

Encefalopatia gąbczasta bydła (BSE) – etiopatogeneza, epidemiologia, realne zagrożenie i diagnostyka

**Antoni J. Furowicz, Jolanta Karakulska,
Danuta Czernomysy-Furowicz,
Anna Perużyńska**

AR w Szczecinie

Zakażenia prionowe u ludzi i zwierząt stanowią poważny problem epidemiologiczny i ekonomiczny. Pionierskie badania Gajduska [6, 7, 8], a następnie Prusiner [16, 17], stanowiły kamień milowy w rozwoju mikrobiologii, biologii molekularnej i patologii. Okazało się, iż cząsteczka białka, którą jest prion, bez pomocy klasycznego materiału genetycznego (DNA), jest w stanie wywołać szereg chorób zwierząt i człowieka, kończących się z reguły zejściem śmiertelnym. Pojawienie się BSE u bydła (1985 r.), a następnie w wyniku zakażeń naturalnych formy tej choroby u kota (FSE) i człowieka (vCJD), jest jeszcze jednym dowodem na pokonywanie przez priony barier gatunkowych.

Na temat BSE ukazało się ostatnio w języku polskim wiele cennych i kompletnych publikacji [3, 12, 13, 14, 15]. Dlatego też w tym artykule zostaną zaprezentowane tylko dane mniej znane oraz poruszone zagadnienia o charakterze kontrowersyjnym.

BSE szerzy się jak typowa choroba zakaźna

Ze względu na liczbę zachorowań bydła jest to do tej pory choroba „angielska”, choć liczba krajów, w których stwierdzono chorobę sukcesywnie wzrasta.

Na niebezpieczeństwo spożywania wołowiny pochodzącej od krów zakażonych prionami BSE zwrócił uwagę w 1987 roku – jako pierwszy – brytyjski mikrobiolog S. Dealer. Niestety rząd Wielkiej Brytanii, preferując slogan: „British beef is safe” (Brytyjska wołowina jest bezpieczna), nie wziął pod uwagę ostrzeżeń Dealera. Co więcej, odebrano mu wszystkie granty naukowe realizowane do tej pory. Nie traktowano też poważnie ostrzeżeń innych biologów, co doprowadziło w konsekwencji do rozprzestrzeniania się BSE nie tylko w kraju, w którym choroba pojawiła się u bydła po raz pierwszy, ale także poprzez eksport mięsa i mączek mięsno-kostnych, jako paszy z padłych krów (meat and bone meal), w kontynentalnych państwach europejskich. Do tej pory odnotowano 182 639 przypadków BSE w Europie, w tym 180 748 (98,9%) w Zjednoczonym Królestwie (Wielka Brytania, Irlandia Północna, wyspa Man, Jersey i Guernsey), 624 (0,34%) – w Irlandii, 522 (0,29%) – w Portugalii, 368 (0,20%) – w Szwajcarii, 271 (0,15%) – we Francji, 38 (0,013%) – w Hiszpanii, 22 (0,012%) – w Belgii, 12 (0,007%) – w Holandii. Pojedyncze zachoro-

wania była stwierdzono też we Włoszech, Luksemburgu, Danii i Liechtensteinie. Obecnie w Wielkiej Brytanii zgłaszanych jest co tydzień około 45 krów z podejrzeniem o BSE. Jest to jednak niewiele w porównaniu z zachorowaniami w szczytowym okresie epidemii, kiedy odnotowywano ponad 1000 przypadków tej choroby tygodniowo [15]. Chorowały głównie krowy mleczne (61,1% stad bydła). Warto podkreślić, iż w przeciwieństwie do Wielkiej Brytanii, w innych państwach europejskich od 1993 r. zachorowania bydła na BSE wykazują tendencje wzrostowe.

Zakażenia odzwierzęce – człowiek konsument ofiarą BSE

Czynnik etiologiczny nowej odmiany choroby Creutzfeldta-Jakoba człowieka (new variant of Creutzfeldt-Jakob Disease – vCJD), będący prionem (PrP^{CJDv}), zdecydowanie różni się od mikropatogenów, wyosobnionych z klasycznej choroby Creutzfeldta-Jakoba (encefalopatii człowieka). Prion ten natomiast wykazuje wysoki stopień podobieństwa z białkiem prionowym BSE (PrP^{BSE}), odpowiedzialnym za wywołanie encefalopatii gąbczastej bydła. Podobieństwa biologiczne oraz zbieżność czasu i miejsca wystąpienia obu chorób sugerują, że są one wywołane przez ten sam czynnik [5, 12, 14, 15].

Nowa odmiana choroby CJD została zdiagnozowana i opisana w Wielkiej Brytanii w 1996 roku. W okresie 14 miesięcy odnotowano zachorowania i śmierć 10 osób; do tej pory stwierdzono śmierć 85 pacjentów. Objawy kliniczne generalnie przypominały klasyczną formę tej choroby, jednak pod niektórymi względami bardzo się od niej różniły. Najważniejsze, to młody wiek chorych, z reguły poniżej 40 lat. Pierwszy chory – Stefan Churchill (1995) miał 19 lat; najmłodszy pacjent 12, a najstarszy 74 lata. Zwrócono też uwagę na wydłużony czas trwania choroby (od 10 do 24 miesięcy) oraz wagę zaburzeń psychicznych (agresja lub apatia, melancholia, nieuzasadniony strach, bezsenność) nad zaburzeniami neurologicznymi, takimi jak ataksja (zaburzenia równowagi, drżenie mięśni) oraz klasycznym otępieniem [5]. Przyjęto za wysoko prawdopodobne istnienie związku przyczynowego między zachorowaniem ludzi na tę chorobę a ekspozycją społeczeństwa na czynnik wywołujący gąbczastą encefalopatię u bydła [12, 14]. Według ekspertów, zakażenie PrP^{CJDv} może w najbliższych latach ujawnić się u 136 tys. mieszkańców W. Brytanii. Dotyczy to osób o zwiększonej genetycznie wrażliwości na zakażenie prionowe, które spożywały zakażoną wołowinę [18].

We Francji odnotowano do tej pory 3 śmiertelne przypadki vCJD u ludzi. Przyczyną było najprawdopodobniej spożycie produktów przygotowanych z wołowiny pochodzącej od bydła zakażonego BSE. Pierwszy zachorował Laurenc Duhamel, który zmarł 4 lutego 2000 roku. Do historii przeszło zdanie wypowiedziane przez inną ofiarę zakażenia – Arnauda Eboli do matki: „I’m sorry, Mum, but I’m going mad!” (Przepraszam, Mamo, ale zaczynam szaleć!), w momencie gdy uświadomił sobie, że jest chory na vCJD (The Agony of Arnaud, Die Zeit 49, 30, Nov. 2000).

W 1990 roku odnotowano w Wielkiej Brytanii pierwszy przypadek encefalopatii gąbczastej u kota (FSE), u którego mogło dojść w sposób naturalny do zakażenia prionem BSE. Do chwili obecnej stwierdzono 87 przypadków tej choroby u kotów w Wielkiej Brytanii, Norwegii oraz Liechtensteinie [15].

BSE doprowadziła do olbrzymich strat ekonomicznych w państwach UE, związanych z koniecznością wybijania chorých i podejrzaných o zachorowanie zwierząt oraz gwałtownym spadkiem spożycia wołowiny. Zachorowania wśród ludzi (vCJD) często są przyczyną hysterii; odnotowano sytuację określoną przez Stadlbauera [18], jako: „madness, and not only amongst cattle!” (szaleństwo, nie tylko wśród bydła!).

Czy priony są rzeczywiście bardzo zakaźne?

Wielokrotnie stwierdzano, że białka te prezentują bardzo znaczną zakaźność. Istnieje możliwość przeniesienia ich podczas zabiegów chirurgicznych oraz kosmetycznych (np. zakażenia jatrogenne prionem klasycznej choroby Creutzfeldta-Jakoba w wyniku przekuwania uszu oraz przegrody nosowej) lub manipulacji w trakcie badania mięsa w rzeźniach i zakładach przetwórczych (BSE). U krów minimalna dawka konieczna do wywołania encefalopatii, to ok. 0,1 g zakażonego mózgu, podanego *per os* [5].

Stwierdzono, że u bydła największa liczba cząsteczek prionu występuje w mózgu, rdzeniu kręgowym, w niektórych nerwach obwodowych, płynie mózgowo-rdzeniowym, tkance limfoidalnej przewodu pokarmowego, tj.: migdałkach podniebiennych, kosmkach Peyera, krezkowych węzłach chłonnych, wyrostku robaczkowym (człowiek) oraz w śledzionie [4, 5, 12]. Tak więc, najbardziej zakaźna jest tkanka nerwowa i limfatyczna, związana z układem odpornościowym.

Nowe dowody zakaźności prionów BSE dla człowieka

Odnotowano identyczność bydłowego prionu PrP^{BSE} oraz prionu „ludzkiego” PrP^{CJDv} w aspekcie glikolizacji białka. Stwierdzono mianowicie w cząsteczkach wymienionych prionów identyczne profile glikolizacji białka, tzn. taką samą liczbę reszt cukrowych w każdej cząsteczce [14].

U małp *Macacus rhesus* oraz u lemurów, po zakażeniu homogenatami tkanki mózgowej krów padłych na BSE, odnotowano *post mortem* zmiany histopatologiczne w mózgu typowe dla rozwijających się u ludzi w przebiegu vCJD. Przyżyciowo obserwowano u tych zwierząt szereg objawów neurologicznych [5, 12].

Dlaczego BSE jest chorobą śmiertelną?

Przyczyną są nieodwracalne zmiany powodujące zamieranie komórek centralnego układu nerwowego (neuronów), przede wszystkim w wyniku zwyrodnienia amyloidowego tkanki mózgowej [5]. W wyniku zmiany enzymów degradujących w sposób bardzo efektywny białko prekursorowe amyloidu (APP), takich jak alfa-sekretaza, na endosomalne lizosomalne proteazy (beta i gamma), nie będące w stanie zdegradować APP całkowicie, zostaje wytworzone białko amyloidowe, zbliżone do białka (AP) występującego w chorobie Alzheimerera, lub peptydy je wytwarzające. Wytrącają się one tworząc amyloid. Rozpoczyna się proces zwyrodnienia amyloidowego, prowadzący do śmierci komórek centralnego układu nerwowego. W wyniku precypitacji amyloidu powstają w mózgu charakterystyczne fibryle oraz tarczka (płytką) amyloidowa, uważane za pierwszy biodepozyt. Konsekwencją tego zwyrodnienia jest degeneracja wodniczka mózgu – powodująca powstanie struktur gąbczastych [1]. Z reguły równolegle rozpoczyna się synteza drugiego depozytu. Odnotowuje się gwałtowny wzrost w neuronach jonów Ca⁺⁺⁺, co prowadzi do aktywacji kinaz białkowych, fosforylujących białko *tau*, związane z mikrotubulami. Te ostatnie, w warunkach fizjologicz-

nych są odpowiedzialne za ortogradowy transport enzymów i białek (*via* akson), koniecznych do normalnego funkcjonowania komórki nerwowej. Z hiperufosforylowanych form białek *tau*, następuje synteza sparowanych helikalnych włókien, występujących w postaci splątków neurofibrilarnych, tworząc drugi depozyt. Trzeci depozyt powstaje w wyniku niektórych mechanizmów immunologicznych; tworzą go astrocyty i komórki mikrogleju, normalnie pełniące szereg funkcji obronnych w ośrodkowym układzie nerwowym. Nadmierne pobudzenie tych komórek w wyniku kostymulacji poprzez zaktwowane (prawdopodobnie przez białko prionu) limfocyty T (CD8), prowadzi do ich proliferacji oraz pobudza właściwości prezentacji antygeny. Niektóre z astrocytów mogą wykazywać działanie neurotoksyczne, syntezując cytokinę TNF α oraz tlenek azotu i rodniki tlenowe. Warto podkreślić, iż szereg wymienionych zmian w mózgu stwierdzali wcześniej Gajdusek i inni autorzy w mózgach ludzi zmarłych na klasyczną formę CJD i kuru. Odnotowano także podobne zaburzenia u ludzi zmarłych na chorobę Alzheimerera [6, 7, 8, 10].

Najbardziej prawdopodobny przebieg zakażenia u człowieka

Zakażenie następuje drogą pokarmową po spożyciu wołowiny (lub jej przetworów) zawierającej priony bydłęce (PrP^{BSE}). Dochodzi do inwazji prionów do tkanki limfoidalnej przewodu pokarmowego, głównie migdałków podniebiennych, kosmków Peyera, wyrostka robaczkowego, krezkowych węzłach chłonnych oraz śledziony. Następnym etapem jest akumulacja i powielanie cząsteczek prionu, przede wszystkim w migdałkach i śledzionie [12]. W testach przeprowadzanych na zwierzętach laboratoryjnych stwierdzono, iż wymieniona tkanka limfoidalna jest niezbędna do transportu prionów. U zwierząt pozbawionych eksperymentalnie, w wyniku immunosupresji, normalnie funkcjonującej tkanki limfoidalnej, akumulacja i transport prionów zostały zahamowane. Założono, że transport prionów z przewodu pokarmowego do mózgowia może się odbywać dwiema drogami – poprzez aksony (transport retrogradowy) nerwów obwodowych (głównie *nervus trigeminus*) lub naczyniami krwionośnymi [5]. Wydaje się, że pierwsza droga transportu jest bardziej prawdopodobna. Należy podkreślić, iż od momentu przedostania się prionów do przewodu pokarmowego do rozpoczęcia ich transportu do mózgu, mija wiele czasu. Odnotowano, że w wyniku zakażenia krwi, dopiero po 2-3 latach dochodzi do przedostania się zarazków do mózgu, a następnie do rdzenia kręgowego [18]. Stanowią one najbardziej zakażone regiony organizmu tych zwierząt. Trudno w tej chwili wytłumaczyć, dlaczego okres akumulacji prionów (nabywania właściwości inwazyjnych?) jest tak długi.

Ostatnim etapem zakażenia jest kontakt prionów bydłęcych z białkiem natywnym komórek nerwowych człowieka, zmiana konformacji stereochemicznej tego białka, „powstanie” prionów PrP^{CJDv}, które poprzez zwyrodnienie amyloidowe powodują ekstensywną śmierć komórek nerwowych [1].

Białko natywne – „prekursor” patogennego prionu?

Białko natywne (PrP^c) morfologicznie i czynnościowo związane jest z membraną komórki nerwowej. Odpowiedzialne jest m.in. za mechanizmy transportu membrany oraz odpowiednie „ułożenie” enzymów degradujących prekursorowe białko amyloidu (APP). Budowa PrP^c człowieka jest dobrze poznana. Łańcuch peptydowy składa się z 254 aminokwasów; jest ono

wyposażone w dwie cząsteczki oligocukrów w obrębie pętli utworzonej przy udziale mostka dwusiarczkowego [4]. Do reszty seryny zostaje przyłączona cząsteczka glikozylofosfotydyloinozytolu, służącego do zakotwiczenia PrP^C w błonie komórkowej, w której znajduje się dla tej cząsteczki specyficzny receptor. Bardzo zbliżoną do PrP^C budowę posiada chorobotwórczy prion; różni się jednak od niego opornością na proteazę i wysokie temperatury oraz szereg związków chemicznych [5].

Uważa się, iż w wyniku zakażenia dochodzi do kontaktu prionu z PrP^C. W wyniku tego spotkania białko natywne ulega stopniowemu przekształceniu w patologiczne białko prionu. W pierwszym rzędzie traci swoje właściwości transportowe, co manifestuje się m.in. tym, iż przestaje być syntetyzowana sekretaza degradująca APP, a jej funkcje przejmują lizosomalne proteazy, które jednak nie są w stanie całkowicie rozłożyć tego białka. Dochodzi do zwyrodnienia amyloidowego i śmierci komórek nerwowych [1, 4]. Sam proces przekształcenia PrP^C w patologiczny prion (np. PrP^{CJDv}) jest różnie interpretowany. Nie stwierdzono, mimo bardzo dokładnych badań, udziału w tym procesie informacji zakodowanej w DNA. Przyjmuje się najczęściej, iż w wyniku kontaktu z prionem PrP^C dochodzi do zmiany konformacji stereochemicznej tej drugiej cząsteczki, która nabiera właściwości chorobotwórczych. Powstają kolejno: przejściowy dimer (PrP^C+prion), dwie cząsteczki prionu tworzące homodimer (w wyniku konformacji PrP^C), dwie zakaźne cząsteczki prionu (w rezultacie rozpadu homodimeru).

Na rolę białka natywnego w powstawaniu zakażenia człowieka wywołanego przez priony BSE, wskazują rezultaty następującego doświadczenia. Homogenem tkanki mózgu, pochodzącej od krowy padłej na encefalopatię gąbczastą, zainfekowano grupę myszy laboratoryjnych. Były to myszy transgeniczne, u których na drodze manipulacji genetycznych uzyskano właściwości wytwarzania ludzkiego białka natywnego (PrP^C). Nie syntetyzowały one natomiast natywnego białka, specyficznego dla swojego gatunku. Odnotowano, iż po 602 dniach inkubacji padło 40% zakażonych myszy. Badając *post mortem* tkankę mózgową stwierdzono zmiany typowe dla encefalopatii gąbczastej [12]. Wyniki tego eksperymentu wyjaśniają dodatkowo, dlaczego pewne formy choroby Creutzfeldta-Jakoba (vCJD) mają charakter zakażeń odzwierzęcych.

W próbach terapii encefalopatii gąbczastej testuje się szereg preparatów stabilizujących białko natywne (PrP^C) badanego gatunku. Chodzi tutaj w pierwszym rzędzie o takie, które nie pozwalają na „przejście” tego białka (zmianę konformacji stereochemicznej), pod wpływem inwazyjnego prionu, w cząsteczkę patologiczną. Badania takie realizuje m.in. firma Glaxo Wellcome [5].

Diagnostyka – nowe elementy

W listopadzie 2000 roku The Permanent Veterinary Committee UE przyjął wstępny projekt Komisji Europejskiej, dotyczący wprowadzenia obligatoryjnego badania BSE we wszystkich krajach członkowskich UE, za pomocą szybkich testów diagnostycznych. Następnie, w grudniu 2000 roku, wydane zostało rozporządzenie wprowadzające w życie ten projekt z dniem 1 stycznia 2001, w celu gromadzenia danych epidemiologicznych. Ostatecznie, od 1 lipca 2001 roku obowiązują

nakaz badania w kierunku BSE bydła w wieku ponad 30 miesięcy, które padło lub zostało poddane ubojowi [9].

Ze względu na dosyć typowy syndrom kliniczny BSE, istotnym elementem rozpoznawczym jest dokładne badanie kliniczne krów wykazujących objawy neurologiczne (system bierny) [1, 2]. Ważną próbę stanowi badanie histologiczne, a zwłaszcza immunohistochemiczne wycinków mózgow padłych lub ubitych zwierząt. Na tzw. czynny system diagnostyczny składa się szereg testów immunologicznych, z których większość może być wykonywana jedynie *post mortem*, na próbkach tkanki mózgowej [2, 9].

Szybkie testy na BSE są dostępne już od 1998 roku. Komisja Europejska przeprowadziła ich ocenę w 1999 roku. Trzy spośród ocenianych testów uznane zostały za bardzo wiarygodne, a następnie zatwierdzone do użytku w krajach UE. Ich zastosowanie umożliwiło wykrycie epidemii BSE we Francji, a także pierwszego przypadku tej choroby w Niemczech i Hiszpanii. Testy te są jednak skuteczne jedynie w przypadku bydła w wieku ponad 30 miesięcy, które jest już wysoko zaraźliwe. Oznacza to, że nie można zidentyfikować zwierząt będących we wczesnym okresie choroby. Dodatkowo problem wiąże się zatem z interpretacją wyników, ponieważ nawet ujemny wynik testu nie daje pełnej gwarancji, że zwierzę nie jest zarażone [9].

Komisja Europejska prowadzi prace nad doskonaleniem testów na BSE i TSE (TSE – inne encefalopatie gąbczaste poza BSE [1, 2]), a szczególny nacisk kładzie na możliwość diagnozowania różnych typów TSE. Określa także wzorce referencyjne i przeprowadza standaryzację prób dla wszystkich laboratoriów UE, wykonujących badania BSE szybkimi testami. Ponadto ocenia techniczne wykonanie testów, zgodnie z normami UE [13]. Ocenie poddawanych jest 5 procedur testowych, czym kieruje the General Direction for Health and Consumer Protection wraz z Institute for Reference Materials and Measurement (IRRM) w Geel (Belgia). Jest to światowej sławy laboratorium, należące do Joint Research Unit przy Komisji Europejskiej, produkujące wysoko specjalistyczne próby referencyjne do wielu analiz.

Wszystkie zaakceptowane przez Komisję testy służą do rozpoznawania BSE *post mortem* i są opracowywane w następujących instytucjach [9]:

- Institute for Animal Science and Health ID-Lelystad (Holandia);
- Imperial College of Science Technology and Medicine (Wielka Brytania);
- Institute of Neurodegenerative Diseases, University of California at San Francisco (USA);
- PerkinElmer Life Sciences (Wielka Brytania);
- Prionics (Szwajcaria).

Spośród dostępnych testów należy wymienić przede wszystkim test produkcji szwajcarskiej – Prionics-Check, opracowany i opatentowany przez firmę Prionics. W teście tym, stwierdza się obecność fragmentu białka prionu opornego na proteinazę (PrP 27-30), przy zastosowaniu techniki Western-blot i przeciwciała monoklonalnego (Mo Ab 6H4). Detekcję przeprowadza się metodą chemiluminescencji. Łączny czas badania wynosi od 7 do 8 godzin. W Szwajcarii test ten jest stosowany do szybkiego potwierdzania lub wykluczania choroby u podejrzanych zwierząt, a także w poubojowych proce-

sach diagnostycznych – do rozpoznawania i eliminacji podklinicznych przypadków BSE u bydła oraz do monitorowania BSE i scrapie. Bada się nim wszystkie zwierzęta padłe i podane ubojowi z konieczności oraz wybrane losowo zdrowe krowy w wieku powyżej 2 lat przeznaczone na ubój (około 16 500 zwierząt rocznie) [9, 13]. W przypadku obecności białka prionowego w mózgowiu, uzyskany wynik potwierdza się badaniem immunohistochemicznym. Zaletą testu jest przede wszystkim krótki czas badania oraz możliwość zdiagnozowania znacznej liczby prób w krótkim czasie. W rezultacie wprowadzenia przez Szwajcarię w 1999 roku wymienionego testu, zwiększyła się wykrywalność BSE u testowanego bydła [13]. Jednakże Kübler [cyt. za 18] zwraca uwagę na konieczność ostrożnej interpretacji wyniku testu, zwłaszcza gdy jest on ujemny. Według tego autora test Prionics-Check jest dodatni na 6 miesięcy przed pojawieniem się pierwszych objawów klinicznych choroby, przy średnio pięcioletnim okresie jej inkubacji. U bydła ubijanego w wieku około 20 miesięcy, koncentracja prionów BSE w mózgu może być zbyt niska, aby je wykryć tym testem. Tak więc, negatywny wynik próby nie oznacza automatycznie, iż u badanego zwierzęcia nie występuje zakażenie BSE. Rezultat taki należy – według Küblera – przyjmować bardzo ostrożnie, interpretując wynik badania określeniem, iż priony w danej próbce są „niewykrywalne”. Wydaje się, że komentarz ten można odnieść do wszystkich testów wykonywanych *post mortem* [9, 13].

W innym teście – E.G.-G. Wallac Ltd, wykorzystuje się dwa przeciwciała monoklonalne (Mo Ab). Wykrywanie białka prionu realizuje się metodą fluorescencji pod wpływem lantanowców (DELFLIA). Badanie trwa około 24 godzin. W kolejnym teście – Enfer Scientific produkcji irlandzkiej, wykorzystuje się technikę immunoenzymatyczną (ELISA) oraz chemiluminescencję. Próba ta charakteryzuje się znaczną czułością, a czas badania wynosi do 24 godzin. W teście użyto poliklonalne przeciwciała dla cząsteczek prionów, produkowane przez brytyjską firmę Proteus [9, 13]. Jako pierwsze stosowane są przeciwciała poliklonalne dla PrP, następnie koniugat znakowany peroksydazą chrzanową oraz substancją chemiluminescencyjną wzmacniającą sygnał reakcji [13]. Test jest od paru lat stosowany w Irlandii do badania rdzeni kręgowych bydła poddanego ubojowi i przeznaczonego do celów konsumpcyjnych dla ludzi oraz do badania bydła pochodzącego ze stad chorych na BSE i poddanych ubojowi z nakazu władz irlandzkich [9].

Bardzo czuły test Platelia został przygotowany przez Bio-Rad Laboratories i the French Commissariat a l'Energie Atomique (CEA). Test ma charakter próby immunoenzymatycznej typu „sandwich”, w której biorą udział dwa przeciwciała monoklonalne. Aby zapewnić największą czułość i specyficzność, wykorzystuje się dwie techniki. Specjalne przygotowanie próby, metodą wynalezioną i opatentowaną przez CEA, polega na poddaniu jej działaniu proteiny K, w celu zniszczenia białka PrP i uaktywnienia białka PrP^{BSE}. Następnie wykonuje się dwustronny immunometryczny pomiar rozpuszczalnego i opornego na działanie proteaz białka PrP^{BSE} metodą DAS-ELISA [13]. W czerwcu 2000 roku Komisja Europejska oceniła ten test jako najszybszy i najczulszy [9].

Nowatorskie procedury testowe (z uwzględnieniem prób przyżyciowych). Nowe techniki testowe są stale rozwijane. Obecnie nadrzędnym celem przy opracowywaniu i dos-

konaleniu testów na BSE jest znalezienie procedur, które umożliwiłyby badanie żywych zwierząt, np. na podstawie testów krwi. Dadzą one możliwość monitorowania stanu zdrowia stad bydła oraz rejestrowania wczesnych objawów choroby.

Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica stara się o europejski patent na procedurę badania BSE we krwi żywych zwierząt, która jest aktualnie zatwierdzana i standaryzowana. Test został opracowany dzięki intensywnej współpracy BIV z licznymi partnerami, przy poparciu Federal Ministry of Research. Planowane jest wprowadzenie tego testu na rynek europejski w końcowych miesiącach tego roku [9].

Inna z kolei firma – ScheBo Biotech, we współpracy z University of Giessen, opracowała i opatentowała dwie nowe metody wykrywania BSE, na których oparty jest test Brainostic. Daje on możliwość producentom, hurtownikom i sprzedawcom detalicznym oraz instytucjom sprawującym nadzór nad badaniem żywności, oznaczania obecności pozostałości tkanki mózgowej czy rdzenia kręgowego bydła w produktach mięsnych. Można tym testem wykryć nawet śladowe ilości wymienionych elementów, bez względu na to, czy jest to tkanka pochodzenia bydłowego, czy wieprzowego. Test Brainostic jest immunochemiczną metodą do wykrywania specyficznych składników „podejrzanych tkanek”, wykorzystującą technikę Western-blot neuronospecyficznego enolazy – NSE oraz kwaśnych białek związanych z fibrylami – GFAP. Test ten uzyskał już oficjalny status w Szwajcarii i został dopuszczony do stosowania [9].

O ciekawym odkryciu, które można wykorzystać do celów diagnostycznych, donieśli naukowcy z University Hospital w Zurychu (Nature 408, 479-483, 2000). Zidentyfikowali oni plazminogen, pro-proteazę, jako białko wiążące PrP^{Sc} i zauważyli, że gdy konformacja PrP^{Sc} zostaje zniszczona przez 6M mocznik, wówczas wiązanie to zostaje rozerwane. Plazminogen może więc „rozróżniać” białko prionowe fizjologiczne od patologicznego [cyt. za 9].

Kolejną obiecującą metodą, opracowaną przez dr Mary-Jo Scherrer z Departamentu Rolnictwa USA i dotychczas wykorzystywaną do wykrywania scrapie u owiec, jest immunoelektroforeza kapilarna. Planowana jest adaptacja tej metody do przyżyciowego wykrywania BSE u bydła [9].

Znaki zapytania, wątpliwości

Gąbczasta encefalopatia bydła (BSE) pojawiła się w Wielkiej Brytanii w 1985 roku. Choroba szerzyła się masowo i miała charakter epizootii; w pierwszym jej okresie odnotowywano około 1000 nowych przypadków zachorowań tygodniowo. Sądzono, że pojawienie się BSE mogło być spowodowane wprowadzeniem na przełomie lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych (czas inkubacji od 2,5 do 8 lat; najczęściej 5 lat) znacznych zmian w procesie utylizacji padłych przeżuwaczy (owiec i bydła). Dotyczyły one obniżenia temperatury przetwarzania zwłok i zastąpienia chemicznych procesów ekstrakcji tłuszczu, przez wytlaczanie. Wśród utylizowanych zwierząt znajdowały się owce padłe w wyniku zakażenia prionem scrapie (owczej encefalopatii); później także krowy padłe na BSE [4]. Założono, że BSE może być następstwem karmienia krów mączkami kostno-mięsnymi pochodzącymi z wymienionych zwierząt, zawierającymi priony owcze (PrP^{Sc}) lub bydłowe (PrP^{BSE}) [1]. Mogło w ten sposób dojść do zaadaptowania mutantu prionu owczego do organizmu krowy. Sprawą nie

wyjaśnioną jednak do końca jest sam mechanizm pojawienia się pierwszego prionu BSE. Możliwe, iż nastąpiło to w wyniku spontanicznej mutacji, która jest jednak w przyrodzie rzadkim zjawiskiem. Nie wyklucza się udziału w tym procesie pewnych substancji o charakterze kofaktorów, które mogą brać udział w transformacji prionów. Wymienia się m.in. znajdujące się w paszy (często w niedopuszczalnej ilości) środki owadobójcze zawierające fosforany [18].

Wśród wielu badaczy wątpliwości budzi proteinowa struktura prionu (sialoproteina), w kontekście „replikacji” tej cząsteczki i innych mechanizmów, do których teoretycznie konieczna jest obecność klasycznego nośnika informacji – DNA. Do chwili obecnej, mimo bardzo intensywnych badań, nie udało się jednak stwierdzić obecności tego elementu [11]. Niemniej jednak powstało kilka teorii dotyczących „hipotezy” prionu. Cheserbro [cyt. za 11] zakłada możliwość występowania czynnika infekcyjnego (bardzo małego, niekompletnego wirusa), dla którego prion jest „genem wrażliwości na zakażenie”, kodującym receptor na powierzchni komórki. Natomiast według Kimberlina [10] ekspresja chorób wywoływanych przez priony wymaga dwóch mechanizmów, zakładając, że czynnikiem infekcyjnym jest niezidentyfikowany wirus (*wirio?*). Są to: mutacja genu wrażliwości w przypadku zakażeń rodzinnych oraz mutacja wirusa w przypadkach sporadycznych.

Niektórzy autorzy [cyt. za 11] uważają, że choroby wywoływane przez priony należy traktować jako „nowotwory białek”. Stwierdzono, iż wszystkie „nowotwory białek” charakteryzuje odkładanie w tkankach układu nerwowego patologicznych izoform białek (A β B w chorobie Alzheimera, α -synukleiny w chorobie Parkinsona). Dochodzi do tego w wyniku mutacji w genie kodującym prekursor tego białka w przypadkach rodzinnych lub posttranslacyjnych modyfikacji w przypadkach sporadycznych. Odkładające się białka nabywają dodatkowych funkcji, a sam proces akumulacji patologicznych protein prowadzi do śmierci neuronów w drodze apoptozy, a nie martwicy.

Co dalej z BSE?

W związku z tym, iż wiele elementów związanych z etiopatogenezą i epidemiologią tej choroby nie zostało do końca poznanych, trudno jest jednoznacznie przewidywać formy i częstotliwość jej występowania na naszym kontynencie. Według „czarnego scenariusza” vCJD może wystąpić w Wielkiej Brytanii u ponad 100 tysięcy mieszkańców, czego nie wyklucza szereg epidemiologów tego kraju. Byłby to prawdziwy kataklizm, który dodatkowo obciążałby sumienia niektórych członków rządu oraz ekspertów W. Brytanii. Aktualnie nie dysponuje się żadną formą szczepionki, która mogłaby skutecznie zapobiegać BSE. Nie ma też skutecznych leków, aczkolwiek trwają bardzo intensywne badania nad ich wyprodukowaniem.

Zasadnicze elementy profilaktyki wiążą się przede wszystkim z szybką i adekwatną diagnostyką BSE u bydła (również przyżyciowo). Konieczna jest także ekologiczna reorientacja rolnictwa w krajach UE; dotyczy to zarówno farmerów, jak i konsumentów [18]. Z trawożernego bydła uczyniono „kani-bali”, w rezultacie recyklingu, w którym „krowa zjada krowę”. Pogwałcono w ten sposób elementarne prawa natury. Ten system chowu zwierząt należy bezzwłocznie przerwać. Recykling w zakażeniach prionami ma swoją smutną historię.

Pierwszy opisał to zjawisko Gajdusek [6, 7], kiedy w wyniku ludożerstwa u mieszkańców szczepu Fóre pojawiły się groźne zakażenia prionowe, określone jako kuru. W przypadku encefalopatii norek (Transmissible mink encephalopathy – TME), brano pod uwagę możliwość zakażenia w rezultacie zjadania słabszych osobników przez zwierzęta z tego samego stada. Nie wyklucza się także zakażeń pokarmowych u dzikich przeżuwaczy (zwłaszcza jeleni), zjadających poronione płody i błony płodowe (Chronic wasting disease – CWD). Dotyczy to również owiec (scrapie).

Jednym z doraźnych sposobów zapewnienia „zdrowej” wołowiny na rynkach europejskich może być import tego mięsa z krajów wolnych od BSE. Krajem takim jest obecnie jeden z największych producentów wołowiny na świecie – Argentyna. Bydło, najczęściej ras mięsnych, praktycznie od urodzenia przebywa na specjalnie przygotowanym pastwisku; w jego żywieniu nie stosuje się dodatków paszowych w postaci mączek mięsno-kostnych, gdyż byłoby to nieopłacalne. W latach 1992-2000 przeprowadzono w Argentynie ogromną akcję, polegającą na badaniu mózgów zwierzęcych na obecność prionów bydłych (PrP^{BSE}) i owczych (PrP^{Sc}). Badaniom poddano 7510 mózgów zwierząt padłych lub ubitych [1, 2]. W kierunku BSE przebadano 5572 krowy, 21 lam, 75 jeleni, 63 norki i 34 koty domowe. Natomiast na obecność prionu PrP^{Sc} (scrapie) przetestowano 1580 mózgów owczych i 165 kozich. Należy podkreślić, iż 881 prób pochodziło od zwierząt padłych z objawami nerwowymi (808 krów, 28 kóz, 24 kóz, 21 owiec). Stosowano testy będące modyfikacją Western blot (CLV, R4) oraz testy immunohistologiczne. W żadnym przypadku nie uzyskano wyników świadczących o obecności prionów, w związku z czym uznano ten kraj za wolny od BSE i scrapie. Badania były realizowane we wszystkich prowincjach przez zespół specjalistów, liczący 200 osób (kierownik dr B. Carillo). Wiodącymi ośrodkami były: Centro Antirrábico de Resistencia-Chaco oraz Laboratio del INTA-Azul. Ponadto uczestniczyły w tym programie laboratoria INTA (Instytutu Rolniczego), SENASA oraz zespół badawczy z Akademia National de Agronomia y Veterinaria de Buenos Aires [1].

Obecnie argentyńską wołowinę sprowadza Holandia i na małą skalę Francja.

W Polsce do tej pory klinicznie i w wyniku bardzo wycinkowych badań laboratoryjnych prób mózgu ubitych zwierząt nie stwierdzono BSE. Kraj nasz jest jednak traktowany przez ekspertów Unii Europejskiej jako terytorium pewnego ryzyka. Prawdopodobnie jest to związane z krótkotrwałym importem mączek mięsno-kostnych z krajów UE, które mogły być przeznaczone na paszę dla bydła. Nie trzeba podkreślać, iż wystąpienie BSE w Polsce byłoby prawdziwą katastrofą, zarówno w kontekście epidemiologicznym, jak i ekonomicznym.

Literatura: 1. Blanco V.J.F., Weber L.E., Carillo B.J.: Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires) 81 (6), 460-462, 2000. 2. Carillo B.J., Blanco V.J.F., Weber L.E.: Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires) 80, 453-459, 1999. 3. Deptuła W., Pawlikowska M.: Medycyna Wet. 55, 117-711, 1999. 4. Furowicz A.J., Czernomysy-Furowicz D.: Przegląd Hodowlany 7, 3-7, 1996. 5. Furowicz A.J.: Encefalopatie gąbczaste zwierząt w kontekście zagrożenia dla człowieka. Mat. Naukowe I Symp. Farmaceutycznego, Pol. Dom Farm.-Farmacja, Szczecin 2001. 6. Gajdusek D.C.: Kuru in the New Guinea Highlands. Tropical Neurology. Red. J.D. Spilane, Oxford Press, New York 1973. 7. Gajdusek D.C.: Unconventional Viruses Causing Su-

bacute Spongiform Encephalopathies. Virology. Red. B.N. Fields et al., Raven Press, New York 1985. **8. Gajdusek D.C.:** Subacute Spongiform Viruses Encephalopathies Causes by Unconventional Viruses. Subviral Pathogenes of Plants and Animals, Viroids and Prions. Red. K. Maramorosch and McKelvey Jr., Academic Press, New York 1985. **9. Habermüller K.:** Life Sciences and Technology 5 (5), 20-22, 2001. **10. Kimberlin R.H.:** Unconventional „slow” viruses. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Red. M.T. Parker and L.H. Collier. Vol. 4 – Virology; London-Melbourne-Auck-

land 1990. **11. Liberski P.:** Postępy Mikrobiologii 37, 9-32, 1997. **12. Molenda J.:** Medycyna Wet. 56, 355-362, 2000. **13. Polak M.P., Żmudziński J.F.:** Medycyna Wet. 56, 211-213, 2000. **14. Polak M.P., Żmudziński J.F.:** Medycyna Wet. 57, 5-8, 2000. **15. Polak M.P., Żmudziński J.F.:** Medycyna Wet. 57, 228-232, 2001. **16. Prusiner S.B.:** Trends Biochim. Sci. 21, 482-490, 1996. **17. Prusiner S.B., Scott M.R.:** Ann. Rev. Gen. 31, 139, 1997. **18. Stadlbaures E.A.:** Life Sciences 5 (1), 18-19, 2001.

Najnowsze wyniki badań genetycznego tła wysokiej plenności owiec booroola

Małgorzata K. Charon, Elżbieta Martyniuk

SGGW

Rozwijające się dynamicznie badania genomów zwierząt gospodarskich służą przede wszystkim tworzeniu markerowych map genomowych. Informacje zawarte w tych mapach są wykorzystywane do identyfikacji genów determinujących cechy użytkowe zwierząt lub genów wpływających istotnie na ich fenotypową ekspresję. Pierwsza mapa genomu owcy, opracowana przez Crawford i wsp. [1] na podstawie wyników analizy segregacji 246 polimorficznych markerów genetycznych w trzech pokoleniach pełnego rodzeństwa, miała całkowitą długość równą 2070 cM. Kolejna mapa genomu owcy, skonstruowana została na podstawie segregacji 519 markerów genetycznych [3], a jej długość wynosi 3190 cM.

Do cech użytkowych owiec, które są obiektem najintensywniejszych poszukiwań genów o dużym efekcie należą cechy odporności na choroby i pasożyty, cechy umięśnienia, a przede wszystkim cechy reprodukcyjne. U owiec niektórych ras, wykazujących wysoką plenność, prowadzone są poszukiwania genów, które leżą u podłoża uwarunkowania genetycznego tej cechy. Pierwszym genem wysokiej plenności, którego istnienie wykazała analiza [2] segregacji, był autosomalny gen oznaczony symbolem FecB (Fecundity gene of Booroola).

Dalsze badania segregacji wysokiej plenności w dwunastu rodzinach referencyjnych australijskiego merynosa booroola, wykonane na 379 sztukach potomstwa płci żeńskiej, połączone z badaniami polimorfizmu loci markerowych DNA tych zwierząt oraz analizą homologii między chromosomami owcy, człowieka i bydła umożliwiły lokalizację genu FecB w chromosomie 6 i oszacowanie odległości niektórych loci markerowych od tego locus [8]. W cytowanych badaniach zastosowano nie tylko markery ze stosunkowo mało jeszcze wtedy po-

znanego genomu owcy (10 markerów mikrosatelitarnych, gen albuminy – ALB), ale także pochodzące od innych gatunków, np. z genomu bydła (10 sekwencji mikrosatelitarnych, gen α -S1-kazeiny – CSN1S1) oraz genomu człowieka (gen nasłórkowego czynnika wzrostu – EGF, gen α – receptora czynnika wzrostu pochodzącego z płytek krwi – PDGFRA oraz fosfoproteiny S1 – SPP1). Dzięki zastosowaniu metody hybrydyzacji komórek somatycznych i analizie klonów komórek hybrydowych pochodzących od owcy i chomika ustalono, że mikrosatelity OarAE101 i BM143 można zaliczyć do grupy loci syntenicznych, złożonej z genów: PDGFRA, SPP1 i EGF.

Kolejnym krokiem było zawężenie regionu poszukiwań locus FecB do odcinka chromosomu 6 między 6q23 a 6q21, który jest homologiczny do regionu 4q21-25 genomu człowieka [8]. Opracowany wówczas test identyfikacji obecności genu FecB w genotypie owiec na podstawie polimorfizmu trzech sekwencji mikrosatelitarnych OarAE101, OarHH55 i BM143 został szybko zweryfikowany. Zbyt duża odległość mikrosatelit OarHH55 i BM143 od poszukiwanego locus (około 20 cM) zmusiła badaczy do sięgnięcia po inny marker – BM1329, mikrosatelitę z genomu bydła [6]. Wkrótce do testu dodano trzeci marker, niestety jego sekwencję i lokalizację znali jedynie badacze z Nowej Zelandii z zespołu kierowanego przez Montgomery'ego. Było to jednocześnie sygnałem, że być może w niedługim czasie zostanie poznana dokładna lokalizacja locus FecB.

Wspomniany zespół badaczy nowozelandzkich przeprowadził wszechstronne badania, z wykorzystaniem różnych metod molekularnych, jak też laparoskopowej oceny stopnia owulacji, pomiarów morfometrycznych pecherzyków i oocytów oraz analiz segregacji cech (asocjacja loci markerowych z QTL). Badania wykonano na owcach homozygotycznych w locus FecB, a także na kilku pokoleniach mieszańców pochodzących z krzyżowania wstecznego (tryki FecBFecB x matki ++, następnie córki FecB+ x tryki ++) oraz owcach stanowiących grupę kontrolną, ++. Do badań włączono także owce należące do 6 innych ras, które nie mają genu FecB, jak również owce mieszańcowe (rasa lokalna x booroola) z Arabii Saudyjskiej, Holandii i USA. Wyniki tych kompleksowych badań i analiz zostały ostatnio opublikowane przez Wilson i wsp. [10].

Badaniami molekularnymi objęto region chromosomu 6 długości 20 cM, zidentyfikowany we wcześniejszych badaniach jako zawierający locus FecB. Analiza QTL, metodą Haley'a i wsp. [5], udoskonaloną dla analizy danych uzyskanych