

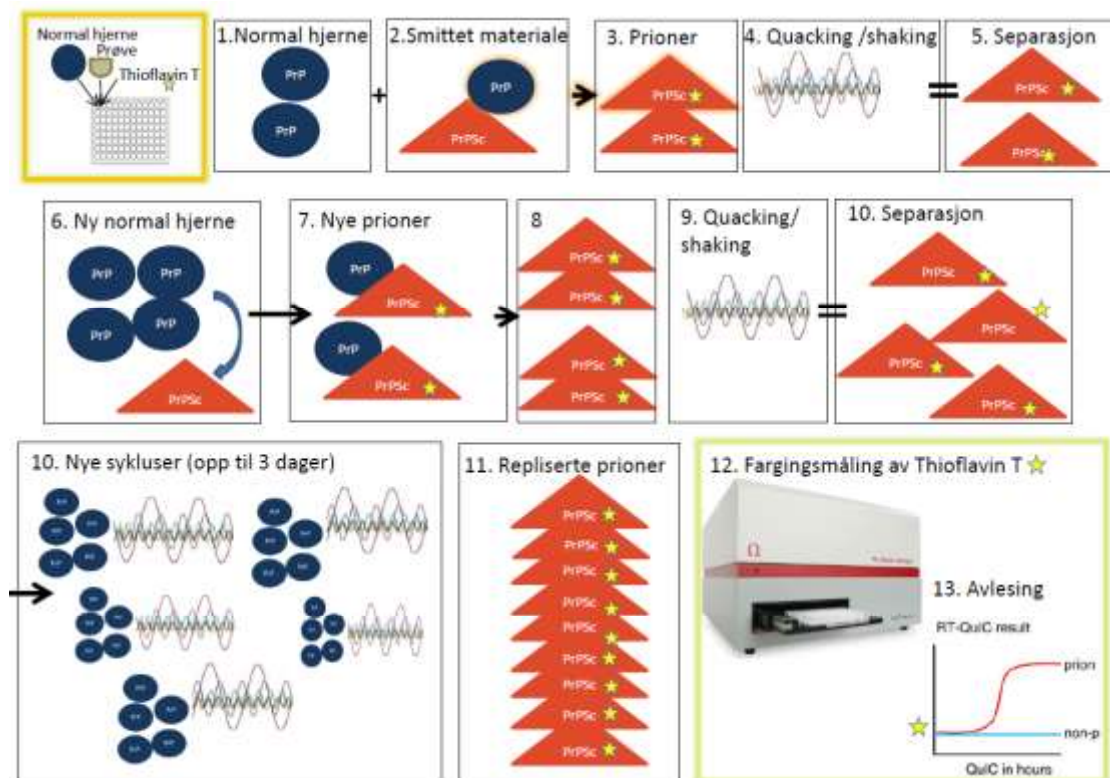
Prosjekt 17/20695- 6

«Deteksjon av skrantesjukessmitte (prioner) i avføring fra rein.»

1- Problemstilling:

Målet med prosjektet var å etablere den meget sensitive forskningsmetoden RT-QuIC i Norge, mer spesifikt ved Veterinærinstituttet, for påvisning av små mengder av skrantesjukessmitte (CWD) spesielt i forhold til deteksjon av tidlig smitte i ekskretter fra hjortedyr.

I RT-QuIC metoden imiteres prosessen som skjer i kroppen (*in vivo*) under prionsykdom ved å blande prøven som skal analyseres sammen med en type kunstig normal prion (recPrP) under en optimalisert biokjemisk forhold i forsøksrøret (*in vitro*). Dersom det finnes syke/feilfoldete prioner (PrP^{Sc}) i prøven, vil de «smitte» over til recPrP ved å omdanne disse til PrP^{Sc} som deretter danner aggregater. Denne prosessen er repetert og derved amplifisert i gjentatte sykluser med resting (quaking) og hvilefase slik at flere recPrP blir omdannet til PrP^{Sc} og flere aggregater dannes. Et fluorescerende fargestoff (Thioflavin T) er brukt som markør for disse aggregatene, og fluorescensen fra stoffet kan bli målt med en FluoStar maskin. Metoden er illustrert i figur 1. En prøve som er positiv for PrP^{Sc} vil derved vise en kurve med fluorescensens intensitet som stiger opp med tid mens kurven til negative prøven vil holde seg flat gjennom analysetiden (figur 1, nederste del, rød kurve).



Figur 1: Prinsippet til RT-QuIC test

2- Etablering av RT-QuIC metoden ved Veterinærinstituttet Oslo.

RT-QuIC metoden er i bruk i noen få laboratorier verden rundt, spesielt i USA. Metoden er også i bruk hos prosjektpartneren Dr Andreoletti i INRA Toulouse. Derfor har ingeniør Linh Tran og forsker Sylvie Benestad oppholdt seg en uke i INRA Toulouse, Frankrike, for rask opplæring på TSE hjernemateriale. INRA Toulouse hadde imidlertid ikke erfaring med deteksjon av prioner i avføring og forsøkene som ble satt i gang med avføring fikk ikke gode resultater.

Metoden ble etter det først testet ut i Oslo på noen av hjernemateriale fra norske reinsdyr, basert på protokollen utviklet i laboratoriet i Toulouse og den kunstig lagd recPrP fra hamster kjøpt fra Universitetet i Colorado. Testen klarte å detektere prioner i positive prøver, men samtidig viser det også en god del falske positive (negative prøver som gir positive resultater) og negative signaler (positive prøver som gir negative resultater). Selv om RT-QuIC er utviklet for mange år siden i USA og er blitt brukt i laboratorier verden rundt i forskningen av prionsykdommer, må metoden generelt optimaliseres av de spesifikke laboratorier og også når ulike vevstyper analyseres. Dette er grunnen til at det finnes mange variable protokoller for RT-QuIC i litteraturen. RT-QuIC reaksjonen er kompleks og er styrt av flere faktorer, blant annet av biokjemiske parameter som pH, temperatur, konsentrasjon av salt og SDS detergenten, i tillegg til egenskaper til den kunstige recPrP, og prionstammen i prøvematerialet.

For å bli kvitt de falske signalene ble ulike pH, temperaturer, og konsentrasjoner av salt og SDS for RT-QuIC reaksjonen testet i ulike kombinasjoner. Vi endte til slutt med en testreaksjon som inneholder kombinasjonen: 20 mM H₂PO₄ pH 7.4, 320 mM NaCl, 0.002% SDS og ved 40°C, som ga betydelig redusert falske positive og falske negative signaler i hjerneprøver.

3- Organisering av ringtest på avføringsprøver:

I tillegg til etablering av RT-QuIC metoden ønsket vi også å evaluere robustheten til testen ved testing av avføring. Dette ble gjort ved at vi sendte totalt 79 blinde/maskerte prøver til to veletablerte laboratorier med lang erfaring på RT-QuIC teknikken, mens vi beholdte et sett selv. Disse 2 forskningsgrupper er de 2 laboratoriene som har publisert om påvisning av prion i avføring fra CWD dyr ved RT QuIC, Universitet i Calgary ved Sabine Gilch <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752360/pdf/jove-127-56373.pdf> og Colorado Universitet ved Davin Henderson <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5817259/pdf/jgv-98-1953.pdf>) og de har brukt hver sin hjemmelaget protokoll og eget recPrP substrat, Canada med mus recPrP og USA med hamster recPrP.

Hver prøvesett var anonymiserte prøvene, avføring av reinsdyr, med kjent negative prøver (36 negative dyr) og en kjente positive prøve. På grunn av manglende kjent positive avføringsprøver (vi har bare en CWD hvithalehjort fra USA), har vi brukt avføring eller vanlig buffer som var blandet («spiket») med små mengder med prioner fra CWD reinsdyr materiale.

Resultatene samarbeidene våre sendte var overraskende meget skuffende (Figur 2). Det var stor uoverstemmelse mellom resultatene fra de 2 labene, den amerikanske laben klarte å påvise flere av de positive prøvene men fikk også signal fra kjente negative prøver (falske positive). Den kanadiske laben identifisere bare 2 prøver med positive signal (mange falske negative), og en av dem var kjent negative (falsk positiv).

Koder	Prøvetype		Spiket (konsentrasjon)	USA	Canada	Expected results	Konklusjon
17 04 CD 3381	Mokk neg rein	Neg rein		Positiv	Negativ	NEG	Feil pos USA, riktig neg Canada
17 04 CD 3182	Mokk neg rein	Neg rein		Positiv	Negativ	NEG	Feil pos USA, riktig neg Canada
17 04 CD 3439	Mokk neg rein	Neg rein		Positiv	Negativ	NEG	Feil pos USA, riktig neg Canada
18 04 CD 12752	Mokk neg rein	Neg rein		Positiv **	Negativ	NEG	Feil pos USA, riktig neg Canada
Tube 5	Mokk neg rein	Neg rein (17-04-CD3660)		Positiv	Negativ	NEG	Feil pos USA, riktig neg Canada
Tube 9	Mokk neg rein	Neg rein (17-04-CD3660)		Negativ	Negativ	NEG	Riktig
17 04 CD 2103	Mokk pos rein	Pos Deer (PD2, Davin, USA)		Positiv *	Negativ	POS	Riktig pos USA, feil neg Canada
Tube 18	Mokk neg rein	Bare neg møkk		Negativ	Negativ	NEG	Riktig
Tube 13	Mokk neg rein	med pos Hjernevev (Davin)	1: 1.000	Positiv ***	Negativ	POS	Riktig pos USA, feil neg Canada
Tube 14	Mokk neg rein	med pos Hjernevev (Davin)	1: 10.000	Positiv *	Negativ	POS	Riktig pos USA, feil neg Canada
Tube 16	Mokk neg rein	med pos Hjernevev (Davin)	1: 100.000	Positiv	Negativ	POS	Riktig pos USA, feil neg Canada
Tube 12	Mokk neg rein	med pos Hjernevev (Davin)	1: 1.000.000	Negativ	Negativ	post neg	Feil neg
Tube 17	Mokk neg rein	med pos Hjernevev (Davin)	1: 10.000.000	Positiv	Negativ	post neg	Riktig pos USA, feil neg Canada
Tube 15	Mokk neg rein	med pos Hjernevev (Davin)	1: 100.000.000	Negativ	Negativ	post neg	Feil neg
Tube 11	Mokk neg rein	med pos LN (norsk reinsdyr) 18-04-CD1743	1: 40.000	Negativ	Negativ	POS	Feil neg
Tube 10	Mokk neg rein	med pos LN (norsk reinsdyr) 18-04-CD1743	1: 160.000	Negativ	Negativ	post neg	Feil neg
Tube 6	Mokk neg rein	med pos LN (norsk reinsdyr) 18-04-CD1743	1: 640.000	Negativ	Negativ	post neg	Feil neg
Tube 8	Mokk neg rein	med pos LN (norsk reinsdyr) 18-04-CD1743	1: 1.280.000	Negativ	Negativ	post neg	Feil neg
Tube 7	Mokk neg rein	med pos LN (norsk reinsdyr) 18-04-CD1743	1: 2.560.000	Positiv *	Negativ	post neg	Riktig pos USA, feil neg Canada
Tube 2	PBS	Bare PBS		Negativ	Negativ	NEG	Riktig
Tube 3	PBS	med pos Hjernevev norsk reinsdyr 18 04 CD2868	1: 1.280.000	Negativ	Negativ	post neg	Feil neg
Tube 1	PBS	med pos Hjernevev norsk reinsdyr 18 04 CD2868	1: 2.560.000	Negativ	Negativ	post neg	Feil neg
Tube 4	PBS	med pos Hjernevev norsk reinsdyr 18 04 CD2868	1: 5.120.000	Negativ	Negativ	post neg	Feil neg
Tube 20	PBS	Bare PBS		Negativ	Positiv	NEG	Riktig neg USA, feil pos Canada
Tube 25	PBS	med pos Hjernevev fra USA (Davin)	1: 1.000	Positiv **	Negativ	POS	Riktig pos USA, feil neg Canada
Tube 23	PBS	med pos Hjernevev (Davin)	1: 10.000	Positiv ***	Negativ	POS	Riktig pos USA, feil neg Canada
Tube 19	PBS	med pos Hjernevev (Davin)	1: 100.000	Positiv **	Positiv	POS	Riktig pos
Tube 22	PBS	med pos Hjernevev (Davin)	1: 1.000.000	Negativ	Negativ	post neg	Feil neg
Tube 24	PBS	med pos Hjernevev (Davin)	1: 10.000.000	Negativ	Negativ	post neg	Feil neg
Tube 21	PBS	med pos Hjernevev (Davin)	1: 100.000.000	Negativ	Negativ	post neg	Feil neg
POS = positive feces / feces spiked with high concentrated positive brain homogenate (diluted $\leq 10^{-5}$) postneg = feces spiked with high concentrated positive brain homogenate (diluted $> 10^{-5}$)							
Lab	Antall korrekt positive		Antall positive resultater	Falske positive	Falske negative		
USA	5		14	5	182	USA: 5 feil pos, 9 riktig pos	
Canada	1		2	1	182	Canada: 1 feil pos, 1 riktig pos	

Figur 2: RT QuIC resultatene fra labene i USA og Canada. Ikke inkludert i denne tabellen var 31 avføringsprøver fra CWD negative reinsdyr, USA fant 4 av disse som positive (falske positive). I kolonnen «Expected results» kan man finne resultatet som var forventet i forhold til dyret CWD status.

Konklusjon av ringtesten.

Resultatene har bekreftet at avføring har i seg hemmere som kan maskere det positive signalet man burde få når prioner er tilstede. I tillegg er det et spesifisitetsproblem ved at avføringsprøvene som er blandet med negativ hjerne også kan gi (falsk) positivt resultat. Tatt i betraktning at disse 2 gruppene var de beste i verden om deteksjon av CWD prioner i avføring og at våre resultater var like lite pålitelige måtte vi trekke konklusjonen av at ambisjonen beskrevet i prosjektet ikke var realistisk. Partneren i Canada sier at metoden var vellykket når de brukte avføring fra hjortedyr under kontrollerte forsøksbetingelser og at de har aldri prøvd metoden på reelle prøver fra feltet. Dyrene de undersøkt i publikasjonen var eksperimentelt infisert med CWD, hadde blir foret med kontrollert fôr og var prøvetatt på mange forskjellige tidspunkter, og mengde prioner de kunne påvise kunne variere en del under sykdomsutviklingen. Dette kunne i hvert fall delvis forklare hvorfor ringtest resultatene ble dårlige enn forventet ut fra publikasjonene.

4- Sammenlikning av RT QuIC med andre diagnostiske metoder (ELISA TeSeE Bio-Rad og ELISA HerdChek IDEXX) på lymfeknuter fra reinsdyr

Det ble derfor satt stor fokus på å bruke RT-QuIC metoden for å detektere små mengder av prioner i andre vev som, i motsetning til avføring, ikke inneholder hemmere som interferer med metoden. I perioden mellom september 2017 og mai 2018 ble reinsdyrpopulasjonen fra Nordfjella zone 1 slaktet i et forsøk å utrydde CWD i regionen. Alle voksne reinsdyr fra dette område ble testet, fra en blanding av hjernemateriale og en bit av lymfeknute, med den rutine diagnostiske testen ELISA (TeSeE Bio-Rad).

Det ble funnet 19 positive dyr blant de 2 359 reinsdyr testet (Mysterud et al. 2019 Ecophere <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ecs2.2931>). Vi har videre undersøkt lymfeknuter fra 350 av disse reinsdyrene, valgt ut på basen av etiske grunner blant individene som ikke ble konsumert. Vi har analysert dem med Rt-QuIC metoden og en annen kommersiell tilgjengelig ELISA test (HerdChek IDEXX). Blant disse 350 prøvene ga 2 av dem svake signaler med RT-QuIC metoden, men resultatene ble ikke bekreftet hverken ved repetisjon av RT-QuIC eller western blot og immunohistokjemi testene. RT QuIC detekterte ikke prioner fra resten av de lymfeknuter prøvene.

Konklusjon: Man kan konkludere fra dette studie at den diagnostiske sensitiviteten (testens kapasiteten å påvise prioner i uforynnet/ reelle prøver) av RT QuIC protokollen som ble brukt ikke er høyere enn de andre diagnostiske testene brukt i rutine, selv om den analytiske sensitiviteten (testens kapasitet å detektere prioner i meget fortynt prøver) av RT QuIC er beskrevet som mye høyere enn de andre påvisningsmetodene.

5- Testing av ulike recPrP substrater

I begynnelsen av prosjektet fantes stortsett 2 ulike typer med substrater, hamster eller mus prionprotein (recPrP). En vellykket/optimal RT-QuIC test skal være av en riktig kombinasjon av mange biokjemiske faktorene og type substrat (recPrP) man bruker, det vil si hvordan og fra hvilken art det normale prionprotein er laget.

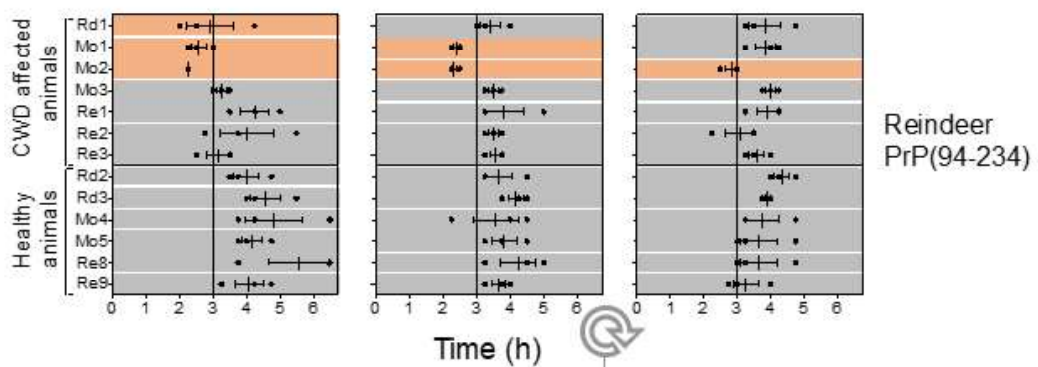
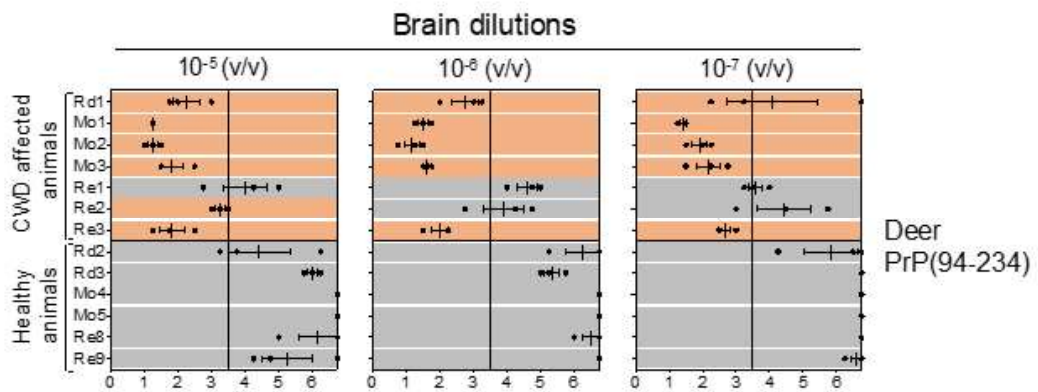
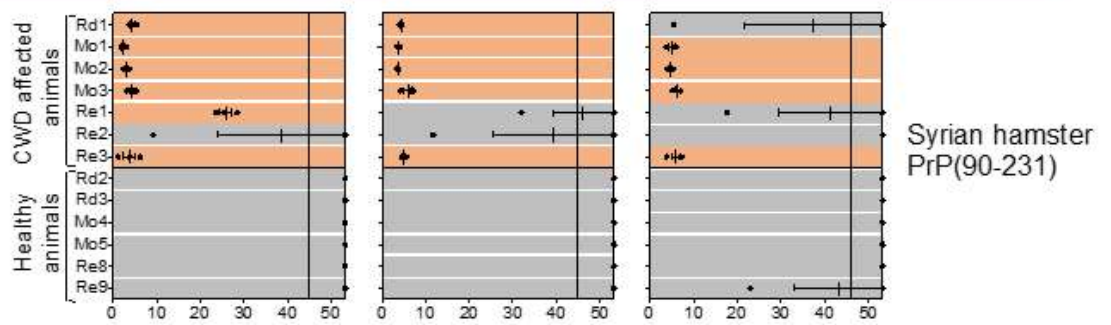
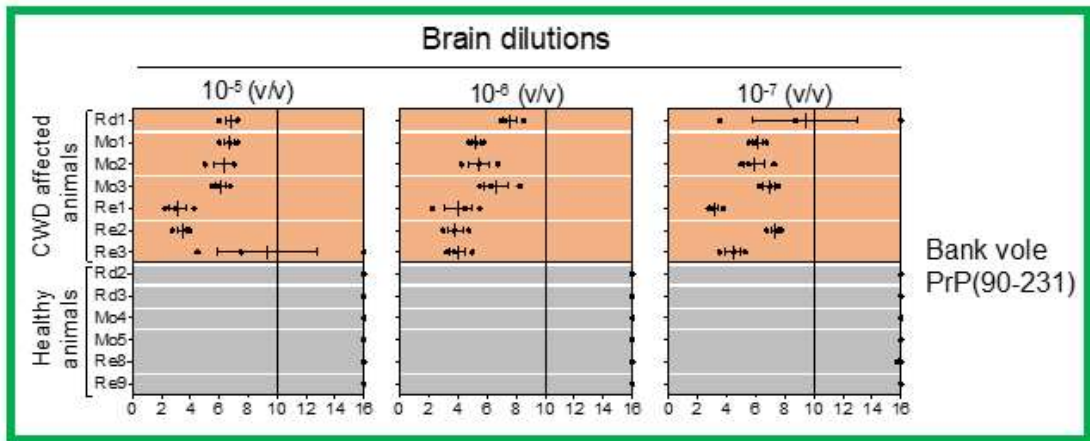
I siste delen av prosjektet har vi undersøkt om recPrP substratet kunne påvirke resultatene i forhold til eliminering av falske positive (spesifisitet) og falske negative (sensitivitet). Vi har innledet et samarbeidet med Besta Instituttet i Milano hvor Dr Fabio Moda har lang erfaring med RT-QuIC og har publisert mange fremragende artikler i human medisin, blant annet om Creutzfeldt Jakob sykdommen. Denne forskningslaben har til disposisjon (via Giuseppe Legname I SISSA Trieste) nye prionprotein recPrP substrater, og de ble testet i parallell i Milano og på Veterinærinstituttet i Oslo på hjerne og lymfeknutemateriale fra negative eller positive CWD hjortedyr som illustrert i figur 3.



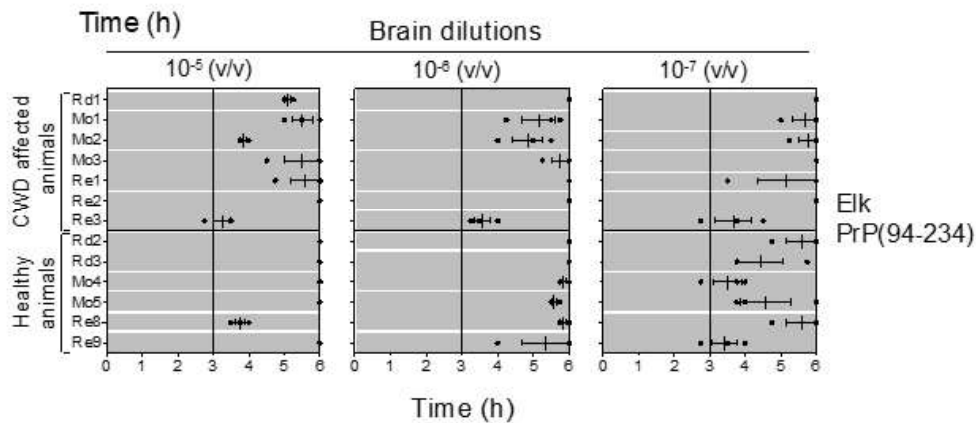
Figur 3: Nye prionprotein recPrP substrater ble testet i parallell i Milano og på Veterinærinstituttet i Oslo på hjerne og lymfeknutemateriale fra negative eller positive CWD hjortedyr

Resultatene viser at substratet som er brukt er meget viktig. Bildet under viser at klatremus (bank vole) substratet er den som fungerer best med CWD materiale.

- Den klarer å detektere prioner i hjernemateriale fra all dyr som er CWD positive uten falske positive (deteksjon av prioner i negative dyr)



Time (h)



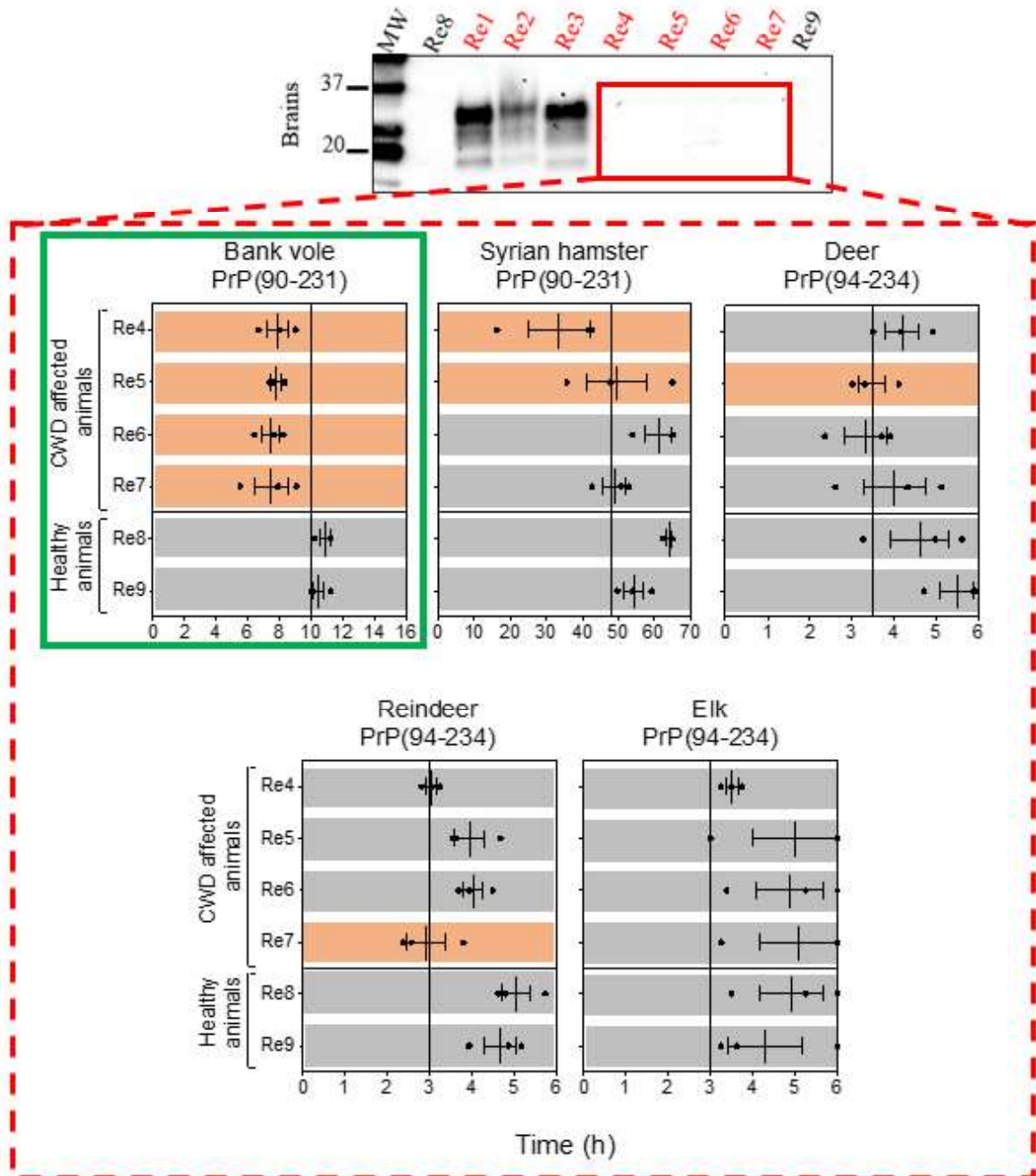
Figur 4: Western blot og RT QuIC resultater fra norske hjortedyr.

Øverst ser man western blot resultater: positivt signal fra hjernevev hos 3 reinsdyr (Re), 3 elg (Mo) og et hjortedyr (rd) i form av et trippelbånd mønster, som vist i de røde rektanglene.

Under følger resultatene fått ved bruk av RT-QuIC med forskjellige substrater (merket til høyre). Hvert punkt på en linje representerer når kurven (med prioner visualisert med Thioflavin T) går opp i forhold til tiden (tid, X aksen) det vil si når prionene er detekterbare etter RT-QuIC amplifisering. Grafene omringet av grønt viser resultatene fra bank vole substrat. I hver firkant er hjernematerialet fortynning fra 10^{-5} (1 yl fortynnet i 100 000 yl buffer) til 10^{-7} (1: 1 yl fortynnet i 10 000 000 yl buffer). De 7 første linjene er fra CWD positive dyr, de 6 siste linjene er fra CWD negative dyr (som merket til venstre). En oransje linje betyr at resultatet viser prioner, en grå linje ingen prioner er påvist. Resultatene er vurdert i forhold til en terskel (vertikal linje). Prøvene som gir signal før denne streken er positiv, de andre er betraktet som uspesifikk (negativ).

Fra denne figuren ser man at RT QuIC med bank voles som substrat er den beste, og wapiti (elk) substratet ikke egner seg til protokollen /prionprøvene.

2. Den har høyere analytisk sensitivitet enn western blot metoden fordi den klarer å detektere prioner i prøver som er 100 til 1000 ganger mer fortynnet (Figur 4)
3. Den klarer å detektere prioner i hjernen de de dyrene som er diagnostisert med CWD fordi prioner var påvist i lymfeknuter (figur 5)



Figur 5: Western blot og RT QuIC resultater fra norske hjortedyr (tilsvarende figur blir publisert i Scientific Report, vi jobber nå med revisjonen av manuskriptet)

Øverst ser man western blot resultater: hjerneprøvene fra dyr som var diagnostisert med CWD i lymfeknuter men som er negative med western blot i hjerne er analysert videre med RT-QuIC: 4 reinsdyr (Re4 –Re7, i rød rektangel) viser ingen signal (bånd).

Re8 og Re9 er negative reinsdyr.

Under følger resultatene fått ved bruk av RT-QuIC med forskjellige substrater (merket over hver rektangel). Hvert punkt på en linje representerer når kurven (med prioner visualisert med Thioflavin T) går opp i forhold til tiden (tid, X aksene) det vil si når prionene er detekterbare etter RT-QuIC amplifisering. Grafen omringet av grønt viser resultatene fra

bank vole substrat, på grunn av liten prioner brukte vi bare en fortykning 10^{-5} (1 yll fortynnet i 100 000 yll buffer)

En oransje linje betyr at resultatet viser prioner, en grå linje ingen prioner er påvist. Resultatene er vurdert i forhold til en terskel (vertikal linje). Prøvene som gir signal før denne streken er positiv, de andre er betraktet som uspesifikk (negative).

Fra denne figuren ser man igjen at bank voles substratet er den beste og at RT QuIC med den påviser prioner når andre metoder ikke klarer å påvise prioner.

Disse resultatene blir snart tilgjengelige i Scientific Report, vi jobber nå med revisjonen av manuskriptet. (Edoardo Bistaffa#, Tram Thu Vuong#, Federico Angelo Cazzaniga, Linh Tran, Giulia Salzano, Giuseppe Legname, Giorgio Giaccone, Sylvie L. Benestad, Fabio Moda. Use of different RT-QuIC substrates for detecting CWD prions in the brain of Norwegian cervids. In revision Scientific Reports.)

6- Konklusjon:

Hovedmålet med prosjektet var å etablere RT QuIC metoden for å kunne påvise prioner i avføring til hjortedyr infiserte med CWD. Vi baserte oss om publikasjoner som beskrev RT QuIC påvisning prioner i avføring. Det er sannsynlig at protokollene fungerte bra på avføring av hjortedyr eksperimentelt infisert med CWD og hold under kontrollert forsøksdiett, mens avføring fra ville dyr i felt inneholder tydelig flere hemmere og andre substanser som interferer med testen. Tross for intensive forsøk har vi ikke klart å kontrollere disse faktorene i prosjektperioden og kunne derfor ikke anse metoden som pålitelig for påvisning av prioner i avføring hos ville hjortedyr.

RT-QuIC protokollen testet i parallell på slutten av prosjektperioden på Veterinærinstituttet i Oslo og Besta Instituttet i Milano med bruk av en ny recPrP substrat fra klatremus (bank vole) åpner allikevel nye muligheter for å detektere små mengder av prioner hos norske hjortedyr infiserte med CWD. Imidlertid blir en lang optimaliseringsperiode nødvendig for å eventuelt anvende metoden til påvisning av prioner i avføring, som viser seg å være mye mer utfordrende enn opprinnelig planlagt.