

Spongiozna encefalopatija (1920.–2010.)

**Mirko JUNG, prof. dr. sc., dr. med.,
spec. mikrobiolog**

Švicarska, CH-8800, Zürich, Säumerstrasse
45

Ključne riječi

spongiozna encefalopatija
prioni
genetika
spori virusi

Key words

spongious encephalopathy
prions
genetics
slow viruses

Primljeno: 2010–02–11

Received: 2010–02–11

Prihvaćeno: 2010–11–11

Accepted: 2010–11–11

Pregledni članak

U radu se prikazuju prve prionske bolesti od kojih je većina genetskog podrijetla. Uključuju točkaste mutacije (promjena jednog baznog para, change in a single base pair Adenine/Guanine, Thymin/Cytosine) DNA, insercija oktapeptida u N-ti dio prionskog proteina (3 do 216 oktapeptida), delecije (samo dva ili tri su poznata do sada). Tri ili više insercija potrebna za ovu bolest. To je 35 točkastih mutacija (najčešće su na kodonima 102, 178 i 200). Najnovija varijanta CJB, koja nastaje konzumacijom mesa zaraženog goveda, karakterizira polimorfizam Metionin/Metionon (M/M) na kodonu 129 u 98 posto slučajeva. U ostalih oblika prionske bolesti nema zabilježenih promjena u prionskom genomu. Točkaste mutacije karakterizira jedna promjena u jednom baznom paru od 10⁹ postojećih u ljudskom genomu. Genetske prionske bolesti čine 10–15 posto svih slučajeva prionske bolesti. Ne-genetske prionske bolesti čine 85–90 posto slučajeva, a zajedno se javljaju u 1,5–2,5 slučaja na milijun stanovnika. Genetske prionske bolesti su istovremeno i infektivne. Patološki prionski protein (PrP^{Sc}) potreban je za postavljanje dijagnoze. Klinička dijagnoza genetskih i ne-genetskih prionskih bolesti čini se vrlo kompliciranom. U bolesnika s genetskim prionskim bolestima ponekad postoje anamnestički podaci o sličnim slučajevima koji su se pojavili u ovoj ili prijašnjim generacijama. Genetske prionske bolesti mogu se dijagnosticirati analizom baznih parova laboratorijskom metodom ili automatskim uređajem ili citokemijom, metodom lančane reakcije polimerazom, Western blot metodom, imunoenzimskim testom (ELISA). Za izvođenje ovih metoda potrebno je konstruirati tzv. "primere" ili početnice za kodone 102, 178 i 200. Rade se i obdukcije, biopsije, elektroneurodijagnostika i analiza cerebrospinalnih markera prionskih bolesti. Diferencijalna dijagnostika na druge bolesti je također vrlo važna. Najviše publikacija objavio je Prusiner, koji je dobio i Nobelovu nagradu. On je nedavno promijenio svoje mišljenje o eliminaciji proteina X i prihvatio tezu o utjecaju stranih čimbenika. Patološki prionski protein PrP^{Sc} ne može nastati iz prionskog proteina PrP^C jer PrP^{Sc}, kao protein, ne može stvarati nove proteine. PrP^{Sc} je proizvod gena, što znači da je produkt nukleoproteina. U radu smo sažeto prikazali njegove ideje o genetskim prionskim bolestima. Infektivnost genetskih i ne-genetskih prionskih bolesti čini se vrlo niska.

U posljednjih 40 godina analizirana je kultura tkiva: mnogo puta je bila pozitivna i uzročnik je mogao proći "pasaže". Godine 2007. objavljen je rad o virusnoj etiologiji prionskih bolesti. Međutim, mnogi sojevi otkriveni do danas mogli su se uspoređivati samo elektronskim mikroskopiranjem. Pronađene su čestice veličine 20 do 50 nanometra, koje su se smatrale virusima, ali usporedba nije bila moguća. Nekoliko drugih neurotrofnih virusa također je detektirano, čime se zakomplicirala dijagnostika prionskog uzročnika. Potrebna su daljnja istraživanja kulture tkiva, što je razvidno iz brojne do sada objavljene literature.

Spongious encephalopathy (1920–2010)

Review paper

We have studied the first prion diseases of which most cases were of genetic origin. They include point mutations (change in a single base pair Adenine/Guanine, Thymin/Cytosine) in the DNA, insertions of octapeptides in the N-part of the prion protein (3 to 216 octapeptide) and deletions (only two or three have been known until now). Three or more insertions are needed for the disease. They are 35 point mutations (the most frequent are at codon 102, 178 and 200). The newest variant CJD, which is caused by eating infected meat from in-

fected beef is characterized by polymorphism Methionine/Methionone (M/M) at codon 129 in 98 percent of cases. The other cases of prion disease have no change in the prion genome. Point mutations are characterized by a single change in one base pair of 109 available in the human genome. Genetic prion diseases make up to 10–15 percent of all prion disease cases. Non genetic prion diseases are 85–90 percent; they together make up to 1,5–2,5 per million of inhabitants. Genetic prion diseases are simultaneously also infectious. PrP^{Sc} is needed for the diagnosis. Clinical diagnosis of genetic and nongenetic prion diseases appears very complicated. Genetic disease has sometimes anamnestic information on similar cases appearing in this or earlier generation. Genetic prion disease can be diagnosed by the study of base pairs by a laboratory method or by an automatic device or by Cytochemistry, Polymerase chain reaction, Western blot, Enzyme immunoassay (ELISA). Genetic methods need primers for the codon 102, 178 and 200. There are also autopsy, biopsy, electroneurodiagnostic and substances in the cerebrospinal flu-

id. The differential diagnostic to other diseases is very important. Most publications are from Prusiner, who received the Nobel prize. He changed recently his mind in eliminating the protein X and accepted clearly effects of foreign factors. PrP^{Sc} cannot originate from PrP^C because both are proteins. The PrP^{Sc} is a product of the gene, i.e. that means it is nucleoprotein. We have summarized his ideas on genetic prion disease in the text. The infectivity of genetic and nongenetic prion diseases appears very low.

The last 40 years tissue culture was tried: they were many times positive and the agents could be passaged. In 2007 a publication appeared as the virus of prion diseases was found. But many strains detected until now could only be compared with electron microscopic appearance. 20 to 50 nanometer great formations were found but the tissue itself did not function and a comparison was not possible. Several other neurotropic viruses were also found and this complicates the diagnosis of the prion agent. The tissue culture studies should be helped as evident from numerous publications in the world literature.

Uvod

Tešku neurodegenerativnu bolest, s uvijek smrtnim završetkom, opisali su u Njemačkoj, dvadesetih godina prošlog stoljeća [1, 2]. Bolest nakon toga i danas poznajemo pod imenom Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJB). Dugo se godina dijagnostika zasnivala na kliničkom pregledu i histopatološkom nalazu. Kliničko-patološku triadu je opisao Hadlow W.J. [3], jedan od starijih istraživača na tom području: a) histološki se nalaze male okrugle ili ovalne vakuole u neuronima sive supstance mozga (koje je ponekad moguće vidjeti golim okom), b) stanice sive supstance postaju tamne, skvrčene i atrofične, što uzrokuje velik gubitak neurona, c) astrocitoza uključuje hipertrofiju i hiperplaziju astrocita u sivoj supstanci. Iako astrocitoza nekada može biti prvi znak bolesti, danas se ipak to smatra samo reaktivnim odgovorom. Oko neurona se mogu vidjeti fine granule, fibrilarne strukture, sa svojstvima amiloida. Zbog nedostatka upalnih znakova proces je nazvan encefalopatija [4]. Dijagnostička biopsija mozga, izvedena kod dva bolesnika s CJB, otkrila je u oba bolesnika upalni profil sa signifikantnom pleocitozom u cerebrospinalnom likvoru (CSL) što bi upućivalo da se radi o kroničnoj infekciji u CJB-i [5].

Na sličnu bolest te mogućnost hereditarnog (obiteljskog) prijenosa bolesti, upozoreno je već 1928. i 1936. godine [6, 7]. Klinički je bolest podsjećala na CJB, a prema autorima su je nazvali Gerstmann-Sträussler-Scheinkerov sindrom (GSS). Na takav, hereditarni tip bolesti upozorili su i kod Libijskih Židova koji su emigrirali u Izrael [8]. Učestalost bolesti u toj etničkoj skupini bila je trideset puta veća od učestalosti u drugim etničkim skupinama u Sjevernoj Africi ili u Europi (javljao se 1–2 slučaja CJB ili manje na milijun stanovnika). Opisano je 1974. godine 13 bolesnika u Libijskih Židova te pojedinačni u Izraelu, Maroku, Alžiru, Tunisu te u Istočnoj Europi. Najprije se

pretpostavljalo da je uzrok bolesti konzumacija mozga ovaca, ali to nije dokazano [9]. Zatim se razmatralo o dva moguća načina vertikalnog prijenosa [10]: do prijenosa može doći i konatalno, kao što je to slučaj kod scrapiea ovce [11] ili Bovine spongiformne encefalopatije (BSE) [12]. Konatalnih prijenosa bolesti u čovjeka nisu našli, izuzevši genetsku etiologiju s mogućom višedesetljetnom inkubacijom. Do oboljenja čovjeka može doći i jatrogeno: kod transplantacije corneae [13] ili neurokirurškog zahvata [14] ako je davaoc bolesnik s CJB, i ako instrumenti nisu adekvatno dekontaminirani [15]. Ovdje genetika nije etiološki odgovorna za prijenos bolesti, ali može imati utjecaja na fenotip [16].

Pregled jatrogenih infekata

Neurokirurgija – najčešće transplantacija Durae mater.
Opća kirurgija – rad s inficiranim perifernim tkivima.
Okulistika – transplantacija Corneae, aplanacijska tonometrija.

Krv – transfuzija konzerviranih krvnih stanica i sastojaka (rijetko).

Hormoni hipofize – hipofizni hormon rasta (HHR).

Neučinkovita dekontaminacija instrumenata – preporučuju se instrumenti za jednokratnu upotrebu.

O učestalosti pojave CJB i srodnih oboljenja objavljeni su brojni radovi. Najčešće se javlja u etničkim skupinama u Izraelu [8], Slovačkoj [17] te Italiji [18]. Skupina stručnjaka u Eurocidu [19] objavila je podatke iz 6 europskih zemalja (Finske, Danske, Italije, Nizozemske, Belgije, Ujedinjenog kraljevstva) [20]. Prikazali su 567 bolesnika s CJB, od tih su u 14,5 % našli malformacije u prionskom genu. Kod manje od polovice tih bolesnika našli su slične bolesti u obitelji. Godine 2005. je ista skupina u Eurocidu [21] objavila rezultate iz devet zemalja Europe te Australije i Kanade u razdoblju od 1993.–2002. godine. Prikazali

su 4.441 slučaj CJB, od kojih je 445 bilo hereditarnog, genetskog izvora, tj. 10,2 %. To se slaže s današnjim istraživanjem, da je učestalost CJB općenito veća, 2–2,5 na milijun stanovnika (Švicarska 2,4). Možda je tome pridonijela bolja etiološka dijagnostika molekularno-biološkim metodama. Krajem 70-ih godina započeo je brz razvoj laboratorijske dijagnostike s posebnim interesom za uzročnika za kojeg se već 1967. godine smatralo da je proteinske prirode [22, 23]. To je potvrđeno 15 godina kasnije [24, 25] i to vrijedi još i danas, a uzročnik je nazvan PRION (što bi značilo: protein infekciozni), no do danas još nije u potpunosti isključena ni virusna teorija [26].

KURU

Godine 1957. opisani su brojni bolesnici s teškom neurodegenerativnom bolesti u domorodaca u Novoj Gvineji (Teritorij Australije). Uzrok (Gajdusek, 1957.) razvoja bolesti nije bio poznat. Pretpostavljalo se da se bolest prenosi ritualnim kanibalizmom. Intenzivnim epidemiološkim mjerama bolest je postepeno iščeznula. Oboljenje je nazvano „Kuru“ što na domorodačkom jeziku znači „tresti“ (tremor). Godine 1966. uspelo se eksperimentalno prenijeti moždano tkivo bolesnika od Kuru na čimpanze (Gajdusek, 1966.) što je dalo naslutiti virusnu etiologiju. Isti je autor inokulirao mozak Kuru bolesnika na Rhesus majmune i izazvao bolest životinje s kratkom inkubacijom od 6 mjeseci (Gajdusek, 1972.) Tako je prvi puta prenjeta spongiformna virusna encefalopatija s čovjeka na životinju. Neurološka slika Kurua je pokazala velike sličnosti sa scrapie, oboljenjem ovaca (Hadlow, 1959). Scrapie i Kuru spadaju u istu neurološku grupu bolesti kao i Creutzfeldt-Jakob bolest, te Bovina spongiformna encefalopatija. Premda neurološko-patološka slika nije potpuno identična u obje bolesti ipak je signifikantno slična (vakuolarna degeneracija neurona, vakuolizacija citoplazme, smanjenje neuralnih stanica, te astrocitna gliozna). Upalne promjene nisu bile nađene.

Za bolest je karakteristično mentalno propadanje, dizatrija, tremor i jači grčevi te paralize (Goldfarb, 2004.). Epidemija bolesti je dosegla vrhunac 1950. godine, a iščeznula oko 1990. godine.

PRIONSKA GENETIKA

Prionski gen su opisali 1985. godine [27], a njegovu lokaciju na kromosomu 20, 1987. godine [28]. Humani genom se sastoji od oko 7×10^9 baznih purinsko (A adenin – G guanin) pirimidinskih (T timin – C citozin) parova: A-G, T-C (Bp) i toliko ih je u svakoj diploidnoj stanici.

Genomsku strukturu prionskog gena (PRNP) su opisali 1991. godine [29], kasnije opisan je dvojni PRNP gena, ali njegov značaj nije poznat [30]. Iz objavljenog rada je

vidljiva sekvenca (redosljed) baznih parova (Bp) što čini osnovu cijele genetike. Prikaz gena je na Slici 1. i nađeno je oko 2300 baznih parova. Ekson PRNP eksprimira prionski protein (PrP^C); C označava normalni celularni protein. Grafički je to jednostavno prikazano na Slici 2. Kod prionskog oboljenja dolazi, poslije translacije, do patološkog PrP^{Sc} (Sc od scrapie, prionske bolesti ovaca). Proces stvaranja PrP^{Sc} nije još riješen. PrP^{Sc} je ustvari marker infekcije i njegovim dokazom potvrđena je dijagnoza bolesti. Kod oboljenja dolazi do porasta PrP^{Sc}, ali to nastaje promjenom, a ne umnožavanjem PrP^C, jer PrP^{Sc}, kao protein, ne može stvarati nove proteine. Za to su odgovorni nukleotidi (Bp).

Precizna uloga prionskog gena nije još u potpunosti jasna. Iz pokusa na životinjama znamo da dolazi do određenih bioloških promjena u 24-sata (circadian), ako se prionski gen odstrani, životinje postaju otporne na infekciju prionima, jer poslije odstranjenja prionskog gena ne mogu više oboljeti od BSE (što se pokušava primijeniti u govedarstvu) [31]. Isto tako nisu uspjeli dokazati infektivnosti PrP^{Sc} *in vitro* [32]. Kod nekih pokusa su dobili nejasne rezultate. Godine 2000. su opisali polimorfni prionski gen, tzv. dvojni. Taj gen nije bio promijenjen u inficiranim stanicama mozga kod ovčjeg scrapiea niti u moždanim stanicama bolesnika s CJB.

Prionski protein (PrP)

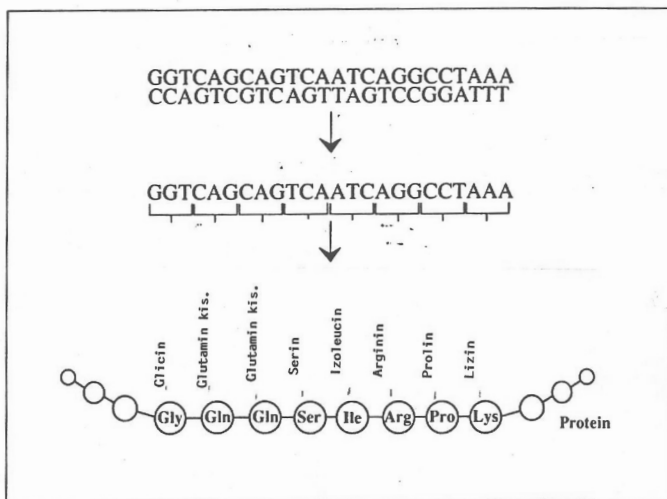
Prionski protein čine 254 aminokiseline kodirane, od 1 do 254. Na svakom diploidnom kodonu su dvije aminokiseline, jednake (homozigoti) ili različite (heterozigoti).

Terminalne regije su N (1–25) i C (231–254). Područje 51–91 služi za inserciju (umetanje) ili za deleciju (brisanje) oktapeptida (oktapepid: 24 Bp: 8 aminokiselina). U regiji 102–231 su točkaste mutacije (najvažnije mutacije u genu). Redosljed (sekvenca) baznih parova (Bp) PrP^C i PrP^{Sc} je identičan i stoga čovjek ne stvara protutijela na PrP^{Sc} tako da serološke pretrage ne mogu poslužiti u dijagnostičke svrhe. Zato u dijagnostici koristimo male glodavce s drugom Bp sekvencom. PrP^{Sc} je prion koji ima nešto manje aminokiselina, različitu konformaciju (orijentaciju u prostoru) i djelomično je otporan na razgradnju proteazama što PrP^C nije. Zbog manjeg broja aminokiselina ima i manju molekularnu težinu (27–30 kilodaltona). Od proteaza se još i danas koristi isključivo Proteinaza K. Izomere PrP je prikazao Prusiner (Grafikon 3.) u suradnji s Ball 1988. godine, University California i Italfarmaco Research Center, Milano, 1996. godine te Hall H.L. University California, 2001. godine. PrP je vezan na površini stanice s Glucophosphatidinositolom, a ima jednu disulfidnu vezu i tri moguće veze sa šećerima (jedna, dvije ili bez), tzv. glikozilacija. Glikozilacija i konformacija igraju bitnu ulogu kod stvaranja tipova ili sojeva PrP^{Sc} koji, kod prijenosa na isti ili drugi soj, perzistiraju nepromijenjeni. Sojeve PrP^{Sc} je ispitivala Bruce kod scrapiea

```

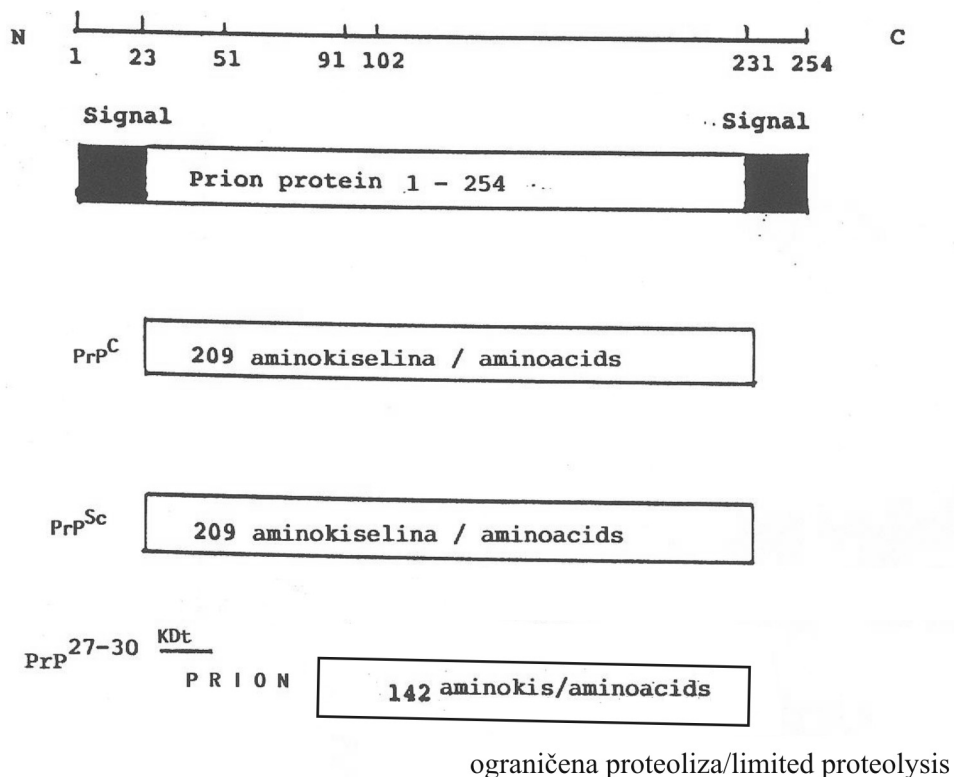
                ATG GCG AAC CTT GGC TGC TGG ATG CTG GTT CTC TTT GTG GCC 60
                Met Ala Asn Leu Gly Cys Trp Met Leu Val Leu Phe Val Ala
ACA TGG AGT GAC CTG GGC CTC TGC AAG AAG CGC CCG AAG CCT GGA GGA TGG AAC ACT GGG 120
  Thr Trp Ser Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly
GGC AGC CGA TAC CCG GGC CAG GGC AGC CCT GGA GGC AAC CGC TAC CCA CCT CAG GGC GGT 180
  Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly
GGT GGC TGG GGG CAG CCT CAT GGT GGT GGC TGG GGC CAG CCT CAT GGT GGT GGC TGG GGG 240
  Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly
CAG CCC CAT GGT GGT GGC TGG GGT CAA GGA GGT GGC ACC CAC AGT CAG TGG AAC AAG CCG 300
  Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro
AGT AAG CCA AAA ACC AAC ATG AAG CAC ATG GCT GGT GCT GCA GCA GCT GGG GGA GTG GTG 360
  Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val
GGG GGC CTT GGC GGC TAC ATG CTG GGA AGT GCC ATG AGC AGG CCC ATC ATA CAT TTC GGC 420
  Gly Gly Cys Thr Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly
AGT GAC TAT GAG GAC CGC TAC TAT CGT GAA AAC ATG CAC CGT TAC CCC AAC CAA GTG TAC 480
  Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Arg Tyr Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr
TAC AGG CCC ATG GAT GAG TAC AGC AAC CAG AAC AAC TTT GTG CAC GAC TGC GTC AAT ATC 540
  Tyr Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile
ACA ATC AAG CAG CAC ACC GTC ACC ACA ACC ACC AAG GGG GAG AAC TTC ACC GAG ACC GAC 600
  Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp
GTT AAG ATG ATG GAG CGC GTG GTT GAG CAG ATG TGT ATC ACC CAG TAC GAG AGG GAA TCT 660
  Val Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Arg Glu Ser
CAG GCC TAT TAC CAG AGA GGA TCG AGC ATG GTC CTC TTC TCC TCT CCA CCT GAG ATC CTC 720
  Gln Ala Tyr Tyr Glu Arg Gly Tyr Ser Met Val Leu Phe Ser Ser Pro Val Ile Leu
CTG ATC TCT TTC CTC ATC TTC CTG ATA GTG GGA TGA GGAAGGCTCTCTCGTTTCCACCATCTTTCTA 787
  Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly End
ATCTTTTCCAGCTTGAGGGAGGCGGTATCCACCTGCAGCCCTTTTAGTGGTGGTCTCACTCTTCTCTCTTTGT 867
CCCCGATAGGCTAATCAATACCCCTTGGCACTGATGGCACTGGAAAACATAGAGTAGACCTGAGATGCTGGTCAAGCCCC 947
CTTTGATTGAGTTCATCATGAGCCGTTGCTAATGCCAGGCCAGTAAAAGTATAACAGCAAAATAACCATTGGTGTCTGAA 1027
ATACCTTTGCGCTGGATACCTCTGGCTCCTCAGCAGCTAGAGCTCAGTATACCTAATGCCCTATCTTAGTAGAGATTTCA 1107
AGCTATTTAGAGATATTTTCCATTTTAAAGAAAACCCGACAACATTTCTGCCAGGTTTGTAGGAGGCCACATGATACTTA 1187
TTCAAAAAATCCTAGAGATCTTAGCTCTTGGGATGCAGGCTCAGCCGCTGGAGCATGAGCTCTGTGTGTAACCCGAGA 1267
TGGGGTGATGTTTTACTTTTACAGTATGGGCTACACAGCAGCTGTTCAACAAGAGTAAATATTTGTCACAACACTGAACC 1347
CTGGCTAGAGGACATATTCACAGTGAACATAACTGTAACATATATGAAAAGGCTTCTGGGACTTGAATCAAAATGTTTG 1427
GAATGGTGCCCTTGGAGGCAACCTCCCATTTAGATGTTTAAAGGACCCATATATGTGGCATTCTTTCTTTAACTATAG 1507
GTAATTAAGGCAGTGAAAAGTAAATTCCTTCTAGACACTGAAGGCAAAATCTCCTTTGTCCATTTACTGGAAAACGAGA 1587
ATGATTTTGCATACAGGAGAGCTGCAGTTGTGAAAAGCACCATCATCATAGAGGATGATGTAATTAATAAATGGTCAGTG 1667
TGCAAGAAAAGAACTGCTTGCATTTCTTTATTTCTGTCTCATAATGTCAAAAACAGAAATAGGTCAAGTTCATAGTT 1747
TCTGTAATTTGGCTTTTGAATCAAGAATAGGGAGACAATCTAAAAAATATCTTAGGTTGGAGATGACAGAAATATGATTG 1827
ATTTGAAGTGGAAAAGAAATCTGTTAATGTTAATTAAGTAAAATATATCCCTGAATTTGTTGATTTGTCCACCTAGC 1907
AGATATGTTACTTTTCTGCAATGTTATATTTGGCTTGCACCTTTGTGAGTATCTATGTAAAAATATATATGATATATA 1987
AATATATATTTGCATAGGACAGACTTAGGAGTTTGTTTAGAGCAGTTAACATCTGAAGTGTCTAATGCATTAACCTTTGT 2067
AAGGTAAGTAACTAATATGTGGGAAACCCCTTTGCGTGGTCTTAGGCTTACAATGTGCACTGAATCGTTTCATGTA 2147
AGAATCCAAAGTGACACCATTAAACAGGCTCTTGAATATGCATGTACTTTATATTTTCTATATTTGTAACCTTGCATGT 2227
TCTTGTTTTGTATATAAAAAAATGTAATGTTTAAATATCTGACTGAAATTAACGAGCGAAGATGAGCACCA 2301
    
```

Slika 1. Sekvenca nukleotida genomskog fragmenta (PRNP) koji kodira prionski protein (PrP)
 Figure 1. Nucleotide sequence of genomic fragment containing the coding the human prion protein (PRNP)



Slika 2. Ekspresija proteina
 Figure 2. Protein expression

Gen je zapravo samo određeni redosljed (sekvenca) baznih parova (Bp) u kodirajućoj DNK (jedna aminokiselina - 3 Bp)
 A gene consist of a given sequence of base pairs (Bp) in the coding DNA (one aminoacid - 3 Bp)



Slika 3. Izomere prionskog proteina
Figure 3. Isomers of prion protein

i BSE, a ispitivala je i raspodjelu lezija u mozgu (Lesion profile), prenosivost i inkubaciju [33]. Inkubacija je odlučujuća kod scrapiea [33]. Collinge [34] je metodom Western blot (WB) mogao razlikovati sporadičnu i iatrogeno CJB te varijantu CJB (vCJB), PrP^{Sc} u sporadične i BSE bio je identičan; to je bio jedan od prvih dokaza za identičnost vCJB, odnosno BSE. To je skoro istovremeno potvrđeno i u Škotskoj [35].

Brzi napredak molekularne biologije s transgeničnim laboratorijskim životinjama kao npr. miš s prionskim genom goveda (Mo^{Bo} umjesto Mo^{Mo}) značajno je povisio osjetljivost na eksperimentalni prijenos bolesti govedo-miš. I na taj način je dokazana identičnost BSE i vCJB [36]. Prenosivost intra- ili inter-speciesa je značajna, ovisna o redosljedu baznih parova, Bp [37]. Zato genetski faktori mogu igrati ulogu i kod ne-genetskih slučajeva što se najbolje vidi kod polimorfizma, gdje ne dolazi do mutacije u prionskom genu.

Polimorfizam

Kod polimorfizma se radi o mogućnosti ugradnje baznih parova (Bp) aminokiselina na diploidnom lokusu prionskog proteina. Najvažniji je kodon 129. Par aminokiselina čine metionin (m) i valin (v), a tri mogućnosti su homozigoti m/m i v/v i heterozigot m/v. Kodon 129 je daleko najznačajniji, a to smo opisali 2003. godine [38].

Homozigoti (m/m) i heterozigoti (m/v) su podjednako često dokazani, a homozigoti v/v su znatno rjeđi (izuzev u skupini jatrogenih oblika). Homozigoti su dokazani u 98–99 % slučajeva oboljelih od varijante CJB, koja je rezultat konzumacije s BSE inficirane govedine [39]. Heterozigot m/v je dokazan u samo jednog oboljelog od vCJB poslije transfuzije [40], ali već u drugog posttransfuzijskog slučaja je opet dokazan homozigot m/m [41]. Homozigoti m/m pokazuju veću osjetljivost na infekt. Kod genetskih prionskih bolesti uloga m/m na kodonu 129 nije tako jasna, no ponekad očito utječe na kliničku sliku. Polimorfizam m/m igra ulogu i kod fatalne insomnije, ali na kodonu 178 i od toga ovisi da li će se razviti fatalna ili sporadična insomnija.

Po nekim autorima će broj slučajeva vCJB biti znatno veći, jer bi broj klinički asimptomatskih slučajeva mogao iznositi i do 237 na milijun stanovnika [42].

Insercija

Inserciju (umetanje) oktapeptida (8-aminokiselina odnosno 24 Bp) u prionski protein u regiji 51–91 [43]. Zapravo su četiri oktapeptida i jedan nonapeptid, a označeni su kao R1, R2, R3, R4. Opisani su kao 5 (normalan) 6/5+1, 7/5+2, 8/5+3, 9/5+4, 10/5+5, 11/5+6, 12/5+7, 13/5+8, 14/5+9. Npr. insercija 2: R1 R2 R2 R2a R2a R3 R3. Tako napisana mutacija je opisana u jednoj

maloj obitelji u UK 1992. godine, a u brojnom srodstvu su geneološki dokazali još 50 osoba [44]. Godine 2005. su dokazali zajednički hereditarni faktor te male obitelji i brojne rodbine s oko 80 dokazanih, ali klinički inaparentnih slučajeva, te 100 sumnjivih slučajeva, kod kojih je bila potrebna detaljna obrada. Isto su tako našli neočekivano visok broj takvih mutacija, daleko viši od klasičnih točkastih mutacija, ali o broju klinički asimptomatskih slučajeva nemamo podataka. Smatra se da je za klinički manifestnu bolest potrebna insercija od najmanje tri oktapeptida [16]. Radove na tom polju nastavili su sve do najnovijeg doba. Godine 2003. dokazana je ponavljajuća insercija oktapeptida (Octapeptide-Repeat-Insertion) [45] sa 7 oktapeptida, 168 Bp. Radilo se o bolesniku s obiteljsko-familijarnim oblikom bolesti koja je počela u dobi od 26 godina starosti, a trajala je 16 godina. Drugi bolesnik je 68 godišnji Japanac kod kojeg je nađena insercija 3 oktapeptida (72 Bp). Bolesnik je umro nakon 3 godine zbog pneumonije [46]. Kod jednog bolesnika sa slikom sporadične CJB dokazana je insercija 5 oktapeptida (120 Bp) [47]. Kod drugog bolesnika sa slikom sporadične CJB nađena je insercija sa 6 oktapeptida [48]. Molekularno-genetska dijagnostika je pokazala neobične neuropatološke promjene. Kod spomenutog bolesnika nisu [48] našli slučaj oboljenja u obitelji.

Pokusima na životinjama su došli do rezultata da insercije mogu utjecati na stvaranje patološkog prionskog proteina (PrP^{Sc}), što može biti od značaja za početak bolesti kod hereditarnih oblika. Ispitivanja polimorfizma kod kineske populacije pokazalo je inserciju 73 Bp kod 11-ero djece i njihovih majki, ali ne i kod očeva [49]. Zaključeno je da oktapeptid insercije utječu na porast PrP^{Sc} [50]. Godine 2005. objavljena je prva insercija (5 oktapeptida) nađena u Japanu [51].

Fenotip 86 oboljelih osoba s insercijom 6 oktapeptida, te 84 sumnjivih slučajeva opisani su 2006. godine [52]. Kod mnogih je opažen rani početak demencije te različite kliničke slike. Obrnuto proporcionalan je bio odnos između starosti bolesnika i trajanja bolesti. Polimorfizam na kodonu PrP 129 nije imao utjecaja na trajanje bolesti. Ista skupina autora opisala je tri obitelji s različitim inser-

cijom 5 oktapeptida [53]. Kod afričke obitelji opažena je rapidna progresivna demencija s Kuru-sličnim (amiloidnim) pločicama u mozgu. Originalna mutacija kod te obitelji se vjerojatno sastojala u deleciji jednog polipeptida. Na osnovi podataka u literaturi se čini da slučajevi sa insercijom 5 oktapeptida oboljevaju kasnije od slučajeva sa 6 oktapeptida. Kodon 129 može modificirati oboljenje. Povećanje patološkog PrP^{Sc} je znatno u slučajevima insert mutacija [54], tako da broj inserata može utjecati na patogenezu hereditarne prionske bolesti. Naglašavamo, da je za razvitak bolesti potrebna insercija od najmanje 3 oktapeptida [16]. Inserciju smo opisali 2003. godine [55].

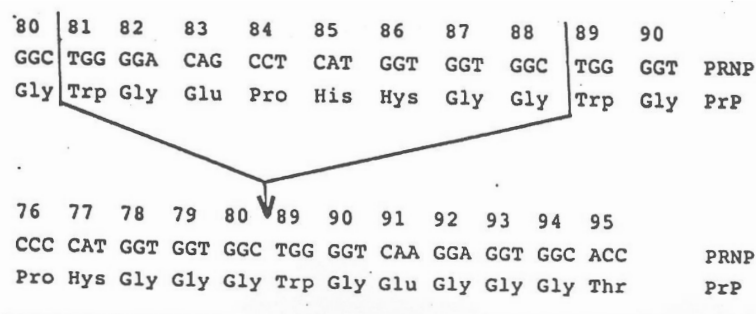
Delecija

Kod delecija (brisanja) se radi o gubitku 24 bazna para (Bp), što odgovara 8 aminokiselina ili jedan oktapeptid. I delecije su opisane 2003. godine [55]. Postoji mogućnost da dođe do delecije 48 Bp što odgovara 16 aminokiselina (2 oktapeptida). Prikaz delecije je u Grafikonu 4. U desetljeću 1990.–2002. godine opisano je desetak slučajeva delecije i kod skoro polovice bolesnika su dijagnoze bile negativne ili nejasne. Već 1993. godine došlo se do zaključka da delecije nisu u vezi s CJB [56], a taj zaključak vrijedi još i danas [16]. Zanimljivo je da su deleciju našli i u HeLa stanicama jedne bolesnice s karcinomom cerviksa [57].

Točkaste mutacije (Point mutations)

Najčešći su oblik promjena u prionskom genu PRNP, a radi se o promjeni samo jednog purinsko-pirimidinskog baznog para (Bp) između 7×10^9 (milijardi) baznih parova koji su u jezgri svake diploidne stanice [58]. To dovodi do promjene sekvence aminokiseline na tom kodonu, jer je aminokiselina rezultat sekvence tri bazna para.

Na taj se način mijenja i sekvence aminokiseline u prionskom proteinu (PrP), a to je od sudbonosnog značaja. Sekvence nukleotida, odgovorne za ekspresiju aminokiseline smo znali analizirati pred više od trideset godina kemijskim enzimskim metodama [59, 60]. Metoda se postepeno proširila i u manje laboratorije, a koristila se u



Slika 4. Delecija nukleotida (24-Bp) u prionskom genu (PRNP)

Figure 4. Deletion of nucleotide (24-Bp) in the prion protein gene (PRNP)

Točkasta mutacija / Point Mutation							
Trojni kodon				Triple codon			
Bazni par	T	C	C	T	C	T	Base pair
	A	G	G	A	G	A	
	Serin			Arginin			
	T	C	C	T	C	T	Base pair
	A	G	G	A	G	A	
	Serine			Arginine			

Purini : Adenin (A) Guanin (G) Purines : Adenine (A) Guanine (G)
 Pirimidini: Timin (T) Citosin (C) Pyrimidines: Thymin (T) Cytosine (C)
 RNK Uracil (U) umjesto Timina RNA Uracil (U) instead of Thymine

Slika 5. Točkasta mutacija
 Figure 5. Point mutation

dokazu očinstva te u kriminalistici [61]. Korištenje tehnike u humanoj medicini dovelo je do neslućenog napretka [62]. Metoda se počela koristiti i za istraživanje patogenih bakterija i virusa, kao i pomoć pri genetskoj terapiji malignih tumora, istraživanju žive okolice, itd. Danas korištena metoda pirosekvenciranja nikleinskih kiselina primjenom 454 sekvencera omogućuje čitanje znatno dužih DNK sekvenci, što je od naročito značaja za viruse. Novim

generacijama sekvencera možemo odrediti 400–500 nukleotida × 1 milijun. 25 milijuna Bp može se odrediti za 4 sata s točnošću od 99 %.

Na Slici 6. su prikazane sve humane prionske bolesti uključivši insercije, delecije te točkaste mutacije. Non-genetskih oblika je samo 4, što je na izgled čudno jer oni ipak čine 80–90 % svih prionskih bolesti. Dvije nove točkaste mutacije opisane su 2008. i 2009. godine [63, 64].

SINDROM HUMANIH PRENOSIVIH PRIONSKIH OBOLJENJA
 Syndrome of human transmissible prion diseases

GENETSKI OBLICI Genetic forms	BROJ Number	TOCKASTE MUTACIJE U PRIONSKOM GENU Point mutations in the Prion Protein Gene
GENETSKA CJB Genetic CJD	34	P102L P105L G114V A117V G131Y G142S Y145X
GSS SINDROM GSS syndrome		R148H Q160X N171S D178N V180X V180I T183A
Fatal INSOMNIJA 178 Fatal Insomnia 178		H187R T188A T188K T188R T193I E196K F198S
		E200K D202N V203I R208H V210I E211Q Q212P
		Q217R Q218K E219K M232T M232R P238S S132I I180L
UMETANJE Insertion	8	Bazni parovi Base pairs
INDEL		24, 48, 96, 120, 144, 168, 192, 216
BRISANJA Deletions	2	Bazni parovi Base pairs
		24 i 48

NE-GENETSKI OBLICI
 Non-genetic forms

- SPORADICNA CJB (sCJB)
Sporadic CJD (sCJD)
- IATROGENA CJB (iCJB) 4
Iatrogen CJD (iCJD)
- VARIJANTA CJB (vCJB)
Variant CJD (vCJB) Polymorphism at codon 129 (m/m in 98 %)
- SPORADIC INSOMNIA
Sporadic Insomnia

(A) Alanine, (R) Arginine, (N) Asparagine, (D) Aspartacid, (C) Cysteine, (Q) Glutamine, (G) Glycine, (E) Glutamic acid, (H) Histidine, (I) Isoleucine, (L) Leucine, (K) Lysine, (M) Methionine, (P) Proline (Fenylalanine), (S) Serine, (T) Threonine, (W) Tryptophan, (Y) Tyrosine, (V) Valine

Slika 6. Sindrom humanih prenosivih prionskih oboljenja
 Figure 6. Syndrome of human transmissible prion diseases

Tipovi točkastih mutacija

1. P102L

Prva točkasta mutacija opisana je 1989. godine [65] kod jednog bolesnika s GSS u Europi i drugog u SAD-u s dokazanim hereditarnim porijeklom bolesti. Za etiološku dijagnozu bili su dovoljni prijenosi moždane supstance bolesnika na glodavce, objavljeni pred skoro 10 godina prije genetske dijagnoze [66–68]. U to se vrijeme mislilo da je učestalost tih slučajeva između 1 i 10 na 100 milijuna stanovnika (!), što se nije potvrdilo. Genetska dijagnoza je dokaz zamjene (supstitucije) leucina (L) prolinom (P) i označava se kao P102L. Za potvrdu etiološke dijagnoze nisu smatrali dovoljno specifičnom histopatologiju mozga pri autopsiji već su zahtijevali imunoblot pretragu moždanog tkiva [69]. Autori su pronašli tri različite forme: a) ataksična forma, b) dementna forma i c) demencija s patološkom količinom zamršenih neurofibrila [70]. Na kodonu 102, zamjena leucina – prolinom P102L se čini specifičnom za ataksičnu formu GSS. Skoro istovremeno se pokazalo da mutacija P102L, iako najčešća, nije jedina mutacija kod GSS forme prionske bolesti [71]. Poslije 3 godine su kod jednog drugog bolesnika s GSS sindromom dokazali inserciju 8 oktapeptida između kodona 51–91 prionskog proteina [72]. Godine 1997. objavljen je slučaj u jednoj japanskoj obitelji s varijantom GSS [73].

Mutacija P102L je bila kasnije povezana s mutacijama F198S, A117V, P105L, G131V, Y145X, H187R te D178N mutacijama. Godine 1996. opisan je prvi slučaj GSS u kineskoj obitelji s mutacijom P102L [74].

Vrlo dobro istražena i poznata heterogenost Gerstmann-Sträussler-Scheinkerovog sindroma (GSS) obzirom na fenotip je molekularno-biološki ispitivana u prionskom laboratoriju u blizini Londona [75]. Mutacija P102L je povezana s različitom propagacijom proteaza-rezistentnog, divljeg PrP^{Sc} te postojećom proteinskom mutacijom. Godine 2008. opisan je slučaj iste mutacije, kod jedne obitelji u Italiji, do sada neopisane [76]. Slučajevi oboljelih s P102L mutacijom te vrlo različitim fenotipom bili su ispitivani klinički, metodom neuroimaging, te elektrofiziološki kod kineskih obitelji u Taiwanu [77]. Odnos genetskih mutacija na 128 dokazanih slučajeva genetske prionske bolesti u Japanu (ukupno 918 ispitanih bolesnika) iznosio je 19,6 % za mutaciju P102L [78].

2. D178N

Prionsko oboljenje s točkastom mutacijom D178N (arginin D zamijenjen asparaginskom kiselinom N na kodonu PrP 178) opisali su Medori i Goldfarb sa suradnicima [79, 80]. Godine 1995. eksperimentalno su dokazali prijenos bolesti na pokusne glodavce [81]. Oboljenje s takvom mutacijom može razviti kliničku sliku cerebelarne

ataksije (podsjećajući na GSS sindrom) bez insomnije [82]. U to se vrijeme počelo sumnjati na drugi, dodatni, genetski faktor, koji bi igrao ulogu kod varijabilnosti fenotipa. Pokazalo se da, kod toga, igra dominantnu ulogu polimorfizam na kodonu 129 PrP (metionin/valin), što je dobro poznato iz prionske genetike [38, 83]. Takav fenotip može podsjećati na GSS sindrom. Mutaciju na kodonu D178N opisali su u brojnoj Finskoj obitelji. Bolest se razvila kao brza demencija s cerebelarnim znacima, oštećenjem gornjeg motornog neurona te mišićnom rigiditetu i mioklonusima. Opisana točkasta mutacija je sigurno povezana s bolešću [84]. Opisanu mutaciju potvrdili su i u Kini [85]. Mutacija D178N je jedna od najčešće opisivanih točkastih mutacija. Karakterističan je vrlo različit početak bolesti te različiti fenotipovi, o čemu se još i danas raspravlja [86]. Iako jedna od najčešćih, u Japanu je bila vrlo rijetka, samo u 1,8 %.

Vrlo je zanimljivo da su kod bolesnika u Koreji također našli različite točkaste mutacije, koje su podsjećale na već opisane mutacije u svijetu [87].

Mutacija D178N odgovorna je za fatalnu familijarnu insomniju (FFI). Vrlo je važna fenotipska varijabilnost istraživana 1998. godine [88]. Danas je opisan spektar fenotipova FFI, genetske i sporadične CJB, kojem treba dodati još i GSS sindrom [89]. Izražena je i intrafamilijarna varijabilnost. Točna je dijagnoza moguća samo genetskim istraživanjem sekvence Bp. Bolest se obično javlja kasno u životu, a moguće je da se uopće ne pojavi.

Klinički podaci iz 1995. godine

D178N- V kodon 129	Demencija, ataksija, mioklonus, spongioformna degeneracija u kori mozga i subkortikalnim ganglijama te astrogliaza
D178N-M kodon 129	Insomnija, disautonomija, ataksija, mioklonus, atrofije određenih talamičkih jezgara
D178N-M kodon 129	Insomnija, konfuzija, demencija, ukočenost, astrocitoza, lokalizirana spongioza

3. E200K

Ove točkaste mutacije su dokazane 1989. godine na Sveučilištu u New Yorku i u Nacionalnom Institutu za zdravstvo u Bethesda (NIH), Maryland [90, 91]. Za genetski dokaz su primijenili metodu PCR koristeći dva primera (→ ←), sintetizirana oligonukleotida iz početnice otvorenog okvira za čitanje PRNP (open reading frame). Tako je došlo do promjene glutamina u lizin E200K. Opisana mutacija je bila prisutna kod više članova obitelji. Naknadno je pronađena identična točkasta mutacija u skupinama oboljelih od CJB u seoskoj populaciji

Slovačke [92]. Za dijagnostiku je korišteno direktno sekvenciranje baznih parova (Bp) kod bolesnika, rođaka i drugih osoba na području pojave CJB. U Slovačkoj regiji Orava su našli 22 bolesnika oboljela od CJB, a troje su dokazani i prijenosom bolesti na laboratorijske glodavce. Mutacija je dokazana u 11 slučajeva CJB i u 12 od 40 zdravih, rođaka prvog koljena. Učestalost CJB je bila nekoliko stotina puta viša od učestalosti u ostaloj populaciji.

Ispitivanja su izvršena u Grčkoj, Poljskoj i Čehoslovačkoj. Iste godine je ispitana prisutnost identične mutacije u 171 osobe, od toga su 102 bile zdrave. U 30 oboljelih sa sporadičnom CJB (sCJB) mutacija je dokazana samo kod dva slučaja, tako da se danas sCJB ne ubrajaju u striktno genetske prionske bolesti [93]. Koristeći opisanu metodu (sekvenciranje Bp) otkrivena je ista mutacija E200K u libijskih Jevreja u Izraelu te kod sefardičnih slučajeva (Jevreji u Španjolskoj, Tunisu i Grčkoj) [94]. Već sljedeće godine [95] dokazane su insercije oktapeptida u prionski protein gen. Našli su 5, 7 ili 8 oktapeptida. Te insercije predisponiraju CJB. U suradnji Bethesde, CSSR, Izraela, Santiago Chilea, ispitano je 55 klinički dijagnosticiranih slučajeva s vjerojatnom ili mogućom CJB [96–101]. Istraživanja na bolesnicima s CJB i točkastim mutacijama nastavljaju se i u najnovije vrijeme [102]. U nekih bolesnika je nađen thalamus sindrom, a dijagnoza je postavljena uz pomoć „Single photon emission computed tomography (99 m)“ tzv. Tc-ethyl cysteinate dimer. U Italiji je 2009. godine opisan slučaj E200K mutacije s osvrtnom na dosada poznatu literaturu [103].

Zanimljivo je da, kod točkaste mutacije E218K dominantni negativni efekt i ne zahtijeva prisutnost Protein X [104].

Klinički podaci iz 1995. godine [105]

E200K-M kodon 129	Demencija, ataksija, mioklonus, piramidalni znakovi, EEG, PHD, široko rasprostranjena spongiformna degeneracija, astrocitoza, gubitak neurona
-------------------	---

DIJAGNOSTIKA

Za vrijeme života se dijagnostika genetskih prionskih oboljenja osniva na anamnestičkim podacima o klinički sličnim, teškim neurološkim oboljenjima u istoj obitelji.

Analizom redosljeda (sekvence) baznih parova (Bp) u prionskom genu i potvrdom aminokiselina u prionskom proteinu (PrP) rutinski je moguće dokazati točkastu mutaciju, inserciju ili deleciju, promjene u prionskom genu. Značaj sekvence BP u PRNP te aminokiselina u PrP odlučuje o prenosivosti na ljude ili laboratorijske životinje te kliničke karakteristike fenotipa. Izvrstan i jednostavan

članak o tome je objavila Priola [37]. Ispitivanje drugih osoba iste obitelji (klinički zdravih) je moguće (u specijaliziranim laboratorijima), ali je neetično, jer eventualno pozitivni nalaz u osobe koje mogu biti klinički zdrave, a razvoj bolesti je moguće očekivati nakon više godina, desetljeća ili nikada. Takove osobe s poznatom genetskom malformacijom, doduše asimptomatskom, mogu zapasti u depresiju, psihozu, počinuti suicid i to samo zbog saznanja o genetskom kodu.

Elektro-neuro-dijagnostika. Metoda je opširno prikazana 2003. godine [106] te tehnički sažeta 2009. godine [107]. Kompjuterizirana tomografija (CT) ne pokazuje abnormalnosti. Magnetska rezonanca (Magnetic resonance imaging) može ponekad otkriti stanovitu artrofiju moždanog tkiva i vrlo je korisna za dijagnostiku varijante CJB. Od velikog je dijagnostičkog značaja elektroencefalogram (EEG) pomoću kojeg se mogu identificirati pojedine faze bolesti, u kojima može doći do dezorganizacije normalnog osnovnog ritma, disritmija te pojave interminantnih ili zašiljenih bi- ili tri- faznih valova. Tipična je pojava zašiljenih trofaznih valova u intervalu jedne sekunde, PSW^{Sc} [108]. Nedostatak takvog nalaza do 12 tjedna bolesti ne isključuje dijagnozu sporadične CJB [109]. O tome se raspravljalo 1988. godine [110], kada još molekularna dijagnostika prionskih bolesti nije bila tako razvijena kao danas.

Biopsija mozga. Kod biopsije mozga se uobičajeno uzima mali komadić sub-dominantnog frontalnog korteksa, pod općom anestezijom. U oko 5 % kasnije potvrđene dijagnoze CJB rezultat biopsije može biti lažno negativan zbog različite distribucije patoloških promjena, „Lesion profile“. Biopsija može biti praćena ozbiljnim komplikacijama uključivši cerebralni apces ili krvarenje [111].

Rezultati biopsije mozga kod bolesnika sa sumnjom na CJB u Njemačkoj, između 1993.–2005. godine [112], prikazani su u 26 bolesnika. CJB je potvrđena u 11 bolesnika. Kod preostalih 15 bolesnika nisu našli znakove CJB. Histološki su tražene spongiformne promjene, gubitak neurona te gliozna. To je kombinirano s imunokemijskim pretragama. Diferencijalno-dijagnostički su došli u obzir tumori, paraneoplastičke bolesti, vaskulitis te Alzheimerova bolest. Ponekad je bilo moguće dokazati kronični encefalitis sa znacima upalnog procesa. Dijagnoza Alzheimerove bolesti može biti odlučujuća za primjenu terapije i to je jedan od razloga za biopsiju mozga. Dijagnoza prionske bolesti je druga najčešća dijagnoza poslije Alzheimerove bolesti [113]. U svakom je slučaju potrebno, prije biopsije analizirati rezultate svih, a napose molekularno bioloških pretraga. Biopsija mozga je svakako potrebna u slučaju demencije nepoznatog uzroka. Suradnja neurologa, neurokirurga, neuroradiologa i neuropatologa daje najbolje dijagnostičke rezultate.

Autopsija. Rezultati autopsije 60 umrlih s kliničkom dijagnozom CJB su opisani 2009. godine [114]. Neuropa-

tološki je klinička dijagnoza potvrđena u 53 slučaja. Mioklonus je bio dijagnosticiran kod 53, a periodični šiljati valovi (PSW^{Sc}) u EEG-u nađeni su u 49 bolesnika. U 7 bolesnika, nije se radilo o CJB nego su bolovali od: cerebralnog infarkta, hipoksične encefalopatije, limfoma, kroničnog alkoholizma sa subduralnim hematoma, aseptičnog meningitisa, alkoholizma i dr. Zbog kliničkih simptoma poremećaja svijesti, smetnji hoda i vrtoglavice svi su ti bolesnici označeni kao moguća CJB.

Cerebrospinalni markeri prionskih bolesti. Bjelančevine 14-3-3 opisane 1967. godine [115] sastoje se od dvije putujuće komponente, označene kao 130 ili 131, ta metoda je uvedena u prionsku dijagnostiku 1986. godine [116]. Ispitani su rezultati dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti 1996. godine [117]. Na 389 ispitanih bolesnika osjetljivost testa je iznosila 98 %, a specifičnost 99 %. Test 14-3-3 je jedini priznat od strane Svjetske zdravstvene organizacije, SZO [118].

Kisela fibrilarna bjelančevina (Glial fibrillary acidic protein) GFAP je marker za astrocitne stanice [119], a njihova je koncentracija kod prionskih bolesti znatno povišena. Isto je pronađeno kod eksperimentalno inficiranih hrčaka te scrapiea ovaca. Test nije našao velike dijagnostičke primjene, ali se koristi i danas [120]. GFAP test je korišten kao dokaz prisutnosti fibrilarne bjelančevine u tkivu mozga i medulle spinalis [121].

Neuron specifična enolaza. U ranom stadiju CJB dokazan je visok nivo tog enzima u cerebrospinalnom likvoru [122]. Metoda se još uvijek koristi [123].

Protein S100. Ova bjelančevina je heterodimer iz dvije izomerične subjedinice s homolognim sekvencama aminokiselina. Protutijela za dijagnostiku dobivena su cijepljenjem kunića i komercijalno su dostupna za imunoenzimski test. Koncentracije S100 kod bolesnika s CJB su bile znatno više [124]. Dijagnostička vrijednost testa je znatno manja ako je došlo do subarahnoidalnog krvarenja ili moždane kapi [125].

Ostale metode za dokaz patološkog PrP

Hematoksin-Eosin (HE) metoda. Metoda bojenja Hematoksin-Eosinom se koristi i danas, pouzdana je i brzo gotova. U prvom je redu potrebno dekontaminirati prione (PrP^{Sc}). Dijelovi moždanog tkiva (3×3×1 cm) se stavljaju u 5 volumena puferirane formol-fiziološke otopine. Fiksacija je završena nakon dva dana. Kod većih količina tkiva materijal se stavlja u 98 % mravlju kiselinu kroz 1 sat, a zatim se dekantira u otopinu 2M NaOH te konačno tretira s 5 volumena 10 % puferirane formol-fiziološke otopine kroz 1 sat. Otopinu je potrebno promijeniti najmanje jednom da bi se odstranila mravlja kiselina.

Bojenje metodom HE: materijal je najčešće parafinirano tkivo centralnog nervnog sistema (CNS). Deparafinizacija se vrši: 1) trostrukom promjenom ksilena; 2) 1–2 min. alkohol 10, 90 te 70 %, te ispiranje vodom; 3) materijal se prenese u otopinu filtrirane boje (Harris Hematoxilin BDH na 5 min.); 4) kratko ispiranje vodovodnom vodom te diferencijacija u apsolutnom alkoholu s 1 % HCL. Dobro ispiranje vodovodnom vodom. Bojenje se kontrolira mikroskopski, stanične jezgre su plave boje; 6) nakon ispiranja vodovodnom vodom dodaje se 0,5 % otopine Eosina Y (2–3 min.); 7) ispiranje preparata 1–2 min. sa 70, 90 i 100 % alkoholom s ksilenom, 8) preparati se čuvaju u Pentex mediju na osnovi ksilena (Cox Scientific).

Western blot (WB) je danas najčešće korištena dijagnostička metoda [126]. Koristi se suspenzija moždanog tkiva (poslije smrti) ili neki drugi materijal, prije smrti, u kojem je potrebno dokazati PrP^{Sc}. S proteinazom K se odstranjuje PrP^C. Pokazalo se da fosfotungstenova kiselina stvara komplekse s PrP^{Sc}, ali ne i sa PrP^C. To znatno povisuje osjetljivost testa i danas se sve više koristi u znanstvenim laboratorijima [127]. Suspenzija tkiva se podvrgne elektroforezi na akrilamidogelu. Nakon završene elektroforeze materijal se prenosi, posebnom metodom (to je i princip testa) na nitrooceluloznu foliju. Sada se dodaje monoklonalno mišje protutijelo za humani PrP^{Sc} (humano protutijelo ne postoji, jer čovjek ne stvara protutijelo na vlastiti prionski protein). U pozitivnom slučaju dolazi do stvaranja kompleksa anti PrP^{Sc} (miš) – PrP^{Sc} (čovjek). Sada dodajemo protutijelo za imunoglobuline miša (koji su u kompleksu), koje je konjugirano s odgovarajućim enzimom ili supstratom za vizualizaciju (senfova peroksidaza, aminobenzidin ili drugo). Ta metoda se koristi u poznatom MRC (Medical Research Council). Danas je na raspolaganju jednostavnija, automatizirana metoda, komercijalno dostupna, a prvi je rezultat već vidljiv za nekoliko sati. Pozitivne je rezultate potrebno potvrditi u odgovarajućem specijalnom laboratoriju. Rezultat WB je u obliku traka, različite širine i intenziteta, a ovisan je o molekularnoj masi. Specifičnost metode je vrlo visoka. Metodom WB su otkriveni i različiti tipovi priona [33, 34] i onih koji uzrokuju varijantu CJB. Tako su nađene različite forme priona i za sporadičnu, jatrogenu i nedefiniranu varijantu bolesti. Veliki napredak je dosegao Scott M.R. [36], koji je radio s transgenim miševima, kojima je prionski gen bio zamijenjen prionskim genom čovjeka ili goveda. Danas je metoda usavršena i omogućen je pregled velikog broja uzoraka. Nažalost kod BSE inficiranih goveda, koje su bez simptoma, rezultat je najčešće lažno negativan. Apsolutan dokaz postiže se tzv. Bioassayom odnosno, prijenos uzročnika na laboratorijsku životinju koja oboli s tipičnom kliničkom slikom. Za to se najčešće koriste miševi (mo^{Bo}) da bi se izbjegla species barijera.

Enzimski imunoset (Enzyme Immunoassay) temelji se na činjenici da jedna molekula enzima može katalizirati

velik broj supstrata, tako da dolazi do krajnjeg produkta molekule. Tu su metodu opisali Engvall E. i Perlmann P. [128, 129]. Metoda je u usporedbi s Western Blotom (WB) manje osjetljiva, ali omogućava testiranje velikog broja životinja. U metodi se koriste mikrotitracijske pločice s 100 zdenaca u koje se stavlja anti-mišji PrP^{Sc}. Tom serumu dodaje se materijal čovjeka ili životinje koji se ispituje na patološki prion. Za vizualizaciju metode dodaju se alkalna fosfataza ili drugo. Metoda je prihvaćena općenito pa i od Svjetske zdravstvene organizacije (Raeberti i Oesch [130]).

PCR (Polymerase Chain Reaction) je tehnika koju koristimo za dokaz vrlo malih količina infektivnog materijala prisutnih u ispitanom uzorku, povećavajući količinu specifičnih nukleotidnih sekvenci uz pomoć direktne DNA sinteze, što su opisali Mullis i Faloona 1987. godine [131]. Za izvođenje ove metode potrebno je konstruirati tzv. „primere“ ili početnice. Reakcija se sastoji iz 3 dijela: denaturacije DNK u uzorku, vezanja specifičnih početnica koje okružuju sekvencu koja će se amplificirati te ekstenziju početnica DNK polimerazom nakon čega nastaju dvije kopije originalnog slijeda nukleotida. Tako je DNK, locirana između dva primera, amplificirana. Nakon 30 ciklusa amplifikacija specifičnog DNK segmenta je postignuta.

Nukleotidni slijed mora biti poznat. PCR treba biti izvedena tako da je minimalna mogućnost kontaminacije izvana. Velik problem predstavlja vanjska DNK. Neki koriste posebne prostore za izvedbu testa, a koriste i „sealed“ kontejnere.

Genetska dijagnostika. Kod sumnje na genetsku prionsku bolest važna je anamneza o sličnoj bolesti u obitelji. Bolest je karakteristična i dugotrajna tako da nije moguća zabluda. Genetski oblici bolesti su nađeni u samo 10–15 % svih prionskih bolesti, a kojih je oko 2 bolesnika na milijun

stanovnika. Genetsko istraživanje pokazuje promjene u redoslijedu baznih parova. Istraživanja se izvode u velikim laboratorijima koji imaju posebne aparate. Mutacije su najčešće na kodonima prionskog proteina 102 (P102L), 178 (D178L) i 200 (E200K). Za njihovo istraživanje moramo imati na raspolaganju odgovarajuće početnice.

Primeri za mutacije P102L, D178N i E200K

P102L 5⁻ GAC CTG GGC CTC TGG AAG AAG CGC-3 forward

5⁻ GGC ACT TCC CAG CAT GTA GCC G-3 reverse

D178N 5⁻ CTA TGC ACT CAT TCA TTA TGC -3 forward

5⁻ GTT TTC CAG TGG CCA TCA GTG -3 reverse

E200K 5⁻ CTA TGC ACT CAT TCA TTA TGG -3 forward

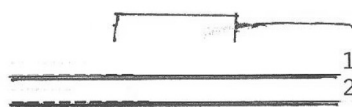
5⁻ GTT TTC CAG TGC CCA TCA GTG -3 reverse

Zbog malog broja bolesnika s genetskim prionskim promjenama dijagnostika se radi u malom broju centara [120]. Za nas se dijagnostika vrši u laboratoriju za prionske bolesti u Londonu.

Citokemija. Metodu je uveo Bell 1997. godine [132]. On je pripremio serume za humani PrP^{Sc} i ustupio ga drugim laboratorijima. Metoda je vrlo korisna i njome je bilo moguće pretraživati biopat mozga. Ubrzo nakon njegovog otkrića počeli su i drugi laboratoriji pripremati svoje antiserume. U međuvremenu su otkrili antiserume pomoću kojih su mogli razlikovati PrP^C i PrP^{Sc}, što je bio velik napredak u diferencijalnoj dijagnozi.

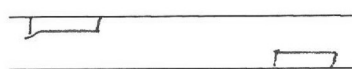
PRIMJER PCR

Nativna DNK

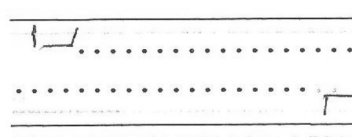


Regija koja će biti amplificirana

Denaturacija i vezanje primera



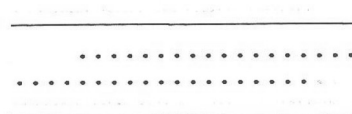
Ekstenzija primera



Nova komplementarna DNK

Ciklus 1 kompletan

2 para "strands"



1 Nova "duplex" DNK

Urin. Dokaz patološkog PrP^{Sc} u urinu bio bi od velikog epidemiološkog značaja jer za dobivanje uzorka nije potrebno koristiti invazivnu metodu, a signifikantno pozitivan rezultat bi ukazao na infekt. Znamo da inkubacija bolesti može trajati desetljećima, a istraživanje asimptomatske infekcije nije moguće. Ne smije se zanemariti istraživanje jatrogene infekcije, a to je često otežano, jer se bolesnički dokumenti čuvaju samo 10 godina. Za dokaz PrP^{Sc} u urinu koristi se metoda WB. Urin se prvo obradi s proteinazom K, da se odstrani PrP^C. Nakon elektroforeze materijal se prenosi na specijalnu foliju i tretira s anti-PrP^{Sc} serumom, koji se obilježen peroksidazom iz hrena (Horseradish peroxidase). Tako nastaje kompleks urinarnog PrP^{Sc} s imunoglobulinom iz upotrebljenog anti-seruma. Većina radova s pozitivnim PrP^{Sc} nalazom u urinu je objavljena posljednjih godina [133, 134]. O signifikantnosti metode se još uvijek raspravlja. PrP^{Sc} su dokazali i u urinu ovaca [135]. PrP^{Sc} se dugo zadržava u tlu što je možda i razlog za infektivnost pašnjaka na kome uzgajaju ovce [136] to je ranije i dokazano [137].

TEORIJA VIRUSNE ETIOLOGIJE CJB

Transmisivne spongiformne encefalopatije (TSE), kao što su endemski scrapie ovaca, sporadična CJB (sCJB) i epidemična Bovina spongiformna encefalopatija (BSE) mogu biti uzrokovane klasom tzv. slow-virusa. Takav koncept ostaje, do danas, najbolje objašnjenje i korektno predviđanje širenja TSE agensa na različite uzorke. S popularizacijom „priona“ (infekciozni protein) osnovni podaci o TSE virusima su bili zapostavljeni. Niti jedan oblik PrP ne ispunjava Kochove postulate za infekciju. Patološki PrP nije potreban za infektivnost. Spontana PrP mutacija i nevidljiv oblik infekcioznog PrP mogu protumačiti inkompatibilnost rezultata. Svojestvo je brojnih virusa da mogu preživjeti teške uvjete okoline te enzimatske utjecaje. Visoko infektivni materijali imaju nukleinske kiseline od 1–5 Kb čak nakon intenzivne digestije. Sedimentiranje i elektronska mikroskopija [138] otkrivaju čestice veličine 25–35 nm u dijametri. One bi mogle akomodirati viralni genom od 1–4 Kb, što je dovoljno za kodiranje protektivnog nukleokapsida ili enzima, potrebnog za replikaciju. Najznačajniji „krak“ može proizvesti visoku infektivnost. Tako se mogu brzo identificirati virusne i „strain“-specifične molekule, koje su važne za dijagnozu, prevenciju te osnovno razumijevanje.

Na pokušajima izolacije su radili mnogi autori [139, 140]. Manuelidis, Gorgacz i Manuelidis 1978. godine su inokulirali 11 miševa; miševi su bili inokulirani s 0.05 ml intracerebralno i 0.01 ml intraperitonealno [141]. Pet životinja je uginulo 5 dana poslije inokulacije, a ostali 354–588 dana poslije inokulacije. Jedan miš je imao sindrom „češanja“, a ostali su bili bez znakova. Za vrijeme druge pasaže jedan miš sa sindromom „češanja“ je uginuo, a 4 miša

s istim znacima su bili žrtvovani. Kod autopsije su dva miša iz prve pasaže i jedan miš iz druge pasaže imali maksimalno proširenje mokraćnog mjehura, a promjene na mozgu su bile slične kao kod miševa inficiranih sa scrapie. Neurološke i astrocitne promjene te status spongiosus su našli kod miševa inficiranih s CJB, a naročito u cerebralnom korteksu, bazalnim jezgrama i talamusu. Dalje su nađene degenerativne promjene i gubitak živčanih stanica. U neuronima cerebralnog korteksa je nađeno nešto malih vakuola. Nije nađeno amiloidnih vlakana. Umjereno je bila uvećana mikroglia. Sve su te promjene slične onima opisanim u prvoj pasaži. Kod zdravih miševa tih promjena nisu našli. Kako je CJB prenesena na zamorčad, hrčke i miševe te promjene mogu biti bliže CJB. Manuelidis, Fritch i Xi YG 1997. godine su istraživali novi agens varijante CJB koji može inficirati ljude [142]. Istraživali su BSE, koji je postao problem javnoga zdravstva jer su obolijevali i ljudi. Taj novi agens je inficirao ljude dajući neobičnu kliničku sliku varijantu CJB (vCJB). Taj novi vCJB agens je provocirao slične amiloidne plakove i cerebralnu patologiju. Prve pasaže tog novog agensa na miševima su pokazale sličnu kliničku sliku i aktivirali su mikroglia, ali su imali neznatnu količinu PrP-res (protease-rezistentnog PrP) i cerebralne lezije [143, 144]. Mikroglia i astrociti participiraju u selekciji soja jer se agens stabilizirao i reproducirao BSE-like bolest u sljedećim pasažama. Rane vakuolarne promjene u neuronima su aktivirale mikroglia, a astrociti su prethodili signifikantnoj PrP-res akumulaciji. Ovo istraživanje otkriva upalnu reakciju domaćina prema jednom egzogenom agensu. Učinjeno je mnogo mikrofotografija od kojih su neke značajne. Virusni plakovi pokazuju jasnu sliku križa malteškog reda koja se može usporediti sa slikama u obiteljskom CJB. Arjona i sur. 2004. godine su istraživali razne sojeve i našli su da humana CJB i slične neurodegenerativne bolesti mogu biti uzrokovane različitim srodnim agensima [145]. Oni su povezani s abnormalnim PrP-res i daju rezistentne PrP-res trake. Ističemo da PrP-res nije infektivan. Razlikuju se dva soja CJB agensa PrP-res, što je dokazano pasažama na mozgu miševa. Brzi CJB soj FU daje mnoge PrP-res depozite, a polagani, SY soj, ih daje malo. PrP-res FU i SY sojevi su identični, ali SY inficirane stanice mozga uzrokuju sporo razvijajuće bolesti.

Manuelidis, Liu i Mullins su 2009. godine ispitali 11 sojeva sCJB, GSS, vCJB, BSE, Kuru i Scrapie [146]. Rezultati su navedeni u tablici 1. Našli su da su svojstva specifična za soj vCJB kodirana agensom, a ne proteinom domaćina. To je bitna razlika od teorije priona. To je objavio i Prusiner [147].

Prva dva soja humane sCJB imaju dugu inkubaciju i ograničenu patologiju u mozgu, isto takav je još jedan soj GSS. Jedan drugi soj iz Japana ima kraću inkubaciju ali, velike amiloidne promjene. Jedan drugi ljudski soj vCJB ima slične promjene s amiloidom i kratku inkubaciju. Jedan soj goveda ima isto tako kratku inkubaciju i Kuru-

Tablica 1. Rezultati ispitivanja Manuelidisa i suradnika u 11 bolesnika sa sCJD**Table 1.** The results of research of Manuelidis and collaborators on 11 patients with sCJD

Porijeklo	Dijagnoza	Inkubacija u miša	Patologija u miša
US – čovjek	sCJB	370 (307) dana	Ograničeno
Italija – čovjek	sCJB	380 (324) dana	Ograničeno
UK – čovjek	GSS	380 (350) dana	Ograničeno
Japan – čovjek	GSS	120 (70) dana	Rašireno+amiloid
Japan – čovjek	GSS	130 dana	Rašireno+amiloid
UK – čovjek	vCJB	185 (126) dana	BSE tip+amiloid
UK – krava	BSE	160 dana	BSE+amiloid
Kuru – čovjek	Kuru	440 (154) dana	kCJD specifično
UK – ovca	Scrapie	140 (87) dana	Scrapie varijanta
UK – ovca	Scrapie	120 dana	Scrapie varijanta
UK – ovca	Scrapie	330 (310) dana	Kuru specifično

specifične promjene Dva soja scrapiea ovaca imaju kratku inkubaciju i varijantu scrapiea u moždanom tkivu, a posljednji soj scrapiea ima dugu inkubaciju i specifičnu Kuru sliku u mozgu.

Jasno se vide razlike u tipovima promjena u mozgu i inkubaciji. Kuru agens se razlikuje od CJB sojeva po inkubaciji i neuropatologiji kod 2 mišja genotipa. sCJB se lako prenosi na kulture hrčka. Kulture slezene razlikuju Kuru i sCJB agense. Jasno je da se Kuru javlja samo u Novoj Gvineji dok se japanska CJB javlja u Japanu.

Slow virusi su srodna skupina infektivnih virusa. BSE je patogen za mnoge vrste, pa i čovjeka, ali vrlo duge inkubacije. TSE agensi se mogu adaptirati na mnoge vrste te postaju virulentniji, ali održavaju stabilni identitet. Pojedini virusi se razlikuju po inkubaciji, moždanoj neuropatologiji te limforetikularnom odgovoru. TSE agensi se mogu jako razlikovati u virulenciji za species, u inkubaciji i neuropatološkom nalazu [148]. Tako je dokazano da je infekcijski agens Kuru različit od CJB i scrapie agensa. Strain-specifična svojstva virusa CJB kodira agens, a ne PrP domaćina, usprkos toga što stanice ekspimiraju oba PrP gena [149]. Što je s proteinom X? Između PrP^{Sc} i PrP^C postoje razlike u konformaciji. Da li su razlike u konformaciji odgovorne za prionske razlike treba utvrditi. Akumulacija PrP^{Sc} u mozgu nađena je kod velike većine humanih prionskih bolesti, ali ne kod svih. Neki istraživači su našli male količine PrP^{Sc}, što bi značilo da neurodegeneracija nastaje abnormalnim mehanizmom mutantnog PrP^{Sc}, ali to je potrebno dokazati.

Modeli staničnih kultura daju novu, uzbudljivu tehniku, koja daje kritične, fundamentalne eksperimente in-

fekcijskog TSE agensa. Viralne ili prionske molekule mogu biti evaluirane na infektivnost i svojstva izoliranog soja. Tako mogu biti ispitani brojni izolati i preparati koji odgovaraju Kochovim postulatima. Na tom području su radili mnogi autori. Prvi je David Ferreira, 1968. godine [150] opisao “Virus like” čestice, veličine 35 nm u mozgu. Lampert je 1971. godine našao slične čestice u mozgu, Bignami i Parry 1971. godine te Narang 1974. godine [151–153], koji su mislili da je to TSE agens. Barringer i Prusiner [154] su 1978. godine našli slične kristalne tvorbe, veličine 25 nm. To je pogodilo kasnijoj tvrdnji da to nije virus. Mnogo radova je objavila Manuelidis 1976., 1978. i 1979. godine [155–157]. Daljnja istraživanja su otkrila čestice 25–35 nm koje su se smatrale virusima (Manuelidis, 2007.) One ne vežu PrP antitijela dok ih celularni PrP veže. Disrupcija tih stanica uništava patogenost. Na temelju tih rezultata zaključuju da se radi o virusima. Brojni se radovi slažu s virusnom etiologijom, a istraživanja provedena kratko iza toga su otkrila mnogo detalja koji govore u prilog tome. Već smo spomenuli da PrP^{Sc} ne može stvarati nove PrP^{Sc}, jer je za to potreban nukleoprotein.

Za sada još uvijek nije nađena scrapie nukleinska kiselina. Osnovne razlike između prionske i virusne teorije postoje, a sakupio ih je Prusiner, 1994. godine i prikazane su u tablici 2.

Kao poseban dokaz navodimo uklanjanje PrP^{Sc}, koji je vrlo rezistentan na konvencionalne metode inaktivacije. To naročito vrijedi za biofarmaceutske proizvode, pripravljene iz humanih stanica. Potrebno je odstraniti PrP^{Sc} s nano-filtracijskom metodom miješanjem solucije lim-

Tablica 2. Razlike prionske i virusne teorije (Prusiner)**Table 2.** Differences between prion and viral theory (Prusiner)

1.	Koncentracija PrP ²⁷ (patološki prion) je proporcionalna titru priona
2.	Kinetika proteolitičke digestije patološkog priona i infektivnosti je slična
3.	Antiserumi PrP ²⁷ neutraliziraju infektivnost
4.	PrP ²⁷ je otkriven samo u kulturama koje su infektivne
5.	PrP amiloidni plakovi su specifični za prionske bolesti ljudi i životinja
6.	PrP ^{Sc} je specifičan za bolesti ljudi i životinja
7.	Genetska veza MoPrP (mišjega) gena i vremena inkubacije
8.	Transgena ekspresija i primarna struktura PrP ^{Sc} odgovaraju za species barijeru, neuropatologiju i sintezu priona miševa
9.	Genetska veza između točkastih mutacija na kodonima 102, 178 i 200 i razvoj prionskih bolesti kod ljudi je dokazana
10.	Miševi s MoPrP transgenom mutacijom za GSS spontano razvijaju neurološku disfunkciju, spongiformnu degeneraciju u mozgu i astrocitnu gliozu
11.	Ablacija PrP gena u miševima sprječava scrapie odnosno propagaciju priona
12.	Miševi s kimeričkim Mo/Sha PrP transgenima proizvode "arteficijalne" prione s novim svojstvima

fogglobulina s CJB-homogenatom moždane supstance [158]. Ekvini limfoglobulin i antihumani timocitni imunoglobulin su selektivni agensi koji djeluju na T limfocite. Kao indikacija se navodi transplantacija moždane ovojnice da bi se spriječila jetrogena infekcija. Proces nanofiltracije je uspješan, preostali PrP^{Sc} se dokazuje WB-tehnikom.

Poznato je da prionska bolest ne vodi do stvaranja specifičnih protutijela, što je jedinstveno u infektivnoj patologiji. Tom problemu nije posvećeno dovoljno pažnje. Potrebno je spomenuti, da virolozi još i danas, nakon višegodišnjeg istraživanja smatraju da je uzročnik bolesti virus, a u infektivnom materijalu su i nakon ekstenzivne digestije nukleinskog materijala našli nukleinske kiseline 1–5 Kb. Uzročnike je bilo moguće držati u kulturi, obično miševa, a za uspoređivanje su služile elektronske slike, ponekad vrlo jasne. Usporedba dva virusa je vrlo teška ili nemoguća. Trebalo bi istražiti protutijela u takvom materijalu, a ne u prionskom proteinu, a izgledi za terapiju bi bili znatno bolji, jer antiviralne supstance daju dobre rezultate kod nekih, virusnih infekcija (Herpes simpleks, zoster virus i dr.). Napredak bi trebao ići u tom smjeru.

ZAKLJUČAK

1. Nakon prvih opisa JCB 1920. godine pa sve do danas nisu riješene sve dileme o etiologiji spomenute bolesti
2. Današnje gledanje na genetske prionske bolesti ne treba mijenjati. To vrijedi naročito za točkaste mutacije na kodonima 102, 178 i 200. Isto vrijedi za polimorfizme (kodon 129). Međutim ove genetske bolesti ljudi čine svega 10–15 %.

3. Preostali 85–90 % bolesnika s CJB, vCJB te jatrogenim infekcijama (nakon transplantacije dure mater, kornee, transfuzije krvi, primjene hormona rasta, radom s kontaminiranim instrumentima, kod tonometrije u okulistici i dr.), te bolesnici s Kuru bolešću u Novoj Gvineji mogu se uvrstiti u virusne bolesti (slow virusi?).
4. Isto se može tvrditi za bolesti ovaca (scrapie) te govoda (BSE) i nekih drugih životinja.

Literatura

- [1] Creutzfeldt G. Ueber eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiat* 1920;57:1–18.
- [2] Jakob A. Ueber eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde. *Z Ges Neurol Psychiat* 1921;64:147–228.
- [3] Hadlow WJ. Scrapie and Kuru. *Lancet* 1959;II:289–90.
- [4] Gajdusek DC. Spongiform virus encephalopathies. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1972;6:78–83.
- [5] Bui E, Ehrensperger E, Sahlas DJ, i sur. Inflammatory cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Can J Neurol Sci* 2008 Nov;35:625–9.
- [6] Gerstmann J. Ueber ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellaren Systems. *Wien Med Wochenschr* 1928;78:906–8.
- [7] Gerstmann J, Strüssler E, Scheinker I. Ueber eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Zeitschr Neurol* 1936;154:736–62.
- [8] Kahana E, Alter M, Braham J, Sofer D. Creutzfeldt-Jakob disease: focus among Libyan Jews in Israel. *Science* 1974;183:90–1.

- [9] Alter M, Kahana E. Creutzfeldt-Jakob disease among Lybian Jews in Israel. *Science* 1976;192:428.
- [10] Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr, Bernoulli C, Asher DM. Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol* 1979;5:177–88.
- [11] Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis* 1982;146:657–64.
- [12] Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* 1988;123:638–44.
- [13] Duffy P, Wolf J, Collins G, DeVoe AG, Streeten B, Cowen D. Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 1974;290:692–3.
- [14] Bernoulli C, Siegfried J, Baumgartner G, i sur. Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet* 1977;1:478–9.
- [15] Pana A, Jung M. Infezioni iatrogene nelle malattie da prioni 1. Revisione della letteratura. Roma: Igene e Santa Publica; 2005.
- [16] Mead S. Prion disease genetics. *Eur J Hum Genet* 2006;14:273–81.
- [17] Mitrová E, Huncaga S, Hocman G, Nyitrayová O, Tatará M. “Clusters” of CJD in Slovakia: the first laboratory evidence of scrapie. *Eur J Epidemiol* 1991;7:520–3.
- [18] Ladogana A, Puopolo M, Poggi A, i sur. Neurology. High incidence of genetic human transmissible spongiform encephalopathies in Italy. 2005;64:1592–7.
- [19] EUROID Group. Genetic epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe. *Rev Neurol (Paris)* 2001;157:633–7.
- [20] Kovacs GG, Puopolo M, Ladogana A, i sur. Genetic prion disease: the EUROID experience. *Hum Genet* 2005;118:166–74.
- [21] Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, i sur. Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia and Canada. *Neurology* 2005;64:1586–91.
- [22] Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature* 1967;215:1043–4.
- [23] Pattison IH, Jones KM. The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec* 1967;80:2–9.
- [24] Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982;216:136–44.
- [25] Prusiner SB. Prions Nobel Lecture 1997. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1998;95:13363–83.
- [26] Manuelidis L. A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochem* 2007;100:897–915.
- [27] Oesch B, Westaway D, Wälchli M i sur. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 Protein. *Cell* 1985;40:735–46.
- [28] Sparkes RS, Simon M, Cohn VH i sur. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986;83:7358–62.
- [29] Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L. Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* 1991;49:320–9.
- [30] Peoc’h K, Serres C, Robert Y i sur. The human “prion-like” protein Doppel is expressed in both Sert cells and spermatozoa. *J Biol Chem* 2002;277:43071–8.
- [31] Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN i sur. Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* 2007;25:132–8.
- [32] Hill AF, Antoniou M, Collinge J. Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol* 1999;80:11–4.
- [33] Bruce M, Chree A, McConnell I, Foster J, Pearson G, Fraser H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Phil Trans R Soc London B* 1994;343:405–11.
- [34] Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of “new variant” CJD. *Nature* 1996;383:685–90.
- [35] Bruce ME, Will RG, Ironside JW i sur. Transmissions to mice indicate that “new variant” CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997;389:498–501.
- [36] Scott MR, Will R, Ironside J i sur. Compelling transgenic evidence for transmission of BSE prions to humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:15137–42.
- [37] Priola S. How animal prions cause disease in humans. *Microbe* 2008;3:568–75.
- [38] Jung M. Genetika prionskih bolesti (I dio) – Polimorfizam. *Infektol Glasn* 2003;23:23–9.
- [39] Will RG, Ironside JW, Zeidler M i sur. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996;347:921–5.
- [40] Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 2004;364:527–9.
- [41] Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS i sur. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004;363:417–21.
- [42] Hilton DA, Ghani AC, Conyers L i sur. Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol* 2004;203:733–9.
- [43] Owen F, Poulter M, Lofthouse R i sur. Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1989;1:51–2.
- [44] Owen F, Poulter M, Collinge J i sur. A dementing illness associated with a novel insertion in the prion protein gene. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;13:155–7.
- [45] Lewis V, Collins S, Hill AF i sur. Novel prion protein insert mutation associated with prolonged neurodegenerative illness. *Neurology* 2003;60:1620–4.
- [46] Nishida Y, Sodeyama N, Toru Y, Toru S, Kitamoto T, Mizusawa H. Creutzfeldt-Jakob disease with a novel insertion and codon 219 Lys/Lys polymorphism in PRNP. *Neurology* 2004;63:1978–9.
- [47] Mead S, Webb TE, Campbell TA i sur. Inherited prion disease with 5-OPRI: phenotype modification by repeat length and codon 129. *Neurology* 2007;69:730–8.
- [48] Gelpi E, Kovacs GG, Ströbel T i sur. Prion disease with a 144 base pair insertion: unusual cerebellar prion protein immunoreactivity. *Acta Neuropathol* 2005;110:513–9.
- [49] Yu SL, Jin L, Sy MS i sur. Polymorphisms of the PRNP gene in Chinese populations and the identification of a novel insertion mutation. *Eur J Hum Genet* 2004;12:867–70.
- [50] Moore RA, Herzog C, Errett J i sur. Octapeptide repeat insertions increase the rate of protease-resistant prion protein formation. *Protein Sci* 2006;15:609–19.
- [51] Beck G, Kawano T, Naba I, Nishimura T, Sawada J, Hazama T. A case with a 120 base pair insertional mutation in the prion protein gene: the first case in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:756–7.
- [52] Mead S, Poulter M, Beck J i sur. Inherited prion disease with six octapeptide repeat insertional mutation—molecular analysis of phenotypic heterogeneity. *Brain* 2006;129:2297–317.

- [53] Mead S, Webb TE, Campbell TA i sur. Inherited prion disease with 5-OPRI: phenotype modification by repeat length and codon 129. *Neurology* 2007;69:730–8.
- [54] Yu S, Yin S, Li C i sur. Aggregation of prion protein with insertion mutations is proportional to the number of inserts. *Biochem J* 2007;403:343–51.
- [55] Jung M. Genetika prionskih bolesti (II. dio) brisanja (delecija) i umetanja (inseracija) u prionskom genu. *Infektol Glasn* 2003;23:147–53.
- [56] Palmer MS, Mahal SP, Campbell TA i sur. Deletions in the prion protein gene are not associated with CJD. *Hum Mol Genet* 1993;2:541–4.
- [57] Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L. Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* 1991;49:320–9.
- [58] Muench KH. *Genetic Medicine*. New York: Elsevier; 1988.
- [59] Sanger F. The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1975;191:317–33.
- [60] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463–7.
- [61] Passarage E. *Taschenatlas der Genetik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1994.
- [62] Check W. DNA Sequencing Grows Virtuosic and Deep. *Microbe* 2009;4:18–22.
- [63] Suzuki K, Matsumura N, Suzuki T i sur. A case of Creutzfeldt-Jakob disease with codon 129 polymorphism and codon 180 point mutation. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2008;45:107–11.
- [64] Hilton DA, Head MW, Singh VK, Bishop M, Ironside JW. Familial prion disease with a novel serine to isoleucine mutation at codon 132 of prion protein gene (PRNP). *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009;35:111–5.
- [65] Hsiao KK, Doh-ura K, Kitamoto T, Tateishi J, Prusiner SB. A prion protein amino acid substitution in ataxic Gerstmann-Sträussler syndrome. *Ann Neurol* 1989;26:137.
- [66] Tateishi J, Sato Y, Koga M, Doi H, Ohta M. Experimental transmission of human subacute spongiform encephalopathy to small rodents. I. Clinical and histological observations. *Acta Neuropathol* 1980;51:127–34.
- [67] Tateishi J, Koga M, Sato Y, Mori R. Properties of the transmissible agent derived from chronic spongiform encephalopathy. *Ann Neurol* 1980;7:390–1.
- [68] Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. The familial occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease. *Brain* 1981;104:535–58.
- [69] Bockman JM, Prusiner SB, Tateishi J, Kingsbury DT. Immunoblotting of CJD prion proteins: Host species-specific epitopes. *Ann Neurol* 1987;21:589–95.
- [70] Hsiao K, Doh-ura K, Kitamoto T, Tateishi J, Prusiner SB. A prion protein amino acid substitution in ataxic GSS. *American Neurological Association. Program and abstracts* 1989, P56.
- [71] Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y. Pro-leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:974–9.
- [72] Goldfarb LG, Brown P, Vrbovska A i sur. An insert mutation in the chromosome 20 amyloid precursor gene in a Gerstmann-Sträussler-Scheinker family. *J Neurol Sci* 1992;111:189–94.
- [73] Tanaka Y, Minematsu K, Moriyasu H i sur. A Japanese family with a variant of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:454–7.
- [74] Wang Y, Qiao XY, Zhao CB i sur. Report on the first Chinese family with Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease manifesting the codon 102 mutation in the prion protein gene. *Neuropathology* 2006;26:429–32.
- [75] Wadsworth JD, Joiner S, Linehan JM i sur. Phenotypic heterogeneity in inherited prion disease (P102L) is associated with differential propagation of protease-resistant wild-type and mutant prion protein. *Brain* 2006;129:1557–69.
- [76] Giovagnoli AR, Di Fede G, Aresi A, Reati F, Rossi G, Tagliavini F. Atypical frontotemporal dementia as a new clinical phenotype of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with the PrP-P102L mutation. Description of a previously unreported Italian family. *Neurol Sci* 2008;29:405–10.
- [77] Chi NF, Lee YC, Lu YC, Wu HM, Soong BW. Transmissible spongiform encephalopathies with P102L mutation of PRNP manifesting different phenotypes: clinical, neuroimaging, and electrophysiological studies in Chinese kindred in Taiwan. *J Neurol* 2010;257:191–7.
- [78] Yamada M. Prion diseases in Japan: analysis of 918 patients. *Rinsho Shinkeigaku* 2007;47:805–8.
- [79] Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A i sur. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med* 1992;326:444–9.
- [80] Goldfarb LG, Brown P, Haltia M i sur. Creutzfeldt-Jakob disease cosegregates with the codon 178Asn PRNP mutation in families of European origin. *Ann Neurol* 1992;31:274–81.
- [81] Tateishi J, Brown P, Kitamoto T i sur. First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* 1995;376:434–5.
- [82] Taniwaki Y, Hara H, Doh-ura K i sur. Familial Creutzfeldt-Jakob disease with D178N-129M mutation of PRNP presenting as cerebellar ataxia without insomnia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:388.
- [83] Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M i sur. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 1992;258:806–8.
- [84] Goldfarb LG, Haltia M, Brown P i sur. New mutation in scrapie amyloid precursor gene (at codon 178) in Finnish Creutzfeldt-Jakob kindred. *Lancet* 1991;337:425.
- [85] Spacey SD, Pastore M, McGillivray B, Fleming J, Gambetti P, Feldman H. Fatal familial insomnia: the first account in a family of Chinese descent. *Arch Neurol* 2004;61:122–5.
- [86] Synofzik M, Bauer P, Schöls L. Prion mutation D178N with highly variable disease onset and phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:345–6.
- [87] Choi BY, Kim SY, Seo SY i sur. Mutations at codons 178, 200-129, and 232 contributed to the inherited prion diseases in Korean patients. *BMC Infect Dis* 2009;9:132.
- [88] Zerr I, Giese A, Windl O i sur. Phenotypic variability in fatal familial insomnia (D178N-129M) genotype. *Neurology* 1998;51:1398–405.
- [89] Synofzik M, Bauer P, Schöls L. Prion mutation D178N with highly variable disease onset and phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:345–6.
- [90] Goldgaber D, Goldfarb LG, Brown P i sur. Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker's syndrome. *Exp Neurol* 1989;106:204–6.
- [91] Goldfarb LG, Brown P, Goldgaber D i sur. Identical mutation in unrelated patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1990;336:174–5.

- [92] Goldfarb LG, Mitrová E, Brown P, Toh BK, Gajdusek DC. Mutation in codon 200 of scrapie amyloid protein gene in two clusters of Creutzfeldt-Jakob disease in Slovakia. *Lancet* 1990;336:514–5.
- [93] Goldfarb LG, Brown P, Mitrová i sur. Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200Lys mutation: an analysis of 45 families. *Eur J Epidemiol* 1991;7:477–86.
- [94] Goldfarb LG, Korczyn AD, Brown P, Chapman J, Gajdusek DC. Mutation in codon 200 of scrapie amyloid precursor gene linked to Creutzfeldt-Jakob disease in Sephardic Jews of Libyan and non-Libyan origin. *Lancet* 1990;336:637–8.
- [95] Goldfarb LG, Brown P, McCombie WR i sur. Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:10926–30.
- [96] Goldfarb LG, Brown P, Cervenakova L, Gajdusek DC. Genetic analysis of Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994;343:379–84.
- [97] Goldfarb LG, Brown P, Gajdusek DC. The molecular genetics of human transmissible spongiform encephalopathy. U: Prusiner SB, Collinge J, Powell J, Anderton B, ur. *Prion diseases of humans and animals*. London: Ellis Horwood; 1992, str. 139–53.
- [98] Palmer MS, Collinge J. Mutations and polymorphisms in the prion protein gene. *Hum Mutat* 1993;2:168–73.
- [99] Goldfarb LG, Brown P, Haltia M, Ghiso J, Frangione B, Gajdusek DC. Synthetic peptides corresponding to different mutated regions of the amyloid gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease show enhanced in vitro formation of morphologically different amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4451–4.
- [100] Hainfellner JA, Jellinger K, Diringer H, Guentchev M, Kleinert R, Pilz P, Maier H, Budka H. Creutzfeldt-Jakob disease in Austria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;61:139–42.
- [101] Hainfellner JA, Parchi P, Kitamoto T, Jarius C, Gambetti P, Budka H. A novel phenotype in familial Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein gene E200K mutation coupled with valine at codon 129 and type 2 protease-resistant prion protein. *Ann Neurol* 1999;45:812–6.
- [102] Konno S, Murata M, Toda T i sur. Familial Creutzfeldt-Jakob Disease with a codon 200 mutation presenting as thalamic syndrome: diagnosis by single photon emission computed tomography using (99m)Tc-ethyl cysteinate dimer. *Intern Med* 2008;47:65–7.
- [103] Mancuso M, Siciliano G, Capellari S i sur. Creutzfeldt-Jakob disease with E200K PRNP mutation: a case report and revision of the literature. *Neurol Sci* 2009;30:417–20.
- [104] Lee CI, Yang Q, Perrier V, Baskakov IV. The dominant-negative effect of the E218K variant of the prion protein does not require protein X. *Protein Sci* 2007;16:2166–73.
- [105] Goldfarb LG, Brown P. The transmissible spongiform encephalopathies. *Annu Rev Med* 1995;46:57–65.
- [106] Markand ON, Brenner RP. *Organica brain syndromes and dementia*. U: Ebersole J, Pedley TA. Current practice of clinical electroencephalography. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003, str. 394–7.
- [107] Cyngiser TA. Creutzfeldt-Jakob disease: A disease overview. *Am J Electroneurodiagnostic Technol* 2009;48:199–208.
- [108] Drury I, Beydoun A. Evolution of periodic complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Electroneurodiagnostic Technol* 1996;36:230–4.
- [109] Steinhoff BJ, Räcker S, Herrendorf G i sur. Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 1996;53:162–6.
- [110] Zochodne DW, Young GB, McLachlan RS, Gilbert JJ, Vinters HV, Kaufmann JC. Creutzfeldt-Jakob disease without periodic sharp wave complexes: a clinical, electroencephalographic, and pathologic study. *Neurology* 1988;38:1056–60.
- [111] World Health Organization. Global surveillance, diagnosis and therapy of human transmissible spongiform encephalopathies: Report of a WHO consultation. WHO/EMC/ZDI/98.9. Geneva, Switzerland, 9–11 February 1998.
- [112] Heinemann U, Krasnianski A, Meissner B i sur. Brain biopsy in patients with suspected Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurosurg* 2008;109:735–41.
- [113] Warren JD, Schott JM, Fox NC i sur. Brain biopsy in dementia. *Brain* 2005;128:2016–25.
- [114] Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Sobue G, Hashizume Y. Clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease: accuracy based on analysis of autopsy-confirmed cases. *J Neurol Sci* 2009;277:119–23.
- [115] Carlson FD. *Psychological and biochemical aspects of nervous integration*. England: Prentice-Hall; 1967.
- [116] Harrington MG, Merrill CR, Asher DM, Gajdusek DC. Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 1986;315:279–83.
- [117] Lee KH, Harrington MG. Premortem diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by cerebrospinal fluid analysis. *Lancet* 1996;348:887.
- [118] Golańska E, Gresner S, Sieruta M, Liberski P. Cerebrospinal fluid markers of prion diseases. *Neurol Neurochir Pol* 2008;42:441–50.
- [119] Dormont D, Delpech B, Delpech A i sur. Hyperproduction of glial fibrillary acidic protein (GFA) during development of experimental scrapie in mice. *C R Seances Acad Sci III* 1981;293:53–6.
- [120] Wadsworth JD, Powell C, Beck JA i sur. Molecular diagnosis of human prion disease. *Methods Mol Biol* 2008;459:197–227.
- [121] Schmidt GR, Hossner KL, Yemm RS, Gould DH, O'Callaghan JP. An enzyme-linked immunosorbent assay for glial fibrillary acidic protein as an indicator of the presence of brain or spinal cord in meat. *J Food Prot* 1999;62:394–7.
- [122] Wakayama Y, Shibuya S, Kawase J, Sagawa F, Hashizume Y. High neuron-specific enolase level of cerebrospinal fluid in the early stage of Creutzfeldt-Jakob disease. *Klin Wochenschr* 1987;65:798–801.
- [123] Zerr I, Bodemer M, Räcker S i sur. Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1995;345:1609–10.
- [124] Isobe T, Takahashi K, Okuyama T. S100a0 (alpha alpha) protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system. *J Neurochem* 1984;43:1494–6.
- [125] Otto M, Wiltfang J, Schütz E i sur. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study. *BMJ* 1998;316:577–82.
- [126] Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF i sur. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 2001;358:171–80.
- [127] Safar J, Wille H, Itri V i sur. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 1998;4:1157–65.

- [128] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochimistry* 1971;8:871–4.
- [129] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 1972; 109:129–35.
- [130] Raeber AJ, Oesch B. Diagnostics for TSE agents. *Dev Biol (Basel)* 2006;123:313–23.
- [131] Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335–50.
- [132] Bell JE, Gentleman SM, Ironside JW i sur. Prion protein immunocytochemistry—UK five centre consensus report. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997;23:26–35.
- [133] Gonzales-Romero D, Barria MA, Leon P, Morales R, Soro C. Detection of infectious prions in urine. *FEBS Lett* 2008;582: 3161–6.
- [134] Dabaghian R, Zerr I, Heinemann U, Zanusso G. Detection of proteinase K resistant proteins in the urine of patients with Creutzfeldt-Jakob and other neurodegenerative diseases. *Prion* 2008;2:170–8.
- [135] Andrievskaia O, Algire J, Balachandran A, Nielsen K. Prion protein in sheep urine. *J Vet Diagn Invest* 2008;20:141–6.
- [136] Cooke CM, Rodger J, Smith A, Fernie K, Shaw G, Somerville RA. Fate of prions in soil: detergent extraction of PrP from soils. *Environ Sci Technol* 2007;41:811–7.
- [137] Seidel B, Thomzig A, Buschmann A i sur. Scrapie Agent (Strain 263K) can transmit disease via the oral route after persistence in soil over years. *PLoS One* 2007;2:e435.
- [138] Bignami A, Forno LS. Status spongiosus in Jakob-Creutzfeldt disease. Electron microscopic study of a cortical biopsy. *Brain* 1970;93:89–94.
- [139] Narang HK. Virus-like particles in Creutzfeldt-Jakob biopsy material. *Acta Neuropathol* 1975;32:163–8.
- [140] Manuelidis EE. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from man to the guinea pig. *Science* 1975;190:571–2.
- [141] Manuelidis EE, Gorgacz EJ, Manuelidis L. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease with scrapie-like syndromes to mice. *Nature* 1978;271:778–9.
- [142] Manuelidis L, Fritch W, Xi YG. Evolution of a strain of CJD that induces BSE-like plaques. *Science* 1997;277:94–8.
- [143] Race RE, Fadness LH, Chesebro B. Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol* 1987;68:1391–9.
- [144] Neary K, Caughey B, Ernst D, Race RE, Chesebro B. Protease sensitivity and nuclease resistance of the scrapie agent propagated in vitro in neuroblastoma cells. *J Virol* 1991;65:1031–4.
- [145] Arjona A, Simarro L, Islinger F, Nishida N, Manuelidis L. Two Creutzfeldt-Jakob disease agents reproduce prion protein-independent identities in cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8768–73.
- [146] Manuelidis L, Liu Y, Mullins B. Strain-specific viral properties of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) are encoded by the agent and not by host prion protein. *J Cell Biochem* 2009;106:220–31.
- [147] Prusiner SB. Molecular biology and genetics of prion diseases. *Phil Trans Soc London* 1994;143:447–63.
- [148] Manuelidis L. A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochem* 2007;100:897–915.
- [149] Prusiner SB. Molecular biology and genetics of prion diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994;343:447–63.
- [150] David-Ferreira JF, David-Ferreira KL, Gibbs CJ Jr, Morris JA. Scrapie in mice: ultrastructural observations in the cerebral cortex. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968;127:313–20.
- [151] Bignami A, Parry HB. Aggregations of 35-nanometer particles associated with neuronal cytopathic changes in natural scrapie. *Science* 1971;171:389–90.
- [152] Lampert P, Gajdusek DC, Gibbs C. Experimental spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease) in chimpanzees. Electron microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1971; 30:20–32.
- [153] Narang HK. An electron microscopic study of the scrapie mouse and rat: further observations on virus-like particles with ruthenium red and lanthanum nitrate as a possible trace and negative stain. *Neurobiology* 1974;4:349–63.
- [154] Baringer JR, Prusiner SB. Experimental scrapie in mice: ultrastructural observations. *Ann Neurol* 1978;4:205–11.
- [155] Manuelidis L, Sklaviadis T, Manuelidis EE. Evidence suggesting that PrP is not the infectious agent in Creutzfeldt-Jakob disease. *EMBO J* 1987;6:341–7.
- [156] Manuelidis EE, Gorgacz EJ, Manuelidis L. Interspecies transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to Syrian hamsters with reference to clinical syndromes and strains of agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:3432–6.
- [157] Manuelidis EE, Kim J, Angelo JN, Manuelidis L. Serial propagation of Creutzfeldt-Jakob disease in guinea pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73:223–7.
- [158] Truchot L, Arnaud T, Bloy C, Perret-Liaudet A. CJD PrPsc removal by nanofiltration process: application to a therapeutic immunoglobulin solution (Lymphoglobuline). *Biologicals* 2006; 34:227–31.