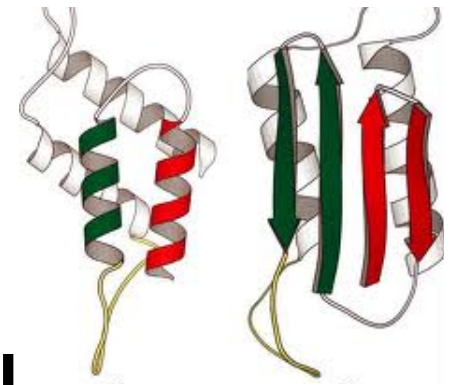
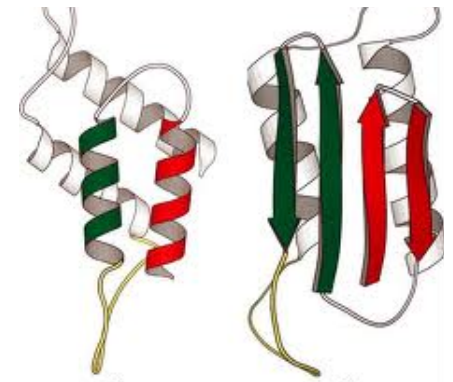
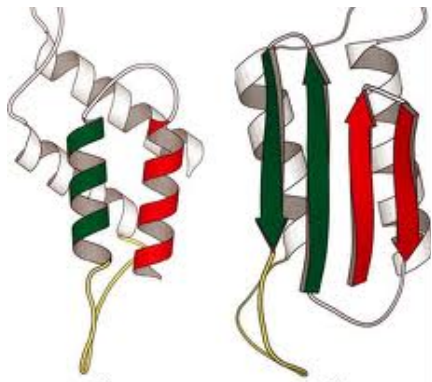


Diagnostika prionů



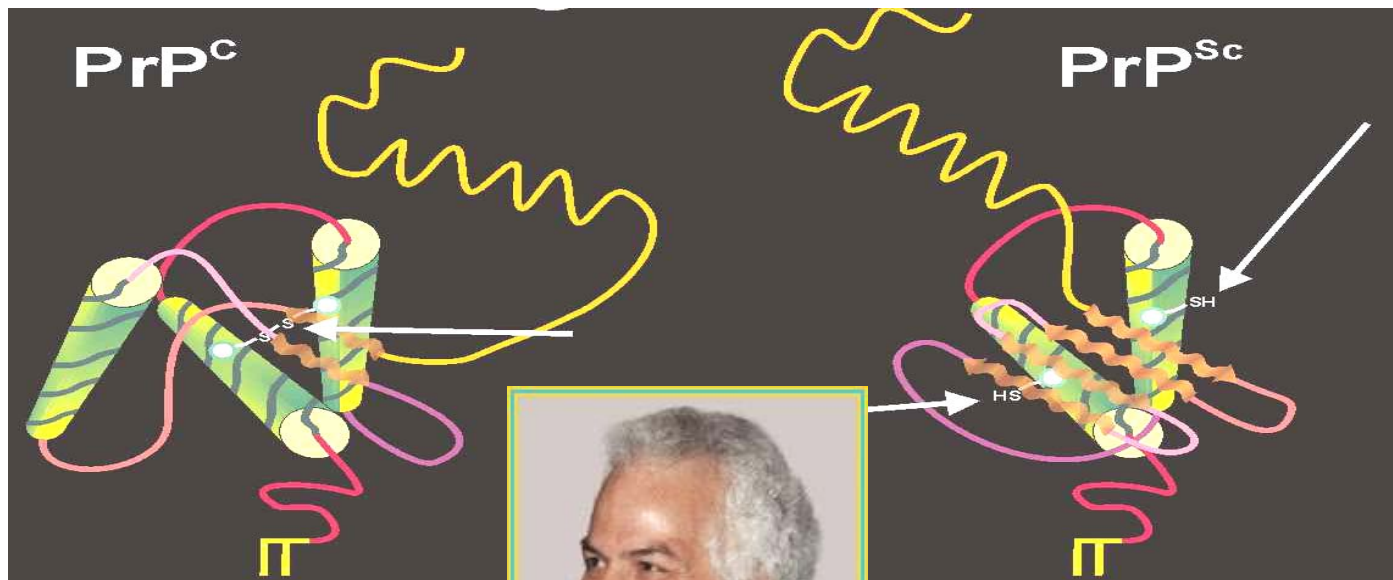
Vladislava Růžičková

XVI. ročník kurzu pro učitele 2014, Brno



Diagnostika prionů

Prion (PrP^{Sc} -patologická forma prionového proteinu (PrP^{C})).

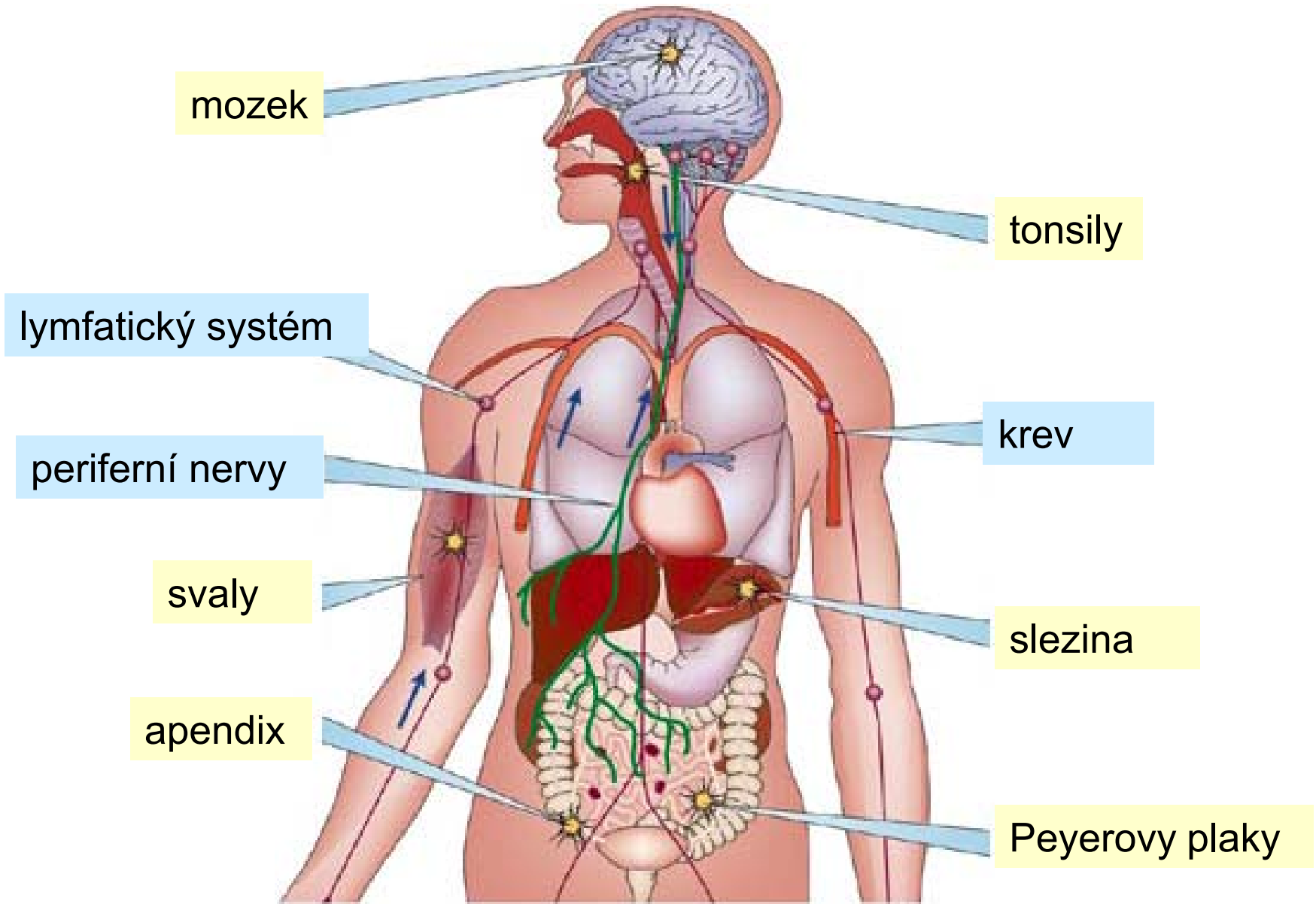


Stanley Prusiner

- 1997 Nobel Prize

- Vyznačují se **přenositelností** z buňky do buňky.
- Ovlivňují **fenotyp** buňky, nikoli její **genotyp**

Výskyt prionu u člověka



PRIONÓZY u lidí

- neurodegenerativní změny v mozku astrocytech a v mikroglíích člověka

Dlouhá inkubační doba (měsíce až roky), pak kóma a smrt.

KURU u etnika Fore na Nové Guineji

Creutzfeldtova-Jakobova nemoc (CJD)

Nová forma vCJD (v 1996) (**humánní BSE**)

Fatální familiální insomnie (FFI)

Gerstmannův- Sträusslerův- Scheinkerův syndrom (GSS)

Není humorální nebo celulární imunologická odezva.

Creutzfeldtova-Jakobova nemoc (CJD)

tvoří 85 % všech prionóz

- Celosvětová incidence 1 – 2 případy/ milion obyvatel/rok
- věk nad 65 let.
- průměrné trvání nemoci je 8 měsíců.
- 85 – 90 % pacientů umírá do 1 roku od klinické manifestace.
- obě pohlaví jsou postižena stejně.

Výskyt 3 forem CJD

1. **sporadická** – nejvíce případů (příčina je neznámá)
2. **genetická** – 10 - 15 %, mutace v genu *prpn*
3. **náhodně přenesená** – 5 %

Pacienti obvykle umírají na pneumonii

Dva typy CJD dle příznaků

Onemocnění CJD se projevuje ve věku 55 – 70 let.

typickým projevem je rychle postupující demence spojená s poruchami pohybové činnosti, ztrátou paměti a stavy zmatenosti, jako důsledek degenerativních změn v mozku.

Proto je většinou rozpoznána až v značně pokročilém stádiu nemoci.

U vCJD jsou charakteristickými znaky:

- raný věk **19 - 39 let**
- psychické projevy - úzkost, deprese,
- nechtěné svalové kontrakce a zhoršená svalová koordinace
- neuropatologické spongiformní změny, ztráta neuronů,
- zbytnění gliové tkáně (patrně v bazálních gangliích a v thalamu)

Diagnostická kritéria WHO pro sCJD z roku 2002

Diagnóza sCJD možná

Rychlý průběh demence (kratší než 2 roky)+ 2 další příznaky:

Myoklonie (*záškuby svalů*); zrakové/mozečkové projevy a kinetický mutismus (*psychicky podmíněná němota*)

Diagnóza pravděpodobná

Klinický obraz jako výše uvedeno plus znaky:

Přítomnost proteinu **14-3-3** v likvoru

Typické EEG projevy (periodicky se opakující generalizující trifazické nebo polyfazické vlny)

Diagnóza sCJD jistá

Průkaz patogenního prionu v mozkové tkáni

Histologický nálezn (spongiformní dystrofie, atrofie neuronů a glióza)

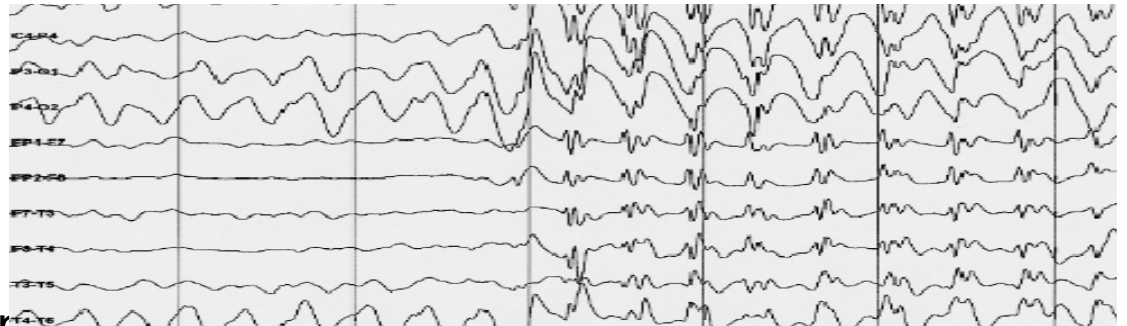
Imunohistochemický nálezn (použití protilátek prokazujících výskyt prionu ve tkáni)

Westernův přenos (WB) (specifický průkaz prionu)

Genetické vyšetření (určení polymorfismu kodonu 129 genu **Prnp**)

Laboratorní diagnostika SE založena na EEG a MR:

U klasické formy CJD je typický nálezn na EEG (elektroencefalogram)



na MR (magnetická rezonance) je zjevné poškození (hypermintenzity) bazálních ganglií, atrofie

a v likvoru lze prokázat protein **14-3-3** (důkaz westernovým přenosem).

U variantní formy CJD lze

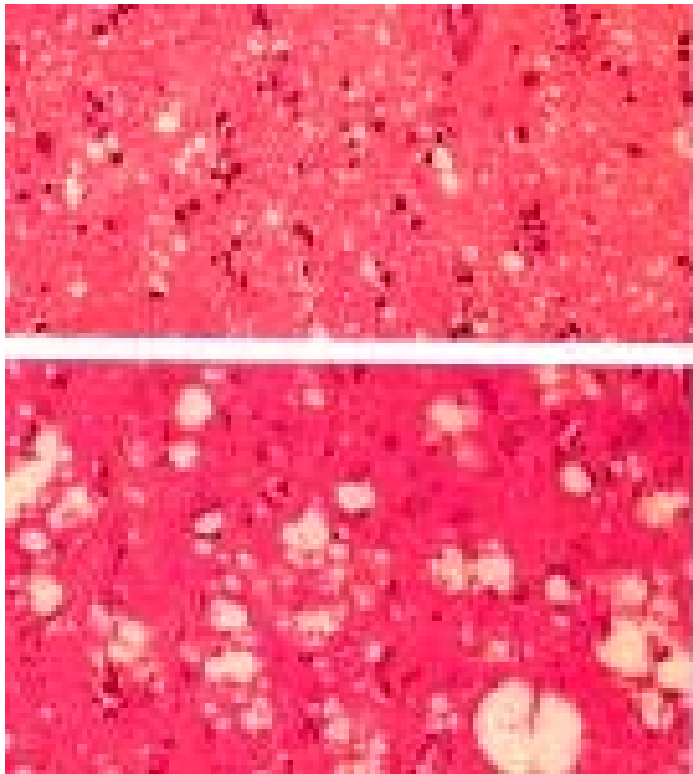
- priony prokázat v tonzilách, apendixu nebo ve slezině;
- na MR je postižení zejména v **thalamu**,
- likvor je negativní na protein **14-3-3**.
- **EEG typický pro CJD chybí.**



LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA:

Neurohistopatologie – vzorky z pitevniho materiálu
spongiformní změny (opticky prázdné prostory – vzhled mycí houby),
úbytek neuronů a zmnožení astrocytů (astrocytózu) amyloidní plaky.

Degenerace mozkové tkáně při CJD.



Mikroskopická detekce

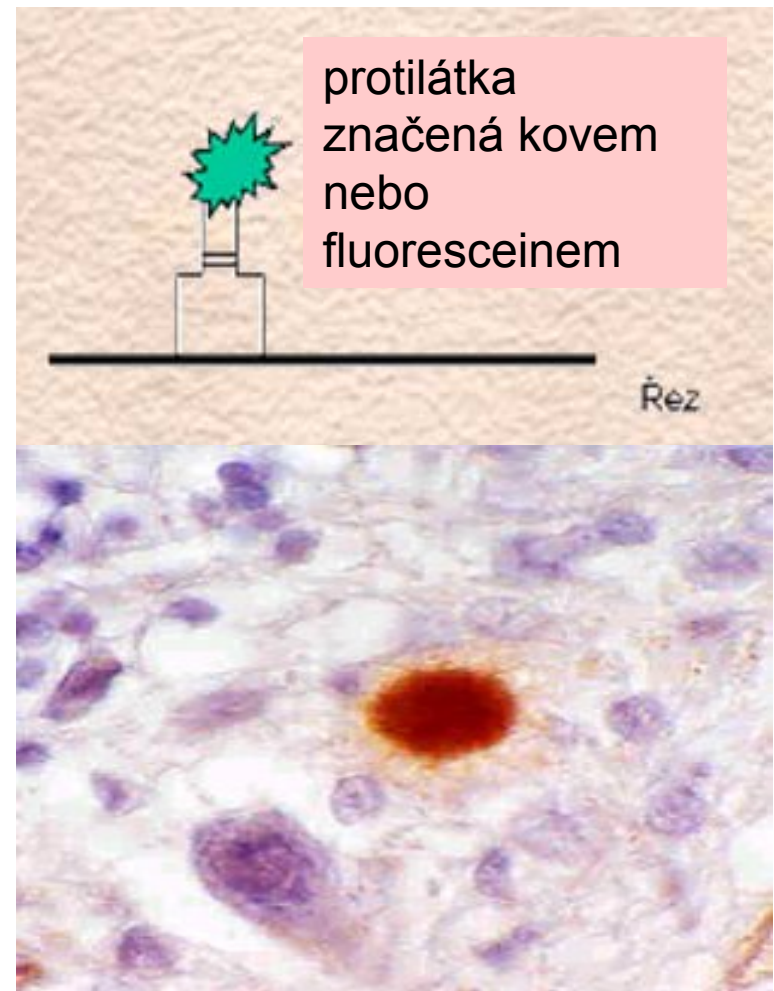
V první fázi se v mozkové tkáni tvoří vakuoly (díry) 5 – 20 μm velké. spongiformní změny (opticky prázdné prostory – vzhled mycí houby), úbytek neuronů a zmnožení astrocytů (astrocytózu).

V závěrečné fázi (spodní obrázek) jsou vakuoly velké 5 – 70 μm .

Imunohistochemie – přímá detekce PrP^{Sc} ve tkáni

Obecný protokol

- odběr a fixace tkáně
- krájení a napínání histologických řezů
- optimalizace prezentace antigenů
- vazba primární protilátky
- detekční systém



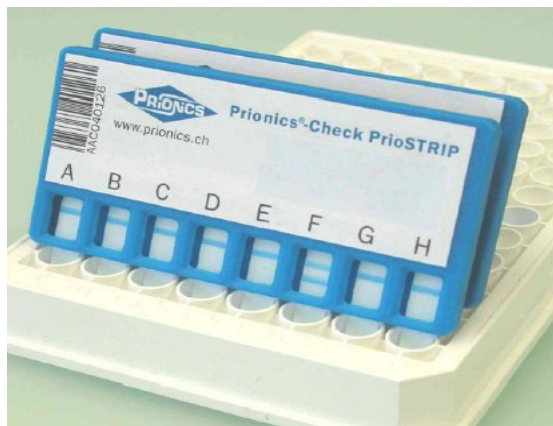
Příprava vzorku na vyšetření BSE *post mortem* a rapid testy



štěpení proteinázou K



přidání pufru k natrávenému vzorku

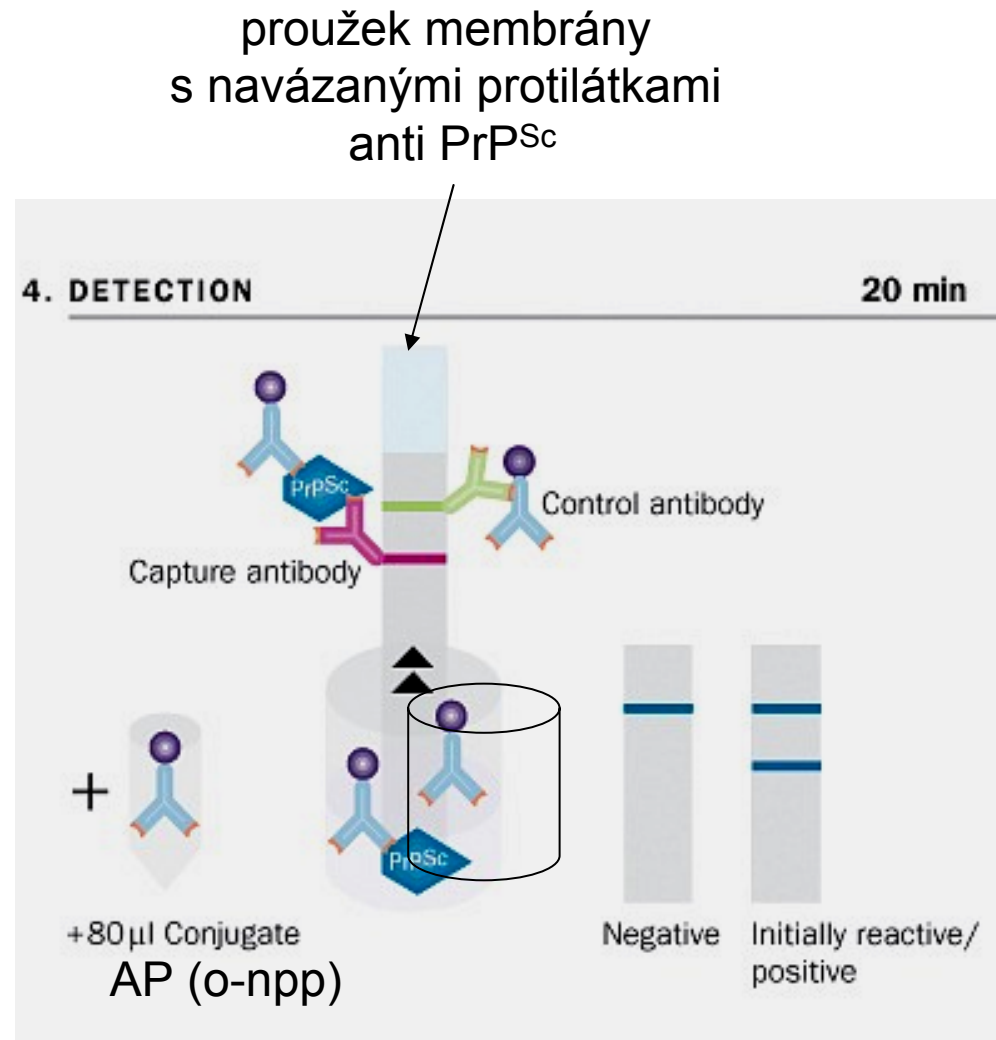
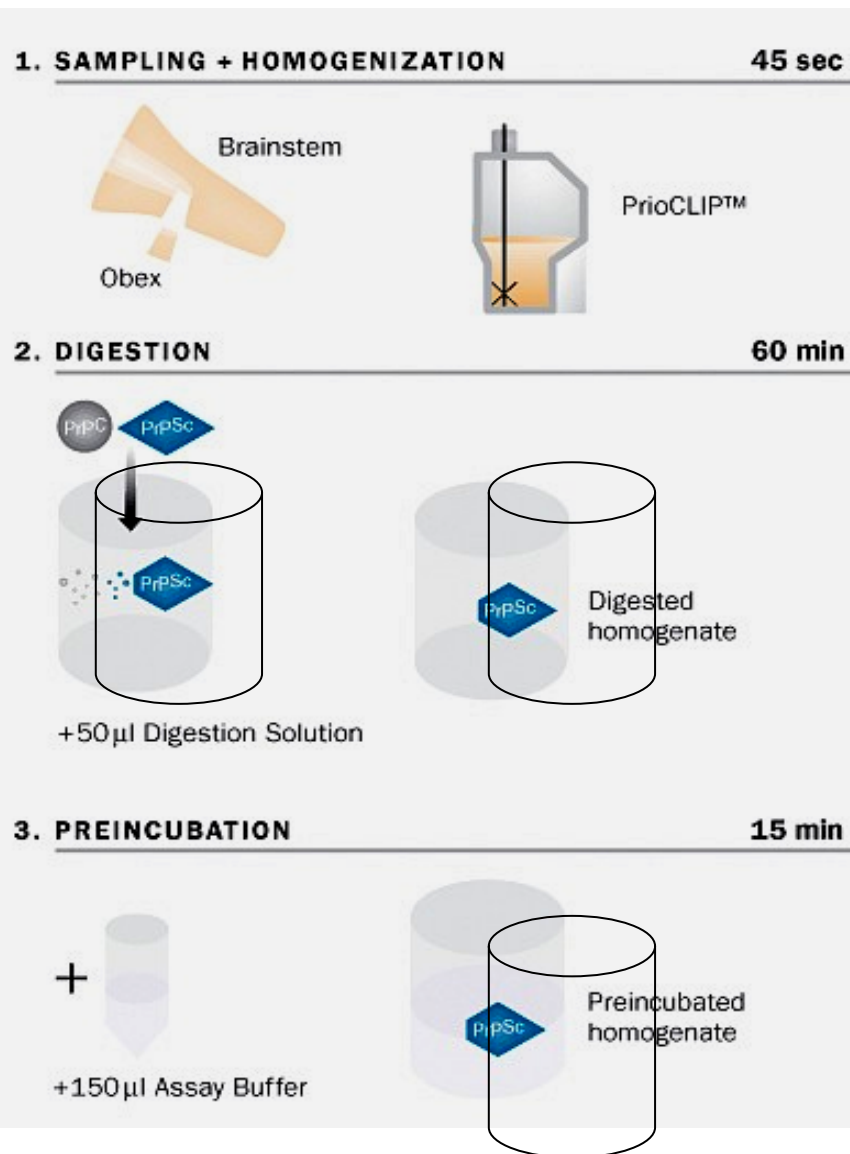


vizuální

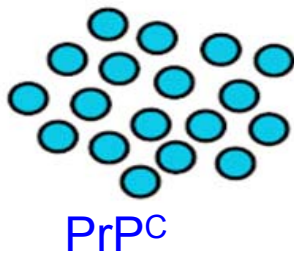


a PC detekce prionu

Prionics-Check LIA test – detekce PrP^{Sc}



homogenát
normálního
mozku



homogenát
infekčního
mozku

Cyklická amplifikace prionového proteinu (PMCA)

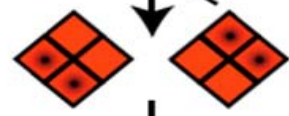
+



37°C

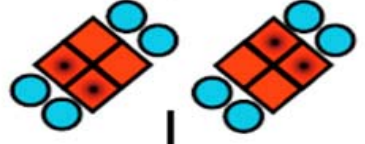


ultrazvuk

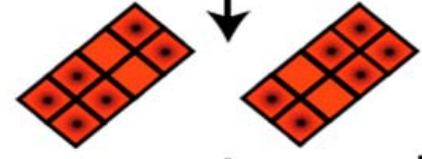


1. CYKLUS

37°C






ultrazvuk



2. CYKLUS

Detekce WB

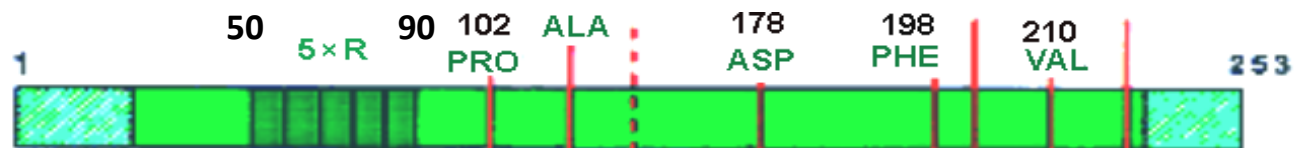


-  PrP^{Sc}
-  PrP^{Sc} v PCMA
-  PrP^C

Molekulární diagnostika prionů

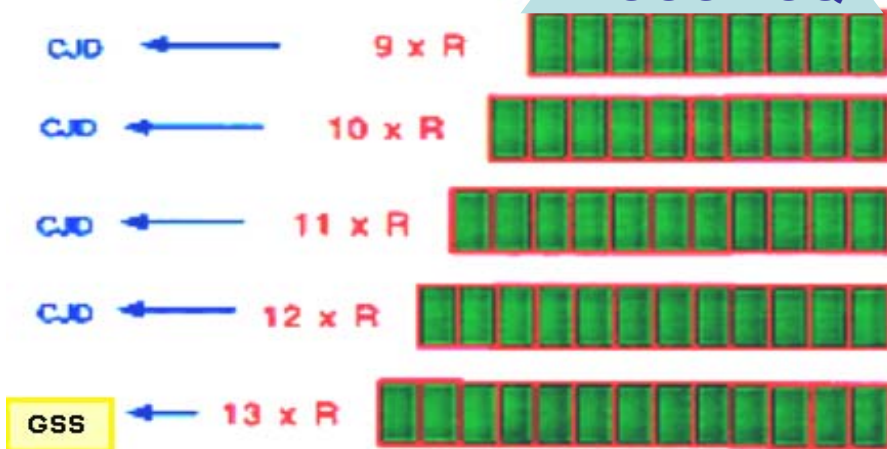
Genetické vyšetření familiálních SE.

U Familiální CJD lze diagnostikovat inzert 144 bp v genu *Prnp* (6 repeticí) u kodonu 53



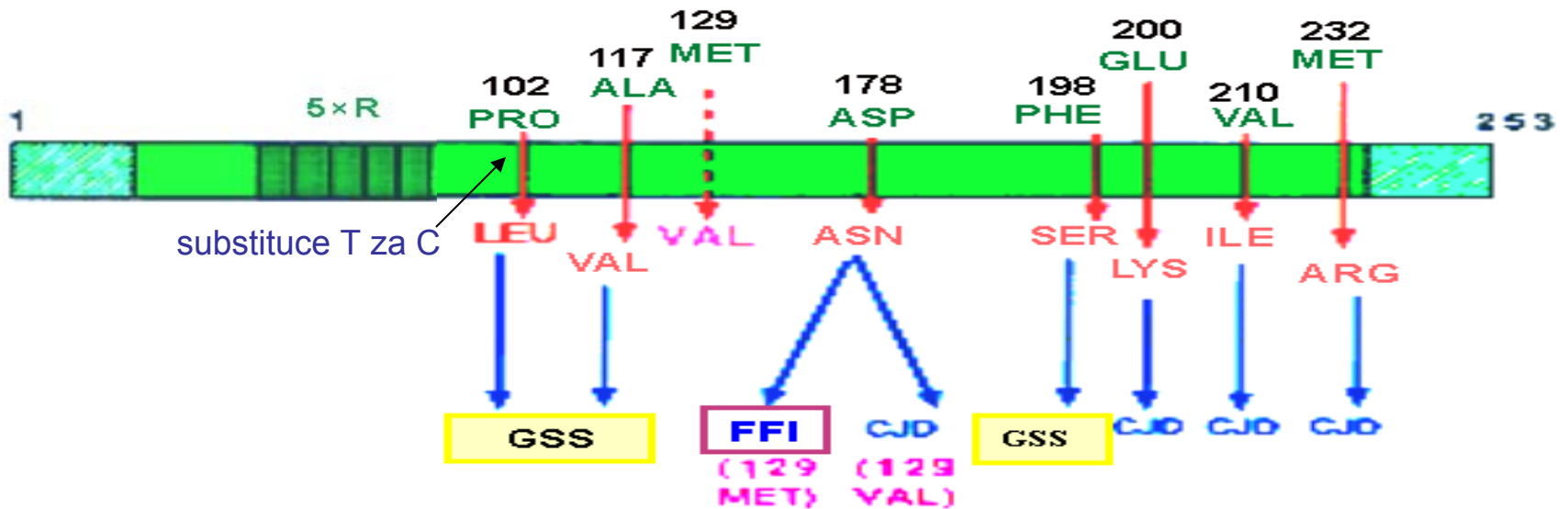
oktapeptidové repeticie

PHGGGWGQ



Genetická analýza mutací v genu *prpn* u familiálních SE

Spontánní mutace se dědí jako dominantní autozomální znak
přenášený mendelisticky



Pokusy na zvířatech

Další vyšetřovací metodou pro detekci prionů je očkování laboratorních hlodavců domnělým infekčním materiálem





Chemické metody spektrofotometrie a krystalografie

slouží k výzkumu prionů

Výskyt prionóz v ČR

FFI (celosvětově asi 8 – 10 případů, **v ČR žádný případ**)

GSSS (5ti-letý průběh) v ČR **jedna rodina**, u níž nebylo provedeno genetické vyšetření.

CJD (dědičné případy známo asi 20) rodokmeny v oblastech na severozápadním Slovensku (Kysuce a na Oravě s přesahem na severovýchodní část Moravy a na jižním Slovensku s přesahem do Maďarska.

vCJD – většina obětí cca 200 případů tvořili Britové.

CJD	2002	2003	2004	2005	2006
Genetická	2	3	0	1	0
Sporadická	5	8	11	9	11
Celkem	7	11	11	10	11