

УДК 619

ВИБРАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЙ КОНВЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ В ДИАГНОСТИКЕ ПРИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

REAL-TIME QUAKING INDUCED CONVERSION (RT-QUILC) ASSAY OF PRION STRAINS

©Седошикина К. А.

Аграрно-Технологического Института Российского Университета Дружбы Народов,
г. Москва, Россия
sedoshkina@gmail.com

©Sedoshkina K.

Agrarian Technological Institute of the Russian Peoples' Friendship University,
Moscow, Russia
sedoshkina@gmail.com

©Рысцова Е. О.

канд. с-х. наук,
Аграрно-Технологический Институт Российской Университета Дружбы Народов,
г. Москва, Россия
ekaterina-ryscova@yandex.ru

©Rystcova E.

PhD,
Agrarian Technological Institute of the Russian Peoples Friendship University,
Moscow, Russia
ekaterina-ryscova@yandex.ru

Аннотация. Прионные заболевания наносят серьезный ущерб животноводству, вызывая гарантированный падеж скота в случае инфицирования. Поэтому исследование, диагностика и попытки найти лечение прионных болезней не теряет своей актуальности уже на протяжении более чем 70 лет. В статье рассматривается инновационный метод диагностики прионов на основе метода вибрационно-индуцированного анализа (RT-QuIC тест)

Abstract. In article described: general characteristic of prion and life time method of diagnostics. RT-QuIC is faster, higher throughput assay for prion seeding. Prions propagate as multiple strains in a wide variety of mammalian species. The detection of all such strains by a single ultrasensitive assay such as Real Time Quaking-induced Conversion (RT-QuIC) would facilitate prion disease diagnosis, surveillance and research.

Ключевые слова: прионы, прионные болезни, губчатая энцефалопатия.

Keywords: prion, prion strains, prion diseases, spongiform encephalopathy.

Сокращения: ГМ—головной мозг, СМЖ—спинно-мозговая жидкость. БКЯ—Болезнь Крейтцфельдта-Якоба.

Введение

Проблема прионных болезней животных родилась в рамках учения о медленных инфекциях в 1954 г. С тех пор актуальность исследования прионных заболеваний животных не снизилась, что обуславливается высокой опасностью падежа среди животных, что наносит ущерб сельскому хозяйству. Прионные болезни человека и животных крайне опасны и всегда приводят к летальному исходу, что может привести к трагическим экономическим последствиям для государства.

Прионы вызывают заболевания — трансмиссивные губчатые энцефалопатии (ТГЭ) у различных млекопитающих, в том числе губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота («коровье бешенство»), скрейпи у овец, болезнь Крейтцфельдта-Якоба у людей, а также хроническую изнуряющую болезнь оленей и лосей.

В организме животного происходят патоморфологические изменения, которые отличаются весьма существенным своеобразием: отсутствуют признаки воспаления, наряду с этим в центральной нервной системе развивается картина выраженного первично-дегенеративного процесса в головном, а часто и в спинном мозге. Изменения выражаются в картине гибели нейронов, в накоплении амилоидных бляшек и в выраженному глиозе [1, с. 381]. Диагностика данных заболеваний чрезвычайно затруднена в связи с длительным инкубационным периодом.

У имеющихся в настоящее время диагностических тестов отсутствуют такие важные характеристики как чувствительность, скорость и количественное определение белков. Прионные болезни могут развиваться в течение 10 лет и более, прежде чем симптомы заболевания проявятся. Поэтому более информативный тест может дать возможность раннего выявления, предотвращения инфицирования и лечения болезней [3, с. 286–295].

Основные положения:

Исходя из выше описанных свойств прионных заболеваний, можно утверждать, что их своевременная диагностика способна обнаружить развитие инфекционного процесса на ранних стадиях заболевания. Одним из перспективных методов прижизненной детекции прионов является метод вибрационно-индуцированного конверсионного анализа.

Этот метод впервые был описан группой ученых лаборатории NIAID под руководством доктора медицинских наук, профессора, руководителя Лаборатории Стойких Вирусных Заболеваний Байрона Когхэй (Byron Caughey) в 2014г (США, Монтана).

В основе эксперимента лежало то, что прионы способны находиться в организме млекопитающего не только в клетках ГМ, но также в слюне, грудном молоке, моче, отделяемом из носовой полости, СМЖ. Однако их концентрация настолько мала, что не позволяет их обнаружить.

Неспособность ранней диагностики ставит под угрозу процесс переливания крови, так как даже в незначительных количествах прионы могут индуцировать развитие инфекции в организме здорового реципиента [6].

Метод вибрационно-индуцированного конверсионного анализа позволяет обнаружить *in vitro* минимальную концентрацию белка, которая может спровоцировать инфекционный процесс. Что позволит диагностировать на ранних стадиях прионные заболевания животных и человека [5].

Так, к примеру, в Великобритании были зафиксированы ряд случаев заражения здоровых реципиентов от инфицированной прионами крови донора при гемотрансфузии, что пробудило интерес к разработке экспрессивной, неинвазивной, безболезненной диагностике [8, 9].

По данным Национального Центра Патологии Прионных Болезней (США) [2] общее количество случаев выявления прионных заболеваний представлено в Таблице 1.

Кроме того, в 2005 году в Великобритании были опубликованы результаты масштабного исследования по оценке числа лиц, которые могут быть инфицированы болезнью Крейтцфельда-Якоба. По всей Великобритании были отобраны гистологические образцы лимфоретикулярной ткани 16703 пациентов (14964 аппендэктомия, 1739 тонзилэктомия), примерно 60% из которых были из одной возрастной группы 20-29 лет. Двадцать пять процентов образцов были исключены из окончательных анализов, поскольку содержат недостаточное количество лимфоидной ткани. Три образца аппендицита показали накопление прионного белка в лимфоретикулярной ткани, давая по оценкам 237 случаев на миллион [4, С.733–739]. Эти результаты подчеркивают важность ранней диагностики прионных заболеваний, чтобы снизить риск их распространения через продукты питания, гемотрансфузию, хирургические манипуляции, а также подчеркивают необходимость приступить к масштабной проверке на наличие прионного белка всех доноров.

Таблица 1.
СТАТИСТИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ПРИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ВЕЛИКОБРИТАНИИ

Год	Зарегистрировано	Прионные заболевания	Сporадические
1996	57	36	31
1997	113	68	59
1998	89	53	45
1999	121	73	65
2000	144	101	89
2001	210	118	110
2002	242	144	125
2003	259	161	138
2004	313	179	161
2005	328	179	157
2006	369	182	162
2007	369	206	187
2008	387	223	207
2009	399	233	212
2010	403	247	218
2011	393	239	216
2012	409	241	218
2013	416	257	222
2014	357	211	188
2015	350	227	181
<i>ВСЕГО</i>	5728	3378	2991

Метод вибрационно-индуцированного конверсионного анализа позволяет обезопасить процедуру гемотрансфузии от передачи прионных инфекций.

В новом исследовании ученые из Монтаны поместили оптоволоконную сферу прямо в нос пациентов в самой верхней части полости, где находятся обонятельные нейроны. В теории, эти нейроны должны содержать более высокие уровни ненормальных прионных белков, потому что они непосредственно связаны с мозгом.

Суть метода сводится к тому, что биоматериал для исследования высевается на питательную среду и помещается в планшетный ридер, затем планшеты герметизируются и инкубируются в течение 20 часов с 60-секундными циклами вибрации и 60-секундными циклами спокойствия. В качестве маркера используется Тиофлафин, флуоресцентный краситель. Когда этот краситель добавляют к рекомбинантным белкам прионов, то он становится интегрированным в процессе полимеризации, что приводит к увеличению флуоресценции с течением времени. Путем повторяющихся циклов инкубации, ведущих к усилению аномальной деятельности PrPSc, возможна активация процессов трансформации нормальных белков, таким образом, экспериментально можно определить не только само наличие инфекционных приональных агентов, но и показать минимально инфекционные дозы, которые необходимы для индукции трансформации здоровых белков в прионные [5].

Результаты и выводы

Метод вибрационно-индуцированного конверсионного анализа выявляет позитивные образцы биоматериала в течение от 4 до 20 часов с лучшей аналитической чувствительность. Кроме того, анализ 11 БКЯ-пациентов показал, что если семеро были положительными при использовании предыдущих условий, то десять были положительными при использовании нового анализа. В этих и дальнейших анализах в общей сложности 46 из 48 биообразцов от спорадических БКЯ-больных были положительными, в то время как все 39 не больных БКЯ были отрицательными, что дает 95,8% для диагностической чувствительности и 100% для специфичности.

Итак, для выработки полной диагностической чувствительности нового метода требуется более высокое число больных. Но уже сейчас понятно, что это многообещающий способ выявления приональных заболеваний без инвазивных процедур.

Список литературы:

1. Зуев В. А. Независимое издание для практикующих врачей // Прионы-возбудители медленных инфекций человека и животных. 2010. №6. С.381.
2. Case Western Reserve University. Режим доступа:
<http://case.edu/med/pathology/centers/npdpsc/pdf/web-table.pdf>, (дата обращения 18.02.2016)
3. Diack AB, Head MW, McCutcheon S, Boyle A, Knight R, Ironside JW, Manson JC, Will RG//Variant CJD. Review. Prion. 2014. №8. С.286–295
4. Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L//Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. J Pathol. 2004. № 203. С.733–739.
5. Lacroux C, Comoy E, Moudjou M, Perret-Liaudet A, Lugan S, Litaisse C//Preclinical Detection of Variant CJD and BSE Prions in Blood. Режим доступа:
<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004202> (дата обращения 16.02.2016).
6. Mathiason CK//Silent Prions and Covert Prion Transmission. 2015.
7. Orrú CD, Groves BR, Raymond LD, Hughson AG, Nonno R, Zou W//Bank Vole Prion Protein As an Apparently Universal Substrate for RT-QuIC-Based Detection and Discrimination of Prion Strains. 2015. №11(6).
8. Orrú CD, Favale A, Corona C, Mazza M, Manca M//Detection and Discrimination of Classical and Atypical L-type Bovine Spongiform Encephalopathy by Real-Time Quaking-Induced Conversion. 2015. №53(4)

9. Vascellari S, Orru CD, Hughson AG, King D, Barron R//Prion seeding activities of mouse scrapie strains with divergent PrPSc protease sensitivities and amyloid plaque content using RT-QuIC and eQuIC. 2012.

References:

1. Zuev V. A. Nezavisimoe izdanie dlja praktikujushhih vrachej // Priony-vozbuditeli medlennyh infekcij cheloveka i zhivotnyh. 2010. №6 P.381.
2. Case Western Reserve University. Rezhim dostupa:
<http://case.edu/med/pathology/centers/npppsc/pdf/web-table.pdf>, (data obrashhenija 18.02.2016)
3. Diack AB, Head MW, McCutcheon S, Boyle A, Knight R, Ironside JW, Manson JC, Will RG//Variant CJD. Review. Prion. 2014. №8. P.286–295
4. Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L//Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. J Pathol. 2004. № 203. P.733–739.
5. Lacroix C, Comoy E, Moudjou M, Perret-Liaudet A, Lugan S, Litaise C//Preclinical Detection of Variant CJD and BSE Prions in Blood. Rezhim dostupa:
<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004202> (data obrashhenija 16.02.2016).
6. Mathiason CK//Silent Prions and Covert Prion Transmission. 2015.
7. Orrú CD, Groves BR, Raymond LD, Hughson AG, Nonno R, Zou W//Bank Vole Prion Protein As an Apparently Universal Substrate for RT-QuIC-Based Detection and Discrimination of Prion Strains. 2015. №11(6).
8. Orru CD, Favole A, Corona C, Mazza M, Manca M//Detection and Discrimination of Classical and Atypical L-type Bovine Spongiform Encephalopathy by Real-Time Quaking-Induced Conversion. 2015. №53(4)
9. Vascellari S, Orru CD, Hughson AG, King D, Barron R//Prion seeding activities of mouse scrapie strains with divergent PrPSc protease sensitivities and amyloid plaque content using RT-QuIC and eQuIC. 2012.

Работа поступила в редакцию
26.02.2016 г.

Принята к публикации
29.02.2016 г.