

Różnicowanie BSE i trzęsawki w pogłowie owiec i kóz

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

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

Polak M. P., Larska M., Rożek W., Żmudziński J. F.

Discriminatory testing for BSE and scrapie in sheep and goat populations

Summary

The use of BSE-contaminated meat and bone meal for feeding sheep and goats may be the cause of transmitting the BSE agent into small ruminant populations. Experimental studies have shown that sheep which are fed cattle brain homogenates from BSE cases can succumb to a BSE-like disease. The distribution of BSE agents in these sheep is similar to scrapie and a wider range of organs is affected when compared with BSE in cattle. Thus, the possibility of crossing the species barrier between sheep and man cannot be excluded (as has been shown with BSE and its variant – Creutzfeldt-Jakob disease in man). The paper describes implementing one of the approved immuno-blot methods used for discriminating between BSE and scrapie in a small ruminant population. The use of two monoclonal antibodies of which only one reacts with scrapie and atypical scrapie samples facilitates differentiation between BSE and scrapie positive samples from sheep and goats.

Keywords: BSE, scrapie

Pasażowalne gąbczaste encefalopatie (TSEs) zwierząt domowych, do których zalicza się, między innymi, BSE bydła i trzęsawkę owiec, należą do chorób prionowych, w przebiegu których dominują zmiany neurodegeneracyjne. Długi okres inkubacji oraz brak objawów klinicznych w latentnej fazie rozwoju choroby sprawiają, że przyżyciowa diagnostyka laboratoryjna na obecnym etapie wiedzy właściwie nie istnieje. Powszechne uznanie istnienia związku między spożyciem produktów od bydła chorego na BSE, a pojawieniem się wariantu choroby Creutzfeldta-Jakoba u ludzi zwróciło uwagę na zagrożenie dla konsumenta (4, 13). W przeciwieństwie do BSE, znana od kilkuset lat trzęsawka małych przeżuwaczy nie stanowiła zagrożenia i dotychczas nie opisano zachorowań typowych dla chorób prionowych u ludzi, które można by łączyć ze spożyciem produktów pochodzenia owczego lub koziego. W związku z powszechnym stosowaniem mączek mięsno-kostnych w żywieniu małych przeżuwaczy istnieje ryzyko transmisji BSE do pogłowie owiec i kóz. Potwierdzają to wyniki zakażeń eksperymentalnych owiec i kóz homogenatem tkanki nerwowej krów z potwierdzonym BSE (6). Podanie 0,5 g materiału BSE drogą doustną prowadziło do zachorowań zarówno owiec, jak i kóz, przy czym okres inkubacji choroby u kóz był dłuższy. Zagrożenie może wynikać z odmiennego rozmieszczenia patologicznego białka prionowego u owiec. Patologiczne białko prionowe u owiec gromadzi się nie tylko w ośrodkowym układzie nerwowym, jak ma to miejsce w przypadku BSE u bydła, ale także w układzie

limfatycznym, co może zwiększać ryzyko transmisji choroby do człowieka. Na początku 2005 r., opisano pierwszy przypadek gąbczastej encefalopatii u kozy, który zarówno w próbie biologicznej na myszkach, jak i w badaniach molekularnych wykazywał cechy typowe dla czynnika BSE bydła (5). Oznaczało to, że BSE w warunkach naturalnych może przekraczać barierę gatunkową bydło/koza. Pod koniec lat 90. XX w. w Wielkiej Brytanii, pojawiły się obawy, że BSE wniknęło do pogłowie owiec i pozostaje nierozpoznane ze względu na podobieństwo objawów klinicznych zarówno w przypadku naturalnie występującej trzęsawki owiec, jak i po zakażeniu doświadczalnym owiec czynnikiem BSE (3). Ponadto, od 2003 r. notuje się przypadki atypowej trzęsawki owiec w Europie o nieznanym pochodzeniu (1, 2, 7, 12). W związku z tym próbki mózgowia, w których wykryto obecność patologicznego białka prionowego powinny być poddane badaniu w teście różnicującym, czy jest to czynnik typowy dla trzęsawki, czy dla BSE. Badanie to ma określić ewentualne zagrożenie dla człowieka pochodzące od obecności czynnika BSE w populacji małych przeżuwaczy. Możliwość prowadzenia takich badań wiązała się to z koniecznością opracowania nowych metod diagnostycznych, ponieważ badanie kliniczne, jak również dostępne w tym okresie testy diagnostyczne nie pozwalały odróżnić naturalnych przypadków trzęsawki owiec od BSE owiec (zakażanych doświadczalnie materiałem od chorych krów). Należy nadmienić, że w Polsce nie wykryto dotychczas trzęsawki małych przeżuwaczy, co może wiązać się z małą skalą badań.

Pierwsze próby różnicowania BSE i trzęsawki u owiec na poziomie molekularnym podjęto pod koniec lat dziewięćdziesiątych XX w. (8, 9). Uzyskanie w kolejnych latach przeciwciał monoklonalnych dla różnych epitopów białka prionowego doprowadziło do wykrycia różnic w materiale patologicznym z przypadków naturalnych trzęsawki owiec oraz z przypadków zakażeń doświadczalnych owiec materiałem BSE (10, 11, 14, 15). Wyniki uzyskane w tych badaniach zaowocowały zmianami w prawodawstwie unijnym. Od 13 stycznia 2005 r. obowiązuje rozporządzenie komisji nr 36/2005 modyfikujące podstawowy akt prawny dotyczący pasażowalnych gąbczastych encefalopatii u przeżuwaczy, jakim jest rozporządzenie nr 999/2001. Aktualnie każdy potwierdzony przypadek TSE u małych przeżuwaczy wymaga dalszych badań wyjaśniających. Najpierw wykonuje się badanie różnicujące jedną z 3 dopuszczonych metod typu immuno-blot. Jeżeli w badanej próbce nie można wykluczyć obecności czynnika BSE, podejmuje się dodatkowe badania różnicujące (immuno-blot inny niż ten, który stosowano w pierwszym etapie, różnicujące badanie immunohistochemiczne, ewentualnie różnicujące badanie metodą ELISA). W badaniach tych elementem różnicującym białko prionowe jest zestaw dwóch przeciwciał monoklonalnych, z których jedno reaguje wyłącznie z czynnikiem wywołującym trzęsawkę małych przeżuwaczy. W przypadku podtrzymania podejrzenia BSE, rozstrzygające jest badanie na myszkach w próbie biologicznej (badanie to trwa do dwóch lat). Zakłada się, że możliwość identyfikacji czynnika BSE w pogłowie małych przeżuwaczy pozwoli na dokładniejszą analizę tego zjawiska, ocenę zagrożenia dla człowieka oraz na podjęcie ewentualnych działań zapobiegających.

Celem badań było wdrożenie metody VLA hybrydowy western-blot (jednej z trzech dopuszczonych metod różnicowania czynnika BSE i trzęsawki) w Krajowym Laboratorium Referencyjnym ds. TSEs Zwierząt w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowym Instytucie Badawczym (PIWet-PIB) w Puławach. Metoda ta pozwala na analizę immunoreaktywności oraz profilu glikozylacji patologicznej formy białka prionowego, odpornej na proteolizę. Każda próbka badana jest w duplikacie na dwóch żelach, aby ocenić jej reaktywność z dwoma przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko różnym epitopom białka prionowego odporne na proteolizę (PrP^{res}).

Materiał i metody

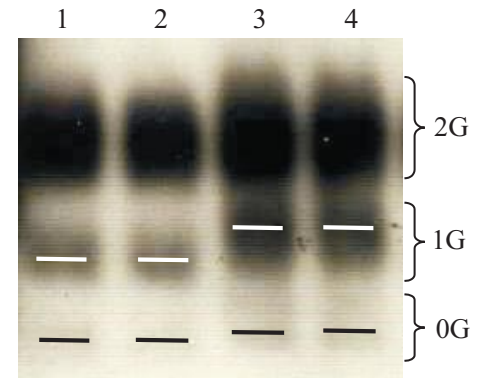
Materiał do badań stanowił pień mózgu z okolicy zasuwni. Do badań wykorzystano homogenaty z dwóch potwierdzonych przypadków BSE u bydła oraz dwie referencyjne próbki z potwierdzonych przypadków trzęsawki owiec (uzyskane dzięki uprzejmości Wspólnotowego Laboratorium Referencyjnego ds. TSEs, VLA Weybridge, Wielka Brytania). Jako kontrolę ujemną zastosowano homogenaty tkanki nerwowej od zdrowych krów.

Do różnicowania formy patologicznej białka prionowego specyficznej dla BSE od formy specyficznej dla trzęsawki zastosowano metodę VLA hybrydowy western-blot. Próbki pnia mózgu homogenizowano do uzyskania 10% zawiesiny w buforze do homogenizacji (Prionics), a następnie wirowano przez 5 min. przy obrotach $12\ 000 \times g$ w temp. 10°C . Próbki trawiono w obecności proteiny K, niosząc, odpowiednio, po 100 μl badanej próbki i 10 μl proteiny K (Prionics) o stężeniu 1 mg/ml w duplikacie na 96-dółkową płytkę o pojemności 0,2 ml (Eppendorf). Po inkubacji przeprowadzanej w temperaturze 50°C przez 45 min. dodawano roztwór inhibitorów proteaz (Prionics) oraz bufor próbkowy (Prionics) i prowadzono denaturację w temperaturze 99°C przez 10 min. Elektroforeza w warunkach redukujących prowadzona była w 12,5% żelu poliakrylamidowym w systemie NuPAGE (Invitrogen) przy stałym napięciu 200 V przez 45 min. Próbki nanoszono podwójnie na 2 oddzielne żele w ilości 10 μl na każdy dołek. Kontrolę testu stanowiły: kontrola dodatnia (homogenat pnia mózgu zdrowej krowy, nie poddany trawieniu proteiną K) oraz kontrola ujemna (homogenat pnia mózgu zdrowej krowy, poddany trawieniu proteiną K). Rozdzielone białka transferowano na dwie membrany PVDF, 0,45 μm (Immobilon, Millipore). Przed transferem membrany umieszczano w 96% metanolu, a następnie przenoszono do aparatu do transferu (BioRad) wypełnionego buforem do transferu (25 mM Tris, 190 mM glicyna, 10% metanol). Transfer białek prowadzono przez 60 min., przy stałym napięciu 150 V i w temperaturze 4°C . Po transferze membrany inkubowano w buforze do blokowania (Prionics) przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Następnie każdą z membran inkubowano z jednym z przeciwciał monoklonalnych (mAb): 6H4 w rozcieńczeniu 1 : 5000 (Prionics) przez 60 min. lub mAb P4 w rozcieńczeniu 1 : 2500 (R-Biopharm) przez 120 min. w temperaturze pokojowej. Obydwa przeciwciała rozcieńczano w buforze TBST (1,37 mM NaCl, 0,027 mM KCl, 0,25 mM Tris, 0,05% Tween-20). Po trzykrotnym płukaniu w TBST membrany inkubowano z koniugatem anty-mysie IgG z fosfatazą alkaliczną (Prionics) w rozcieńczeniu 1 : 5000 przez okres 30 min. Po trzech płukaniach membrany inkubowano 5 min. w buforze luminescencyjnym (Prionics), a następnie nawarstwiano substrat CDP-Star (Sigma) także na okres 5 min. Sygnał chemiluminescencyjny uzyskany na kliszy rentgenowskiej poddawano obróbce i analizie komputerowej za pomocą programu ONE-Dscan, wersja 1.31 (Scanalytics). W interpretacji wyników brano pod uwagę immunoreaktywność oraz różnice mas cząsteczkowych badanych białek. W przypadku BSE u bydła należało oczekiwać sygnału reakcji z mAb 6H4 i braku sygnału reakcji z mAb P4. Dla typowego przypadku trzęsawki owiec należało oczekiwać zarówno sygnału reakcji z mAb 6H4, jak i z mAb P4. Forma nieglikozylowana (0G) patologicznego białka prionowego trzęsawki powinna charakteryzować się większą masą cząsteczkową w stosunku do analogicznej formy z przypadków BSE bydła. W przypadku doświadczalnego BSE u owiec lub nietypowego przypadku trzęsawki owiec należałoby się spodziewać sygnału z obydwoma przeciwciałami (słabszy w reakcji z mAb P4 w porównaniu do 6H4) oraz niższej masy cząsteczkowej formy nieglikozylowanej w stosunku do próbek dodatnich BSE bydła (14).

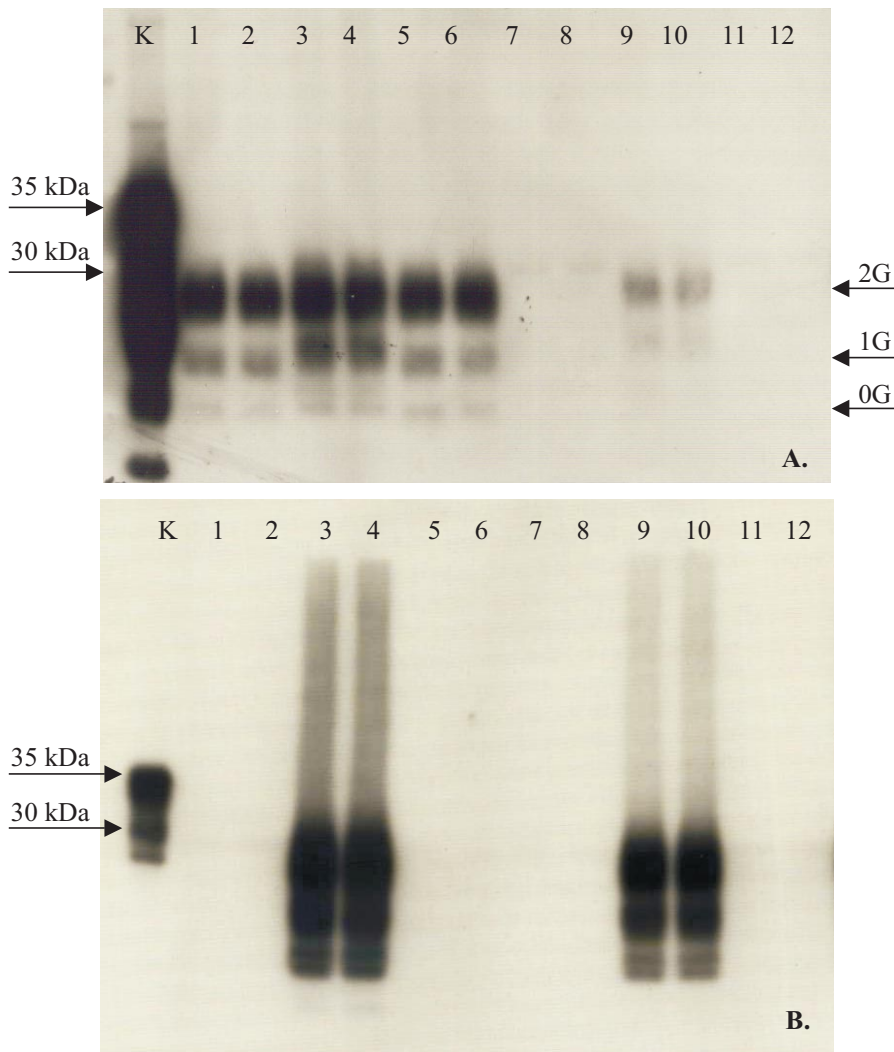
Wyniki i omówienie

W przypadku próbek BSE uzyskano dodatni sygnał reakcji wyłącznie z przeciwciałem 6H4 w postaci trzech prążków odpowiadających formom glikozylacji białka PrP^{res} (tzw. profil glikozylacji: forma dwuglikozylowana – 2G, jedno- – 1G i nieglikozylowana – 0G) (ryc. 1). Próbki dodatnie z przypadków trzęsawki owiec zareagowały dodatnio zarówno z przeciwciałem 6H4, jak i z przeciwciałem P4. W przypadku jednej z próbek zauważono znacznie słabszy sygnał reakcji z przeciwciałem 6H4, choć sygnał reakcji z mAb P4 dla obydwu próbek z przypadków trzęsawki był porównywalny. Nie stwierdzono reakcji w przypadku kontrolnych próbek ujemnych ani z mAb 6H4, ani z mAb P4. Poza uzyskaniem dodatniego sygnału reakcji dla próbek pochodzących z przypadków BSE bydła (z przeciwciałem 6H4) i trzęsawki owiec (zarówno przeciwciałem 6H4, jak i P4) stwierdzono także

różnice w migracji formy nieglikozylowanej (0G) białka PrP^{res} (ryc. 2). Forma „0G” z przypadków trzęsawki posiadała większą masę cząsteczkową w odniesieniu do analogicznej formy z przypadków BSE bydła, co widoczne było w postaci wyższej lokalizacji na membranie w odniesieniu do analogicznej formy z przypadków BSE bydła. Podobną prawidłowość zauważono także dla formy jednoglikozylowanej (1G) (ryc. 2). Jednocześnie porównanie zawartości procentowej formy dwu- i jednoglikozylowanej białka PrP^{res} dla BSE i trzęsawki pozwoliło także zróżnicować obydwie czynniki. Zawartość formy dwuglikozylowanej była wyższa w przypadku BSE w przeciwieństwie do formy jednoglikozylowanej, która wykazywała wyższą zawartość dla trzęsawki (ryc. 3). Różnica ta jest wyraźnie widoczna na wykresie punktowym, na którym oś X odpowiada procentowej zawartości formy dwuglikozylowanej, a oś Y odpowiada formie jednoglikozylowanej (ryc. 4).



Ryc. 2. Różnice w migracji formy jedno- (1G) i nieglikozylowanej (0G) białka PrP^{res} z przypadku BSE (linia 1, 2) oraz trzęsawki (linia 3, 4). Znakowanie przeciwciałem 6H4. Położenie form 1G oraz 0G zaznaczono kreskami



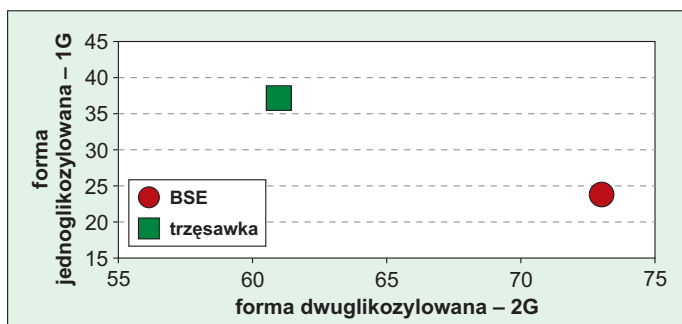
Ryc. 1. Wynik badania dwóch próbek BSE od bydła oraz dwóch próbek trzęsawki owiec metodą „VLA hybrydowy western-blot” (każda próbka zbadana w duplikacie)

Objaśnienia: A. reakcja z przeciwciałem 6H4; B. reakcja z przeciwciałem P4; K – kontrola testu – próbka białka PrPC nie poddana proteolizie; 1-2, 5-6 – dwie próbki BSE od bydła; 3-4, 9-10 – dwie próbki trzęsawki owiec; 7- 8, 11-12 – dwie próbki ujemne; 2G, 1G, 0G – forma dwu-, jedno- i nieglikozylowana białka PrP^{res}

Skala badań w kierunku trzęsawki owiec w ostatnich latach uległa znacznemu nasileniu w krajach członkowskich Unii Europejskiej (UE). Wiąże się to z możliwością transmisji gąbczastej encefalopatii bydła do małych przeżuwaczy w związku ze stosowaniem w ich żywieniu mączek mięsno-kostnych. Ze względu na odmienną patogenezę choroby u owiec w stosunku do bydła, o czym wspomniano we wstępie, ryzyko transmisji choroby do człowieka byłoby znaczne. Dlatego też pojawiła się potrzeba różnicowania dodatnich przypadków trzęsawki małych przeżuwaczy, aby odróżnić zachorowania owiec na typową trzęsawkę od procesu chorobowego wywołanego przez czynnik BSE, który mógł być obecny w mącz-



Ryc. 3. Różnice w zawartości procentowej formy dwu- (2G) i jednoglikozylowanej (1G) białka PrP^{res} z przypadku BSE oraz trzęsawki. Znakowanie przeciwciałem 6H4



Ryc. 4. Różnice w zawartości procentowej formy dwu- (2G) i jednoglikozylowanej (1G) białka PrP^{res} z przypadku BSE oraz trzęsawki w postaci wykresu punktowego (zależność zawartości formy 2G na osi X do zawartości formy 1G na osi Y). Znakowanie przeciwciałem 6H4

kach mięsno-kostnych stosowanych w żywieniu tych zwierząt. Opracowując metody różnicowania trzęsawki i BSE u owiec wykorzystano materiał od owiec zakażonych eksperymentalnie czynnikiem BSE. Analiza metodą immuno-blot formy PrP^{res} białka prionowego z użyciem przeciwciała P4 z przypadków BSE bydła, trzęsawki owiec oraz eksperymentalnego BSE u owiec wykazała, że reaktywność występuje w przypadku trzęsawki owiec oraz eksperymentalnego BSE u owiec. Oznaczało to, że epitop dla mAb P4 na białku PrP^{res} z przypadków BSE bydła w przeciwieństwie do trzęsawki i eksperymentalnego BSE owiec ulega zniszczeniu w wyniku trawienia z użyciem proteinazy K. W badaniach własnych zastosowano jedną z dopuszczonych aktualnie w krajach członkowskich UE technik różnicowania BSE i trzęsawki tzw. „VLA hybrydowy western-blot” (14). Uzyskane wyniki pozwoliły na jednoznaczne zakwalifikowanie próbek badanych jako zawierających czynnik wywołujący BSE lub trzęsawkę w oparciu o immunoreaktywność z przeciwciałem 6H4 lub P4 oraz na podstawie wielkości fragmentów nieglikozylowanych białka PrP^{res}. Dodatkowo, ocena procentowej zawartości form 2G oraz 1G pozwoliła na zróżnicowanie czynników BSE i trzęsawki.

Krajowe Laboratorium Referencyjne ds. TSEs Zwierząt w PIWet-PIB w Puławach, wraz z czterema laboratoriami z krajów członkowskich UE, uczestniczyło w lipcu 2005 r. w teście kompetencji zorganizowanym przez Wspólnotowe Laboratorium Referencyjne – VLA Weybridge, Wielka Brytania. Obejmował on ocenę zdolności poszczególnych laboratoriów wykrywa-

nia i różnicowania BSE od trzęsawki na podstawie badań różnicujących metodą immuno-blot. Po przedstawieniu uzyskanych wyników, Krajowe Laboratorium Referencyjne ds. TSEs Zwierząt w PIWet-PIB w Puławach uzyskało akceptację i zgodę Wspólnotowego Laboratorium Referencyjnego na prowadzenie badań różnicujących dodatnich przypadków trzęsawki owiec i kóz w Polsce.

Piśmiennictwo

1. Benestad S. L., Sarradin P., Thu B., Schonheit J., Tranulis M. A., Bratberg B.: Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.* 2003, 153, 202-208.
2. Buschmann A., Biacabe A. G., Ziegler U., Bencsik A., Madec J. Y., Erhardt G., Luhken G., Baron T., Groschup M. H.: Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J. Virol. Methods* 2004, 117, 27-36.
3. Butler D.: Doubts over ability to monitor risks of BSE spread to sheep. *Nature* 1998, 395, 6-7.
4. Collinge J., Sidle K. C. L., Meads J., Ironside J., Hill A. F.: Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of „new variant” CJD. *Nature* 1996, 383, 685-690.
5. Eloit M., Adjou K., Coullier 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., Sarradin P.: BSE agent signatures in a goat. *Vet. Rec.* 2005, 156, 523-524.
6. Foster J. D., Hope J., Fraser H.: Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet. Rec.* 1993, 133, 339-341.
7. Gretzschel A., Buschmann A., Eiden M., Zeigler U., Luhken G., Erhardt G., Groschup M. H.: Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *J. Vet. Med. B*, 2005, 52, 55-63.
8. Hill A. F., Sidle K. C. L., Joiner S., Keyes P., Martin T. C., Dawson M., Collinge J.: Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy. *Neurosci. Lett.* 1998, 255, 159-162.
9. Kuczius T., Haist I., Groschup M. H.: Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation. *J. Infect. Dis.* 1998, 178, 693-699.
10. Lezmi S., Martin S., Simon S., Comoy E., Bencsik A., Deslys J.-P., Grassi J., Jeffrey M., Baron T.: Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie cases and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheep by use of western blotting and immunohistochemical methods. *J. Virol.* 2004, 78, 3654-3662.
11. Nonno R. M., Eseposito E., Vaccari G., Conte M., Marcon S., Di Bari M., Ligios C., Di Guardo G., Agrimi U.: Molecular analysis of cases of Italian sheep scrapie and comparison with cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in sheep. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 4127-4133.
12. Orge L., Galo A., Machado C., Lima C., Ochoa C., Silva J., Ramos M., Simas J. P.: Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 3487-3491.
13. Parchi P., Capellari S., Chen S. G., Petersen R. B., Gambetti P., Kopp N., Brown P., Kitamoto T., Tateishi J., Giese A., Kretschmar H.: Typing prion isoforms. *Nature* 1997, 386, 232-233.
14. 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.
15. 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 Miroslaw P. Polak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: ppolak@piwet.pulawy.pl