



BSE – możliwości identyfikacji i profilaktyki

Ewa Słota, Małgorzata Natonek, Agata Żyga, Barbara Rejduch
Zakład Immuno- i Cytogenetyki Instytut Zootechniki, Balice k. Krakowa

BSE – identification and prophylactics

Summary

Prion diseases (for example: scrape of sheep, BSE, CJD of humans) are among the most notable central nervous system degenerative disorders caused by the accumulation of modified cellular protein. The conversion of PrP(C) (the normal cellular protein) into PrP(Sc) (the abnormal disease-causing isoform) involves a conformation change whereby the α -helical content diminishes and the amount of β sheet increases. PrP (Sc) is partially resistant to proteases, temperature, high and low pH. Because the incidence of prion diseases is due to several factors, various efforts need to be taken to reduce the scale and consequences of the disease. They include post-mortem and *in vivo* diagnosis and prophylactics, i.e. monitoring of animals and feed control.

Key words:

BSE, TSE, PrP(C), PrP(Sc), laboratory diagnosis.

1. Choroby z grupy encefalopatii gąbczastej – przyczyny i sposoby rozprzestrzeniania się

BSE (*Bovine Spongiform Encephalopathy*) należy do grupy chorób encefalopatii gąbczastej – TSE (*Transmissible Spongiform Encephalopathy*). Choroby te znane są od ponad dwóch wieków i występują u różnych gatunków zwierząt. Do najważniejszych z nich należą: scrapie (trzęsawka) występująca u owiec, którą po raz pierwszy opisano już ponad 200 lat temu) oraz choroba Creutzfeldta-Jakoba (CJD) atakująca ludzi i zdiagnozowana w latach dwudziestych ubiegłego wieku. Encefalopatie gąbczaste atakują centralny układ nerwowy i charakteryzują się długim cza-

Adres do korespondencji

Ewa Słota,
Zakład Immuno-
i Cytogenetyki,
Instytut Zootechniki,
32-083 Balice k. Krakowa.

biotechnologia

sem inkubacji (od momentu zarażenia do chwili wystąpienia pierwszych objawów może minąć nawet dwadzieścia lat), natomiast czas objawowy jest bardzo krótki (0,5-2 lat) i zawsze kończy się śmiercią.

Za encefalopatie gąbczaste odpowiedzialne są cząstki glikozylowego białka nie zawierające kwasów nukleinowych, które jednak mają zdolność namnażania się i zakażenia (1). Białka te zbudowane są z 231 aminokwasów i występują w błonach komórek nerwowych mózgu. Sekwencje aminokwasowe takiego białka są różne u różnych gatunków zwierząt (2). Dla białek tego rodzaju w 1992 r. Prusiner wprowadził nazwę prion (PrP – *proteinaceous infectious particle*). W badaniach przeprowadzanych w ostatnim dziesięcioleciu wykazano, że cząsteczki takiego białka występują u wszystkich ssaków, nie tylko tych chorych. Chociaż nazwa prion początkowo była utworzona z myślą o białku „zakaźnym” szybko przyjęła się również dla formy „zdrowej”. Dla rozróżnienia tych form przyjęto różne oznaczenia: (PrP(C)) dla formy normalnie występującej w zdrowym organizmie i PrP(Sc) dla formy zmienionej. Zarówno forma „zdrowa” jak i zmieniona jest kodowana przez ten sam gen zlokalizowany u różnych gatunków zwierząt na różnych chromosomach i tak u ludzi *locus* tego genu znajduje się na ramieniu p dwudziestego chromosomu, a w przypadku bydła na trzynastym chromosomie (3). Infekcyjność prionu spowodowana jest różnicami w konformacji czyli ułożeniu przestrzennym. Cząsteczki zdrowego białka występujące w komórkach mózgowych wszystkich ssaków mają trójwymiarowy spiralny kształt alfa-helisy, natomiast jego zakaźna postać przyjmuje płaską formę beta (4,5). Ta postać prionu wykazuje odporność na wysoką temperaturę i inne czynniki fizykochemiczne takie jak: promieniowanie radioaktywne, UV, formalina, wysokie lub niskie pH. Zmienione białko prionowe wytrzymuje wszystkie metody sterylizacji; jest niewrażliwe na enzymy proteolityczne oraz na temperaturę (do 120°C). Dopiero zastosowanie wyższej temperatury z jednoczesnym poddaniem ciśnieniu trzech atmosfer powoduje jego inaktywację. Całkowite unieczynnienie prionu uzyskuje się dopiero przy spaleniu zakażonego materiału (6).

Istnieje kilka dróg zakażenia chorobami z grupy TSE. Jednym z nich jest droga pokarmowa. W ten sposób rozprzestrzeniła się choroba kuru, występująca w Nowej Gwinei u plemienia Fore, gdzie miał miejsce rytualny kanibalizm polegający na spożywaniu mózgu zmarłych krewnych (6).

Inną możliwością zakażenia jest tzw. szlak jatrogenny czyli przypadkowe przenoszenie choroby na osoby zdrowe poprzez zabiegi terapeutyczno-lekarskie, wszelkiego rodzaju przeszczepy uzyskane od osób pozornie zdrowych lub zmarłych jeszcze przed wystąpieniem pierwszych objawów (6).

Możliwa jest również wrodzona skłonność do zmian konformacyjnych prionu będąca przyczyną „klasycznej” postaci CJD.

Choroba prionowa zaczyna się w momencie zetknięcia chorej cząsteczki prionowej z prawidłowym białkiem komórek nerwowych gospodarza, powodując w nim zmiany konformacji. Białko PrP(Sc) gromadząc się w komórce, powoduje jej autodestrukcję, przedostaje się do sąsiednich komórek, kolejno je zakażając, co powoduje

wzrost poziomu czynnika chorobotwórczego (1). Skumulowane białko PrP(Sc) można zaobserwować w mózgu chorych zwierząt jako charakterystyczne złogi amyloidu zwane pałeczkami prionowymi.

Choroby prionowe nie budziły do niedawna większych emocji. Dopiero pojawienie się nowego wariantu choroby Creutzfeldta-Jakoba (nvCJD) wzmożyło zainteresowanie badaniami nad chorobami z grupy TSE. Wszystkie objawy choroby i dotychczasowe badania wskazują na powiązania nvCJD z BSE, chociaż ciągle brak na to jednoznacznego dowodu.

2. Metody diagnozowania BSE

Zwiększająca się liczba przypadków chorób z grupy TSE powoduje konieczność opracowania skutecznych testów diagnostycznych. Test przyżyciowy powinien diagnozować chore zwierzęta przed wystąpieniem objawów klinicznych i pozwalać na odróżnienie zwierząt chorych od podejrzanych, wykazujących podobne objawy kliniczne (7). Dostarcza to niemałych trudności spowodowanych brakiem wyizolowanego czynnika zakaźnego, a także brakiem odpowiedzi immunologicznej ze strony gospodarza.

Obecnie jedyną skuteczną i pewną metodą diagnozowania BSE jest badanie pośmiertne. Obejmuje ono:

- badanie histopatologiczne mózgowia,
- badania mikroskopowe na obecność włókienek SAF (*scrapie associated fibrils*),
- wykrywanie patologicznej formy białka PrP(Sc) z użyciem metod immunoenzymatycznych (*westernblotting*, ELISA).

Prowadzone są również badania nad wykrywaniem markerów specyficznych dla BSE. Markery takie zostały rozpoznane w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w moczu jako związki wytwarzane w przebiegu zakażenia (7).

Brak szczepionek przeciw BSE i dostatecznie rozwiniętych metod diagnozowania żywych zwierząt wysuwa profilaktykę BSE na czołowe miejsce w walce z rozprzestrzenianiem się tej choroby. Wprowadzone przepisy sanitarno-epidemiologiczne Unii Europejskiej i Polski są w pełni uzasadnione, a ich egzekwowanie wymaga rozwinięcia rutynowej kontroli pasz, które są potencjalnym źródłem infekcji.

3. Analiza pasz w celu wykrywania dodatku mączki mięsno-kostnej

Obecnie nie ma jednoznacznie określonych technik laboratoryjnych analizy pasz w celu identyfikacji dodatku mączki mięsno-kostnej (MBM). Metody wykrywania dodatków zwierzęcych (w tym szczególnie bydłych) w paszach oparte są na analizie białek, DNA i fragmentów kości. Opracowując metodę analizy pasz należy wziąć pod uwagę proces produkcji mieszanek zwierzęcych i problemy z tym związane. Produk-

cja pasz obejmuje obróbkę termiczną (ok. 130°C). Wysoka temperatura prowadzi do zmian biochemicznych i strukturalnych związków, denaturuje białka, zmieniając ich pierwszo-, drugo- i trzeciorzędową strukturę. Ponadto wysoka temperatura i ciśnienie powodują rozerwanie wiązań kowalencyjnych i degradację białek do krótkich polipeptydów. Kolejna zmiana w strukturze białka obejmuje utlenianie grup tiolowych (-SH) i tworzenie wiązań dwusiarczkowych pomiędzy różnymi domenami tych samych polipeptydów. Końcowy proces oziębiania powoduje ponowne zwijanie białek i tworzenie nierozpuszczalnych agregatów. Podczas opisanych zmian temperaturowych białka mogą tworzyć również kompleksy z węglowodanami (1). W każdej technice opracowanej do analizy białek poddanej obróbce cieplnej powinno się wziąć pod uwagę opisane zmiany struktury białek.

Metody wykrywania materiału zwierzęcego w paszach, oparte na analizie białek, można podzielić na dwie grupy: immunologiczne i elektroforetyczne. Metody immunologiczne oparte są na wiązaniu przeciwciała ze specyficznym antygenem. Stanowią one bardzo czułą grupę metod wykrywających białka na poziomie ng/ml. Wiele z metod zostało rozwiniętych w celu identyfikowania gatunku, od którego pochodzi surowe mięso, jednak większość z nich nie może być użyta ze względu na zmiany białka jakie zachodzą pod wpływem wysokiej temperatury w procesie produkcji pasz. Do grupy metod immunologicznych rokujących pozytywnie na opracowanie skutecznej analizy paszy należy ELISA i *westernblotting*.

Powszechnym podejściem do analizy materiału zwierzęcego w paszy są badania na poziomie DNA. Identyfikując DNA zawarte w paszach trzeba uwzględnić zmiany jakie zachodzą podczas obróbki termicznej w procesie produkcji mieszanek zwierzęcych. Ogrzewanie wpływa denaturująco na strukturę DNA, powodując otwarcie wiązań wodorowych i rozerwanie podwójnej spirali DNA. Drugim efektem ogrzewania jest zniszczenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy nukleotydami i rozkład cząsteczki DNA na krótsze fragmenty.

Analizę DNA prowadzi się najczęściej z zastosowaniem technik hybrydyzacji DNA oraz amplifikacji z użyciem reakcji PCR (*polimerase chain reaction*).

Techniki hybrydyzacji wykorzystują komplementarność fragmentów pojedynczych nici DNA. Sonda (znakowana, pojedyncza nić DNA) rozpoznaje nawet niewielkie ilości poszukiwanej sekwencji. Sondy mogą być znakowane przy użyciu barwników fluorescencyjnych lub radioaktywnie. Stosuje się dwie podstawowe techniki hybrydyzacji DNA: jedna z użyciem enzymów restrykcyjnych (*fingerprinting*), druga z wykorzystaniem całego, nie pociętego DNA (*blotting*). DNA *fingerprinting* daje więcej informacji niż *blotting*. Nie ma jednak praktycznego zastosowania w analizie pasz, gdyż podczas ich obróbki powstają fragmenty DNA o różnych wielkościach co może prowadzić do błędnej interpretacji wyników.

Amplifikacja DNA opiera się na cyklicznym powielaniu badanej sekwencji z udziałem termostabilnej polimerazy DNA w obecności starterów, nukleotydów i jonów magnezu (8). Otrzymany DNA może być w dalszym ciągu analizowany i identyfikowany przez liczne techniki (np. elektroforezę w żelu, sekwencjonowanie, elektro-

forezę kapilarną, spektrometrię masową). W metodzie tej ocenia się wiele różnych sekwencji DNA, najczęściej pochodzenia mitochondrialnego, z uwagi na ich liczne występowanie w komórce w formie identycznych kopii. Innym powodem zastosowania mitochondrialnego DNA jest jego duża zmienność wśród kręgowców, pozwalająca na gatunkową identyfikację materiału bydlęcego (9). Do identyfikacji białek innych gatunków zwierząt w paszach stosuje się najczęściej sekwencję genu mitochondrialnego – cytochromu b kręgowców (cyt b) (10). Powielony fragment DNA poddaje się działaniu enzymów restrykcyjnych, endonukleaz, co pozwala na gatunkowe określenie pochodzenia badanego materiału. Za pomocą opisanej metody wykrywa się materiał pochodzenia zwierzęcego (ssaki i drób) na poziomie 1%.

Identyfikację materiału zwierzęcego w paszach można prowadzić również na poziomie analizy tkanki kostnej metodą mikroskopowego badania kości. W odróżnieniu od innych tkanek, materiał kostny nie zmienia się zasadniczo przez rozdrabnianie i termiczną obróbkę mieszanek paszowych. Analiza oparta jest na morfologicznej obserwacji struktury fragmentów kości w mikroskopie stereoskopowym i ocenie histologicznej struktury cząsteczek w mikroskopie optycznym. Obecność jam, zatok lub małych baniek powietrznych między płytkami, z których składa się kość, jest podstawą identyfikacji badanego materiału (1). Wynik badania w znacznej mierze zależy od doświadczenia osoby badającej próbkę, co niesie ze sobą ryzyko błędnego oznaczenia ze względu na subiektywność oceny osoby przeprowadzającej badanie. Metoda ta byłaby bardziej wiarygodna po rozwinięciu techniki barwienia tkanek kostnych w paszy.

4. Metoda identyfikacji dodatku bydlęcej MBM opracowana w Instytucie Zootechniki

Ze względu na coraz częstsze sygnały o pojawieniu się BSE w najbliższym sąsiedztwie Polski (Niemcy, Czechy, Słowacja) oraz wprowadzenie zakazu stosowania MBM w żywieniu zwierząt, w Instytucie Zootechniki w 2001 r. opracowano metodę identyfikacji bydlęcych mączek mięsnych i mięsno-kostnych według zmodyfikowanej procedury Tartaglii i wsp. (9). Opracowana metoda opiera się na powieleniu fragmentu mitochondrialnego DNA o wielkości 271 pz i pozwala na wykrycie dodatku MBM już na poziomie 0,125%. Określa orientacyjnie poziom domieszek zwierzęcych, nie jest jednak metodą ilościową. Opracowana procedura umożliwia przeprowadzenie badań w stosunkowo krótkim czasie, bowiem od rozpoczęcia izolacji DNA do uzyskania obrazu prążków na żelu upływa trzy dni. Koszt badania jednej próbki skalkulowano na sumę ok. 100 zł. W następnej kolejności podjęte zostaną prace nad identyfikacją dodatku mączki pochodzącej również od innych gatunków.

5. Podsumowanie

Niepokój związany z rozprzestrzenianiem się chorób prionowych jest w pełni uzasadniony. W tym przypadku sam człowiek stał się ogniwem łańcucha infekcji, przyczyniając się do zwiększenia dynamiki szerzenia się BSE. Ze względu na to, że nigdy nie ma jednej przyczyny występowania określonego zjawiska konieczne jest wielokierunkowe działanie zmierzające do zmniejszenia skali i skutków choroby. Ważne by objęło ono zarówno diagnostykę jak i szeroko pojętą profilaktykę, szczególnie zaś monitorowanie zwierząt i kontrolę pasz.

Literatura

1. Momcilovic D., Rasooly A., (2000), *J. Food Prot.*, 63(11), 1602-1609.
2. Żmudziński J. F., Polak M. P., (2001), *BSE – mity i fakty*. Materiały konferencyjne: Choroba szalonych krów, Balice.
3. Schlapäpfer J., Stahlberger-Saitbekova N., Küffer J., Dolf G., (2000), *J. Anim. Breed. Genet.*, 117, 211-216.
4. Aguzzi A., Wiessman C., (1997), *Nature*, 389, 795-798.
5. Prusiner S. B., (1997), *Science*, 278, 245-251.
6. Grzybowski G., (2001), *Przegląd Hodowlany*, 1, 1-6.
7. Polak M. P., Żmudziński J. F., (2000), *Medycyna Wet.*, 56(3), 143-148.
8. Wang R., Myers M. J., Campbell W., Cao W., Paine D., Cerniglia C. E., (2000), *Mol. Cell Probes*, 14, 1-5.
9. Tartaglia M., Saulle E., Pestalozza S., Morelli R., Antonucci G., Bataglia P.A., (1998), *J. Food Prot.*, 61(5), 513-518.
10. Meyer R., Höfelein C., Luthy J., Candrian U., (1995), *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 78, 1542-1551.