

Ina Amyloïde

Inaktivierung von Amyloidosen verursachenden Keimen durch ein neues alkalisches Reinigungsmittel gemäss dem neuen Protokoll für die Kontrolle der amyloidiziden Wirkung

Guillaume Fichet, Franklab Frankreich

ZUSAMMENFASSUNG

Das iatrogene Risiko der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) ist seit vielen Jahren klar identifiziert. Die Agence Nationale de Sécurité des Médicaments (französische Behörde für Arzneimittel und Medizinprodukte ANSM) veröffentlichte 2011 für die Risikovorbeugung eine Liste mit vollständig inaktivierenden Produkten. Dieses Protokoll ist jedoch nicht unfehlbar, denn die meisten Verfahren sind bei dem Stamm, auf den sich das Protokoll bezieht, sowie bei menschlichen Prionen nur teilweise oder gar nicht wirksam. Ausserdem berücksichtigt es die Weiterentwicklung der Erkenntnisse über ultrasensible Detektionstechniken und Amyloidosen nicht, bei denen ein neues, sekundäres Übertragungsrisiko von Mensch zu Mensch nicht ausgeschlossen werden kann. Wir schlagen deshalb vor, dieses mangelhafte, aber noch gültige Protokoll zu einem Protokoll für die Kontrolle der amyloidiziden Wirkung weiterzuentwickeln. Ein für Reinigungs- und Desinfektionsgeräte (RDG) zugelassenes Produkt (1%, 10 Minuten, 55° C) erfüllt bereits dieses Protokoll.

EINLEITUNG

Auch wenn bis anhin im Vergleich zur Exposition des Menschen gegenüber dem Erreger der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) nur wenige klinische Fälle der Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK) zu verzeichnen waren, wird eine grosse Anzahl asymptomatischer Fälle vermutet. Die Infektiosität von Blut und anderen peripheren Geweben rechtfertigt zudem die Suche nach neuen Produktzusammensetzungen und kompatiblen Verfahren, mit denen das Risiko einer sekundären Prionenübertragung über Medizinprodukte und Bluttransfusionen (Gill *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014) ausgeräumt werden kann. Die nachgewiesenen sporadischen Risiken einer iatrogenen Übertragung der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit sowie das Fehlen von Ante-mortem-Diagnosen dieser Erkrankung verpflichten ferner zu spezifischen Dekontaminierungsaufgaben für Medizinprodukte in Gesundheitseinrichtungen. Die französischen Gesundheitsbehörden haben unter der Federführung der ANSM eine Liste von Produkten zusammengestellt, die Prionen vollständig inaktivieren und dem PSP (Pri-

onen-Standard-Protokoll) entsprechen. Dieses gründet vor allem auf der Inaktivierung der Prionen des Typs 263K (hamsteradaptierter Scrapie-Stamm). Die Kombination Hamster/Prionenstamm 263K für den Test inaktivierender Produkte eignet sich jedoch nicht für die Problematik beim Menschen. Die Effizienz der Inaktivierungsverfahren hängt ausserdem vom Prionentyp (oder Stamm) sowie von der ausgewählten Wirtsart ab (Giles *et al.*, 2008). Eine brandneue Studie hinterfragt ausserdem die von der ANSM veröffentlichte Liste der Produkte, denen eine vollständige Inaktivierung von Prionen nachgesagt wird. Die meisten sind gegen Scrapie-Prionen sowie menschliche Prionen nur teilweise oder gar nicht wirksam (Belondrade *et al.*, 2016).

Neben den Prionenkrankheiten sind auch andere neurodegenerative Erkrankungen des Menschen auf falsch gefaltete Proteine (Amyloidosen) zurückzuführen, vor allem Alzheimer (impliziertes Protein = aus APP entstandene β -Amyloidpeptide), Parkinson (impliziertes Protein = Alpha-Synuclein (SCNA)) sowie Chorea Huntington (impliziertes Protein = Polyglutamin (polyQ)). Diese Krankheiten zeichnen sich durch eine extra- oder intrazelluläre Ablagerung von aus Amyloidplatten bestehenden Proteinen aus. Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit galt als einzige übertragbare Amyloidose, bis experimentelle Nachweise den Verdacht aufkommen liessen, dass die bei Parkinson und Alzheimer implizierten Proteine ebenfalls von einem Menschen auf den anderen übertragen werden können (Jaunmuktane *et al.*, 2015; Prusiner *et al.*, 2015; Frontzek *et al.*, 2016).

Als Antwort auf die Amyloidosen-Problematik beim Menschen haben wir im Rahmen der Prionenerkrankungen zuerst die Modelle für transgene Mäuse mit normaler Proteinexpression und Infektionsanfälligkeit für menschliche Prionen genutzt (Beringue *et al.*, 2008; Moudjou *et al.*, 2014). Für die Untersuchung der prioniziden Eigenschaften von erfolgversprechenden Produkten haben wir auf der Grundlage der Literatur (Saborio *et al.*, 2001) optimierte, ultrasensible azelluläre Vervielfältigungstechniken (Protein Misfolding Cyclic Amplification PMCA) genutzt. Gleichzeitig entwickelten und patentierten wir eine innovative Methode mit Hirnhomogenat ohne materiellen Träger, um die Inaktivierung ins-

gesamt zu analysieren. Die Forschung wurde zudem auf die übrigen Amyloidosen ausgeweitet, um ein neues Protokoll für die Kontrolle der amyloidiziden Wirkung (PKAW) vorzuschlagen und so das noch gültige, aber mangelhafte PSP abzulösen.

ERGEBNISSE

Entwicklung einer Technik für die In-vitro-Amplifikation von Prionen des Stamms 263K sowie Biotest-Ergebnisse

Wir haben auf der Grundlage der Literatur die PMCA-Technik für die Amplifikation von Prionen des nach dem derzeit gültigen PSP als Referenz dienenden Stamms 263K mittels Direkthomogenat (Moudjou *et al.*, MBio) sowie Adsorption auf Metallstäbchen entwickelt und optimiert.

Für die In-vitro- und In-vivo-Analysen haben wir Natron (1N, 1 Stunde, 20° C) als Nachweis eingesetzt und willkürlich eine Behandlung aus der ANSM-Liste ausgesucht. Ein Testprodukt wurde in einer Konzentration von 1% über 10 Minuten bei 55° C getestet.

Durch die Behandlung mit Natron wurde die PMCA-Konversionsaktivität der 263K-Prionen gestoppt, während die im Handel erhältliche Lösung überhaupt nicht wirksam war. Das Testprodukt vermochte die Aktivität jedoch vollständig zu stoppen.

Der Biotest beim Hamster gemäss dem PSP (dauerhaft implantiertes Stäbchen) bestätigte diese Ergebnisse: Das Testprodukt beendete die Konversion vollständig.

Entwicklung einer Technik für die In-vitro-Amplifikation von Prionen des vCJK-Stamms sowie Biotestergebnisse für transgene Mäuse

Wir haben anschliessend die Aktivität bei einem Direkthomogenat und durch Adsorption von menschlichen vCJK-Prionen auf Metallstäbchen bewertet. Wie zuvor verwendeten wir Natron (1N, 1 Stunde, 20° C) als Nachweis sowie die gleiche, willkürlich aus der ANSM-Liste gewählte Behandlung. Nach Behandlung mit Natron war die PMCA-Konversionsaktivität der vCJK-Prionen gestoppt, während die im Handel erhältliche Lösung überhaupt nicht wirksam war. Das Testprodukt vermochte die Aktivität jedoch vollständig zu stoppen.

Modelle mit transgenen Mäusen

Modelle mit transgenen Mäusen, die die menschlichen Stämme MM1 und vCJK exprimieren (Beringue *et al.*, PLoS One 2008, Douet *et al.*, EID 2014) sind bereits verfügbar. Die Leistungsfähigkeit eines Produkts in Bezug auf die Inaktivierung wird durch Inokulieren von Direktthomogenat bewertet, um die mit PMCA erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen. Die Biotests bestätigten, dass das neue Produkt menschliche Prionen inaktiviert (Biotest mit vCJK-Stamm läuft noch). Angesichts der überraschenden Ergebnisse mit dem im Handel verfügbaren Produkt haben wir auch eine damit behandelte Gruppe in den Biotest (MM1-Stamm) zusätzlich zum Natronnachweis integriert. Während Natron inaktiviert, reduziert das im Handel erhältliche Produkt nur teilweise die Infektiosität menschlicher Prionen. Anders ausgedrückt: Die Tiere entwickelten klinische Symptome und starben alle an der Krankheit.

Weiterentwicklung des PSP zum PKAW

Neben der 2016 veröffentlichten Studie (Belondrade *et al.*, 2016) konnten wir bestätigen, dass mindestens eine Behandlung der Liste Prionen nicht inaktiviert.

Im Gegensatz zu den Prionen, deren Inaktivierung von diesem standardisierten, jedoch nur begrenzt wirksamen Protokoll der ANSM (siehe oben) festgelegt wird, gibt es kein empfohlenes Protokoll für die Untersuchung von Amyloidosen verursachenden Erregern. Wir haben eines entwickelt, um vom PSP ausgehend auf das PKAW überzugehen.

Für andere Amyloidosen als Prionen haben wir das menschliche Alpha-Synuclein als Studienmodell verwendet. Wir haben uns nur auf direkte In-vitro-Studien sowie die Adsorption auf Oberflächen unter Anwendung der ultrasensiblen PMCA-Technik beschränkt. Das neue Testprodukt hat die PMCA-Aktivität des menschlichen Alpha-Synucleins vollständig gestoppt. Es ist folglich in der Lage, die Fibrillenstrukturen gänzlich zu zerlegen.

Die Hauptbewertungskriterien für das neue Protokoll lauten wie folgt:

- Bei den Amyloidose-Prionen schlagen wir vor, menschliche Stämme (sporadisch und Variante) zu verwenden, das gesamte Inokulat zu behandeln und das Stäbchen durch In-vitro-Siebungstests nach einer sensiblen Detektionsmethode wie PMCA aufzubewahren, bevor die Restinfektiosität allein durch intrazerebrale Direktinjektion in das Empfängertier inokuliert wird.
- Bei den übrigen Amyloidosen empfehlen wir das Alpha-Synuclein-Modell, dessen Ergebnisse auf andere menschliche Amyloidosen ausgeweitet werden können. Wir empfehlen nur In-vitro-Direktstudien und Adsorption auf Oberflächen mit PMCA, die je nach Wissensstand weiterentwickelt werden können.

FAZIT

- Die azellulären Techniken für die Amplifikation von Prionen ermöglichen ein Routine-Screening erfolgversprechender Produkte, die eine vollständige Inaktivierung menschlicher Prionen im Bereich der menschlichen Gesundheit bewirken sollen.
- Anhand von Modellen für transgene Mäuse kann die Infektiositätsreduktion dieser Produkte validiert werden.
- Eine Adsorption der Prionen auf einem materiellen Träger reicht nicht für eine Analyse ihrer Inaktivierung im Rahmen eines Biotests. Ein Abtragen kann nur in vitro analysiert werden. Der Einsatz eines Direktinokulats hat den Vorteil, den Infektionstitern und seine Reduktion durch Testprodukte für eine bestimmte Menge infektiöses Material messen zu können.
- Bestätigung durch eine weitere veröffentlichte Studie, dass mindestens eine in der ANSM-Liste aufgeführte Behandlung sich bei diesem Erregertyp als unwirksam erweist und dass das PSP deshalb nicht mehr länger als Referenzprotokoll dienen kann.
- Wir schlagen vor, das fehlerhafte PSP zu einem Protokoll weiterzuentwickeln, das die Amyloidosen berücksichtigt. Dabei handelt es sich um das Protokoll für die Kontrolle der amyloidogenen Wirkung (PKAW).
- Es gibt bereits ein von einem französischen Labor hergestelltes Produkt, das die Kriterien des neu vorgeschlagenen PKAW erfüllt und für die automatisierte Prädesinfektion einen technischen Fortschritt darstellt.

Angesichts dieser Ergebnisse müsste das derzeit gültige PSP für die Integration der PMCA-Technik sowie von Modellen für die Titrierung menschlicher Prionen und anderer, weiter oben beschriebener implizierter Erreger weiterentwickelt werden. Das hier vorgeschlagene PKAW ist bereits eine Weiterentwicklung des PSP. Die derzeit verwendeten Produkte erfüllen die Kriterien dieses PKAW nicht.

DANKSAGUNG

Teilweise Zusammenarbeit mit den Labors der UR892 für molekulare Virologie und Immunologie des INRA von Jouy-en-Josas, Frankreich

BIBLIOGRAFIE

- <http://ansm.sante.fr/Dossiers/Creutzfeldt-Jakob-et-produits-de-sante/Protocole-Standard-Prion-lutte-contre-les-infections-liees-aux-soins/offset/0>
- <http://www.google.com/patents/EP2732827A1?cl=fr>
- Belondrade M, Nicot S, Beringue V, Coste J, Lehmann S, Bougard D. (2016). Rapid and Highly Sensitive Detection of Variant Creutzfeldt-Ja-

kob Disease Abnormal Prion Protein on Steel Surfaces by Protein Misfolding Cyclic Amplification: Application to Prion Decontamination Studies. PLoS One.;11(1):e0146833.

- Beringue, V., Le Dur, A., Tixador, P., Reine, F., Lepourry, L., Perret-Liaudet, A., Haik, S., Vilotte, J. L., Fontes, M. and Laude, H. (2008). Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD. PLoS One, **3**, e1419.
- Chen CC, Wang YH. (2014). Estimation of the exposure of the UK population to the bovine spongiform encephalopathy agent through dietary intake during the period 1980 to 1996. PLoS One.;9(4):e94020.
- Frontzek K, Lutz MI, Aguzzi A, Kovacs GG, Budka H. (2016). Amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy are frequent in iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dural grafting. Swiss Med Wkly;146:w14287.
- Giles K, Glidden DV, Beckwith R, Seoanes R, Peretz D, DeArmond SJ, Prusiner SB. (2008). Resistance of bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions to inactivation. PLoS Pathog.;4(11).
- Gill ON, Spencer Y, Richard-Loendt A, Kelly C, Dabaghian R, Boyes L, Linehan J, Simmons M, Webb P, Bellerby P, Andrews N, Hilton DA, Ironside JW, Beck J, Poulter M, Mead S, Brandner S. (2013). Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. BMJ ;347:f5675.
- Jaunmuktane Z, Adlard P, Bjurström N, Caine D, Lowe J, Norsworthy P, Hummerich H, Druyeh R, Wadsworth JD, Brandner S, Hyare H, Mead S, Collinge J. Iatrogenic CJD due to pituitary-derived growth hormone with genetically determined incubation times of up to 40 years. Brain. 2015 Nov;138(Pt 11):3386-99.
- Moudjou, M., Sibille, P., Fichet, G., Reine, F., Chapuis, J., Herzog, L., Jaumain, E., Laferriere, F., Richard, C. A., Laude, H., Andreoletti, O., Rezaei, H. and Beringue, V. (2014). Highly infectious prions generated by a single round of microplate-based protein misfolding cyclic amplification. MBio, **5**, e00829-00813.
- Prusiner SB, Woerman AL, Mordes DA, Watts JC, Rampersaud R, Berry DB, Patel S, Oehler A, Lowe JK, Kravitz SN, Geschwind DH, Glidden DV, Halliday GM, Middleton LT, Gentleman SM, Grinberg LT, Giles K. Evidence for α -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Sep 22;112(38):E5308-17.
- Saborio, G. P., Permanne, B. and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. Nature, **411**, 810-813. |