

Działalność krajowego laboratorium referencyjnego BSE i trzęsawki

MIROSŁAW P. POLAK, JERZY ROLA, WOJCIECH ROŻEK,
MAGDALENA LARSKA, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

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

Polak M. P., Rola J., Rożek W., Laska M., Żmudziński J. F.

Activity of the National Reference Laboratory for BSE and Scrapie

Summary

The activity of the National Reference Laboratory for a given disease encompasses not only diagnostics but also research and instruction. In the case of transmissible spongiform encephalopathies this range of activities constantly expands along with the accumulation of the data on prion protein characteristics, pathogenesis of spongiform encephalopathies and the threat to consumer health. Besides the standard task, which is confirmatory testing, the reference laboratory should organize instruction, verify diagnostic methods, control the quality of diagnostic reagents, cooperate with the community reference laboratories, participate and arrange comparative tests, as well as take part in the investigations of expert working groups. All the above mentioned aspects of the activity of the National reference laboratory for BSE and scrapie are presented in this review.

Keywords: BSE, TSE, reference laboratory

Ustawa o Inspekcji Weterynaryjnej z 29 stycznia 2004 r. (Dz. U. Nr 33, poz. 287) w artykule 23, punkt 5 definiuje zadania krajowych laboratoriów referencyjnych. W następnym punkcie ustawa określa zadania krajowego laboratorium referencyjnego (KLR) wykonującego badania w kierunku pasażowalnych gąbczastych encefalopatii (TSEs), wskazując, że w tym zakresie regulacje unijne stosuje się w sposób bezpośredni do laboratorium referencyjnego. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 z 22 maja 2001 r. ustanawiające przepisy w zakresie zapobiegania, zwalczania oraz likwidacji określonych pasażowalnych gąbczastych encefalopatii, definiuje zadania krajowych laboratoriów referencyjnych w Aneksie X, rozdział A. Należą do nich:

- a) potwierdzanie wyników dodatnich z regionalnych laboratoriów diagnostycznych;
- b) weryfikowanie metod diagnostycznych stosowanych w regionalnych laboratoriach diagnostycznych;
- c) koordynowanie stosowanych w kraju standardów diagnostycznych i metod poprzez:
 - kontrolowanie jakości wszystkich odczynników diagnostycznych stosowanych w kraju;
 - przeprowadzanie okresowych badań porównawczych;
 - posiadanie w swoich archiwach izolatów lub odpowiednich tkanek zawierających takie izolaty, pochodzących z potwierdzonych przypadków TSEs;
- d) współpraca ze Wspólnotowym Laboratorium Referencyjnym.

Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 21 października 2004 r. w sprawie wykazu laboratoriów referencyjnych właściwych dla poszczególnych rodzajów i kierunków badań, podaje dwa laboratoria działające w ramach Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego (PIWet.-PIB) w Puławach, które są odpowiedzialne za działalność referencyjną z zakresu BSE bydła i trzęsawki małych przeżuwaczy. Jest to Zakład Anatomii Patologicznej w odniesieniu do metody histopatologicznej (HI) oraz immunohistochemicznej (IHC) oraz Zakład Wirusologii w zakresie szybkich testów oraz metody immunoblot.

Niniejszy artykuł przedstawia działalność referencyjną Zakładu Wirusologii PIWet-PIB w Puławach w zakresie BSE i trzęsawki.

Od 1998 r. pracownicy KLR uczestniczą w szkoleniach, podnosząc swoje kwalifikacje w zakresie diagnozowania i potwierdzania BSE oraz trzęsawki. Pierwsze szkolenie, obejmujące wykonywanie badań odwoławczych w kierunku BSE miało miejsce w 1998 r. w VLA Weybridge, Wielka Brytania, gdzie mieści się wspólnotowe laboratorium referencyjne (WLR). Podobne szkolenie w zakresie metody immunoblot odbyło się w KLR dla Niemiec w Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases na wyspie Riems. Ponadto od 1999 r. szkolenia obejmowały podstawy teoretyczne oraz metodykę wykonania szybkich testów dopuszczonych do badań monitoringowych w kierunku BSE.

Aktualnie nowe testy do badań monitoringowych prezentowane są pracownikom zarówno KLR, jak i pracowni regionalnych na spotkaniach organizowanych w PIWet.-PIB w Puławach z udziałem przedstawicieli producentów zestawów diagnostycznych.

Działalność referencyjna obejmuje przede wszystkim prowadzenie badań potwierdzających. Mają one na celu potwierdzenie lub wykluczenie dodatniego wyniku badania uzyskanego w laboratorium regionalnym. W ramach monitoringu czynnego każda próbka badana jest jednokrotnie (4). Jeśli stwierdzony zostanie wynik dodatni w pierwszym badaniu, procedury wymagają przeprowadzenia ponownego badania, z tą różnicą, że próbka badana jest w duplikacie (podwójnie). Dopiero gdy ponownie uzyskany zostanie wynik dodatni, próbka trafia do KLR, celem wykonania badań potwierdzających (2). Pierwszy przypadek BSE w Polsce zdiagnozowano i potwierdzono w maju 2002 r. W okresie maj 2002 r. - listopad 2006 r. w Zakładzie Wirusologii PIWet.-PIB wykonano 41 badań potwierdzających, z których 35 dało wyniki dodatnie. Dwa pozostałe przypadki BSE potwierdzono wyłącznie w Zakładzie Anatomii Patologicznej PIWet.-PIB, ponieważ próbki zostały utracone w formalinie, co uniemożliwiało wykonanie badania metodą immunoblot.

Tkanka mózgową z dodatnich i potwierdzonych przypadków BSE przechowywana jest w archiwum Zakładu Wirusologii, stanowiąc materiał do badań naukowych. Analiza profili glikozylacji białka PrP^{Sc} wykazała, że 5 spośród 35 przypadków potwierdzonych w Zakładzie Wirusologii należy do tzw. atypowych przypadków BSE (5). Profil glikozylacji białka prionowego różni się od profilu glikozylacji białka PrP^{Res} powszechnie występującego w pogłowie zwierząt Polski i Europy, a podobne, atypowe przypadki BSE opisano także we Włoszech, Francji i Holandii. Najczęściej postać atypowa dotyczy zwierząt starszych w wieku powyżej 8-9 lat. W Polsce atypowe przypadki BSE zanotowano u zwierząt 9-13 letnich. Nie wyjaśniono dotychczas praktycznego znaczenia tej zmienności w profilu glikozylacji białka prionowego, choć jest to dość rzadkie zjawisko.

Poza badaniami potwierdzającymi KLR prowadzi także badania naukowe nad opracowaniem prostych i szybkich metod diagnozowania BSE (projekt celowy zamawiany przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi dotyczący zastosowania testu dot-blot w diagnostyce BSE), jak również nad oceną ryzyka BSE w Polsce (w ramach programu wieloletniego PIB) (6).

Kolejnym zadaniem KLR jest weryfikacja metod diagnostycznych stosowanych w regionalnych laboratoriach diagnostycznych. W tym celu od 2003 r. pracownicy KLR przeprowadzają wizyty kontrolne w regionalnych pracowniach diagnozujących BSE. Kontrola pracy laboratorium obejmuje nie tylko ocenę wykonania poszczególnych etapów badania, ale także przechowywanie odczynników oraz próbek, postępowanie z odpadami i stosowane środki bezpieczeństwa biologicznego. Ewentualne niedociągnięcia i uchybienia przed-

stawiane na spotkaniu podsumowującym kontrolę służą usprawnieniu działalności laboratorium.

Jednym z zadań KLR jest także kontrolowanie jakości odczynników diagnostycznych stosowanych w kraju. Oznacza to konieczność oceny każdej nowej serii danego zestawu diagnostycznego (szybkiego testu) przed dopuszczeniem go do stosowania w danym kraju. Dotychczas tylko nieliczne kraje (np. Niemcy) wdrożyły system oceny każdej nowej serii testu wprowadzanej na rynek. Do niedawna, zgodnie z wytycznymi WLR, wystarczała jedynie ocena dostarczanego właśnie do WLR dossier związanego z danym testem, co stanowiło podstawę dopuszczenia danego zestawu do stosowania w krajach członkowskich. Gwarantem dobrej jakości produkowanych zestawów diagnostycznych miał być system jakości, wdrożony przez każdego producenta. Ostatnie ustalenia zmierzają w kierunku wyboru kilku KLR do oceny poszczególnych serii zestawów diagnostycznych w warunkach praktycznych, przed dopuszczeniem ich do obrotu w krajach Unii. KLR dla Polski zgłosiło chęć udziału w takich ocenach dwóch szybkich testów.

Ustalenia opisane powyżej są wynikiem dyskusji prowadzonych w trakcie spotkań organizowanych corocznie przez WLR dla KLR w Wielkiej Brytanii. Spotkania te są jednym z elementów współpracy KLR ze Wspólnotowym Laboratorium Referencyjnym dla TSEs. Przedstawiciele KLR dla Polski uczestniczyli dotychczas w trzech takich spotkaniach roboczych (najpierw jako kraj kandydujący w 2003 r., a następnie jako członek UE). Spotkania takie, mające charakter roboczy, służą wymianie poglądów między przedstawicielami poszczególnych KLR, rozwiązywaniu wspólnych problemów diagnostycznych oraz zapoznawaniu się z aktualnościami dotyczącymi TSEs u zwierząt. Współpraca z WLR nie ogranicza się wyłącznie do spotkań roboczych i konsultacji. Podobnie jak KLR jest jednostką odwoławczą dla laboratoriów regionalnych, tak WLR jest jednostką referencyjną dla KLR. Zależność ta oznacza możliwość potwierdzania przez WLR wyników wątpliwych i nietypowych, uzyskanych w badaniach potwierdzających w KLR. W ciągu 3 lat pracy, KLR w Puławach raz wysłało dwie próbki od zwierząt padłych, które dawały wyniki niejednoznaczne. Były to próbki bardzo złej jakości, w stanie całkowitego rozkładu gnilnego (brak możliwości utrwalenia materiału w formalinie do badania metodami HI lub IHC), w stanie płynnym, uniemożliwiającym identyfikację rejonu zasuwki w badanej próbce. Lokalizacja trzech prążków białka prionowego w badaniu metodą immunoblot była nietypowa (poniżej miejsca położenia dla typowych przypadków BSE), a sygnał reakcji był bardzo słaby. W związku z niejednoznaczną interpretacją wyników badań przez WLR, wyniki badań tych dwóch próbek uznano za wątpliwe (nierozstrzygające).

Badania biegłości służą ocenie kompetencji zarówno KLR, jak i laboratoriów regionalnych. Ten element działalności referencyjnej jest szczególnie istotny w przypadku krajów wolnych od BSE. Doświadczenie

zdobyte w trakcie analizy próbek dodatnich jest bardzo przydatne w późniejszym potwierdzaniu wyników badań z laboratoriów regionalnych. KLR uczestniczy w testach porównawczych od 2003 r. Pierwsza ocena organizowana jeszcze nie przez WLR, ale Instytut Materiałów Referencyjnych i Miar (IRMM, Geel, Belgia), obejmowała analizę 85 próbek kodowanych. Od 2004 r. próbki przesyłane są przez WLR (1 badanie/rok). W 2004 r. oraz 2005 r. otrzymano po 10 próbek do oceny. Dotychczas wszystkie próbki zostały zdiagnozowane prawidłowo. W związku ze zdiagnozowaniem czynnika wywołującego BSE u kozy pojawiła się konieczność różnicowania dodatnich przypadków od małych przeżuwaczy na trzęsawkę i BSE (1). Chodzi o ocenę skali zjawiska przekroczenia bariery gatunkowej przez czynnik BSE i ewentualnych konsekwencji dla zdrowia człowieka. W związku z tym opracowano i wdrożono 3-etapowy system oceny próbek dodatnich od małych przeżuwaczy, umożliwiający różnicowanie białka PrP^{Sc} na pochodzące od bydła lub owiec i kóz (7, 8). Pierwotnie tylko 3 laboratoria w ramach UE uzyskały pozwolenie WLR na prowadzenie badań różnicujących BSE i trzęsawkę. Dopuszczenie kolejnych laboratoriów do wykonywania takich badań uwarunkowane było uzyskaniem pozytywnego wyniku w teście kompetencji zorganizowanym przez WLR w 2005 r. KLR dla Polski brało udział w tej ocenie i uzyskało pozytywną opinię, dzięki czemu może prowadzić badania różnicujące dodatnich przypadków TSE od małych przeżuwaczy (3). O randze problemu świadczy m.in. to, że pod koniec listopada 2005 r. KLR ponownie otrzymało próbki do oceny jego zdolności różnicowania BSE i trzęsawki. Do obowiązków KLR należy przeprowadzanie testów porównawczych dla pracowni regionalnych, diagnozujących BSE. Pierwszy taki test zorganizowano w 2005 r. Głównym problemem w przeprowadzeniu oceny jest dostępność potwierdzonych próbek dodatnich w kierunku BSE. Ilość tkanki nerwowej z potwierdzonych w kraju przypadków BSE, będąca w posiadaniu Zakładu Wirusologii, nie jest duża, ponieważ większość materiału trafia do badań odwoławczych metodami HI oraz IHC. Ponadto nierównomierny rozkład białka PrP^{Sc} w posiadanych próbkach nie zapewnia uzyskania jednorodnego materiału, co gwarantowałoby uzyskiwanie powtarzalnych wyników. Dlatego też KLR starało się pozyskać materiał z potwierdzonych przypadków BSE z archiwum TSE, mieszczącego się w VLA Weybridge, Wielka Brytania. Jednakże postanowiono, że ze względu na duże zapotrzebowanie materiał ten będzie rozdzielany głównie dla laboratoriów naukowych, prowadzących badania nad patogenezą chorób prionowych. Także próby pozyskania próbek z innych KLR w obrębie UE zakończyły się fiaskiem. Dopiero komercyjne udostępnienie przez IRMM próbek z przypadków BSE pozwoliło na przeprowadzenie testu porównawczego dla laboratoriów regionalnych w 2005 r. Każde z pięciu laboratoriów otrzymało 10-12 kodowanych próbek homogenatu pnia mózgu (6-8 próbek dodatnich oraz 4 próbki ujemne

w kierunku BSE). Wszystkie laboratoria uzyskały zarówno czułość diagnostyczną, jak i specyficzność diagnostyczną na poziomie 100%. Oznacza to pozytywny wynik testu porównawczego dla laboratoriów ZHW z Gdańska, Krakowa, Leszna, Warszawy i Wrocławia. W przyszłości planuje się coroczne organizowanie 1-2 testów kompetencji dla laboratoriów regionalnych.

Corocznie KLR organizuje spotkania dla pracowników regionalnych pracowni BSE dotyczące bieżących problemów diagnostycznych, wyników przeprowadzonych kontroli, testów kompetencji, jak również aktualnych danych odnośnie do epizootologii BSE i nowinek naukowych dotyczących chorób prionowych.

Bogate doświadczenie pracowników KLR związane z zagadnieniami dotyczącymi chorób prionowych oraz metod ich diagnozowania wykorzystywane jest nie tylko w pracy laboratorium, ale także na szerszym forum poprzez prowadzenie szkoleń zarówno dla diagnostów, jak i lekarzy praktyków, udział w pracach grup eksperckich o charakterze doradczym dla Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi (plan gotowości zwalczania BSE) czy też poprzez udział w pracach komisji przetargowych przy zakupach zestawów diagnostycznych.

Podsumowując należy stwierdzić, że zakres obowiązków KLR w aspekcie chorób prionowych zwierząt poszerza się i wykracza daleko poza ramy jedynie działalności laboratoryjnej. Wiąże się to zarówno z poznaniem natury czynnika etiologicznego tych chorób, jak również z wdrażaniem systemu jakości w pracy laboratoriów diagnostycznych. KLR jest jednym z ogniw urzędowego nadzoru nad BSE w Polsce i odgrywa ważną rolę w systemie monitorowania i diagnozowania tej choroby u bydła przeznaczonego do konsumpcji przez człowieka. W tym aspekcie KLR funkcjonuje bezpośrednio w oparciu o legislację Unii Europejskiej.

Piśmiennictwo

1. Eloit M., Adjou K., Couplier M., Fontaine J. J., Hamel R., Lilin T., Messiaen S., Andreoletti O., Baron T., Bencsik A., Biacabe A.-G., Beringue V., Laude H., Le Dur A., Vilotte J. L., Comoy E., Deslys J. P., Grassi J., Simon S., Lantier F., Sarrafin P.: BSE agent signatures in a goat. *Vet. Rec.* 2005, 156, 523-524.
2. Polak M., Rożek W., Larska M., Rola J., Żmudziński J. F.: Ocena wyników monitoringu czynnego BSE w Polsce w latach 2001-2004. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 654-656.
3. Polak M. P., Larska M., Rożek W., Żmudziński J. F.: Różnicowanie BSE i trzęsawki w pogłowie owiec i kóz. *Medycyna Wet.*, złożone do druku 2005.09.06 pod nr 429/05.
4. Polak M. P., Larska M., Rożek W., Rola J., Żmudziński J. F.: Szybkie testy diagnostyczne stosowane w Polsce w monitoringu BSE. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 767-769.
5. Polak M. P., Rożek W., Rola J., Żmudziński J. F.: Prion protein glycoforms from BSE cases in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2004, 48, 201-205.
6. Polak M. P., Rożek W., Żmudziński J. F.: Implementation of dot-blot in rapid diagnosis of BSE. *Bull. Vet. Inst. Pul.* 2005, 49, 263-266.
7. Stack M. J., Chaplin M. J., Clark J.: Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol.* 2002, 104, 279-286.
8. Thuring C. M. A., Erkens H. F., Jacobs J. G., Bossers A., Van Keulen L. J. M., Garssen G. J., Van Zijderveld F. G., Ryder S. J., Groschup M. H., Sweeney T., Langeveld J. P. M.: Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity and glycoprofile of prion protein. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 972-980.

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