



## ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE



MARIAN TRUSZCZYŃSKI, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

# Możliwości wczesnego wykrycia gąbczastej encefalopatii bydła oraz uznania populacji za wolną od tej choroby – zgodnie z dyrektywami Międzynarodowego Urzędu Epizootii (OIE)

Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Dotychczasowe piśmiennictwo polskie na temat gąbczastej encefalopatii bydła (bovine spongiform encephalopathy – BSE) znajduje się w następujących publikacjach (2, 18-22, 25, 29, 30, 35). Choroba ta jest jedną z grupy chorób określanych jako pasażowalne gąbczaste encefalopatie (transmissible spongiform encephalopathies – TSE). Ważniejsze prace piśmiennictwa światowego dotyczące tej tematyki znajdują się w kolejnych publikacjach (3-5, 9, 11, 13, 14, 17, 31-34).

Wskazane dane literaturowe pozwalają na ograniczenie się we wstępie do niezbędnych informacji wprowadzających do przedstawianego tematu, którym jest: a) scharakteryzowanie aktualnych możliwości wczesnego wykrycia BSE; b) podanie kryteriów uznania populacji bydła za wolną od tej choroby. Oprócz tych głównych punktów – opracowanie niniejsze zawiera niektóre inne elementy, istotne dla uchronienia populacji bydła od BSE.

BSE jest chorobą, w przebiegu której zmiany histopatologiczne lokalizują się w mózgu (17, 20, 21, 28, 31-33, 35). Objawy kliniczne to: niepokój, ataksja kończyn tylnych, nadwrażliwość, utrata masy ciała, obniżona wydajność mleka (17, 20, 31, 35).

Mechanizm powstawania zaburzeń w zdrowiu nie jest wystarczająco wyjaśniony (3, 11, 17). Choroba ma związek ze spożywaniem przez krowy mączki mięsno-kostnej z owiec, u których wystąpiło scrapie (17, 20, 31, 32), inna niż BSE, pasażowalna gąbczasta encefalopatia. Równie niebezpieczne są mączki mięsno-kostne od bydła zawierające czynnik chorobowy, pochodzący pierwotnie z przypadków scrapie, który zaadaptował się do organizmu krowy.

Jako czynnik etiologiczny uznaje się prion (PrP<sup>Sc</sup>). Jest to białko, które stanowi izoformę normalnego

białka PrP<sup>C</sup>, które występuje w komórkach nerwowych. Gen dla syntezy białka PrP<sup>C</sup> jest obecny u wszystkich ssaków. Sekwencja aminokwasów białka PrP<sup>C</sup> i PrP<sup>Sc</sup> jest identyczna, a różnica między tymi białkami dokonuje się potranslacyjnie. Zmiany te dotyczą konformacji cząsteczki białkowej, która zmienia się ze spiralnej na płaską. Tak zmieniona cząsteczka, już jako PrP<sup>Sc</sup>, zaczyna działać katalitycznie, lub jako element samoreplikujący się. Powoduje to, że inne cząsteczki PrP<sup>C</sup> przekształcają się w PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>Sc</sup> wykazuje nadzwyczajną oporność na działanie endogennych proteaz, dzięki czemu dochodzi do jego gromadzenia się, agregacji i precipitacji, a to powoduje tworzenie się wakuol w cytoplazmie neuronów i w efekcie daje obraz gąbczastego uszkodzenia komórek nerwowych (6, 17).

Białko PrP<sup>Sc</sup> wykazuje nadzwyczajną oporność na wysokie temperatury. Do jego inaktywacji potrzebna jest temperatura ponad 130°C, działająca przez 30-60 minut na cząstki o rozmiarach 50×50×50 nm (6, 8, 30). Białko PrP<sup>Sc</sup> nie ulega inaktywacji pod wpływem promieniowania radioaktywnego i UV, działania formaliny, niskiego lub wysokiego pH. W zwłokach zakopanych w ziemi zachowuje zakaźność przez lata. Zakaźność białka PrP<sup>Sc</sup> jest inaktywowana przez 1M NaOH przy 55°C oraz chlorowanie przy koncentracji 20 000 ppm (6).

Niektórzy badacze (10) uważają, że nie prion, a wirus jest czynnikiem etiologicznym BSE. Brak odpowiedzi immunologicznej wyjaśniają hipotezą, iż może to być wirus zawierający sam kwas nukleinowy bez płaszcza białkowego, całkowicie otoczony amyloidem, a więc nieimmunogeny, lub wirus posiadający płaszcz białkowy, ale dodatkowo otoczony warstwą amyloidową, co uniemożliwia pobudzenie układu immunologicznego (10).

Z uwagi na rozprzestrzenianie się BSE w następstwie skarmiania mączek mięsno-kostnych, Ministerstwo Rolnictwa Wielkiej Brytanii wydało w marcu 1996 r. zakaz podawania jako paszy wszystkim gatunkom zwierząt fermowych czyli gospodarskich, łącznie z rybami, mączek mięsno-kostnych zawierających białko ssaków, a więc nie wyłącznie bydła i owiec (27). Chodzi tu o zapobieganie nie tylko BSE, ale również innym pasażowalnym encefalopatiom, które mogłyby wystąpić u innych niż bydło gatunków zwierząt gospodarskich.

### Aktualne możliwości diagnozy

Objawy kliniczne nie dają podstawy do rozpoznania BSE. Inne choroby neurologiczne, a także niedoborowe – jak hypomagnezemia, manifestują się bardzo podobnymi lub identycznymi objawami. Niemniej objawy kliniczne ze strony centralnego układu nerwowego stanowią punkt wyjściowy do podejrzenia BSE. Potwierdzenie tej choroby opiera się na badaniu pośmiertnym histologicznym lub immunohistochemicznym skrawków mózgu (17, 23, 26, 28, 31, 35). U około 20% zwierząt podejrzanych na podstawie badania klinicznego o BSE nie udaje się potwierdzić tego przypuszczenia pośmiertnym badaniem mózgu (4, 11, 27, 34).

Podstawową trudnością w zapobieganiu i zwalczaniu BSE jest brak do chwili obecnej miarodajnych i praktycznie możliwych do szerokiego stosowania laboratoryjnych testów przyżyciowego rozpoznawania choroby. Byłyby one natomiast bardzo przydatne w kontrolowaniu obrotu krajowego i międzynarodowego bydła. Uzyskane wyniki stanowiłyby bowiem podstawę przeciwdziałania dostaniu się osobników znajdujących się w okresie inkubacji BSE – a więc nie wykazujących objawów chorobowych, lecz zakażonych – do populacji wolnej od tej choroby.

Pewne nadzieje na możliwość opracowania metod do przyżyciowej diagnostyki pasażowalnych gąbczastych encefalopatii dało wykrycie w płynie mózgowo-rdzeniowym ludzi z chorobą Creutzfeldta-Jakoba (CJD) dwóch białek – p130/131 (12, 23, 24). Białka te prawdopodobnie należą do grupy białek określanych mianem 14-3-3, które stwierdzano u pacjentów wykazujących wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia CJD (6, 23). Białka p130/131, występujące w płynie mózgowo-rdzeniowym, mogą pochodzić z tkanki nerwowej, a ich obecność w tym płynie może być wyrazem toczącego się procesu patologicznego. Badania Lee i Harringtona (23, 24) wydają się potwierdzać tę hipotezę. Badacze ci pracują obecnie nad określeniem występowania białka 14-3-3 we wczesnych stadiach BSE. Zaznaczają oni, że równolegle powinny być prowadzone bada-

nia nad występowaniem tych białek w przebiegu innych chorób neurologicznych, aby określić ich specyficzność jako markera TSE. Na obecnym etapie wiedzy brak jest zatem specyficznego testu laboratoryjnego, który byłby w stanie identyfikować przyżyciowo zwierzęta znajdujące się w okresie inkubacji, lub przyżyciowo potwierdzać kliniczne podejrzenie o BSE.

Zapobieganie i zwalczanie BSE dodatkowo utrudnione jest faktem długiego okresu inkubacji. U większości bydła trwa on 4-5 lat (11, 17, 31, 32). Wiek najmłodszej krowy, która zachorowała na BSE wynosił 20 miesięcy.

### Działania zmierzające do wczesnego wykrycia BSE

Wobec przedstawionych trudności, związanych z wykryciem BSE, niezbędne jest podjęcie działań, które mimo wszystko, przy obecnym stanie wiedzy, zapewnią możliwie wczesne stwierdzenie występowania tej choroby w populacji bydła.

Wychodząc naprzeciw tej kwestii, jednym z ważnych tematów 65 Sesji Ogólnej Międzynarodowego Urzędu Epizootii (OIE) było doskonalenie, dotyczącego BSE, rozdziału 3.2.13.1. Międzynarodowego Kodeksu Zdrowia Zwierząt (International Animal Health Code). Rozdział ten stanowi, że sytuacja epizootiologiczna państwa w zakresie BSE może być uznana za określoną wyłącznie po spełnieniu warunku realizowania ciągłych przeglądów bydła i monitorowania stanu zdrowotnego (continuous surveillance and monitoring).

Minimalne wymogi efektywnego przeglądu są następujące:

1. obowiązkowe zgłaszanie podejrzanych o BSE na podstawie badania klinicznego, przypadków chorobowych;
2. laboratoryjne badanie przy użyciu technik diagnostycznych (17, 26, 28, 31) materiału z mózgu od zwierząt podejrzanych o BSE na podstawie badania klinicznego, które poddano ubojowi lub które padły;
3. rejestracja potwierdzonych przypadków (każdy przypadek potwierdzony powinien być zgłoszony jako odrębne ognisko).

W przypadku niemożności przekonywującego udokumentowania, że wymienione warunki są spełnione, sytuacja epizootiologiczna w zakresie BSE w danym kraju traktowana jest jako nieznana względnie nieokreślona. To zaś może rodzić trudności w międzynarodowym obrocie żywymi zwierzętami, produktami pochodzenia zwierzęcego oraz materiałem biologicznym pochodzenia zwierzęcego (nasienie, komórki jajowe, zarodki).

Najistotniejszym zatem elementem działań, zmierzających do możliwie najwcześniejszego wykrycia

Tab. 1. Minimalna liczba badań wymaganych by spełnić warunek 90% szansy wykrycia BSE występującej w 1% przypadków chorób neurologicznych u bydła

| Populacja bydła w wieku 20 miesięcy lub więcej | Spodziewane neurologiczne choroby – 100 przypadków na 1 000 000 zwierząt | Minimalna liczba mózgów, które należy zbadać |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 500 000                                        | 50                                                                       | 50                                           |
| 700 000                                        | 70                                                                       | 68                                           |
| 1 000 000                                      | 100                                                                      | 91                                           |
| 2 500 000                                      | 250                                                                      | 151                                          |
| 5 000 000                                      | 500                                                                      | 184                                          |
| 7 000 000                                      | 700                                                                      | 196                                          |
| 10 000 000                                     | 1000                                                                     | 205                                          |
| 20 000 000                                     | 2000                                                                     | 217                                          |
| 30 000 000                                     | 3000                                                                     | 221                                          |
| 40 000 000                                     | 4000                                                                     | 224                                          |

BSE – wydaje się być – wydanie przez ministra rolnictwa danego kraju zarządzenia, które zobowiązuje państwową służbę weterynaryjną do ciągłych przeglądów klinicznych, zmierzających do wykrycia zwierząt wykazujących objawy neurologiczne. Uczestniczący w tych przeglądach lekarze weterynaryjni, państwowi i prywatni, powinni być zapoznani z objawami klinicznymi BSE przy pomocy filmu, przedstawiającego zachowanie się zwierząt chorych oraz wykładów charakteryzujących etiologię, patogenezę i rozpoznawanie, w tym rozpoznawanie różnicowe BSE z uwzględnieniem innych chorób o podobnych objawach.

Jak się ocenia (16), średnio w poszczególnych państwach występuje u bydła rocznie co najmniej 100 przypadków zachorowań o objawach neurologicznych na 1 000 000 osobników, czyli 0,01%.

Ze względu na to, że żadne objawy kliniczne nie są patognomiczne dla BSE i mogą występować też w innych niż BSE chorobach neurologicznych bydła (np. przy wściekłości) – dla postawienia miarodajnego rozpoznania niezbędne jest wykonanie laboratoryjnego badania tkanki mózgowej przy użyciu odpowiednich metod histologicznych lub immunohistochemicznych, z uwzględnieniem również badań w kierunku wścieklicy (26).

Zakłada się, że 1% przypadków chorób o objawach neurologicznych może stanowić BSE (16).

Przeglądy kliniczne, które wykrywają zwierzęta, wykazujące objawy neurologiczne oraz monitorowanie laboratoryjne BSE w grupie tego rodzaju

zwierząt uznaje się za miarodajne i wiarygodne, jeżeli zostaną spełnione następujące warunki, określone w podanej przez Międzynarodowy Urząd Epizootii (OIE) tabeli 1 (16). Przedstawiona jest w niej niezbędna liczba mózgów, które zależnie od liczby zwierząt z objawami neurologicznymi należy zbadać, by osiągnąć 90% ufności, czyli szansy wykrycia BSE.

Interpretując dane zawarte w tab. 1 dodaje się, że przy dokonanym przeglądzie klinicznym 500 000 osobników i spodziewanym wykryciu 50 osobników wykazujących objawy neurologiczne – minimalna liczba mózgów, które należy zbadać laboratoryjnie powinna wynosić 50. Przy podanych większych liczbach zwierząt, poddanych przeglądowi klinicznemu oraz przy spodziewanym wystąpieniu przypadków neurologicznych odpowiadających 0,01%, liczby mózgów,

które powinny być zbadane wynoszą odpowiednio: dla 100 spodziewanych przypadków chorób neurologicznych – 91, a dla 4000 spodziewanych przypadków chorób neurologicznych – 224. Według tab. 1, jeżeli poddano by badaniu klinicznemu populację bydła rzędu 10 000 000 i zgodnie z podanym uprzednio założeniem wykryto by 1000 przypadków o objawach neurologicznych, to wtedy należałoby zbadać co najmniej 205 mózgów spośród 1000 krów wykazujących objawy neurologiczne, aby uzyskać wiarygodne dane o występowaniu lub nie występowaniu BSE w tej populacji.

### Wymagania do uznania kraju za wolny od BSE

Biorąc pod uwagę niewystarczające rozeznanie, co do możliwości występowania BSE w krajach europejskich, które nie zgłosiły występowania na ich terenie BSE, a zatem uważanych za wolne od tej choroby (mimo, że mógł do nich nastąpić import mączek mięsno-kostnych z prionami BSE), należy w przypadku zamiaru sprowadzania z tychże krajów bydła lub produktów tego gatunku, żądać dokumentacji, która powinna zawierać:

1. pisemną ocenę zagrożenia BSE na terenie kraju eksportera;

2. określoną pisemnie strategię utrzymania zagrożenia ze strony BSE na minimalnym poziomie, z udokumentowaniem skutecznego wdrożenia tej strategii;

3. szczegółowy protokół systematycznych przeglądów klinicznych i ciągłego monitorowania BSE, w którym byłyby uwzględnione następujące punkty:

a) regularne przeglądy kliniczne i nadzór nad bydlęm importowanym z krajów, w których występuje BSE;

b) nadzór nad ubojem bydła dorosłego i badanie bydła dorosłego, wykazującego objawy neurologiczne;

c) dochodzenie epizootologiczne i badanie laboratoryjne mózgów bydła, u którego wystąpiły objawy nerwowe odpowiadające BSE;

4) dokumentację dochodzeń epizootologicznych w przypadku bydła wykazującego objawy neurologiczne łącznie z wynikami badań diagnostycznych. Minimalna liczba badań dla osiągnięcia 90% szans na wykrycie lub wykluczenie wystąpienia BSE wskazana jest w tab. 1. Dane dotyczące wymienionej dokumentacji muszą być przechowywane przez przynajmniej 7 lat.

Przy imporcie do danego kraju z innego kraju bydła, mięsa wołowego i produktów pochodzących od bydła, administracja weterynaryjna kraju importującego powinna wymagać dodatkowo międzynarodowego certyfikatu zdrowia zwierzęcia, w którym byłyby zawarte następujące informacje, że:

1. BSE podlega obowiązkowi zgłaszania w kraju eksportującym,

2. bydło z BSE podlega ubojowi i zniszczeniu poprzez spalenie w całości,

3. istnieje zakaz żywienia bydła produktami białkowymi wyprodukowanymi z tkanek, które pochodzą od przeżuwaczy w wieku powyżej 6 miesięcy.

4. bydło przeznaczone do eksportu jest:

a) trwale oznakowane, co umożliwia identyfikację matki i stada pochodzenia,

b) zwierzęta nie są pierwszym pokoleniem krów podejrzanych o BSE, lub krów u których potwierdzono BSE.

Dodatkowo przy imporcie zarodków i/lub komórek jajowych należy uzyskać zaświadczenie, że materiały te pochodzą od:

1. samic, które nie wykazują BSE,

2. samic, które nie są córkami krów z BSE,

3. samic, które nie były podejrzane o BSE w czasie pozyskiwania zarodka lub komórki jajowej.

Jako uzupełnienie wymienionych wymagań Międzynarodowy Urząd Epizootii zaleca uzyskanie świadectwa, że bydło przeznaczone na eksport urodziło się co najmniej trzy lata po wprowadzeniu zakazu stosowania mączek mięsno-kostnych z przeżuwaczy do żywienia przeżuwaczy. W przypadku importu zarodków i komórek jajowych Międzynarodowy Urząd Epizootii zaleca uzyskanie oświadczenia, że pochodzą one od samic urodzonych co najmniej trzy lata po wprowadzeniu zakazu, o którym mowa uprzednio.

Przedstawione wytyczne działania powinny zabezpieczyć kraj importujący przed zawlečeniami BSE. Jednakże, ze względu na nie wyjaśnione do końca możliwości i okoliczności transmisji czynnika BSE w obrębie pogłowia bydła oraz do zwierząt innych gatunków, kraje, na terenie których BSE nie zostało stwierdzone, powinny zachować maksymalną ostrożność przy imporcie bydła oraz wszelkich materiałów biologicznych pochodzących od bydła z krajów w których BSE występowało lub występuje.

## Piśmiennictwo

1. Aitken A., Collinge D., Van Heusden B., Isobe T., Rosenboon P., Rosenfeld G., Soll J.: Trends Biochem. Sci. 17, 489, 1992.
2. Anon.: Medycyna Wet. 51, 53, 1995.
3. Anon.: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 15, 1087, 1996.
4. Bradley R., Wilesmith J. W.: Br. med. Bull. 49, 932, 1994.
5. Bruce M.: Bovine spongiform encephalopathy: experimental studies in the United Kingdom. Joint OIE/WHO Consultation on bovine spongiform encephalopathy. Paris, 1-2 September 1994.
6. BSE information at the University of Illinois at Urbana-Champaign. Internet: <http://w3.aces.uiuc.edu.ansci/bse>.
7. Collinge J., Sidle K. C. L., Meads J., Ironside J., Hill A. F.: Nature 383, 685, 1996.
8. Commission Decision of 27 June 1994, 94/382/EC; 95/29/EC.
9. Dawson M., Wells G. A. H., Parker B. N. J.: Vet. Rec. 126, 112, 1990.
10. Diringier H., Beeks M., Oberdieck U.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 724, 246, 1994.
11. Epidemiological studies and research on transmissible spongiform encephalopathies. Meeting of the OIE Ad hoc Group on Transmissible Spongiform Encephalopathies, Paris, 8-10 October 1996.
12. Harrington M. G., Merril C. R., Asher D. M., Gajdusek D. C.: New England J. Med. 315, 279, 1986.
13. Hoinville L. J., Wilesmith J. W., Richards M. S.: Vet. Rec. 136, 312, 1995.
14. Hoinville L. J.: Vet. Rec. 134, 274, 1994.
15. Hsich G., Kenney K., Gibbs C. J., Lee K. H., Harrington M. G.: New England J. Med. 335, 924, 1996.
16. International Animal Health Code, O.I.E., 1993-1996, 1997 Up-dates.
17. Kimberlin R. H.: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 11, 347, 1992.
18. Kołacz J., Maleszewski J.: Medycyna Wet. 47, 49, 1991.
19. Kondracki M.: Życie wet. 67, 43, 1992.
20. Larski Z.: Medycyna Wet. 47, 193, 1991.
21. Larski Z.: Medycyna Wet. 52, 479, 1996.
22. Larski Z.: Medycyna Wet. 53, 367, 1997.
23. Lee K. H., Harrington M. G.: Vet. Rec. 140, 206, 1997.
24. Lee K. H., Harrington M. G.: Lancet 348, 887, 1996.
25. Maleszewski J., Truszczyński M.: Medycyna Wet. 48, 443, 1992.
26. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. OIE, Paris, 1996.
27. Programme to eradicate BSE in the United Kingdom. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London/Tolworth, 31 May 1996.
28. Simmons M. M., Harris P., Jeffrey M., Meek S. C., Blamire I. W. H., Wells G. A. H.: Vet. Rec. 138, 175, 1996.
29. Truszczyński M., Maleszewski J.: Medycyna Wet. 50, 13, 1994.
30. Truszczyński M., Twarowski B.: Medycyna Wet. 53, 507, 1997.
31. Wells G. A. H., Scott A. C., Johnson C. T., Gunning R. F., Hancock R. D., Jeffrey M., Dawson M., Bradley R.: Vet. Rec. 121, 419, 1987.
32. Wilesmith J. W., Ryan J. B. M., Atkinson M. J.: Vet. Rec. 128, 199, 1991.
33. Wilesmith J. W., Wells G. A. H., Cranwell M. P., Ryan J. B. M.: Vet. Rec. 123, 638, 1988.
34. Wilesmith J. W.: Phil. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B, 343, 357, 1994.
35. Żmudziński J. F., Truszczyński M., Maciołek H.: Gąbczaste encefalopatie ze szczególnym uwzględnieniem gąbczastej encefalopatii bydła (Bovine spongiform encephalopathy, BSE). Wyd. PIWet., Puławy 1995.