

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA

V NITRE

**FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV**

1 126767

VÝVOJ A ROZŠÍRENIE PRIONOVÝCH CHORÔB

2010

Mária Doruľová

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA

V NITRE

**FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV**

VÝVOJ A ROZŠÍRENIE PRIONOVÝCH CHORÔB

Bakalárska práca

Študijný program:	Udržateľné poľnohospodárstvo a rozvoj vidieka
Študijný odbor:	6.1.1 Všeobecné poľnohospodárstvo
Školiace pracovisko:	Katedra veterinárnych disciplín
Školiteľ:	prof. MVDr. Pavol Šťastný, PhD.

Nitra 2010

Mária Doruľová

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Mária Doruľová týmto vyhlasujem, že som bakalársku prácu na tému „Vývoj a rozšírenie prionových chorôb“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak hore uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre, 10. apríla 2010

.....

Pod'akovanie

Touto cestou si dovoľujem vysloviť úprimné poďakovanie vedúcemu bakalárskej práce prof. MVDr. Pavlovi Šťastnému, PhD. za odborné vedenie a cenné rady pri získavaní a spracovaní podkladových materiálov potrebných na vypracovanie bakalárskej práce.

Abstrakt

Prionové ochorenia zvierat a človeka sú známe približne 50 rokov, história siaha omnoho ďalej. Už v polovici 18. storočia bola známa choroba oviec, ktorá dostala názov scrapie - klusavka. Táto choroba vykazovala podobnosť s ostatnými chorobami, ktoré boli objavené neskôr. Pôvodca týchto ochorení je prion. Objavitel' prionu bol Stanley B. Prusiner, ktorý získal za tento objav Nobelovu cenu v roku 1997. Prion je infekčná častica zložená len z bielkoviny, neobsahuje nukleové kyseliny a je rezistentný voči agensom postihujúcim nukleové kyseliny a vyvolávajú transmisívne spongiformné encefalopatie človeka a zvierat. Transmisívne spongiformné encefalopatie sú fatálne neurodegeneratívne choroby prejavujúce sa dlhou inkubačnou dobou, postihujú mozog a sú smrteľné. Medzi najvýznamnejšie patria u zvierat scrapie a BSE. U človeka Creutzfeldova – Jakobova choroba a nový variant Creutzfeldovej – Jakobovej choroby, ktorý by mohol byť v príčinnom vzťahu s epidémiou BSE. Bolo dokázané, že nvCJD je vlastne ľudskou BSE. Cieľom tejto práce bolo zhrnúť poznatky o súčasnom stave, rozšírení a vzniku prionových ochorení, poukázať na históriu vzniku a objavenie týchto ochorení, a taktiež poukázať na dôležitosť dodržiavania legislatívnych opatrení proti šíreniu prionových ochorení.

Kľúčové slová: priony, prionové choroby, BSE, scrapie

Abstract

Prion disease to animals and humans are known about 50 years, the history goes back much further. Already in the mid-18th century was known disease of sheep, which was named scrapie - scrapie. The disease showed a similarity to other diseases which were discovered later. Inventor of the prion diseases. It was discovered by a prion, Stanley B. Prusiner, who won for the discovery of the Nobel Prize in 1997. Prion is an infectious particle composed only of protein, no nucleic acid and is resistant to agents affecting nucleic acid and cause transmissible spongiform encephalopathies in humans and animals. Transmissible spongiform encephalopathies are fatal neurodegenerative diseases occurring long the incubation times, affects the brain and are fatal. The most important are animals in scrapie and BSE. In humans, Creutzfeldt - Jakob disease and new variant Creutzfeldt - Jakob disease, which could be a causal relationship with the epidemic of BSE. It has proven nvCJD is actually a human BSE. The aim of this study was to summarize the current state of knowledge, and the extension of prion diseases, to highlight the history and the emergence of these diseases, and also highlight the importance of respecting legislation measures against the spread of prion diseases.

Keywords: prions, prions diseases, BSE, scrapie

Obsah

Úvod.....	8
1. Cieľ práce.....	9
2. Metodika práce.....	10
3. Prehľad literatúry.....	11
3.1 História prionových ochorení.....	11
3.2 Pomalé vírusové infekcie.....	12
3.3 Prionový proteín PrP.....	13
3.4 Mechanizmus konverzie PrP ^c na PrP ^{sc}	14
3.5 Priony.....	16
3.6 Prionové choroby.....	17
3.7 Prenos TSE.....	18
3.8 Diagnostika prionových chorôb.....	21
3.9 Rozdelenie prionových chorôb.....	22
3.9.1 Ľudské prionové ochorenia.....	23
3.9.1.1 Kuru.....	23
3.9.1.2 Creutzfeldtova-Jakobova choroba (CJD).....	24
3.9.1.2 Nový variant Creutzfeldtovej-Jakobovej choroby.....	26
3.9.2 Zvieracie nákazy.....	27
3.9.2.1 Scrapie.....	27
3.9.2.2 Bovinná spongiformná encefalopatia (BSE).....	30
4. Záver.....	36
5. Zoznam použitej literatúry.....	37

Úvod

Prionové ochorenia sú závažné ochorenia postihujúce zvieratá a ľudí. Tieto choroby majú dlhú inkubačnú dobu, sú smrteľné a doposiaľ nepoznáme účinnú terapiu ani špecifickú prevenciu. Vyznačuje sa demenciou a poruchami pohybu. Diagnostika vychádza z klinických príznakov a overuje sa na základe histopatologického nálezu v centrálnej nervovej sústave. Pôvodca týchto ochorení je prion, ktorý bol objavený v roku 1982. Prion je infekčná častica zložená z bielkoviny, neobsahujúca nukleové kyseliny, ktorá je svojou infekčnosťou podobná vírusom. Infekčná častica vyvolávajúca prionové ochorenia je izoforma normálnej bielkovinovej bunky. Táto bielkovina je prítomná u väčšiny živočíšnych druhov. Prionové choroby sa rozdeľujú podľa pôvodu na choroby vyskytujúce sa u ľudí a u zvierat. Medzi najznámejšie zvieracie ochorenia patrí scrapie a BSE. Scrapie bola objavená už v polovici 18. Storočia. Táto choroba postihuje ovce a názov bol odvodený od „to scrape“ – škrabať. BSE bolo po 1. krát zaznamenané v roku 1984 v Anglicku. S epidémiou BSE sa spája aj vznik nového variantu Creutzfeld – Jakobovej choroby (nvCJD) u ľudí, pretože prionový kmeň vyvolávajúci nvCJD je totožný s kmeňom, ktorý vyvoláva BSE. To znamená, že bola prelomená medzidruhová bariéra. V súlade s tým bolo prijatých niekoľko opatrení na zabránenie šíreniu BSE. V roku 1988 bol vydaný zákaz obohacovať krmivo pre dobytok proteínmi pochádzajúcimi z prežúvavcov. Od tohto roku sa stalo hlásenie chorých zvierat povinným a všetky zvieratá, ktoré uhynuli, alebo boli usmrtené museli byť vyšetrené histopatologicky. Pre dodržiavanie týchto opatrení sa podarilo epidémiu zastaviť. Cieľom mojej práce bolo preto poukázať na prísne dodržiavanie legislatívy pre udržanie súčasného stavu. V práci som sa zamerala aj na históriu, vznik a rozšírenie týchto ochorení a podrobne som charakterizovala stav poznania a praxe v tejto oblasti. Jednotlivo som popísala najvýznamnejšie zvieracie a ľudské prionové choroby, snažila som sa popísať históriu, klinické príznaky, rozšírenie vo svete i na Slovensku.

1. Cieľ práce

Prionové ochorenia sú ochorenia postihujúce zvieratá a človeka a sú nebezpečné najmä tým, že sú neliečiteľné a smrteľné. Vyznačujú sa dlhou inkubačnou dobou a nepoznáme ani špecifickú prevenciu.

Vzhľadom k poznaniu uvedených skutočností sme si vytýčili ciele :

- poukázať na históriu a objavenie prionov a ich šírenie
- charakterizovať základné pojmy
- poukázať na nebezpečnosť prionových ochorení
- rozdeliť prionové ochorenia na ochorenia u ľudí a u zvierat
- zhrnúť predpokladané a možné cesty prenosu a šírenia prionov medzi zvierat'om a človekom
- zhrnúť opatrenia pre zabránenie šírenia prionových ochorení

2. Metodika práce

V práci boli použité odborné a vedecké literárne zdroje knižnej a časopiseckej formy z domácich a zahraničných zdrojov. Okrem toho boli použité poznatky z výskumných správ a materiály uvedené na internetových stránkach.

Metodika vypracovania záverečnej práce zahŕňala preštudovanie literatúry a jej následného spracovania informácií o riešenej problematike s ilustrovaním situácie prionových ochorení

3. Prehľad literatúry

3.1 História prionových ochorení

Už v prvej polovici 18. stor. bola v Anglicku známa choroba oviec, pri ktorej sa choré zvieratá nápadne treli o pevné predmety a to napriek tomu, že spočiatku nebolo vidieť na ich koži žiadne chorobné zmeny. Ovce nútilo k opísanému správaniu úporné svrbenie, ktoré bolo spôsobené dráždením nervových zakončení v koži. Táto choroba sa v Anglicku pomenovala scrapie od „to scrape“ – škrabať. (Mitrová, 1999).

Aj keď scrapie opísali už v roku 1710, až v roku 1936 Cuillé a Chelle preukázali prenosnosť scrapie intraokulárnou injekciou miechy z nakazenej ovce. Inkubačná doba pozorovaná v týchto pokusoch bola medzi 14 a 22 mesiacmi. Experimentálny prenos scrapie na kozy, myši, potkany a morčatá dokázal prenosnosť tejto choroby na iné druhy zvierat a potvrdil dlhú inkubačnú dobu (Príkazský, 1999).

V rokoch 1920-1921 bola opísaná z humánnych chorôb najdlhšie známa, najpočetnejšia a medicínsky najzávažnejšia Creutzfeldtova - Jakobova choroba. Opísali ju takmer súčasne Dr. Creutzfeldt a Dr. Jakob, ale jej prenosnú povahu – mieru jej rizika odhalil až v roku 1968 D. C. Gajdušek. (Mitrová, 2001)

V roku 1957 Gajdušek po prvý raz opisuje vo svojich denníkoch chorobu kuru, ktorá postihovala výlučne kanibalov kmeňa Fore na Papui – Novej Guinei, ktorí jedli pri rituálnom pohrebe mozog zomrelého. Po objavení ochorenia boli tieto praktiky ukončené a kuru prakticky zanikla (Mareš, 2003).

Hunter v r. 1979 pomocou elektrónovej mikroskopie študoval frakcie získané z nervového tkaniva a zistil, že tie frakcie ktoré sa vyznačovali najvyššou infektivitou, pozostávajú z bunkových membrán. Millson a Manning v tom istom čase riešili túto otázku rozdielnym spôsobom. Použili enzýmové markery a ich výsledky tiež potvrdili väzbu infekčného agensu na membránové zložky bunky. Uvedené pozorovania viedli k názoru, že pôvodca klusavky je naviazaný, alebo priamo vybudovaný do membránových štruktúr nakazeného organizmu. Týmto sa vysvetľovala neschopnosť imunitného systému hostiteľa identifikovať ho ako cudzorodý a reagovať proti nemu (Mitrová, 1999).

V roku 1982 bol objavený pôvodca ochorenia – prion. Objavitel' prionu bol Stanley B. Prusiner, ktorý získal v roku 1997 za túto teóriu Nobelovu cenu.

Na konci roku 1984 bolo po prvý krát zaznamenané ochorenie BSE v západnom Sussexe v Anglicku. Neskôr sa začali objavovať ďalšie prípady – zvieratá boli agresívne, trpeli poruchami koordinácie tela a zomierali po krátkej dobe. (Mareš, 2003)

V r. 1985 Oesch vyslovil predpoklad, že prionový proteín je zakódovaný na chromozómoch samotného postihnutého hostiteľa. Veľmi rýchlo sa dokázalo, že záhadná prionová bielkovina PrP^{sc} (PrP^{res}) je iba modifikovanou podobou normálnej prionovej bielkoviny, ktorá sa vyskytuje v každom organizme a má nepochybne svoju fyziologickú, zatiaľ neobjasnenú úlohu. Tento normálny prionový proteín sa vyskytuje v bunke na jej povrchu. Na rozdiel od PrP^{res} sa účinkom proteolytických enzýmov rozkladá, je na ne senzitívny. Preto sa označuje ako PrP^{sen}. Poradie aminokyselín v PrP^{res} a PrP^{sen} je rovnaké. Jediný rozdiel spočíva v ich terciárnej štruktúre – konformácii. (Mitrová, 1999)

V roku 1988 zakázala britská vláda používanie mäsovokostnej múčky pre kŕmenie dobytka.

V roku 1995 zomrel na nvCJD prvý pacient. V roku 1996 oznámil britský minister zdravotníctva novú formu ochorenia mozgu. EÚ vydala zákaz exportu britského hovädzieho mäsa. (Mareš, 2003)

Dnes je vedecky presvedčivo dokázanou skutočnosťou, že patologickým nálezom pri každej transmisívnej spongiformnej encefalopátie (TSE), či ľudí či zvierat, je prítomnosť abnormálneho bunkového prionového proteínu – t. j. patologicky zmeneného, nerozpustného prionového proteínu. Preto je opodstatnené používať pre celú skupinu TSE ako synonymum aj názov – prionové choroby. (Mitrová, 1999)

3.2 Pomalé vírusové infekcie

Bjorn Sigurdsson v roku 1854 dokumentoval, že okrem známych vírusových infekcií existujú pomalé vírusové infekcie (PVI). Choroby oviec, ktoré medzi PVI zaradil (visna, Maedi, scarpie), boli známe aj dovtedy. To, že majú navzájom spoločné a v porovnaní s ostatnými nákazami odlišné vlastnosti – rozpoznať až Sigurdsson.

Pôvodné Sigurdssonove kritéria pre PVI sú nasledovné:

1. Neobvykle dlhá (mesiace, roky) trvajúca inkubačná doba.
2. Od manifestácie prvých klinických príznakov choroba rýchle postupuje a vždy končí smrťou.

3. Choroba postihuje len určité druhy a patologické zmeny sa nachádzajú len v jednom cieľovom orgáne, alebo sústave.

Na rozdiel od typických vírusov, netypické agensy:

1. Vyznačujú sa oveľa väčšou odolnosťou na používané chemické a fyzikálne spôsoby dekontaminácie a inaktívácie.
2. V nakazenom organizme nevyvolávajú ani bunkovú, ani humorálnu imunitnú reakciu, ktorá by sa dala dokázať doteraz používanými metódami.
3. Dodnes sa nepodarilo v nich dokázať ani ribonukleovú ani deoxyribonukleovú kyselinu.

Vzhľadom na netypické vlastnosti dostali názov nekonvenčné agensy. (Mitrová, 1999)

Poznanie, že sa jedná o nákazy zahájilo pátranie po pôvodcovi. Vylúčenie nekonvenčného vírusu vystriedalo šokujúci poznanie, že sa nejedná o dovtedy známy infekčný agens, ale pravdepodobne o malý proteín, ktorý S. Prusiner nazval – PRION (Mitrová, 2007)

3.3 Prionový proteín PrP

Stanley Prusiner získal a analyzoval bielkovinu, ktorú nazval prionový proteín. Už v roku 1982 publikoval presvedčenie, že v prípade nekonvenčných agensov ide o bielkovinnú infekčnú časticu. Odvtedy sa dokázalo, že prionový proteín vzniká v samotnom organizme hostiteľa. Ukázalo sa však, že sa tvorení nielen v postihnutom, ale v každom, i v zdravom organizme, ako normálny bunkový prionový proteín (PrPc). Tento potom mení svoju terciárnu štruktúru, stáva sa rezistentným na proteázy (PrPres) a ako taký bol identifikovaný u zvierat nakazených scrapie (PrPres). Podľa Prusinera je prion infekčná partikula, častica, ktorú tvorí PrPres. (Mitrová, 1999).

Prionový proteín PrPc je relatívne malá membránová bielkovina, ktorá sa skladá z 254-273 aminokyselín a má relatívnu molekulovú hmotnosť 33-35 kDa. PrPsc je považované za špecifický chorobný proteín, má relatívnu molekulovú hmotnosť 27-30 kDa. (Miluchová et al., 2007).

PrPsc je konformačný izomér PrPc, ktorý sa od normálneho prionového proteínu odlišuje v sekundárnej a terciálnej štruktúre. Sekundárna štruktúra obsahuje 45 % β -

skladaného listu a 30% α -závitnice (Caughey et al., 1991). PrPc obsahuje asi 40% α – skrutkovnice (helixu a len málo β – skrutkovnice. Tento rozdiel sprevádzajú výrazné fyzikálne – chemické vlastností. Na rozdiel od PrPsen, ktorá je v nenedaturujúcich saponátoch rozpustná, PrPres sa v nich nerozpúšťa a má schopnosť vytvárať v mozgu nerozpustné amyliodné fibriárne štruktúry (Mitrová, 1999).

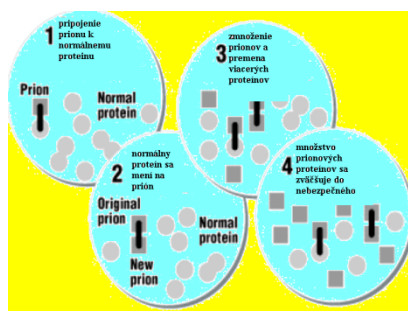
Pri bližšom skúmaní prionu Prusiner a ďalší zistili, že existujú dva druhy prionov. Prvý druh bol označený ako PrPc (celurárny), ktorý sa bežne vyskytuje u všetkých cicavcov a nevykazuje žiadne známky infekčnosti. Jeho funkcia v organizme doposiaľ nie je známa. PrPsc (scarpie) sa líši od PrPc odlišným konformačným usporiadaním. Sekvencia aminokyselín v reťazci PrPc a PrPsc je rovnaká. PrPsc vzniká z PrPc posttranslačnými procesmi. Pri premene PrPc na PrPsc sa predpokladá možnosť spontánnej konverzie PrP alebo somatické mutácie, kde vzniká PrPsc, tento sa následne naviaže na PrPc a doposiaľ nezisteným spôsobom ho premení na PrPsc. (Vznik PrPsc nemusí byť podmienená len prítomnosťou mutácie PrP génu, ale napríklad tiež infekciou – u nvCJD). Dochádza tak k reťazovej reakcii. Priony sa nahromadia v mimobunkovom priestore, kde sa spájajú v masu (tvoria tzv. amyliodné plaky). Krátky priebeh ochorenia s dlhou inkubačnou dobou svedčí o tom, že sa priony tvoria exponenciálnou radou. Konverzia PrPc na PrPsc, ktorá sa považuje za kľúčovú patogenetickú udalosť vo vývoji prionových ochorení, pravdepodobne prebieha na bunkovom povrchu alebo po prebehnutnej edocytóze. Predpokladá sa, že rôzne typy odlišného priestorového usporiadania a glykosalacia sú podkladom existencie rôznych prionových kmeňov, resp. typov (Mareš, 2003).

3.4 Mechanizmus konverzie PrPc na PrPsc

Všeobecne sa predpokladá, že za konverziu PrPc na PrPsc je zodpovedná konformačná zmena a nie kovalentná modifikácia, keďže obe izoformy majú rovnakú aminokyselinovú sekvenciu a zrejme aj postranlačné zmeny. Zdá sa, že konverzia spočíva v zmene rozpustného monoméru PrPc s prevahou α -helixov na nerozpustný multimér bohatý na β -štruktúry. Pomocou cirkulárneho dichroizmu a infračervenej spektroskopie sa ukázalo, že PrPc obsahuje približne 42 % α -helixov, a 3 % β -skladaných listov oproti 30 % α -helixov a 43 % β -štruktúry v PrPsc (Prčina et al., 2009).

Mechanizmus, akým sa deje konformačná zmena sa vysvetľuje pomocou dvoch hypotetických modelov:

1. Prvý model previjania predpokladá, že zmena normálneho, bunkového PrPsen na patologický PrPres sa uskutočňuje v priebehu procesu, ktorým sa časť jeho α -skrutkovnice rozvinie a to v oblasti zodpovedajúcej približne 108 – 144 aminokyseliny a previnie sa do β -skrutkovnice. Proces je termodynamicky kontrolovaný. Potreba vysokej dávky aktivačnej energie bráni spontánnej konverzii. Patologická konformačná zmena nastáva v rámci interakcie vniknutého PrPres s bunkovým PrPsen, táto vyvolá následnú kaskádu konverzie bunkového PrP na PrPres. Ako už aj S. Prusiner pripúšťa, táto reakcia môže byť závislá na enzýme, alebo ďalšej bielkovine – chaperone.
 2. Jadrový model, predpokladá kineticky kontrolovaný proces, kde je konformačná zmena PrPsen a PrPres reverzibilná, izoméry sú v rovnováhe. PrPres sa začne množiť, ak sa do takejto rovnovážnej zmesi pridá PrPres. Toto pridané PrPres tvorí akési kryštalizačné jadro, ku ktorému sa potom rýchlo pridávajú ďalšie premenené monoméry PrPsc. Model sa prirovnáva ku kryštalizácii, kde spontánne vytváranie kryštalizačného jadra (prvého agregátu) je veľmi pomalé, ale ak je pridané z vonka, ďalšia premena je veľmi rýchla.
- Čo spôsobuje zmenu konformácie a zmnoženie β -konfigurácii PrPsc – nie je jasné (Mitrová, 1999).



Obrázok 1 Vznik prionov (www.svssr.sk)

Prionový gén je zodpovedný za skupinu ochorení nazývaných ako TSE (transmisívna spongiformná encefalopatia). Prionový gén je lokalizovaný na krátkom ramene ľudského chromozómu 20 a ovčieho a bovinného chromozómu 13 (Miluchová et al., 2007).

Ukázalo sa, že PrPsen je bielkovina prítomná u väčšiny živočíšnych druhov – nielen cicavcov, stavovcov a bezstavovcov, ale aj u múch a kvasiniek. Z toho možno usudzovať, že bol prítomný nielen u spoločného predchodcu cicavcov, ale ešte na nižšom vývojovom stupni. (Mitrová, 1999)

3.5 Priony

Prion je infekčná častica zložená len z bielkoviny, neobsahujúca nukleové kyseliny, ktorá je svojou infekčnosťou podobná vírusom a viroidom. Názov má odvodený od anglického pomenovania *proteinaceous infectious particle* (proteínová infekčná častica). Priony rôzneho pôvodu majú rôznu molekulovú hmotnosť 27000-30000 a sú si vzájomne podobné. Infekčná častica vyvolávajúca prionové ochorenie je izoforma normálnej bielkoviny bunky, ktorá podmieňuje neurodegeneratívne procesy (Bežo, Bežová, 1998).



Obrázok 2 Priony (www.osel.cz)

Priony možno charakterizovať ako častice, ktoré sú rezistentné voči agensom postihujúcim nukleové kyseliny a ešte presne nezisteným mechanizmom vyvolávajú neurodegeneratívne ochorenia scarpie a ďalšie spongioformné encefalopátie zvierat a človeka (Žemľa et al., 1998).

Priony sú svojím chemickým zložením i spôsobom rozmnožovania zásadne odlišné od všetkých živých organizmov. Ich funkcia zatiaľ nie je objasnená. Za istých okolností sa môže tento zdravý glykoproteín zmeniť na patologický, ktorý je rezistentný voči pôsobeniu proteolytických enzýmov. Preto sa nemôže v neurónoch fyziologicky

odbúravať, čo vedie k ich degenerácii. K symptómom tejto choroby patrí demencia, ataxia, myoklonus, kóma a smrť, spravidla po hypostatickej pneumónii. Charakteristický je neuropatologický obraz – smrť neurónov, špongiózne zmeny v tkanive mozgu, glióza a astrocytóza, avšak bez zápalu. (www.lfuk.sk).

Účinkom detergentov a proteáz tvorí PrP^{sc} charakteristické agregáty. V infikovaných bunkách sa akumuluje v cytoplazmatických mechúrikoch a je hlavnou súčasťou extracelulárnych amyloidných pláčov. Infekčnosť prionov sa znižuje hlavne varom v roztokoch SDS a autoklávovaním pri 132°C počas viac ako dvoch hodín. Aj predĺžená expozícia voči proteázam, močovina, fenol a guanidínizotiokyanát majú negatívny efekt na infekčnosť. (Žemla et al., 1998).

PrP^{sc} sa od PrP^c odlišuje taktiež svojou rezistenciou k proteáze K, fosfolipáze C a k vysokým teplotám. Je metabolický stály, nerozpustný v detergentoch a má silnú tendenciu agregovať a polymerizovať (Dormont, 2002).

3.6 Prionové choroby

Prionové choroby, nazývané tiež TSE či prionózy sú fatálne neurodegeneratívne choroby prejavujúce sa neobvykle dlhou inkubačnou dobou. Demencie a poruchy pohybu patria medzi základné klinické príznaky. Klasické neuropatologické znaky týchto zápalových encefalopatií sú špongioformné degenerácie, straty neurónov, proliferácie neurogliových buniek a ukladanie amyloidných plakov (Prusiner, 1996)

Prenosné spongioformné encefalopatie – prionové choroby tvoria skupinu chorôb s degeneratívnym postihnutím mozgu, sú smrteľné, neliečiteľné a prenosné. Postihujú ľudí aj zvieratá. V postihnutom organizme sa vždy dá dokázať prítomnosť patologického prionového glykoproteínu – prionu (Mitrová, 2001)

Prionózy majú dlhú latenciu a vyvíjajú sa pomaly, avšak doposiaľ nepoznáme ani účinnú terapiu, ani špecifickú prevenciu. Inkubačná doba je od 2 mesiacov do 30 rokov. Hoci existuje medzidruhová bariéra, nie je absolútne neprekonateľná a jej prelomenie má nedozerne následky. Príkladom je epidémia BSE, ktorá vznikla kŕmením dobytka mäsovokost'ovou múčkou pripravenou z oviec uhynutých na klusavku. Táto choroba dobytka je príčinou obrovských hospodárskych strát v postihnutých štátoch. Je však hrozbou aj pre človeka, lebo je dokázaný medzidruhový

prenos na primáty a o možnom prekonaní medzidruhovej bariéry svedčí aj výskyt nového variantu CJD v krajinách s výskytom BSE (www.lufk.sk)

3.7 Prenos TSE

TSE sa prenášajú prostredníctvom molekuly, ktorá nie je živým organizmom. Je to len sekvencia aminokyselín, teda veľmi jednoduchý peptid alebo bielkovina, ktorej hovoríme infekčná bielkovina. Ak sa dostane do živého organizmu, prenikne do každej bunky v tele. Vo väčšine buniek je ale infekčná bielkovina úplne neškodná. Postihnuté sú len tie tkanivá, v ktorých sa prepisujú priony do bielkovín. Nazývame ich prionové bielkoviny, ktoré sú vlastné tomu – ktorému organizmu a majú svoju danú funkciu. Vtedy dochádza k molekulovej interakcii v zmysle silového pôsobenia medzi infekčnou bielkovinou a prionovou bielkovinou. (Miluchová et al., 2007).

Postupne sa u viacerých neurodegeneratívnych chorôb (najmä u Alzheimerovej choroby) odhalili spoločný patogenetický význam konformácie a ukladania amyliodu v CNS, ale súčasne sa zvýraznil zásadný rozdiel v ich prenosnej, či neprenosnej povahe. Atypický obraz v patogenéze prionových chorôb vytvárali aj pribúdajúce poznatky o úlohe imunitného systému. U prionových chorôb, na rozdiel od všetkých známych vírusových reakcií, nedostatočnosť imunitných reakcií (konkrétne deficit zreých B-lymfocytov a C3 zložky komplementu) bráni šíreniu periférnej prionovej nákazy do CNS a naopak, dostatočné pomnoženie prionu vo folikulárnych dendritických bunkách sleziny umožňuje len kompetentný IS. (Mítrová, 2007)

Spôsob prenosu nebol doteraz úplne objasnený. Podľa doterajších údajov rýchle šírenie BSE u hovädzieho dobytku bolo spôsobené krmivom kontaminovaným prídavkami z kadaverov uhynutých zvierat. Druhá cesta prenosu je vertikálna, dedičná. Ide o tzv. familiárnu formu, kde zmutuje gén kódujúci normálny PrPc proteín. U oviec sú pravdepodobné ešte ďalšie, doteraz neznáme, cesty prenosu, pretože sa toto ochorenie nepodarilo eradikovať od jeho objavenia asi pred 200 rokmi. Sporadické formy prionových ochorení, ktoré zahŕňajú väčšinu CJD, nevykazujú zjavnú infekčnú alebo genetickú etiológiu. Môžu sa prisúdiť spontánnej konverzii divokého typu PrPc proteínu do stavu PrPsc (Príkazský, 1999).

Prelomenie medzidruhovej bariéry sa nepovažuje za kritický celkový počet odlišných aminokyselín v molekule prionového proteínu, ale podobnosť aminokyselín

medzi pozíciami 96 a 167. Práve v tejto oblasti je väčšia podobnosť medzi ľudským a bovinným prionom ako aj medzi ovčím a bovinným a to i napriek tomu, že celkový počet rozdielnych aminokyselín medzi prionmi oviec a hovädzieho dobytká je len sedem a medzi prionmi človeka a hovädzieho dobytká až tridsať (Novák, 2001).

Iatrogénna forma prenosu je pomerne zriedkavá, ale zaslúži si pozornosť. Boli dokázané prenosy prostredníctvom štepov dura mater, transplantáciou rohovky a neskôr tiež rastovým hormónom a gonadotropínom z ľudských hypofýz. Prenos bol dokázaný pri neurochirurgických zákrokoch. Klinické symptómy sú pri iatrogénnom prenose neodlíšiteľné od prirodzeného prenosu. Doteraz sa nedokázal prenos CJD transfúziou krvi (Príkazský, 1999).

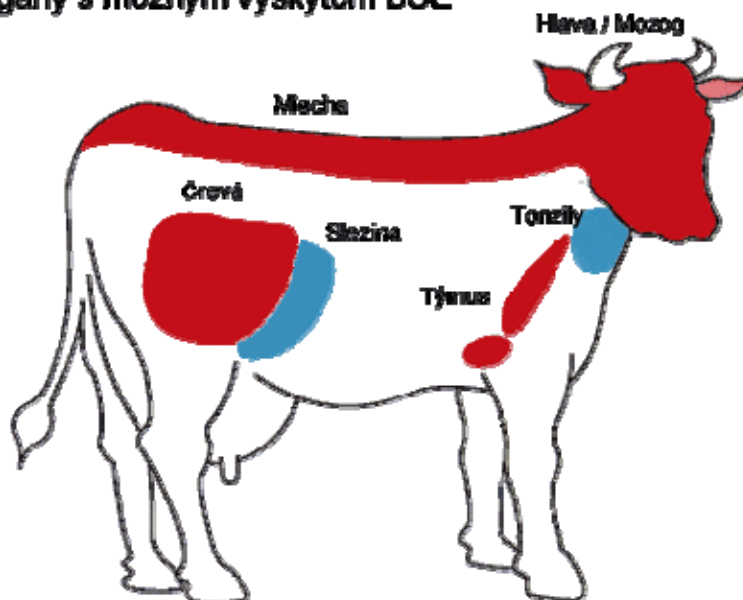
Infekčnosť tkanív a telesných tekutín pri scrapie charakterizuje a kategorizuje dokument EEC z roku 1992 (tabuľka 1). V súlade s ním je aj stanovisko 18 známych neurológov, ktorí odporúčajú, ako manipulovať s tkanivami ľudí podozrivými z výskytu CJD a iných SE (Vrtiak et al., 1997)

Prusiner však vyslovil pochybnosti o teórii, že priony postihujú len nervovú sústavu. Podľa neho sa priony môžu vyskytovať aj vo svaloch. V roku 2002 Bosque objavili priony vo svaloch myší infikovaných prionmi. Zároveň však vyslovili názor, že akumuláciu prionov v kostrovej svalovine iných zvierat treba dokázať, preto je nutné celkové a systematické vyšetrenie distribúcie prionov v kostrovej svalovine. V roku 2003 Gatzel objavili abnormálne priony vo svaloch ôsmich z tridsiatich dvoch pacientov postihnutých CJD. O rok neskôr Kovacs informoval o zistení dostatočného množstva abnormálnych prionových proteínov vo svale pacienta postihnutého sporadickou CJD (Miluchová et al., 2007).

Tabuľka 1 Infekčnosť tkanív a telesných tekutín pri scrapie oviec a kôz (upravené podľa EEC Regulatory document, 1992).

Kategória I Vysoká infekčnosť	Mozog, miecha, oči
Kategória II Stredná infekčnosť	Lieum, lymfatické uzliny, proximálna časť hrubého čreva, slezina, tonzily, dura mater, epifýzy, placenta, cerebrospinálna tekutina, hypofýza, nadoblička
Kategória III Nízka infekčnosť	Distálna časť hrubého čreva, nosová sliznica, sedací nerv, kostná dreň, pečeň, pankreas, týmus
Kategória IV Zatiaľ nedokázaná infekčnosť	Krvná zrazenina, srdce, obličky, mliečna žľaza, mlieko, ovárium, sliny, slinná žľaza, seminálne vezikuly, sérum, kostrové svalstvo, semenníky, tyroidea, uterus, fatálne tkanivo, kosť chrupkovité tkanivo, spojivové tkanivo, chlpy, koža, moč.

Orgány s možným výskytom BSE

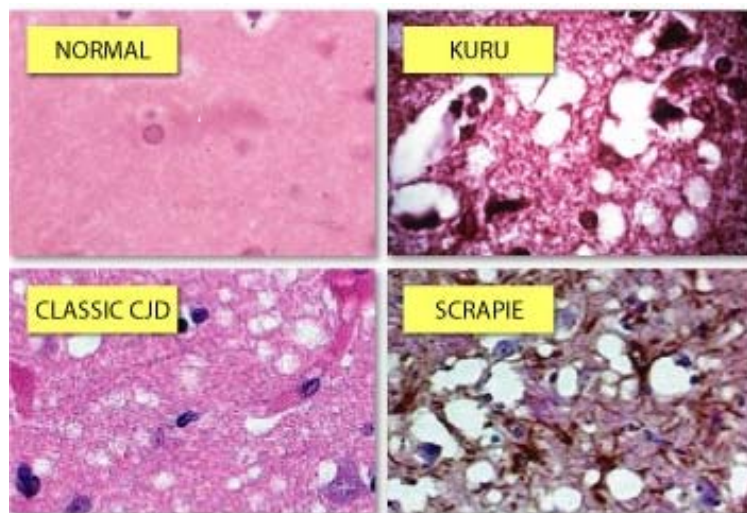


Obrázok 3 Znáznornenie infekčných tkanív na tele zvierat'a (www.svssr.sk)

3.8 Diagnostika prionových chorôb

Diagnostika prionových chorôb vychádza z klinických príznakov, overuje sa na základe typického histopatologického nálezu v centrálnej nervovej sústave a dôkazom prítomnosti patologického prionového proteínu buď imunohistochemicky (Western blotom), alebo izolovaním znázornením pomocou elektrónového mikroskopu. Dôkaz sa zvyčajne hľadá až po smrti, pitvou sa zisťuje, či sú v mozgu prítomné vakuoly, amyliodné proteínové sedimenty a astroglia (Miluchová et al., 2007).

Prítomnosť TSE-špecifického amyliodu možno dokázať pomocou dostupných monoklonových a polyklonových protilátok imunofarbením v histologických rezoch, alebo pri použití čistého PrP izolovaného z mozgu alebo sleziny pomocou techniky Western blot. Získanie veľmi čistých PrP a monoklonových protilátok umožňuje dokonca technikami immunoblot a imunofarbením diferencovať jednotlivé formy CJD. Detegovanie amyliodu špecifického pre TSE imunocytometrickými a imunohistochemickými metódami patrí k najcitlivejším dôkazom TSE a dopĺňa až nahrádza tradičné diagnostické metódy (experimentálny prenos nákazy, neurohistopatológiu). Doterajší poznatkový stav nasvedčuje, že imunitná reakcia pri TSE má významnú úlohu v diagnostike, ale je neúčinná pri obrane postihnutého organizmu (Mitrová, 1997).



Obrázok 4 TSE (www.zootechnika.estranky.cz)

3.9 Rozdelenie prionových chorôb

Z historického hľadiska možno rozlíšiť klasické a nové varianty prionových chorôb. (tabuľka 2)

Tab 2 (Mitrová, 2001)

Zvieratá	Ľudia
Klasické varianty	
Klusavka, scrapie	Creutzfeldtova-Jakobova choroba
Prenosná encefalopatia noriek	Kuru
Chronické kachektizujúce ochorenie jeleňov a sobov	Gerstamenn-streusselrov syndróm
	Fatálna familiárna insomniá
Nové varianty	
Bovinná Spongiformná encefalopatia	Nový variant CJD - BSE
Spongiformná encefalopatia mačiek	
Spongiformná encefalopatia vzácnych druhov v ZOO	
Spongiformná encefalopatia experimentálnych zvierat (lemúry)	

Z klasických variantov je najstaršia a u zvierat najrozšírenejšia klusavka oviec a kôz, z humánnych chorôb je najdlhšie známa Creutzfeldtova-Jakobova choroba. Nové varianty sa objavili tiež najprv u zvierat. Prvá vznikla u hovädzieho dobytku povinná spongiformná encefalopatia (BSE), po nej felinná spongiformná encefalopatia u mačky domácej. Neskôr sa zistili v zoologických záhradách, napr. u veľkých mačiek (ocelot), ale aj vo zverincoch výskumných pracovísk, kde sa nákaza prejavila po kŕmení nakazeným krmivom u lemurov, ktoré sú blízke človeku. (Mitrová, 2001)

Podľa výskytu môžeme prionové choroby rozdeliť na choroby vyskytujúce sa u ľudí a u zvierat (tabuľka 3)

Tab 3 (Žemla, 1998)

Ochorenie	Hostiteľ
Klusavka (scrapie)	Ovca, koza
Prenosná encefalopatia noriek (TME)	Norka
Prenosná encefalopatia jelenej zveri Jeleník (CWD)	Los
Spongiformná encefalopatia hovädzieho dobytku (BSE)	Krava
Spongiformná encefalopatia mačiek (FSE)	Mačka
Exotická encefalopatia kopytníkov (EUE)	Antilopa
Kuru	Človek
Creutzfeldtova-Jakobova choroba (CJD)	Človek
Syndróm Grestmanna, Strausslera a Scheinkera (GSS)	Človek
Smrteľná familiárna nespavosť (FFI)	Človek

3.9.1 Ľudské prionové ochorenia

3.9.1.1 Kuru

Kuru sa charakterizuje ako infekčné ochorenie. Vyskytuje sa u domorodcov na ostrove Papua-Nová Guinea. Chorobu prvýkrát opísal r. 1957 Gajdušek (Žemla, 1998).

V 50. rokoch 20. storočia, keď bola choroba najviac rozšírená, zomieralo na kuru až 200 ľudí ročne, odhaduje sa, že celkovo zomrelo až 3000 ľudí. Po vládnom zákaze kanibalizmu choroba postupne takmer úplne vymizla, u žiadneho človeka narodeného po roku 1960 sa už nevyskytla. Avšak kvôli dlhej inkubačnej dobe kuru (niekedy až 50 rokov) sa v regióne sporadicky objavili nové prípady aj v 90. rokoch 20. storočia a na začiatku 21. storočia (Prčina, 2009).

Pátranie po príčine kuru sa uberalo kľukatou cestou vytvárania a zavrhovania hypotéz. Jej zrozumiteľnú podobu akoby zábleskom geniality, prinieslo porovnanie mikroskopických zmien v mozgu ľudí postihnutých kuru a oviec nakazených klusavkou. Pôvodca, ktorý kuru spôsobuje patrí do tej istej skupiny agensov, ako pôvodca klusavky. (Mitrová, 1999)

Túto podobnosť potvrdil aj následný úspešný prenos ochorenia intracerebrálnou inokuláciou šimpanzov, u ktorých sa vyvinuli príznaky zhodné z kuru. Inkubačná doba kuru je od 1-2 rokov do 25-30 rokov. (Žemla, 1998).

Najväčšia hustota infekčného agensu je v mozgu mŕtveho. Prenos na zdravých jedincov sa uskutočnil rituálnym endokanibalizmom. Inkubačný čas ochorenia bol 4 – 5 rokov u detí, ale u dospelých viac ako 20 rokov. Patogenéza spočíva v pomalej nezápalovej degeneratívnej deštrukcii nervových buniek cerebellum a tých častí mozgu, s ktorými je mozoček spojený nervovými dráhami (Miluchová et al., 2007).

Postihoval príslušníkov jazykovej skupiny Fore. Deti choreli bez rozdielu pohlavia, u dospelých sa vyskytovalo kuru častejšie u žien ako u mužov. Obrady rituálneho kanibalizmu po smrti členov rodiny boli bežné, pričom sa jedli pozostatky nebožtíka (vrátane mozgu) tepelne veľmi zle spracované. Kuru sa rozvíja nenápadne. Začína poruchami rovnováhy, ktoré sa prejavujú po fyzickej námahe, pri únave, ale aj po nočnom odpočinku. Postupne sa poruchy pohybu zvyrazňujú, objavuje sa tras končatín, pohyby sú nekoordinované a dochádza k výrazným poruchám rovnováhy. Pri každom pohybe postihnutého vznikú mimovoľné, nechcené pohybové prejavy, sprevádzané trasom. Mimovoľná mimika tváre a pocit eufórie u chorého, často majú za následok, že sa postihnúť smejú. V mozgovej kôre sa obvykle nachádzajú ložiskové špongioznej zmeny mierneho stupňa. Najvýznamnejšie zmeny sa našli v mozočku. Pri kuru sa mikroskopický obraz kôry mozočka na prvý pohľad mení. (Mitrová, 1999).

Histológia CNS jedincov postihnutých kuru odhalila stratu neurónov, degeneráciu myelínu, astrogliózu, proliferáciu mikroglií amyloidné plaky. V cerebele bola zaznamenaná masívna strata a degenerácia Purkiného a granulárnych buniek, spolu s proliferáciou astrocytov a tvorbou hustej vláknitej gliózy. Pre kuru sú typické amyloidné plaky, ktoré sú zložené z hustého jadra, ktoré je obklopené jemnými fibrilárnymi lúčovitými výbežkami. Pri všetkých študovaných prípadoch bola zaznamenaná proliferácia mikroglií. Neboli zaznamenané žiadne zmeny v tkanivách mimo CNS (Prčina, 2009).

3.9.1.2 Creutzfeldtova - Jakobova choroba (CJD)

Už od počiatku dvadsiatich rokov dvadsiateho storočia bola známa smrteľná neurodegeneratívna choroba, ktorú sprevádzala progredujúca demencia pacienta. Meno dostala po Dr. Creutzfeldovi a Dr. Jakobovi, ktorí ako prví opísali jej priebeh, klinické príznaky a aj typické mikroskopické zmeny v mozgu. Príčinu choroby, ktorá nesie ich meno však títo lekári neodhalili. Jej objasnenie čakalo takmer 50 rokov, kým sa ju v laboratóriu Dr. Gajduška podarilo experimentálne preniesť na šimpanzy. Bola to už

v poradí druhá humánna nekonvenčná nákaza. Priebeh a dominujúce príznaky CJD pripomínali zmeny, ktoré prichádzajú vo vyššom veku ako súčasť starnutia. Choroba, ktorá sa síce prejavovala veľmi rôznymi nervovými príznakmi (poruchami rovnováhy, chôdze, zraku atď.), ale vždy postupnou stratou pamäti a progredujúcou demenciou, sprevádzalo dramatické poškodenie a úbytok nervových buniek (Mitrová, 1999).

CJD sa vyskytuje v troch hlavných formách: sporadickej (sCJD), dedičnej (fCJD) a iatrogénnej (iCJD). Navyše sa v nedávnej dobe vyskytli zvláštne prípady tzv. variantu CJD (nvCJD) (Prčina, 2009).

Sporadická forma sa vyskytuje asi v 1-2 prípadoch na milión jedincov za rok. Je to typické ochorenie človeka, ale môže sa experimentálne preniesť na niektoré druhy hlodavcov. Inkubačná doba u ľudí je v rozmedzí 4 až 19 (prípadne 40) rokov. Postihnutí umierajú zhruba za 1 rok po manifestácii príznakov (Žemľa, 1998).

Sporadická CJD (okolo 85% všetkých prípadov CJD) má neznámy pôvod, zrejme môže vzniknúť v dôsledku somatickej mutácie PRNP génu alebo vďaka spontánnej konverzii PrPc na PrPsc (Prčina, 2009).

Dedičnú formu CJD podmieňuje dedičná dominantná autozomálna porucha, zámena aminokyseliny v kodóne 102 v jednej z alel génu PRNP. Predpokladá sa, že táto mutácia umožňuje spontánnu konverziu PrPc na PrPsc, čo môže viesť k vzniku ochorenia ešte počas života človeka (Žemľa, 1998).

Dedičné formy CJD (10-15% všetkých prípadov) sa vyskytujú s frekvenciou približne 1:1 000 000. Nezvyčajne vysoký výskyt dedičných foriem CJD sa vyskytli u lýbijských židov, v Slovenskej republike na Orave a v Chile (Prčina, 2009).

Prípady iatrogénnej CJD sa vyskytli po liečbe rastovým hormónom izolovaným z hypofýz mŕtvych ľudí, po transplantáciách rohovky a dura mater, a tiež po viacnásobnom použití vyšetrovacích elektród alebo chirurgických nástrojov používaných pri operáciách mozgu. Je to najzriedkavejšia forma CJD, doteraz bolo zaznamenaných menej ako 300 prípadov (Prčina, 2009).

Klinický priebeh CJD je značne pestrý. Choroba začína obvykle prvým, úvodným štádiom rozmanitých, necharakteristických príznakov a ťažkostí. Sú to nepatrné zmeny povahy, objavenia sa správania dovtedy neobvyklého. Často má pacient neurčité problémy, vzniká u neho neistota, pocit, že čosi nie je v poriadku, plačlivosť, inokedy podráždenosť, agresivita, občasné závraty. Toto štádium môže trvať rôzne dlho, niekoľko mesiacov, aj vyše roka. Druhé štádium sa vyznačuje narastajúcou zábudlivosťou, stupňovanou apatiou, poruchami nálady, správania. Môžu sa objaviť aj

zrakové, alebo sluchové halucinácie, bludy a psychotické poruchy myslenia. V tomto štádiu sa už takmer od počiatku prejavujú aj chorobné príznaky, ktoré sú následkom poškodenia určitých štruktúr v mozgu napr. vznik kôrovej slepoty. Poškodenie nervových dráh sa prejavuje zvýšeným svalovým tónusom, spasticitou, zvýšenými šľachovými reflexami, vznikom mimovoľných pohybov – zášklbov na rôzne druhy podráždenia. V konečnom štádiu sa opísané príznaky, hlavne poruchy hybnosti stupňujú, pacient je nehybný, trvale upútaný na lôžko a odkázaný na pomoc okolia. Stav sa stále prehľbuje až kontakt s pacientom sa úplne preruší. Pacient nereaguje, iba niekedy na zvukový podnet sa objavujú myoklonické zášklby, pacient vždy umiera (Mitrová, 1999).

Výskum humánnej CJD sa začal v roku 1975. Hneď u prvého pacienta s potvrdenou diagnózou sa uskutočnil experimentálny prenos choroby na mačku domácu. Týmto sa dokázal výskyt prenosného nervového ochorenia na území ČSR. Zakrátko sa zistil zvýšený výskyt pacientov najprv v južnej, neskôr v severnej časti stredného Slovenska. Postupne sa ukázalo, že rodinná forma v slovenskom súbore (45%) prevyšuje jej celosvetový výskyt (10-15%). Tento nález jasne dokazoval účasť vnútorného, dedičného faktora na vzniku ložiskového výskytu nákazy. Doteraz sa na Slovensku vyskytlo 132 postihnutých klasickým variantom CJD, Z toho bolo 75% prípadov genetických (s mutáciou), 25 % sporadických (bez známej príčiny). Iatrogénna CJD, sa nevyskytla (Mitrová, 2001).

3.9.1.3 Nový variant Creutzfeldtovej - Jakobovej choroby

Neskôr v roku 1996 bol identifikovaný nový variant Creutzfeldovej - Jakobovej choroby, ktorý by mohol byť v príčinnom vzťahu s epidémiou BSE, a vyslovila sa hypotéza, že táto choroba by mohla byť prenášaná na ľudí. Najnovšie molekulové analýzy dokázali, že prionový kmeň vyvolávajúci nvCJD je totožný s kmeňom, ktorý vyvoláva BSE. To znamená, že nvCJD je vlastne ľudskou BSE (Miluchová et al., 2007).

Variant CJD sa od ostatných foriem CJD líši oveľa nižším vekom postihnutých ľudí, ktorí v počiatočných štádiách ochorenia vykazujú psychiatrické symptómy ako depresia, až v neskorších štádiách sa vyvinú príznaky typické pre CJD (Prčina, 2009).

Variant CJD býva často zamieňaná s Creutzfeldtovou – Jakobovou chorobou. U človeka sa v prvom štádiu prejavujú aj príznaky pripomínajúce schizofréniu

psychózy. Bežné sú prudké výbuchy zlosti, záchvaty kriku, rozbíjanie vecí. Zhruba u polovice prípadov bola pozorovaná lepkavosť kože. Následne neistá chôdza a neovladateľné pohyby. Pacient postupne prestáva ovládať pohybové ústroje, až sa nakoniec stáva nehybným a neschopným reči. V posledných štádiách väčšinou nikoho nepoznáva a jeho stav pripomína demenciu (Mareš, 2003).

Dôkazy súvislosti BSE a nvCJD

Priamy dôkaz: Experimentálnym prenosom nákazy zo zvierat'a na človeka – nie je a nebude k dispozícii.

Nepriame dôkazy:

1. Epidemiologický: nvCJD sa dokázala len v štátoch s početným výskytom BSE a naopak – v štátoch bez BSE sa nevyskytuje.
2. Biochemický: patologický prion u všetkých klasických humánnych a zvieracích prionových chorôb má rovnakú štruktúru a rozdielnu od BSE a nvCJD, ktorých štruktúra je navzájom neodlíšiteľná.
3. Charakter neurohistopatologických lézií pri experimentálnom prenose BSE a nvCJD je rovnaký a odlišný od klasickej CJD.
4. Pri prenose nvCJD na transgenné myši sa so zväčšením bovinného genetického podielu skracuje inkubačná doba ochorenia (Mitrová, 2001).

3.9.2 Zvieracie nákazy

3.9.2.1 Scarpie

Už v prvej polovici 18. stor. bola v Anglicku známa choroba oviec, pri ktorej sa choré zvieratá nápadne treli o pevné predmety a to napriek tomu, že spočiatku nebolo vidieť na ich koži žiadne chorobné zmeny. Ovce nútilo k opísanému správaniu úporné svrbenie spôsobené dráždením nervových zakončení na koži. Postihnuté ovce robia rýchlo pohyby jazykom a perami, objavuje sa u nich veľký smäd, nekoordinované pohyby, potácavosť, chvenie, triaška a slabosť svalov. To všetko vedie k poruchám chôdze, od ktorých je odvodených slovenský aj nemecký názov choroby- klusavka.

Nakoniec zviera uhynie. Podobný klinický priebeh bol pozorovaný aj u kôz (Mitrová, 1999).

Klusavka neovplyvňuje reprodukčné schopnosti oviec, ovce s klinickými príznakmi klusavky porodili jahňatá a klusavkou postihnuté barany tiež ostali plodné. Ochorenie trvá 2 týždne až 6 mesiacov (Prčina, 2009).

Uhynuté zvieratá majú chorobné zmeny predovšetkým v mozgu. Postihnutá je najmä sivá hmota. Oveľa menej je zasiahnutá biela hmota. Najnápadnejším nálezom sú početné, rôzne veľké vakuoly v nervových bunkách. Klusavka oviec sa postupne diagnostikovala v kontinentálnej Európe, Ázii, Amerike, na Islande a aj v Japonsku a Austrálii (Mitrová, 1999).

So scrapie je dôvodne spájaný vznik BSE. Scrapie ako jediná transmisívna spongioformná encefalopatia vykazuje existenciu viac ako dvadsiatich rozdielnych kmeňov patogénnych prionov (Baron et al. 1999).

Táto choroba sa nevyhla ani územie Slovenska. Chov oviec bol od nepamäti dôležitou súčasťou slovenského pôdohospodárstva. Územie Slovenska kolonizovali Valasi, ktorí boli pastiermi oviec. Ovce, ktoré Valasi priviedli boli valašky. Príchod Valachov mal veľmi rozsiahle následky a to nielen na miestne ovčiarstvo. Ovplyvnil celkový spôsob života, kultúru, zvyklosti a jazyk. Valaška patria aj dnes k najrozšírenejšiemu plemenu na Slovensku. Práve po Importe oviec zo Španielska došlo na konci 19. stor. k prvému zavlečeniu klusavky na územie terajšieho Slovenska a Maďarska (Mitrová, 1999).



Obrázok 5 Ovca nakazená klusavkou (www.biophys.uni-duesseldorf.de)

Scrapie sa zatiaľ považovala za neprenosnú na človeka. Na Slovensku však bolo na Orave, husto pokrytom regióne s chovom oviec, diagnostikované od roku 1976 celkom 22 prípadov fatálnej demencie. Za posledné tri roky sa objavilo 12 nových prípadov. Ďalších 19 prípadov bolo zaznamenaných v Lučenci asi o 80 km južnejšie. Náhly výskyt na Slovensku bol identifikovaný ako CJD. Zabíja do sedem mesiacov od manifestácie choroby. Čo hlavne znepokojuje svetových odborníkov je fakt, že toto ochorenie môže byť výsledkom prenosu scrapie na človeka (Mareš, 2003).

Colin Masters (Mitrová, 1999) porovnal typické vírusy a nekonvenčné agensy a zostavil súhrn typických a netypických biologických vlastností pôvodcu klusavky.

1. Vlastnosti rovnakú ako u typických vírusov:

- Dá sa filtrovať a titrovať (stanoviť dávka, ktorá pre experimentálnej nákaze spôsobí chorobu a smrť určitému počtu nakazených zvierat)
- Množí sa do vysokých titrov (koncentrácie) v mozgu.
- Po prenesení infekcie periférnou cestou sa množí najprv v lymfatických orgánoch (regionálnych uzlinách, slezine) až potom v mozgu. Dokázalo sa šírenie nákazy pozdĺž priebehu nervov do centrálnej nervovej sústavy.
- Pozoroval sa obmedzený počet vnímavých živočíšnych druhov, ktoré možno nakaziť (má obmedzenú schopnosť prispôbiť sa na nového hostiteľa).
- Potvrdil sa výskyt viacerých kmeňov a zistili sa kmeňové rozdiely v dĺžke inkubačnej doby, v prevládajúcich chorobných príznakoch, rozložení a charaktere mikroskopických mien v mozgu).
- Vnímavosť (rezistenciu) k ochoreniu kontrolujú dedičné vlastnosti nakazeného hostiteľa.
- Základnou zložkou agensu je pravdepodobne bielkovina.

2. Vlastnosti, ktoré sú rozdielne v porovnaní s typickými vírusmi:

- Neprítomnosť špecifickej imunitnej odpovede hostiteľa na pôvodcu klusavky.
- Priebeh ochorenia nemožno ovplyvniť antivírusovou liečbou potlačením, alebo podporovaním imunitných reakcií.
- Veľmi dlhá inkubačná doba.
- Chronický, plynule sa zhoršujúci priebeh, bez prerušenia fázami zlepšeného stavu.
- Prítomnosť nukleovej kyseliny nedokázaná.
- Neobvyklé spektrum rezistencie na fyzikálne a chemické účinky (Mitrová, 1999)

3.9.2.2 Boviná spongioformná encefalopatia (BSE)

BSE je choroba, ktorú vedci odhalili len nedávno. Dlhý čas bolo známe, že existujú také choroby, ako je Creutzfeldtova-Jakobova choroba u ľudí alebo klusavka u oviec, teda dve zriedkavé choroby, o ktorých dnes už vieme, že patria do rovnakej skupiny ako BSE (Quilien, 2002).

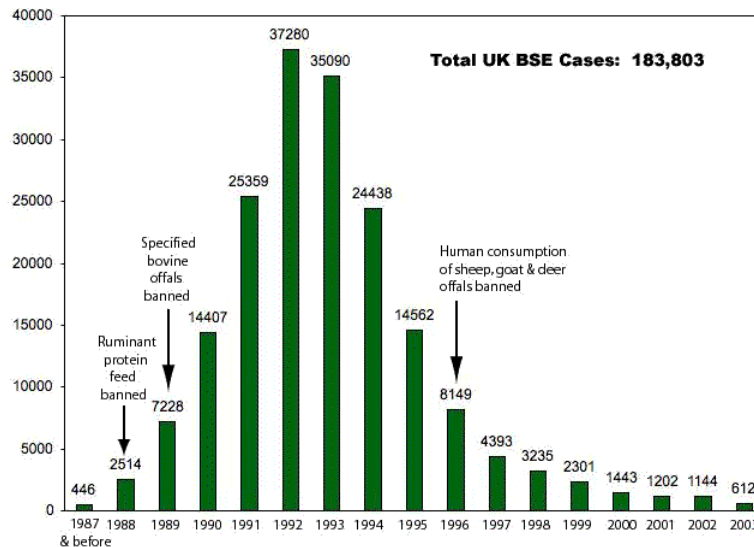
V novembri 1996 v Centrálnom veterinárnom laboratóriu vo Weybridgei, kde bol v tom čase riaditeľom Dr. Ray Baradley, diagnostikovali u hovädzieho dobytku úplne novú, dovtedy nepoznanú chorobu. Bola podobná klusavke, ktorá dovtedy postihovala iba ovce a kozy. Retrospektívnym vyšetrením sa zistilo, že prípad ochorenia s podobnými príznakmi sa vyskytlo už v apríli 1985 (Mitrová, 1999).

BSE je infekčná prenosná choroba, ktorá má inkubačnú dobu niekoľko rokov, deštruuje nervové bunky a vedie k úhynu zvierat (Quilien, 2002).

BSE sa prejavuje postupujúcimi poruchami pohybovej koordinácie a vnímania a neprirodzenou nervozitou zvierat. Inkubačná doba ochorenia je 2 – 8 rokov. Potvrdilo sa, že infekcia sa rozšírila kŕmením dobytku preparátmi (mäsovokostnými múčkami) vyrábanými z infikovaných zvierat. Jej epidémia súvisí so zavedením novej, lacnejšej, ale medzičasom už zakázanej technológie výroby týchto preparátov (Žemľa, 1998).

Kvôli zamedzeniu rozširovania BSE z dobytku na ostatné domestikované zvieratá bol v roku 1988 vydaný vo Veľkej Británii zákaz obohacovať krmivo pre

dobytok proteínmi pochádzajúcimi z prežúvavcov. Podobná regulácia bola kvôli prevencii rozširovania prionu zo zvieracích produktov na ľudí zavedená i v Európskych krajinách a v USA (Baron et al., 1999).



Obrázok 6 Výskyt BSE v Anglicku (www.biophys.uni-duesseldorf.de)

Od júna 1988 sa stalo hlásenie chorých zvierat povinným a všetky ktoré uhynuli, alebo boli utratené, museli byť vyšetrené histopatologicky. Neurohistopatologický obraz charakterizoval symetrické lézie predovšetkým v mozgovom kmeni, v ktorých dominovali spongioza sivej hmoty a vakuolizácia neurónov. Tieto zmeny bývajú výraznejšie a prevládajú v celkovom obraze ešte viacej ako pri klusavke (Mitrová, 1999).

Pri sledovaní dynamiky vzniku a vývoja BSE môžeme rozlíšiť 3 obdobia:

1. Vznik BSE (1979-1984) – je to obdobie, keď sa pri výrobe mäsovo-kostnej múky znížila teplota a upustilo sa od použitia niektorých tukových rozpúšťadiel. V dôsledku toho pretrval v mäsovokostnej múčke pôvodca prionových chorôb. Najpravdepodobnejším prameňom nákazy boli ovce postihnuté klusavkou.
2. Masívne šírenie nákazy BSE (1984 – 1988) – Pokiaľ BSE nebolo rozpoznané, nakazené zvieratá boli opäť spracované na mäsovo-kostnú múčku a recyklovaním narastajúceho počtu chorých zvierat sa skrmovalo stále viac krmiva kontaminovaného pôvodcom prionovej choroby. V tomto období sa

dostávali všetka hovädzie tkanivá, vrátane mozgu, do potravinového reťazca človeka.

3. Obdobie nedôsledných ochranných opatrení (1988-1996) – Epidémia BSE vrcholila v r. 1992 – 1993. Zákaz skrmovania mäsovo-kostnej múčky spôsobila pokles počtu nakazených kráv. Aj po zavedení opatrení ochorelo približne 80 000 zvierat, čo svedčí o nedostatkoch v ich vykonávaní. Ukázalo sa, že zavedené opatrenia nezabránili, aby sa krmivo kontaminovalo mäsovo-kostnou múčkou, potvrdilo sa aj nedôsledné dodržiavanie zákazu skrmovania mäsovo-kostnej múčky. (Mitrová, 2001)

BSE je pomaly prebiehajúce ochorenie s dvojfázovými priebehom.

1. **Prvá fáza, tzv. prodromálne štádium** je sprevádzané všeobecnými prejavmi ochorenia. Prejavuje sa postupným chudnutím pri dobrej žravosti, úbytkom laktácie až zasušením pri zmenšenom brušnom objeme. Vegetatívny nervový systém v tomto období býva alterovaný vo forme brachykardie a hypomotoriky bachora. Prodromálne štádium po neurčitej dobe prechádza do postupných odchýlok v chovaní a nerovných porúch.
2. **Druhá fáza, klinicko-manifestačné štádium** má zreteľné prejavy postihnutia centrálnej nervovej sústavy. Ide o systémový prejav, sprevádzaný alteráciou vedomia (oddeľovania sa od skupiny, samotárstvo, ťažká manipulácia pri dojení, presunoch, premiestňovaní, hrabanie a kopanie končatinami, zvýšená dráždivosť a ľakavosť, vzprunosť až zúrivosť pričom pokojné a dráždivé obdobia sa môžu striedať), psychomotorickými poruchami (zvíra stojí meravito, má rozkročený postoj, chôdza je kymáca, strnulá, zvíra strihá ušami, olizuje sa, vyhŕňa mulec, občas bučí a vydáva neprirodzené zvuky), hypersenzibilitou a v paralytickom prejave nevyhnutne končí letálne. (Miluchová et al. 2007)

Potvrdenie predpokladu, že ide o TSE poskytlo najprv biochemické, potom aj imunocytochemické vyšetrenie mozgu. Ďalším, dôležitým overovacím postupom pre zaradenie medzi TSE bol dôkaz prenosnej povahy BSE. Po úspešnom prenose sa začala skúmať vnímavosť rôznych živočíšnych druhov na BSE. Ďalším krokom bolo overovanie infekčnosti rôznych tkanív na laboratórnych myšiach. Testovali sa svaly, semeno, placenta, krvný koláč, kostná dreň, slezina a mnohé ďalšie. (Mitrová, 1999)

Doteraz sa nepodarilo jednoznačne stanoviť, či pôvodca BSE pochádza z ovce postihnutej klusavkou, alebo zo sporadického, nerozpoznaného výskytu nákazy u kravy. Epidémia dosiahla vrchol v r. 1992. Hrozivá epidemická situácia si vynútila viaceré radikálne opatrenia. V júni 1988 sa zaviedlo povinné hlásenia podozrivých prípadov ochorenia. Súčasne sa vydal zákaz pridávať do krmiva prežúvavcov bielkoviny rovnakého pôvodu (pochádzajúce z prežúvavcov). V auguste sa zaviedla povinnosť utrať a zničiť všetky zvieratá s podozrením na BSE. Európska Únia reagovala na situáciu v Anglicku v júli 1989 zákazom exportu živých teliat, narodených pred zákazom EU zákaz exportu aj na zvieratá mladšie ako 6 mesiacov. Súčasne boli špecifikované tkanivá a orgány, používané pre farmaceutické ciele, ktoré sa nesmeli viac vyvážať do štátov EU. Od 1. Apríla 1990 sa povinné hlásenie BSE rozšírilo na všetky štáty EU. (Mitrová, 1999).

Opatrenia ŠVPS SR

- **23.11.1993** zaradila BSE do zoznamu chorôb povinných hláseni
- **2. 8. 1994** zakázala používanie kostných a mäsokostných múčok a kafilerických. **Výnos MP SR č. 1497/2/1997-100** zo dňa 7.10.1997 v ustanovujúcich požiadavkách na výrobu krmných zmesí pre dobytok nepripúšťa pridávať v akomkoľvek množstve
- **1995** **Histologická diagnostika – test spôsobilosti laboratórií ŠVÚ**
- **1996** **monitoring výskytu BSE – histologickými metódami**
- **1998** **Metodický pokyn č. 4290/98-400 na zabezpečenie karantény a trvalej kontroly hovädzieho dobytku dovezeného z krajín, v ktorých sa vyskytla BSE, Smernica o opatreniach proti bovinnej spongioformnej encefalopatii (BSE)**
- **1999** **Zákon č. 337/1998 Z.z. – p o v i n o s ť** vykonávať sterilizáciu nebezpečných a zvláštnych odpadov pri teplote minimálne 133°C, 20 min , tlak 3 bary
- **2001** **Vláda SR ustanovila Komisiu pre kontrolu BSE**
- V roku 2001 bolo zriadené oddelenie pre laboratórnu diagnostiku BSE na ŠVÚ Zvolen – dôkaz BSE imunochemickými metódami (Šťastný, 2010)

Z 15 krajín Európskej únie len Rakúsko, Fínsko a Švédsko sú doposiaľ bez výskytu BSE. V celej Európe bolo zaznamenaných doposiaľ 183 752 prípadov BSE u hovädzieho dobytku, z toho vo Veľkej Británii 181 637 kusov. (Novák et al., 2001)

Podozrenie na prvý prípad výskytu BSE v Slovenskej republike bolo vyslovené 27. 9. 2001 na základe pozitívnych výsledkov rýchlych laboratórných testov na BSE Štátnym veterinárnym ústavom vo Zvolene na oddelení veterinárnej laboratórnej diagnostiky BSE. Išlo o 6-ročnú kravu z domáceho chovu na farme Horná Ždaňa (okres Žiar nad Hronom), majiteľom ktorej bola Vtáčnik s.r.o., Dolná Trnávka. Po vyšetrení vzorky v Národnom referenčnom laboratóriu SRN v Tübingene sa toto podozrenie potvrdilo. Vyšetrenie bolo vykonané špecifickou diagnostickou metódou EÚ – Imunonblottom. (Miluchová, et al., 2007)

Dnes existujú diagnostické testy (Prionoc-check test, Platelia BSE test, Enfer TSE test), ktoré sú schopné rozlíšiť zdravý hovädzí dobytok od dobytku postihnutého BSE za predpokladu, že je starší ako 30 mesiacov. Všetky testy ktoré prešli vyhodnotením Komisie EU sú testy postmortálne, t.j. je ich možné použiť na vyšetrenie vzoriek odobratých o odporazení resp. uhynutí zvierat. Diagnostické rozlíšenie medzi infekčnými a neinfekčnými prionmi sa dosahuje pomocou enzýmu proteáza K. Tento enzým je schopný nastrihať proteínový reťazec neinfekčného prionu bezo zvyšku na krátke fragmenty tzv. oligopeptidy. Teda pôsobením proteázy je normálna forma PrP rozložená, zatiaľ či pri formách PrPsc dochádza k zmene pôvodných z 32 – 35 kD na 27 – 30 kD. Zostávajúci fragment odolný proti proteáze sa označuje PrP 27 – 30. Tento fragment je vizualizovaný pomocou monoklónovej protilátky (Novák et al., 2001).

Odber a spracovanie vzoriek:

Mozog a predĺžená miecha musia byť odobraté čo najskôr po uhynutí, prípadne odporazení zvierat'a. Odobraté vzorky je potrebné fixovať v desaťnásobnom množstve 10% neutrálneho formalínu. Pri odbere vzorky z predĺženej miechy v oblasti mozgového kmeňa cez *foramen magnum* špeciálnou lyžicou sa odber vykonáva najmenej z troch excízií:

- a) predĺžená miecha v úrovni *obexu*
- b) predĺžená miecha v úrovni *pedunculus cerebellaris*
- c) stredný mozog v úrovni *colliculus rostralis*.

Vzorky sa spracúvajú rutinnou laboratórnou technikou a tkanivové rezy sa farbja hematoxylín – eozínom (Levkut et al., 2001)

4. Záver

Prionové choroby sú závažné choroby zvierat a človeka. Pôvodca týchto chorôb sa nazýva prion. Bol objavený v roku 1982, aj keď tieto choroby boli známe oveľa skôr. Prvou známou prionovou chorobou bolo scrapie, ktoré sa vyskytovalo u oviec v Anglicku už v polovici 18. stor. Ďalšou nebezpečnou zvieracou nákazou je BSE, vyskytujúce sa u hovädzieho dobytku. Z chorôb vyskytujúcich sa u ľudí je najzávažnejšia Creutzfeldtova – Jakobova choroba a nový variant Creutzfeldovej – Jakobovej choroby, ktorý je vlastne ľudskou BSE. Prionové choroby sú neliečiteľné, majú dlhú inkubačnú dobu a vždy sú smrteľné. Z tohto dôvodu je najdôležitejšie prísne dodržiavanie ochranných opatrení, ktoré boli prijaté v dôsledku zabránenia šíreniu týchto nebezpečných nákaz.

5. Zoznam použitej literatúry

- BARON, T.G.M – MADEC, J.Y. – CALAVAS, D. 1999. Similar signature of the prion protein in scrapie and bovine spongiform encephalopathy linked disease. In: *j. Clin. Microbiol.*, roč. 11, 1999, s. 3701-3704.
- BEŽO, M. – BEŽOVÁ, K. 1998. *Genetický slovník*. Nitra: SPU. 1998, 318 s. ISBN 80-7137-556-X
- CAUGHEY, B. W., DONG, A., BHAT, K:S:, ERNSR, D., HAYES, S. F., CAUGHEY, W. S. 1991. Secondary structure analysis of the scarpie – asociated protein PrP 27-30 in water by infered spectroscopy. In: *Biochemystry*, 1991. č. 30, s. 7672-7680
- DORMONT, D. 2002. Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. In: *FEBS*
- LEVKUT, M. – LEVKUTOVÁ, M. – REVAJOVÁ, V. 2001. Patologicko-anatomická a histologická diagnostika bovinnej špongiformnej encefalopatie (BSE). In: *Slov. Vet. Čas.* roč. 26, 2001, č. 4, s. 214 – 216, ISSN 1335 - 0099
- MAREŠ, J. – URBÁNEK, K. – HERZIG, R. 2003. Nová varianta Creutzfeldt – Jakobovy nemoci. In. *Neurologie pro praxi* [online]. 2003, č. 1 [cit. 2010-02-20], p. 30-34. Dostupné na internete:
<http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=1045>
- MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – KULÍŠEK, V. – BUJKO, J. 2007. Molekulový základ priónov, výskyt priónóz u ľudí a zvierat a ich klinická charakteristika a diagnostika, In *Slovak J.Anim. Sci.*, SARC 2007,s. 105-112 ISSN 1355-3686
- MITROVÁ, E. 1997. Prenosné špongiformné encefalopátie: Neuroinfekcie s nekonvenčnými imunitnými reakciami. In: *Bratisl. lek .Listy*, roč. 98, 1997, č. 4, s. 209 – 211, ISSN 0006 – 9248
- MITROVÁ, E. 1999. *Transmissibilné spongiformné encefalopátie: Prionové choroby*. Press Publica. 1999, 128 s. ISBN 963-9001-55-4

- MITROVÁ, E. 2001. Prenosné spongiformné encefalopatie – priónové choroby. In *Výživa a zdravie*. roč. 46, 2001, č. 3, s. 63 – 67, ISSN 0042 – 9406
- MITROVÁ, E. 2001. Prenosné spongiformné encefalopatie – priónové choroby. In *Výživa a zdravie*. roč. 46, 2001, č. 4, s. 76 – 77, ISSN 0042 – 9406
- MITROVÁ, E. 2007. Prionové choroby a ich aktuálny epidemiologický význam. In. *Neurol. prax* [online].2007, č. 3 [cit. 2010-03-12], s. 134-135. Dostupné na internete: <http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf.id=2513>
- NOVÁK, M. – HLINKA, D. – MAGC, D. 2001. Rýchla diagnostika bovinnej špongiformnej encefalopatie (BSE). Súčasná situácia na Slovensku a vo svete. In: *Slov. Veter. Čas.*, roč. 26, 2001, č. 4, s. 200-205, ISSN 1335-0099
- PRČINA, M. – ŽILKA, N. – KOVÁČECH, B. – KONTSEKOVÁ, E. 2009. *Prionózy: Konformačné choroby ľudí a zvierat*, Košice, 2009. 20 s.
- PRÍKAZSKÝ, V. 1999. Creutzfeld – Jakobova nemoc a ďalšie prionové nemoci. *Epidemiologie chronických onemocnění SZÚ – CEM Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* [online], roč. 9, 1999, č. 8, s. 344-346 [cit. 2009-04-23] Dostupné na internete: <<http://toaster.szu.cz/cen/ZPRAVY/zpr0999/ceu.html>>
- Prióny [s. a.] [online] [cit. 2009-09-20]. Dostupné na internete: <<http://fuk.sk/files/ref/priony2.doc>>
- PRUSINER, S.B. 1996. Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. In: *Trends Biochem. Sci.*,č. 21, 1996, s. 482- 487.
- QUILIEN, J.F. 2002. Európsky výskum o BSE: *Správa pre spotrebiteľov č. 2*. Bratislava: Výskumný ústav potravinársky, 2002. 16. s
- ŠTASTNÝ, 2010 - prednáška
- VRTIAK, O.J. – CABADAJ, R. – MIKULA, I. – SOKOL, J. 1997. Špongiformné encefalopatie (prionózy) živočíchov. In: *Bratisl. lek. Listy*, roč. 98, 1997, č. 4, s. 212 – 216, ISSN 0006 – 9248
- ŽEMLA, J. – ČIAMPOR, F – LABUDA, M. 1998. *Špeciálna virológia*. Bratislava: SAP. 1998, 218 s. ISBN 80-88908-04-3

Zoznam ilustrácií dostupných na internete:

Obrázok 1 <<http://www.svssr.sk/sk/choroby/bse.asp>>

Obrázok 2

<http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&akce=showall&clanek=762&id_c=968>

Obrázok 3 <<http://www.svssr.sk/sk/choroby/bse.asp>>

Obrázok 4 <<http://www.zootechnika.estranky.cz/clanky/zoohygiena-a-choroby-hospodarskych-zvirat/nespecificka-choroby-prionove-choroby>>

Obrázok 5 <<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/research/prions/index.html>>

Obrázok 6 <<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/research/prions/index.html>>