

RIZIKO HORIZONTÁLNEHO ŠÍRENIA CREUTZFELDTOVEJ-JAKOBOVEJ CHOROBY Z POHLÁDU NOVŠÍCH POZNATKOV

MUDr. Eva Mitrová, DrSc., RNDr. Ladislava Wsólóvá, MUDr. Alžbeta Janáková

Oddelenie pre prionové choroby, Vedeckovýskumná báza Slovenskej zdravotníckej univerzity Bratislava

Creutzfeldtovu-Jakobovu chorobu (CJch) na Slovensku dlhodobo charakterizuje nízky priemerný ročný výskyt sporadickej formy (sCJch) (0,57/1 mil. obyv.) a veľmi vysoký (0,83/1 mil. obyv.) nález genetickej formy s mutáciou E200K (gCJchE200K). V rokoch 2001–2005 bol zistený signifikantný ($p = 0,034$) nárast sporadických prípadov. Pri hľadaní jeho príčiny a zameraní na možný výskyt neidentifikovanej iatrogennej formy (iCJch) v súbore sCJch, práca porovnáva počet operácií v súboroch gCJchE200K a sCJch, diagnostikovaných pred a počas zvýšenej incidencie sporadickej formy. Počet operácií je hodnotený vo dvoch intervaloch: menej ako 15 rokov a viac ako 15 rokov pred manifestáciou CJch. V intervale možnej iatrogénnej nákazy (viac ako 15 rokov) porovnanie dokumentuje v súbore sCJch signifikantne vyšší: 1. celkový počet operácií ($p = 0,010$), 2. počet pacientov, ktorí mali 2 a viac operácií ($p = 0,036$) a 3. výskyt ortopedických výkonov a operácií miechy, ktoré sa v súbore gCJchE200K nevyskytli. Výsledky nedokazujú prítomnosť iCJch v súbore sCJch, ale signalizujú zvýšené exogénne riziko nákazy a upriamujú pozornosť na nutnosť aktualizovať pravidlá bezpečnosti pri práci a prevencie proti CJch v súlade s najnovšími poznatkami.

Kľúčové slová: Creutzfeldtova-Jakobova choroba, iatrogénna forma, operácie.

Neurol. pro praxi, 2007; 3: 155–158

Zoznam skratiek

CJch – Creutzfeldtova-Jakobova choroba
gCJch – Creutzfeldtova-Jakobova choroba – genetická forma
gCJchE200K – gCJch s mutáciou prionového génu E200K
iCJch – Creutzfeldtova-Jakobova choroba – iatrogénna forma
sCJch – Creutzfeldtova-Jakobova choroba – sporadická forma
vCJch – nový variant CJch
CNS – centrálna nervová sústava
DNA – desoxiribonukleová kyselina
E200K – mutácia prionového génu na kodóne 200
EÚ – Európska únia
Im – intramuskulárne
Iv – intravenózne
Ipt – intraperitoneálne
M129V – polymorfizmus prionového génu na kodóne 129
MM – metionínová homozygotita
MV – heterozygotita metionín/valín
PCR – polymerázová reťazová reakcia
Pch – prionová choroba
PRNP – ľudský prionový gén
SAF – fibrily asociované so scrapie
Sc – subkutánne
SZO – Svetová zdravotnícka organizácia

Úvod

Creutzfeldtova-Jakobova choroba (CJch) je v celosvetovom meradle najrozšírenejšia a najvýznamnejšia humánna prionová choroba (Pch). V jej patogenéze má významnú úlohu premena bunkového prionového proteínu na patologickú izoformu, ku

ktorej dochádza buď v dôsledku mutácie prionového génu – PRNP (genetická forma – gCJch), po exogénnej nákaze patologickou izoformou (iatrogénna forma – iCJch), alebo zatiaľ neobjasneným mechanizmom (sporadická forma – sCJch).

V roku 1993 zahájila EÚ spoločný program surveillance CJch. K pôvodným ôsmym štátom, medzi ktorými bolo aj Slovensko, neskôr pribudli nielen ďalšie štáty Európy, ale aj Austrália, Kanada a USA. Spoločný postup umožnil získať štatisticky hodnotiteľné súbory u zriedkavého ochorenia. Výsledkom boli prvé, systematicky a porovnateľným spôsobom získané údaje o výskyte CJch a jeho foriem. K nim patrí analýza 542 sCJch a gCJch zo 6 štátov z rokov 1993–1995, ktorou sa stanovil výskyt sCJch 0,69/1 mil. obyv. O štyri roky neskôr, v súbore pacientov diagnostikovaných v 15 štátoch v rokoch 1999–2002 (3 720 sCJch, 455 gCJch a 138 iCJch) sa zistilo, že priemerný ročný výskyt sporadickej formy je 1,39/1 mil. obyvateľov a všetkých troch foriem 1,67/1 mil. obyv. (9). Porovnané údaje signalizovali nielen zlepšenie diagnostiku, ale aj stúpajúci výskyt CJch, predovšetkým sporadickej formy.

Slovensko, kde sa povinné hlásenie CJch datuje už od r. 1983, na rozdiel od ostatných štátov zapojených do programu EUROCD, charakterizuje unikátny, až 69 % podiel genetickej formy s mutáciou E200K (gCJch^{E200K}). Priemerný výskyt sporadickej formy nepresahoval 31 % (12). Nápadná zmena bola pozorovaná od r. 2001, keď došlo ku štatisticky významnému nárastu sCJch na 36 %. Výskyt iatrogénnej formy sa v SR dosiaľ nepotvrdil.

Cieľom pilotnej štúdie je prispieť k riešeniu otázky, či môžu byť chirurgické úkony rizikovým

faktorom CJch a vylúčiť / podporiť predpoklad, že sa na náhlo, signifikantnom náraste sporadických pacientov podieľajú aj nerozpoznané iatrogénne prípady CJch.

Vyšetrované súbory

- Súbory CJch: 181 pacientov s definitívnou CJch, diagnostikovaných v rokoch 1975–2005, (118 gCJch^{E200K} a 63 sCJch). Porovnávaný bol počet chirurgických úkonov u pacientov diagnostikovaných po roku 2001 (20 sCJch a 20 gCJch^{E200K}) s výskytom operácií u pacientov z rokov 1975–2000. Hodnotil sa celkový počet operácií vykonaných menej ako 15 rokov viac ako 15 rokov pred manifestáciou CJch, početnosť operácií u jedného pacienta a chirurgické úkony na jednotlivých orgánoch (tabuľka 1–3).
- Kontrolný súbor 1:20 neurologických pacientov s diagnózou inou ako CJch, vek a pohlavie ako u 20 postihnutých sCJch, diagnostikovaných od r. 2001, analyzovaný výskyt operácií a chirurgicky ošetrených úrazov.
- Kontrolný súbor 2:960 náhodne vybraných darcov rohoviek, genetické vyšetrenie PRNP na prítomnosť mutácie E200K a polymorfizmus M129V.

Metódy

1. Diagnostika CJch

- 1.1 Molekulárne biologické vyšetrovanie PRNP (izolácia DNA, amplifikovanie PCR reakciou, identifikovanie mutácií a polymorfizmov PRNP reštrikčnými enzýmami a/alebo sekvenovaním PRNP) (12).

Tabuľka 1. Porovnanie výskytu operácií v súbore sporadickej a genetickej Creutzfeldtovej-Jakobovej choroby z rokov 2001–2005

Súbor	Počet operácií do r. 1990	Počet operácií od r. 1991	Spolu
20 sCJch	20	15	35
20 gCJch	6	12	18
20 N kontrol	25	6	31

sCJch – sporadická Creutzfeldtova-Jakobova choroba

gCJch – genetická Creutzfeldtova-Jakobova choroba

N kontroly – pacienti hospitalizovaní s inou neurologickou dg. ako CJch

Tabuľka 2. Početnosť operácií vykonaných 15 a viac rokov pred manifestáciou genetickej a sporadickej Creutzfeldtovej-Jakobovej choroby

Počet operácií	Genetická CJch	Sporadická CJch	Kontrolná skupina
žiadna operácia	16	8	11
1 operácia	2	6	7
2 a viac operácií	2	6	2

Tabuľka 3. Výskyt chirurgických výkonov podľa lokalizácie u sporadickej a genetickej Creutzfeldtovej-Jakobovej choroby

Sporadická CJch	Genetická CJch		Operovaná sústava	
	% operovaných v súbore	% z celkového počtu operácií	% operovaných v súbore	% z celkového počtu operácií
Ortopedické operácie	40	23,5	0	0
Nervová sústava	15	8,8	0	0
Tráviaca sústava	26,5	30	35,3	
Urogenitál	25	14,7	5	5,9
Lymfatická sústava	15	8,8	5	5,9
Ciev	5	2,9	15	17,6
Endokrinná sústava	10	5,9	5	5,9
Nádory	5	2,9	20	23,5
Úrazy	5	2,9	5	5,9
Dýchacia sústava	5	2,9	0	0

1.2 Histopatologické vyšetrenie excízií mozgu (nešpecifická diagnostika)

1.3 Špecifické metódy CJch na dôkaz prionu v CNS (imunohistochemický dôkaz monoklonálnymi protilátkami, biochemická izolácia a dôkaz fibrilárnych štruktúr prionu (scrapie associated fibrils – SAF) elektrónovým mikroskopom (12).

2. **Epidemiologická analýza:** Sledovaná dynamika výskytu CJch a jej foriem, geografická distribúcia a vek pacientov a porovnávaný výskyt operácií a chirurgicky ošetrených úrazov (predpokladaný exogénny rizikový faktor CJch).

3. **Štatistické metódy:** Pre porovnanie vybraných ukazovateľov sCJch, gCJch^{E200K} a kontrolného súboru v hodnotených intervaloch sa použil Chí kvadrát test v kontingenčných tabuľkách v softvéri EPI INFO verzia 6.

vzrástol na 0,98/mil. obyv., pričom percento sCJch stúplo z 31 % na 36 % všetkých CJch.

1.3 **Výskyt genetickej formy CJch** (gCJch^{E200K}) prevláda v oboch porovnaných intervaloch. **Priemerný ročný výskyt gCJch^{E200K}** zaznamenal signifikantný vzostup z 0,83/mil.obyv. na 1,08/mil. obyv. (rozdiel, $p = 0,006$), ale v dôsledku nárastu sporadickej formy, percento genetikých prípadov v súbore CJch kleslo zo 69 % na 65 %.

2. **Geografická distribúcia gCJch^{E200K} a asymptomatických nosičov mutácie** sa v priebehu sledovaného obdobia zmenila. K pôvodne ohraňčeným zoskupeniam na severe a juhu stredného Slovenska, pribudli roztrúsené prípady gCJch^{E200K} na celom území štátu.

3. **Priemerný vek** pacientov stúpil z 56,07 r. (najvyšší vek 68 r.) v rokoch 1975–1990 na 58,53 r. (najvyšší vek 78 r.) v rokoch 1991–2005.

4. **Distribúcia polymorfizmu PRNP génu M129V:**

4.1 Súbor CJch:

– Homozygoti – metionín/metionín (M/M): sCJch 55 %, gCJch 78 %,

– Heterozygoti – metionín/valín (M/V): sCJch 35 %, gCJch 22 %,

– Homozygoti – valín/valín (V/V) sú len u sCJch (10 %), u gCJch sa nevyskytujú (mutácia E200K sa viaže na alelu s metionínom na kodóne 129).

4.2 Kontrolný súbor (960 osôb): 48 % M/M, 43 % M/V a 9 % V/V (13).

4.3 Referenčné hodnoty SZO (98 osôb): 38 % M/M, 51 % M/V, 12 % V/V (20).

5. Potencionálny exogénny rizikový faktor CJch:

5.1 **Chirurgické výkony v súbore sCJch a gCJch^{E200K} v rokoch 1975–2000:** Rozdiel v počte operácií (porovnanie 0,1, 2 a viac výkonov) nebol štatisticky významný ($p = 0,504$).

5.2 **Chirurgické výkony v súbore sCJch a gCJch^{E200K} v rokoch 2001–2005:** Porovnanie výskytu operácií v intervale viac ako 15 rokov pred manifestáciou CJch dokumentuje u sporadických prípadov signifikantne vyšší: 1. celkový počet operácií ($p = 0,010$) 2. počet pacientov, ktorí mali 2 a viac operácií ($p = 0,036$) ako aj nález ortopedických operácií (40 %) a operácií miechy (15 %), ktoré sa u gCJch^{E200K} nevyskytli a nižší výskyt operácií novotvarov (5 % : 20 %).

Rozdiely medzi kontrolnou skupinou a súborom gCJch^{E200K} ($p = 0,157$) a sCJch ($p = 0,279$) neboli štatisticky významné.

Diskusia

V porovnaní s celosvetovými nálezmi, Slovensko dlhodobo charakterizujú viaceré špecifické rysy výskytu CJch. Prejavujú sa vysokým priemerným ročným výskytom choroby a podielom genetickej formy, ktorý je najvyšší zo všetkých skúmaných štátov (9) a súvisí s nálezom geografického nahromadenia gCJch^{E200K} (12).

Kolísanie ročného výskytu CJch (nadpriemerný počet prípadov pred, alebo po roku s nízkym počtom pacientov), sa opakovane vyskytlo aj v minulosti, ale takéto výkyvy priemernú hodnotu incidencie CJch neovplyvnili. Signifikantný nárast sCJch od roku 2001, bol kvalitatívne novou situáciou. Predbežné nálezy CJch v roku 2006 naznačujú, že mohlo ísť o prechodný nález, lebo sCJch sa vracia k nízkym hodnotám.

Prudký, krátkodobý nárast sCJch, je varovným signálom, ktorý núti k hľadaniu príčin a analýze potenciálnych exogénnych rizikových faktorov CJch, predovšetkým v zameraní na iatrogénnu nákazu. Pri predpoklade neidentifikovanej iCJch v súbore sporadických prípadov sa medzi prvými vnucuje, úvaha o potenciónnom riziku nákazy CJch pri chirurgických úkonoch.

Výsledky

1. Výskyt CJch:

1.1 **Priemerný ročný výskyt CJch** do roku 2001 bol 1,08/mil. obyv., v rokoch 2002–2005 vzrástol na 2,02/mil. obyv.

1.2 **Priemerný ročný výskyt sporadickej CJch** – v rokoch 1975–2000 bol 0,57/mil. obyv., v rokoch 2001–2005 štatisticky významne ($p = 0,034$)

Definovať mieru rizika prenosu Pch invazívnymi liečebnými postupmi sa dosiaľ nepodarilo. Vznik iCJch je známy po transplantácii (rohovka, dura mater) a liečbe rastovým hormónom humánneho pôvodu (2, 5, 7). Kým údaje o nákuze kontaminovanými neurochirurgickými nástrojmi nechýbajú (2, 4, 16, 19), dokázať súvislosť iCJch s rutinnými chirurgickými výkonmi sa zatiaľ nepodarilo. Novšie epidemiologické analýzy nasvedčujú, že aj operácie mimo CNS môžu byť rizikovým faktorom CJch. Niektoré práce zaznamenali vyššie riziko u žien (18), iné u gastrointestinálnych operácií (8).

Porovnanie počtu operácií v súboroch sCJch a gCJch^{E200K}, diagnostikovaných pred a počas zvýšeného výskytu sporadickej formy dáva pozoruhodné výsledky. V súbore gCJch^{E200K} je súčet operácií nižší a väčšina z nich pripadá na posledných 15 rokov pred prvými klinickými príznakmi. V intervale viac ako 15 rokov pred manifestáciou CJch (ktorý prichádza do úvahy z hľadiska dĺžky inkubačnej doby), bol v súbore sCJch signifikantne vyšší súčet operácií, ale aj počet (2 a viac) chirurgických úkonov na jedného pacienta. Tento údaj signalizuje, že riziko CJch štatisticky významne narastá s počtom operácií. Podobnú koreláciu uvádza Collins a spol. 1999 (3), kým Ward a spol. 2002 (18) takúto závislosť nepozorovali.

Hodnotu opísaných nálezov zvyšuje skutočnosť, že rozdiel v počte operácií u porovnaných foriem CJch v r. 1975–2000, pred zvýšeným výskytom sporadických prípadov, nebol štatisticky významný.

V súbore sCJch je pozoruhodný aj výskyt ortopedických operácií a operácií miechy, ktoré sa u gCJch^{E200K} vôbec nezistili. Aj keď sa jedná o relatívne malé čísla, v budúcnosti bude treba venovať pozornosť práve týmto chirurgickým intervenciám.

Pri porovnaní kontrolnej skupiny so súborní CJch, žiaden z rozdielov nie je štatisticky významný. Tento výsledok môže mať zásadný význam pre interpretáciu predchádzajúcich údajov, ale môže byť aj skreslený, keďže pacienti postihnutí sCJch a gCJch^{E200K} pochádzajú z dedín a miest celého Slovenska, kým kontrolný súbor je z Bratislavy, čo nevylučuje určité rozdiely v presnosti informácií a v minulosti aj dostupnosť chirurgického ošetrovania. Obe možnosti budú čo najskôr overené.

Pri iatrogénnom prenose Pch majú významnú úlohu: genetická vnímavosť hostiteľa, prameň nákazy, vstupná brána a infekčná dávka. Tieto faktory zvažujeme aj pri posudzovaní našich predbežných výsledkov.

Genetickú vnímavosť k CJch dnes umožňujú stanoviť molekulárne genetické metódy testovaním ukazovateľov nešpecifickej (polymorfizmy) a špecifickej (mutácie) dedičnej vnímavosti. Najvyššia vni-

mavosť Met/Met homozygotov k nákuze sa najprv zistila u iCJch, neskôr aj u sCJch, gCJch a najvýraznejšie u vCJch (12, 19). Vyšetrenie *PRNP* polymorfizmu M129V na Slovensku dokumentuje najvyššie percento homozygotov s metionínom na 129 kodóne *PRNP* (13), tj. najpočetnejšie zastúpenie takých jedincov, u ktorých je náchylnosť na CJch najvyššia.

Druhým závažným genetickým rizikom je mutácia E200K, ktorá v analyzovanej populácii dosahuje výnimočne vysoký výskyt. Jej penetrancia je 59 % a predpokladá sa, že zvyšuje vnímavosť aj ku exogénnej CJch.

Prameňom nákazy môžu byť pacienti postihnutí ktoroukoľvek formou CJch. Chýbajú poznatky, ako dlho pred klinickou manifestáciou choroby môže dôjsť k horizontálnej nákuze. S výnimkou Anglicka, kde sa predpokladá najmä riziko šírenia vCJch a to aj krvou a krvnými preparátmi (10), vo svete súvisí riziko iatrogénnej nákazy predovšetkým so sCJch. Na Slovensku, kde prevláda gCJch^{E200K}, má významnú úlohu „genetická riziková skupina CJch“, asymptomatickí nosiči mutácie E200K. U tejto skupiny prevenciu sťažujú dva neznáme faktory: 1. nevieme v ktorom veku sa „zdraví“ nosiči mutácie stávajú rizikom z hľadiska šírenia nákazy, 2. nevieme rozlíšiť, ktorí „nosiči“ ochorejú (59 %) a ktorí nie. Postupné rozšírenie nosičov E200K (pacientov aj „zdravých“ jedincov) na celé územie Slovenska (12) signalizuje rastúce riziko iatrogénnej nákazy. Stúpajúcim počtom transplantácií rohoviek sa zvyšuje možnosť nákazy od „zdravých“ nosičov, aj význam genetického vyšetrenia ich darcov. Dokazuje to nález mutácie u dvoch z vyšetreného súboru darcov rohoviek (11). Treba zdôrazniť, že infekčnosť gCJch^{E200K} bola dokázaná experimentálnym prenosom ochorenia na zvieratá (mačky, opice, chryčky).

Dôležitým, z hľadiska možného prameňa nákazy, je narastajúci vek postihnutých CJch. Tento mení posudzovanie vekových zmien (motorických aj kognitívnych) u starších pacientov, nasmerovaním diferenciálnej diagnostiky aj na Pch.

Pohľad na riziko iatrogénnej CJch menia aj citlivejšie laboratórne metódy a to dôkazom pôvodu nákazy mimo CNS (vo svalovine, periférnych nervoch) u klasického aj nového variantu CJch (6, 7, 15). Niet pochybností, že prion sa v nich nachádza v oveľa menšom množstve ako v CNS, ale s ohľadom na získané ukazovatele zvýšenej genetickej vnímavosti, nemožno tieto poznatky ignorovať. Alarmujúce sú tiež údaje o doteraz evidovaných pacientoch, operovaných nástrojmi, použitými predtým u pacientov, ktorí neskôr ochoreli na sCJch (43 pacientov), alebo vCJch (71 pacientov) (1).

Pri zvažovaní iatrogénneho rizika Pch treba brať do úvahy dostupnosť sterilizačných metód, optimálnych z hľadiska šetrnosti voči chirurgickým nástroj-

om, aj maximálneho odstránenia infekčnosti. Pôvodu Pch charakterizuje vysoká priľnavosť k povrchu oceľových chirurgických nástrojov, čo znižuje účinnok odporúčaných sterilizačných postupov (14). Anonymné testovanie biologickej kontaminácie chirurgických nástrojov po štandardnom sterilizovaní, na viacerých chirurgických pracoviskách dokázalo pozitívnu reakciu na bielkoviny, ku ktorým patrí aj prion (17). Experimentálne poznatky naznačujú ako najúčinnnejšie tie postupy, ktoré kombinujú fyzikálne, chemické a najnovšie, aj enzymatické metódy, alebo ktoré využívajú skúsenosti elektrotechnického priemyslu s aplikáciou radio-frekvenčne produkovanej plazmy (1).

Brána vstupu, ktorou nákuza vniká do organizmu hostiteľa, výrazne ovplyvňuje dĺžku inkubačnej doby. Kým po transplantácii rohovky, alebo dura mater, najkratšia inkubačná doba trvá 1,5 roka, intramuskulárne podanie rastového hormónu vyvolá ochorenie až po 4,5–12 rokoch a perorálna nákuza (vCJch) sa prejaví najskôr po 6 rokoch (20).

Experimentálne sa dokázalo, že periférne podaná, malá infekčná dávka (napr. CJch) sa vôbec nemusí prejavíť klinicky, ale údaje o periférnou cestou (iv., ipt., im., sc., po.) vniknutých kritických dávkach u človeka zatiaľ nie sú známe.

Záver

Na základe výsledkov pilotnej štúdie nemožno potvrdiť ani vylúčiť predpoklad, že sa na štatisticky významnom výskyte sCJch v SR v rokoch 2001–2005, podieľajú iatrogénne prípady, nakazené pri chirurgickej liečbe postihnutých. 1. Signifikantne vyšší súčet operácií a 2. významne prevládajúci pacienti s väčším počtom operácií v súbore sCJch, pri porovnaní so súborom gCJch^{E200K} v intervale viac ako 15 rokov pred manifestáciou ochorenia, ako aj 3. genetické riziko CJch v analyzovanej populácii a potencionálny prameň nákazy u asymptomatických nosičov mutácie E200K, s poznatkami o nákuze prionu v periférnych tkanivách a s absenciou optimálnych metód sterilizácie chirurgických nástrojov, signalizujú rastúce riziko iatrogénnej CJch. Poukazujú na nutnosť zohľadniť tieto poznatky v pravidlách prevencie humánnych Pch a prehodnotiť ich význam v rámci prenosných chorôb, lebo u smrteľných, neliečiteľných nákaz, ako sú Pch, relatívne zriedkavý výskyt nie je ukazovateľom ich epidemiologickej a spoločenskej závažnosti.

MUDr. Eva Mitrová, DrSc.

Národné referenčné centrum prionových chorôb,
Slovenská zdravotnícka univerzita
Limbová 14, 833 03 Bratislava
e-mail: eva.mitrova@szu.sk

Literatúra

1. Baxter HC, Campbell GA, Whittaker AG, Jones AC, Simpson AH, Gibbard RL. Elimination of transmissible spongiform encephalopathy infectivity and decontamination of surgical instruments by using radio-frequency gas-plasma treatment. *J Gener Virol* 2005; 88: 2393–2399.
2. Bernoulli C, Siegfried J, Baumgartner G et al. Danger of accidental person-to person transmission of CJD. *Lancet* 1977; 1: 478–479.
3. Collins S, Law M, Fletcher A, Boyd A, Masters CJ. Surgical treatment and risk of sporadic CJD: a case control study. *Lancet* 1999; 353: 693–697.
4. Davanipour Z, Iter M, Sobel E et al. CJD: a possible medical risk factors. *Neurology* 1985; 35: 1483–1486.
5. Duffy P, Wolf J, Collins, et al. Possible person-to person transmission of CJD. *New Engl Med J* 1974; 299: 692–693.
6. Glatzel M, Abela E, Maissen M et al. Extraneural pathologic prion protein in sporadic CJD. *N Engl J Med* 2003; 348: 1812–1820.
7. Ishida C, Okida S, Kitamoto T et al. Involvement of peripheral nervous system in human prion disease including dural draft associated CJD. *J Neurol* 2005; 76: 325–329.
8. Kondo, K. CJD is not associated with other disorders except organ resections in 88 autopsies in Japan. *Neuroepidem* 1984; 3: 21–34.
9. Ladogana A, Puopulo M, Croes E, Budka H, Collins S, Alperovitch A, Mitrova E, Glatzel M, Knight R, Pocchiari M, Will R, Zerr I. Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia and Canada. *Neurology* 2005; 64: 1586–1591.
10. Llewelyn A. Possible transmission of vCJD by transfusion. *Lancet* 2004; 363: 422–428.
11. Mitrová E, Černák P a Rosocha J. Transplantácia rohovky – dôvody a výsledky preventívneho genetického vyšetřovania darcov. *Slov lekár* 2004; 9–10: 264–267.
12. Mitrová E and Belay G. Creutzfeldt-Jakob disease with E200K mutation in Slovakia: characterization and development. *Acta Virol* 2002; 46: 31–39.
13. Mitrová E, Mayer V, Jovankovičová V, Slivarichová D, Wsóllová L. CJD risk and PRNP codon 129 polymorphism. *Europ J Neurol* 2005; 12: 1–4. decontamination of surgical instruments: an ongoing dilemma *J Hospit Infect* 2006; 63: 432–438.
15. Peden AH, Ritchie DL, Head MW, Ironside JW. Detection and localization of PrPsc in the skeletal muscle of patients with variant, iatrogenic and sporadic forms of Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* 2006; 168: 927–929.