

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Prionová onemocnění zvířat

Bakalářská práce

Autor práce: Soňa Vyhnánková

Obor studia: Speciální chovy

Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Prionová onemocnění zvířat“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18. 4. 2018

Prionová onemocnění zvířat

Souhrn

Prionová onemocnění jsou skupinou neurodegenerativních chorob zvířat i lidí. Jsou přenosná jak v rámci jednoho druhu, tak i mezidruhově. Tyto choroby se vyznačují velmi dlouhou inkubační dobou a vždy končí úmrtím. Způsobena jsou přeměnou nativního prionového proteinu (PrP^C) na infekční formu (PrP^{Sc}), které se od sebe liší prostorovým uspořádáním.

Prionová onemocnění zvířat jsou scrapie neboli klusavka vyskytující se u ovcí, koz a v malé míře u muflonů, dále pak bovinní spongiformní encefalopatie (BSE, v ČR nemoc šílených krav) napadající skot a jako jediná je označená za zoonózu. Mezi transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE) zvířat náleží i chronické chřadnutí jelenovitých (CWD). Tím se mohou nakazit různé druhy jelenovitých, včetně losů. Posledním prokázaným prionovým onemocněním kopytníků je encefalopatie exotických kopytníků (EUE), mezi něž spadají převážně různé druhy antilop. Mezi napadané druhy šelem patří norci, kteří mohou trpět přenosnou encefalopatií norků (TME). Do skupiny prionových onemocnění náleží felinní spongiformní encefalopatie (FSE) pozorována u domácích koček, ale i jiných kočkovitých šelem jako jsou gepardi, lvi, tygři, pumy, oceloti a další.

Mezi důležité diagnostické postupy prionových onemocnění patří vyšetření ELISA, PMCA, tonsilární biopsie. Jako pomocná vyšetření slouží EEG, magnetický rezonance, vyšetření likvoru a biopsie napadených tkání. Zkoumány jsou i další možnosti léčby. Nejdůležitějším opatřením v boji proti prionovým chorobám je prevence, protože dosud nebyly objeveny žádné účinné léčebné postupy.

Klíčová slova: Zvíře, onemocnění, prion, příznaky, diagnostika

Prions diseases of animal

Summary

Prion diseases are a group of neurodegenerative diseases of animals and humans. These are transmissible within one species but also interspecies. These diseases have a very long incubation time and always end with death. They are caused by the conversion of native prion protein (Pr^{PC}) to infectious form (Pr^{PSc}), which differs in spatial disposition.

Among prion diseases of animals include scrapie occurring in sheep, goats and in small extent in mouflons, further bovine spongiform encephalopathy (BSE, „mad cow disease“ in the Czech Republic) attacking cattle and as the only one labeled as zoonosis. Transmissible spongiform encephalopathy (TSE) of animals also include chronic wasting disease (CWD). The last proven prion disease is exotic ungulate encephalopathy, among which are predominantly different species of antelopes. Other attacked species are minks who may suffer from transmissible mink encephalopathy (TME). Furthermore feline spongiform encephalopathy (FSE) is observed in domestic cats but also in other feline such as cheetahs, lions, tigers, pumas, ocelot and others.

Important diagnostic procedures for prion diseases include ELISA, PMCA and Tonsil biopsy. EEG, magnetic resonance, examination of liquor and biopsy of the affected tissues are used as auxiliary examinations. Other treatment options are being also studied.

The most important measure in the fight against prion diseases is prevention, because no effective treatments have been discovered yet.

Keywords: Animal, diseases, prion, symptoms, diagnosis

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce.....	2
3. Literární rešerše	3
3.1 Prion	3
3.1.1 Historie a prionová teorie	3
3.1.2 Chemické složení prionů	4
3.1.3 PrP ^C a jeho molekulární podstata	4
3.1.4 PrP ^{Sc} a jeho molekulární podstata.....	5
3.2 Prionová onemocnění.....	7
3.2.1 Klusavka	7
3.2.2 Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE – Bovine Spongiform Encephalopathy).....	13
3.2.3 Přenosná encefalopatie norků (TME - Transmissible Mink Encephalopathy).....	16
3.2.4 Chronické chřadnutí jelenovitých (CWD - Chronic Wasting Disease)	18
3.2.5 Felinní spongiformní encefalopatie (FSE – Feline Spongiform Encephalopathy).....	22
3.2.6 Encefalopatie exotických kopytníků (EUE - Exotic Ungulate Encephalopathy)	24
3.3 Diagnostika prionových onemocnění.....	25
3.4 Prevence a léčba.....	27
3.4.1 Preventivní opatření na území ČR.....	28
4. Závěr.....	30
Použitá literatura	31
Seznam zkratk	38

1. Úvod

Nemoci způsobené priony se nazývají také transmisivní spongiformní encefalopatie, vyznačují se typickými změnami mozkové tkáně a dlouhou inkubační dobou, a proto je jejich odhalení problematické a zdlouhavé. Způsobeny jsou infekčními bílkovinami, které organismus nepovažuje za cizorodé a netvoří tak žádné protilátky. Ačkoli jsou prionové nemoci známé již od roku 1730, dodnes není zcela objasněno, jak se priony šíří v organismu nebo ve vnějším prostředí, a proto je důležité věnovat jim náležitou pozornost.

2. Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo formou literární rešerše shrnout nejnovější poznatky týkající se onemocnění zvířat zapříčiněných priony.

3. Literární rešerše

3.1 Prion

Označení „prion“ je z anglického „*proteinaceous infectious particles*“, což v překladu znamená proteinové infekční částice. Americký lékař a profesor neuropatologie a biochemie Stanley B. Prusiner tento název navrhl (Klaban, 2005).

3.1.1 Historie a prionová teorie

Původně se předpokládalo, že některá neurodegenerativní onemocnění jsou způsobena tzv. „pomalými viry“. Nazývány tak byly proto, že inkubační doba těchto chorob byla neobvykle dlouhá (v rámci let). Jednalo se hlavně o klusavku ovcí a Creutzfeldtova–Jakobovu nemoc (CJD - Creutzfeldt–Jakob Disease) lidí (Ferenčík et al., 2005).

O prionová onemocnění se začal blíže zajímat r. 1972 Stanley B. Prusiner, kterému v témže roce zemřel pacient nakažený CJD. Prusiner se rozhodl, že zjistí příčinu onemocnění svého pacienta (Vogel, 1997). Už v té době bylo známo, že CJD, Kuru nebo klusavkou lze v laboratorních podmínkách nakazit experimentální zvíře (v tomto případě se jednalo převážně o křečky) pomocí extraktu nakažené mozkové tkáně. Jeho výzkum trval přibližně 10 let a spolupracoval na něm zhruba s 20 lidmi. Společně po této době došli k závěru, že v mozku křečků, kteří byli nakaženi extraktem z mozku ovcí, jež uhynuly na klusavku, se nalézají pouze jeden původce onemocnění – protein. Na základě toho v roce 1982 vyslovil tzv. prionovou teorii, jejíž hlavní myšlenkou bylo, že priony nejsou virové, ale bílkovinné částice. Svou teorii pan Prusiner dokázal tak, že injekčně nakazil zdravého křečka extraktem z mozku křečka, který byl infikován klusavkou. Po několika měsících se (na začátku u zdravého křečka) projeví klinické příznaky a následně uhynul. Tento pokus opakoval i u dalších křečků, ale s tím rozdílem, že extrakt z mozku jedince nakaženého klusavkou „obohatí“. Jednou do něj přidal enzymy specificky rozkládající nukleové kyseliny a následně injekčně upravený extrakt přenesl na zdravé křečky. U nich rovněž došlo k projevům onemocnění a následnému úhynu. Podruhé však přidal k extraktu z mozku infikovaného křečka enzymy, které rozkládají proteiny – proteolytické enzymy. Tím pak nakazil zdravé jedince. U křečků se neprojeví žádné příznaky nemoci – extrakt s proteolytickými enzymy pro ně nebyl infekční (Ferenčík et al., 2005).

V dalších letech Prusiner se svými spolupracovníky vydal další práce, které objasňovali strukturu a vlastnosti prionů. Díky objevu prionů získal v roce 1997 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu (Ferenčík et al., 2005). Studie Stanleyho Prusinera a jeho spolupracovníků ukázaly například i to, že prionový protein je přítomen i u zcela zdravých zvířat a že myši, co postrádají PrP, není možné jakýmkoli způsobem nakazit prionovým onemocněním (Vogel, 1997)

3.1.2 Chemické složení prionů

Priony se řadí mezi glykoproteiny, neboli proteiny, jež mají na molekulách aminokyselin navázané sacharidy, a to v různém množství. Jejich základ tvoří prionový protein PrP, který je u člověka tvořen 253 aminokyselinami a jeho molekulová hmotnost je přibližně 35 až 36 kDa (kilodaltonů -jednotka molekulové hmotnosti). Mezi PrP^C a PrP^{Sc} není rozdíl v uspořádání aminokyselinových jednotek (Ferenčík et al., 2005).

3.1.3 PrP^C a jeho molekulární podstata

Tento přirozeně se vyskytující prionový protein je označován PrP^C (C ve významu „cell“ neboli buňka) (Ferenčík et al., 2005). PrP^C se běžně nachází v živočišných buňkách. Nalezneme ho ve všech buňkách savců, převážně ho však exprimují (vylučují) buňky nervového a imunitního systému. Jeho funkce v organismu nejsou dosud všechny známy. Zřejmě má svůj podíl na přenosu vzruchu prostřednictvím synapsí, na diferenciaci buněk (Legname et al., 2004) a účast například na metabolismu či transportu zinečnatých nebo měďnatých iontů (Brown, 2001, Milhavet and Lehmann, 2002, Watt and Hooper, 2003). Protože se PrP^C vyskytuje v převážné míře na povrchu buňky, lze předpokládat i jeho přítomnost při transmembránové signalizaci procesů (Taylor and Hooper, 2006).

Množství přirozeného prionového proteinu je 50krát vyšší v mozkové tkáni, než je tomu u ostatních tkání. Prionový protein je kódován genem PRNP, který je u člověka lokalizován na chromozomu 20 (Dormont 2002, Milhavet and Lehmann, 2002, Parchi and Gambetti, 1995). Jedná se o membránový protein a tvoří ho drsné endoplazmatické retikulum (ER), na povrch buňky je dopravován Golgiho aparátem (GA) (Yuan et al., 2005) a má z převážné části α strukturu (Legname et al., 2004). Složen je z několika domén, které se od sebe nápadně liší. Ty zahrnují N-terminální signální peptid, který je tvořen 22 aminokyselinami, a po translaci se odštěpuje do ER. Dále pak 5 oktapeptidových repetitivních jednotek obsahující hlavně glycin a prolin (aminokyseliny), středový hydrofobní segment a C-terminální hydrofobní oblast, kde se

napojuje glykosylfosfatidylinozitol (GPI kotva) (Dodelet and Cashman, 1998, Harris, 1999, Moser et al., 1995). Když se PrP^C dostane na povrch buňky, naváže se na plazmatickou membránu pomocí GPI kotvy. Následně je ustavičně pohlcován do buňky skrze jamku obloženou klathrinem. V jamce je zřejmě ukotven pomocí transmembránového PrP^C receptoru (Harris 1999). Protože se vyskytuje na povrchu membrány, je možné že slouží jako membránový receptor (Harris, 2003).

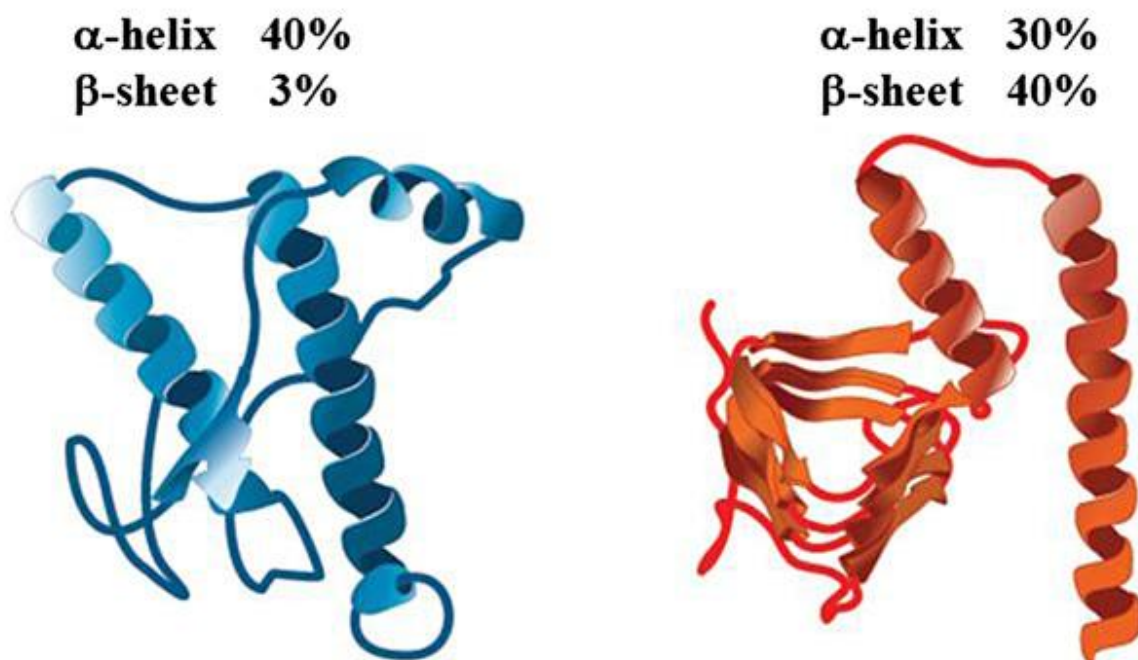
Běžný metabolismus PrP^C může zahrnovat 2 posttranslační štěpení. Jedno zřejmě probíhá uvnitř GPI kotvy a vytváří polypeptidový řetězec, který je uvolněn do prostoru mimo buňku blízko pozice 110. K druhému dochází v hydrofobní oblasti a štěpí se při něm bílkoviny na aminokyseliny. Obě štěpení jsou poměrně pomalá a jejich význam není dosud objasněn (Harris, 1999). Za jistých podmínek může docházet ke štěpení blízko pozice 90. Vznikne pak fragment, jež umí spustit polymerizaci PrP^C. Tímto způsobem může docházet ke vzniku prionového onemocnění (Abdelraheim et al., 2006, Mange et al., 2004).

3.1.4 PrP^{Sc} a jeho molekulární podstata

Zajímavé je, že prionový protein má i svou infekční formu. Označuje se PrP^{Sc} (^{Sc} jako scrapie). Ta se od přirozené odlišuje jen svým prostorovým uspořádáním, ale neliší se svým chemickým složením (Ferenčík et al., 2005, Legname et al., 2004). Přirozený protein PrP^C má převážně α strukturu, kdežto protein PrP^{Sc}, jenž je schopen vyvolat onemocnění, je uspořádán z velké části do struktury skládaného listu (β struktura) – viz obrázek číslo 1 (Legname et al., 2004). Avšak prionový protein se nevyskytuje jen v těchto výše zmíněných prostorových uspořádáních, může jich mít až několik desítek (Ferenčík et al., 2005).

Prion je tedy infekční bílkovinná částice, jež postrádá nukleovou kyselinu (Prusiner, 1998). Jedná se o nejmenší známé jednotky, které jsou schopny vyvolat onemocnění jak lidí, tak i zvířat. V těle nakaženého organismu nevyvolávají žádnou imunitní odpověď – nejsou imunogenní (Klaban, 2005).

Proposed Structure of PrP^C and PrP^{Sc}



Obrázek 1: Struktura PrP^C a PrP^{Sc} (Lee et al., 2013)

Infekční protein, vykazuje vysokou odolnost proti degradačním dějům uvnitř buňky, na rozdíl od PrP^C, který po působení proteolytických enzymů podléhá rozkladu na peptidy až aminokyseliny. Dále vykazuje vysokou odolnost vůči proteinkináze K, fosfolipáze C a vysokým teplotám. Je metabolicky stálý, nerozpouští se v čistících prostředcích, vykazuje silný sklon ke shlukování a polymerizaci (Dormont, 2002).

Infekční prionový protein tak tvoří nerozpustné shluky ukládající se v nervové tkáni, ty se nazývají amyloidní plaky (Ji a Zhang 2010), což způsobí, že mozek se mění ve tkáň připomínající houbovitou strukturu. Z tohoto důvodu se onemocnění, jež způsobují priony, nazývají spongiformní encefalopatie (Klaban, 2005). Dokáže se navázat na PrP^C a způsobit změnu prostorového uspořádání na PrP^{Sc}. Jakým způsobem tato změna probíhá, dosud není známo. To postupem času způsobí, že PrP^C není v mozkové tkáni dostatečně početně zastoupen a je nahrazen infekčním PrP^{Sc}, což způsobí vznik prionového onemocnění. Průběh přeměny na PrP^{Sc} může trvat i léta (Ji a Zhang 2010). Jedna z teorií říká, že u dědičných prionových onemocnění se PrP^{Sc} asi tvoří již v endoplazmatickém retikulu, a to jako mutace v pořadí aminokyselin v řetězci (Harris, 1999, Prusiner, 1998). Pokud není nemoc dědičného původu,

ale jedinec se nakazí, je nutné, aby došlo ke kontaktu mezi PrP^C na povrchu buňky a PrP^{Sc} (Prusiner 1998). Ten může být do organismu zanesen skrze očkování nebo přijat společně s krmivem (Porter and Leemans 2013).

3. 2 Prionová onemocnění

Prionová onemocnění se též označují jako transmisivní spongiformní encefalopatie. Jedná se o skupinu neurodegenerativních nemocí, která postihují člověka i zvířata (Mathiason et al., 2006, Rusina and Matěj, 2012). Při prionových onemocněních se běžně vyskytující prionový protein mění na infekční a hromadí se. To vede ke zničení neuronů a v konečném důsledku ke smrti nakaženého jedince (MaWhinney et al., 2006). Následné nakupení infekčního PrP^{Sc} v centrální nervové soustavě (CNS) vede ke smrti neuronů, astroglíóze (namnožení astrocytů) a vakuolizaci mozkové tkáně, což je považováno za hlavní ukazatel prionových chorob (Tkáčiková and Hreško, 2008).

Nemoci, jenž způsobují priony, se označují jako spongiformní onemocnění, a to z důvodu toho, že narušují jednotlivé části mozku. Tyto oblasti mozkové tkáně vzhledem připomínají houbu díky množství velice malých otvorů (mikrootvorů) v tkáni. I když se priony vyskytují ve všech částech mozku, příznaky určitých onemocnění se liší v závislosti na tom, kde se jich vyskytuje největší množství. Histologicky jsou tato onemocnění charakterizována spongiformní degenerací CNS (Ganter, 2015).

Mezi prionová onemocnění lidí patří Kuru. Toto onemocnění se poprvé vyskytlo mezi členy kmene Fore na Nové Guinei (Wadsworth and Collinge, 2007). Dále pak Creutzfeldt – Jacobova nemoc, u které se v současnosti rozlišují 4 formy – familiární, iatrogenní, sporadická a nová varianta CJD (Espinosa et al., 2010). A zbývající dvě jsou Gastermann-Strässler-Scheinkerův syndrom a Fatální familiární insomnie (Collinge, 2005).

3.2.1 Klusavka

Klusavka je také označována jako scrapie neboli drbavka. Tento název si vysloužila díky jejímu hlavnímu klinickému projevu, kdy se zvířata předpokládané svrbění snaží zmírnit tím, že se drbou například o stromy, hrazení a jiné předměty (Wickner et al., 1999). Jedná se o neurodegenerativní onemocnění postihující kozy a ovce (Johnson, 2005). Tato nemoc se vyskytuje i v menší míře u muflonů (Jeffrey and González, 2007, Smith and Bradley, 2003).

Scrapie je prvním popsaným prionovým onemocněním a nejvíce studovanou spongiformní encefalopatií. Popsána byla již téměř před 300 lety, přesněji okolo roku 1730 v Anglii (Greenlee and Greenlee, 2015), což byl jediný stát, kde se v té době vyskytovala (Smith and Bradley, 2003). Klusavka poté byla hlášena po celém světě s výjimkou Nového Zélandu a Austrálie, což jsou dvě země, kde jsou velmi početné chovy ovcí (Kaslow et al., 2014). Ve 40. a 50. letech 20. století mnoho zemí zakázalo dovoz ovcí z Velké Británie, a to až do doby, než bude prokázáno, že jsou britské ovce zdravé (McKintosh et al., 2003). Dnes se vyskytuje zřídka a je vzácná i díky eradikačním programům, které byly zavedeny, aby došlo k vymýcení choroby (Greenlee and Greenlee, 2015). I přesto, že se jedná o nejdéle známé prionové onemocnění zvířat, stále není jasný přirozený způsob přenosu (Mathiason et al., 2006).

Studie, které vyšetřovaly, jaké byly příčiny vzniku klusavky, došly k závěru, že zdravé ovce byly nakaženy během očkování proti viru vrtivky, což je nemoc ovcí přenosná na člověka. Vakcína se totiž vyráběla z formalínem zpracovaným extraktem z ovčí lymfatické tkáně, která byla napadena PrP^{Sc}. Tak došlo k nakažení zdravého jedince. Dva roky po vakcinaci se klusavka objevila u více než 1500 ovcí (Motarjemi and Adams, 2006).

Není hodnocena jako zoonóza, neboť nebyl zatím objeven žádný důkaz, který by potvrdil, že se jí může nakazit i člověk (Smith and Bradley, 2003). Epidemiologické studie trvající více jak 30 let nedošly k přesvědčivému důkazu o přenosu klusavky na člověka (Cousens, et al., 1990). Avšak byl prokázán přenos na makaky (Hannaoui et al., 2017).

Formy klusavky

Různé projevy klusavky mohou být dány, stejně jako v případech jiných prionových chorob, druhem prionu a genetickou výbavou zvířete (Yokoyama et al., 2010). Zvýšený dohled v průběhu posledních dvou desetiletí vedl k rozlišení klusavky na několik typů, a to na klasickou a atypickou formu (Aguilar-Calvo et al., 2015).

Klasická forma

U pokusných přenosů klusavky, kdy se použily části mozku a míchy z nakažených jedinců, se dospělo k závěru, že klusavka je přenosná, pokud se infekce přenesese přes spojivku oka, pod pokožku, mezi lebku a tvrdou plenu mozkovou či nitrolební cestou. Tyto způsoby přenosu byly

prokázány již roku 1936. U některých genotypů ovcí je možný i přenos přes placentu z matky na potomky. Možný je zřejmě i přenos přes mléko a mlezivo, což doposud není prokázáno a byl by to další možný způsob nakažení jehňat (Greenlee and Greenlee, 2015).

Ačkoli byl prokázán vertikální přenos (z matky na potomka), nejpravděpodobnější cesta nakažení se zdá být přenosem mezi ovce a jejich jehňaty v době porodu (Aguilar-Calvo et al., 2015). Kromě vertikálního přenosu klusavky je možná i nákaza horizontální čili z jednoho zvířete na druhé (Bunk, 2004).

Byl testován i přenos nemoci přes sperma beranů, kteří byly prokazatelně nakaženi klusavkou. Ze závěru výzkumu však bylo patrné, že nebezpečí přenosu choroby je velmi nízké, ať při inseminaci či během přirozeného připojení. Inseminace je přenos samčích pohlavních buněk do rozmnožovacího ústrojí samice. Nakažlivé priony však byly prokázány ve spermatu nakažených beranů v *in vitro* podmínkách, což naznačuje, že tato cesta může vyžadovat další výzkum (Greenlee and Greenlee, 2015).

Díky vysoké odolnosti proti denaturačním látkám, které by měly vést k rozpadu prionu, se dokáží udržet i ve vnějším prostředí, což podporuje přenos v rámci stáda (Aguilar-Calvo et al., 2015).

K rozšíření onemocnění pak s nejvyšší pravděpodobností došlo díky vývozu zvířat, u kterých se do té doby neobjevily žádné klinické příznaky nemoci (Greenlee and Greenlee, 2015).

U klasické formy klusavky je dlouhé období, kdy se neprojeví žádné příznaky onemocnění. Toto období nazýváme inkubační doba. Trvá od 2 do 7 let, a to v závislosti na množství infekčního prionu, kterému jsou ovce vystaveny, a genotypu ovcí (Greenlee and Greenlee, 2015).

Klinické příznaky se ve většině případů začnou projevovat během 2. – 5. roku života zvířete (Healy et al., 2002) a ke smrti dochází mezi 2 týdny až 6 měsíci po projevení prvních příznaků. Mezi počáteční příznaky patří změny v chování jedince (Ganter, 2015), jako je upřený pohled, snaha oddělit se od stáda a být o samotě, ztráta zvědavosti, dále pak třes, poruchy koordinace chůze, zhoršený zrak až oslepnutí. Jedním z nejlépe rozeznatelných a hlavních příznaků, který byl pozorován u ovcí nakažených klasickou formou klusavky, je svědění (Aguilar-Calvo et al., 2015). To se projevuje snahou zvířete drbat se o hrazení, případně si vykusovat vlnu, hlavně tedy v oblasti, kde pociťuje svědění nejvíce. Často to bývá například

u kořene ocasu a na hřbetě. Stává se, že si tak ovce zničí rouno a na těle mají lysá místa (Ganter, 2015, Jeffrey and González, 2007, Novakofski et al., 2005, O'Rourke et al., 2011, van Keulen et al., 2008).

U vnímavých ovcí dochází v inkubační době k namnožení prionů v lymfatických uzlinách. Proto nakažené ovce mohou být během této doby zdrojem znečištění okolního prostředí. I přesto, že během vývoje klusavky se účastní lymfatický systém, se v organismu netvoří vůči nákaze žádné protilátky. Je to způsobeno tím, že hostitelský organismus přirozeně zahrnuje PrP^C, který má stejnou postupnost aminokyselin jako nakažlivý PrP^{Sc} (Greenlee and Greenlee, 2015).

PrP^{Sc} byl zjištěn převážně v centrální nervové soustavě, ve slezině, v mízních uzlinách, v mandlích, ve svalech, v tlustém střevě a ileu (kyčelníku – spodní úsek tenkého střeva) a u březích zvířat i v placentě (Jeffrey and González, 2007, Novakofski et al., 2005, O'Rourke, et al., 2011, van Keulen, et al., 2008). Dle Aguilar-Calvo et al. (2015) byl další výskyt zjištěn i v kůži, mléčné žláze, tlustém střevě a v posledních letech i ve slinivce, srdci a v močovém měchýři, ale již v nižších koncentracích.

Nákazy schopný prion byl dále nalezen v sekretech a exkrementech, což by mohlo umožnit přenos i ve stádě, případně i v mezidruhovém měřítku. V nakaženém stádě byl průměrný úhyn 3 – 5 % zvířat, nicméně při pozorování byl zaznamenán dokonce až 20% úhyn (Jeffrey and González, 2007, Novakofski et al., 2005, O'Rourke et al., 2011, van Keulen et al., 2008).

PrP^{Sc} je zjištělný pomocí imunohistologického vyšetření, které zahrnuje odběr tkáně ze třetího víčka, mandlí, nebo sliznice konečníku. Vzorky se mohou odebírat i během života jedince, zatímco jiná vyšetření tkání se dělají až po jeho smrti (Greenlee and Greenlee, 2015).

Neuropatologické změny u klusavky jsou houbovitá vakuolizace, jež se projevuje vznikem mikrootvorů v nervové tkáni, dále dochází k funkčním i morfologickým změnám astrocytů (tzv. astroglióza) a ke vzniku PrP^{Sc} amyloidních plaků v CNS. Amyloidem se rozumí patologická fibrilární forma proteinu, která má β strukturu. Ke vzniku takového amyloidu dojde shlukováním původní formy proteinu, kterou lze rozložit – degradovat (solubilní forma) a má výrazně zastoupenou beta strukturu, do formy fibrilární, kterou již degradovat nelze (Hunter, 2003).

Klasická forma klusavky se vyskytuje i u koz, u nichž byla poprvé popsána roku 1939, kdy byla experimentálně přenesena z ovcí. Krátce poté byl popsán i případ přirozeného výskytu klusavky u koz. Klusavka u koz se objevuje nejčastěji u smíšených stád koz a ovcí, ale jsou známi i případy koz, které byly nakaženy klusavkou, i když nikdy nepřišly do styku s žádnou ovčí (Greenlee and Greenlee, 2015). Klinické příznaky kozí scrapie jsou velmi podobné těm, jež se projevují u ovcí. Může mezi ně patřit ztráta zvědavosti, podrážděnost, nezvyklá ostražitost, neklid, poruchy koordinace, neobvyklé držení těla, třes, skřípání zubů, slinění, přecitlivělost na různé podněty (jako hluk, teplo, chlad, bolest), nebo opakované vyzvracení náplně bacheru (Benestad et al., 2008, Ganter, 2015, Goldmann, 2008, Vaccari, et al., 2009). Hromadění PrP^{Sc} v placentě u koz je nižší ve srovnání s tím, co bylo pozorováno u placenty ovcí nakažených klusavkou. Podobně jako je to u této formy u ovcí, tak i u koz se v průběhu inkubační doby zapojuje lymforetikulární systém (Greenlee and Greenlee, 2015).

Polymorfismus aminokyselin, které kódují geny (PRNP) u koz i ovcí, je spojován s vnímavostí vůči klusavce. Toto zjištění vedlo k selektivnímu šlechtění ovcí, jež jsou vůči klusavce odolné. Toto šlechtění nemělo negativní dopad na produkci, zdraví zvířat ani reprodukci (Dawson et al., 2008, Sweeney and Hanrahan, 2008). Příkladem mohou být ovce, jež jsou homozygotní pro Arg v pozici 171, ty se zdají být vůči klusavce odolné (Prusiner, 1997).

Několik studií se zabývalo rozborem genu PRNP u koz, jakožto nebezpečným předpokladem pro vznik klusavky, přestože je u nich výskyt klusavky méně častý, než je tomu u ovcí. Bylo zjištěno, že i u koz se vyskytují genotypy, které jsou vůči klusavce odolné. Avšak byly hlášeny případy, kdy kozy odolné vůči klasické formě klusavky, byly nakaženy atypickou formou (Benestad, et al., 2008, Goldmann, 2008, Imran and Mahmood, 2011, Vaccari, et al., 2009).

Atypická forma

Jedná se o druhou transmisivní spongiformní encefalopatii ovcí, která byla poprvé popsána v roce 1998 v Norsku (Greenlee and Greenlee, 2015), a proto byla pojmenována Nor-98 (Aguilar-Calvo et al., 2015). Od roku 1998 rostl počet případů Nor-98 ve většině evropských zemí, v USA a objevily se případy i na Novém Zélandě (Aguilar-Calvo et al., 2015, Greenlee and Greenlee, 2015).

Předpokladem u atypické formy klusavky je, že se vyvinula samovolně, protože je velmi rozšířená a často se vyskytuje u starších zvířat, a to i pouze u jednotlivců ve stádě (Aguilar-Calvo et al., 2015).

Netytická forma scrapie byla vždy odhalena v jednom stádě ovcí, proto se nezdá být nakažlivá nebo se velmi špatně přenáší za přirozených podmínek. Vyskytuje se převážně u starších zvířat, dokonce velice ojediněle. Důkaz výskytu nakažlivých agens mimo centrální nervovou soustavu naznačuje, že je možný i přirozený přenos netytické klusavky prostřednictvím kontaminovaného krmiva pro zvířata (Hunter, 2003).

Případy nakažených zvířat se lišily od obvyklé klusavky klinickým obrazem, molekulární charakteristikou abnormálního prionového proteinu, šířením PrP^{Sc} v organismu nakažené ovce a epidemiologií, která se zabývá příčinami vzniku a zákonitostmi šíření nemoci (Greenlee and Greenlee, 2015).

Klinické příznaky se podobají klasické formě klusavky, ale jsou méně výrazné. Svědění je u atypické formy neobvyklé, mezi nejčastější příznaky patří poruchy koordinace pohybu (Hunter, 2003).

Agens se nevyskytuje mimo centrální nervovou soustavu jedince. Nepodařilo se do současné doby prokázat PrP^{Sc} v lymfatické tkáni ovcí nakažených atypickou formou klusavky (Greenlee and Greenlee, 2015). Výskyt PrP^{Sc} omezen na obex, intenzivnější je v mozečku, středním mozku, thalamu a bazálních jádrech (Hunter, 2003).

U netytické formy klusavky se spongiformní změny vyskytují převážně v kůře mozečku a mozku, spíše než v prodloužené míše, jako je tomu u běžné klusavky ovcí (Greenlee and Greenlee, 2015).

Bylo prokázáno, že je možný přenos atypické formy klusavky orální cestou (Aguilar-Calvo et al., 2015). Netytická klusavka byla během výzkumu přenesena nitrolebně a přes dutinu ústní na zdravé jedince a nakažlivost byla prokázána i ve tkáních mimo centrální nervovou soustavu, konkrétně v ileu a ve slezině, dále pak i v kosterním svalstvu, lymfatických tkáních a v periferních nervech (Hunter, 2003).

Netytická forma klusavky byla hlášena i u koz. Liší se umístěním lézí v mozku. Jsou posunuty více vpředu, než je tomu u ovcí. Jejich výskyt je omezen na thalamus a střední mozek. Stejně jako u ovcí nebyla prokázána v lymfatických tkáních, jak tomu bývá u běžné formy (Greenlee and Greenlee, 2015).

K dnešnímu dni epidemiologické studie neprokázaly žádnou spojitost mezi klasickou a atypickou formou a jakéhokoli prionového onemocnění lidí. Nicméně tyto studie jsou početně omezené, a proto je nutné provést před vyvozením konečných závěrů další studie, které se budou týkat možnosti přenosu klusavky na člověka (Aguilar-Calvo et al., 2015).

3.2.2 Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE – Bovine Spongiform Encephalopathy)

Jedná se o chronické degenerativní onemocnění, které postihuje centrální nervovou soustavu skotu (Aguilar-Calvo et al., 2015, Smith and Bradley, 2003).

Česká republika má od 28. května 2015 status země se zanedbatelným výskytem BSE. Tento status uděluje Světová organizace pro zdraví zvířat (OIE) na základě dlouhodobého plnění podmínek týkajících se výskytu nemoci šílených krav na území členského státu. U nás bylo zavedeno povinné vyšetření na BSE u porážených zvířat v roce 2001. Na konci března 2015 bylo vyšetřeno celkem 1, 879 milionů kusů skotu, z toho bylo potvrzeno 30 případů (Státní veterinární správa ČR, 2015).

Poslední případ BSE v ČR byl v roce 2009. V ostatních evropských státech je dnes výskyt ojedinělý, naposledy se objevila ve Španělsku v květnu 2017 (SVS ČR, 2018).

Formy BSE

Klasická forma

V roce 1986 ve Velké Británii propukla epidemie do té doby neznámé prionové nemoci u skotu. Pojmenována byla bovinní spongiformní encefalopatie neboli „nemoc šílených krav“ (Ganter, 2015, Greenlee and Greenlee, 2015, Prusiner, 1997). Tohoto roku byl vyšetřen mozek skotu, který byl nakažen touto nemocí. Vyšetření zjistilo podobné změny jako u mozku ovce nakažené scrapii. V mozcích nakažených zvířat byly nalezeny proteiny PrP^{Sc}, které nebylo možné štěpit proteázou. K prvním případům mohlo dojít už na počátku roku 1980 či dokonce už 1970. To však není potvrzeno (Smith and Bradley, 2003).

Po potvrzení prvních případů se začal zvyšovat počet dalších odhalených případů. V roce 1990 bylo ve Velké Británii potvrzeno už 14 000 případů nakaženého dobytka z celkového počtu 10 miliónů. V roce 1996 došlo k nárůstu na 160 000 nakažených kusů a došlo k rozšíření nemoci mimo Velkou Británii. Nemoc se objevila ve 24 zemích po celém světě,

včetně USA. Odhaduje se, že 1 – 3 miliony kusů nakažených zvířat bylo poráženo pro lidskou spotřebu ještě před objevením klinických příznaků (Smith and Bradley, 2003). Kromě Velké Británie patřilo mezi nejvíce postižené země Irsko, Švýcarsko a Portugalsko (Belay and Schonberger, 2005, Collinge, 2001). Došlo se tehdy k závěru, že by mohlo jít o epidemii. Z tohoto důvodu byla zahájena epidemiologická šetření, která měla za úkol zjistit, jaké jsou příčiny vzniku tohoto onemocnění (Smith and Bradley, 2003).

Původ BSE zůstává však dodnes neznámý. Některé teorie říkají, že BSE je výsledkem přenosu scrapie od ovcí na skot nebo použitím masokostní moučky (MBM) v krmivu (Greenlee and Greenlee, 2015). Krávy chované pro produkci mléka se běžně krmily masokostní moučkou, která obsahovala tepelně upravované zbytky ze zpracování masa, kosti a mozky zvířat nakažených BSE. Často byla obohacena i vnitřnostmi ovcí a dobytka, které byly užívány jako výživový doplněk bohatý hlavně na bílkoviny (Ducrot, et al., 2008). Poukázalo se na to, že společným znakem pro všechny farmy, kde se vyskytli jedinci nakažení BSE, byla zvířatům podávána právě krmiva zahrnující masokostní moučku. V prošetřování počátku BSE bylo zjištěno, že Velká Británie byla první zemí, která začala masokostní moučku podávat mladým telatům v roce 1970, ačkoli to podle některých mohlo být už i dříve. Protože se zdá, že mladý skot je obzvlášť náchylný k nakažení BSE, může to být důvod epidemie v Anglii (Smith and Bradley, 2003). Zkrmování infikovanou MBM byla tedy považována za nejpravděpodobnější příčinu epidemie. Epidemiologické studie dokázaly, že doplňky krmiva, především masokostní moučka, obsahovala tkáň centrální nervové soustavy s PrP^{Sc}, což se ukázalo i jako zdroj šíření BSE ve Spojeném Království (Greenlee and Greenlee, 2015).

Zákon o krmivech byl ve Velké Británii vydán roku 1988, přesto byl ekonomický a politický dopad epidemie velmi vážný, a to po celé Evropě (Prusiner, 1997). Preventivní opatření se zaměřuje především na to, aby se tkáň, u které je největší pravděpodobnost, že by mohly vyvolat onemocnění, nedostaly do krmiv pro zvířata či do potravin určených pro lidskou spotřebu (Greenlee and Greenlee, 2015). Po zákazu zkrmování MBM došlo k postupnému snížení výskytu onemocnění (Ducrot, et al., 2008, Smith and Bradley, 2003).

Vznik epidemie byl tedy studii objasněn, avšak dosud není jasné, jak se nakazil první jedinec. Tato otázka je dosud nevyřešena. Ale vzhledem k tomu, že podoba tkáně z centrální nervové soustavy je po úmrtí zvířete podobná, ale ne zcela stejná jako u scrapie ovcí, předpokládá se, že došlo k přenosu právě z ovcí na skot, nebo od skotu nakaženého klusavkou (Smith and Bradley, 2003).

Inkubační doba činí 2 až 8 let. Ve většině případů u dojnic byla inkubační doba kratší, a to od 4 do 5 let (Imran and Mahmood, 2011, Sigurdson and Miller, 2003). Většina případů BSE se projevila u dojnic od 3 do 6 let (s průměrem 3,5 roku), v té době došlo k projevům prvních klinických příznaků. Období, kdy došlo k nakažení dojnic, se v těchto případech odhaduje přibližně v půl roce života dojnic (Greenlee and Greenlee, 2015).

Mezi klinické příznaky klasické formy BSE patří chybné držení těla, klopýtavá chůze, neobvykle silná vnímavost vůči různým podnětům, třes a ztráta tělesné hmotnosti (ve více jak 75% případů), tření se, olizování se, pokles produkce mléka (Novakofski et al., 2005) a v některých případech se objevila i neobvyklá agrese u nakaženého jedince (Greenlee and Greenlee, 2015). Jako další příznaky se objevují hlavně změny v chování, které nedoprovází zvýšená teplota. Zvířata jsou neklidná, bojí se a těžce se ovládají. Nakažený skot postupem času s těžkostmi vstává, při chůzi se mu rozjíždí končetiny a v některých případech je během chůze zvedá nezvykle vysoko (Prusiner, 1997). Na rozdíl od klusavky nebylo v případě BSE častým příznakem svědění a škrábání se. V mozku se nalézají nahromaděné PrP^{Sc} a je zde výrazná spongiformní vakuolizace (Novakofski, et al., 2005).

Původce BSE skotu se množí převážně v centrální nervové soustavě a nehromadí se v lymforetikulárním systému, jako je tomu u klusavky. PrP^{Sc} se vyskytuje v mandlích a Peyerových plátech z distálního ilea, i když je důkaz pro další periferní distribuci v pozdních stádiích nemoci (Greenlee and Greenlee, 2015). V konečné fázi onemocnění se infekční priony mohou vyskytovat v míše a periferních nervech, v trojklanném ganglionu a hrudních gangliích, hřbetních kořenových uzlinách, mandlích, dále v sítnici, nadledvinkách, ileu a kostní dřeni. Žádné studie nepřinesly důkazy o tom, že by se infekční priony vyskytovaly v mléce, spermatu a u embryí. Mláďata však po nakažených zvířatech prokazovala až dvakrát zvýšené nebezpečí, že se u nich BSE vyvine (Imran and Mahmood, 2011, Sigurdson and Miller, 2003).

BSE je zoonóza, je tedy přenosná na člověka (Aguilar-Calvo et al., 2015, Smith and Bradley, 2003, Vulin, et al., 2011). Způsob přenosu však není dosud znám. Nejjednodušší cestou přenosu se prokázala možnost ze skotu na ovce, a to orální cestou neboli přes dutinu ústní. To se zdá být nejpravděpodobnější cestou přenosu ze skotu na člověka. Tuto domněnku potvrzují i poznatky, že se před zavedením preventivních opatření využívalo velké množství skotu nakaženého BSE k lidské výživě a lidé se tak nakazili (Smith and Bradley, 2003). Jako na možný důkaz přenosu BSE na člověka poukazují studie, které se zabývaly výskytem nové varianty Creutzfeldt – Jacobovy nemoci u 3 dětí ve věku 9 let ve Velké Británii a ve Francii

(Chazot et al., 1996). Byla dokázána odlišnost ve vnímavosti lidského PrP k bovinnímu a ovčímu PrP (Cousens et al., 1990).

U BSE nikdy nebylo potvrzeno, že se přirozeně vyskytuje u ovcí. Nicméně stále je tu možnost, že ovce či kozy jí mohly být nakaženy. Zvláště ve Spojeném království byla stáda ovcí a koz vystavena znečištěným krmivům stejně jako tomu bylo u skotu, ale v mnohem menší míře. Ovce je možné nakazit BSE orální cestou, ale není dokázáno, že by se u nich BSE vyskytla přirozeně (Ganter, 2015).

Atypická forma

Vyjma klasického kmene PrP vyvolávající BSE byly objeveny ještě dva další kmeny, které jsou příčinou atypické formy BSE. Jedná se o H-typ a L-typ. V průběhu aktivního dohledu, jenž byl zaměřen na poražená zvířata, byla popsána většina atypických případů BSE (Ducrot et al., 2008). Vyskytuje se převážně u skotu, který je starší více jak 10 let. U klasické formy jsou zvířata výrazně mladší. Na rozdíl od klasické BSE se počet skotu nakažený atypickou formou nesnížil, když byla zavedena preventivní opatření na boj proti tomuto onemocnění. Počet skotu nakažený atypickou formou zůstává v celku neměnný v čase. Toto podporuje tvrzení, že případy atypické BSE vznikají samovolně (Greenlee and Greenlee, 2015).

Oba typy se vyskytují přirozeně. H-typ BSE byl popsán u skotu ve Francii, v Německu, Japonsku, Nizozemí, Polsku, ve Švýcarsku, Velké Británii a Spojených státech amerických. L-typ byl zjištěn u skotu v Itálii, Japonsku, Belgii a v Kanadě. Pokusy ukazují, že oba typy atypické formy mají kratší inkubační dobu, než je tomu u formy klasické. H-typ BSE může být dědičný. Tato možnost však pro zatím prokázána nebyla (Greenlee and Greenlee, 2015).

3.2.3 Přenosná encefalopatie norků – (TME - Transmissible Mink Encephalopathy)

TME je prionovým onemocněním norků. Nebyly zjištěny žádné případy u volně žijících populací, ale pouze u faremne chovaných zvířat. Ohniska této nemoci jsou vzácná (Nair and Johnson, 2011).

První případ byl pozorován u druhu norek americký (*Neovison vison*) (Greenlee and Greenlee, 2015) v roce 1947 v Minnesotě ve Wisconsinu. Následně v 60. a 70. letech došlo k propuknutí epidemie na území USA. Poslední výskyt epidemie byl hlášen roku 1985 ve Spojených státech. Prionové onemocnění norků se objevilo na farmách i v jiných státech, konkrétně

v Kanadě, východním Německu, Finsku a ve státech bývalého Sovětského svazu (Aguilar-Calvo et al., 2015, Greenlee and Greenlee, 2015, Marsh and Hadlow, 1992). Epidemiologické studie ohnisek prokázaly, že příčina šíření TME souvisí se zkrmováním masa hospodářských zvířat, která byla nakažena nějakou TSE. Nejprve se mělo za to, že epidemie vypukla na základě zkrmování masa ovcí nakažených scrapii, avšak během epidemie v roce 1985 v USA jedna z farem uvedla, že norci z jejich farmy nebyli krmeni masem z ovcí, nýbrž hovězím masem. To vedlo k teoriím, že BSE je hlavní příčinou vzniku TME (Sigurson and Miller, 2003).

Původ TME však zůstává dosud nejistý. Jako nejpravděpodobnější možnost, jež zapříčila vznik TME, se jeví přenos L-typu BSE, protože u norků, jež byly naočkovány tímto typem v laboratorních podmínkách, nejvíce odpovídaly klinické příznaky. Při naočkování klasické formy BSE, se u zvířat také projeví příznaky TSE, ale chování nakažených jedinců bylo spíše klidné a poslušné než útočné a vzteklé, jak tomu bylo pozorováno v případech na farmách. I u norků nakažených scrapii se vyvinula TME (Baron et al., 2007), ale pouze při intacerebrálním způsobu přenosu. Po pozření krmiva obsahující původce scrapie u norků nedošlo k vývoji onemocnění. To dokazuje, že BSE představuje původ vzniku TME a že encefalopatie skotu není vázána jen na jediný druh. Pokud byl skot nakažen TME, pak mozková tkáň z takto nakaženého skotu následně vyvolá TSE u norků (Sigurson and Miller, 2003).

Inkubační doba je pak pouze 4 až 7 měsíců. Inkubační doba u přirozeně se vyskytující TME byla odhadnuta na základě pozorování na 7 až 12 měsíců (Sigurson and Miller, 2003).

Klinické příznaky trvají od 1 týdne až po několik měsíců. Jako první se objeví změny v chování, mezi něž patří agresivita a zvýšená vnímavost vůči somatosenzitivním podnětům, jako například chlad, teplo, bolest a podobně (Sigurson and Miller, 2003). Další zdroje uvádí mezi změnami chování ještě deprese, neklid, zanedbávání péče o potomstvo a péče o srst. Mezi počátečními příznaky se mohou objevit obtíže s přijímáním potravy a polykáním (Imran and Mahmood, 2011). Později se objevuje porucha koordinace, třes, chození v kruhu a nutkavé kousání předmětů i sebe sama zvláště v oblasti ocasu (Sigurson and Miller, 2003), ataxie, chvílemi i zatínání čelistí a zakřivení ocasu do polohy jako ho mají veverka. V závěru průběhu onemocnění se mohou objevit křeče, zvířata se zdají jakoby unavená a nevykazují žádné reakce na okolní podněty. V některých případech bylo u norků pozorováno, že tlačí hlavou proti kleci (i po několik hodin). Po objevení klinických příznaků nastává smrt mezi 2 až 8 týdny (Imran and Mahmood, 2011).

Priony způsobující TME byly u nakažených zvířat zjištěny i mimo CNS. Nalézají se ve slezině, v mezenterických mízních uzlinách a střevě, v brzlíku, játrech, ledvinách a slinných žlázách. Hlavními neurodegenerativními znaky jsou spongiformní změny na mozkové tkáni a astrocytóza (rozpad astrocytů – podpůrných buněk NS). Spongiformní degenerace se nejvíce soustředí v oblasti mozkové kůry, převážně ve frontální kůře a corpus striatum, dále v thalamu a hypothalamu, méně pak ve středním mozku. V mozečku a v míše se změny neobjevují (Imran and Mahmood, 2011, Sigurdson and Miller, 2003).

Jako nejpravděpodobnější cesta přenosu se jeví horizontální, a to jako příčina kanibalismu či pokousání zvířat mezi sebou, pokud se zvířata nacházela ve stejné kleci. Avšak u mláďat sdílející klec se svými matkami se neobjevily žádné známky nákazy, i když v té době byl vyhlášen začátek epidemie. Vertikální způsob přenosu u TME nebyl prokázán. Onemocnění bylo pozorováno jen u dospělých jedinců. Při vypuknutí epidemie může úmrtnost dosáhnout až 100 % (Imran and Mahmood, 2011).

TME lze lehce přenést na mývaly orální, intracerebrální a parenterální cestou. Intracerebrálně lze TME nakazit skunky, fretky, kuny, soboly, ovce a kozy, skot, křečky a některé druhy opic, jako například makaky a kotuly (Sigurdson and Miller, 2003). Přenosem na křečky byly objeveny dva odlišné kmeny. Kmen „hyper (HY)“ a „ospalý (DY – z angl. drowsy)“. Vykazují odlišné klinické příznaky, délku inkubační doby a výskyt lézí (Aguilar-Calvo et al., 2015).

3.2.4 Chronické chřadnutí jelenovitých (CWD - Chronic Wasting Disease)

CWD se vyskytuje u čeledi jelenovitých, ať už u zvířat v lidské péči nebo u volně žijících. Bylo pozorováno u následujících druhů jelenovitých: jelenec ušatý (*Odocoileus hemionus*), jelenec běloocasý (*Odocoileus virginianus*), jelenec černoocasý (*Odocoileus hemionus columbianus*), wapiti nelsonův (*Cervus elaphus nelsoni*), los yellowstonský (*Alces americanus shirasi*) (Aguilar-Calvo et al., 2015).

Poprvé bylo CWD zaznamenáno v Coloradu ve Spojených státech v roce 1967 (Aguilar-Calvo et al., 2015). Dále se pak onemocnění rozšířilo do dalších 16 států USA (Wyoming, Utah, Kansas, Nebraska, Nové Mexiko, Texas, Severní Dakota, Jižní Dakota, Wisconsin, Illinois, Maryland, Missouri, New York, Minnesota, Virginie, Západní Virginie) a pozorováno bylo i ve 2 kanadských provinciích, konkrétně Saskatchewan a Alberta (Bourne, 2015, Mathiason et al., 2006). Mimo Severní Ameriku byl CWD detekován u jelenovitých

chovaných na farmách v Koreji (Bourne, 2015). K dnešnímu dni se vyskytuje už v 21 státech USA, v Kanadě a dokonce i v Evropě, přesněji v Norsku. Onemocnění bylo zjištěno u ročních jelenů a losů, ale i u zvířat starších 15 let (Hannaoui et al., 2017).

Náchylnost k CWD se u jelenovitých liší i v rámci druhu. Je ovlivněna věkem, pohlavím a genetickou výbavou. To výrazně komplikuje porozumění této nemoci. Prevalence CWD je u dospělých jelenů přibližně 2krát vyšší než u laní v různých oblastech. Je to zřejmě způsobeno vyšším příjmem potravy u samců a tím vyšší pravděpodobnost nakažení z prostředí, případně dalším důvodem může být, že samci jsou k nákaze z prostředí více citliví než samice. I během říje samci přijdou do kontaktu s více samicemi a s ostatními samci bojují, což může přispívat k nakažení díky kontaktům s jinými jedinci, a tím se nákaza může lépe šířit právě mezi samci. Avšak ve znalostech o přenosu CWD je stále spousta nedostatků (Potapov et al., 2013).

I když se zdá, že se nákazu CWD daří držet pod kontrolou, díky opatřením jako je zamezení styku volně žijících jelenovitých s těmi chovanými v lidské péči a vybíjení nakažených stád, není tomu zcela tak, kvůli přetrvávajícímu výskytu prionů CWD ve volném prostředí. Výskyt CWD u volně žijících stád je ještě hůře omezený, než je tomu u stád chovaných lidmi. Chronické chřadnutí se může stále šířit, což dokazuje i jeho výskyt v Norsku. I přesto, že je snaha vytvořit vakcínu, úplné vymýcení nemoci je prozatím v nedohlednu. Možnost kontroly je značně omezena i dlouhou inkubační dobou, z počátku ne zcela vypo- vídajícími klinickými příznaky, odolností prionů CWD v prostředí a neúplným pochopením přenosu. Norské úřady se rozhodly vybit celé stádo čítající 2500 sobů a dalším zabránit přístupu do oblasti výskytu CWD, aby tak potlačily možnost rozšíření (Hannaoui et al., 2017).

Podobné přístupy byly uskutečněny i v Severní Americe, kde byl nařízen cílený lov jelenů, aby se snížil jejich počet ve stádech, a tím se omezila možnost přenosu mezi jednotlivci. Je totiž možné, že počet zvířat ve stádě ovlivňuje přenos. Jedná se zatím o nejběžnější způsob boje proti CWD, protože prozatím nebyla vyvinuta žádná vakcína nebo léčba. Nakažení jedinci mohou být odlišeni od zdravých na základě viditelných příznaků, avšak to až v pozdějších stádiích nemoci. Přesto je lov zaměřen na všechny jeleny ve stádě. Důvodem je hlavně to, že u některých se ještě nemusely projevit první klinické příznaky a u jiných nemusí být zcela rozpoznatelné, aby se dalo jasně říci, že se jedná o CWD (Potapov et al., 2016). Úspěch tohoto opatření však není stoprocentní, protože priony CWD v prostředí stále představují možnost nákazy. Důležité je, aby se tkáň z nakažených jedinců nedostaly do lidské potravy, proto se vyvíjí různé diagnostické metody, jež by bylo možno provádět u živých zvířat bez jakéhokoli

zásahu do organismu a před projevem klinických příznaků. Příkladem je vyšetřování výkalů. Jako preventivní opatření by mohl sloužit výběr odolných genotypů jelenovitých, stejně jako je tomu u scrapie ovcí, kdy se vybírají odolná plemena (Hannaoui et al., 2017).

CWD je pomalu se rozvíjející onemocnění s dlouhou inkubační dobou. Pokusné naočkování jelence ušatého (*Odocoileus hemionus*) CWD prokázalo, že inkubační doba se pohybuje mezi 2 až 4 léty (Hannaoui et al., 2017), v průměru 20 až 25 měsíců. CWD je smrtelné onemocnění. Nejsou žádné údaje o rozdílech v délce průběhu onemocnění mezi pohlavími (Potapov et al., 2013).

Klinické příznaky zahrnují změny chování a fyzické změny jako je ztráta hmotnosti. Příznaky se na začátku průběhu onemocnění nemusí projevovat výrazně a jsou lehce zaměnitelné s běžným chováním a sezónním kolísáním tělesné hmotnosti. Proto stanovení nemoci na základě klinických projevů nemusí být spolehlivá a jsou nutná patologická (po smrti zvířete) vyšetření nebo biochemické analýzy mozku či lymfatické tkáně. Ty odhalí spongiformní změny, astrocytózu a nahromadění PrP^{Sc} v mozku a lymfatické tkáni. U většiny prionových onemocnění je nakažlivost omezena hlavně na mozek, ale u CWD se PrP^{Sc} vyskytuje v mnoha tkáních mimo nervovou soustavu, tělních tekutinách a exkrettech, což usnadňuje horizontální přenos (Hannaoui et al., 2017).

Dulberger et al. (2010) zaznamenali pokles plodnosti nebo životaschopnosti narozených kolouchů u samic nakažených CWD přibližně u 10 pozorovaných nakažených laní.

CWD je jedna z nejnakažlivějších prionových chorob, protože nakažení schopné priony jsou vylučovány do prostředí močí, výkaly a slinami a dokáží v něm přetrvat i roky (Hannaoui et al., 2017, Mathiason et al. 2006).

Přenos mezi jednotlivými zvířaty v rámci druhu je možný při blízkém kontaktu mezi jedinci, a to přes sliny, moč a výkaly nebo nepřímo prostřednictvím zamořeného prostředí. K nákaze může dojít pozřením rostlin předtím kontaminovanými zvířetem s CWD. Priony CWD se mohou hromadit ve volném prostředí a zůstat schopni nakažení roky. K vývoji CWD u zdravého zvířete je třeba dostatečný počet PrP^{Sc}, ačkoli nejnížší možná dávka není známa. Zdá se, že pravděpodobnost přenosu z matky na potomka během březosti nebo při narození je minimální (Potapov et al., 2013).

Přirozený přenos na jiné druhy nebyl pozorován. Nicméně kvůli tomu, že různé druhy jelenovitých se vyskytují na místech, kde jsou chována i hospodářská zvířata, případně jsou

v těchto oblastech i volně žijící druhy zvířat, stále vzrůstají obavy z možnosti nakažení jiných zvířat, a to zvláště těch hospodářských (Bourne, 2015, Hannaoui et al., 2017).

U skotu se vyvinulo TSE po nakažení CWD jen při intracerebrálním podání, nikoli při perorálním přenosu. Intracerebrálně lze CWD nakazit i jiné druhy zvířat, jako kozy, ovce, hlodavce, norky, fretky a kotuly, ale nejedná se o fyziologickou možnost přenosu (Hannaoui et al., 2017). Pokusný orální přenos na kočky neprokázal vývoj nemoci ani po 9 letech (Bourne, 2015).

Přenos na člověka doposud nebyl prokázán, ale představuje možné nebezpečí (MaWhinney et al., 2006). Dle laboratorní studie *in vitro*, v níž se zjišťovalo, jak infekční PrP^{Sc} CWD působí na lidský „zdravý“ PrP^C je možnost přenosu na člověka nepatrná. Závěrem byla nízká míra proměny PrP^C na PrP^{Sc}. Ale jen jedna studie na prokázání toho, že je CWD na člověka nepřenositelná, je nedostačující (Barria et al., 2011). Myši, jež byly vyšlechtěny k nadprodukcii lidského PrP, také nebyly nakaženy CWD. Avšak pokusy s kotuly zjistily, že ti se mohou CWD nakazit. Byly provedeny i studie, kde byl zkoumán přenos na makaky. Je očekávána i dlouhá inkubační doba, stejně jako tomu bylo v případě přenosu scrapie na makaky, proto by tyto studie mohly trvat i déle než 10 let. V období 6 let, přesněji mezi lety 1993 až 1999, probíhala ve Wyomingu a Coloradu sledování výskytu CJD u lidí, ale nedošlo v těchto letech ke zvýšení výskytu a ani se neobjevily žádné nové formy CJD u lidí, kteří pravidelně jedli maso vysoké zvěře. To naznačuje, že je zřejmě u CWD mezi jelenovitými a lidmi jistá překážka zabráňující přenosu. Avšak výsledky studií *in vitro* naznačují, že překážka není nepřekročitelná (Hannaoui et al., 2017).

Dnes už je známo, že druhová bariéra není ovlivněna jen prionovými proteiny dárce (PrP^{Sc}) a příjemce (PrP^C), ale záleží i na jejich uspořádání PrP^{Sc} a PrP^C, protože různé kmeny infekčních prionů se liší právě uspořádáním aminokyselin. Nové kmeny CWD se proto mohou objevit, pokud se CWD nakazí jiné druhy zvířat než jelenovití (Hannaoui et al., 2017).

Priony se dokáží přizpůsobit a napadat tak jiné druhy. Toto přizpůsobení je charakteristické zkrácenou dobou inkubace, nárůstem rychlosti napadení a změnami vlastností PrP^{Sc}. Nové prionové kmeny by se mohly rozvíjet, pokud by například priony CWD byly schopné nakazit nový druh. Příkladem by mohly být různé druhy hlodavců, kteří se vyskytují v oblastech, kde je i CWD. Předpoklad vzniku druhotného CWD odvozeného od hostitele znamená, že by druhová bariéra mezi lidským PrP a novým PrP^{Sc} nemusela existovat. Vzhledem k dlouhému období od nakažení až po projev prvních příznaků je nutných mnoho let

pozorování, aby bylo možné říci, že CWD nepředstavuje pro lidskou populaci žádné nebezpečí (Hannaoui et al., 2017).

3.2.5 Felinní spongiformní encefalopatie (FSE – Feline Spongiform Encephalopathy)

FSE byla hlášena u domácích koček i u divokých kočkovitých šelem chovaných v lidské péči (Bencsik et al., 2009). Prvním nakaženým plemenem domácí kočky byla siamská. Vyskytovala se u 5 gepardů štíhlých (*Acinonyx jubatus*), 5 lvů pustinných (*Panthera leo*), 3 tygrů (*Panthera tigris*), 3 pum amerických (*Puma concolor*), 3 ocelotů velkých (*Leopardus pardalis*), jednou u kočky bengálské (*Prionailurus bengalensis*) a u kočky Temminckovy (*Catopuma temminckii*). Až na 2 případy byly všechny u zvířat původem z Velké Británie či se nacházela na jejím území. Prvním případem bez vazby na Spojené království byla kočka Temmenckova pocházející z Německa, kterou následně dopravily přes Nizozemí do Austrálie, kde u ní došlo k projevům prvních příznaků. Druhý případ nemá přímou souvislost s Velkou Británií. Jednalo se však o geparda narozeného ve francouzské zoologické zahradě, který byl potomkem samice pocházející z Angie. Kvůli tomuto zjištění je podezření na možnost vertikálního neboli perinatálního přenosu (přenos během porodu) (Eiden et al., 2010).

Jako TSE byla tato nemoc uznána roku 1990, kdy byly hlášen první případ kočky, jejíž onemocnění bylo podobné scrapii ovcí, po objevení dalších případů v témže roce, byla tato nemoc označena za spongiformní encefalopatii koček (Gruffydd-Jones et al., 1991). Mnoho případů (89) se objevilo ve Velké Británii a následně pak méně i v jiných zemích. Na příklad ve Francii dosud bylo zjištěno 5 případů u gepardů, jež byli přivezeni z Anglie. Jeden případ i u jedince narozeného ve Francii (Bencsik et al., 2009). Mezi další země, v nichž se FSE vyskytlo, patří Norsko, Lichtenštejnsko v roce 2004, Německo a Itálie. Ve všech těchto zemích byl vždy jeden případ. Dvakrát se encefalopatie koček objevila ve Švýcarsku (Eiden et al., 2010).

Bencsik et al. (2009) popsali dva případy výskytu FSE na území Francie u gepardů. Jednalo se o matku a jejího potomka. To by mohlo představovat možný přenos FSE z matky na mláďata. Byl proveden srovnávací rozbor mozku u obou případů. Studie přenosu se dělaly na myších, jež tvoří ovčí prionový protein, u nichž byla potvrzena schopnost rozlišit různé agens BSE, a to pomocí rozboru a mapování mozku. Dále umožňuje snadné rozpoznání pomocí výskytu typických plaků na mozku, jež byly popsány i u lidí s novou variantou CJD nebo

u makaků nakažených BSE. Výsledky pokusů ukazují, že nejvíce pravděpodobným zdrojem nákazy byla právě BSE.

Gepardí samice byla dovezena z parku Whipsnade ve Velké Británii do zoologické zahrady Peaugres ve Francii. Tato samice porodila mladé v době, kdy už se u ní projevovaly příznaky onemocnění. Po pěti týdnech byla usmrcena, do té doby byla ponechána naživu jen kvůli tomu, aby se mohla starat o svá 3 koťata. Během tohoto období kojila a po její smrti byla mláďata krmena z 40 % čerstvým králičím nebo kuřecím masem a z 60 % hovězím. U jednoho z jejích potomků se objevil další případ FSE a byl u něj diagnostikován ve věku 7 let. To může představovat první známý případ přenosu z matky na potomstvo (Bencsik et al., 2009, Eiden et al., 2010).

Předpokladem pro vznik FSE je přenos encefalopatie skotu zkrmováním krmiva obsahující původce nemoci šílených krav. Tento předpoklad potvrzují i průzkumy na myších se stejným genetickým základem, které byly nakaženy BSE a následně i FSE. U myší se v obou případech rozvinulo onemocnění. To vykazovalo podobnosti v délce inkubační doby a výskytu lézí ve stejných oblastech mozku (Bencsik et al., 2009) a zároveň se ani příliš nelišilo v klinických projevech (Eiden et al., 2010).

Inkubační doba není přesně stanovena, avšak většina zvířat, u nichž byla prokázána, se věkově pohybovala od 4 do 9 let (Bencsik et al., 2009).

Klinické příznaky se mohou lišit jedinec od jedince, ale nejčastěji zahrnují změny chování jako je větší agresivita nebo naopak plachost, ataxii a třes zejména hlavy a uší. Pozorováno dále bylo nadměrné slinění, a to buď přerušované nebo v kuse, přehnané reakce na hlasité zvuky a dotek, chorobná žravost a žízňivost, nepřirozeně zvýšená nebo snížená péče o srst, neschopnost správného odhadu vzdálenosti, rozšířené zornice, v některých případech i kývání hlavou. Smrt obvykle nastala mezi 6 až 8 týdny od projevení prvních známek onemocnění (Bencsik et al., 2009, Gruffydd-Jones et al., 1991).

PrP^{Sc} se u encefalopatie koček vyskytuje jak v centrální nervové soustavě (CNS), tak i v periferní. Nejvíce se hromadí v šedé kůře mozkové, středním mozku, thalamu a mozečku. Výrazné spongiformní změny byly pozorovány hlavně ve středním mozku, thalamu a hypotalamu. Mírné změny byly pozorovány i v oblasti míchy. PrP^{Sc} byl zjištěn v celé periferní nervové soustavě, nejvíce se ho však objevilo ve spinálních gangliích (uzliny na kořenech míšních nervů), v nervech jazyka a v sedacím nervu. Kromě toho bylo pozorováno i hromadění v gliových buňkách (podpůrná funkce, podílí se na přenosu vzruchu) zrakového nervu. Dále

byl původce FSE zjištěn i v lymforetikulárním systému a dalších tkáních. Přesněji byl viditelný ve slezině a podčelistních mízních uzlinách, dále pak v kůře nadledvin (Eiden et al., 2010).

Bylo prokázáno, že kočky je možné experimentálně nakazit CJD (Gruffydd-Jones et al., 1991)

Nahlášeno bylo příliš málo případů, aby mohlo být posouzeno, zda jsou plemena koček, jež mají zvýšenou náchylnost k FSE či je-li náchylnější určité pohlaví (Gruffydd-Jones et al., 1991).

3.2.6 Encefalopatie exotických kopytníků (EUE - Exotic Ungulate Encephalopathy)

Jedná se o TSE exotických kopytníků z čeledi turovitých (Bovidae). V době epidemie BSE byla EUE pozorována ve Velké Británii u 6 Kudu velkých (*Tragelaphus strepsiceros*), 6 Antilop losích (*Taurotragus oryx*), 2 přimorožců arabských (*Oryx leucoryx*), u 2 jedinců plemene Vahumský skot neboli Watusi, u přimorožce jihoafrického (*Oryx gazela*), nyaly nížinné (*Tragelaphus angasii*), přimorožce šavlorohého (*Oryx dammah*) a bizona (*Bison bison*). Všechna tato zvířata na onemocnění zemřela (Imran and Mahmood, 2011).

Krmná dávka těchto druhů obsahovala MBM vyrobenou z tkání přežvýkavců (Imran and Mahmood 2011) nebo tato zvířata byla v kontaktu s nakaženými jedinci. Přesto, že MBM bylo krmeno velké množství zvířat v zoo, nemoc se vyvinula jen u hrstky z nich (Sigurdson and Miller, 2003). Většina zvířat měla jako doplněk krmné dávky právě MBM, avšak výjimka byla právě u druhu kudu velký, u kterého mohlo dojít zřejmě i k horizontálnímu přenosu či je tento druh vysoce náchylný k nakažení prionovým onemocněním nebo dokonce obojí (Cunningham et al., 2004, Sigurdson and Miller, 2003).

U myší, jež byly nakaženy EUE od jedince kudu a nyaly, se vyvinula TSE s podobným výskytem neuropatologických lézí a ani délka inkubační doby se příliš nelišila od té u myší nakažených BSE (Imran and Mahmood 2011, Sigurdson and Miller, 2003). Studie zabývající se kmeny prionů odhalila podobnosti mezi kmeny EUE a BSE, což podporuje názor, že encefalopatie exotických kopytníků má svůj původ právě v nemoci šílených krav, která byla schopna překročit mezidruhovou bariéru (Imran and Mahmood 2011).

Klinické příznaky se liší na základě napadeného druhu a neshodují se s příznaky BSE nebo klusavky (Imran and Mahmood 2011).

Tkáně pro studie výskytu PrP^{Sc} byly odebrány tak, aby nedocházelo k jejich společnému kontaktu. Na každý vzorek zvlášť byly používány jedny rukavice a nástroje. Vzorky byly uchovávány buď v 10% roztoku formalínu, nebo byly zamrazeny při -20 °C. PrP^{Sc} na základě těchto testů nebyl nalezen v kosterní svalovině, endometriu a mléčné žláze. Naopak prokázán byl v ileu a CNS. Stopové množství prionu bylo nalezeno ve slezině, plicích, podčelistních slinných žlázách, spojivce a kůži. Je však nutno vzít v úvahu, že se může jednat o posmrtné znečištění tkání nebo mohlo dojít k přenosu PrP^{Sc} v laboratoři. Přítomnost infekčnosti v tkáních, jako je kůže a slinná žláza, naznačuje možné cesty, kterými by mohlo dojít k přímému přenosu (Cunningham et al., 2004).

3.3 Diagnostika prionových onemocnění

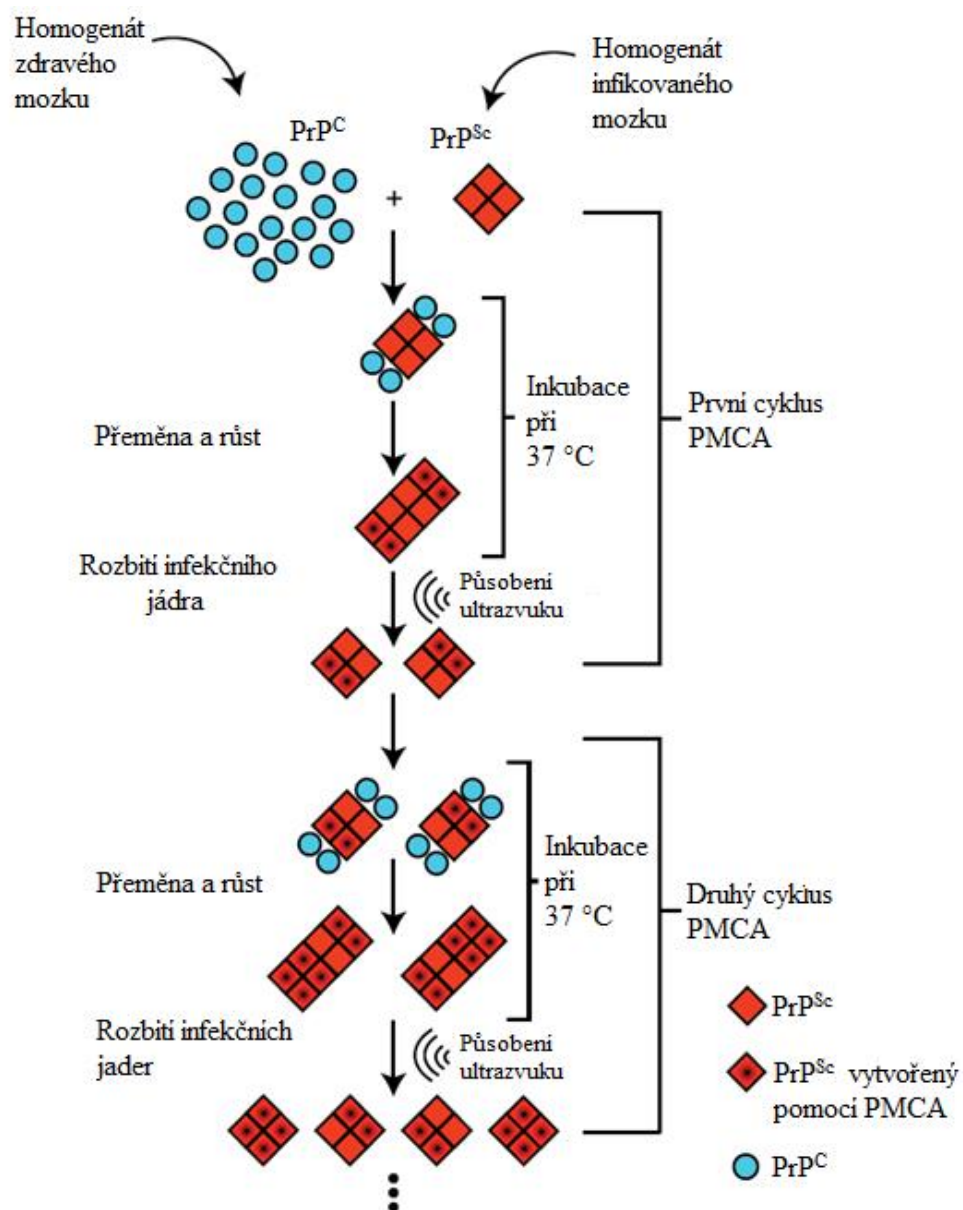
Diagnostika za použití běžných metod, jež se využívají při nemocech způsobených viry či bakteriemi, je u těch prionových velmi obtížná. Mezi běžné metody patří polymerázová řetězová reakce, sérologická vyšetření (zahrnující vyšetření séra na přítomnost protilátek) a testy na buněčných kulturách (Kostka and Vávra, 2002, Kübler et al., 2003). Důvodem je to, že PrP^{Sc} neobsahuje žádnou nukleovou kyselinu a skládá se jen z proteinu, který organismus nerozpoznává jako cizorodou látku. Dalším problémem je i to, že infekční agens je v tělesných tkáních velmi nerovnoměrně zastoupen. Největší množství je ve tkáních nervové soustavy, naopak nejméně ho je ve snadno dostupných tělních tekutinách jako například v krvi nebo moči (Kübler et al., 2003).

Prvotní stanovení diagnózy bylo na základě klinických projevů. Nemoc proto byla rozpoznána až ve značně pokročilém stupni vývoje, a takové stanovení ne vždy bylo zcela vypovídající a přesné (Hilton et al., 1998).

Dnes se provádí neuropatologické analýzy a imunochemické detekce PrP^{Sc} ve tkáních CNS. V současné době se k detekci proteinů způsobujících prionová onemocnění nejčastěji využívají vyšetření jako western blot, ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a imunohistochemie (Federspil et al., 2002). PrP^{Sc} je snadno detekován metodami Western blot nebo imunohistochemie po odstranění buněčné isoformy (PrP^C). To se většinou provádí předběžným zpracováním vzorků pomocí proteáz (obvykle proteinázou K), které v malé míře štěpí PrP^{Sc}, ale zcela odstraňují PrP^C. Použití proteinázy K však odstraňuje frakce špatně agregovaného nesprávně přeloženého PrP^{Sc}, který je obvykle přítomen v krvi a pravděpodobně v dalších tělesných tekutinách a snižují tak možnost detekce (Properzi and Pocchiari, 2013).

Další metodou je naočkování hlodavců v laboratořích předpokládaným infekčním materiálem (Deslys et al., 2001).

V posledních 15 letech bylo vyvinuto několik metod pro zvýšení citlivosti detekce PrP^{Sc} s cílem najít spolehlivý test pro včasnou diagnostiku prionových onemocnění ve snadno dostupných tkáních nebo tělních tekutinách. Mezi tyto metody patří cyklická amplifikace prionového proteinu (PMCA = protein misfolding cyclic amplification). Tato metoda je založena na principu, že disagregovaný PrP^{Sc} inkubovaný v přítomnosti velkého přebytku PrP^C produkuje nový PrP^{Sc}. Postup PMCA je patrný na obrázku číslo 2 (Properzi and Pocchiari, 2013)



Obrázek 2: Schéma PMCA (upraveno dle Watts et al. 2006)

U lidí se ve výjimečných případech přistupuje i k biopsii mozku, aby mohla být stanovena přesná diagnóza. Avšak tento způsob je používán ve velmi omezené míře, protože je spojen s vysokou morbiditou a může mít falešně negativní výsledky, pokud je vzorek odebrán z té části mozku, kde se PrP^{Sc} nevyskytuje vůbec nebo v mizivém množství. Navíc odběr takové tkáně představuje bezpečnostní rizika v operačních místnostech a následná sterilizace použitých nástrojů je složitá. Bylo prokázáno, že CJD je přenosné skrze chirurgické nástroje, transfuzi krve nebo při transplantaci rohovky (Federspil et al., 2002).

Jako pomocné metody při stanovení onemocnění se v případech TSE mohou použít vyšetření jako EEG, tonzilární biopsie (odběr tkáně z mandlí) vyšetření likvoru (mozkomíšního moku) a magnetická rezonance (MR) (Mareš et al., 2003).

Vyšetření EEG není vždy zcela průkazné. U některých encefalopatií byly pozorovány při EEG charakteristické změny. U CJD, se ale vyskytovaly přibližně jen u 2/3 pacientů (Federspil et al., 2002).

Vyšetření likvoru se provádí, protože bylo zjištěno, že ničení nervových buněk a astrocytů vede ke zvýšení hladiny určitých proteinů v mozkomíšním moku. Příkladem je neuron-specifická enoláza, S100-protein a protein Tau, a to jako náhradní markery, které jsou ukazatelem rychlé destrukce neuronů. Nejdůležitější je v současné době stanovení proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku, i když zcela nepoukazuje na prionové onemocnění. Proto se využívá pouze společně s klinickými projevy, EEG a MR. Toto vyšetření je možné provádět během života nakaženého jedince, ale stále je pouze ve vývoji (Federspil et al., 2002).

Teorie o tom, že infekční priony se vyskytují i v krvi a jsou infekce schopné, byla prokázána na základě studií například u CWD a CJD. V případě CJD to bylo zjištěno pomocí vývoje onemocnění u pacientů, jež byly příjemci krevní transfúze nebo plazmy. Dárci však nevykazovali žádné příznaky nemoci. Vyšetření krve na prionová onemocnění však dodnes nebylo prokazatelně spolehlivé (Properzi and Pocchiari, 2013).

3.4 Prevence a léčba

U ovcí lze zabránit šíření scrapie i chovem těch zvířat, jež vůči ní vykazují odolnost. Jedná se o jedince polymorfni v kodonech 136, 154 a 171 genu PRPN (McCutcheon et al., 2005).

Vakcinace proti jakékoli spongiformní encefalopatii není prozatím možná, protože tělo vůči infekčním prionům netvoří žádné protilátky (Kaslow et al., 2014).

Proti prionovým onemocněním dosud není známa žádná dostatečně účinná léčba (Gelpi and Budka, 2016).

Léčba TSE prozatím není známa, ale probíhají různé studie zabývající se touto problematikou. Nadějně jsou ty, jež ukazují jistou možnost léčby za pomoci malých molekul, které dokáží ustálit α -strukturu prionového proteinu tak, aby nedocházelo k přeměně na strukturu skládaného listu (Mareš et al., 2003, Rusina and Matěj, 2012).

3.4.1 Preventivní opatření na území ČR

Mezi preventivní opatření platných na území našeho státu patří zákaz zkrmování masokostní moučky (MBM), odstraňování specifikovaného rizikového materiálu (SRM) a monitoring – povinné vyšetřování skotu.

Od 1. listopadu 2003 u nás platí plošný zákaz zkrmování MBM u všech hospodářských zvířat.

Odstraňování SRM, za který je považována u skotu lebka včetně mozku, očí a míchy zvířat starších 12 měsíců, u ovcí a koz lebka včetně mozku a očí, mandle a mícha zvířat starších 12 měsíců nebo u zvířat s prořezanými trvalými řezáky, dále pak slezina a ileum zvířat všech věkových kategorií. Toto platí pro zvířata, která pochází ze zemí se zanedbatelným výskytem BSE. Od roku 2000 se v ČR odstraňuje SRM, a to na jatkách či bourárnách masa. SRM je poté zpracováno v asanačních podnicích, výsledkem je MBM a kafilerní tuk, jež se společně spaluje.

Povinné vyšetřování je u nás již od roku 2001 a provádí se dodnes. Odvíjí se od současné zlepšující se nálezové situace. Dnes probíhá na základě schématu:

I. BSE – skot

Povinné vyšetřování se týká zdravého skotu staršího 30 měsíců původem z Bulharska, Rumunska nebo třetích zemí, přeřazeného a nutně poraženého skotu staršího 2 let, uhynulého nebo utraceného skotu staršího 2 let a bez rozdílu věku u zvířat, u nichž je podezření z nakažení BSE.

II. Scrapie – ovce a kozy

Povinně se vyšetřují uhynulé a utracené kusy, které byly ve věku více než 18 měsíců a ovce a kozy bez rozdílu věku, u kterých je podezření, že jsou nakažené klusavkou.

Přesný počet zvířat vyšetřených na TSE v letech 2011 až 2017 je vypsán v tabulce č. 1

(SVS ČR, 2018)

Rok	skot	pozitivní případy BSE	ovce	pozitivní případy TSE u ovcí	kozy	pozitivní případy TSE u koz
2001	114 146	2				
2002	175 435	2	1 155	16	102	0
2003	210 456	4	2 970	12	274	0
2004	200 873	7	1 063	9	86	0
2005	170 857	8	447	1	216	0
2006	174 470	3	1 097	0	113	0
2007	160 420	2	2 839	1*	163	0
2008	157 270	0	994	16	328	0
2009	156 472	2	582	0	172	0
2010	146 455	0	726	0	150	0
2011	97 848	0	744	0	118	0
2012	54 794	0	1 527	0	240	0
2013	36 057	0	1 536	0	182	0
2014	18 293	0	1 579	1*	131	0
2015	20 095	0	2 811	3*	327	0
2016	15 516	0	2 874	2*	416	0
2017	20 158	0	3 375	1*	546	0
Celkem	1 929 615	30	26 319	62	3 564	0

Tabulka 1: Přehled vyšetření TSE u zvířat v ČR od r. 2001 do r. 2017, převzato z SVS 2018

* atypická forma klusavky

4. Závěr

Odhalování infekčních prionů, v posledních 15 letech prošlo intenzivním výzkumem. Došlo k významnému posunu a byly vyvinuty metody, které dokáží detekovat infekční priony i v nižších koncentracích než doposud. Takovou metodou je například PMCA. Dle mého názoru se jedná o zlomový objev, protože PMCA je schopna odhalit prionový protein i ve velmi nízkých koncentracích. Díky tomu byly zjištěny priony mimo tkáň CNS i lymforetikulárního systému, a dokonce v případech některých chorob v tělních tekutinách a exkrementech. Navíc, pokud dojde ke zdokonalení diagnostických metod, nebude jedním z nejspolehlivějších postupů posmrtné vyšetření mozkové tkáně.

Zkoumán byl i princip přenosu prionů. Závěrem bylo, že priony jsou velmi odolné částice, které zůstaly ve vnějším prostředí infekce schopné po dlouhou dobu. V posledních letech byl zaznamenán pokles výskytu prionových chorob. Pokles byl způsoben zavedením preventivních opatření, jež zahrnovala převážně zákaz zkrmování masokostní moučky, která byla považována za hlavní příčinu šíření prionových nemocí i mezi druhy. Přenos na člověka byl prokázán u BSE a předpokládaná prevalence byla vyšší, než je momentální skutečný výskyt. Proto stále neodezněly obavy z prionových nemocí.

Mezidruhový přenos mezi zvířaty byl prokázán jak v laboratorních podmínkách, tak přirozeně mezi zvířaty chovanými v lidské péči i volně žijícími. BSE je prokazatelně schopna překročit bariéru mezi druhy, a to i přirozeným způsobem přenosu. Nejvíce obav vyvolává stále to, že neexistuje léčba proti prionovým onemocněním či vakcinace, která by zabránila vývoji nemoci.

Použitá literatura

- Abdelraheim, S. R., Královicová, S. and Brown, D. R. (2006). Hydrogen peroxide cleavage of the prion protein generates a fragment able to initiate polymerisation of full length prion protein. *The international journal of biochemistry and cell biology*. 38 (8): 1429–1440.
- Aguilar-Calvoa, P., Garcíaa, C., Espinosaa, J. C., Andreolettib, O., Torres, J. M. (2015). Prion and prion-like diseases in animals. *Virus Research*. 207: 82–93.
- Baron, T., Bencsik, A., Biacabe, A. G., Morignat, E., Bessen, R. A. (2007). Phenotypic similarity of transmissible mink encephalopathy in cattle and L-type Bovine spongiform encephalopathy in a mouse model. *Emerg. Infect. Dis.* 13 (12): 1–11.
- Barria M. A., Telling G. C., Gambetti P., Mastrianni J. A., Soto C. (2011). Generation of a New Form of Human PrPSc in Vitro by Interspecies Transmission from Cervid Prions. *The Journal of biological chemistry*. 286 (9): 7490–7495.
- Belay, E. D. and Schonberger, L. B. (2005). The Public health impact of Prion diseases. *Annual Review of Public Health*. 26: 191–212.
- Bencsik, A., Debeer, S., Petit, T., Baron, T. (2009), Possible Case of Maternal Transmission of Feline Spongiform Encephalopathy in a Captive Cheetah. *Plos One*. 4. (9): 1–7.
- Benestad, S. L., Arsaac, J. N., Goldmann, W., Nöremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet. Res.*, 39 (4): 1–14.
- Bourne, D. C. (2015). Chronic wasting disease of cervids. *Small Ruminant Research*. 128 (1): 72–78.
- Brown, D. R. (2001) Copper and prion disease. *Brain Res. Bull.* 55 (2): 165-173.
- Bunk, S. (2004). Chronic Wasting Disease - Prion Disease in the Wild. *PLoS Biology*. 2 (4): 427–430.
- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 519–550.
- Collinge, J. (2005). Molecular neurology of prion disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 76 (7): 906–919.

- Cousens, S. N., Harriesjones, R., Knight, R., Will, R. G., Smith, P. G., Matthews, W. B. (1990). Geographical-distribution of cases of creutzfeldt-jakob disease in england and wales 1970-84. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 53 (6): 459–465.
- Cunningham A. A., Kirkwood J. K., Dawson M., Spencer Y. I., Green R. B., Wells G. A. H. (2004). Distribution of Bovine Spongiform Encephalopathy in Greater Kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Emerging Infectious Diseases*. 10 (6): 1044–1049.
- Dawson, M., Moore, R. C., Bishop, S. C. (2008). Progress and limits of PrP gene selection policy. *Vet. Res.*, 2008. 39 (4): 1–12.
- Deslys, J.-P., Lasmezas, C.I., Comoy, E., Domont, D. (2001). Diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. J.* 161: 1–3.
- Dodelet, V. C., Cashman, N. R. (1998). Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood*, 91 (5): 1556–1561.
- Dormont, D. (2002). Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Lett.* 529: 17–21.
- Ducrot, C., Arnold, M., D Koeijer, A., Heim, D., Calavas, D. (2008). Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. *Vet. Res.* 39 (4): 1–18.
- Dulberger, J., Hobbs N. T., Swanson H. M., Bishop Ch. J., Miller M. W. (2010). Estimating Chronic wasting disease effects on mule deer recruitment and population growth. *Journal of Wildlife Diseases*. 46(4): 1086–1095.
- Eiden, M., Hoffmann, C., Balkema-Buschmann, A., Müller, M., Baumgartner, K., Groschup, M. H. (2010). Biochemical and immunohistochemical characterization of feline spongiform encephalopathy in a German captive cheetah. *J. Gen. Virol.* 91: 2874–2883.
- Espinosa, P. S., Bensalem-Owen, M.K., Fee, D. B. (2010). Sporadic Creutzfeldt–Jakob disease presenting as nonconvulsive status epilepticus case report and review of the literature. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 112 (6): 537–540.
- Federspil P. A., Federspil P., Plinkert P. K. (2002). Diagnostik der Prionkrankheiten. *HNO*. 50 (4): 327–331.
- Ferenčík, M., Rovenský, J., Shoenfeld, Y., Mařha. (2005). Imunitní systém – informace pro každého. Praha: Grada Publishing., 1. vyd., 236 s.

- Ganter, M. (2015). Zoonotic risks from small ruminants. *Veterinary Microbiology*. 181: 53–65.
- Gelpi, E. and Budka, H. (2016). *International Neurology*. John Wiley & Sons, Inc. Chichester. 2. vyd., s. 296–299.
- Goldmann, W. (2008). PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet. Res.* 39. (4): 1–14.
- Greenlee, J.J. and Greenlee, M.H. (2015). The Transmissible Spongiform Encephalopathies of Livestock. *ILAR Journal*. 56 (1): 7–25.
- Gruffydd-Jones, T. J., Galloway, P. E., Pearson, G. R. (1991). Feline spongiform encephalopathy. *Journal of Small Animal Practice*. 33 (10): 471–476.
- Hannaoui, S., Schatzl H. M., Gilch S. (2017). Chronic wasting disease: Emerging prions and their potential risk. *PLoS Pathog.* 13 (11): 1–5.
- Harris, D. A. (1999). Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (3): 429–444.
- Harris, D. A. (2003) Trafficking, turnover and membrane topology of PrP Protein function in prion disease. *British medical bulletin*. 66 (1): 71–85.
- Healy, A.M., Hanlon, A.J., Weavers, E., Collins, J.D., Doherty, M.L. (2002). A behavioural study of scrapie-affected sheep. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 79: 89–102.
- Hilton, D.A., Fathers, E., Edwards, P., Ironside, J.W., Zajicek, J. (1998). Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*. 352: 703–704
- Hunter, N. (2003). Scrapie and experimental BSE in sheep. *British Medical Bulletin*. 66: 171–183.
- Chazot, G., Broussolle, E., Lapras, C., Blättler, T., Aguzzi, A., Kopp, N. (1996). New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet*. 347 (9009): 1181–1181.
- Imran M., Mahmood, S. (2011). An overview of animal prion diseases. *Virology Journal*. 8: 1–8.
- Jeffrey, M., González, L. (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 33 (4): 373–394.

- Ji, H. F., Zhang, H. Y. (2010). beta-sheet constitution of prion proteins. *Trends Biochem.Sci.* 35 (3): 129–134.
- Johnson, R. T. (2005). Prion diseases. *The Lancet Neurology.* 4 (10): 635–642.
- Kaslow, R. A., Stanberry, L. R. and Le Duc, J. W. (2014). *Viral infections of humans: epidemiology and control.* Springer. New York. 1187 s.
- Klaban, V. (2005). *Ilustrovaný mikrobiologický slovník.* Galén. Praha. s. 654.
- Kostka, F. and Vávra F. (2002). Možnosti intravitální diagnostiky scrapie imunohistochemickým vyšetřením lymfatických tkání. *Veterinářství.* 52: 401–402.
- Kübler, E., Oesch, B. and Raeber, A. J. (2003) Diagnosis of prion diseases. *British medical bulletin.* 66 (1): 267–279.
- Lee, J., Kim S. Y., Hwang K. J., Ju Y. R., Woo H-J. (2013). Prion Diseases as Transmissible Zoonotic Diseases. *Osong Public Health and Research Perspectives.* 4 (1): 57–66.
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O. B., Riesner, D., Cohen, F. E.; Dearmond, S. J., Prusiner, S. B. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science.* 305 (5684): 673-676
- Mange, A., Beranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y., Lehmann, S. (2004). Alpha- and beta-cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biology of the Cell.* 96 (2): 152–132.
- Mareš, J., Urbánek, K., Veselý, J., Herzig, R., Křupka, B. (2003). *Neurologie 2003 – Trendy v medicíně.* Nakladatelství Triton, Praha. 1. vydání, 386 s.
- Marsh, R. F., Hadlow, W. J. (1992). Transmissible mink encephalopathy. *Rev sci. tech.* 11 (2): 539–550.
- Mathiason C. K., Powers J. G., Dahmes S. J., Osborn D. A., Miller K. V., Warren R. J., Mason G. L., Hays S. A., Hayes-Klug J., Seelig D. M., Wild M. A., Wolfe L. L., Spraker T. R., Miller M. W., Sigurdson Ch. J., Telling G. C., Hoover E. A. (2006). Infectious Prions in the Saliva and Blood of Deer with Chronic Wasting Disease. *Science.* 314 (6): 133–136.
- MaWhinney S., Pape W. J., Forster J. E., C. Alan Anderson C. A., Patrick Bosque P., Miller M. W. (2006). Human Prion Disease and Relative Risk Associated with Chronic Wasting Disease. *Emerging Infectious Diseases.* 12 (10): 1527–1535.

- McCutcheon, S., Hunter, N., Houston, F. (2005). Use of a new immunoassay to measure PrP^{Sc} levels in scrapie-infected sheep brains reveals PrP genotype-specific differences. *J. Immunol. Methods* 298: 119–128.
- McKintosh E., Tabrizi S. J., Collinge J. (2003). Prion diseases. *Journal of NeuroVirology*. 9: 183–193.
- Milhavet, O. and Lehmann, S. (2002). Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain research reviews*. 38 (3), 328–339.
- Moser M., Colello, R. J., Pott, U. and Oesch, B. (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron*. 14 (3): 509–517.
- Motarjemi, Y. and Adams, M. (2006). *Emerging foodborne pathogens*. Woodhead Publishing. 3–614.
- Nair R. R. and Johnson J. K. (2011). Prions and neuro degenerative diseases. *African Journal of Biotechnology*. 10 (13): 2366–2374.
- Novakofski, J., Brewer, M. S., Mateus-Pinilla, N., Killefer, J., McCusker, R. H. (2005). Prion biology relevant to bovine spongiform encephalopathy. *J. Anim. Sci.* 83 (6): 1455–1476.
- O'Rourke, K. I., Zhuang, D. Y., Truscott, T. C., Yan, H. J., Schneider, D. A. (2011). Sparse PrP^{Sc} accumulation in the placentas of goats with naturally acquired scrapie. *BMC Veterinary Research*. 7 (7): 1–9.
- Parchi, P. and Gambetti, P. (1995). Human prion diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 8: 286–293.
- Porter, M. C. and Leemans, M. (2013) Creutzfeldt–Jakob disease. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. 13 (4): 119–124.
- Potapov A., Merrill E., Pybus M., Lewis M. A. (2016). Chronic Wasting Disease: Transmission Mechanisms and the Possibility of Harvest Management. *PLoS ONE* 11(3): 1–20.
- Properzi F. and Pocchiari M. (2013). Identification of Misfolded Proteins in Body Fluids for the Diagnosis of Prion Diseases. *Journal of Cell Biology*. 2013(25): 1–10.
- Prusiner, S.B. (1997). Prion Disease and the BSE Crisis. *Science*. 278 (5336): 245–251.
- Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 13363–13383.
- Rusina, R. and Matěj, R. (2012). Prionová onemocnění. *Neurologie pro praxi*. 13(2): 78–82.

- Sigurdson, C. J. and Miller, M. W. (2003). Other animal prion diseases. *British Medical Bulletin*. 66 (1): 199–212.
- Smith, P.G. and Bradley R. (2003). Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology. *British Medical Bulletin*. 66 (1):185–198.
- Sweeney, T. et Hanrahan, J. P. (2008). The evidence of associations between prion protein genotype and production, reproduction, and health traits in sheep. *Vet. Res.* 39 (4): 1–13.
- Tkáčiková L., Hreško S. (2008) Genotypization of the prp gene of the ruminants. *Journal of Agrobiology*. 25(1): 109-111.
- Taylor, D. R. and Hooper, N. M. (2006) The prion protein and lipid rafts. *Molecular membrane biology*. 23 (1): 89–99.
- Vaccari, G., Panagiotidis, C. H., ACIN, C., Peletto, S., Barillet, F., Acutis, P., Bossers, A., Langeveld, J., van Keulen, L., Sklaviadis, T., Badiola, J. J., Andreoletti, O., Groschup, M. H., Agrimi, U., Foster, J., Goldmann, W. (2009). State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology. *Vet. Res.* 40 (5): 1–12.
- van Keulen, L. J. M., Bossers, A., van Zijderveld, F. (2008). TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet. Res.* 39 (4): 1–11.
- Vogel, G. Prusiner recognized for once – heretical prion theory. *Science*. 1997, 278 (5336): 214.
- Vulin, J., Biacabe, A.G., Cazeau, G., Calavas, D., Baron, T. (2011). Molecular Typing of Protease-Resistant Prion Protein in Transmissible Spongiform Encephalopathies of Small Ruminants, France, 2002-2009. *Emerging Infectious Diseases*. 17 (1): 55–63.
- Wadsworth, J. D. F. and Collinge, J. (2007). Update on human prion disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1772 (6): 598–609.
- Watt, N.T. and Hooper, N.M. (2003). The prion protein and neuronal zinc homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* 28: 406–410.
- Watts, J.C., Balachandran, A., Westaway, D. (2006). The expanding universe of prion diseases. *Plos Pathog.* 2: 152–161.

- Wickner, R.B., Taylor, K.L., Edskes, H.K., Maddelein, M.-L., Moriyama, H., Roberts, B.T. (1999). Prions in *Saccharomyces* and *Podospora* spp.: Protein-based inheritance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 844–861.
- Yokoyama, T., Masujin, K., Schmerr, M.J., Shu, Y., Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Matsuura, Y., Murayama, Y., Mohri, S. (2010). Intraspecies Prion Transmission Results in Selection of Sheep Scrapie Strains. *Plos One*. 5. (11): 1–10.
- Yuan, J., Kinter, M., Mc0Geehan, J., Perry, G., Kneale, G., Gambetti, P., Zou, W-Q. (2005). Concealment of epitope by reduction and alkylation in prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326: 652–659.

Internetové zdroje

- Pejchal, P. Česká republika získala status země se zanedbatelným rizikem výskytu BSE [online]. SVS. 29. května. 2015 [cit. 2018-03-30]. Dostupné z <https://www.svscr.cz/ceska_republika_ziskala_status_zeme_se/>.
- Státní veterinární správa České republiky. BSE (bovinní spongiformní encefalopatie) – neboli nemoc šílených krav [online]. SVS. 1. ledna. 2018 [cit. 2018-03-30]. Dostupné z <<https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/tse-bse-klusavka-scrapie-cwd/>>.

Seznam zkratek

BSE	Bovinní spongiformní encefalopatie
CJD	Creutzfeldt – Jacobova nemoc
CNS	Centrální nervová soustava
CWD	Chronické chřadnutí jelenovitých
Da	Dalton – atomová (molekulová) hmotnostní jednotka
EEG	Elektroencefalogram
ELISA	Enzymoimunoanalýza
ER	Endoplazmatické retikulum
EUE	Encefalopatie exotických kopytníků
FSE	Felinní spongiformní encefalopatie
GA	Golgiho aparát
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
MBM	Masokostní moučka
MR	Magnetická rezonance
OIE	Světová organizace pro zdraví zvířat
PMCA	Cyklická amplifikace prionového proteinu
PrP ^C	Přirozený prionový protein
PRPN	gen pro prionový protein
PrP ^{Sc}	Infekční prionový protein
SRM	Specifikovaný rizikový materiál
TME	Spongiformní encefalopatie norků
TSE	Přenosné spongiformní encefalopatie
USA	Spojené státy americké