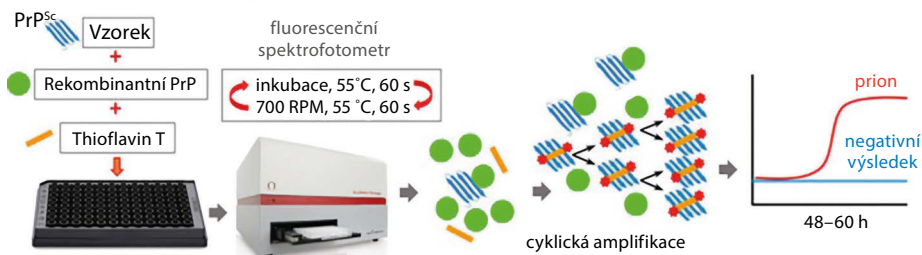


HLAVNÍ TÉMA

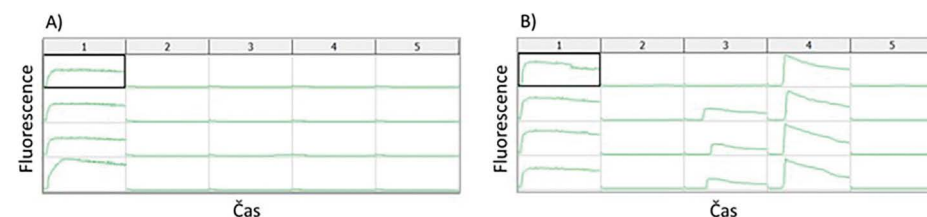
POKROK V INTRAVITÁLNÍ LABORATORNÍ DIAGNOSTICE PRIONOVÝCH ONEMOCNĚNÍ: VYSOCE CITLIVÁ A SPECIFICKÁ DETEKCE PRIONŮ V MOZKOMÍŠNÍM MOKU POMOCÍ RT-QUIC

Obr. 2. Princip vyšetření mozkomíšního moku pomocí RT-QuIC na přítomnost prionů



Malé množství vzorku moku pacienta získaného lumbální punkcí se přidá k reakční směsi obsahující rekombinantní prionový protein (PrP) a fluorescenční indikátor Thioflavin T. Destička s napipetovanými vzorky se inkubuje ve fluorescenčním spektrofotometru za pravidelného střídání inkubační fáze a fáze intenzivního třepání. Ve vzorku přítomný patologický prionový protein (PrP^{Sc}) mění konformaci rekombinantního PrP a vznikající agregáty PrP váží Thioflavin T, který po navázání produkuje fluorescenci. Třepání rozlamuje vznikající agregáty za vzniku nových agregačních center a dochází tak k amplifikaci signálu.

Obr. 3. Záznam RT-QuIC vyšetření mozkomíšního moku pacientů na přítomnost prion konvertující aktivity



Negativní výsledek (A), pozitivní výsledek (B). Vzorky jsou vyšetřovány v kvadruplikátu (sloupce). 1 – pozitivní kontrola (mozkový homogenát pacienta se sporadickou CJN, typ MM1), 2 – negativní kontrola (pufr), 3 – mok pacienta (10x ředění), 4 – mok pacienta (neředěný), 5 – negativní kontrola (pufr). Reakce probíhala po dobu 60 hodin za teploty 55 °C, střídání 60 s inkubace v klidu s 60 s intenzivního třepání (700 RPM). Pacient B) je pozitivní ve 3 ze 4 jamek u 10x ředěného likvoru a ve 4 ze 4 jamek u likvoru neředěného.

specifita RT-QuIC je zajištěna nutností vysoké podobnosti aminokyselinové sekvence rekombinantního substrátu s priony přítomnými ve tkáních pacientů. Agregáty jiných amyloid tvořících proteinů (tau, alfa synuklein atd.) změnu tvaru rekombinantního prionového proteinu neindukují. Tyto vlastnosti umožňují detekci prionů v mozkomíšním moku a dalších tkáních pacientů za jejich života, krátce po objevení příznaků onemocnění. V případě využití mozkomíšního moku či stěru čichové sliznice se dosahuje často více než 95% senzitivity a téměř 100% specifity. Vznikající agregovaný rekombinantní protein navíc není infekční a tak se snižuje i riziko profesionální nákazy pracovníků v laboratoři. Výjimečné vlastnosti RT-QuIC vedly k jeho nedávnému zařazení do nových WHO diagnostických kritérií pro sporadickou CJN (Jankovská, 2021). K diagnóze pravděpodobné CJN tak nově stačí přítomnost neuropsychiatrického onemocnění a pozitivní RT-QuIC.

Dostupnost prionového RT-QuIC v České republice

Vyšetření RT-QuIC není v současné době dostupné komerčně, ale pouze v rámci probíhající výzkumné studie na našem pracovišti.

Naše laboratoř ve spolupráci s Národní referenční laboratoří lidských prionových onemocnění a skupinou Jiřího Šafaře (Western Case Reserve University, Cleveland, Ohio) zavedla do praxe druhou generaci prionového RT-QuIC testu. Pomocí archivních vzorků mozkomíšního moku a mozkové tkáně jsme ověřili schopnost zavedené metody detekovat všechny typy prionových onemocnění, které se vyskytují v České republice (Moško, 2021). V pilotní studii jsme navíc zjistili, že priony lze detekovat i v kůži většiny zemřelých CJN pacientů (Baranová, 2023). Aktuálně probíhá otevřená prospektivní studie, ve které ve spolupráci s klinickými neurologickými pracovišti ověřujeme diagnostickou spolehlivost metody RT-QuIC u žijících pacientů s podezřením na prionové onemocnění. Studie je otevřena pro všechny neurologické kliniky. V případě podezření na prionové onemocnění je standardně indikována diagnostická lumbální punkce pro stanovení přítomnosti proteinu 14-3-3 eventuálně dalších markerů, jako je tau protein. Při zájmu o provedení RT-QuIC vyšetření na priony je možné po získání informovaného souhlasu zaslat malý alikvot (0,5–1 ml) odebraného likvoru na naše pracoviště. Podrobnosti k transportu lze získat

mailem od autora tohoto článku. Případně lze kontaktovat pracovníky NRL, kteří z alikvotu mozkomíšního moku určeného pro analýzu proteinu 14-3-3 zajistí dopravu vzorku do prionové laboratoře. Likvor nesmí mít příměs krve, proto není vhodné použít jeho první podíl, což je ale stejné pravidlo, které platí pro vyšetřování přítomnosti proteinu 14-3-3. Mozkomíšní mok se do transportu uchovává v lednici a transport probíhá za chladu. V případě nutnosti je možné mok zmrazit a uchovávat zmrazený. Vzorky se vyšetřují v kvadruplikátu, a to jak neředěné, tak 10x ředěné, aby se eliminoval vliv případných inhibitorů RT-QuIC reakce. Za pozitivní se považuje vzorek, který dá pozitivní reakci minimálně ve 2 jamkách ze 4. Z doposud vyšetřených 52 vzorků mozkomíšního moku bylo 16 RT-QuIC pozitivních. Z těchto 16 pacientů již bylo 10 neuropatologicky verifikováno a ve všech případech byla přítomnost prionového onemocnění neuropatologicky potvrzena. Příklady záznamu pozitivního a negativního RT-QuIC testu jsou na obrázku 3. Bohužel většina RT-QuIC negativních případů nebyla následně nekropticky verifikována, tudíž v naší prospektivně vyšetřené kohortě nejsme schopni určit přesnou senzitivitu a specifitu s ohledem na potenciální falešně negativní případy. Určitě by bylo vhodné všechny případy vyšetřené RT-QuIC následně neuropatologicky analyzovat. Výsledky prospektivní studie by měly posloužit jako podklad pro jednání se zdravotními pojišťovnami a ministerstvem pro získání úhrady vyšetření.

RT-QuIC – budoucnost laboratorní diagnostiky neurodegenerativních proteinopatií?

Metoda RT-QuIC představuje naději pro výrazné zrychlení pravděpodobné diagnózy prionového onemocnění, a tím otevírá možnost pro budoucí aplikaci v současnosti vyvíjených terapeutických postupů. Nicméně již nyní může včasná diagnóza prionového onemocnění omezit počet nadbytečných vyšetření a umožnit rychlé nasazení paliativní péče. To ve svém důsledku zvyšuje kvalitu života pacienta i jeho blízkých a vede k úspoře nákladů na zdravotní péči. Sledování přítomnosti prion konvertující aktivity u bezpřízna-