

Приони: същност, заболявания, обеззаразяване

Св. Йорданова*, К. Тончева

Национален център по заразни и паразитни болести – София

Keywords:

prions, infection, disinfection and sterilization

Ключови думи:

приони, инфекция, обеззаразяване (гезинфекция и стерилизация)

PRIONS: CHARACTERISTICS, DISEASES, DECONTAMINATION

S. Yordanova, K. Toncheva

National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

Summary. The purpose of this article is to review the current information on pathogenic prions, the diseases they cause and effective disinfection and sterilization procedures.

Infectious prion proteins (PrP^{sc}) are produced by abnormal folding of the widely distributed normal prion proteins (PrP^c). PrP^{sc} and PrP^c have the same amino acid sequence (primary structure) but different secondary structure. PrP^{sc} cause diseases called transmissible spongiform encephalopathies (TSE) – neurodegenerative diseases which affect not only humans, but also a wide range of animals. The TSE are not transmitted from person to person, but theoretically this can occur during the practice of invasive medical procedures. Infectious prion proteins are unusually resistant to conventional chemical and physical decontamination methods.

Характеристика на прионите като инфекциозни агенти

Прионите са белтъчни инфекциозни частици с размери 20–30 nm, които не съдържат нуклеинови киселини (РНК или ДНК). Тези необикновени инфекциозни агенти са видоизменени форми на широко разпространените нормални прион протеини.

Човешките прион протеини се кодират само от един ген, намиращ се в късото рамо на хромозома XX [12]. Продуктът от матричната РНК е гликопротеин, изграден от 253 аминокиселини. В N-края на протеина се разполага последователност от 8 аминокиселини, която е повторена пет пъти. Този участък има висок афинитет към медните йони, следователно прион протеините (PrP) биха могли

да играят роля в транспорта или метаболизма им. Изследванията през последните години показват, че в ранните етапи на прионните заболявания се наблюдава дисбаланс на мед в организма [17].

PrP-генът постоянно се експресира в мозъка и в други тъкани на здрави животни и хора [2]. Най-голямо количество на PrP се регистрира в ЦНС, по-точно в невроните. В значителна степен протеинът се експресира и в клетките на имунната система [19]. Прионите се реплицират първо в лимфните възли, слезката и тимуса и след това в мозъка. Тези нормални протеини се наричат клетъчни PrP (PrP^c).

Инфекциозните, патологично изменени, изоформи на тези протеини се наричат scrapie-свързани прион протеини (PrP^{sc}).

* E-mail: disinfection@abv.bg

PrP^c и PrP^{sc} имат идентична аминокиселинна последователност (първична структура), но различна вторична структура [13]. Съществена разлика между нормалните и патологичните PrP се наблюдава в техните биофизични характеристики. PrP^c са разтворими и напълно се разрушават при крайния етап на храносмилането, при въздействие с протеази (протеаза-чувствителни). PrP^{sc} се продуцират, когато нормалните прион протеини, при които преобладават α -хеликазните структури, претърпят конформационни промени. Те могат да настъпят спонтанно или чрез мутация, вследствие на което PrP^{sc} придобиват β -листовидна структура [2, 5, 11, 16].

Инфекциозните приони са неразтворими форми, устойчиви на протеолизата (протеаза-резистентни) в гастроинтестиналния тракт и поради това цял, неразрушен PrP може да достигне до чревната лигавица. Ахон изказва предположение, че при абсорбцията му може да се предизвика заболяване [3].

Заболявания

Инфекциозните приони причиняват заболявания, наречени трансмисивни спонгиозни енцефалопатии (TSE). Това са редки, бързо прогресиращи дегенеративни мозъчни заболявания с летален изход, от които боледуват хора и някои видове животни. Микроскопски се характеризират с вакуоли и отлагане на амилоиден протеин (прион протеин) в същото вещество на мозъка. Тези заболявания са изключително редки при хората, не се предават от човек на човек, но заразяване може да се осъществи чрез инвазивни медицински процедури [20].

Заболяванията се характеризират с дълъг инкубационен период (от 1,5 до 30 години) и хронично протичане без ремисия. Няма доказано лечение или профилактика. Наблюдава се загуба на двигателния контрол, парализа, демения и смърт, обикновено настъпваща след пневмония. TSE при хората включва: болестта на Creutzfeldt-Jakob (CJD), вариант на болестта на Creutzfeldt-Jakob (v CJD), Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome (GSS), Fatal familial insomnia (FFI) и Kuru [20]. Болестта на Creutzfeldt-Jakob бива: спорадична (приблизително 85% от случаите), фамилна (приблизително 15%) и придобита (по-малко от 1%). През 1996 г. в Англия и Франция за пръв път е регистриран вариант на болестта на

Creutzfeldt-Jakob (v CJD) [1]. Той се характеризира с това, че засяга значително по-млади хора, протича по-продължително, налице са ранни психиатрични прояви (депресия, апатия, изолация и делириум), болезнени сензорни симптоми, забавена проява на ясни неврологични симптоми и отсъствие на електроенцефалографски промени [1].

Досега са описани следните механизми на предаване на TSE: при използване на дълбоки мозъчни електроди и контаминирани неврохирургични инструменти, трансплантация на корнеа или dura mater и чрез човешки растежен хормон и гонадотропен хормон от трупни хипофизи [4].

Според степента на инфектираност, тъканите се делят на три групи [20]:

- Висока инфектираност – главен мозък, гръбначен мозък и очи
- Средна инфектираност – ликвор, бъбреци, бял гроб, черен гроб, галак, плацентата, лимфни възли
- Ниска или неустановена инфектираност – кръв, съединителна тъкан, сърдечен мускул, надбъбречна жлеза, венци, периферни нерви, черва, простата, скелетна мускулатура, щитовидна жлеза, тестиси, носен секрет, слюнка, сълзи, пот, серозен ексудат, сперма, урина, фецес, мляко

В таблица 1 са представени някои основни характеристики на заболяванията, причинени от приони при хора и животни [21].

Класическата форма на болестта на Creutzfeldt-Jakob се среща рядко – на милион население приблизително един случай за година. Най-често засегнати са хората от възрастовата група от 60 до 69 години. Семейната форма на CJD се наблюдава приблизително десет пъти по-рядко от спорадичната [1].

При анализа на данните за случаите от CJD се констатира, че единственият логичен рисков фактор е фамилната обремененост. Не се наблюдава статистически значимо повишение на риска при лечение с кръв, кръвни и плазмени продукти [1].

До 1 декември 1999 година са регистрирани 45 случая на заболяване от vCJD в Англия и един случай във Франция. Повечето заболявания са под 40 години, а няколко от пациентите са в юношеска възраст [1].

Според Solassol и др. [15] първият „пик“ на епидемията от vCJD е достигнат през 2003 година – до 6 октомври 2003 г. са описани 143 случая.

Табл. 1. Прионни болести

Заболяване (абрeвиатура)	Естествен гостопроемник	Патогенни прион протеини (PrP ^{Sc})	Начин на предаване
1	2	3	4
При животните			
Scrapie Скрепи	Овце и кози	OvPrP ^{Sc}	Чрез плацентата или околоплодни води на болно животно
Transmissible mink encephalopathy (TME) Енцефалопатия по норките	Норки	MkPrP ^{Sc}	Чрез заразена храна
Chronic wasting disease (CWD) Атрофична болест на елените	Мулета, елени и лосове	MdePrP ^{Sc}	Неясен
Bovine spongiform encephalopathy (BSE)	Егър розгат добитък	BoPrP ^{Sc}	Чрез заразена храна
Feline spongiform encephalopathy (FSE)	котки	FePrP ^{Sc}	Чрез заразена храна
Exotic ungulate encephalopathy (EUE)	ниала и кугу антилопи	UngPrP ^{Sc}	Чрез заразена храна
При хората			
Kuru Куру	човек	HuPrP ^{Sc}	Канибализъм
Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) Болест на Кройцфелд–Якоб	човек	HuPrP ^{Sc}	– При спорадични форми – спонтанна PrP ^c до PrP ^{Sc} конверсия или соматична мутация – При фамилни форми – мутация в PrP гена – При придобити форми – инфекция чрез прион- съдържащи материали (напр. dura mater, електрогу).
Вариант на болестта на Creutzfeldt–Jakob (vCJD)	човек	HuPrP ^{Sc}	Инфекция чрез животински продукти, съдържащи вируса на BSE
Gerstmann–Straussler– Scheinker syndrome (GSS) Синдром на Герстман– Щройслер–Шайнкер	човек	HuPrP ^{Sc}	Мутация в PrP гена
Fatal familial insomnia (FFI) Фатално фамилно безсъние	човек	HuPrP ^{Sc}	D178N мутация в PrP гена с M129 полиморфизъм

Обеззаразяване на епидемиологично значими обекти

Причинителите на TSE са необичайно устойчиви на повечето физични и химични методи за дезинфекция и стерилизация, използвани в обеззаразяването. В таблица 2 са представени най-често използваните химични дезинфектанти и физични методи, които са се оказали неефективни или частично ефективни при въздействие върху контаминирани материали [20].

Природата и физическото състояние на инфектираните тъкани влияе силно върху ефективността на посочените методи. Например инфектираността се стабилизира в значителна степен чрез изсушаване или фиксиране с алкохол, формалин или глутаров алдехид. Следователно, заразните материали не трябва да се излагат на въздействието на фиксиращи реагенти, а трябва да останат влажни след употреба чрез на кисване в дезинфектанти [6, 20].

Медицински инструментариум

Водещи фактори при определяне на начина на обеззаразяване са:

- Нивото на инфектираност на тъканите, които контаминират инструментите
- Как и къде ще бъде използван инструментариума след обеззаразяване

Най-строги са изискванията за инструментите, които са били в контакт с тъкани с високо ниво на инфектираност (главен мозък, гръбначен мозък и очи). В този случай се препоръчва инструментите да бъдат за еднократна употреба. Хирургичните инструменти, които се използват многократно, следва да бъдат почистени механично преди подлагане на обеззаразяване [18, 20]. По този начин се намалява белтъчното натопарване от органичната материя. Използваните почистващи препарати трябва да се третират като инфекциозни отпадъци.

СЗО и отделни автори предлагат различни методи за обеззаразяване:

Изгаряне – най-сигурният метод за обеззаразяване на инструменти и групи материали е изгарянето им в инсинераторни пещи [20].

– Прилага се за всички пособия за еднократна употреба (инструменти, материали) и отпадъци.

– Препоръчителен метод за всички инстру-

Табл. 2. Неефективни или недостатъчно ефективни дезинфектанти и физични методи

Течни химични	Газообразни	Физични методи
<i>Неефективни</i>	<i>Неефективни</i>	<i>Неефективни</i>
Алкохол Амоняк β-пропиолактон Формалин Солна киселина Водороден прекис Пероцетна киселина Феноли Na додецил сулфат (5%)	Етилен оксид Формалдехид	Изваряване Суха топлина (<300 °C) Ионизираща, UV или микровълнова радиация
<i>Променливо или частично ефективни</i>		<i>Променливо или частично ефективни</i>
Хлорен диоксид Глутаралдехид Гуанидин тиоцианат (4M) Йодофори Na дихлоризоцианурат Na метапериодат Урея (6M)		Автоклавиране на 121 °C за 15 min. Изваряване в 3% Na додецил сулфат

менти, изложени на контакт с тъкани с висока инфекциозност.

Автоклавиране, комбинирано с химични методи за обработка на термоустойчиви инструменти за многократна употреба [20]

– Накисване в натриев хидроксид (NaOH) и стерилизация в автоклав с устройство за изгонване на въздуха на 121 °C за 30 min; почистване и рутинна стерилизация.

– Накисване в NaOH или разтвор на натриев хипохлорит за 1 час; прехвърляне на инструментите във вода; стерилизация в автоклав с устройство за изгонване на въздуха на 121 °C за 1 час; почистване и рутинна стерилизация

– Накисване в NaOH или натриев хипохлорит за 1 час, изплакване с вода, поставяне в отворен съд и стерилизация в автоклав с устройство за изгонване на въздуха на 121 °C или в автоклав с вакуумно устройство на 134 °C за 1 час; почистване и рутинна стерилизация

– Накисване в NaOH и кипване за 10 min; почистване и рутинна стерилизация

– Накисване в натриев хипохлорит (за препочитане) или в NaOH на стайна температура за 1 час; почистване и рутинна стерилизация

Favero u Rutala [7, 14] предлагат два тристепенни метода за обеззаразяване на инструменти за многократна употреба:

1. За инструменти в контакт с тъкани с висока и средна инфекциозност:

– Обработка с препарат с комбинирано миешо и дезинфекционно действие.

– Стерилизация чрез използване на един от по-долу посочените методи.

а) Стерилизация на 134 °C за 18 min в автоклав с вакуумно устройство.

б) Стерилизация на 121 °C за 60 min в автоклав с устройство за изгонване на въздуха.

в) Накисване в 1N NaOH за 60 min на стайна температура с последващо стерилизиране в автоклав с устройство за изгонване на въздуха на 121 °C за 30 min.

– Основно почистване и рутинна стерилизация.

2. За инструменти в контакт с тъкани с ниска или неустановена инфекциозност:

– Почистване.

– Дезинфекция с разрежен 1:10 натриев хипохлорит (белина) или разтвор на 1N NaOH, който в най-малка степен да уврежда инструментите.

– Основно почистване и рутинна стерилизация.

Според Hill [8] най-сигурният начин за

обеззаразяване на инфектирани инструменти и тъкани е заливане с 1N NaOH или неразредена белина (5,25 % натриев хипохлорит) с последващо автоклавиране на 134 °C за 4,5 часа.

Кожа

Ненаранена кожна повърхност, контаминирана с телесни течности или тъкани се почиства внимателно със сапун и топла вода. Изплаква се и се подсушава. След това областта се третира с 0,1N NaOH или разтвор 1:10 на натриев хипохлорит за 1–2 min [10].

Течности

Към контаминирани течности се добавя 1N NaOH, последвано от автоклавиране на 134 °C за 4,5 часа. Като алтернатива – третираната с 1N NaOH течност може да се остави на стайна температура за 24 часа [8].

Всички течни отпадъци трябва да се събират и обработват като инфекциозни.

Повърхности

Съгласно препоръките на СЗО [20], повърхностите се обработват по следния начин:

– Заливане с 2N NaOH или неразреден натриев хипохлорит за 1 час, забърсване и изплакване с вода.

– Когато повърхностите не издържат третиране с NaOH или хипохлорит се извършва почистване и прилагане на някои от частично ефективните методи, посочени в табл. 2.

Hill [8] предлага алтернативен метод за дезинфекция на повърхности:

– Контаминирани повърхности се третират с 1N NaOH за 5 min, последвано от забърсване на повърхността с 1N HCl и обилно изплакване с вода.

– Повърхности, които не могат да издържат третиране с NaOH / HCl, се обработват с 10% разтвор на белина за 10–15 min, след което се изплакват обилно с вода.

Сухи обекти – съгласно СЗО [20]

- които издържат на въздействие на NaOH или натриев хипохлорит, се накисват предварително в един от двата разтвора за 1 час и след това се автоклавира при температура 121 °C за 1 час.
- които не издържат на въздействие на NaOH или натриев хипохлорит, трябва да се стерилизират в автоклав при температура 134 °C за 1 час.

Твърди отпагъци

Автоклавирант се на 134 °C за 4,5 часа пре-гу да се опаковат като медицински отпагъци за изгаряне в инсинератор [8].

През последните години се работи и върху други методи за обеззаразяване на контаминиранни с приони обекти. Националният съвет за научни изследвания (NRC) в Канада съобщава за успешно инактивиране с озон на инфекциозни приони, изолирани от мозъка на мишки, болни от болестта на Creutzfeldt–Jakob (CJD). Чрез използване на ензими е постигнато разрушаване на прион протеини [9]. Авторите на проекта прилагат ензима бактериална кератиназа, изолирана от *Bacillus licheniformis* щам PWD-1. Поставят си за цел да постигнат пълно разрушаване

на прион протеин, изолиран от мозъчния ствол на животни с BSE и scrapie. Резултатите показват, че само при наличие на детергенти и предварителна термична обработка при температура по-висока от 100 °C, се постига пълно ензимно разрушаване на PrP^{Sc}. Опити с протеиназа K и с два групи пречистени ензима (които не са трипсин и пепсин) също са били успешни.

На основата на тези ензимни процеси биха могли да се разработят ефективни методи за геконтаминация на медицинско и лабораторно оборудване.

Книгопис:

1. American Academy of Pediatrics. [Prion Diseases]. In: Pickering LK, ed. 2000 Red Book: Report of the Committee on Infections Diseases. 25 th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2000: 471–472
2. Aucouturier P, Kascsak RJ, Frangione B, et al. Biochemical and conformational variability of human prion strains in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1999 Oct 15; **274**[1]: 33–36
3. Axon, ATR., Beilenhoff U, Bramble, MG, Ghosh, S, Kruse A, McDonnell GE, Neumann, C, Rey, J-F, Spenser, K. Variant Creutzfeldt–Jakob Disease (vCJD) and Gastrointestinal. *Endoscopy* 2001; **33** (12):1070–1080
4. Brown P, Preece MA, Will RG. „Friendly fire“ in medicine: Hormones, homografts and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1992; **340**:24–27
5. Caughey B & Raymond GL. The scrapie – associated form of PrP is made from a fold into a known three-dimensional structure. *Science* 1991; **253**: 164-169
6. Delgado-Hachmeister JE; Rangel-Frausto MS; Ponce de Leon S. Transmissible spongiform encephalopathies. *Salud Publica Mex* 2002; **44**:69–75
7. Favero M. S., Bond W. W., Chemical disinfection of medical and surgical materials, Disinfection, sterilization and preservation, fifth ed, S S Block, ed (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,2001): 910-913
8. Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J. Diagnosis of new variant Creutzfeldt–Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 1997; **349**: 99–100.
9. Jan P. M. Langeveld, Dick F. M. Van de Wiel, G. Jan Garssen and Alex Bossers, Enzymatic Degradation of Prion Protein in Brain Stem from Infected Cattle and Sheep. Published: Dec. 1, 2003, edition of The Journal of Infectious Diseases
10. Katz, S., Control in the age of prion: How has the paradigm been altered, ASM 2003
11. Pan K-M, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB. Conversion of – helices into – sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**:10962–10966.
12. Prusiner S.B. Molecular biology of prion diseases. *Science* 1991; **252**: 1515–1522
13. Prusiner S.B. Prions. *Proc natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13 363–13 383
14. Rutala, W.A.; Weber, D.J., Creutzfeldt-Jakob Disease: Recommendations for disinfection and sterilization, *CID* 2001; **32**: 1348-1356
15. Solassol J, Arlotto M, Lehmann S. Detection of procedures: comparative study of standard Western blot, filter retention and scrapie-cell assay. *J Hosp Infect* 2004; **57**:156–161
16. Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 1993; **32**: 1991-2002
17. Thackray AM, Knight R, Haswell SJ: Metal imbalance and compromised antioxidant function are early changes in prion disease. *Biochem J* 2002 Feb 15; **362**(Pt 1): 253–8
18. Tilton D. Decontaminating the Indestructible Prion. *Wild Iris Med. Educ.* 2002 [Online] <http://www.nursingceu.com>
19. Wadsworth JD, Hill AF, Beck JA, Collinge J. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immuno-blotting assay. *Lancet* 2001; **358**:171–180
20. WHO 2000. WHO infection control guidelines for transmissible spongiform encephalopathies. Report of a WHO consultation, Geneva, Switzerland, 23–26 March 1999
21. Wisniewski T., Prion-Related Diseases, 2004 [Online]. <http://www.emedicine.com/neuro/topic662.htm>