

NAUČNI RAD – Original Paper

“KRAVLJE LUDILO”: AKTIVNI NADZOR U BIH

“MAD COW DISEASE”: ACTIVE SURVEILLANCE IN BIH

Bajrović T., Eterović T.

Abstract – The aim of this study was to assess the BSE related situation in BiH and initiate the activities toward the completion of diagnostic procedures and prevention of mad cow disease occurrence and thus the prevention of human neurological diseases. In this work the results of active surveillance over “mad cow disease“ in BiH, are presented. All brain tissue samples were taken from the cows older than 24 months and slaughtered for the human consumption purposes in abattoirs. We tested 13298 samples originating from six cantons in FBiH, and RS between 2006- 2008, with each sample proven negative. The test results from 2008 to date are not presented in this work because in the meantime the ELISA(BIO-RAD) kit was replaced with the IDEXXELISA kit.

Key words: cattle, bovine spongiform encephalopathy, active surveillance

Kratak sadržaj – Cilj ovog istraživanja bio je doći do procjene situacije s BSE u BiH i inicirati ostale poslove kojim bi se kompletirala dijagnostika i prevenirala pojava kravljeg ludila, a time učinilo više na prevenciji ljudskih neuroloških bolesti.

U radu su prezentirani rezultati aktivnog nadzora nad “krajlim ludilom“ u BiH. Svi uzorci tkiva mozga su bili porijeklom od krava starijih od 24 mjeseca, zaklanih u klaonicama za potrebe ishrane ljudi. Ukupno je ispitano 13.298 uzoraka iz šest kantona u FBiH i RS, i to u periodu od 2006. do 2008. godine. Svi rezultati su bili negativni. Rezultate testiranja od 2008. do danas nismo prezentirali u našem radu, jer smo u međuvremenu ELISA-u BIO-RAD zamijenili IDEXX ELISA-om.

Ključne riječi: goveda, bovina spongiformna encefalopatija, aktivni nadzor

Dr. sc. Tarik Bajrović, DVM, redovni profesor, Toni Eterović, DVM, stručni saradnik, Katedra za mikrobiologiju i imunologiju i zarazne bolesti životinja, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Sarajevu

Tarik Bajrović, DVM, PhD, Professor; Toni Eterović, DVM, Associate, Department of Microbiology, Immunology and Infectious Diseases, Veterinary Faculty, Sarajevo University

Uvod

Transmisivne spongiformne encefalopatije (TSE) ili prionske bolesti su grupa neurodegenerativnih oboljenja koja uključuju Creutzfeldt–Jakobovu bolest (CJD) u ljudi, grebež ili skrepi (engl. scrapie) u ovaca i koza i bovinu spongiformnu encefalopatiju (BSE) ili „krvlje ludilo“ u goveda.

Ove bolesti karakterišu specifične histopatološke lezije i naslage abnormalno prilagođenih izoformi (PrP^{Sc}) od strane domaćina – šifriranih fizioloških prion proteina (PrP^{Sc}) u centralnom nervnom sistemu (CNS). PrP je skraćenica od „Proteinaceous infectious particles“. PrP^c i PrP^{Sc} označava celularni (c) i skrepi celularni protein (sc) (cit. prema 9).

PrP^{Sc} su za razliku od PrP^c djelimično otporni na digestiju proteinazom K, rezultirajući u N na krajevima skraćenim prion proteinima, nazvanim PrP^{res}, koji se mogu otkriti Western blotom i pokazuju karakteristično vezane šablone, koji se reflektuju kao 3 PrP^{res} glikoforme.

Jasne molekularne mase i relativne količine PrP^{res} glikoformi se koriste u biohemijskom tipiziranju kao kriterijum za diferenciranje između prionskih bolesti (18). Konverzija normalnog, divljeg tipa proteina PrP^c u patogenezi prion proteina PrP^{Sc} podrazumijeva promjene (*folding*) u proteinu (10), a Perrier i sar. (12) smatraju da samo prisustvo patoloških izoformi PrP^{Sc} stimuliše konverziju PrP^c u PrP^{Sc} i njihovo taloženje, dovodeći do nervnih disfunkcija.

Epidemiološka istraživanja identificirala su kontaminirano mesno i koštano brašno kao vehikl koji reciklira BSE agens u goveđoj populaciji. Međutim, kod originalnog BSE je hipotetično da li bolest dolazi iz ovčijeg skrepija ili iz spontane bovine prionske bolesti analogno sporadičnim formama CJD u ljudi, ili čak od humane prenosive spongiformne encefalopatije, (cit. prema 18). „Krvlje ludilo“, također poznato i kao „mad cow disease“ zapaženo je 1986. godine u Engleskoj (19). To je podmukla, subakutna, afebrilna i prenosiva encefalopatija odraslih goveda, koju karakterišu neurološki znaci. Klinički tok je progresivan, traje više nedjelja i varira po toku do 1 do 6 mjeseci, s fatalnim ishodom. Oboljele životinje izgledaju uplašene i preosjetljive, uz ataksije, nagli gubitak kondicije i pad mliječnosti. Rano u toku bolesti javi se ukočenost stražnjih nogu, zbog čega se skraćuje korak a hod postaje nesiguran (15).

U 2001. godini incidenca BSE-a izražena brojem slučajeva dijagnosticiranih na milion goveda starijih od 24 mjeseca rangira se od 258 u Engleskoj, pa do jedne u Austriji i Japanu (20).

Nobelova nagrada za medicinu dodijeljena je 1997. godine Stanleyu Prusineru (cit. prema 6), jer je prvi predložio hipotezu po kojoj prionske bolesti nastaju zbog misfolder proteina, ali i objašnjenja mehanizama s kojim su prioni u vezi s nakupljenim amiloidnim plakama u mozgu (13). Postoje pretpostavke da preobrazba normalnih priona u abnormalne izoforme dolazi od lizozoma, a prekidi nervnih funkcija na mjestima gdje se nalaze spongiformne promjene od oslobađanja hidrolitičkih enzima iz lizozoma preopterećanih sa PrP^{Sc} (7).

Prema Gu i sar., (5) neurotoksicitet od promjena na prionima je kompleksan te uključuje i transmembranske prion proteine, a ne isključivo nakupine proteinaza otpornih PrP^{Sc} priona. Novija istraživanja evolucije i fizioloških funkcija divljeg tipa prion proteina su pokazala da se u nekih kvasaca pri nepovoljnim prilikama javljaju fenotipske varijante, pri čemu važnu ulogu imaju prioni (2, 6). Prion proteini sadrže približno 250 amino kiselina, a samo neke od njih vezuju bakar, pri čemu ta metalna veza utiče na porast kiselosti i otpuštanje bakra, što ukazuje na ulogu PrP^C u metabolizmu bakra (1).

Pojava novih TSE-a, a naročito nove varijante Creutzfeldt Jacob bolesti (nvCJD) u ljudi nije samo ozbiljna prijetnja za ljudsko i životinjsko zdravlje nego i uzrok značajnih ekonomskih gubitaka u industriji žive stoke. Preventivne mjere, kao što su zabrana upotrebe mesnog i mesno–koštanog brašna, izgleda da imaju efekta u kontroli širenja "krvljeg ludila", ali nemaju efekta na druge prionske bolesti. Genetski modificirane životinjske vrste koje su uzgajane radi mesa, naročito ovce i goveda, mogle bi za duži vremenski period biti rješenje i prevencija TSE-a (11, 12).

Nedavne pojave dvije atipične, vjerovatno sporadične forme BSE-a bile su u vezi s dva posebna prionska soja, karakteristična po posebnim Western blot profilima abnormalnih proteaza – otpornih PrP^{res}, nazvanih visoki - tip (BSE-H) i niski - tip (BSE-L), koji se također razlikuju od klasičnog BSE-a (18). Ovi autori su nakon karakterizacije 5 atipičnih BSE – H izolata analizom molekularnih i neuropatoloških osobina tokom transmisije na transgenim miševima pokazali da atipični BSE-H su prioni sličnih karakteristika klasičnom BSE prionu. Rezultati do kojih su oni došli su korisni, ali ne mogu biti vrednovani kao kada bi se umjesto miševa koristili prirodni domaćini (goveda). Njihova mišljenja su istovjetna mišljenjima onih po kojima BSE agens mora biti originalni goveđi prion, kao BSE-H.

Cilj ovog istraživanja bio je doći do procjene situacije sa BSE u BiH i inicirati ostale aktivnosti kojim bi se kompletirala dijagnostika i prevenirala pojava krvljeg ludila, a time i učinilo više na prevenciji ljudskih neuroloških bolesti.

Materijal i metode

Materijal su predstavljali mozgovi (*obex*) krava uglavnom uvezenih u BiH za klanje, starijih od 24 mjeseca (prosječne dobi 33 mjeseca), zaklanih u klaonicama u šest kantona FBiH, a testiranja su realizirana u laboratoriji za BSE pri Veterinarskom fakultetu u Sarajevu.

U radu smo koristili TeSeETM kit (BIORAD) koji je unutar Evropske unije odobren kao brzi test za BSE i Skrepi programe testiranja goveda, ovaca i koza, a u skladu s preporukama Aneksa III, poglavlje A, (EC) broj 999/2001 (8).

Sadržaj predstavljaju dva kita: purifikacioni i detekcioni. TeSeETM purifikacioni kit omogućava pročišćavanje, koncentrisanje i otapanje PrP^{Sc} iz uzorka tkiva mozga, dobijenog od inficirane životinje korištenjem proteinaze K. Uzorkovanje moždanog tkiva je vršeno iz podnožja obeksa kao optimalno. TeSeETM detekcioni kit je imuno-enzimatski

(sendvič) kit u kome su monoklonalna antitijela za otkrivanje abnormalnih prion proteina, otpornih na proteinazu K, u tkivima skupljenim od inficiranih životinja. Prva monoklonalna antitijela su ugrađena u udubljenja mikroploče, a druga su vezana za peroksidazu. Negativnu kontrolu predstavlja PBS pufer, a pozitivnu PBS pufer kojem su dodati neinfektivni sintetički peptidi.

Rezultati

Podaci o broju ispitanih uzoraka se odnose na period od 2006. do 2008. godine, u kojem je testirano 13.298 uzoraka tkiva mozga krava.(tab. 1).

Tabela 1: Podaci o porijeklu i broju testiranih uzoraka tkiva mozga krava od 2006. do 2008. godine
Table 1: Origin and number of brain tissue samples of cows tested between 2006-2008

| Oznaka kantona | 2006. | 2007. | 2008. |
|----------------|-------|-------|-------|
| 6 | 145 | 3138 | 1607 |
| 7 | 120 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 2644 | 1989 |
| 4 | 0 | 1458 | 2044 |
| 9 | 0 | 62 | 33 |
| 1 | 0 | 26 | 28 |
| Područje RS | 0 | 4 | 0 |
| UKUPNO | 265 | 7332 | 5701 |

Tokom 2006. godine, testiranjima na „krvlje ludilo“ je obuhvaćeno 265 uzoraka tkiva mozga krava porijeklom iz dva kantona, što je relativno malo, ali pri tome treba uzeti u obzir činjenicu da smo te godine i započeli s laboratorijskim testiranjima, tako da praksa uzimanja i dostave uzoraka u laboratorij još nije bila ustrojena. Kako se iz tabele 1 vidi, u naredne dvije godine značajno su intenzivirana testiranja, posebno u 2007. godini, i to u kantonima oznaka 6, 8 i 4, gdje se broj testiranih uzoraka kretao od 1.458 do 3.138.

Laboratorijska testiranja izvršena ELISA (BIO-RAD testom) na 13.298 uzoraka tkiva mozga zaklanih, klinički zdravih goveda starijih od 24 mjeseca, bila su negativna. Do danas (testiranja se vrše kontinuirano i u 2011. godini) nije bilo pozitivnih ili sumnjivih uzoraka na „krvlje ludilo“ (podaci nisu prezentirani u ovom radu).

Diskusija

Pojava nove, do tada nepoznate, bolesti u mliječnim krava sa neurološkim znacima 80-tih godina u Engleskoj nije predstavljala samo izazov nego i obavezu naučne i stručne javnosti da osigura dijagnozu i pokuša zaustaviti dalja oboljenja i uginuća

goveda. U odsustvu bjesnila u Engleskoj, klinička sumnja bila je najprije usmjerena na intoksikacije hranom, metaboličke bolesti, pa i genetski uslovljene bolesti, a nešto kasnije, bolest je nazvana „kravlje ludilo“ i bila dovedena u vezu sa ovacima oboljelim od skrepija. Uzročnik, sličan uzročniku skrepija, počeo se spominjati još tridesetih godina, a opisan je drugačiji od virusa i „etiketiran“ kao prion ili proteinska infektivna čestica (cit. prema 9).

Zapravo, veza između „kravlje ludila“ i skrepija je na neki način „spillover“ infekcija, ali prenos infekta s jedne životinjske vrste na drugu nije onakav o kakvom se obično govori kod zaraznih bolesti, bilo kontagioznih bilo nekontagioznih, već se radi o challengeu (eng. challenge – izazov, namjerno zaražavanje) koji se odvija tokom normalnog proizvodnog procesa na farmama, putem hranjenja goveda krmivima u kojima su potencijalno prisutni uzročnici skrepija, s obzirom da se bjelančevinska komponenta životinjskog porijekla u obroku za goveda obezbjeđuje tkivima ovaca uginulih od skrepija. Ukratko, leševi ovaca uginulih od skrepija se neškodljivo ne uklanjaju sa farmi ovaca, niti čine dostupnim drugim životinjama, nego se preuzimaju i nakon odgovarajuće tehnološke obrade uključuju u krmne smjese za ishranu goveda. Za skrepi ovaca i koza se zna više od 300 godina, pa je čudno, ukoliko je praksa uključivanja uginulih životinja u lanac ishrane praktikovana cijelo vrijeme, da se „kravlje ludilo“ nije pojavilo i mnogo ranije. Pojave skrepija u ovaca i koza van Engleske (cit. prema 15) se opisuju u epizootskoj formi, ali se dovode u vezu s uvozom ovih vrsta životinja iz Engleske, gdje se bolest javlja enzootski, što je veoma interesantno s obzirom na prirodu uzročnika i duge inkubacione periode karakteristične za prionske bolesti. U zaklanih, klinički zdravih goveda, jedini kriterij za testiranje na prisustvo priona – uzročnika „kravlje ludila“ je dob, koja se provjerava ili preuzima iz prateće dokumentacije o životinji, a koju kod nas posjeduju uglavnom goveda namijenjena klanju koja su uvezena iz drugih zemalja. Među domaćim govedima, izuzev onih koji potiču iz velikih farmskih uzgoja, nema preciznih podataka o dobi, ali testiranja na „kravlje ludilo“ podjednako izostaju i iz farmskih, i iz individualnih govedarskih uzgoja. Također izostaju testiranja prinudno zaklanih i uginulih goveda, koje bi trebalo testirati ne samo u okviru programa pasivnog ili aktivnog nadzora nego i po osnovu utvrđivanja uzroka uginuća (ne samo za „kravlje ludilo“), što bi nakon određenog vremenskog perioda i dobijenih rezultata predstavljalo izuzetnu epizootiološko - epidemiološku vrijednost. Dijagnostički pregled tkiva ili organa prinudno zaklanih goveda radi procjene upotrebljivosti mesa za ishranu ljudi negativnog bakteriološkog rezultata najčešće se tumači posljedicom prethodnog tretiranja životinje antibioticima, pa se uz prihvatljiv organoleptički nalaz meso „pusti“ u promet. Zapravo, ne ide u promet samo meso nego i sve ostalo, pa i nervna tkiva.

Pasivni nadzor podrazumijeva testiranja tkiva mozga prinudno zaklanih krava sumnjivih na bolest, a aktivni nadzor uključuje testiranje tkiva mozga krava sa neurološkim znacima, na bjesnilo sumnjivih – negativnih grla, svih grla u dobi preko 24 mjeseca koja se kolju za potrebe ishrane ljudi i uginulih grla. Za područje Amerike se uključuju i sva pala (engl. fallen) grla, a od 2000. godine u aktivni nadzor u Engleskoj su uvrštena „culled“ goveda.

U vezi koncentratnih krmnih smjesa i držanja više različitih životinjskih vrsta u jednom ekonomskom dvorištu, treba reći da se teško može kontrolisati ili zabraniti unakrsna kontaminacija krmivima – namjerna ili nenamjerna – pa bismo u tom smislu morali zabraniti zajedničko držanje peradi ili svinja s preživarima. Upravo pojava mnogih slučajeva "krvljeg ludila", koja je uslijedila nakon zabrane korištenja mesno-koštanoga brašna u ishrani krava u svijetu, protumačila se unakrsnom kontaminacijom (cit. prema 15).

Iako su u BiH veoma malo zastupljene farme divljači (uglavnom jeleni i kune, a ranije i polarne lisice) trebalo bi voditi računa da se za jelene koriste ona hraniva koja nemaju životinjsku komponentu.

S obzirom da nema dokaza o horizontalnom i vertikalnom prenosu "krvljeg ludila", niti zoonotičnosti (samo zabrinutost), sva pažnja mora biti usmjerena na mesno-koštano brašno, latentno inficirano s agensom kojem je dozvoljeno da perzistira u hrani. Pri tome ne treba hraniti mladu telad koncentratima za odrasla goveda. Zbog jednostranog pristupa aktivnom nadzoru nad "krvljim ludilom" kakav se provodi u BiH, s isključivim osloncem na pregled uzoraka uzetih od krava zaklanih za potrebe ishrane ljudi, čestih uvoza priplodnih goveda i komponenti koncentratnih krmiva, dugih inkubacionih perioda u prionskih bolesti (prosječan inkubacioni period za BSE u Francuskoj je 5 godina, cit. prema 16), te česte kvadriplegije i prinudnog klanja klinički oboljelih goveda, ne može se isključiti postojanje "krvljeg ludila" u BiH.

Zaključak

1. U BiH se provodi aktivan, ali nekompletan nadzor nad „krvljim ludilom“.
2. U provođenju programa zdravstvene zaštite životinja nisu aplikativni niti mikro, niti makro menadžment.
3. Profilaksu "krvljeg ludila" treba bazirati na zabrani uvoza ili unosa životinjskih komponenti, a ne na laboratorijskom testiranju gotovih krmnih smjesa.
4. Neophodno je podržavati proizvodnju samo jedne vrste životinja u jednom ekonomskom dvorištu.
5. Razmotriti dalju praksu prodaje rizičnih govedih tkiva za ishranu ljudi.
6. Početi rješavati pitanja (ne)uklanjanja životinjskog otpada s farmi, iz klaonica i drugih pogona.

LITERATURA

1. Burns CS, Aronoff-Spencer E, Dunham CM, et al. Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein, *Biochemistry*, Vol. 41; 3991-4001, 2002.
2. Csaba P. Yeast prions and evolvability; *Trends in Genetics*, Vol. 17, 167-169, 2001.

3. Doherr M.G, Oesch B, et al. Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 145, 672, 1999.
4. Fischer M B, Roeckl C, Parizek P, et al. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* 408; 479-483, 2000.
5. Gu Y, Fujioka H, Mishra R S, et al. Prion peptide 106-126 modulates the aggregation of cellular prion protein and induces the synthesis of potentially neurotoxic transmembrane PrP. *J Biol Chem.*, 277; 2275-2286, 2002.
6. Harinder P S, Makkar, Gerrit J Viljoen. Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, 2005.
7. Laszlo L, Lowe J, Self T, et al. Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *Journal of Pathology*, 166(4), 333-41, 1992.
8. Moynagh J, Schimmel H. Tests for BSE evaluated, *Nature* 400, 105, 1999.
9. Nelson K E, Carolyn F, Masters W. Infectious disease epidemiology theory and practice second edition, Jones and Bartlett publishers, 466, 2007.
10. Pan K M, Baldwin M, Nguyen J, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol.90; 10962-6, 1993.
11. Parry H B. Elimination of natural scrapie in sheep by sire genotype selection nature, 277;127 – 128, 1979.
12. Perrier V, Kaneko K, Safar J, et al. Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 99; 13079-84, 2002.
13. Prusiner S B. Molecular virology of prion disease, *Science*, 252;1515 – 1522, 1991.
14. Prusiner S B. Prion Diseases and the BSE Crisis, *Science*, 278; 245-251, 1997.
15. Radostits O M, Blood D C, Gay C C. *Veterinary medicine osmo izdanje*, 1446, 2008.
16. Supervie V, Costagliola D. The unrecognised French BSE epidemic, *Vet. Res.*;35: 349-62, 2004.
17. Telling G C, Scott M, Mastrianni J, et al. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein, *cell*, 83;79 – 90,1995.
18. Torres J M, Andréoletti O, Lacroux C, et al. Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of h-type prion in homologous prion protein context, *Emerg Infect Dis.*; Vol.17:1636-44, 2011.
19. Wilesmith J W, Wells G A, Cranwell M P, et al. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec.* ;Vol. 123: 638-644, 1988.
20. - - -: OIE (office international d'epizooties) Dostupno na http://www.oie.int/eng/info/n_sbincidence.htm
21. - - -: SSC/14-15 Septembar 2000./5.2m: Opinion of the SSC on BSE-related culling in cattle, Opinion of the scientific steering committee on BSE-related culling in cattle adopted at the meeting of the 14/15 Septembar 2000.

Uredništvo primilo rukopis 28.10.2011.