

Zakażenia subkliniczne w chorobach prionowych

MIROSLAW P. POLAK, JERZY ROLA

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

Polak M. P., Rola J.

Subclinical infections in prion diseases

Summary

Despite many years of painstaking research prion diseases are not fully understood while the mechanism of their pathogenesis is still a challenge. The initial failure in interspecies transmission of these diseases was explained by the existence of an effective species barrier. However, evaluation of successful infection was solely based on clinical examination (presence of CNS signs). Early detection of prion infections with increased diagnostic sensitivity was possible due to improved diagnostic methods and the use of the presence of PrP^{Sc} as the specific marker of prion diseases. It turned out that that despite the lack of a clinical phase after infection with the agent causing transmissible spongiform encephalopathy both in humans and animals, infectivity was growing and it was possible to transmit the disease in further passages into healthy individuals resulting in the development of clinical infection and a fatal outcome. Therefore it can be concluded that apparently healthy humans and animals subclinically infected with prion diseases pose a risk of transmission comparable to clinically affected ones.

Keywords: prion diseases, subclinical infections, BSE

Choroby prionowe to zespół zakaźnych gąbczastych encefalopatii (Transmissible Spongiform Encephalopathies – TSEs) występujących zarówno u ludzi (choroba Creutzfeldta-Jakoba), jak i u zwierząt (trzęsawka owiec, gąbczasta encefalopatia bydła – BSE). Kluczowym etapem patogenezы tych chorób jest przemiana komórkowej formy białka prionowego, kodowanego przez gospodarza (PrP^C) do formy patologicznej określanej jako PrP^{Sc} (1). Białko PrP^{Sc} uznawane jest za główny składnik czynnika etiologicznego chorób prionowych. Różnice między tymi białkami widoczne są na poziomie struktury trzeciorzędowej, czyli ułożenia przestrzennego łańcucha białkowego. W przeciwieństwie do formy fizjologicznej, w przypadku PrP^{Sc} dominują struktury płaskie (harmonijka β), a zawartość struktur spiralnych (helisa α) jest mniejsza. Gromadzenie się formy patologicznej białka prionowego poprzedza fazę kliniczną choroby, a jej obecność w badanej próbce, już w okresie inkubacji choroby, wykorzystywana jest w diagnostyce laboratoryjnej.

Opisane eksperymentalne przypadki, w których przy wysokich mianach PrP^{Sc} nie stwierdzano objawów klinicznych choroby, nasunęły podejrzenie istnienia zakażeń subklinicznych (6). Poza aspektem poznawczym, stwarza to poważne implikacje zdrowotne tak ze strony pozornie zdrowych zwierząt (produkty pochodzenia zwierzęcego), jak i ludzi (transplantologia, transfuzje krwi, operacje chirurgiczne, zabiegi neurologiczne), gdzie wysokie stężenie białka PrP^{Sc} nie odpowiada obrazowi klinicznemu. Jednocześnie obecność tego białka oznacza możliwość transmisji choroby na osobniki zdrowe.

Gromadzenie się patologicznej formy białka prionowego (PrP^{Sc}) bez wystąpienia fazy klinicznej choroby

określa się mianem zakażenia subklinicznego (3, 5). Niektórzy autorzy, definiując zakażenia subkliniczne, wskazują na brak jawnej fazy klinicznej, dopuszczając możliwość występowania przejściowych i nietypowych objawów chorobowych u zakażonych zwierząt.

Opisano występowanie zakażeń subklinicznych w wyniku: międzygatunkowej transmisji materiału od zwierząt chorych na TSE; zakażenia zwierząt z defektem immunologicznym; zakażenia drogą doustną materiałem od zwierząt chorych na TSE; zakażenia inokulum o niskim mianie patologicznej formy białka prionowego.

Pierwsze podejrzenia istnienia zakażeń subklinicznych opisano przy próbach transmisji międzygatunkowej chorób prionowych (6, 8, 9). Najczęściej zjawisko to tłumaczono istnieniem bariery gatunkowej, wiązanej bezpośrednio z różnicami w strukturze pierwszorzędowej białka PrP^C u różnych gatunków zwierząt. W przypadku istnienia bariery gatunkowej, niewielki odsetek zwierząt ulegał zakażeniu, a okres inkubacji był wydłużony. Kolejne pasaży prowadziły do skrócenia okresu inkubacji choroby, przy rosnącym odsetku zwierząt podatnych na zakażenie (2). Użycie myszek transgenicznych z wbudowanym genem kodującym białko PrP innego gatunku zwierząt lub ludzi prowadziło do rozwoju choroby prionowej.

Dotychczas stosowana ocena skuteczności transmisji chorób prionowych jedynie w oparciu o wystąpienie lub brak objawów klinicznych zakażenia, okazała się zawodna w związku ze stwierdzaniem wysokich mian białka PrP^{Sc} u pozornie zdrowych zwierząt, a pasażowanie materiału na zdrowych osobnikach, prowadziło w kolejnych pasażach do rozwoju klinicznej postaci choroby i padnięć zwierząt zakażonych.

Podobny rodzaj zakażenia obserwowano w przypadku zwierząt z defektem immunologicznym (4). Myszy transgeniczne, pozbawione ekspresji limfocytów B wydawały się odporne na zakażenie czynnikiem wywołującym trzęsawkę owiec na podstawie braku objawów klinicznych ze strony OUN. Jednakże u zwierząt tych stwierdzono gromadzenie się znacznych ilości białka PrP^{Sc} w tkance mózgowej.

Kolejnym czynnikiem decydującym o rozwoju zakażenia subklinicznego było zakażenie zwierząt drogą doustną, a bezpośredni wpływ na wynik takiego zakażenia miał poziom ekspresji białka PrP^C gospodarza oraz droga zakażenia (12). Inokulum stanowił szczep czynnika wywołującego trzęsawkę owiec adaptowany do myszek. Poza myszkami normalnymi (typu dzikiego) w badaniach użyto myszek transgenicznych tg20, u których ekspresja białka PrP^C jest 10-krotnie wyższa. Materiał zakaźny, w tej samej dawce, podawano drogą domózgową (i.c.), dotrzewnową (i.p.) lub doustną (p.o.). Zakażenie myszek typu dzikiego, inokulum o niskim mianie zakaźnym drogą i.c. oraz i.p., prowadziło do rozwoju typowej postaci klinicznej choroby prionowej z następowymi padnięciami zwierząt. W przypadku, gdy materiał zakaźny podawano *per os*, nie stwierdzano występowania objawów klinicznych w ciągu ponad 600 dni obserwacji. Natomiast poziom białka PrP^{Sc} w mózgowiu zwierząt zakażonych drogą p.o. (analizowany metodą western-blot), był porównywalny z poziomem białka po zakażeniu drogą i.c. oraz i.p. Potwierdzenie korelacji między obecnością białka PrP^{Sc} a zakaźnością mózgowia z przypadków zakażeń subklinicznych uzyskano w próbie biologicznej na myszkach tg20. Poziom białka prionowego (wyrażony jako LD₅₀) w homogenatach mózgowia myszek tg20 był znacząco wyższy w stosunku do poziomu tego białka w inokulum dla myszek typu dzikiego podawanego *per os*. Wskazuje to na czynny proces syntezy białka prionowego w zakażeniu subklinicznym. W przypadku myszek transgenicznych, bez względu na drogę podania inokulum, zawsze stwierdzano rozwój klinicznej postaci choroby prionowej, kończącej się padnięciami zakażonych zwierząt. Najdłuższy czas inkubacji stwierdzano w przypadku zakażenia drogą p.o. Generalnie, czas inkubacji choroby był o połowę krótszy w stosunku do myszek typu dzikiego. Podsumowując te wyniki należy stwierdzić, że zakażenie drogą doustną powoduje rozwój choroby prionowej, a podwyższony poziom ekspresji białka PrP^C (np. w stanach zapalnych odcinka żołądkowo-jelitowego przewodu pokarmowego) zwiększa skuteczność zakażenia, prowadząc do rozwoju śmiertelnej choroby prionowej.

W badaniach Thackray i wsp. (11), w przeciwieństwie do poprzednio opisanych doświadczeń, zakażenie myszek transgenicznych (tg20) inokulum o niskim mianie patologicznej formy białka prionowego prowadziło do rozwoju formy pośredniej między zakażeniem subklinicznym i klinicznym. U części z tych myszek zauważono występowanie przejściowej fazy objawów klinicznych, jednakże nigdy nie dochodziło do rozwoju pełnej postaci klinicznej (ataksja) z następowymi padnięciami chorych zwierząt. Podobny rodzaj objawów z użyciem identycznego inokulum o niskim mianie, ale na myszkach typu dzikiego opisano już wcześniej (10). Jednakże wtedy, po przejściowej fazie klinicznej, doszło do rozwoju jawnej fazy

choroby z objawami ataksji i padnięciami zwierząt zakażonych. Podsumowując wyniki powyższych badań można stwierdzić, że transmisja w obrębie tego samego gatunku, nawet przy ekspozycji na bardzo niskie dawki czynnika wywołującego chorobę prionową prowadzi do jego amplifikacji, stwarzając zagrożenie w przypadku przerobu produktów odpadowych na karmę dla zwierząt. Wykazanie, że miano czynnika zakaźnego chorób prionowych w zakażeniach subklinicznych jest na podobnym poziomie do miana z przypadków klinicznych, jest jednoznaczne z identycznym zagrożeniem zdrowia ludzi i zwierząt tak w przypadku zakażeń subklinicznych, jak i zakażeń klinicznych (5).

Zjawisko występowania zakażeń subklinicznych w przebiegu chorób prionowych potwierdzają, jak się wydaje, wyniki badań monitoringowych bydła w kierunku BSE, chociażby w Polsce. Spośród 15 przypadków choroby wykrytych do końca maja 2004 r., zaledwie dwie krowy wykazywały objawy kliniczne nasuwające podejrzenie BSE. Dwanaście przypadków choroby zdiagnozowano wstępnie, a następnie potwierdzono u zwierząt zdrowych (jeden przypadek dotyczył krowy padłej). Celem uzyskania całkowitej pewności, że u zwierząt zdrowych z dodatnim wynikiem badania laboratoryjnego w kierunku BSE zdiagnozowano stan zakażenia subklinicznego, należałoby wykonać badanie przyżyciowe w kierunku gąbczastej encefalopatii bydła (co w przypadku BSE nie jest obecnie możliwe), a następnie prowadzić obserwację kliniczną przez cały okres życia zwierzęcia. Jednakże na podstawie wyników badań histopatologicznych stwierdzonych w Polsce przypadków BSE (wykrywana w tym badaniu obecność zmian gąbczastych w istocie szarej pnia mózgu bezpośrednio poprzedza pojawienie się fazy klinicznej choroby), można podejrzewać, że przynajmniej dwie krowy (negatywne wyniki w badaniu histopatologicznym) mogły być w fazie zakażenia subklinicznego czynnikiem wywołującym BSE.

Piśmiennictwo

1. Aguzzi A., Heppner F. L.: Pathogenesis of prion diseases: a progress report. *Cell Death Differ.* 2000, 7, 889-902.
2. Collinge J.: Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1999, 354, 317-323.
3. Dickinson A. G., Fraser H., Outram G. W.: Scrapie incubation time can exceed natural lifespan. *Nature* 1975, 256, 732-733.
4. Frigg R., Klein M. A., Hegyi I., Zinkernagel R. M., Aguzzi A.: Scrapie pathogenesis in subclinically infected B-cell-deficient mice. *J. Virol.* 1999, 73, 9584-9588.
5. Hill A. F., Collinge J.: Subclinical prion infection. *Trends Microbiol.* 2003, 11, 578-584.
6. Hill A. F., Joiner S., Linehan J., Desbruslais M., Lantos P. L., Collinge J.: Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 10248-10253.
7. Lasmezas C. I., Deslys J.-P., Robain O., Jaegly A., Beringue V., Peyrin J.-M., Fournier J.-G., Hauw J.-J., Rossier J., Dormont D.: Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 1997, 275, 402-405.
8. Race R., Chesebro B.: Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* 1998, 392, 770.
9. Race R., Raines A., Raymond G. J., Caughey B., Chesebro B.: Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J. Virol.* 2001, 75, 10106-10112.
10. Taylor D. M., McConnell I., Fergusson C. E.: Closely similar values obtained when the ME7 strain of scrapie agent was titrated in parallel by two individuals in separate laboratories using two sublines of C57BL mice. *J. Virol. Methods* 2000, 86, 35-40.
11. Thackray A. M., Klein M. A., Aguzzi A., Bujdosó R.: Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum. *J. Virol.* 2002, 76, 2510-2517.
12. Thackray A. M., Klein M. A., Bujdosó R.: Subclinical prion disease induced by oral inoculation. *J. Virol.* 2003, 77, 7991-7998.

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