogi β -amyloidu stwierdzono w ścianie naczyń krwionośnych, korze mózgowej, wzgórzu, mózdzku. U zwierząt, u których występują kliniczne objawy choroby PrP^{Sc} gromadzi się w mózgu. U zwierząt zakażonych MBSE zwyrodnienie neuronów cechowało się też złogami dużych agregatów białka Tau, płytek amyloidu B42 i astrogliazą. Patologiczne priony występowały też w komórkach zwojowych siatkówki (5) w zwojach grzbietowych i brzusznych korzeni, skąd za pośrednictwem szlaków nerwowych rdzenia kręgowego przedostają się do kory mózgowej.

Ważne znaczenie mają obserwacje, że u lemurów zakażonych *per os* karmą skażoną BSE i zakażonych na drodze naturalnej patologiczne priony występowały też w grudkach chłonnych migdałków, limfocytach tkanki łącznej blaszki podstawowej oraz infiltrujących śluzówkę i podśluzówkę jelit, komórkach siateczkowo-śródbłonkowych lamina propria jelit cienkich, komórkach M, grudkach Peyera i węzłach chłonnych jelit, komórkach czerwonej miazgi śledziony. W ośrodkowym układzie nerwowym patologiczne priony zidentyfikowano

w grzbietowych i brzusznych korzeniach rdzenia kręgowego odcinka szyjnego, warstwie IV kory mózgowej. Zmiany zwyrodnieniowe zarówno u zwierząt zakażonych na drodze naturalnej, jak i doświadczalnie dotyczyły nagromadzenia agregatów białka Tau w neuronach, wakuolizacji i gliozy astrocytów. Złogi białka Tau występowały głównie w neuronach kory mózgowej, pniu mózgu i wzgórzu. U lemurów w wieku 9-13 lat zakażonych BSE ilość białka Tau była 300-krotnie wyższa aniżeli u zdrowych zwierząt w wieku 1-2 lat. Zarówno w mózgu, jak i w rdzeniu kręgowym wakuolizacja dotyczyła większości włókien szlaków nerwowych (4).

W oparciu o charakter i rozmieszczenie PrP^{Sc} rozważano udział przynajmniej dwóch sposobów transmisji zakażenia z przewodu pokarmowego (11, 16). W jednym sposobie ma mieć miejsce penetracja komórek nabłonka jelit cienkich przez PrP^{Sc} z następującą jego replikacją w cytoplazmie komórek, podczas gdy w drugim sposobie ekspresja normalnego PrP^C na błonie komórek nabłonka jelitowego pełniąc rolę receptora eliminuje konieczność wniknięcia prionu zakaźnego do cytoplazmy komórek nabłonka. Dotychczas nie wykazano ekspresji PrP^C przez komórki nabłonka jelitowego, ale obecność PrP^{Sc} stwierdzono w układzie chłonnym przewodu pokarmowego (GALT Gut Associated Lymphoid Tissue), szczególnie w komórkach dendrytycznych, natomiast komórki M i limfocyty nabłonka jelitowego i układu siateczkowo-śródbłonkowego spełniają rolę przenośników. PrP^{Sc} nie jest rozpoznawany przez układ immunologiczny jako obcy. Limfocyty CD⁶⁸ uczestniczą w transporcie PrP^{Sc} do komórek dendrytycznych (15). Nie jest w pełni wyjaśniony mechanizm transmisji z układu siateczkowo-śródbłonkowego do ośrodkowego układu nerwowego. Być może, transport odbywa się za pośrednictwem neuro-immunologicznych połączeń przez autonomiczne unerwienie śledziony lub jelit, jak to sugerują Will i Ironside (16). Występowanie u pacjentów ataksji przed pojawieniem się objawów demencji potwierdza tę drogę transmisji zakażenia w organizmie. Priony penetrują rdzeń kręgowy jeszcze przed zajęciem mózgu. Istnieją sugestie, że sfagocytowany przez makrofagi PrP^{Sc} wnika do komórki nerwowej, gdzie wywiera swoje niszczące działanie. W zakażonym neuronie PrP^{Sc} spełnia rolę czynnika niszczącego oraz matrycy dla posttranslacyjnej fazy biosyntezy PrP, zapoczątkowując w ten sposób proces chorobowy (15).

Objawy kliniczne

Początek choroby jest trudny do zauważenia. Choroba rozwija się powoli przez kilka miesięcy lub lat. Po per oralnym lub domózgowym zakażeniu lemurów, *Microcebus murinus*, pierwsze objawy zmiany zachowania wystąpiły u części zwierząt po 3 miesiącach, zaś objawy neurologiczne po 13 miesiącach po zakażeniu. Choroba rozpoczynała się zaburzeniem funkcji poznawczych, postępującą obojętnością na wpływ czynników otoczenia. Następnie pojawiała się apatia, niechęć do poruszania się i lękliwość.

W miarę postępu choroby pojawiają się zaburzenia neurologiczne, które wraz z czasem ulegają nasileniu. Ma miejsce dramatyczny spadek masy ciała, któremu towarzyszy drżenie całego ciała i krańcowe wyczerpanie, pojawia się też na skórze swędząca wysypka, a u części zwierząt na kilka tygodni przed śmiercią ślepotą (5).

Rozpoznanie choroby

Chorobę rozpoznano na podstawie pośmiertnego badania histologicznego mózgu, które wykazało istnienie wakuolizacji neuronów w postaci zmian gąbczastych umiejscowionych w istocie szarej mózgu i mózdzku. Badania immunohistochemiczne i immunobloting umożliwiły wykrycie złogów patologicznego białka prionowego w strukturach przewodu pokarmowego, mózgu i rdzenia kręgowego (Bons i wsp.) (5).

Zwłoki padłych zwierząt poddano dekontaminacji. Pomieszczenia odkażono, a z pożywienia wykluczono dodatek białka zwierzęcego.

Piśmiennictwo

1. Aguzzi A., Brandner S.: The genetics of prions – a contradiction in terms? *Lancet* 1999, 354, 22-25.
2. Bons N., Mestre-Frances N., Charnay Y., Salmona M., Togliavini F.: Spontaneous spongiform encephalopathy in a young adult rhesus monkey. *C. R. Acad. Sci. III*. 1996, 319, 733-736.
3. Bons N., Mestre-Frances N., Guiraud I., Charney Y.: Prion immunoreactivity in brain, tonsils, gastrointestinal epithelial cells and blood and lymph vessels in lemurian zoo primates with spongiform encephalopathy. *C. R. Acad. Sci. Paris* 1997, 320, 971-979.
4. Bons N., Mestre-Frances N., Belli P., Cathala F., Gajdusek D. C., Brown P.: Natural and experimental oral infection of non-human primates by bovine spongiform encephalopathy agent. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 4046-4051.
5. Bons N., Lehmann S., Nishida N., Mestre-Frances N., Dormont D., Belli P., Delacourte A., Grassi J., Brown P.: BSE infection of the small short-lived primate *Microcebus murinus*. *C. R. Biologies* 2002, 325, 67-74.
6. Brandner S., Isenmann S., Raeber A.: Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 1996, 379, 339-340.
7. Chiesa R., Ricardo P., Ghetti B., Harris D. A.: Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* 1998, 21, 1339-1351.
8. Dalgaard N. J.: Prion diseases. An review. *Acta pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 2002, 110, 3-13.
9. Hill A. F., Desbrulais M., Joiner S., Siedle K. C., Gowland L., Collinge J., Doey L. J., Lantos P.: The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 1997, 389, 448-450.
10. Hill A., Collinge J.: Subclinical prion infection. *Trends Microbiol.* 2003, 11, 578-584.
11. Ironside J. W.: Neuropathological findings in new variant CJD and experimental transmission of BSE. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* 1998, 21, 91-99.
12. Kirkwood J. K., Cunningham A. A.: Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet. Rec.* 1994, 135, 296-303.
13. Prusiner S. B.: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982, 216, 136-144.
14. Race R., Chesbro B.: Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* 1988, 392, 770-772.
15. Rico A.: Prion: toxic or infectious agent. *Medical Hypotheses* 2003, 60, 209-214.
16. Will R. G., Ironside J. W.: Oral infection by the bovine spongiform encephalopathy prion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 4738-4739.
17. Wyatt J. M., Pearson G. R., Smerdon T. N., Gruffydd-Jones T. J., Wells G. A.: Spongiform encephalopathy in a cat. *Vet. Rec.* 1990, 126, 513.
18. Schätzl H. M., Da Costa M., Taylor L., Cohen F. E., Prusiner S. B.: Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.* 1995, 245, 362-374.
19. Zlotnik I., Grant D. P., Dayan A. D., Earl C. J.: Transmission of Creutzfeldt-Jakob from man to squirrel monkey. *Lancet* 1974, 24, 435-438.