

Мониторинг и диагностика прионных инфекций в Беларуси

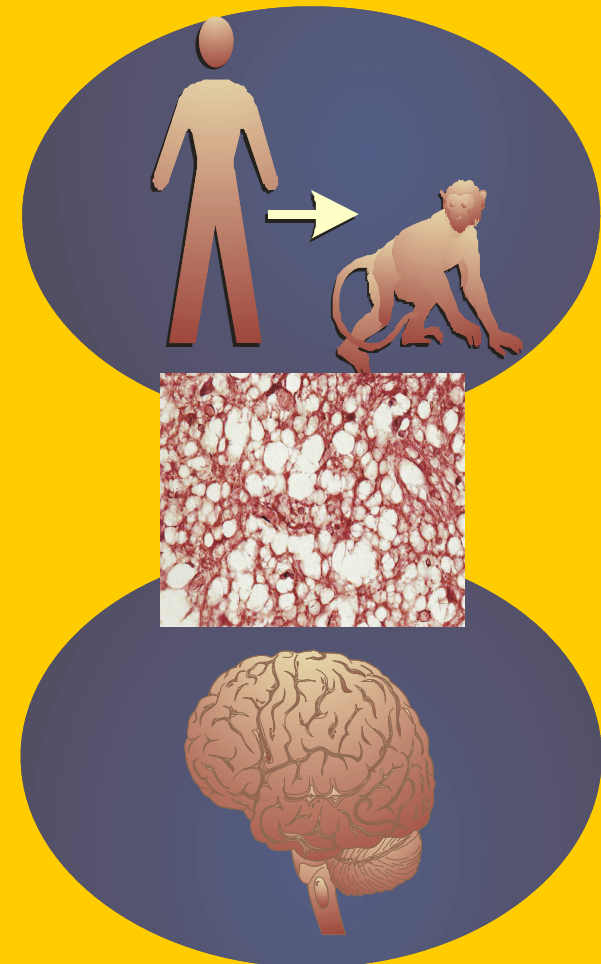
Николай Полещук

Заведующий отделом эпидемиологии и иммунопрофилактики
инфекционных заболеваний ГУ «НИИ эпидемиологии и
микробиологии» МЗ РБ

Иркутск
21-24 сентября 2009

Прионные болезни

- Связаны с накоплением в головном мозге *прионного белка* изменённой конформации (PrP^d).
- Трансмиссивность заболеваний доказана экспериментально путём заражения животных.
- Заболевания человека и животных, характеризующиеся длительным инкубационным периодом и необратимыми дегенеративными изменениями в центральной нервной системе, приводящими к фатальному исходу.

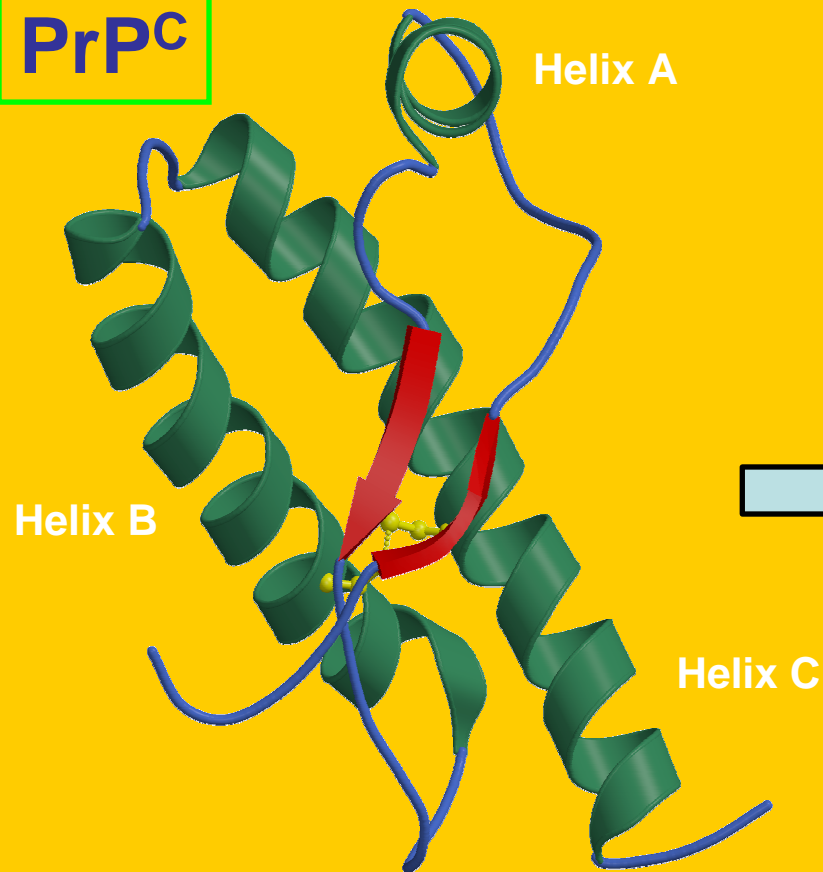


Инфекционный агент

- Прион (PrP^{d}) – новый класс инфекционных агентов, представляет собой аномальную протеазоустойчивую форму прионного белка, кодируемого клеткой хозяина (PrP^{c});
 - PrP – сиалогликопротеин, локализован на клеточной поверхности, наибольшая экспрессия белка выявлена в ЦНС;
 - PrP^{d} обнаруживается в разных тканях зараженных особей до проявления признаков клинического заболевания.
 - Результаты экспериментальных исследований указывают на прямую роль PrP^{d} в инициации и патогенезе прионных инфекций (гипотеза Прузинера «только белок»);
 - Серологических методов диагностики PrP^{d}
 - не существует;
-

Конформационные различия прионных белковых форм

PrP^C

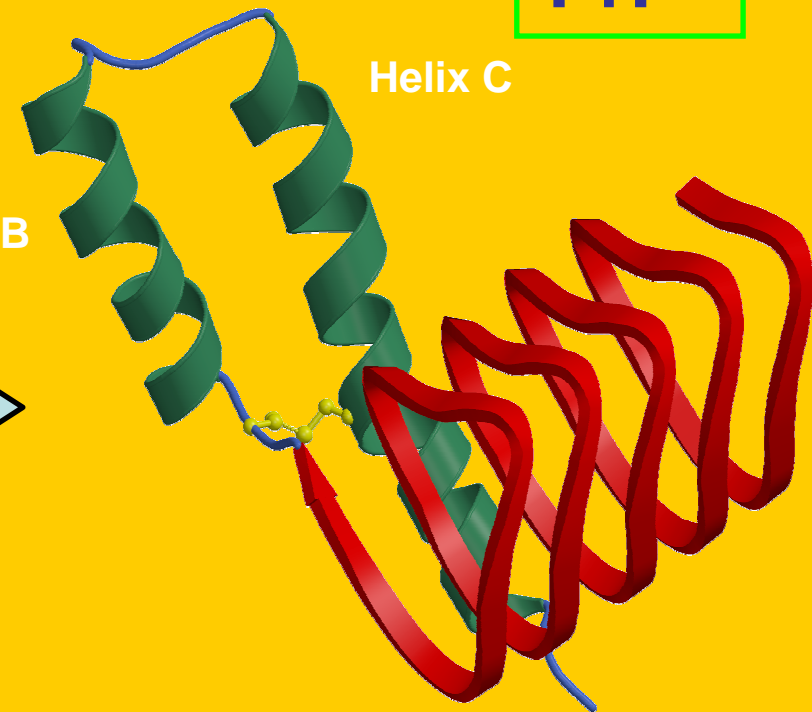


Нормальный прион
протеин

Helix B



PrP^D



Конформационно
изменённый
прион протеин

Прион протеин: свойства

	PrP ^C	PrP ^d
Молекулярный вес	33-35 кДа	33-35 кДа
Инфекционность	нет	да
Растворимость	да	нет
Протеолиз	да	нет
α -спирализация (%)	43	3
β -укладка (%)	20	34

PrP^d нечувствителен к обработке основными методами инактивирующими микроорганизмы и вирусы, имеет тенденцию к полимеризации и откладывается в ЦНС в виде амилоидных бляшек

Современная классификация



В Беларуси выявлена эндемичная прионная болезнь человека – амиотрофический лейкоспонгиоз

Актуальность проблемы прионных болезней для Беларуси

- **Продолжающееся распространение эпизоотии ГЭ КРС в ряде стран Западной Европы;**
 - **Возможный занос прионных заболеваний из этих стран в Беларусь;**
 - **Регистрация случаев прионных болезней среди населения и сельскохозяйственных животных;**
 - **Отсутствие реальных данных об эпидемической ситуации в Беларуси и странах СНГ.**
-

Санитарный контроль за прионными болезнями в Беларуси

- Прионные болезни включены в разряд социально-значимых заболеваний. При этом финансирование проблемы остается недостаточным.

Постановлением МСХиП РБ и МЗ РБ от 13 марта 2001 г. N 9/15 «Об утверждении нормативных правовых актов по борьбе с губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота» введены «Инструкция по мерам профилактики и борьбы с ГЭ КРС» и «Инструкция по диагностике ГЭ КРС».

- Эпизоотологический мониторинг прионных болезней у животных осуществляется РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского
- Эпидемиологический мониторинг за прионными болезнями у населения ограничен и недостаточен. Проводится в рамках фундаментальных исследований в ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии»

Уровень развития лабораторно-диагностической службы и научно-прикладных исследований служит гарантией возможности совершенствования системы контроля за прионными болезнями в Республике Беларусь

Направления деятельности по проблеме прионных болезней

- **Эталонные штаммы:**
 - возбудитель БКЯ, штамм БКЯ-ДВ, выделен от человека в 1990 г.;
 - возбудитель АЛ, штамм АЛ-Д, выделен от человека в 1989 г.;
 - возбудитель скрепи, штамм 263 К, получен от д-ра Deslys I.F. (Центр атомных исследований, Департамент нейропатологии, Франция).
 - **Фундаментальные исследования:**
 - моделирование инфекции в системе *in vitro* и *in vivo*;
 - изучение механизмов амилоидогенеза при прионных болезнях;
 - изучение механизмов прион-астроглиального взаимодействия в перевиваемых и первичных культурах астроцитов человека и животных);
 - изучение функциональной активности различных субтипов астроцитов и их участия в иммунологическом, компенсаторном и дегенеративном процессах при репродукции возбудителей прионных инфекций;
 - изучение участия апоптоза в поражении и гибели астроглиальных клеток *in vitro*, обусловленного прионами;
 - изучение конформационных превращений PrP^d скрепи, БКЯ и АЛ при различных условиях обработки *in vitro*.
 - **Научно-прикладные исследования:**
 - эпидемиологический мониторинг за прионными болезнями в РБ;
 - разработка средств и способов диагностики прионных болезней, в том числе прижизненной диагностики, с использованием нанотехнологических подходов;
 - разработка способов подавления инфекционного процесса *in vitro* и *in vivo*, вызванного прионами.
-

Прионные инфекции человека в Беларуси

Нозоформа	Клиническая картина
Болезнь Крейтцфельда-Якоба спорадические формы с 1984 по 2008 – 22 пациента	На первый план выступают когнитивные нарушения (интеллектуально-мнестическое снижение, дезориентация). Двигательные нарушения присоединяются позже. Длительность заболевания 1-4 года.

1. Полещук Н.Н., Рытик П.Г., Гузов С.А и др. Астроцитная глия в патогенезе болезни Крейтцфельда-Якоба // Архив патологии, 1990, т.52, №1, С. 31-36
2. Титов Л.П., Полещук Н.Н., Протас И.И и др. Прионные заболевания – болезнь Крейтцфельда-Якоба в Республике Беларусь // Медицина. – 2006. – №2. – С.19-22

Амиотрофический лейкоспонгиоз Регистрируется в Республике Беларусь с 1984 года: - семейно-наследственные (болезнь Миотча) – 12 пациентов, - спорадические (с 1985-2008 гг.) – 17 пациентов	Вялые парезы и параличи конечностей и мышц туловища. Все связи чувствительности сохранены. Развивается как в восходящем, так и в нисходящем направлениях. Больные погибают от расстройств дыхания спинального типа. Черепные нервы не страдают, даже при управляемом дыхании.
---	---

1. Капитулец С.П., Капитулец Н.Н., Полещук Н.Н Экспериментальное доказательство наличия аномального прионного белка PrP^{Sc} в аутопсийных образцах мозга людей, умерших от амиотрофического лейкоспонгиоза (2 новых случая) // Современные проблемы инфекционной патологии человека: Сб. науч. тр. Вып.1 / Государственное учреждение «НИИ эпидемиологии и микробиологии», Минск, Белпринт, 2008 – С.112-117
2. Протас И.И., Недзьведь М.К., Капитулец С.П. и др. Амиотрофический лейкоспонгиоз – прионная инфекция ЦНС (клинико-морфологические и экспериментальные доказательства прионной природы заболевания) // Медицинские новости – 2009. – №16

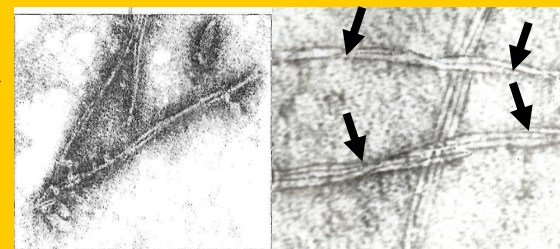
Заболевания ГЭ КРС и ВБКЯ не выявлены, что может объясняться низкой чувствительностью и эффективностью используемых методик

Лабораторная диагностика

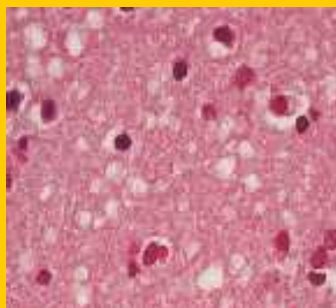
Биопроба
на животных



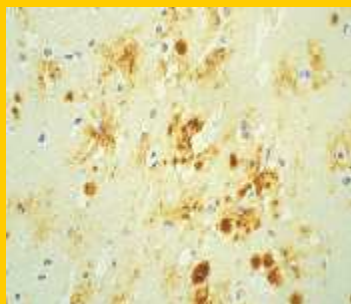
Электронная микроскопия
(негативное контрастирование)



Гистология



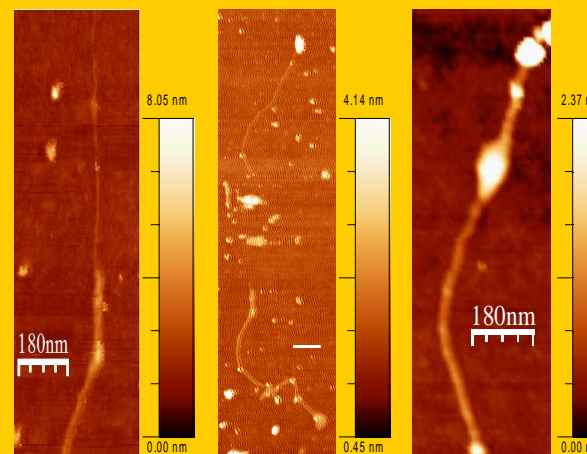
Иммуноцитохимия



Иммунный
блоттинг



Атомно-силовая микроскопия



Результаты научных исследований по проблеме прионных болезней (1)

- Разработан иммунологический метод посмертной диагностики прионных болезней человека путем постановки иммунного блоттинга.

В рамках ГНТП «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии» создана и проходит регистрацию в МЗ тест-система для выявления аномального протеазоустойчивого прионного белка PrP 27-30 в аутопсийных образцах мозга человека методом иммунного блоттинга «Прион-Блот».

Первичные моноклональные антитела:

- 6H4 (Prionics–Chek Western, Швейцария)
- 3F4 (коммерческие)
- SAF 70 (коммерческие)
- 2C8, 9C12, 6A5, 7F7 (пр-во НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН РФ)

CJD AL Sc

66 кДа
45 кДа
34 кДа
29 кДа
24 кДа



Результаты научных исследований по проблеме прионных болезней (2)

- Для сравнения использовали коммерческую тест-систему для выявления прионного белка у КРС (ГЭ КРС), овец и коз (скрепи) Prionics–Chek Western, Швейцария).

Показано, что тест-система «Прион-Блот» по диагностической чувствительности и специфичности не уступает коммерческой тест-системе «Prionics»: она позволяет выявлять PrP²⁷⁻³⁰ в аутопсийном материале головного мозга человека при верификации диагноза БКЯ и АЛ.

	Prionics	Прион-Блот
Моноклональные антитела	6H4	3F4
Конъюгат	Козлиные антитела против IgG мышей, меченные щелочной фосфатазой	Козлиные антитела против IgG мышей, меченные пероксидазой хрена
Субстрат	Люминисцирующий, CDP-star	Хромогенный, диаминобензидин

Результаты научных исследований по проблеме прионных болезней (3)

- Проведена комплексная оценка вероятности возникновения и заноса ГЭ КРС на территории Республики Беларусь, осуществлен научно-обоснованный анализ риска возникновения ГЭ КРС и дана оценка последствий при возникновении инфекций в стране. Риск возникновения инфекции в Беларуси оценивается как «высокий» и обусловлен завозом до 2000 года импортного скота и мясокостной муки до 2001 года из неблагополучных по прионным инфекциям стран.
 - Установлено, что при культивировании возбудителей прионных болезней в системе *in vivo* (сирийские хомяки) и *in vitro* (культура клеток) мишенями для прионов являются не только нейроны, но и астроциты и их гибель идет как по дистрофическому, так и по апоптозному механизму.
 - Методами иммуногистохимии и иммунного блоттинга исследованы 50 аутопсийных образцов мозга людей, умерших от нейродегенеративных заболеваний неустановленной этиологии, и 350 образцов мозга КРС старше 30 мес из группы риска на ГЭ КРС, с отрицательным результатом.
-

Результаты научных исследований по проблеме прионных болезней (4)

- Получены новые экспериментальные данные по изучению этиопатогенеза амиотрофического лейкоспонгиоза (АЛ).

Методами иммунного блоттинга, электронной и атомно-силовой микроскопии. доказано, что накопление патологического прионного белка (PrP^d) в мозговой ткани человека является критичным событием для развития заболевания. Полученные факты дополняют ранее известные данные по этиопатогенезу АЛ и свидетельствуют о правомочности утверждения, что заболевание имеет прионную природу и входит в группу трансмиссивных губкообразных энцефалопатий.

- Изучены двумерные АСМ-изображения конформации PrP^d амиотрофического лейкоспонгиоза на поверхности кремния при различных условиях обработки *in vitro*.
 - Разработаны экспериментальные подходы для доклинического выявления PrP^d в тканях и биологических жидкостях с использованием достижений протеомики и нанотехнологий.
-

Нерешенные проблемы

- **Отсутствие достаточного финансирования.**
В 2010 г. финансирование разработок по проблеме прионных болезней в республике не планируется;
 - **Обеспечение постоянного и ретроспективного контроля в ЛПУ** психиатрического и патологоанатомического профилей с предоставлением возможности использования статистического материала, историй болезни, патматериала от людей для проведения диагностических исследований;
 - **Отсутствие методической и практической литературы**, дифференцированно адаптированной для широкого использования медицинскими и ветеринарными работниками.
 - **Недостаток подготовленных квалифицированных научных кадров.** Исследования ограничены небольшой группой ученых, занимающихся фундаментальными исследованиями в области патогенеза БКЯ, АЛ, скрепи. Необходимо организовывать курсы повышения квалификации по изучению клинико-морфологических особенностей, правилам отбора материала и диагностики прионных инфекций;
 - **Отсутствие в достаточном объеме эффективных средств лабораторной диагностики** прионных болезней у людей, в связи с чем приходится разрабатывать собственные диагностические подходы и отечественные тест-системы;
-

Спасибо за внимание