

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd**

Lidská prionová onemocnění

Bakalářská práce

Praha, 2007

Eva Parobková

Lidská prionová onemocnění

Bakalářská práce

Eva Parobková

Obor: Zdravotnická bioanalýtika

Vedoucí práce: Prim.MUDr.František Koukolík, DrSc

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Praha

srpen 2007

Za odborné vedení práce děkuji prim.MUDr.Františkovi Koukolíkovi,
DrSc.

Za podporu a inspiraci děkuji vedoucí laborantce patologického oddělení
Marcele Štecherové.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a na
základě uvedených pramenů a literatury.

Eva Parobková

Praha, srpen 2007

Obsah

1. Teoretická část	9
1.1. Co je to prion.....	9
1.2. Prionové bílkoviny	9
1.3. Typy prionů	10
1.4. Prionové choroby	11
1.4.1. Historie onemocnění.....	11
2. Lidská prionová onemocnění.....	11
2.1. Sporadická Creutzfeldtova- Jakobova nemoc.....	12
2.2. Iatrogenní Creutzfeldtova- Jakobova nemoc.....	13
2.3. Familiární Creutzfeldtova- Jakobova nemoc.....	13
2.4. Nová varianta Creutzfeldtovy- Jakobovy nemoci	14
2.4.1. Teorie vzniku prionových onemocnění	14
2.4.2. Možnosti přenosu infekčních prionů	14
2.4.3. Situace v České republice	15
2.5. Gerstmann-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom.....	15
2.6. Kuru	15
2.7. Fatální familiární a sporadická insomnie	16
2.8. Opatření Evropské unie	17
3. Diagnostika.....	19
3.1. Definitivní diagnóza lidských prionových chorob.....	19
3.2. Vyšetřovaný materiál.....	19
4. Pracovní postupy.....	20
4.1. Neurohistologické vyšetření.....	20
4.2. Metoda hematoxylin eosin:	20
4.3. Metoda luxolovou modří (LUX):.....	21
4.4. Metoda NOR:	22
4.5. Imunohistochemické vyšetření:.....	22
4.6. Genetické vyšetření	25
4.6.1. Metody užívané k analýze mutací	26
4.6.2. Sekvenování.....	26
5. Závěr	Chyba! Záložka není definována.

Užité zkratky

BSE	-	bovinní spongiformní encefalopatie
CNS	-	centrální nervová soustava
EU	-	Evropská unie
FFI	-	fatální familiární insomnie
GSS	-	Gerstmann-Sträusslerův -Scheinkerův syndrom
IHC	-	imunohistochemie
NRL TSE	-	Národní referenční laboratoř pro transmisivní spongiformní encefalopatie
PCR	-	polymerázová řetězová reakce
PRNP	-	prionový protein
SRM	-	specifický rizikový materiál
TSE	-	transmisivní spongiformní encefalopatie
vCJN	-	nová varianta Creutzfeldtovy Jakobovy nemoci

Souhrn

Lidské prionové choroby, Creutzfeldtova-Jakobova nemoc (CJN) sporadická, familiární, iatrogenní i její nová varianta, Gerstmann-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom, fatální familiární i sporadická insomnie a kuru jsou velmi vzácná, vždy smrtící onemocnění, epidemiologicky, historicky, klinicky a neurobiologicky závažná. V čerstvé paměti je epidemie bovinní spongiformní encefalopatie (BSE), která decimovala anglické chovy. BSE se přenesla do Evropy a vyskytuje se i v České republice. Spletitá historie poznávání prionových nemocí začala r. 1738, není ukončena dodnes. Objev povahy agens změnil představy o infekčních chorobách, objev replikace agens, změnil představu o základním biologickém dogmatu. Oba objevy získaly svou Nobelovu cenu. Odolnost prionů vůči všem běžným metodám desinfekce a s tím spjatá rizika jsou důvodem povinného dohledu nad výskytem prionových nemocí v Evropě a Číně. Národní referenční laboratoř lidských prionových chorob (NRL) byla založena r. 2001 při oddělení patologie Fakultní Thomayerovy nemocnice s poliklinikou. Roku 2003 byla NRL zařazena do evropské sítě laboratoří dohlížejících na prionová onemocnění.

Summary

Human prion diseases i.e. Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) sporadic, familial, diseases accidentally transmitted (iatrogenic), Gerstmann-Sträussler-Scheinker's syndrome, fatal familial and sporadic insomnia and kuru are rare , always fatal fascinating historically, clinically and neurobiologically and important epidemiologically. The bovine spongiform encephalopathy which decimated England animal husbandry is in recent memory. The BSE has found its way in Europe, the Czech Republic included. Sinuous history of research of prion diseases which started at 1738 continues until today. The discovery of nature of prions changed the concept of infectious diseases. The disclosure of probable prion replication changed fundamental biological dogma. The Nobel Price awarded both of these breakthroughs (Carleton Gajdusek 1976, Stanley Prusiner, 1997). The prion's resistance toward common disinfection is the reason why there is obligatory surveillance of prion diseases in Europe. National Reference Laboratory of Human Prion Disease of the Czech Republic (NRL) was founded 1.7.2001 at the Department of Pathology of Thomayer's Teaching Hospital. NRL was included in the network of European prion surveillance laboratories in the year 2003.

Úvod

Prionová onemocnění neboli přenosné, čili transmisivní spongiformní encefalopatie jsou vždy smrtící, historicky, klinicky i neurobiologicky vzácná onemocnění postihující lidi a zvířata. Představitelem těchto chorob u lidí jsou sporadická a variantní Creutzfeldtova-Jakobova nemoc. Pro prionové choroby je typická akumulace abnormálního prionového proteinu PrP^{Sc} ve formě amyloidních plaků v centrálním nervovém systému. Záchyt každého, byť jen možného, nebo pravděpodobného případu lidských prionových onemocnění, může znamenat ztrátu nejméně jednoho lidského života, náročná hygienická opatření, bedlivou klinickou ostražitost i složitou a nákladnou diferenciální diagnostiku spočívající ve vyšetření pacienta na příslušném oddělení Neurologické kliniky Fakultní Thomayerovy nemocnice v Praze.

Národní referenční laboratoř lidských prionových chorob byla založena r. 2001 při oddělení patologie Fakultní Thomayerovy nemocnice s poliklinikou. Roku 2003 byla NRL zařazena do evropské sítě laboratoří dohlížejících na prionová onemocnění. Její dobudování r. 2006 spolu s nejmodernějším vybavením umožňuje neurohistologickou, imunologickou a molekulárně genetickou diagnostiku a diferenciální diagnostiku lidských prionových a dalších neurodegenerativních nemocí.

1. Teoretická část

1.1. Co je to prion

Pojem prion vytvořil roku 1982 Prusiner, označoval jím malé bílkovinné infekční částice, které jsou odolné vůči inaktivaci postupy, které mění nukleové kyseliny.

Prion je zkratka pro proteinaceous infectious particle. Jde o infekční agens, které nenesou genetickou informaci uloženou v nukleové kyselině. Jak jsou ale priony syntetizovány? Byly navrženy tři možnosti. První možnost tvrdí, že by přece jen mohly priony obsahovat nukleovou kyselinu, která však určitým způsobem uniká naší detekci. Tato možnost je však při současném stupni poznání o prionech nepravděpodobná.

Nabízí se druhá možnost, tedy že priony mohou nějakým způsobem specifikovat svoji aminokyselinovou sekvenci. To by se mohlo dít např. pomocí tzv. reverzní translace, tj. zpětného přepisu informace z hotového prionového proteinu do nukleových kyselin, případně by priony mohly přímo katalyzovat svoji vlastní syntézu. Ani jedna z těchto dvou možností však zatím nebyla pozorována, jejich objev by znamenal převrat v molekulární biologii.

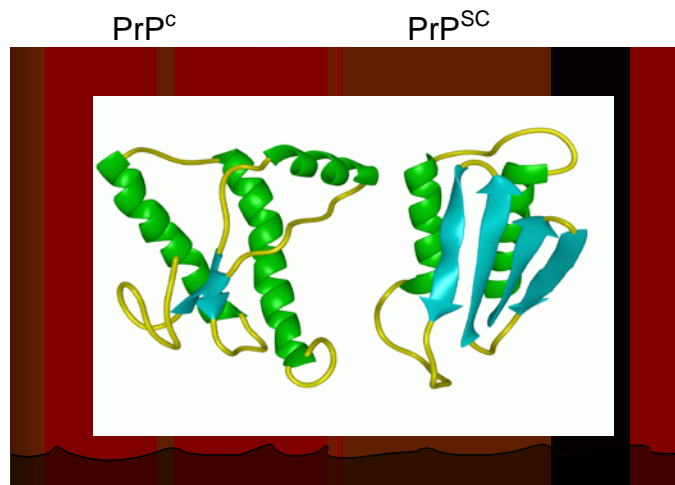
Konečně je tu třetí možnost: vnímavé buňky nesou gen, který kóduje odpovídající prionový protein. Teprve infekce těchto buněk prionem způsobí aktivaci tohoto genu. Poslední hypotéza se jeví jako nejpravděpodobnější.

1.2. Prionové bílkoviny

Nervové buňky savců obsahují prionové bílkoviny (PrP, případně PrP^C pro zdravou buněčnou bílkovinu). Má se zato, že tyto prionové bílkoviny hrají důležitou úlohu při odpočinku a spánku, možná i pro tvorbu dlouhodobé paměti. Priony se nacházejí na buněčné membráně řady buněk. Na 20 chromozomu člověka je lokalizován gen, který vznik prionového proteinu kóduje. Obdobnou bílkovinu vytváří i jiné organismy. Této bílkovině říkáme buněčný nebo také prionový protein PrP^C. Patologický PrP^{Sc} (Sc od scrapie, neboli klusavky) je vlastně patogenní forma normálního prionu.

Na primární úrovni se obě formy shodují (mají stejné pořadí AK), rozdíl mezi prionem a prionovým proteinem nacházíme na úrovni sekundární, je dán

konformací: v prionech se oproti prionovým bílkovinám vyskytuje větší podíl β -skládaných listů. Patologické priony bohaté na struktury β -skládaného listu mají tendence agregovat a vytvářet fibrily. Jinými slovy, prion je odlišně poskládaná prionová bílkovina.



Obrázek č. 1. Molekulární model struktury

Toto jiné poskládání mu však propůjčuje vražedné vlastnosti:

- vykazují vysokou tendenci ke shlukování (shluky prionů se vyskytují buď přímo v nervových buňkách nebo v mezibuněčných prostorech)
- jsou velmi odolné: vůči teplotě, UV záření, nízkému pH, rozpouštěd-
lům (infekce je schopný prach po vystavení teplotě 600°C suchého
tepla!)
- odolávají proteázám (enzymy, které štěpí bílkoviny)
- recept na zničení: 130°C vlhkého tepla při tlaku 3 bary po dobu 20
minut, ale také např. Savo.

1.3. Typy prionů

Subklasifikace prionů na základě strukturálních charakteristik, které definují jejich patologický profil:

- liší se inkubační dobou a neuropatologickými znaky, i když jsou způsobeny stejným proteinem (PrP^{Sc})
- existence různých typů prionů: jsou chemicky identické, ale odlišují se konformací

Jednotlivé typy prionů mají specifické cílové tkáně, inkubační dobu a patogenezí.

1.4. Prionové choroby

Transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE), neboli prionová onemocnění tvoří skupinu neurodegenerativních chorob postihující zvířata a lidi. Jejich poznání má dlouhou a složitou historii.

1.4.1. Historie onemocnění

Nejstarším známým onemocněním je scrapie(klusavka) postihující ovce, popsána byla roku 1738. Nově popsané prionové choroby zvířat jsou encefalopatie norků (1947), chronické kachektizující onemocnění losů a jelenů (CWD, 1967), kočičí spongiformní encefalopatie (FFE, 1990), bovinní spongiformní encefalopatie (BSE, 1986), a stejné onemocnění dalších desítek zvířecích druhů v evropských zoologických zahradách včetně bizona a tygra (1986). V roce 1936 byla scrapie přenesena na zdravé ovce a kozy. Nápadná byla dlouhá inkubační doba. Předpokládalo se, že příčinou onemocnění je virus.

Nejvíce případů se objevovalo na mléčných farmách v jižní Anglii, tedy v oblasti, kde jsou krávy chovány na mléko. Chudší oblasti severní Anglie a Skotska byly nemocí šílených krav postiženy podstatně menší mírou.

2. Lidská prionová onemocnění

Lidská prionová onemocnění jsou sporadická, familiární a iatrogenní Creutzfeldtova-Jakobova nemoc, nová varianta CJN, Gerstmann-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom, kuru, fatální familiární insomnie.

Creutzfeldtovu - Jakobovu nemoc nezávisle na sobě poprvé popsali v roce 1920, rakouský neurolog Alfons- Maria Jakob a německý neurolog Hans Bernard Creutzfeldt. Oba lékaři uveřejnili popis šesti případů degenerativního onemocnění mozku , které nazvali spastická pseudoskleróza. Později byl ale onemocnění přisouzen název uznávající zásluhy obou lékařů. Nemoci se začalo říkat Creutzfeldtova- Jakobova nemoc. CJN postihuje obvykle lidi ve věku kolem padesáti let. Zřídka se s ní setkáváme u lidí mladších než čtyřicet roků a těch, kteří překročily osmdesátku.

Prvními příznaky mohou být drobné výpadky paměti. V počátečních stádiích jsou také časté změny nálady, ztráta zájmu o okolí a neochota účastnit se společenského života. Následuje pokles pracovní výkonnosti s tím, jak se pro nemocného stávají stále složitějšími i úkoly, které dosud hravě zvládal. V této fázi se může choroba jevit jako deprese. Během několika týdnů nemocný ztrácí stabilitu při chůzi, trpí poruchami vidění, mohou se dostavit i halucinace. Choroba poznamenává i řeč. Člověk mluví pomalu, nezřetelně vyslovuje a při konverzaci s obtížemi hledá vhodná slova. Pak události nabere rychlý spád. Nemocný neudrží moč, jeho pohyby jsou trhavé a roztřesené, končetiny mu tuhnou. Nakonec se už nedokáže ani pohybovat ani mluvit.

Proces se sice pomalu, ale nezadržitelně šíří mozkovou tkání, není doprovázen imunitní odezvou, ale mikroskopický obraz poškozené tkáně je typický pro spongiformní encefalopatie.

2.1. Sporadická Creutzfeldtova- Jakobova nemoc

Sporadická CJN se vyskytuje ve všech zemích světa, kde je možno tuto chorobu diagnostikovat. Odhadovaný výskyt je 1 případ/milion lidí/rok. V městské populaci a populaci lidí starších než 65 let jakož i v populaci psychiatrických léčeben může být její výskyt až 5x vyšší. Příčina růstu počtu případů je nejasná. Diskutuje se možnost lepšího poznávání choroby, iatrogenního přenosu a přenosu prionové zoonózy (Glatzel et al.,2002).

Mezi CJN a scrapie nebyl doložen epidemiologický vztah. Příčina sporadické CJN je neznámá. Předpokládá se možnost spontánní konverze PrP nebo somatické mutace. V některých rodinách se vyskytují jak případy splňující kritéria CJN i GSS (viz níže), tak atypické případy, které je nesplňují. U těchto atypických prionových chorob se nemusí objevit neurohistologické diagnostické znaky jako je spongiformní encefalopatie, ale imunohistochemické změny bývají pozitivní. Klinické diagnóze napomáhá zjištění proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku (green et al.,2001). Klinické příznaky těchto atypických prionových chorob zahrnovaly v rozličných kombinacích progresivní demenci, choreu, myoklonus extrapyramidové příznaky, pseudobulbární příznaky, epileptiformní křeče i amyotrofické změny (Collinge, 2001). Střední dožití od prvních příznaků bývá kratší než 12 měsíců.

2.2. Iatrogenní Creutzfeldtova- Jakobova nemoc

V současnosti se užívá termín náhodně přenesená. Byla způsobena transplantací rohovky, užitím nedostatečně sterilizovaných intracerebrálních elektrod, transplantací dura mater, dále užitím růstového hormonu a gonadotropinu získaného z kadaverózních hypofýz (Prusiner, 2001, Report, 1997). Prionové choroby jsou s ohledem na mimořádnou odolnost prionů vůči běžným desinfekčním prostředkům, dlouhou inkubační dobou, pravděpodobnou infektivitu již v průběhu inkubace těžkým epidemiologickým problémem všech operačních oborů i transplantační medicíny, což dokázal nedávný britský případ pacienta, jemuž byla provedena appendectomie. Nástroje byly sterilizovány obvyklým způsobem, jež ponechávají priony nedotčené. Šest měsíců poté propukly u pacienta příznaky vCJN.

Případy, které byly důsledkem intracerebrálních nebo intraokulární inokulace, jsou klinicky blízké klasické CJN s rychle progredující demencí. Inkubace po transplantaci dura mater se pohybovala mezi 19-46 měsíci, inkubace po periferní inokulaci byla v průměru 15ti let. V České republice jsou známy dva případy následného užití nástrojů kontaminovaných při mozkové biopsii u pacientky postižené v této době nediodagnostikovanou sCJN.

2.3. Familiární Creutzfeldtova- Jakobova nemoc

Familiární podoba CJN je způsobena mutacemi PRNP. Diagnostikuje se na základě neuropsychiatrických příznaků, z nichž lze vyvodit pravděpodobnou, možnou, případně definitivní diagnózu CJN, dále na základě pravděpodobné, možné nebo definitivní diagnózy CJN u příbuzného a na základě zjištění mutace PRNP charakteristické pro takové onemocnění.

Rodokmeny postižené těmito onemocněními se vyskytují v oblasti Kysuce a na jižním Slovensku s přesahem do přilehlé oblasti Maďarska. (Mítrová, 1999).

Přibližně 15% případů CJN je dědičných. U všech dosud známých familiárních případů byly zjištěny mutace genu pro prionový protein (PRNP), v současnosti je jich známo více než 20. Tato mutace je důsledkem substituce jedné aminokyseliny PrP, v jednom případě byl zastížen stop kodon, důsledkem byl rozvětvený PrP.

U těchto onemocnění jde o autosomálně dominantní typ dědičnosti. Případy těchto prionových chorob je možno diagnostikovat analýsou PRNP. Genetickým klíčem vnímavosti vůči sporadickým a získaným prionovým chorobám je PRNP polymorfismus v oblasti kodonu 129, kde je kódován buď methionin nebo valin. Většina chorob postihuje homozygoty.

2.4. Nová varianta Creutzfeldtovy- Jakobovy nemoci

Nová varianta CJN - je to lidská obdoba nemoci šílených krav a byla původně popsána na 10 případech, které byly výsledkem epidemiologického dohledu nad výskytem CJN ve Spojeném království. Smyslem dozoru bylo ověřit výskyt této nemoci ve vztahu k epidemii BSE, která v této zemi začala v roce 1986.

2.4.1. Teorie vzniku prionových onemocnění

Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) se objevila ve Velké Británii. První případy byly zaznamenány v roce 1985. Dnes se vyskytuje v řadě zemí, např. Švýcarsku, Francii, Španělsku, Portugalsku, Německu a České republice.

Jedna skupina expertů je přesvědčena, že se priony dostaly do nedostatečně chemicky a tepelně zpracované masokostní moučky z ovčí uhynulých na scrapii.

Druhá velká skupina expertů viní ze vzniku BSE priony skotu. Zastánci této teorie předpokládají, že nejprve musely vzniknout v těle některých kusů skotu priony zcela spontánně, podobně jako v případech sporadické Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci lidí, například mutací nebo spontánní konformací. Když toto zvíře pošlo nebo bylo zabito pro chatrné zdraví, dostalo se jeho tělo do masokostní moučky, kterou byly nakrmeny další krávy.

2.4.2. Možnosti přenosu infekčních prionů

Lasmézas et al.(2001) doložil, že BSE lze přenést mezi primáty intravenózní cestou. BSE priony se adaptují na makaky a byly zjištěny jak v případech vCJN v Británii, tak i ve Francii.

Předpokládá se, že přenos prionů BSE na lidi je alimentární (konzumací mozku, míchy, některých mízních uzlin, sleziny, brzlíku nebo morkových kostí

z kusu nakaženého BSE). Odhaduje se, že do lidského potravního řetězce se dostalo před rokem 1986 asi 50 000 kusů infikovaných zvířat, podstatně větší počet poté. Zákaz užívání rizikových součástí z porážek byl ve Spojeném království vysloven r. 1989.

Pravděpodobnost přenosu záleží na individuální dávce, genetické vnímavosti a výši mezidruhové bariéry mezi hovězím dobyt看kem a člověkem. Předpokládá se, že ta je závislá na odlišných genotypech PRNP. Podle dosavadních zjištění jsou vnímaví jen homozygoti met-met na 129 kodonu PRNP, což je asi 37% dosud vyšetřované populace. Mechanismus, jimž se priony dostávají do CNS, je nejasný. Primární cílovou tkání při alimentárním přenosu by mohla být lymforetikulární tkáň zažívací trubice a sleziny.

Dnes už máme téměř stoprocentní jistotu, že vCJN vyvolávají priony skotu a že to je vlastně lidská forma nemocí šílených krav.

2.4.3. Situace v České republice

BSE v Čechách: veterináři zjistili v ČR první kus dobytka nakažený BSE v roce 2001, ještě též rok přibyl druhý případ. V roce 2002 se objevila opět dvě nakažená zvířata. V roce 2003 byly zjištěny čtyři případy, v roce 2004 sedm. Zatímco předloni bylo v ČR zjištěno osm případů BSE, což bylo nejvíce za dobu, kdy se na nemoc šílených krav porážený skot vyšetřuje, loni se v tuzemsku vyskytly pouze tři případy a letos zatím jeden.

2.5. Gerstmann-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom

GSS je autosomálně dominantní onemocnění, které se klinicky projevuje mozečkovou ataxií s pyramidovými příznaky, později nastupuje demence, která nemusí být hluboká. Kromě těchto příznaků se také objevuje dysfagie, dysarthrie, hyporeflexie. Průběh onemocnění je obvykle pětiletý. První příznaky se objevují ve třetí nebo čtvrté dekádě života. Jde o syndrom, jenž je důsledkem několika druhů mutací.

2.6. Kuru

V horských pralesích východní Nové Guineje byla po druhé světové válce objevena u příslušníků kmene Fore choroba označovaná jako kuru. V té době bylo kuru zodpovědné za plnou polovinu úmrtí mezi forejskými ženami.

Choroba nastupovala téměř nepozorovaně, prvními příznaky byly závratě a chvilková slabost. Následovaly úporné bolesti hlavy, křeče v nohou a nezvládnutelný třes. Muži obvykle boj s chorobou záhy vzdali, přestali jíst a buď zemřeli hladu nebo jiným způsobem. Oběti kuru umírají obvykle do dvou let od okamžiku, kdy se u nich objeví první příznaky nemoci. Lékaři tohoto území byly přesvědčeni, že nejde i infekční chorobu, ale prokletí ze strany šamanů. Později Gajdusek zkoumal mozky obětí kuru dovezené z Nové Guineje a konstatoval, že kuru patří mezi choroby způsobené zvláštními viry.

Kuru se šířilo rituálním kanibalismem. Foreové provozovali kanibalismus jen jako součást pohřebních obřadů.

Kuru postihuje obě pohlaví, častěji však ženy a děti. Nejmladší postižené děti byly pětileté, nejstarším nemocným bylo více než 60 let. Onemocnění trvá v průměru 12 měsíců. Klíčovým příznakem je progresivní ataxie mozečku (slovo kuru označuje v místním jazyce třes). Demence se obvykle nevyvíjí. Předpokládá se, že pramen kuru byl případ sporadické CJN na počátku 20. století. Inkubační doba kuru je nejčastěji kolem 12 let, může přesáhnout 40let.

2.7. Fatální familiární a sporadická insomnie

FFI se projevuje nespavostí a dysautonomií, později se objevuje ataxie, dysarthrie, myoklonus a pyramidové příznaky. V závěru onemocnění je insomnie úplná, doprovázejí je demence, rigidita, mutismus.

Příčinou v obou případech je mutace D178N genu PRNP asociovaná s methioninovým kodonem 129 na stejné alele (Medori et al., 1992). V České republice nebyla FFI zastižena.

Nemoc	Rok prvního popisu	Způsob nákazy	Průměrný věk	Inkubační doba	Symptomy
KURU	1957	kanibalismus	jakýkoliv	2-40 let	ataxie
CJD	1920	spontánní (~90%)	55-70	1,5-30 roků	ataxie, demence
		iatrogenní (1%)	jakýkoliv		
		hereditární (5-15%)	střední		
GSS	1936	hereditární	střední	-----	ataxie, demence
FFI	1986	hereditární	střední	-----	poruchy spánku

Tabulka č. 1 Prionové choroby (100% mortalita)

2.8. Opatření Evropské unie

Evropská unie vytvořila v srpnu 2000 seznam zemí, v nichž je riziko nákazy krajně nepravděpodobné. Je to např. Argentina, Austrálie, Nový Zéland, Chile, Norsko. V zájmu ochrany spotřebitele by měli masné závody dát vyšetřit všechny jednotlivé kusy dobytka na přítomnost BSE, což je prakticky nereálné. Avšak ani potom by nebylo riziko 100% vyloučeno, protože dosavadní testy neprokáží infekci, zejména u mladších zvířat.

Od prvního října 2000 musí být ve všech 15 členských zemích EU odstraňován z jatečně opracovaných těl skotu, ovcí a koz specifický rizikový materiál. Mezi tento materiál se řadí lebka, mandle, mícha, úseky tenkého střeva.

Rozhodnutí komise EU 29.01.2000 k úpravě použití určeného materiálu živočišného původu s ohledem na riziko přenosu BSE a ke změně rozhodnutí 94/474/EG nařizuje všem členským státům zabránit aby se živočišné tkáně potenciálně infikované původcem BSE od 1. října 2000 nedostávaly do potravního a krmivového řetězce. Pro dovoz masa z třetích zemí platí odpovídající úprava od 1. dubna 2001. Odstraňování tzv. specifického rizikového materiálu (SRM) v

rámci zemí EU a uhynulých zvířat z krmivového řetězce snižuje riziko rozšiřování BSE ve stádech zvířat, odstraňování z potravního řetězce snižuje riziko BSE pro spotřebitele. První případ BSE v Dánsku, zjištěný v březnu tohoto roku dále osvětlil, jak je nezbytné bojovat cíleně proti přenosu BSE ve všech zemích EU. Ve všech členských státech odstraňují jatky a asanační ústavy tyto tkáně:

lebku (včetně mozku a očí), tonzily a míchu ovcí a koz starších 12 měsíců slezinu ovcí a koz všech věkových kategorií.

Ve Velké Británii a v Portugalsku (v těchto zemích existuje zvýšené riziko BSE) musí jatka a asanační ústavy odstraňovat navíc tento materiál: celou hlavu (bez jazyka, ale s mozkem, očima a tonzilami), brzlík, slezinu, vnitřnosti a slezinu skotu staršího 6 měsíců páteř včetně spinálních ganglií skotu staršího nad 30 měsíců. Rozhodnutí dále zakazuje od 31. 12. 2000 stanovené jateční techniky, u kterých se může dostat tkáň infikovaná původcem BSE do krevního řečiště a takto kontaminovat krev.

Odebraný rizikový materiál se obarví a zcela zničí. Lze jej buď ihned spálit nebo zpracovat v asanačním ústavu a následně spálit nebo zahrabat na schválených skládkách. Povoleno je přepravovat tento rizikový materiál do jiných členských států za účelem spálení. Po smrti pacienta, u kterého byla potvrzena TSE nebo u kterého existovalo podezření na TSE, se podle rozhodnutí ministerstva zdravotnictví z prosince 2000 zřídila Národní referenční laboratoř pro transmisivní spongiformní encefalopatie (NRL TSE) ve Fakultní Thomayerově nemocnici v Praze.

Každý, i suspektní případ lidské přenosné TSE (CJN, vCJN) podléhá povinnému hlášení dle zákona a hlásí se do spádové hygienické stanice standardním způsobem včetně převozu těla na speciální pracoviště ve Fakultní Thomayerově nemocnici v Praze.

3. Diagnostika

3.1. Definitivní diagnóza lidských prionových chorob

Definitivní diagnóza lidských prionových chorob je založena na neurohistologickém vyšetření doplněném imunohistochemickými metodami, genetickým vyšetřením a metodou westernblot, které ověřují přítomnost prionů ve tkáni. Klasickou neurohistologickou trojicí změn při prionových nemocech je spongiformní dystrofie, numerická atrofie neuronů a glióza. Spongiformní dystrofii charakterizují vakuoly v neuropilu jejichž průměr je 2–20 μm . Objevují se ložiskově, je nutné odlišit je od artefaktů a od vakuol, které se objevují v horních korových vrstvách při různých příčinách korové atrofie. Imunohistochemické vyšetření užívá různé typy protilátek ozřejmujících výskyt prionů ve tkáni. Vysoce charakteristické je, že priony ve tkáni nevyvolávají zánětlivou odpověď, což byl jeden z důvodů dlouhého tápání při objasňování povahy této nemoci. Nález při vCJN se od změn při sCJN odlišuje histologicky i imunohistochemicky. Novou variantu CJN charakterizuje velký počet „floridních“ plak v kůře mozku i mozečku, shluky malých plak v imunohistochemickém obraze, amorfni pericelulární a perivaskulární kupení PrP, těžké spogniformní změny a perineuronální a axonální kupení PrP v neostriatu, výrazná astrocytóza a numerická atrofie neuronů v zadních talamických jádrech a mezencefalu, perineurální a retikulární kupení PrP v šedé hmotě kmene a spinální míchy. Kromě toho odlišuje vCJN od sCJN i analýza westernblotu (Ironsides et al., 2000).

3.2. Vyšetřovaný materiál

Materiálem k potvrzení či vyloučení diagnózy CJN je mozková tkáň získaná jen vzácně biopsií, obvykle při kompletní autopsii. Při odběru tkání je povinností používat ochranný oděv na jedno použití včetně chirurgické čepice, pláště, zástěry, dvojité rukavice a clony na oči. Nástroje na jedno nebo více použití jsou doporučeny pro minimalizaci rizika kontaminace životního prostředí. Používá se pouze manuálních pil. Pro práci s těmito tkáněmi musí mít laboratoř vyčleněný laboratorní prostor, zařízení, nástroje, sklo a reagensy.

Odebraný mozek se nejprve fixuje v 10% roztoku formalinu a po 4 – 6 týdnech tvrzení se tkáň přikrojí. Vlastní přikrojení materiálu se provádí ve speciálních hazard boxech s laminárním prouděním vzduchu. Je třeba poznamenat, že tkáně fixované formaldehydem nebo glutaraldehydem si zachovávají nakažlivost po dlouhá období, ale nikoli nekonečně. Proto tkáně považujeme za infekční po celou dobu procesu fixace, implantace, krájení, barvení a přenesení na mikroskopické sklíčko, dokud nebudou vystaveny působení kyseliny mravenčí. Působení kyseliny mravenčí snižuje nakažlivost na zanedbatelnou úroveň. Působení kyseliny mravenčí spočívá v umístění malých kousků fixované tkáně do 50-100ml 95% kyseliny mravenčí na jednu hodinu, a poté jejich přemístění do čerstvého formalinu na další dva dny před dalším zpracováním.

Všechny následné kroky, které jsou součástí přenášení bloků z formalinu do etanolu na 24 hodin a poté do parafinu, jsou prováděny manuálně nebo v automatickém procesoru pro tkáně TSE. Je také nutno vyčlenit mikrotom pro krájení bloků tkáně, která není vystavena působení kyseliny mravenčí. Části vystavené působením kyseliny mravenčí mohou být krájeny na standardním mikrotomu.

4. Pracovní postupy

4.1. Neurohistologické vyšetření.

Nejprve se zhotovují řezy krájené na výše uvedeném mikrotomu silné asi 4mi, které se barví jednak metodou hematoxylin eosin, luxolovou modří a konečně metodou na organizátory jadérek (NOR).

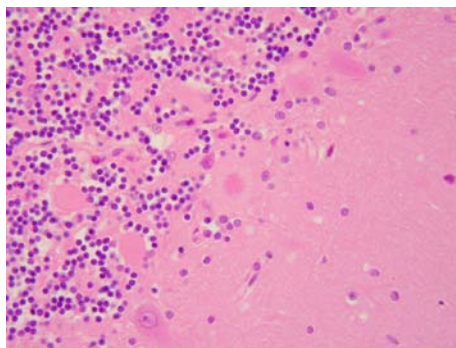
4.2. Metoda hematoxylin eosin:

Hematoxylin je nažloutlý prášek, který sám o sobě nebarví, teprve po oxidaci v hematein. Oxidaci urychlujeme nejčastěji jodičnanem sodným nebo draselným. Po přidání mořidla hlavně kamenců(kamenec draselný a železitý) připravíme barevný lak hemateinu. Z kamencových hematoxylinu se nejčastěji používáme Mayerův hematoxylin. Eosin se rozpouští v alkoholu a používáme ho jako 1%-0,5%roztoku v 96%alkoholu.

K barvení používáme vodných roztoků barviv a proto musíme řezy nejprve zbavit parafínu odparafínováním následujícím způsobem:

- xylén 15 minut
- 96% alkohol
- 96% alkohol
- 80% alkohol
- 70% alkohol
- 50% alkohol
- 40% alkohol
- destilovaná voda

Odparafínované řezy vyprané v destilované vodě barvíme hematoxylinem 10 minut. Obarvené řezy opláchneme v destilované vodě a dále barvíme eosinem 1 minutu. Obarvené řezy odvodníme dvěma lázněmi 96% alkoholu, aceton, aceton/xylén a projasníme dvěma lázněmi xylénu po 1 minutě. Každý takto obarvený preparát uzavíráme neboli montujeme mezi podložní a krycí sklíčko do uzavíracího média (solakryl).



Obrázek č. 2. Metoda HE -floridní plaky

4.3. Metoda luxolovou modří (LUX):

Barvení LUX je pohodlné barvení se spolehlivými výsledky. Jako u předchozího barvení je nutno řezy odparafínovat stejným způsobem. Luxolovou modř používáme jako 0,1% v 96% alkoholu a necháme působit 2 hodiny. Následuje diferenciací: 96% alkohol, 70% alkohol, 0,05% roztok uhličitanu litného, destilovaná voda. Takto obarvené řezy ještě dobarvíme hematoxylinem a eosinem. Následuje odvodnění a montování.

4.4. Metoda NOR:

Jedná se o metodu impregnační, založenou na prosycování tkáně solemi těžkých kovů, nejčastěji stříbra(dusičnanu stříbrného), které se redukuje v černě zbarvené stříbro. Roztok se připravuje jako 2% roztok želatiny v 1% kyselině mravenčí a 50% vodný roztok dusičnanu stříbrného. Vše smícháme v poměru 1:2 a barvíme 2 hodiny při pokojové teplotě. Tomuto barvení samozřejmě přechází odparafínování. Opláchneme vodou a necháme 5 minut působit 5% sírnatan sodný. Poté promyjeme destilovanou vodou, projasníme a montujeme. Oblasti organizátoru jadérek jsou znázorněny jako sytě černé body v jádrech buněk.

4.5. Imunohistochemické vyšetření:

Termínem imunohistochemie označujeme všechny techniky využívající mono nebo polyklonální protilátky, kterými lokalizujeme a vizualizujeme příslušné tkáňové antigeny. Průkaz prionového proteinu provádíme metodou nepřímé imunohistochemie v parafínovém řezu. Tyto nepřímé IHC metody spočívají v navrstvení jednoho a více neznačených imunoglobulinových reagens na primární protilátku. IHC reakce využívají speciální postupy jak odparafínování řezů tak samostatné reakce.

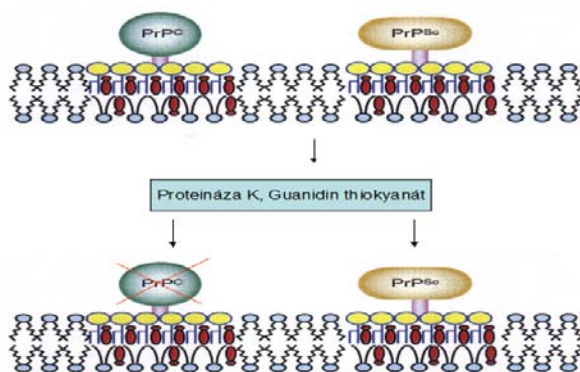
1. Deparafinace

- dvě lázně xylenu po 8 minutách
- isopropylalkohol 4 minuty
- 96% alkohol 2 minuty
- 70% alkohol
- destilovaná voda
- promýt v PBS pufru Ph 7,2-7,4

2. Blokování endogenní aktivity enzymů: pro důkaz antigen-protilátky se běžně využívají protilátky, které jsou značené enzymy (peroxidáza, alkalická fosfatáza, glukoso oxidaza a jiné). Protože se tyto enzymy přirozeně vyskytují v tkáních, mohou znehodnotit

výsledek reakce. Jako blokovací substrát použijeme 3% roztok peroxidu vodíku v destilované vodě po dobu 30 minut.

3. Demaskování antigenů: nepříznivé vlivy fixačních tekutin na tkáňové antigenní struktury se dají do jisté míry zmírnit. Je proto vhodné tkáňové řezy před dalším zpracováním ošetřit tak, aby jejich povrchy lépe nabízely antigeny primární protilátce, tzn. aby nebyly překryty jinými molekulami bránícími specifické reakce. Použití mikrovln po dobu asi 3x10 minut vstupuje do procesu revitalizace antigenních struktur tepelný efekt, který urychluje difúzi, podporuje vznik chemické reakce a stabilizuje bílkoviny. Doporučujeme řezy demaskovat v případě použití primární protilátky 2 MMOL HCl. V případě třetí protilátky Prionix tris pufr pH 6,0. Po 20 minutách chladnutí řezy ošetříme kyselinou mravenčí.
4. Před aplikováním primární protilátky je nutno řezy ošetřit proteolytickým enzymem (Proteináza K) nebo působením proteolytického činidla (guanidin thiokyanát).



Obrázek č.3 působení proteinázy K, guanidin thiokyanátu

5. Vazba primární protilátky: následuje vlastní reakce tkáňového antigenu s primární protilátkou. Vlastním principem IHC vyšetření je specifická vazba monoklonální anti-PrP^{Sc} protilátky na PrP^{Sc} v mozkové tkáni, s následnou vizualizací této vazby pomocí sekundární protilátky značené chromogenem. Metoda má více variant lišících se postupem zpracování vzorků a typem použitých protilátek. Při inkubaci protilátky s tkání v chladu a přes noc lze užít větší naředění (tj. nižší koncentraci) ve srovnání s inkubací v termostatu při 37 °C

Monoklonální protilátky:

- klon 3F4 1:25 (Dako)
- klon 12F10 1:1000 (Cayman Research)
- klon 6H4 1:2000 (Prionics)

6. Detekční systém: vazba antigenu s protilátkou ve tkáních probíhá bez viditelné reakce. Je nutno k vizualizaci lokalizace antigenu a na něj navázaných molekul v preparátu použít dalších látek, tzv. chromogenů, nejčastěji imunoenzymových. Je-li detekční komplex značený peroxidázou, používáme jako chromogen 3,3'-diaminobenzidin (DAB). Oxidací původně rozpustného DAB, který se této reakce účastní jako donor elektronů, vzniká stabilní hnědý produkt, který je nerozpustný v alkoholu a proto se během dehydratace před montováním řezů nevyplaví.

7. Barvení pozadí: ani při používání IHC technik se kvůli předběžné orientaci v preparátu často nevyhneme potřebě paralelního využití přehledných typů histologických barvení, resp. alespoň dobarvení jader v IHC preparátu, a to zejména pro lokalizaci pozitivní reakce vůči okolním známým strukturám preparátu. Proto sklíčka dobarvíme hematoxylinem

8. Dehydratace a montáž preparátu: stejným způsobem jako výše uvedené barvení hematoxylin eosin.



Obrázek č. 4 IHC barvení protilátkou 3F4

Obecně lze postup následovně shrnout:

- odběr a fixace tkáně
- krájení a napínání histologických řezů
- deparafinace
- blok aktivity endogenních enzymů
- optimalizace prezentace antigenů
- proteináza K
- guanidin thiokyanát
- vazba primární protilátky
- vazba sekundární protilátky
- detekční systém
- barvení pozadí
- dehydratace a montáž preparátu

4.6. Genetické vyšetření

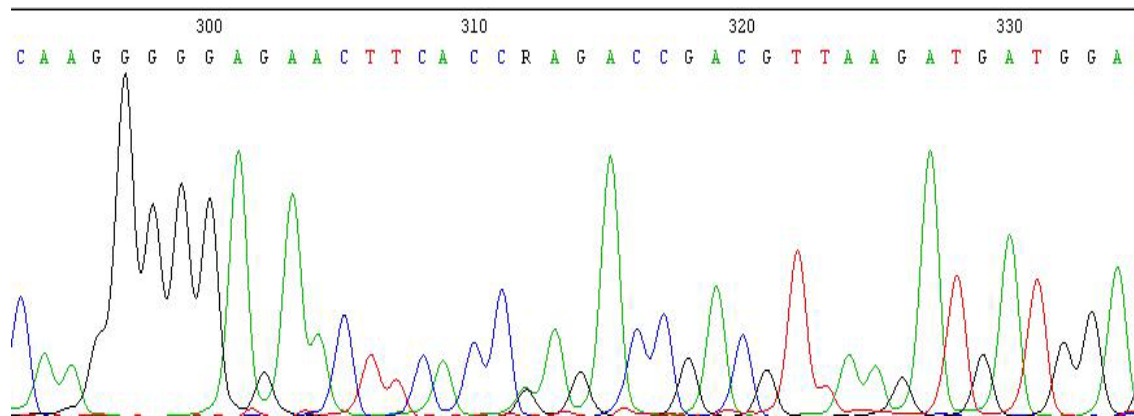
Lidský prionový gen (PRNP) je na krátkém raménku chromosomu 20. Má dva exony a jeden intron. Celá kódující část je v oblasti exonu 2. Zde se zjišťují bodové mutace a inserce v rodinách postižených dědičnými prionovými nemocemi. Mutací zjištěných u familiárních lidských prionových nemocí je více než dvacet. Příklady: mutace P102L se vyskytuje u CJN / FFI. U familiárních případů CJN na našem území jsme zatím zjistili mutaci D178N (záměna aminokyseliny aspartát / asparagin) a E200K (záměna glutamát / lysin).

4.6.1. Metody užívané k analýze mutací

Základním předpokladem úspěšné analýzy je získání dostatečného množství molekul se sekvencí, která nás zajímá. PCR je rychlá, snadno použitelná metoda pro amplifikaci určitého úseku DNA. To znamená, že vzorku obsahující celou lidskou DNA jsme pomocí PCR schopni specificky amplifikovat např. jeden jediný exon, v němž chceme hledat mutaci. Samostatná reakce probíhá ve třech základních krocích: denaturace, hybridizace primerů a enzymová syntéza nového řetězce DNA. Každý krok probíhá při specifické teplotě. Nově vzniklé i původní řetězce DNA jsou templátem pro syntézu nových řetězců v dalším kole. Amplifikace probíhá tedy exponenciální řadou. S použitím speciálních přístrojů thermocyklerů, které jsou schopny rychle a přesně měnit reakční teploty, je po 30 cyklech požadovaný úsek DNA přítomen v mnoha miliónech kopií.

4.6.2. Sekvenování

Sekvenování je analytická metoda, kterou jsme schopni číst bázi po bázi úsek DNA, který nás zajímá. Jako templát slouží obvykle PCR produkt. V reakční směsi je polymeráza, dále je přítomen jeden primer komplementární k sekvenaci templátu a směs deoxynukleotidů a dideoxynukleotidů. Polymeráza přidává na 3'konci primeru base komplementární k sekvenci templátu. Pokud se připojí deoxynukleotid, polymeráza dále pokračuje připojením další base. Pokud se připojí dideoxynukleotid je fragment ukončen. Každý ze 4 dideoxynukleotidů označen fluorescenční značkou specifické barvy. Z délky fragmentu a barvy je proto možné určit polohu a typ base. K rozdělení fragmentů a přečtení fluorescence potřebujeme přístroj sekvenátor. Jemné rozdělení fragmentů umožňuje elektroforéza v kapiláře o průměru 75 μ m. Získanou sekvenci porovnáváme s referenční sekvencí dané oblasti.



Obrázek č.5 Mutace E200K-záměna G-A.

5. Závěr

Příčina „sporadické“CJN (odlišné od vCJN) není dosud jasná. Předpokládá se buď spontánní mutace prionového genu nebo spontánní konformace prionového proteinu. Do dnešní doby zemřelo ve Velké Británii a v několika dalších zemích světa na variantní Creutzfeldtovu-Jakobovu chorobu 176 lidí.

O sporadické CJN je známo, že postihuje starší lidi a přesto, že je známa již řadu let, nikdy u ní nebyla prokázána vazba na pozření infikovaného hovězího masa. Nyní někteří výzkumníci říkají, že u několika případů sporadické CJN u lidí, kteří v osmdesátých a začátkem devadesátých let konzumovali infikovaného hovězího, by mohl být takový vztah prokázán. S velkou obavou je mezi odborníky sledován také nárůst pacientů s chorobou CJN ve Švýcarsku. Švýcarsko je jednou ze zemí, jejíž chovy skotu následně po vzplanutí BSE ve Velké Británii, byly vážně postiženy. Počet případů skotu nemocného BSE kulminoval v roce 1996. S odstupem deseti let švýcarští epidemiologové zaznamenávají náhlý nárůst CJN choroby u lidí. Není však jasné, zda jde o skutečný růst počtu případů nebo o zlepšenou diagnostickou pozornost.

Na pracovišti NRL TSE bylo klinicky vyšetřeno 98 podezřelých a z toho bylo u 49 stanovena definitivní dg CJN, u 43 případů byla stanovena dg. sporadické CJN a 6 případů familiární CJN.

Použitá literatura

Baker, Harry F., Totowa : Molecular Pathology of the prions Totowa : 2001 Humana Press , 2001, ISBN 0-89603-924-2 (váz.)

Collinge J. Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum Mol Genet* 1997;6:1699–1705

F.Koukolík: Přednášky o lidských prionových chorobách ve Fakultní Thomayerově nemocnici s poliklinikou

Gajdusek DC. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*. Sep 2 1977;197(4307):943-60. [\[Medline\]](#)

Gomolčák P.: Základy imunohistochemie v patologii. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně 2001, ISBN 80-7013-239-6

Green AJE, Thompson EJ, Stewart GE.; et al.: Use of 14-3-3- and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:744–748.

Ironside JW, Head MW, Bell JE, McCardle L. ;et al.: Laboratory diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Histopathology* 2000; 37:1–9.

Jiráček R., Koukolík F., : Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie, Praha, Galén 2004,ISBN 80-7262268-4

Koukolík F, Jiráček R. Diagnostika a léčení syndromu demence. Praha: Grada Publishing, 1999

Lasmézas, C. I.; Deslys, J. P ,Demaimay, R.; et al.: Ironside, (1996): BSE transmission to macaques. *Nature* 381,743-744.

Lorains, J.W., Henry, C., Agbamu, D.A., et al.: Variant Creutzfeldt-Jakob disease in an elderly patient. *Lancet* 2001, sv. 357, s. 1339–1340

Medori R, Tritschler JH, LeBlanc A.: Fatal familial insomnia – a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med* 1992;326:444–449.

Mitrová E. Transmissibilné spongioformné encefalopátie. Prionové choroby. Press Publica, 1999.

Prusiner SB, McKinley MP (eds.) Prions: novel infectious pathogens causing scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. San Diego: Academic Press, 1987;451–465.

TSE- prionové choroby člověka a zvířat. Sborník ze semináře Brno 2001, ústav mikrobiologie a imunologie FVL VFU Brno, mikrobiologický ústav LF MU a FN U Svaté Anny v Brně, Československá společnost mikrobiologická – regionální výbor v Praze

WHO manual for surveillance of human TSE including vCJD- World Health Organization 2003.

Seznam obrázků

Obr.č. 1: Prion protein trafficking and the development of neurodegeneration
Trends in Neurosciences, volume 26, issue 7, july 2003, pages 337

Ramanujan S. Hegde and Neena S. Rane

Obr.č.2-3: TSE- prionové choroby člověka a zvířat. Sborník ze semináře Brno
2001, ústav mikrobiologie a imunologie FVL VFU

Brno, mikrobiologický ústav LF MU a FN U Svaté Anny V Brně,
Československá společnost mikrobiologická – regionální výbor
v Praze

Obr.č.4-5: NRL prionových chorob