



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
Departman za veterinarsku medicinu



Damjanović Đorđe

**SPONGIOFORMNE ENCEFALOPATIJE PREŽIVARA
– ETIOLOGIJA, KLINIČKA SLIKA I ZAKONSKA
REGULATIVA**

Diplomski rad

Novi Sad, 2026.



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
Departman za veterinarsku medicinu



SPONGIOFORMNE ENCEFALOPATIJE PREŽIVARA – ETIOLOGIJA, KLINIČKA SLIKA I ZAKONSKA REGULATIVA

Diplomski rad

Kandidat:

Đorđe Damjanović

Mentor:

Doc. dr Jovan Stanojević

Novi Sad, 2026.

KOMISIJA ZA OCENU I OBRANU DIPLOMSKOG RADA

dr Jovan Stanojević, docent, mentor

za užu naučnu oblast Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda

Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Departman za veterinarsku medicinu

dr Miodrag Radinović, redovni profesor, predsednik komisije

za užu naučnu oblast Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda

Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Departman za veterinarsku medicinu

dr Zorana Kovačević, vanredni profesor, član komisije

za užu naučnu oblast Farmakologija i toksikologija

Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Departman za veterinarsku medicinu

KRATAK SADRŽAJ

Prionske bolesti predstavljaju skup neurodegenerativnih bolesti koje se karakterišu sa jako dugim periodom inkubacije, taloženjem *prion-resistant protein scrapie* (PrPsc) u neuronima, progresivnošću i letalnim ishodom. Uzročnik prionskih bolesti su prioni, odnosno infektivne proteinske partikulu koje su zapravo mutirani *prion-resistant protein* (PrPc) koji su fiziološki vezani za vanjsku stranu membrane neurona. Mutacija može nastati slučajno ili biti podstaknuta prisustvom priona u organizmu.

Prionske bolesti su veoma značajne jer se mogu javiti kod skoro svih sisara, a za zoonostski potencijal veoma značajna je bovina spongiformna encefalopatija (BSE), koja predstavlja bolest prisutnu kod goveda i koja je prenosiva na ljude. Od veliko značaja jeste kontrola ove bolesti i težnja da se iskoreni jer je povezana sa nastankom prionskog oboljenja kod ljudi koje se naziva Creutzfeldt-Jakobova bolest. Kod ljudi od prionskih bolesti još je važna i Kuru bolest, koja je prisutna u plemenima gde je prisutan kanibalizam, pa konzumacijom ljudskog mesa dolazi do pojave ovog oboljenja.

Takođe, za nastanak BSE veoma je značajna i prionska bolest kod ovaca koja se naziva Skrejpji jer od obolelih ovaca čiji se leševi koriste za pravljenje mesno-koštanog brašna dolazi do nastanka BSE kod goveda ukoliko konzumiraju koncentrovana hraniva sa proteinima animalnog porekla poreklom od obolelih ovaca. Dokazano je da ukoliko PrPsc dospe u organizam zdravog goveda on će da uzrokuje nastanak BSE, jer će dovesti do mutacije PrPc.

Prenos bolesti sa goveda na ljude moguć je preko ingestije infektivnog materijala, koje je zapravo moždano i limfatično tkivo zaraženih goveda, krv, serum, tanka i debela creva.

Dijagnostika transmisivnih spongiformnih encefalopatija zasniva se na postmortalnom ispitivanju uzoraka centralnog nervnog sistema i dokazivanju karakterističnih patoloških promena, odnosno prisustva abnormalnog prionskog proteina PrPSc.

Histopatološkim pregledom moždanog tkiva, nakon bojenja hematoksilinom i eozinom, utvrđuju se tipične spongioformne promene, vakuolizacija sive supstance, degeneracija neurona i astrocitoza. Za direktno dokazivanje PrPsc primjenjuju se imunohistohemijske metode, ELISA test i Western blot tehnika, dok se prisustvo *scrapie-associated fibrils* (SAF) može utvrditi elektronskom mikroskopijom. Klinički znaci, kao što su promjene u ponašanju, preosjetljivost na nadražaje, ataksija i progresivna slabost, omogućavaju postavljanje sumnje na oboljenje, dok se potvrda zasniva na odgovarajućim laboratorijskim metodama.

Da bi se sprečila pojava i širenje spongiformnih encefalopatija, u klanicama u Republici Srbiji sprovode se veterinarski pregledi goveda pre i posle klanja, u skladu sa važećom zakonskom regulativom. Kod životinja koje ispunjavaju propisane kriterijume vrši se uzorkovanje moždanog tkiva radi laboratorijskog ispitivanja na bovinu spongiformnu encefalopatiju (BSE). Posebna pažnja posvećuje se uklanjanju i neškodljivom uništavanju specifičnog rizičnog materijala, koji može sadržati uzročnika bolesti. Ove mere imaju za cilj zaštitu zdravlja ljudi i životinja, kao i sprečavanje ulaska potencijalno zaraženih tkiva u lanac ishrane.

Ključne reči: prion, Bovina spongioformna encefalopatija, Skrejpi, neurodegenerativno oboljenje.

ABSTRACT

Prion diseases are a group of neurodegenerative disorders characterized by a very long incubation period, the accumulation of *prion protein scrapie* (PrPSc) in neurons, progressive disease development, and a fatal outcome. The causative agents of prion diseases are prions, which are infectious protein particles representing an abnormal form of the cellular prion protein (PrPc), normally associated with the outer surface of neuronal membranes. This abnormal form may arise spontaneously or be induced by the presence of prions in the organism.

Prion diseases are of considerable importance because they can affect almost all mammals. Bovine spongiform encephalopathy (BSE), a disease affecting cattle that can be transmitted to humans, is particularly significant because of its zoonotic potential. Controlling and ultimately eradicating this disease is essential because it is associated with the development of a human prion disease known as variant Creutzfeldt–Jakob disease (vCJD). Another important human prion disease is Kuru, which was observed in populations where cannibalism was practised. Consumption of human tissues could lead to the development of this disease, although such cases are rare.

Scrapie, a prion disease affecting sheep, also played a significant role in the emergence of BSE. When the carcasses of infected sheep were used in the production of meat-and-bone meal, cattle could develop BSE after consuming concentrated feed containing proteins of animal origin. It has been established that when PrPSc enters the body of a healthy animal, it can induce the conversion of normal PrPc into the abnormal prion form, resulting in the development of BSE.

Transmission of the disease from cattle to humans may occur through the ingestion of infectious tissues, particularly the brain and lymphatic tissues of infected cattle, as well as blood, serum, and the small and large intestines.

The diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies is based on post-mortem examination of central nervous system samples and the detection of characteristic pathological changes or the abnormal prion protein PrP^{Sc}. Histopathological examination of brain tissue following haematoxylin and eosin staining reveals typical spongiform changes, vacuolation of the grey matter, neuronal degeneration, and astrogliosis. Immunohistochemical methods, ELISA, and Western blot are used to detect PrP^{Sc}, while scrapie-associated fibrils (SAF) can be identified by electron microscopy. Clinical signs, such as behavioural changes, hypersensitivity to stimuli, ataxia, and progressive weakness, raise suspicion of the disease, whereas confirmation relies on appropriate laboratory methods.

In order to prevent the occurrence and spread of transmissible spongiform encephalopathies, veterinary inspections of cattle are carried out in slaughterhouses in the Republic of Serbia before and after slaughter, in accordance with the applicable legislation. In animals that meet the prescribed criteria, brain tissue samples are collected for laboratory testing for bovine spongiform encephalopathy (BSE). Particular attention is paid to the removal and safe disposal of specified risk materials that may contain the infectious agent. These measures aim to protect human and animal health and prevent potentially infected tissues from entering the food chain.

Keywords: prion, bovine spongiform encephalopathy, scrapie, neurodegenerative disease.

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
2	ISTORIJAT.....	3
3	BOVINA SPONGIOFORMNA ENCEFALOPATIJA.....	5
3.1.	Etiologija.....	5
3.2.	Epidemiologija.....	7
3.3.	Patogeneza	9
3.4.	Klinička slika	11
3.5.	Patomorfološke promene	14
3.6.	Dijagnoza	15
3.6.1.	Histopatološki pregled	17
3.6.2.	Imunohistohemijska analiza.....	17
3.6.3.	Dokazivanje Scrapie - Associated fibrils	19
3.6.4.	Western Blot	19
3.6.5.	ELISA test.....	20
3.7.	Diferencijalna dijagnoza	22
3.8.	Tretman i profilaksa	23
4	SKREJPI	26
4.1.	Etiologija.....	26
4.2.	Epidemiologija.....	31
4.3.	Patogeneza	36
4.4.	Klinička slika	40
4.5.	Patomorfološke promene	44
4.6.	Dijagnoza	45
4.6.1.	Histološki pregled	46
4.6.2.	Biopsija limfoidnog tkiva.....	47
4.6.3.	Biološki ogled	48
4.6.4.	Diskriminatorni Imunoblot	49
4.6.5.	Western Imunoblot.....	50
4.6.6.	Imunohistohemijske metode	51

4.6.7.	Brzi testovi	54
4.6.8.	In vitro metode – PMCA i QuIC.....	54
4.7.	Diferencijalna dijagnoza	56
4.8.	Terapija i profilaksa	56
5	ZAKLJUČAK	57
6	LITERATURA	58

1 UVOD

Transmisivne spongioformne encefalopatije (TSE), predstavljaju grupu retkih neurodegenerativnih oboljenja mozga koje se još nazivaju i prionske bolesti. TSE relativno brzo napreduje i najčešće dovodi do uginuća u period od nekoliko meseci do nekoliko godina. Oboljenje je uzrokovano abnormalnim oblikom proteina koji se naziva prion (skraćenica od engleskog izraza *proteinaceous infectious particle* – proteinska infektivna čestica). Prionski proteini javljaju se u dva oblika: normalni koji se nalazi u ćelijama organizma i infektivni oblik koji uzrokuje bolest. Kada se prionski protein nepravilno savije, takva promena prenosi se na normalne prionske proteine u okolnim nervnim ćelijama (neuronima), što dovodi do promene njihovog oblika, pri čemu i oni postaju infektivni za susedne ćelije. Kada nastanu abnormalni prionski proteini, oni se međusobno grupišu i stvaraju tvorevine koje oštećuju ili uništavaju nervne ćelije. Gubitak nervnih ćelija dovodi do stvaranja šupljina u mozgu, zbog kojih tkivo mozga dobija izgled sundera, što se uočava pod mikroskopom, a istovremeno nastaju i klinički simptomi za TSE. Ovo oboljenje je zbog toga dobilo naziv spongioformno što u prevodu znači “sunderast”.

Bovina spongioformna encefalopatija (BSE), naziva se još i bolest ludih krava, predstavlja hronično i afebrilno degenerativno oboljenje centralnog nervnog sistema goveda, ali je ustanovljena i kod koza kao i nekoliko divljih vrsta papkara u zoološkim vrtovima. Oboljenje je prisutno kod svih starosnih kategorija. Jedna je od najčešćih transmisibilnih spongioformnih encefalopatija životinja koje su karakteristične po veoma dugom toku inkubacije, uzrokovanju degeneracija moždanog tkiva sa vakuolizacijom ćelija i astrocitozom, kao i odsustvom imunološkog odgovora životinje uz letalitet od 100%. Smatra se da je uzrok obolenja hranjenje sa mesno-koštanim brašnom od goveda koja su obolela od spontane sporadične spongioformne encefalopatija ili od ovaca obolelih od Skrepija. Ne postoje dokazi o horizontalnom prenosu između goveda, jer inficirana goveda uneta u zapat nisu inficirala neinficirana goveda, kao ni njihove sledeće generacije. Takođe, vertikalni prenos sa bikova na telad nije zabeležen, dok je rizik kod teladi poreklom od inficiranih krava oko 10% u odnosu na neinficirane krave.

BSE karakteriše se promenama u ponašanju i to: strah u vidu izbegavanja ljudi i sakrivanja, povremena agresivnost poput ritanja prilikom muže, znaci uznemirenosti i nervoza kao što su iskolačene oči, šgrkutanje zubima, zatim nisko ili visoko držanje glave kao i oklevanja u kretanju ispred uglova ili kroz vrata. Drugi simptomi bolesti su promene u osetljivosti kao što je preosteljivost na dodir i svetlost. Može se javiti još i lokomotorne promene poput nekoordinisanih pokreta, zanošenja zadnjeg dela tela, ataksija, ležanje i pareza. Takođe, javlja se i mršavljenje, prestanak preživljanja, pad mlečnosti i alopecija. [1]

Kao kontrolna mera za BSE koristi se aktivni nadzor kod svih životinja u određenim kategorijama, kao i pasivni nadzor kod sumnjivih životinja. Takođe, u dijagnostici se vrši testiranje uzorkovanog nervnog tkiva nakon klanja histopatologijom ili testovima na prione. Od testova koristi se Western blot testiranje uzoraka mozga, imunohistohemijsko testiranje uzoraka mozga, tonzila ili trećeg očnog kapka, kao i ELISA testiranje uzoraka kičmene moždine. [1]

Sve do 2012. godine, sva goveda starija od 24 meseca morala su biti testirana na BSE, ali to je 2012. godine prekinuto, pošto se smatra da je bolest pod kontrolom. Kontrolna mera da se zabrani upotreba mesno-koštanog brašna od animalnih proteina bila je dugo na snazi, ali zbog smanjenog rizika povezanosti BSE i obolenja kod ljudi, redukovana je u većini zemalja. Akcenat se stavlja na pregled specifično rizičnog materijala kao i opreza prilikom obrade trupova i rasecanjem mesa kako ne bi došlo do unakrsne kontaminacije limfoidnim ili nervnim tkivom, te se vrši uklanjanje specifičnog rizičnog materijala kao i njegovo propisno označavanje, skladištenje i uništavanje u licenciranim pogonima. [1]

Skrejpi je infektivno, progresivno, neuro-degenerativno obolenje ovaca i koza izazvano prionima. Pored nekontrolisanog svraba u kliničkoj slici najizraženiji simptom je nedostatak koordinacije i hiperosetljivost. Karakteriše je dug period inkubacije između 1 meseca i 5 godina. Javlja se kao tipični i atipični oblik. Atipični skrejpi se razlikuje od klasičnog skrejpija po kliničkim, epidemiološkim, molekularnim i histopatološkim karakteristikama. PrP^{sc} kod atipičnog skrejpija najčešće se taloži u malom mozgu, za razliku od klasičnog kod kojeg su lezije najčešće nalaze na obeksu. Pored toga kod atipičnog skrejpija iako je dokazana infektivnost u limforetikularnom, nervnom i mišićnom sistemu, PrP^{sc} nije pronađen u perifernim tkivima. [8]

2 ISTORIJAT

Bovina spongioformna encefalopatija je progresivna neurološka bolest goveda koja podseća na Srejpri. Prvi put je dijagnostifikovana 1986. godine u Velikoj Britaniji. Dijagnostifikovano je približno 200.000 slučajeva BSE u svetu, od čega je većina prijavljena u Velikoj Britaniji, gde je tokom 1992. godine bilo prijavljeno 37.280 slučajeva tokom jedne godine. Manji broj slučajeva prijavljen je u većini evropskih zemalja, Izraelu, Japanu, SAD-u, Kanadi kao i Brazilu. Ovo oboljenje uzrokovalo je veliku posledicu po ekonomiju države. [2]

Bovina spongioformna encefalopatija je nastala hranjenjem goveda sa mesno-koštanim brašnom koje je sadržalo proizvode od inficiranih goveda iz spontano nastalih slučajeva BSE ili proizvoda od ovaca zaraženih Skrejprijem. Istraživanja pokazuju da je tih godina došlo do širenja oboljenja jer su se telad hranila sa prionski zaraženim mesno-koštanim brašnom. Epizootska BSE u Velikoj Britaniji dostigla je vrhunac u januaru 1993. sa skoro 1.000 novih slučajeva sedmično, a od tada se broj naglo smanjivao. 1995. godine bilo je 14.562 slučaja, 2000. godine 1.443 slučaja, 2005. godine 225 slučajeva, a 2010. godine 11 slučajeva, a 2015. godine svega 2 slučaja.

Epidemiološki i laboratorijski dokazi pokazuju povezanost između prionske bolesti uzrokovane kod goveda sa prionskom bolešću uzrokovane kod ljudi, a nazvane Creutzfeldt-Jakobova bolest, koja se prvi put pojavila 1996. godine u Velikoj Britaniji. Intervali između pojave prvih simptoma bolesti kod ljudi i prvog slučaja BSE odgovaraju periodima inkubacije za ljudski oblik prionske bolesti. [3]

Međutim, rizik za prenos bolesti je veoma nizak zbog barijere vrste. Kod 85% obolelih pacijenata nije bilo povezanosti sa uzročnikom BSE. [4]

Pored klasičnog tipa, 2001. godine otkrivena je i atipična forma čije je poreklo nepoznato. BSE u ovoj formi se rijetko otkriva i to kod starijih goveda bez simptoma bolesti u klanicama ili nadzorom nad uginulim govedima, što ukazuje na spontani nastanak BSE. [1]

U SAD-u je identifikovan prvi slučaj 2003. godine kod šestogodišnje krave u Vašingtonu, koja je uvezena iz Kanade kod koje je potvrđen klasični oblik BSE. Sledećih pet slučajeva bili su u atipičnoj formi BSE. Drugi slučaj javio se 2005. godine kod dvanaestogodišnje krave, treći je bio 2006. godine kod desetogodišnje krave u Teksasu, četvrti slučaj bio je 2012. godine kod desetogodišnje krave u Alabami, a peti slučaj je bio 2017. godine kod jedanaestogodišnje krave u Alabami, šesti slučaj se javio 2018. godine kod šestogodišnje krave na Floridi. Svetska organizacija za zdravlje životinja procenjuje zemlje koje podnesu zahtev i dodeljuje status rizika za BSE na osnovu istorije ove bolesti u zemlji, sprovođenju njihovih zabrana i nadzora nad BSE. U 2013. godini američki status za BSE je poboljšán na zanemarljiv rizik. U 2015. godini, utvrđeno je da se atipična forma javlja spontano po niskoj stopi u svim populacijama goveda. [5]

Uvođenjem mera kontrole i zabrane uvoza goveda iz zemalja sa BSE, kao i zabrane hranjenja životinja sa prerađevinama animalnog porekla, smanjilo je potencijalnu izloženost životinja a i ljudi prionskim obolenjima. [4]

Skrejpi je prvi put opisan kod merino ovaca uvezenih iz Španije u Englesku u 15. veku. Ime je poteklo od simptoma, tj. od karakterističnog pruritusa koji se javlja kod zaraženih ovaca. Drugom polovinom XX veka su vršena masovna istraživanja etiologije skrejpia kojima su utvrđena 4 pravila koja se odnose na ovo oboljenje:

- Inkubacioni period traje od 1 meseca do 5 godina;
- Replikacija je moguća u uslovima *in vivo*;
- Uzročnik zadržavaju 27nm filteri;
- Uzročnik ne može da se inaktivise sa 0,35% formalinom u roku od 3 meseca, ni kuvanjem u roku od 8 sati.

1988. godine u Norveškoj prvi put je uočen atipični oblik skrejpia izazvan sojem Nor98, koji je tek 2003. godine bio zvanično naučno opisan. Međutim, studije su pokazale da su se slučajevi atipičnog skrejpia pojavljivali krajem 1980-ih godina u Britaniji. [8]

3 BOVINA SPONGIOFORMNA ENCEFALOPATIJA

3.1. Etiologija

Bovina spongiformna encefalopatija predstavlja progresivni neurološki poremećaj goveda koji je rezultat infekcije agensom koga nazivamo prion. Priroda prenosivosti priona još nije jasna, ali se smatra da je agens modifikovani patogeni oblik fiziološkog proteina poznat kao prionski protein. Fiziološki protein prelazi u patogeni oblik koji zatim oštećuje centralni nervni sistem goveda. [6]

Prioni su sitne proteinske čestice koje su sastavljene od oko 250 aminokiselina. Nalaze se kod obolelih životinja od Transmisivne spongiformne encefalopatije. Reč prion je skraćenica od engleskog naziva „*proteinaceous infectious particle*“, što označava proteinsku zaraznu česticu. Način delovanja i širenja priona nije poznat, ali se zna da napadaju nervni sistem i uzrokuju neizlečiva obolenja. [7]

Prionske čestice su otporne na ultraljubičaste zrake, kao i proteazu, odnosno enzim koji cepa proteine po peptidnim vezama na aminokiseline. Otkriveno je da zaraženo tkivo sadrži dve vrste PrP (*prion-resistant protein*) i to jednu koja ne deluje razorno na tkivo PrPc (*prion-resistant protein cellular*) koji je statični i drugi PrPsc (*prion-resistant protein scrapie*) koji razara tkivo. Ova dva oblika se razlikuju po građi, tako što PrPc ima 43% α -heliksa, dok se PrPsc sastoji od 30% α -heliksa i 43% β -nabrane strukture. Pri dolasku do membrane ćelije PrPc se transformiše u PrPsc. Odnosno, fiziološka belančevina se pretvara u infektivnu. Kada nastane PrPsc deluje i na ostale PrPc i tada lančene reakcije ne prestaju. [7]

Za nastanak proteina neophodan je genom koji je izloloan kod svih sisara i on se sastoji od 45 nukleotida koji kodiraju protein od 15 aminokiselina odgovoran za nastanak PrP. Pored toga, prioni imaju mogućnost da se transformišu u bilo koji drugi oblik proteina bez genoma za šifrovanje proteina. Ovo je dokazano u eksperimentima na miševima kojima je davan veštački stvoren PrPsc koji su potom dobili TSE. [7]

Osnovna karakteristika PrPsc je otpornost na uticaje spoljašne sredine i uslove koji bi inaktivisali druge uzročnike. Rezistentan je na endogene proteaze, što predstavlja osnovu njegove agregacije u SAF (*Scrapie Associated Fibrils*). Agregacija ovih fibrila predstavlja supstrat plakova koji se javljaju u nervnom tkivu, uzrokujuću spongioformne degeneracije i disfunkcije nervnog tkiva. [8]

Klasična BSE je uzrokovana infektivnim prionima, ali je početkom 2000-ih identifikovano još dva nova oblika BSE koji su nazvani atipična BSE. Kod jednog oblika atipične BSE nalaze se fragmenti veće molekulske mase i nazivaju se „H-tip“, dok drugi ima manju molekulsku masu i naziva se „L-tip“. Prioni koji uzrokuju klasičnu i atipičnu BSE razlikuju se po svojim biohemijskim karakteristikama, epidemiologiji i neuropatološkim lezijama. [2]

Prioni su otporni na hemijske i fizičke faktore za razliku od drugih uzročnika. Naročito su otporni na uobičajene metode koje vrše degradaciju nukleinskih kiselina i proteine, kao što su visoka temperatura, ultraljubičasti zraci, enzimi proteaza. Otporni su na sterilizaciju na 360°C u trajanju od sat vremena. Njihova denaturacija se vrši pri temperaturi višoj od 1.000°C. Nisu osjetljivi na dezinficijense, ne sadrže genetski materijal i imaju dug period inkubacije. [9]

3.2. Epidemiologija

Bovina spongiformna encefalopatija je nenasledna bolest. Na pojavu ovog obolenja ne utiču genetske različitosti domaćina. Pored toga, do danas nije uočena nijedna rasna predispozicija, obzirom da od BSE obolevaju sve rase goveda. Bolest se javlja tokom cele godine i nije sezonski izražena. [10]

Epizootiološkim istraživanjem utvrđeno je da su izvor infekcije za sva oboljela goveda bila peletirana hrana koja je sadržavala mesno-koštano brašno poreklom od preživara, naročito od ovaca uginulih od Skejpija. Obzirom da je BSE klinički i histopatološki sličan Skrejpiju, doveden je u vezu sa Skrejpijem u svim zemljama gdje su se pojavili zajedno. [10]

Izvor infekcije su tkiva koja vode poreklo od inficiranih životinja a to su: mozak, produžena moždina, kičmena moždina, oči, tonzile, timus, slezina, creva, dorzalne i trigeminalne gagnije, kao i proizvodi u koje su dospela ova tkiva. Mleko i mlečni proizvodi smatraju se sigurnim za ishranu ljudi čak i onda kada potiču od životinja sa ispoljenom kliničkom slikom, a što se tiče goveđeg mesa, samim mišićima nije moguće preneti bolest osim ako dođe do unakrsne kontaminacije mesa sa infektivnim materijalom. [9]

Stepen pojave bolesti je veći kod mlečnih rasa goveda, pošto se u njihovoj ishrani koriste veće količine proteinskih hraniva. [11]

Većina slučajeva sa BSE dijagnostifikovana je kod goveda starih 3-6 godina, do sada najstarije obolelo prijavljeno goveće bilo je starosti od 15 godina, a najmlađe 22 meseca. Period inkubacije iznosi približno 2 godine do 8 godina. Nakon unošenja štetnog agensa on se replikuje u Pajerovim pločama tankog cevca, a zatim migrira preko perifernih nerava u CNS, gde se akumulira i remeti normalnu neuronsku funkciju. [2]

Klasična BSE se razvija kao rezultat izloženosti prionima putem kontaminiranih proteina životinjskog porekla u obrocima goveda. Telad rođena od inficiranih goveda imaju veći rizik od dobijanja BSE nego telad rođena od neinficiranih, ali ovaj način prenosa je od manjeg značaja u odnosu na infekcije dobijene putem kontaminirane hrane. BSE takođe nema polne i rasne predispozicije.

Atipični slučajevi BSE su opisani i u zemljama gde nije bilo klasične BSE epidemije. Životinje obolele od atipične BSE su bile relativno stare i istraživanjima se došlo do hipoteze da je atipična BSE posledica spontane transformacije prionskih proteina i da nije povezana sa unosom hrane kontaminirane prionima. [2]

Obolenje kod ljudi nastaje konzumacijom proizvoda od goveda koja su zaražena sa BSE, kao što su hamburgeri, viršle, kobasica kao i drugi proizvodi sa delovima mozga, kičmene moždine i drugih rizičnih tkiva. Kod ljudi konzumacija kontaminiranog mesa goveda uzrokuje Creutzfeldt-Jakobovu bolest, dok u nekim plemenima, prionska bolest nastaje konzumacijom ljudskog mesa i tada se radi o Kuru bolesti. [9]

Zahvaljujući sprovođenju efikasnih mera kontrole, stepen nastanka klasične BSE se znatno smanjio, kao i njen globalni sanitarni uzicaj i rizik po javno zdravlje. [11]

3.3. Patogeneza

Nakon ingestije infektivnog materijala, prion se može dokazati prvo u tonzilama, retrofaringealnim i mezenterijalnim limfnim čvorovima, u intestinalnom traktu i slezini. Ustanovljeno je da se prion prvo locira u limfoidnim strukturama intestinalnog trakta, a kasnije odlazi u centralni nervni sistem. Bez obzira na način infekcije, infektivne čestice, odnosno prioni se prvo lokalizuju u regionalnom limfnom tkivu. U početnoj fazi infekcije, ulogu imaju dendritične ćelije koje svojim nastavcima fiksiraju i akumuliraju prione. Jedan od osnovnih načina prodora priona u moždano tkivo je preko dorzalnih motornih jedara vagusa. [8]

Iako je BSE obolenje koje rezultira neurološkim defektima, njena patogeneza se zapravo u početku odvija izvan nervnog sistema. Smatra se da glavnu ulogu u prodoru priona u organizam imaju Pajerove ploče u tankim crijevima. Infektivnost Pajerovih ploča je primećena već nakon četiri meseca po infekciji, gde je došlo do akumuliranja priona, mada se PrPsc može akumulirati i u folikularnim dendritskim ćelijama, ali znatno manjeg stepena. Na osnovu ovoga, došlo se do zaključka da je primarno mesto replikacije priona zapravo Pajerove ploče u ileumu. Sve ovo je dokazano u eksperimentalnim uslovima, dok u prirodniim infekcijama infektivnost nije mogla da se uoči jer se radilo o manjim infektivnim dozama u odnosu na eksperimentalne uslove. [12]

Tokom 1990-tih vršena su istraživanja u Velikoj Britaniji, u kojima su proučavani vremenski i prostorni razvoj infektivnosti i patoloških promena kod goveda posle ingestije sa dozama od 100 g homogenizovanog mozga od goveda koja su prirodno inficirana sa BSE, a ogledna goveda su bila ubijana nakon ingestije i infektivnost u tkivima je naknadno određena sa određenim testovima infektivnosti intracerebralnom i intraperitonealnom inokulacijom laboratorijskim miševima i nakon toga je vršena intracerebralna aplikacija govedima kako bi se isključio efekat barijere za vrstu.

BSE prion se širi putem dva puta od gastrointestinalnog trakta do CNS-a i to prvim preko splanhičkih nerava, kompleksa mezenteričnog i celijačnog gangliona i drugim putem preko kaudalno grudnog dijela kičmene moždine i preko vagusnog nerva.

Nakon oralno inficirane teladi, infektivnost je otkrivena u distalnom ileumu, u Pajerovim pločama ali nije bila vidljiva infekcije drugih organa. Infektivnost je bila identifikovana 4 meseca po infekciji i bila nepromjenjena nakon 24 meseca po infekciji ne otkivajući opadanje ili uklanjanje agensa iz Pajerovih ploča. Infektivnost je takođe bila vidljiva u grliću materice i torakalnoj dorzalnoj gagliji 32 do 40 mjeseci posle infekcije ali i u trigeminalnoj gagliji od 36 do 38 mjeseca.

Tragovi infektivnosti su dokazani u koštanoj srži grudne kosti kod stoke ubijene 38 meseci po infekciji. Najranije prisustvo abnormalnog PrP u CNS-u pojavilo se 32 meseca po infekciji bez bilo kakve tipične dijagnostifikovane histopatološke promene u mozgu. [13]

Klinički simptomi počinju da se javljaju kada koncentracija priona postane ista u slezini i mozgu. Posle ovog perioda koncentracija u mozgu se povećava sve do uginuća životinja. U mozgu, prioni izazivaju vakuolizaciju i degeneraciju neurona kao i hipertrofiju i hiperplaziju astrocita. [8]

Prioni ne izazivaju imuni odgovor u organizmu kao ni zapaljenske reakcije jer nema stvaranja interferona, nema patoloških promjena u cerebrospinalnoj tečnosti, a uobičajene analize krvi su u granicama normalne vrijednosti. [9]

3.4. Klinička slika

BSE zbog dugog perioda inkubacije od 2 do 8 godina pogađa goveda starosti od dve godine do trinaest godina, sa najvećim brojem slučajeva u periodu od četvrte do pete godine života. Ranim epidemiološkim istraživanjima, utvrđeno je da su pogođena goveda bila hranjena sa hranom bogatom proteinima animalnog porekla. Bolest je bila u manjoj mjeri zastupljena kod goveda hranjenih na pašnjacima, jer se u njihovoj ishrani koristi veoma mala količina koncentrisanih hraniva bogatih proteinima animalnog porijekla, za zaliku od mlečnih rasa goveda koje se hrane sa velikom količinom koncentrata i drže se u zatvorenim stajama.

Rani znaci oboljenja uključuju hronični gubitak težine i smanjenje prinosa mleka tokom četiri do šest nedelja. Zaražena goveda se odvajaju od stada, imaju pogrbljen i širok stav i uši usmerene unazad, stomak im je uvučen i prisutno je udubljenje gladne jame. Kako bolest odmiče, goveda manje preživaju, postaju anksiozna, uplašena i osjetljiva na dodir, zvučne i vizuelne stimulanse. Kada su u stadu, obolela goveda guraju druge krave sa snažnim udaranjem glave. Imaju poteškoće pri hodanju jer udaraju na prepreke i pokušavaju preskočiti niske predmete, prisutno je i proklizavanje ekstremiteta naročito na mokrim podlogama. [10]



Slika 1 Klinička slika BSE [18]

Bolest je u početku podmukla i vidljivi klinički simptomi napreduju tokom nekoliko nedelja u trajanju od 1 do 6 meseci. Od vidljivih simptoma najizraženiji su simptomi u vidu promena u ponašanju, promene u temperamentu, držanju, čulima i kretanju ali simptomi variraju iz dana u dan. Goveda koja pokazuju kliničke simptome u vidu promene u ponašanju su sumnjiva na BSE, ali nemaju sva goveda u početku kliničke simptome promene u ponašanju, tako da prinudno zaklana goveda zbog smanjene proizvodnje mogu biti pozitivna na BSE. [13]

Zaražena goveda su dezorijentisana i često neprekidno gledaju u zamišljene predmete. Druge promene u temperamentu uključuju izbegavanje drugih krave, udaraju tokom muže i pokazuju otpor prilikom rukovanja sa njima, ali i agresivno ponašanje prema čoveku i drugim govedima. Kod nekih krava je prisutno preterano lizanje, prisutna je često i bradikardija povezana sa oštećenjem vagusa. [13]



Slika 2 Pogrbljen i široki stav goveda sa BSE [3]



Slika 3 Širok stav goveda sa BSE [19]

Prilikom kliničkog pregleda javlja se uznemirenost i nervoza životinje. Relativno rano u početku bolesti primećuje se skraćeni korak, ljuljanje i potreškoće prilikom promjene smjera kretanja, zbog čega je ovo jedna od glavnih stvari koje se prate prilikom transporta životinja. Kao test, preporučuje se proveravanje reakcije goveda na iznenadnu buku, svetlost, nagli pokret i dodir. [13]

Opažaju se ponovljene kontrakcije pojedinih mišića u vidu trzaja mišića. Zahvaćene skupine mišića su: *musculus biceps brachii*, *musculus supraspinatus*, *musculus infraspinatus*, *musculus sternocephalicus* i *musculus quadratus femoris*. Kontrakcije zahvaćenih mišića traju do 30 sekundi i prelaze sa mišića na mišić, sve dok se ne javi podrhtavanje zglobova. Karakteristično kod oboljelih životinja je stenjanje i ponekad škripa zubima.

Spinalni refleksi su normalni, refleks analnog sfinktera je snažan, a kokcidualni mišići su hipertonični. Tjelesna temperatura je u fiziološkim granicama, disanje je ubrzano prosječno oko 60 udisaja u minuti. Krvna slika, ukupna i diferencijalna je u fiziološkim granicama, a koncentracija serumskih globulina je povišena.

Vremenom simptomi napreduju, javljaju se česti padovi koji rezultiraju rane na koži prednjih ekstremiteta, oštećenje tibiotarznog zgloba prilikom udaranja u izmuzišta ili ograde u stajama. Bolest protiče u hroničnom toku, nekoliko nedelja ili mjeseci, a na kraju bolesti životinja leži na sternumu i više se ne može kretati. Bolest uvijek završava letalno. [14]



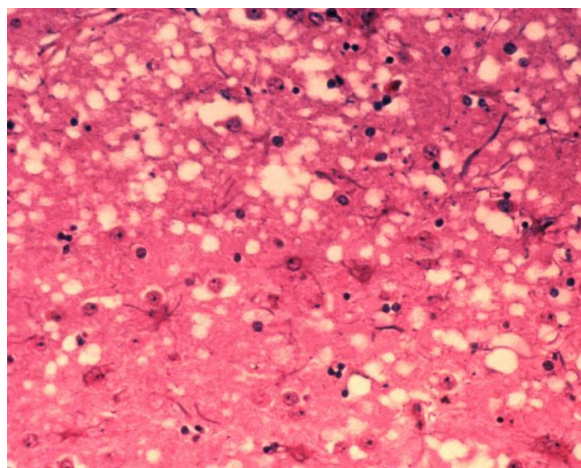
Slika 4 Uznapredovao stadijum bolesti, krava leži u sternalnom položaju i ne može da ustane [12]

3.5. Patomorfološke promene

Bovina spongiformna encefalopatija je bolest koja ne uzrokuje nikakve karakteristične makroskopske promene, kao ni inflamatorne promene niti demijelinizaciju. Karakterističan histopatološki nalaz prionskih bolesti jesu intracitoplazmatska vakuolinizacija neurona, hipertrofija i hiperplazija astrocita, kao i nalaz neprirodnih fibrila. Neuronu sadrže pojedinačne ili mnogobrojne intracitoplazmatske vakuole. [15]

U nekim slučajevima kod kojih je bila prisutna generalna slabost, pored karakterističnih histopatoloških promjena nervnog tkiva, primećuje se i kaheksija organizma. U sivoj masi je primetna vakuolizacija, degeneracija neurona i njihovo propadnje uz hipertrofiju i hiperplaziju astrocita. Najizraženije promene su u srednjem mozgu, moždanom stablu i cervikalnom delu kičmene moždine, a retko se promene mogu proćaci u korteksu velikog i malog mozga, hipokampusu, odnosno amonovim rogovima i bazalnim ganglijama. [8]

Sadržaj vakuola u neuronima ne oboji se, nego ostaje bistar nakon bojenja fiksiranih preparata na glikogen. U parenhimu moždanog stabla uočava se perivaskularna ćelijska infiltracija mononukleara. U ekstraktima mozga bolesne krave elektronskim mikroskopom dokazani su neprirodni fibrili kakvi se nalaze u mozgu ovaca oboljelih od Skrepija, a zovu se SAF (*scrapie associated fibrils*). [14]



Slika 5 Patohistološki nalaz mozga govećeta sa BSE [9]

3.6. Dijagnoza

Kao i kod svih transmisivnih spongiformnih encefalopatija, do danas nema mogućnosti dokazivanja oboljenja kod živih, a sumnjivih jedinki. Najčešći način dokazivanja jeste morfološki, odnosno histopatološki, dokazivanje prisustva karakterističnih neurodegenerativnih promena. Pored ove metode, dokazuje se i osnovni patološki supstrat PrPsc molekul, koji se dijagnostifikuje relativno brzim i pouzdanim metodama kao što su Western blot, ELISA i imunohistohemijske tehnike. Pored dokazivanja prisustva PrPsc, ove metode se koriste u programima monitoringa i praćenja pojavljivanja oboljenja u regionu ili državi.

Najpreciznija metoda dokazivanja BSE jeste post mortem, ali pored toga na osnovu kliničke slike možemo posumnjati na osnovu najčešćih simptoma i to:

- Udaranje nogama u boks za izmuzivanje;
- Preosjetljivost na dodir ili zvuk;
- Skrivanje pogleda;
- Panično reagovanje na nadražaje;
- Odbijanje ulaska u boks za izmuzivanje;
- Neprirodan položaj i neprirodni pokreti ušne školjke, pojačana paznja;
- Smanjena mlečnost;
- Škrgutanje zubima kao i
- Promjena temperamenta.

Takođe, na BSE možemo posumnjati kada se pored ovih simptoma javi i gubitak kondicije, ataksija prednjeg ili zadnjeg para ekstremiteta, slabost nogu, kao i bilo kakve promjene u ponašanju, tremori, gubitak tjelesne mase, pareza i pad životinje uz otežano podizanje. [8]

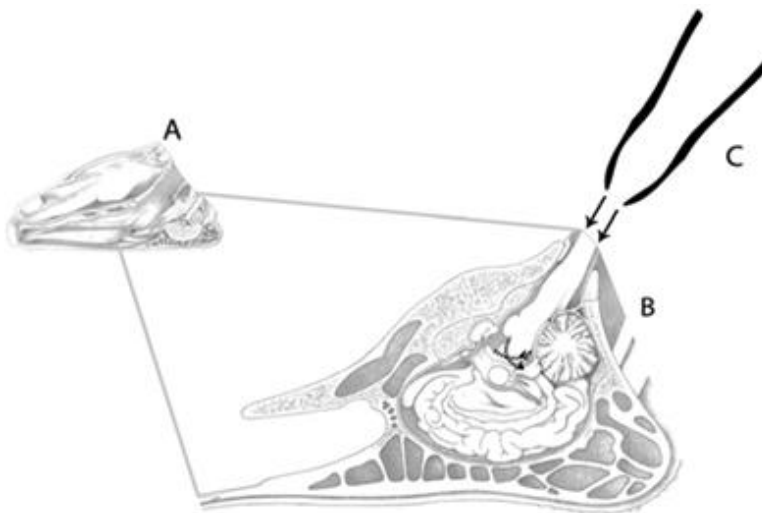
Kod sumnje na BSE radi se nekoliko testova kod žive životinje, kako bi se potvrdila sumnja na BSE. Preporučeno je testiranje životinje na iznenadnu buku, iznenadnu svetlost, nagle pokrete i iznenadne dodire. [13]

Testiranje iznenadnom bukom se vrši uz pomoć dva metalna predmeta tako što se udara jedan o drugi ispred životinje i ovo je test praska, a test iznenadne svetlosti se testira pretežno uz pomoć blica kamere, dok se nagli pokreti testiraju mahanjem predmeta prema kravi sa bliske udaljenosti i test iznenadnog dodira, testira se dodirivanjem životinje u predelu zadnjih ekstremiteta sa štapom. [13]

Abnormalne reakcije na ove testove uključuju preplašenost, zabacivanje glave, pojačanu salivaciju, šmrkanje nozdrva, bežanje ili panično kretanje u krug i trzanje prilikom dodirivanja. Ovi testovi imaju velikog efekta u potvrđivanju sumnje na prisustvo BSE kod goveda, naročito onih koji su sumnjivi na BSE jer su imali istoriju promena u ponašanju ali nisu pokazivali abnormalnosti u hodu. [13]

Kod sumnjivih goveda na BSE, a naročito onih koji su sa karakterističnim simptomima bolesti uz potvrdne testove sa abnormalnim reakcijama na iste, vrši se hitna eutanazija i uzimanje svežeg uzorka nervnog tkiva u što kraćem vremenskom periodu. [8]

Prva faza u dijagnostici jeste uzimanje uzoraka centralnog nervnog sistema i naknadno ispitivanje uzoraka tkiva na prisustvo PrPsc. Kao uzorak uzima se moždano stablo na nivou obexa, pazeći da se ne ošteti. Nophodno je uzeti 2 - 4 g, a ovoj oblasti se može pristupiti kroz *foramen magnum*. [16]



Slika 6 Način uzorkovanja: A) postaviti glavu naopako i B) proći kroz foramen magnum i uzeti uzorak C) pomoću kliješta za uzorkovanje [16]

Nakon uzimanja uzorka vrši se fiksiranje uzorka, njegovo sječenje i priprema preparata za histološko bojenje sa hematoksilin/eozin, a u moždanom tkivu se traži prisustvo karakterističnih spongioformnih promjena i vakuola. Pored toga, primjenjuju se i imunohistohemijske metode koje su brže, osjetljivije i mogu registrovati oboljenje nekoliko mjeseci prije javljanja kliničkih simptoma i zbog toga se one najviše primjenjuju u zemljama gdje je registrovano oboljenje goveda sa BSE. Pored toga, koriste se i metode na bazi elektroforetskog razdvajanja karakterističnih proteina kao što je Western blot i ELISA tehnikama. Za dokazivanje SAF koristi se elektronska mikroskopija. [8]

3.6.1. Histopatološki pregled

Histološki pregled se vrši na formalinom fiksiranim, parafinisanim preparatima mozga koji su obojeni sa hematoksilinom i eozinom. Histološke promene u centralnom nervnom sistemu, vidljive su pod optičkim mikroskopom u vidu spongioformnih promjena poput vakuola u sivoj masi mozga, astrocitoze i neuronske degeneracije. Za dijagnozu, najpreciznije je dio obexa i nukleus kičmenog kanala trigeminalnog nerva. Takođe, vakuole mogu biti prisutne i u sivoj masi srednjeg mozga i blage spongioformne promjene mogu biti primjetne na nivou talamusa. Kod prirodno inficiranih goveda, spongiozne promjene se ne nalaze u moždanom stablu, kao niti u olfaktivnoj sluzokoži a ni u nivou hipokampusa. [16]

3.6.2. Imunohistohemijska analiza

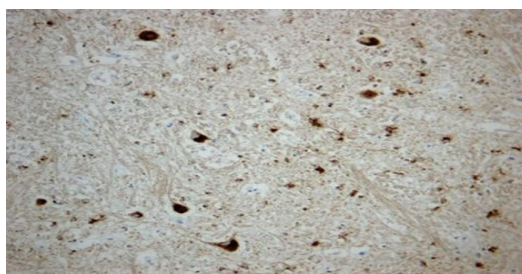
Imunohistohemijska analiza vrši se na moždanom tkivu koje je fiksirano u parafinu kako bi se istaklo prisustvo akumulacija PrPsc. Uzorci su deparafinisani, rehidrirani, predhodno tretirani sa 98% mravljom kiselinom i autoklavirani na 121°C a zatim inkubirani na 4°C sa monoklonskim primarnim antitijelima, inkubirani sa avidin-biotin-peroksidazom, reagovani sa hromogenom 3-3' diaminobenzidinom i kontra obojen sa *Mayer's hemalum*.

Različiti imunohistohemijski tipovi taloženja PrPsc mogu se primetiti u mozgu goveda koji je zahvaćen sa BSE:

- Obeležavanje glijalnog tipa sa PrPsc naslagama koje se granaju iz jezgra glijalnih ćelija na njihovim izdancima dajući im zvezdast izgled, prisutno je centralno u sivoj masi lamina kao i unutar medijalnih nukleusa u kori mozga, talamusu i u obexu.
- Granularni tip karakteriše se granularnom akumulacijom PrPsc obično u sivoj masi dorzalno od vagusa, kao i u nukleusima talamusa.
- Intranuronski tip sa PrPsc karakteriše se sa imunoreaktivnošću i cijeloj neuronskoj citoplazmi dorzalno od jezgra vagusnog nerva, u retikularnoj formaciji, vestibularnom kompleksu, kao i u hipotalamusu.
- Perineuronski tip se sastoji od PrPsc depozita oko individualnih neuronskih jezgara bazalnih ganglija i u dorzalnom dijelu oko motornog jezgra vagusa.
- Linearni trakt karakteriše se naslagama PrPsc duž neuronskih pocusa, posebno na nivou retikularne formacije moždanog stabla.
- Koalescentni tip nastaje spajanjem granularni PrPsc naslaga kako bi se formirale amorfne ili mrežaste mase.
- Intraglijalni tip sa finim tačkastim PrPsc pored glijalnih ćelija,

Kod prirodno inficiranih goveda karakteristično je prisustvo taloženja PrPsc u rostralnijim dijelovima mozga u odnosu na goveda inficirana ingestijom kontaminirane hrane.

Karakteristika kod BSE jeste prisustvo PrP pozitivnih amiloidnih plakova koji se pojavljuju kao guste, jednocentrične ili rijetko multicentrične okrugle strukture prečnika 25 mikrometara sa blijedim jezgrom i tamnom radijalnom periferiom, prisutni u talamusu i u dubljim slojevima moždane kore, kao i u olfaktivnoj sluzokoži. [16]



Slika 7 Imunohistohemijski nalaz PrPsc kod BSE [16]

3.6.3. Dokazivanje Scrapie - Associated fibrils

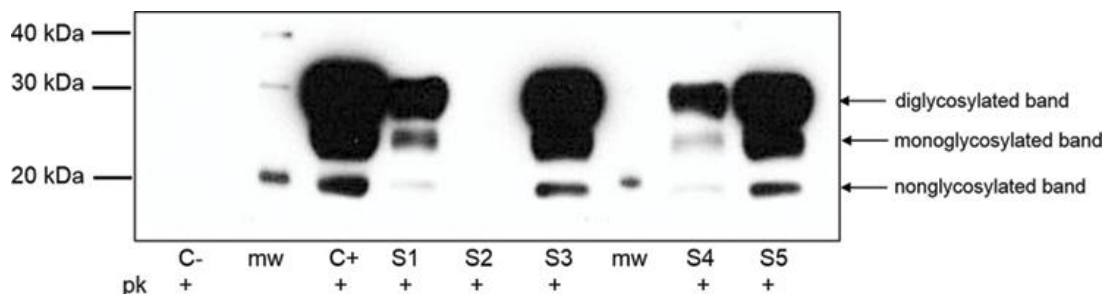
Uz pomoć elektronske mikroskopije, moguće je videti fibrile koji su povezani sa BSE, odnosno SAF koji se drugačije naziva Scrapie-associated fibrils. Sastoji se od PrPsc i ekstrahuju se iz svežeg, zamrznutog ili formalinom fiksiranog nervnog tkiva uz pomoć tretmana homogenizacije, diferencijalnog centrifugovanja i digestije proteinazom K i obojene sa fosfovolframnom kiselinom. Posmatranje pod elektronskim mikroskopom omogućava da istaknemo fibrile sa jednostavnom ili dvostrukom heliks strukturom dužine 100-500 nanometara.[16]

3.6.4. Western Blot

Western blot je imunobiohemijska tehnika koja se koristi u dijagnostici prionskih bolesti. Koristi se za potvrđivanje sumnjivih slučajeva identifikovanih pasivnim ili aktivnim nadzorom kod sumnje na BSE. Ova tehnika se zasniva na imunodetekciji PrPsc na nivou produžene moždine. Može se primjeniti na svježa, smrznuta kao i autolitička tkiva. Ima sličnu osjetljivost kao i imunohistohemijske metode i Western blot je metod izbora sa imunohistohemijskim metodama za potvrdu sumnjivih slučajeva. Veoma je osjetljiva metoda koja koristi 2-4 g uzorka i nekoliko koraka za koncentrisanje PrPsc.

Takođe, postoji protokol SAF-imunoblotting koji uključuje pripremljeni homogenat iz moždanog stabla i varenje uzoraka proteinkinazom K. Nakon koraka ultracentrifugiranja, peleta sa rastvorima Laemmil puferu i ekvivalent od 10 mg vlažnog tkiva stavlja se na SDS-poliakrilamidni gel i nakon razdvajanja proteini se prenose na PVDF membranu. Detekcija PrPsc se vrši pomoću monoklonskog antitijela anti-PrP, a prisustvo imunosignala je otkriveno anti-mišijim IgG konjugovanim fosfatazom, razvijenim korišćenjem sistema hemiluminiscencije i vizualizovanim na hiperfilmskom ECL.

Kod pozitivnih slučajeva, potvrdni Western blot pokazuje prisustvo PrPsc okarakterisan elektroforetskim uzorkom koji se sastoji od tri trake i odgovara di-, mono- i neglikozilovanim oblicima. PrP signali nisu prisutni kod slučajeva goveda koji su potvrđeni kao negativni, pošto PrPsc biva potpuno svaren od strane proteinaze K. Primjena ove metode je veoma važna za procjenu molekularnih karakteristika PrPsc kako bi se pravila razlika između H i L tipa BSE.[16]



Slika 8 Western blot analiza pozitivnih i negativnih slučajeva BSE. C-:negativna kontrola BSE, C+: pozitivna kontrola BSE; C1,C3,C4 i C5: pozitivni BSE uzorci; C2: negativan BSE uzorak. Mv: molekularni markeri. Imunodetekcija je izvedena monoklonskim antitelom

3.6.5. ELISA test

Enzyme-linked immunosorbent assay ili skraćeno ELISA test za PrPc je ključan dio dijagnostičke BSE. Uključuje upotrebu specifičnih antiitjela koja se vezuju za normalni prionski protein PrPc prisutan u moždanom tkivu životinja sa BSE. [2]

Jedna studija opisala je kvantitativni ELISA test koji je uključivao antitijela protiv epitopa PrP otpornog na proteazu da bi se izmjerila količina PrP u moždanim tkivima životinja sa BSE i normlanim kontrolama. U preparatima nativnog tkiva nađena je mala razlika između ove dvije grupe. Međutim, nakon tretmana tkiva toplotom i gvanidin tiocijanatom, ELISA je razlikovala PrPsc specifičan za BSE od PrPc u homogenatima goveđeg mozga.

ELISA test za PrPsc uključuje nekoliko korakak:

- 1) Prevlačenje ELISA ploče ekstrahovanim PrPc i ovo je početni korak u ELISA proceduri. Ploča je obilježena ekstrahovanim PrPc iz moždanog tkiva.
- 2) Korišćenje antitela koja se specifično vezuju za normalni prionski protein, a ova antitela su dizajnirana da prepoznaju i vezuju se sa PrPc i dodaju se na obilježenu ELISA ploču.
- 3) Inkubacija sa primarnim antitelom: ELISA ploča se inkubira sa primarnim antitelom dizajniranim za prepoznavanje i vezivanje za PrPc.
- 4) Pranje nevezanih materijala: nevezani materijali se ispiraju da bi ostali samo PrPc i primarno antitelo na ploči.
- 5) Dodavanje sekundarnog antitela: dodato je sekundarno antitelo, povezano sa enzimom, koje se vezuje za primarno antitelo i formira kompleks.
- 6) Dodavanje supstrata za povezani enzim: doda se supstrat za povezani enzim i enzim katalizuje reakciju koja proizvodi mjerljivu promenu boje.
- 7) Merenje intenziteta promjene boje: mjeri se pomoću spektrofotometra a količina PrPc u uzorku je direktno proporcijalna intenzitetu boje.
- 8) Analiza rezultata: rezultati se analiziraju a određivanje se vrši na osnu unapred definisanog praga i ako je signal ispod praga to ukazuje na prisustvo PrPc, što je normalni oblik prionskog proteina.

Nakon skrininga PrPc, laboratorije prelaze na dodatne potvrđne testove kao što su imunohistohemija ili Western blot da bi se specifično identifikovali i okarakterisali abnormalni PrPsc povezani sa BSE. [17]

3.7. Diferencijalna dijagnoza

Pošto BSE u razvoju kliničke slike ima dosta sličnosti sa mnogim drugim oboljenjima centralnog nervnog sistema, naročito onima koja pri prvim znacima razvoja kliničke slike mogu da ukažu na BSE, poput tremora, češanja, pojačanog samolizanja nosnog ogledala i anksioznosti, sa oboljenjima čiji su uzročnici živi agensi, najvažnije je da se obavi trijaža onih stanja koja imaju sličnost sa encefalopatijama metaboličkog ili toksičkog porijekla. Ako se kod preduzete terapije kod sekundarnih encefalopatija simptomi ublažavaju i organizam vraća u prvobitno stanje, odnosno onda kada se otkloni uzročnik, nastaje povoljna prognoza, dok u slučaju sa BSE iz dana u dan dolazi do ireverzibilne progresije neuroloških simptoma. Kod infektivnih oboljenja, često je prisutna povišena tjelesna temperatura, kod bakterijskih oboljenja javlja se leukocitoza dok je leukopenija prisutna kod virusnih oboljenja i u takvim slučajevima možemo da izolujemo uzročnika, što nije slučaj za BSE. [14]

Takođe, u slučaju Listerioze, češći simptomi su nenormalan položaj glave, hodanje u krug, ptoza gornjeg kapka, oslanjanje i češanje glave o tvrde predmete, dok u slučaju meningitisa i/ili encefalitisa često je prisutno sljepilo ili stalno ležanje. [8]

Diferencijalna dijagnoza uključuje:

- Bjesnilo
- Hipomagnezijemija
- Nervna forma ketoza
- Neoplastične promjene u moždanom tkivu
- Listerioza
- Intoksikacija olovom, gutanje toksičnih biljaka ili gljiva
- Encefalopatije kao posljedica slabosti funkcije jete ili bubrega
- Druge virusne i bakterijske infektivne neurološke bolesti.

Za razliku od ovih diferencijalnih dijagnoza, BSE obično ima spor početak kliničkih znakova sa produženim i progresivnim kliničkim tokom. Veterinari koji sumnjaju na BSE dužni su kontaktirati nacionalnu veterinarsku službu i obezvjediti da se izvrše konačni post-mortalni dijagnostički testovi. [2]

3.8. Tretman i profilaksa

Do sada ne postoji nijedan vid terapije koja bi omogućila izlječenje kod prionskih bolesti. Prognoza je uvek nepovoljna, jer se završava uginućem. Bovina spongioformna encefalopatija je obolenje čija se kontrola i profilaksa razlikuje u odnosu na klasične epizootiološke principe koji važe za ostala infektivna obolenja kod životinja. Osnovne karakteristike, načini prenošenja kao i mogućnost izazivanja obolenja kod ljudi i nemogućnost sigurne dijagnoze obolenja kod živih životinja, uslovili su da se kontrola BSE sprovodi na dugotrajnom praćenju većeg broja generacija onih populacija životinja u kojima su ustanovljeni slučajevi bolesti. Na osnovu poznatih kriterijuma, formirane su grupe zemalja, epizootioloških područja, na osnovu kojih se definiše status pojedinih zemalja.

Ovi statusi su određeni na osnovu kriterijuma kao što su:

- Procena rizika pri čemu se u obzir uzimaju sadašnji i prošli prisutni činioci pojavljivanja BSE;
- Program obaveštavanja i upoznavanja veterinara, farmera, stočara i radnika u transportnim organizacijama, prometu, trgovini i klaonicama, pri čemu se posebna pažnja posvjećuje ranom prijavljivanju sumnje da se radi o neurološkom poremećaju odabranih goveda;
- Obavezno prijavljivanje i ispitivanje svih slučajeva sumnje na BSE;
- Sistem monitoringa i praćenja podataka koji se naročito odnose na rizike kao što je praćenje svih podataka u proteklih 7 godina;
- Ispitivanje tkiva mozga i ostalih tkiva koja se skupljaju tokom sprovođenja sistema praćenja pojavljivanja i podataka dobijenih na osnovu procjene rizika.

Na osnovu ovih kriterijuma, definisane su:

- Zemlje i/ili zone slobodne od BSE-a;
- Zemlje i/ili zone uslovno slobodne od BSE-a;
- Zemlje i/ili zone najmanjeg rizika od BSE-a;
- Zemlje i/ili zone srednjeg rizika od BSE-a;
- Zemlje i/ili zone srednjeg rizika od BSE-a. [8]

U početku se koristio pasivni nadzor kao kontrolna mera ove bolesti, i ukoliko posumnjamo na BSE, obavezno je prijavljivanje, posle čega sledi eutanazija sumnjive životinje zbog nekontrolisanog toka i napretka bolesti koja ugrožava dobrobit životinje i bezbjednost vlasnika, kao i spaljivanje zaraženog trupa.

Danas se koristi aktivni nadzor koji je prvobitno bio usmjeren ka zaklanim životinjama koje su imale neurološka oboljenja, kao što je slučaj kod sumnji na bjesnilo, padova, prinudnih klanja, kao i sva goveda preko 30 mjeseci, što zavisi od propisa, koji se koriste za ishranu ljudi.

Sprovođenjem aktivnog nadzora zaklanih goveda, uz pomoć potvrdnih testova poput imunohistohemije i histoloških preparata, sprečava se da zaražen trup dospije u pogone za preradu mesa koje se koristi u ishrani ljudi. Danas, prosek starosti slučajeva kod kojih je prisutna BSE je preko 11 godina. Većina zemalja, u novije vrijeme podigli su starosnu kategoriju za testiranje do 72 mjeseca za zdrava zaklana goveda, ali u nekim zemljama se i dalje testiraju sva goveda starosti preko 30 mjeseci.

Kontrolni programi mera koriste sledeće pretpostavke:

- Infekcija i bolesti kod goveda je nastala putem hranjenja kontaminirane hrane koja sadrži inficirano mesno-koštano brašno;
- Izvor zaraze goveda može biti eliminisan efektivnom zabranom za hranjenje zaraženom hranom;
- Nema značaja u horizontalnom ili vertikalnom prenosu bolesti.

Na osnovu ovoga, većina zemalja je uspostavila zabranu hranjenja preživara proteinima za preživare. Daljim istraživanjima ustanovljeno je da su telad rođena poslije ove mere bila zaražena pošto je došlo do unakrsne kontaminacije u mlinovima za stočnu hranu, nakon čega je u ishrani preživara zabranjena upotreba proteina animalnog porekla.

Infekcija je prisutna u tkivima koja spadaju u specifično rizičan materijal a to su: mozak, kičmena moždina, oči, krajnik, timus, slezina i crijeva, koji se uklanjaju iz trupova prilikom klanja. Uklanjanjem specifično rizičnog materijala štiti od rizika koji predstavljaju goveda koja možda posjeduju BSE ali ne pokazuju kliničke simptome.

Takođe, uvedena je i zabrana da proizvodi koji su kontaminirani sa specifično rizičnim materijalom ne smeju biti u lancu ishrane ljudi i ovo je zapravo najvažnija mjera bezbjednosti hrane prilikom zaštite za javno zdravlje. Međutim, ovo nije dovoljno pošto se prilikom omamljivanja goveda sa metkom iz pištolja dovodi do stvaranja rupe u lobanji i širenja mozga unutar trupa kao i širenja krvlju u plućno tkivo i druge dijelove organizma. Takođe, razdvajanje trupa po dužini kičmene moždine mogu rezultirati značajnom kontaminacijom trupa i okoline u klaonici. Na osnovu prenosa i infektivnosti kod oglednih goveda, goveda ispod 30 mjeseci starosti se smatraju da imaju veoma mali rizik da budu inficirana, tako da se u nekim zemljama uvodi zabrana da se goveda starosti preko 30 mjeseci nađu u ishrani ljudi. [13]

Specifično rizični materijali kod goveda po kategorijama su:

- Sve starosne kategorije: tonzile, poslednja 4 metra tankog crijeva, slijepo crevo i mezenterijum;
- Goveda starija od 12 mjeseci: dodatno lobanja (isključujući donju vilicu, ali uključujući mozak i oči), kao i kičmena moždina;
- Goveda starija od 30 mjeseci: kičmeni stub uključujući dorzalne korjene ganglija (ali isključujući pršljenove repa, spinalne i poprečne izdanke cervikalnih, torakalnih i lumbalnih pršljenova kao i medijalni greben i krila sakralne kosti). [1]

U skladu sa Kodeksom zdravlja kopnenih životinja, efikasna strategija za preventivu BSE i smanjenje rizika od izlaganja ljudi uključuje:

- Zabranu mesno-koštanog brašna u hrani za preživare;
- Dijagnostifikovanje kliničkih sumnjivih životinja (pasivni nadzor);
- Dijagnostifikovanje životinja koje su bile prinundo zaklane ili uginule na farmi (aktivni nadzor);
- Uklanjanje specifično rizičnog materijala iz lanca hrane ljudi
- Zabrana specifično rizičnog materijala u stočnoj hrani
- Uništavanje svih životinja sa sumnja da su bile izložene kontaminiranoj hrani;
- Ograničavanje uvoza žive stoke i njihovih proizvoda;
- Spaljivanje zahvaćenih leševa i odgovarajuća identifikacija goveda za efikasan nadzor i praćenje. [2]

4 SKREJPI

4.1. Etiologija

Uzročnik svih TSE, pa tako i skrejpia su prioni, odnosno konformaciono izmenjen protein ćelije. Pojam prion je proizašao od akronima *Proteinaceous infectious particles*, skraćeno PrP^c (gde c označava celularni, a sc skrejpia celularni protein). PrP^c predstavlja glikoprotein koji je preko fosfatidilinozitola vezan za ćelijsku membranu. [8]

Zreo PrP protein ovaca i koza se sastoji od 210 amino-kiselina i ima molekulsku masu 30-35 kDa. Njegova funkcija nije u potpunosti razjašnjena, ali je ustanovljeno da on vezuje jone bakra za NH₂- kraj. Pokazalo se da deluje i kao intracelularni pretvarač signala, te bi njegovo odsustvo dovelo do povećanog odumiranja nervnih ćelija. Nekoliko eksperimenata pokazalo je da nedostatak PrP^c dovodi do degeneracije mijelina, što sugerise da očuvanje mijelina možda predstavljala važnu fiziološku funkciju PrP^c. Šta više, kod koza kod kojih nedostaje PrP^c javile su se neuropatije usled demijelinizacije. [20]

Prionske bolesti su posledica akumulacije pogrešno savijenog oblika PrP^C, koji je označen kao PrP^{Sc}. Amino-kiselinska sekvence je istovetna i kod PrP^c i kod PrP^{Sc} kod date vrste, odnosno domaćina. Izoforme se razlikuju samo po sekundarnoj i tercijarnor strukturi, gde izgled proteinskog lanca normalne izoforme ima strukturu koja se sastoji od 40% α -heliksa i 3% β -ploče, dok se izmenjen (PrP^{Sc}) ima strukturu 40% β -ploče i 30% α -heliksa. Prikazana trodimenzionalna tercijarna struktura PrP^{Sc} (Slika 1) sadrži četvorolančanu mešovitu β -ploču sa dve α -zavojnice spakovane na jednoj strani β -ploče. Pramenovi 1a i 1b (crveno) odgovaraju spirali 1 u PrP^C, dok niti 2a i 2b (zeleno) odgovaraju spirali 2. Zavojnice 3 i 4 u ovom modelu ostaju nepromenjeni u odnosu na PrP^C model. Četiri ostatka (Asn108, Met112, Met129 i Ala133) koja su uključena u barijeru vrsta prikazana su u vidu lopte i štapa. Oni se grupišu na površini β -ploče koja je dostupna rastvaraču, što bi moglo da obezbedi mogući interfejs za interakciju PrP^{Sc}-PrP^C.

S2b-H3 petlja koja povezuje β -list i heliks 3 je uključena u barijeru vrste i prikazana je žutom bojom. Ova konformaciono fleksibilna petlja mogla bi doći u kontakt sa PrP^C tokom formiranja kompleksa PrP^{Sc}-PrP^C. Stoga, specifično molekularno prepoznavanje tokom replikacije priona može uključiti i β -list kao primarno mesto vezivanja i S2b-H3 petlju kao dodatno mesto za interakciju. Do transformacije PrP^C u PrP^{Sc} dolazi kada se energetska barijera koja onemogućava početnu konverziju probije ili se PrP^{Sc} uvede u sistem. Veruje se da ove dve izoforme postoje u termodinamičkoj ravnoteži. Supstitucije u PrP aminokiselinskoj sekvenci kod ljudi, miševa i ovaca imaju direktan uticaj na patogenezu TSE, prijemчивost na TSE, kao i na barijeru za prenosivosti između različitih vrsta domaćina. Zbog čega je za razvoj metoda za dijagnozu bolesti, lečenje, prevenciju i iskorenjivanje oboljenja neophodno razumevanje molekularne biologije, kao i PrP genetike skrepija. [21]

Prioni obuhvataju širok spektar sojeva, koji mogu izazvati različite periode inkubacije, kliničke znakove, promene i profile depozicije PrP^{Sc}. Za karakterizaciju sojeva priona koriste se sledeći parametri:

- Biološka svojstva – prionski sojevi imaju različite fenotipove, koji se mogu indetifikovati na osnovu perioda inkubacije, kliničkih simptoma, histopatoloških nalaza, kao i na osnovu tropizma prema tkivima i ćelijama koji su proučavani na modelima miševa.
- Biohemijska svojstva – sojevi priona se razlikuju prema biohemijskim karakteristikama kao što su stabilnost protiv denaturišućih agenasa, obrascima glikolizacije itd. Istraživanja sa pokazala da se sojevi mogu razlikovati i prema afinitetu za vezivanje bakra.
- Konformacijska svojstva - sojevi mogu pokazati slične obrasce rezistencije na proteazu, ali se mogu razlikovati i po svojoj konformaciji. Razlike u konformaciji mogu se otkriti sedimentacijom, transmisijom elektronskom mikroskopijom, mikroskopijom atomskih sila, kao i masenom spektrometrijom. [22]

Svi analizirani genomi sisara sadrže gen koji kodira PrP, kod ljudi je to *PRNP*, dok je kod miševa *prn-p*. Jasno je da geni koji kodiraju PrP igraju ključnu ulogu u pojavi TSE. Geni koji kodiraju PrP ili PrP slične proteine su takođe pronađeni i kod ptica i riba.

Iako je struktura PrP riba i ptica slična strukturi PrP sisara, amino-kiselinska sekvenca se dosta razlikuje, te nije verovatno da će se kod njih javiti TSE. PrP gen sisara se u zavisnosti od vrste sastoji od dva ili tri egzona. Kod ovaca gen koji kodira PrP je loklizovan na 13 hromozomu, njegova dužina varira između 16000 i 22000 baza, a sastoji se od 2 kratka egzona i jednog dugačkog kodirajućeg egzona III. Prnp gen ovaca se sastoji od dva alela: sA (kratak inkubacioni period) i pA (prolongiran inkubacioni period), koji se razlikuju prvenstveno u sekvencama aminokiselina kodiranih kodonom 136. Najveće koncentracije PrP gena nalaze se u talamusu i velikom mozgu, a zatim u malom mozgu, kičmenoj moždini, slezini, drugim limfoidnim tkivima, moždanom stablu, gastrointestinalnom traktu i reproduktivnim organima.[22]

U nekoliko epidemioloških studija pokazalo se da uspešan prenos klasičnog skrejpja zahteva genetski osetljive ovce. Efekat Sinc-gena na dužinu perioda inkubacije kod eksperimentalno zaraženih miševa, kao i sinonimnog Sip-gena kod ovaca predložen je 1968. Na kraju su 1980-1990. upareni različiti polimorfizmi gena za PrP sa Sip -/Sinc- genima. [23]

Polimorfizmi PrP ovaca utiču na podložnost bolesti, kao i na njen razvoj uključujući vreme inkubacije i kliničke znake. Ogromna većina polimorfizama je posledica polimorfizma jednog nukleotida (SNP) u DNK, koji često izazivaju promene jedne aminokiseline. Od posebnog značaja su polimorfizmi kodona 136, 154 i 171 unutar ORF-a (otvorenog okvira čitanja), koji su jasno povezana sa osetljivošću ovaca na grebež. Polimorfizmi kodona su:

- A136V, gde alanin (A) se odnosi na rezistentnost, a valin (V) na osetljivost;
- Q171R, gde se arginin (R) odnosi na rezistentnost, a glutamin (Q) na osetljivost;
- R154H, gde se histidin (H) odnosi na rezistentnost.

Ovi polimorfizmi rezultiraju sa pet različitih alela (ARQ, VRQ, AHQ, ARR i ARH), što dovodi do 15 različitih genotipova, koji su jedini aleli sa značajnom raširenošću širom sveta.

Glavne karakteristike Prnp gena i osetljivosti ovaca su:

- VRQ haplotip je najbliži povezan sa podložnošću klasičnom grebežu. Homozigotne životinje za ovaj haplotip su one koje predstavljaju veći rizik. Heterozigoti sa rezistentnim haplotipovima (ARR i AHQ) imaju manji rizik;
- Prethodni oblik ARQ je takođe bila povezana sa podložnošću klasičnom grebežu, iako sa manjim rizikom ili manjim prodorom od VRQ;
- Aleli ARR i AHQ bili su povezani sa otpornošću na TSE, ali isključivo ukoliko su prisutni kao homozigoti, ARR/ARR ili AHQ/AHQ;
- Postoje rase ovaca kod kojih određeni genotipovi ne postoje ili su izuzetno retki, na primer, VRQ kod ovaca Suffolk ili ARR kod islandskih ovaca. U tim slučajevima, osetljivost na bolest je povezana sa ARQ haplotipom i rezistencijom na haplotip AHQ.

1998. godine Doson i saradnici su izvršili klasifikaciju genoma TSE (Tabela 1) na osnovu rizika od razvoja bolesti, gde su ih svrstali u 5 grupa (R1-R5). Važno je napomenuti da se ova klasifikacija zasniva na verovatnoći, a ne na sigurnosti. [22]

Ova klasifikacija ne može da se primeni na atipični skrejpi, kod kojeg se najčešće nalaze haplotipovi kao što su AHQ/AHQ, AHQ/ARQ i ARR/ARR. Pokazalo se da su polimorfizmi na kodonima 141 i 154 povezani sa podložnosti ovaca na atipični tip oboljenja.

Iako je aminokiselinska sekvenca PrP koza i ovaca slična, PrP genetika kod koza je dosta varijabilnija. Kod koza razlikujemo 29 polimorfizama Prnp, ali iznenađujuće kod njih se ne javljaju polimorfizmi na kodonima 136 i 171. Najmanje pet od njih je povezano sa osetljivosti na skrejpi. I142M haplotipovi imaju produženi period inkubacije nakon eksperimentalne inokulacije i povezuju se sa povećanom otpornošću na klasični grebež u prirodnim uslovima. Iako su R154H haplotipovi povezani sa određenom otpornošću na klasični skrejpi, predstavljaju visok rizik za razvoj atipičnog skrejpija. N146S/D polimorfizmi kodiraju nizak rizik za infekciju. R211Q haplotipovi su pokazali povećanu otpornost na klasični skrejpi.

Haplotip Q222K je povezan sa zaštitom od klasičnog grebeža, ali se navodi da postoje slučajevi gde su heterozigotne životinje zaražene. Dakle, mnogobrojne varijable utiču na podložnost grebeži i zavise ne samo od genotipa domaćina i infektivnog agensa već i od karakteristika stada, rase i geografske lokacije. [23]

Tabela 1. Klasifikacija genotipova na osnovu rizika [23]		
Grupa	Genotipovi	Tumačenje
R1	$\text{PrP}^{\text{ARR}}/\text{PrP}^{\text{ARR}}$	Veoma nizak rizik od razvoja bolesti kod pojedinca i veoma nizak rizik u potomstvu
R2	$\text{PrP}^{\text{ARR}}/\text{PrP}^{\text{AHQ}}$ $\text{PrP}^{\text{AHQ}}/\text{PrP}^{\text{AHQ}}$	Nizak rizik za pojedinca i potomstvo
R3	$\text{PrP}^{\text{ARR}}/\text{PrP}^{\text{ARQ}}$ $\text{PrP}^{\text{ARR}}/\text{PrP}^{\text{ARH}}$ $\text{PrP}^{\text{ARQ}}/\text{PrP}^{\text{AHQ}}$ $\text{PrP}^{\text{AHQ}}/\text{PrP}^{\text{ARH}}$	Individualni nizak rizik, ali se rizik za potomstvo može povećati na osnovu genotip drugog roditelja
R4	$\text{PrP}^{\text{ARH}}/\text{PrP}^{\text{ARH}}$ $\text{PrP}^{\text{ARQ}}/\text{PrP}^{\text{ARH}}$ $\text{PrP}^{\text{ARQ}}/\text{PrP}^{\text{ARQ}}$ $\text{PrP}^{\text{ARR}}/\text{PrP}^{\text{VRQ}}$ $\text{PrP}^{\text{AHQ}}/\text{PrP}^{\text{VRQ}}$	skrejpji se može naći povremeno i postoji veći rizik za potomstvo
R5	$\text{PrP}^{\text{ARQ}}/\text{PrP}^{\text{VRQ}}$ $\text{PrP}^{\text{ARH}}/\text{PrP}^{\text{VRQ}}$ $\text{PrP}^{\text{VRQ}}/\text{PrP}^{\text{VRQ}}$	Najveći rizik od razvoja grebeži

4.2.Epidemiologija

Rezervoari prionskih oboljenja su inficirane životinje. U populaciji životinja oboljenje se prenosi direktnim kontaktom, a smatra se da infekcija nastaje oralnim putem ili preko rana. Pašnjaci se kontaminiraju preko telesnih tečnosti ili tkiva plancete obolelih jedinki. U eksperimentalnim uslovima, prilikom intraperitonealnog, subkutanog ili intravenskog načina inokulacije infektivnog materijala, oboljenje je nastajalo posle produženog perioda inkubacije, dok je prilikom intracerebralne inokulacije materijala period inkubacije bio skraćen.[22]

Otpornost priona na fizičke i hemijske faktore doprinosi da oboljenje može da se prenosi i u dužem vremenskom periodu sekundarnim izvorima zaraze. Infektivni materijal može da se zadrži na pašnjaku godinama. Štaviše, pokazalo se da agens skrejpia ostaje zarazan čak i nakon 16 godina u okruženju. Postoje podaci koji govore o mogućnosti postojanja kliconoša koji su rezistentni na oboljenje, ali koji mogu da izazovu infekciju ostalih životinja u kohabitaciji.

Sumiranje prevalencije TSE infekcija kod malih preživara je težak zadatak suočen sa dugim periodima inkubacije, nedostatkom praktičnih ante mortem testova, promenljivim kliničkim znacima, potencijalno nepoznate genetske komponente kodirane kod domaćina (koje utiču i na rizik od infekcije i na period inkubacije) i putevima prenošenja koji nisu u potpunosti shvaćeni. [22]

Lühken i saradnici, 2006. godine, sprovedli su istraživanje s ciljem utvrđivanja epidemioloških i genetskih razlika između klasičnog i atipičnog skrejpia kod ovaca u Njemačkoj. Upoređeni su podaci koji beleže tok izbijanja skrejpia u 4 stada ovaca – 2 kod ovaca rase ševiot i 2 stada rase safolk. Studija, iako zasnovana na samo četiri stada, ne sugerise nikakve sistematske razlike u dinamici izbijanja skrejpia između ševiot i safolk rasa uprkos različitoj genetici i podložnosti te dve rase. Podaci o učestalosti skrejpia i demografiju i pedigree ovaca pokrivaju periode od nekoliko godina ili decenija. Ključni nalaz je da učestalost kliničkih slučajeva dostiže vrhunac kod ovaca starih 2-3 godine. Ovo je u skladu sa starosnom predispozicijom ovaca na skrejp. Incidencija skrejpia je bila veća kod ovaca nego kod ovnova i u određenim periodima godine, iako ovi efekti nisu bili dosledni među stadima. [24]

U Nemačkoj je početkom 2000-ih godina rađeno istraživanje čiji je cilj bio analiza epidemiologije i genetike prionskih proteina (PrP) u stadima ovaca zahvaćenim skrejpjijem. Za tu svrhu 224 slučaja ovaca zaraženih skrejpjijem koji su dijagnostikovani u periodu između januara 2002. i februara 2006. klasifikovani su kao klasični ili atipični grebež i određene su aminokiseline na kodonima 136, 141, 154 i 171. Uočene su značajne epidemiološke razlike između klasičnih i atipičnih slučajeva grebeža u odnosu na: broj ovaca zaraženih grebežom u okviru stada; veličine stada sa samo jednom zaraženom jedinkom ili sa više jedinki pozitivnih na skrejpji; starosnu distribuciju ovaca pozitivnih na grebež.

Ovce sa ARQ/ARQ genotipom su pod najvećim rizikom da obole od klasičnog grebeža, rizik za atipični grebež se pokazao najveći za ovce koje su nosile fenilalanin (F) na poziciji 141 (AF141RQ) i/ili AHQ haplotip. Atipični grebež se sa značajnom učestalošću javlja i kod ovaca sa haplotipovima ARR i/ili ARQ u kombinaciji sa leucinom na poziciji 141 (AL141RQ). Visoki udeo stada pogođenih atipičnim skrejpjijem ukazuje važnost ovog tipa skrejpjija.

Nakon uvođenja programa aktivnog nadzora nad TSE kod ovaca i koza u EU 2003. godine, prvi put su dobijeni jasno definisani epidemiološki podaci. Prevalencija klasičnog i atipičnog skrejpjija je pokazala različite obrasce, sa više varijacija koje se primećuju kod klasičnog skrejpjija. Kod ovaca, ukupna prevalencija klasičnog grebeža u EU (bez Kipra) je smanjena od 2002. do 2009. godine. U 2009. godini u EU, 271.158 ovaca (od 331.027 testiranih) i 89 koza (od 117.868 testiranih) bilo je pozitivno na TSE, ali samo 14 slučajeva ovce i nijednog kozijeg grebeža otkriveno je kod životinja za klanje.

Može se pretpostaviti da će se zbog genetskih programa oplemenjivanja za otpornost na grebež, udeo ovaca koje nose ARR alele u populaciji povećati i samim tim stope prevalencija klasičnog grebeža će se smanjiti. Međutim, mora se naglasiti da su stope incidencije klasičnog skrejpjija u geografskim područjima bile neujednačene.

Oblasti se mogu grupisati u:

- Zemlje u kojima u klanici nisu otkriveni slučajevi;
- Zemlje sa niskim stopama prevalencije;
- Zemlje sa visokim stopama prevalencije u klanici.

Zbog dugog vremena inkubacije i posebne patogeneze klasičnog skrepjija, može se potceniti stvarna prevalencija, a prijavljen je i značajan broj neotkrivenih slučajeva (do 17%). U osam zemalja EU između 2007. i 2009. godine, učestalost atipičnog grebeža kod zdravih zaklanih ovaca bila je slična ili viša od učestalosti klasičnog grebeža. Ovi podaci sugerisu da atipični grebež predstavlja značajan deo oboljenja malih preživara zaraženih TSE. Čini se da je prevalencija stabilna unutar EU i zbog programa uzgoja koji favorizuju osetljivi ARR genotip, može se pretpostaviti da atipični grebež neće biti eliminisan. Štaviše, ista ograničenja aktivnog nadzora povezana sa klasičnim grebežom važe i za atipični grebež.

Drugi problemi u proceni tačne prevalencije atipičnog skrepjija uključuju varijacije zavisne od starosti i otežno otkrivanje atipičnog skrepjija korišćenjem uzoraka moždanog stabla, nisku osetljivost nekih brzih testova za atipični skrepji i odsustvo patološkog prionskog proteina koji se može detektovati u limforetikularnom tkivu. Zbog čega su od posebnog interesa rezultati koji pokazuju infektivnost u limforetikularnom sistemu ovaca zaraženih atipičnim grebežom.[22]

U periodu od 2002-2006. godine praćena je učestalost pojavljivanja klasičnog i atipičnog skrepjija u 20 evropskih država. Za svaku godinu i zemlju u kojoj je otkriven najmanje jedan slučaj klasičnog skrepjija, a testirano je više od 500 životinja procenjena je prevalencija klasičnog skrepjija (Classical scrapie prevalence estimates - CSPE). Kod zdravih zaklanih životinja varirala je od 0,03% u Švajcarskoj 2004. do 2,8% u Severnoj Irskoj 2005. Dok je kod uginulih životinja CSPE varirala od 0,2% u Norveškoj 2006. do 22% u Sloveniji 2005. Četrnaest zemalja prijavilo je slučajeve atipičnog grebeža, a u 4 zemlje je to bila jedina prijavljena TSE kod ovaca. Za svaku godinu i zemlju u kojoj postoji najmanje jedan prijavljen slučaj atipičnog skrepjija i testirano je više od 500 životinja, procenjena je prevalencija atipičnog skrepjija (Atypical scrapie prevalence estimates - ASPE) i kod zdravih zaklanih životinja varirala je od 0,1% u Švajcarskoj 2004. do 1,4% u Velikoj Britaniji 2005.

Za uginule životinje ASPE je varirala od 0,3% u Norveškoj 2005. do 2,5% u Velikoj Britaniji 2003. Razlike između ASPE i CSPE pronađene su u šest zemalja. U Francuskoj i Velikoj Britaniji, ASPE je bio manji od CSPE među uginulim životinjama. Za druge zemlje u kojima je utvrđena značajna razlika između procenjene prevalencije klasičnog i atipičnog grebeža, ASPE je bila veća od CSPE. Zemlje u kojima nisu utvrđene značajne razlike imale su relativno manje testiranih uzoraka nego druge zemlje. [26]

U poslednjim vekovima vodila se duga diskusija o načinu prenošenja skrejpja, a ni do sada tačni putevi prenosa nisu u potpunosti razjašnjeni. Poznato je da se skrejpi može prenositi horizontalno između ovaca u prirodnim uslovima. Takvi prenosi se dešavaju ili direktnim kontaktom ili kontaminacijom životne sredine. Grebež kod koza se često nalazi u mešovitim stadima sa ovcama, ali je takođe primećeno da se širi sa koze na kozu. Glavni izvor infekcije je infektivna placenta. Infektivnost i PrP su otkriveni u delovima fetusa, u zavisnosti od genotipa potomstva.

U jednoj studiji, Bielanski Adams i saradnici, 2016. godine, eksperimentalno su inficirali gravidne ovce poznatog PRNP genotipa sa karakterističnim sojem scrapie (SSBP/1) i tražili su dokazi o prenošenju SSBP/1 na potomstvo. Ovce su bile iz stada NPU Ševiot, kod koje se javio endemični prirodni grebež od kojeg se SSBP/1 može razlikovati na osnovu histologije, incidencije bolesti i biotestiranja sojeva kod miševa. Korišćena je tehnika embriotransfera s ciljem da se omogući da se fetusi osetljivih PRNP genotipova razviju kod ovaca i otpornih i osetljivih PRNP genotipova, a zatim zarazili gravidne ovce sa SSBP/1. U potomstvu se pojavilo klinička oboljenje skrejpja, uzrokovano i prirodnim skrapijem i SSBP/1, ali dokazi (uključujući tipizaciju soja miševa) o SSBP/1 infekciji su pronađeni samo kod jagnjadi rođenih od potpuno podložnih majki. Rezultati snažno sugerišu da se prenatalni (in utero) prenos grebeža možda dogodio kod ovih ovaca. [27]

Tri linije dokaza potiču iz epidemioloških, terenskih i kliničkih studija, eksperimentisanja i kauzalnog rezonovanja, gde se zaključci izvode na osnovu naučnih činjenica i razumevanja anatomije i fiziologije životinja. Dokazi iz epidemioloških studija dozvoljavaju zaključak da se skrejpi prenosi prenatalno i da sperma i embrioni predstavljaju moguću opasnost za prenošenje grebeža. Dokazi iz eksperimentalnih studija potvrđuju da sperma i oprani ili neoprani embrioni dobijeni *in vivo* predstavljaju opasnost za prenošenje skrejpja. [27]

Posteljica i amnionska tečnost se izlivaju u okruženje tokom jagnjenja i druge ovce i koze ih zatim pojedu, pretpostavlja se da je to najvažniji način infekcije u stadu. Dodatni rezultati ukazuju da oslobođeni PrP^{Sc} može biti izdvojen blizu površine tla i vezan za minerale u zemljištu, kojim se tokom ispaše životinje zaraze. Pored placente, pokazalo se da amnionska tečnost, izmet i mleko sadrže PrP^{Sc}.

Nedavni rezultati su otkrili PrP^{Sc} i u usnoj šupljini ovaca inficiranih skrepijem, a u eksperimentalnim modelima skrepija kod miševa i hrčaka PrP^{Sc} pronađen je u urinu. Veštački putevi prikazani u nekoliko eksperimentalnih infekcija uključuju prenos putem potkožne inokulacije, ekspozicije konjunktive, skarifikacije kože i transfuzije krvi. Neke infekcije skrepijem bile su posledice jatrogog prenosa usled kontaminiranih vakcina. [22]

U većini stada pronađen je samo jedan slučaj atipičnog skrepija. Način prenosa atipičnog skrepija u prirodnim uslovima nije razjašnjen i čak je dovedeno u pitanje da li je ova bolest zarazna. Intracerebralni put infekcije je jasno utvrđen i kod glodara i kod ovaca. Epidemiološki podaci dobijeni programima aktivnog nadzora ukazuju na to da je kapacitet prenosa atipičnog skrepija unutar stada u terenskim uslovima prilično nizak i najverovatnije nepostojeći. Međutim, prijavljeni su slučajevi atipičnog grebeža u stadima, a takođe i koinfekcije sa klasičnom skrepijem u nekim stadima.

Ovi podaci podržavaju teoriju o spontanom poreklu bolesti, što bi moglo biti povezano sa veoma niskom ili odsutnom prirodnom prenosivosti. Retrospektivne studije pokazuju da velike veličine stada (>1.000 ovaca), razmena životinja unutar stada i vitaminski i mineralni dodaci hrani mogu biti faktori rizika za pojavu atipičnog skrepija. Vreme inkubacije skrepija zavisi od puta infekcije i starosti životinje prilikom infekcije, genotipa, soja uključenog agensa i infektivne doze. Postoji negativan odnos između osetljivosti kod ovaca kodirane genotipom i perioda inkubacije bolesti, tj. ovce sa VRQ homozigotnošću imaju najkraće periode inkubacije. Jatrogene infekcije dovode do nešto kraćih perioda inkubacije.

Kod klasičnog skrepija, ovce oboljevaju od kliničke bolesti obično između 2 i 5 godina (prosečna starost 3,5 godine). Iako oba pola podjednako oboljevaju, bolest se ranije manifestuje kod ovnova. Životinje mlađe od 18 meseci retko obole. Međutim, obično nije moguće odrediti vreme infekcije kod starijih ovaca obolelih od skrepija. Učestalost slučajeva atipičnog skrepija raste sa uzrastom životinja. Atipični slučajevi su u proseku stari 6,5 godina. Kao i kod ovaca, na period inkubacije koza utiče genotip. Podaci o starosnoj distribuciji koza zaraženih TSE su retke, ali ukazuju na sličnosti sa distribucijom kod ovčijeg grebeža. Većina koza obolelih od klasičnog grebeža su stare između 2 i 5 godina. Međutim, postoje slučajevi i od 10 godina starosti. Atipični skrepi kod koza opisan je kod osam životinja sa prosekom starosti od 6,3 godine i kod dve životinje sa 10, odnosno 12 godina. [23]

4.3. Patogeneza

Patogeni mehanizmi koji se javljaju kod skrejpja zavise od soja, doze i puta unošenja infektivnog agensa, kao i genotipa domaćina. Kod klasičnog grebeža smatra se da su glavni izvori kontaminacije ostaci placente koje su zaražene životinje izbacile tokom porođaja. Međutim, prenos može nastati i vertikalno kroz ingestiju mleka i kolostruma ili intrauterinim transferom. Eksperimentalne studije su takođe pokazale da se prioni mogu preneti i preko kože i aerosola. Najefikasniji i najređi put je intracerebralna inokulacija infektivnog materijala, a najčešći put infekcije je preko ingestije infektivnog materijala. Patogeneza skrejpji infekcije ima 3 različite faze:

- Invazija limfoidnog tkiva povezanog sa crevima (gut-associated lymphoid tissue – GALT);
- Invazija limfnog tkiva i diseminacija;
- Neuroinvazija. [22]

Nakon oralnog unosa u organizam, prvi kontakt priona odigrava se u intestinalnom m traktu, pri čemu se prioni vezuju za apikalne površine enterocita. Način kako prolaze kroz nepromenjene enteroite nije u potpunosti razjašnjen. Mogući put su M ćelije unutar epitela creva povezanog sa folikulima i specijalizovane za transport makromolekula. Prioni ulaze prvenstveno kroz GALT, uglavnom u Pajerove ploče, koje deluju kao primarno limfoidno tkivo. U mehanizmu „ukrcavanja“, M ćelije igraju važnu ulogu. Kretanje priona iz M ćelija je olakšano konvencionalnim dendritskim ćelijama koje ekspimiraju hemokinski receptor CKSCR5. Prisustvo priona unutar Pajerovih ploča je od suštinskog značaja za razvoj bolesti. Dakle, PrP^{Sc} odlazi u limforetikularni sistem, gde se akumulira i replikuje u makrofagima i folikularnim dendritskim ćelijama (FDC). Rezultati eksperimentalnih studija ukazuju na to da je osetljivost na grebaž značajno smanjena kod životinja sa nedostatkom FDC. Međutim, postoje FDC-nezavisni putevi za neuroinvaziju od strane PrP^{Sc}.

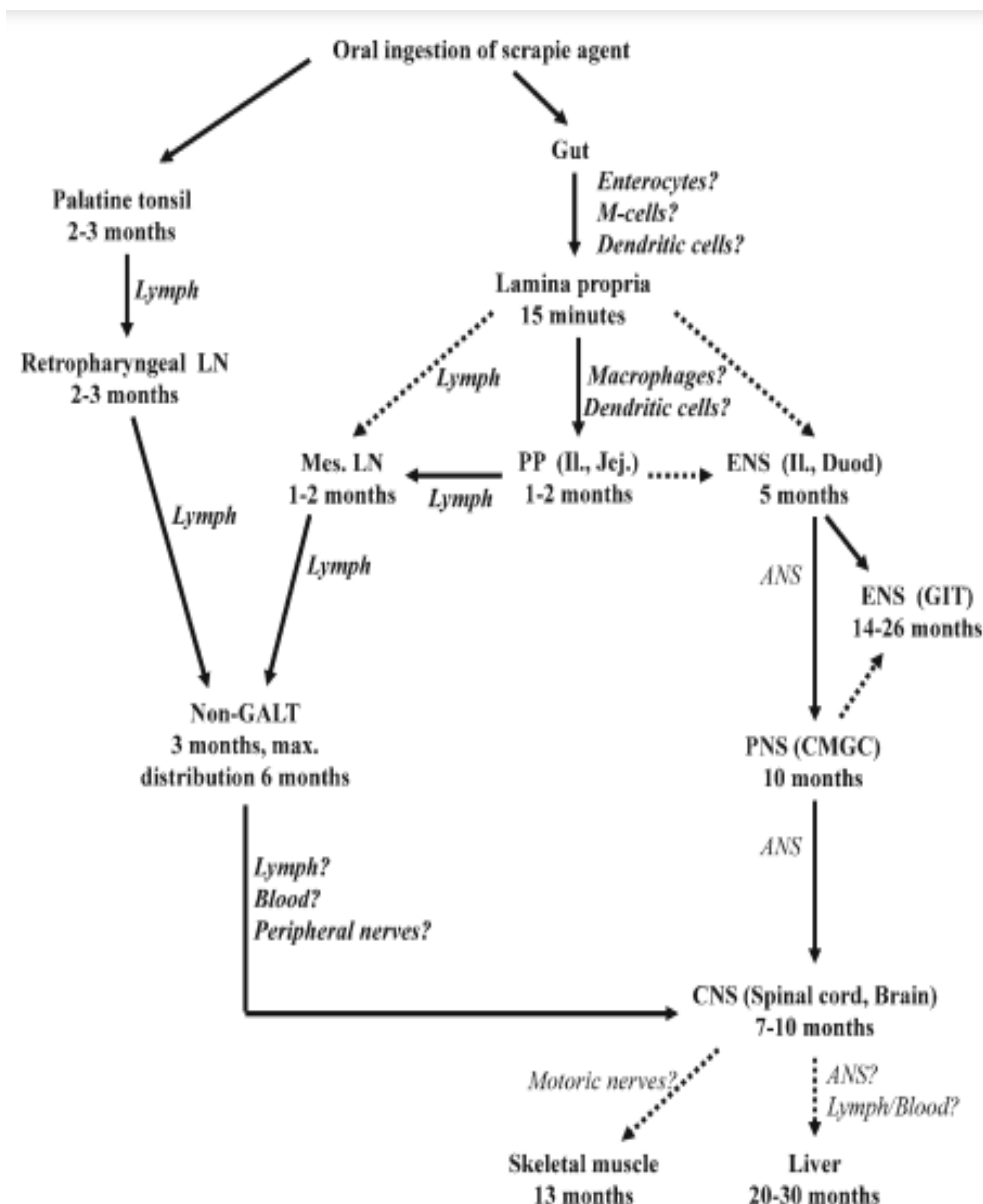
Krajnici predstavljaju još jedan moguć put nastanka infekcije. Prve nakupine PrP^{Sc} se nalaze u Pajеровim pločama, krajnicima i GALT-u jagnjića starih 21-dan. Eksperimentalne infekcije ukazuju na brz transport inokuluma u GALT i odgovarajuće limfne čvorove, ali replikacija i akumulacija de novo PrP^{Sc} je uočena tek nakon 1 meseca od infekcije. [28]

Tokom perioda inkubacije skrejpja, PrP^{Sc} se širi kroz limfni sistem. Aferentna drenaža limfe dovodi do širenja PrP^{Sc} od krajnika i Pajеровih ploča u medijalne, retrofaringealne i mezenterične limfne čvorove. Kao što je pokazano kod prirodno zaraženih jagnjadi, tokom prva dva meseca života akumulacija PrP^{Sc} je ograničena na GALT i mezenterične limfne čvorove. Nakon toga kod jagnjadi starijih od 2 meseca, odvija se širenje priona na sve limfne čvorove limforetikularnog sistema (LRS) i količina PrP^{Sc} u LRS vremenom raste do plato nivoa.

Manje je jasno kako se PrP^{Sc} akumulira u drugim organima, kao što je slezina, koji ne dobijaju aferentnu limfnu drenažu, ali verovatno do njih dolaze hematogenim putem. Širenje PrP^{Sc} hematogenim putem je podržano posmatranjem rane neuroinvazije u cirkumventrikularnim organima koji nemaju krvno-moždanu barijeru. Takođe, PrP^{Sc} je otkriven u krvi zaraženih ovaca, a u njoj se može naći nakon trećine perioda inkubacije. [23]

Enterički nervni sistem (ENS) duodenuma i ileum-a su prvi delovi perifernog nervnog sistema koji postaju zahvaćeni posle 5 meseci. Sa napretkom bolesti počevši od 14 meseca, PrP^{Sc} se širi unutar ENS-a u svim pravcima i po drugim delovima tankog creva, a u kasnijim fazama (21–26 meseci) zahvata čak i jednjak, stomak, debelo crevo i rektum.

Pored parasimpatičkih i/ili simpatičkih nervnih vlakna, prioni posle 10 meseci preko celijačnog i mezenteričnog kompleksa ganglija dolaze do kičmene moždine i/ili moždanog stabla. Sa ovih mesta u CNS-u se dalje odvija uzlazno i silazno širenje PrP^{Sc}. Između 7 i 10 meseci starosti, PrP^{Sc} se može pokazati prvi put u moždanom stablu i kičmenoj moždini mladih VRQ ovaca. Sa 13 meseci starosti, PrP^{Sc} se može identifikovati u skeletnim mišićima i posle 20–30 meseci u jetri prirodno zaraženih ovaca.[22]



Slika 9 Šematski prikaz najčešćih teorija patogeneze skrejpja [22]

Dinamika širenja klasičnog skrejpja kod koza je dobro dokumentovana, ali se oslanja uglavnom na eksperimentalno izazvana oboljenja kod divljih koza. Tok širenja PrP^{Sc} tokom perioda inkubacije deluje prilično sličan toku širenja priona kod ovaca. Međutim, jedna studija pokazuje da vremenski tok može biti produžen u poređenju sa skrejpjem kod ovaca. Kod jarića inficiranih oko rođenja, PrP^{Sc} je detektovan u GALT tek nakon 4 meseca starosti, periferna limfoidna tkiva su postala pozitivna na PrP^{Sc} nakon 6 meseci života, a u CNS-u prve akumulacije PrP^{Sc} su se pojavile u dobi od 18 meseci.

U skeletnim mišićima, PrP^{Sc} nije otkriven pre 21. meseca života. Međutim, treba napomenuti da postoji velika raznolikost sojeva klasičnog skrejpja kod ovaca i koza. Njihova interakcija sa određenim genotipovima domaćina može rezultirati različitom dinamikom širenja. Dakle, opisana distribucija tkiva ne može se smatrati definitivnom. Pored toga, prvi rezultati iz tekućih eksperimenata na kozama I142M zaraženim skrejpjem otkrilo je da je diseminacija TSE agensa u perifernim tkivima produžena u odnosu na diseminaciju kod divljih koza. [22]

Kod prirodno zaraženih životinja klasičnim skrejpjem, PrP^{Sc} ne stimuliše humoralni odgovor jer je njegova aminokiselinska sekvenca identična onoj kod PrP^C. Pošto T ćelije obrađuju antigen kao linearne epitope, ne mogu da razlikuju peptidne sekvence PrP^{Sc} i PrP^C. Zbog toga su ćelije koje predstavljaju antigen lišene neophodnih kostimulatornih signala T-ćelija potrebnih da izazovu humoralni odgovor. Komponente komplemента stupaju u interakciju sa PrP^{Sc}, a kompleksi se lokalizuju u moždanom tkivu i doprinose neurodegeneraciji životinja inficiranih skrejpjem. Pored toga, endocitoza zasnovana na komplementu može doprineti kretanju PrP^{Sc} do limfoidnog tkiva preko dendritskih ćelija koje ekspimiraju CD35.

Klinički simptomi počinju da se javljaju kada se koncentracije priona u mozgu i slezini izjednače. Nakon toga koncentracija priona u mozgu nastavlja da raste, sve do uginuća životinje. U mozgu, prioni izazivaju vakuolizaciju degeneraciju neurona i hipertrofiju i hiperplaziju astrocita. [28]

Što se tiče patogeneze, atipični skrejpji se smatra nezaraznom bolešću. Kod atipičnog skrejpja, distribucija nije primarno fokusirana u produženoj moždini i najveća koncentracija prionskih proteina se nalazi u malom mozgu. Ograničeni podaci koji se tiču distribucije priona atipičnog skrejpja kroz tkiva ukazuju da su količine PrP^{Sc} koje se mogu detektovati ograničene na CNS. Stopa infekcije atipičnog grebeža sugerise da bi to mogla biti spontana bolest, na čiji razvoj imaju uticaj genetički, ekološki i metabolički faktori. U pogledu prenosivosti prirodnog potencijala, epidemiološke studije pokazale su da prisustvo više slučajeva atipičnog skrejpja na gazdinstvu ne isključuje mogućnost da atipični skrejpji može biti sporadična bolest. [23]

4.4. Klinička slika

Klinički znaci su prilično varijabilni između različitih rasa, stada, regiona i zemlja i na njih utiču genotip, soj uzročnika i stadijum bolesti. Klinička faza se uglavnom sporo razvija tokom nekoliko nedelja i meseci, ali postoje slučajevi gde je zabeležen akutni početak i trajanje do godinu dana sa povremenim popuštanjem znakova. Zabeležena su i iznenadna uginuća životinja.

Klinički znaci klasičnog grebeža se generalno očekuju kod životinja starosti između 2 i 5 godina. Ovo obično pogađa mali broj ovaca iz stada, iako su opisane i epidemije. U velikom procentu od potvrđenih slučajeva skrejpija, životinje su pronađene mrtve bez prethodnih znakova bolesti.

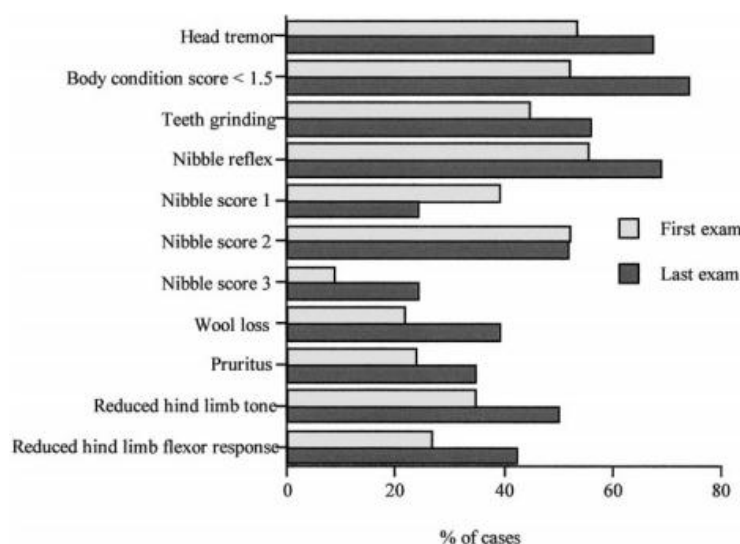
Izolacija životinja iz stada je često prvi klinički znak. Specifičniji simptom u ranoj fazi je gubitak vune uzrokovan svrabom. Obolele životinje mogu izgledati normalno, ali nakon izloženosti stresu (tj. iznenadna buka, prekomerno kretanje i rukovanje) pojavljuje se tremor. U kasnijim fazama, životinja može čak i pasti usled konvulzija. Klinički simptomi skrejpija se mogu podeliti u 5 kategorija:

- **Opšti znaci:** depresija, gubitak vune, regurgitacija i srčana aritmija;
- **Promene u ponašanju:** tremor glave, izmenjen mentalni status, reakcija na grickanje (refleks), škr gutanje zubima, izmenjeno držanje glave, hiperreaktivnost, anksioznost, strepnja, salivacija, agresivnost i nevoljnost za mužu;
- **Promene u osetljivosti:** pruritus, „kanibalizam“, alotriofagija i ujedanje;
- **Promene u kretanju:** ataksija zadnjih ekstremiteta, abnormalno držanje, slabost zadnjih udova i vrtenje u krug;
- **Ostali znaci:** gubitak težine, otok usana, oštećenje vida i hipogalakcija. [23]

Nisu svi simptomi uvek prisutni, ali obično je primetno više od jednog. Štaviše, nervni oblik može dominirati u jednom stadu, dok kod drugog preovlađuje pruritična forma. Generalno, tremor glave, hiperreaktivnost, lučenje pljuvačke, pruritus i gubitak težine su najčešće prijavljeni simptomi u različitim stadima i zemljama.

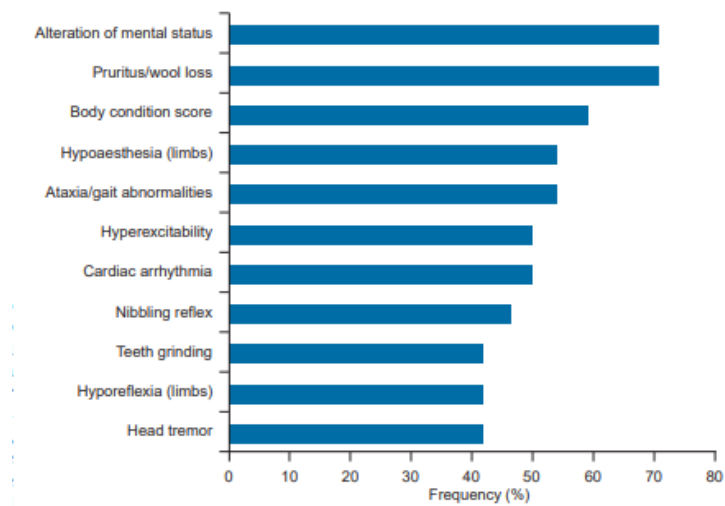
Završne faze karakteriše masivni gubitak težine često uprkos nepromenjenom apetitu i ležeći položaj zbog teške ataksije. Druge manje česte promene uključuju ptijalizam i gubitak ruminalne tečnosti preko usne duplje, nistagmus i izmenjen pupilarni refleks, hipoestezija, srčani i respiratorni poremećaji. [22]

Istraživanja kliničkih simptoma skrejipija u 20 stada u Irskoj u kojima je skrejpi ranije identifikovan su pokazala da su najčešće zabeleženi početni simptomi bili ataksija zadnjih udova (71%), tremor glave (61%), izmenjen mentalni status (57%), pozitivan refleks grickanja (51%), čučajući položaj (51%), bruksizam (44%), nisko držanje glave (38%), skor telesne kondicije 1,5 (38%) i proprioceptivni deficiti zadnjih udova (36%) (Grafik 1) [29].



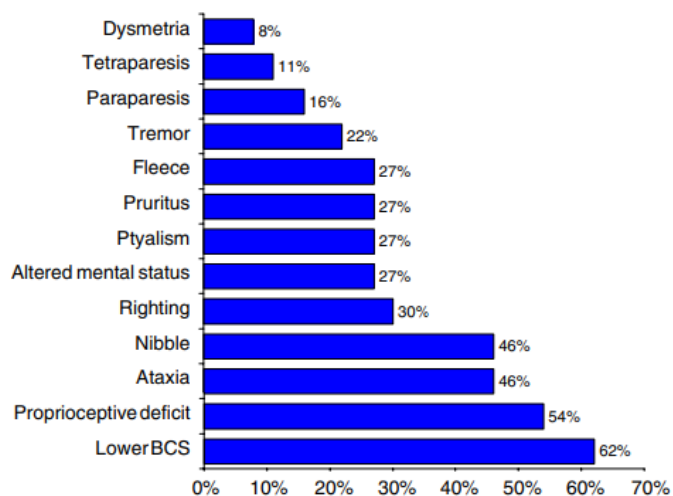
Grafikon 1 - Progres kliničkih simptoma tokom vremena kod ovaca zaraženih skrejpijem [29]

Kod ovaca rase raša aragonesa u Španiji najčešće zabeleženi simptomi su promena mentalnog statusa (70,8%), zatim pruritus (70,8%), skor telesne kondicije ispod 3 (58,3%), hipoestezija zadnjih, a ponekad i prednjih ekstremiteta (54,2%), ataksija i abnormalnosti u hodu (54,2%), povećana razdražljivost na spoljašnje stimuluse (50%), srčana aritmija (50%), refleks grickanja (45,8%), bruksizam (41,7%), hiporefleksija (41,7%) i tremor glave (41,7%) (Grafik 2) [30].



Grafikon 2 - Učestalost najčešćih simptoma kod skrejpi pozitivnih životinja u Španiji [30]

Trogodišnja studija u kojoj su ispitivani klinički znaci kod ovaca obolelih od skrejpija u Italiji pokazala je da su najčešći simptomi smanjen skor telesne kondicije (62%), proprioceptivni deficit (54%), ataksija (46%), refleks grickanja (46%), statički refleks (30%), promenjeno mentalno stanje (27%), ptijalizam (27%), pruritus (27%) i tremor (22%) (Grafik 3) [31].



Grafikon 3 - Učestalost najčešćih simptoma kod skrejpi pozitivnih životinja u Italiji [31]

Podaci o kliničkim znacima kod koza su retki i većina autora se poziva na simptome koji su opisani kod obolelih ovaca. Opisano je da bolest traje između mesec dana i 3 meseca. Najčešći opisani znaci su gubitak težine uprkos preostalom apetitu, ataksija i progresija do ležanja, kao i pruritus.

Promene u ponašanju uključuju apatiju, nervozu ili agresivnost. Ponekad se ređe nalaze simptomi ograničeni na pojedinačne životinje i uključuju lateralizaciju neuroloških znakova kao što su vrtenje u krug, grizenje, ptijalizam, hiperestezija, regurgitacija, oštećenje vida, smanjenu mlečnost i tremor.

Atipični skrejpi se javlja uglavnom kod životinja starijih od 5 godina. Postoje izveštaji koji ukazuju da je ataksija jedna od prvih kliničkih znakova. Ostali klinički znaci koje su farmeri primetili uključuju drhtanje, promene u ponašanju i držanju, kao i gubitak telesne mase. Tremor se jedva primećivao, a alopecija usled pruritusa se nije pojavljivala. Abnormalni neurološki nalaz je ataksija zadnjeg ekstremiteta sa hipermetrijom. Opisan je slučaj koze kod koje su se javili slepilo, ukočen hod i apatija. [22]



Slika 10 Klinička slika Skrejpi kod koze [35]



Slika 11 Klinička slika Skrejpi kod ovce [35]

4.5. Patomorfološke promene

Kod skrejpija nema karakterističnih patoanatomskih promena. Na koži usled intezivnog svraba mogu se javiti predeli bez vune, sa crvenilom kože. Ove promene se najčešće sreću na lateralno na toraksu. Takođe, gubitak telesne mase će se odraziti i leševi će izgledati neuhranjeno iako su imale očuvan apetit.

Kod obolelih životinja mikroskopskim ispitivanjem mozga uočavaju se promene u vidu vakuolizacije neurona i interneuronalne supstance – matriksa, što nervnom tkivu daje spongiozan izgled. Vakuole mogu biti različitog oblika i veličine. U određenim neuronima one se pojavljuju pojedinačno u vidu relativno sitnih, jasno ograničenih praznih prostora, ovalnog do okruglog izgleda. Iako su najčešće javljaju pojedinačno u ponekim neuronima se mogu uočiti dve ili više vakuola, što nervnim ćelijama daje izgled balonirajuće distrofije.

Vakuolizacija matriksa zapaža se u područjima koja su intenzivnije zahvaćena promenama, kao što je kičmena moždina. Ove vakuole su obično sitnije u odnosu na vakuole koje se javljaju na neuronima, okruglog su do ovalnog izgleda i takođe predstavljaju dobro ograničen prazan prostor. U područjima sa intezivnom vakuolizacijom može se uočiti difuzno povećanje broja glija ćelija, naročito astrocita. Promene kod ovaca i goveda su ograničene na sivu supstancu moždanog stabla, uglavnom na područje produžene moždine, ponsa i međumozga (Slika 3). Kod životinja sa atipičnim grebežom spongiformne lezije uglavnom zahvataju koru malog mozga, koru velikog mozga i bazalne ganglije. Histopatološke lezije skrejpija su obično (iako ne uvek) bilateralno simetrične. [8]

4.6. Dijagnoza

Nadzor TSE-a kod malih preživara zasnovan je na brzim testovima, prilikom čega se testiraju uzorci moždanog stabla. Produžena moždina na nivou obeksa je najdosledniji i najprikladniji dijagnostički nivo CNS-a koji se uzorkuje radi testiranja na klasičnu grebež. Kod atipičnog skrejpja medula je minimalno zahvaćena, dok su mali mozak, talamus i bazalne ganglije zahvaćeni u najvećem stepenu. Stoga, uzimajući u obzir praktična i logistička razmatranja uzorkovanja, medula i mali mozak treba da se uzorkuju kroz foramen magnum i pregledaju kako bi se omogućila robusna dijagnoza i klasifikacija klasičnih i atipičnih slučajeva skrejpja. Svi uzorci sa pozitivnim ili sumnjivim rezultatom u jednom od brzih testova moraju biti ponovo testirani u nacionalnoj referentnoj laboratoriji koristeći jednu od odobrenih OIE potvrdnih metoda – histopatologija, imunohistohemija (IHC), elektronska mikroskopija i imunoblot SAF (*scrapie-associated fibrils*). [33]

Potreba da se napravi razlika između slučajeva skrejpja i mogućeg BSE kod ovaca i koza zahtevala je razvoj dijagnostičkih metoda sa potencijalom da se napravi razlika između agenasa koji izazivaju ove infekcije. Konformacija PrP specifičnog za bolest proizvedena kod ovaca zaraženih BSE razlikuje se od konformacije PrP specifične za ovčiji grebež. Ove konformacione razlike mogu se otkriti imunoblot ili IHC tehnike koje koriste antitela specifična za epitop. Unutar EU, strategija za razlikovanje uzročnika obuhvata ispitivanje uzorka CNS-a, nakon inicijalne detekcije putem aktivnog ili pasivnog nadzora (početni skrining), metodom Western imunoblot.

Nakon toga sledi stručni pregled i dalja ispitivanja biohemijskim i IHC metodama svih slučajeva u kojima su primarni rezultati bili dvosmisleni, konačno, ukoliko se idalje ne može isključiti BSE, vrši se biološki ogled gde se koristi standardizovani panel transgenih miševa, prema uputstvima datim u priručniku OIE. Interpretacija in vitro metode (Western imunoblot ili ELISA) se oslanja na razlike između BSE i skrejpi priona na N-terminalnom kraju, mestu cepanja PrP^{Sc} prilikom varenja proteinazom-K (PK). In situ IHC pristup se oslanja na distribuciju i epitop specifične obrasce obeležavanja PrP^{Sc} u mozgu i limforetikularnom tkivu. [22]

4.6.1. Histološki pregled

Morfološke promene u CNS-u kod spongiformnih encefalopatija se sastoje uglavnom od vakuolizacije tela neuronskih ćelija i okolnog neuropila, praćena promenljivom i obično manje upadljivom gliozom. Gliozna je čest i nespecifičan odgovor glia ćelija na različite stimulse i često je prisutna kod prionskih bolesti. Kod skrejpja, primećena je hipertrofična astroglia i aktivacija mikroglije, generalno povezana sa naslagama PrP^{Sc}, vakuolizacijom i neuronskom degeneracijom. I astrociti i mikroglija mogu da akumuliraju PrP^{Sc} u prirodnim i eksperimentalnim slučajevima skrejpja. Tipično, lezije imaju bilateralno simetričnu raspodelu. Postoje značajne varijacije u obrascu distribucije vakuolizacije i drugih promena. [28]

Kod klasičnog skrejpja, lezije su obično najočiglednije u moždanom stablu i to često na dorzalnog jezgru vagusnog nerva. Ne postoji direktna korelacija između težine kliničkih znakova i patoloških promena. Na profil lezije mogu uticati soj skrejpja, genotip PRNP gena, put infekcije, starost domaćina i trajanje kliničke faze. Sumnja na skrejpj ne može se ukloniti ukoliko se ne mogu pronaći značajne vakuolarne promene u mozgu, a pregled treba da bude podržan dodatnim dijagnostičkim testovima. Ovo je posebno važno za atipični skrejpj, u kome nema vakuolizacije u moždanom stablu. U ovim slučajevima, vakuolizacija, ako se uopšte dogodi, generalno je ograničena na molekularni sloj kore malog mozga i bazalne ganglije. [33]

Druge karakteristične lezije skrejpja su degeneracija i gubitak neurona, koji uključuju diseminovane nekrotične neurone ponekad praćene neurofagijom, distrofičnim neuritima i bazofilnim neuronima. Cerebralna amiloidoza je takođe česta kod skrejpja kod ovaca.

Iako histološki pregled ne treba koristiti kao primarni skrining ili potvrdni test u programu praćenja skrejpja, može se koristiti za identifikaciju slučajeva skrejpja ispitivanjem hematoksilina i sekcije eozina, koji se mogu generisati tokom drugih šema nadzora. Histološki pregled je još uvek vredan istraživački alat, posebno za beleženje distribucije i intenziteta vakuolarnih lezija u CNS-u i za postizanje diferencijalne dijagnoze u slučaju negativnog rezultata skrejpja. [33]

4.6.2. Biopsija limfoidnog tkiva

Klasični grebež se može dijagnostikovati kod živih ovaca otkrivanje priona biopsijom membrane trećeg očnog kapka, krajnika ili limfoidnog tkiva rektalne sluzokože. Oni se takođe ponekad mogu pronaći i u superficijalnim limfnim čvorovima. Biopsije trećeg kapka i rektalne sluzokože se mogu uzeti bez sedacije, uz pomoć lokalne anestezije. Biopsija krajnika zahteva anesteziju i manje su praktične za terenske intervencije. Minimalna količina limfoidnih folikula je prisutna u približno 80% uzoraka biopsije trećeg očnog kapka, te se procenjena dijagnostička osetljivost imunohistohemijskog bojenja uzoraka biopsije trećeg kapka za detekciju PrP^{Sc} kreće od 85% do 90%. [28]

Drugi nedostaci u vezi sa upotrebom trećeg kapka za antemortem dijagnozu skrejpja su ti što starije životinje (tj. životinje koje će najverovatnije razviti kliničke znake) imaju tendenciju da imaju manje limfoidnog tkiva u trećem očnom kapku, limfoidno tkivo ne regeneriše se u trećem kapku, što onemogućava prikupljanje uzoraka za ponovno testiranje. U rektalnoj sluzokoži se nalazi veća količina limfoidnog tkiva u odnosu i na krajnike i na konjunktive trećeg očnog kapka. Rektalna mukoza se može uzorkovati više puta bez smanjenja broja limfoidnih folikula dobijenih po uzorku. Najmanje 10 limfoidnih folikula je prisutno u 87% uzoraka rektalne biopsije, što odgovara stopi lažno negativnih rezultata testa od približno 9%. Pored toga, uzorci rektalne biopsije mogu se koristiti za imunohistohemijske analize u tandemu sa enzimskim imunotestovima.

Negativan antemortem test na skrejpji, treba ponovo proceniti više puta na nivou pojedinca i na nivou stada zbog potencijalnih efekata koje PrP genotip, soj skrejpja, period inkubacije i stadijum bolesti mogu imati na performanse testa. Kod ovaca i koza sa klasičnim skrepjem, prioni ponekad mogu da se identifikuju u perifernim limfoidnim tkivima, pre nego što stignu do mozga. Prioni koji izazivaju atipični skrejpji do danas nisu pronađeni u tkivima izvan CNS-a. [33]

4.6.3. Biološki ogled

Biološki testovi koji uključuju miševe koji eksprimiraju transgeni PrP^C su korisni za procenu efikasnosti prenosa agensa grebeža. Na primer, Tg338 miševi prekomerno eksprimiraju ovčiji VRQ transgen i koriste se za analizu izolata ovčijeg skrejpia. Prenos agensa skrejpia sa ovce na miša koji eksprimira ovčiji PrP^C je efikasniji od prenosa agensa na miša koji eksprimira mišji PrP^C. Štaviše, transgeni miševi često prekomerno eksprimiraju PrP^C, što omogućava da se prionske bolesti in vivo razmnožavaju brže i sa većom osetljivošću nego što bi se bolest mogla razmnožavati u normalnim uslovima u prirodnom domaćinu tokom godina.

Na primer, klasični soj skrejpia x124 dobijen od ovce sa VRQ/ARR genotipom ima vreme inkubacije od 9,9 do 13,0 meseci nakon intranazalne inokulacije kod ovaca sa VRQ/ARQ genotipom, dok će Tg338 miševi kojima je inokulisan isti soj skrejpia imati vreme inkubacije od otprilike 76 dana. Kraći period inkubacije prionskih bolesti kod transgenih miševa omogućava da se in vivo eksperimenti izvode brže i uz manje troškove nego slični eksperimenti na prirodnim domaćinima. [33]

Eksperimentalni modeli koji uključuju miševe se široko koriste za identifikaciju sojeva priona povezanih sa bolešću. U tim modelima, sojevi priona se porede na osnovu obima vakuolizacije izazvane na unapred definisanim lokacijama sive i bele mase. Laboratorijski miševi divljeg tipa C57BL/6, RIII i VM redovno se koriste u eksperimentalnim modelima prionskih bolesti. Međutim, upotreba miševa može biti isključena zbog efekata barijere vrste i niske stope prenosa. U takvim slučajevima, upotreba transgenih miševa koji eksprimiraju PrP^C vrste domaćina često može rezultirati većim stopama prenosa i kraćim periodima inkubacije.

Ispitivanja infektivnosti se oslanjaju na eksperimentalni prenos, ali zbog etičkih razmatranja i dugih perioda inkubacije povezanih sa TSE, kriterijum prenosivosti ne koristi se za rutinsku dijagnozu. Međutim, biološki eksperimenti su važna metoda kojom se identifikuju i definišu nove fenotipske varijante priona, i razlikuju slučajevi grebeža od BSE kod ovaca ili koza. [28]

4.6.4. Diskriminatorni Imunoblot

U skladu sa zakonodavstvom EU (januar 2005, EC regulativa 36/2005), svi potvrđeni slučajevi TSE-a kod malih preživara trebaju da se ispituju dodatnim diskriminatornim testovima za otkrivanje BSE infekcije kod ovaca i koza. Ovo uključuje diskriminatorni imunoblot (prema definisanim imunoblot protokolima) i biološki test na mišu (tipizacija soja) bilo kog izolata sa uzorkom imunoblotinga sličnim BSE.

Razlike u veličini neglikozilovanog PrP^{Sc} tretiranog proteinazom K (PK) mogu biti prikazani SDS-PAGE elektroforezom visoke rezolucije nakon čega sledi imunoblot metoda ili vezivanje monoklonskih antitela na epitop koji se nalazi na neravnom kraju PK-cepanog PrP^{Sc}. Jedno od ovih antitela je, na primer, mab P4, čiji epitop WGQGGS ostaje detektovan nakon PK varenje PrP^{Sc}, za razliku od BSE PrP^{Sc}, iz kojeg je ovaj epitop odsečen dejstvom enzima PK. Antitela koja prepoznaju epitop u regionu jezgra PrP^{Sc}, mab L42, na primer, detektuje skrejpri kao i BSE PrP^{Sc} nakon PK digestije, jer ovaj tretman nema uticaja na epitope jezgra proteina. Poslednjih godina, razvilo se nekoliko tehnika tipizacije biohemijskih sojeva, koji koriste ove razlike u mestu cepanja PrP^{Sc} dejstvom PK.

U Nemačkoj se primenjuje takozvani FLI test, što je biohemijska strategija tipizacije BSE/skrejpri priona koja koristi razlike u mestu glikozilacije i PK cepanja PrP^{Sc}. Antitela za detekciju su mab L42 i P4. Prema FLI testu, PrP^{Sc} u uzorku će biti ocenjen kao BSE i podvrgnut daljem ispitivanju pomoću biotestiranja na mišu (tipizacija soja), ako je uzorak u skladu sa sledeća tri biohemijska atributa:

1. Odnos glikoforma za diglikozilovani oblik je iznad 50%;
2. Odnos vezivanja antitela P4/L42 ima nižu vrednost od 0,4;
3. Molekulska masa je za >0,5 kDa niža od one kod unutrašnjeg skrejpri standarda. [22]

4.6.5. Western Immunoblot

Western blotting (WB) je metoda za dijagnostikovanje TSE sa visokom osetljivošću i specifičnošću. I PrP^C i PrP^{Sc} imaju molekulsku masu od 33-35 kD. Kada se vari proteinazom K, PrP^C se potpuno razgrađuje, dok se N-terminalni kraj PrP^{Sc} uklanja, ostavljajući rezistentnu frakciju od 27-30 kD, nazvanu PrP 27-30 ili PrP^{Res}. Osnovna metodologija WB sastoji se od ekstrakcije rezistentnog fragmenta PrP^{Sc} digestijom proteinazom K, odvajanja proteina u poliakrilamidnom gelu elektroforezom i transfera na nitroceluloznu membranu koja je inkubirana sa specifičnim antitelima. [23]

PrP^{Res} se vezuje za specifična antitela, što se detektuje u pozitivnim uzorcima mozga. Dijagnoza zasnovana na detekciji PrP^{Res} od strane western imunoblot-a za slučajeve klasičnog skrejpja zahteva da imuno obeležene trake koje odgovaraju proteinima u opsegu molekulske mase od 17 kDa (neglikozilovani PrP^{Res}) do 27 kD (diglikozilovani PrP^{Res}) budu prisutne isključivo kod traka za uzorake skrejpja tretiranih proteinazom-K, a trake za kontrolne uzorke pružaju odgovarajuća poređenja.

Za atipične ili Nor98 slučajeve grebeža, koristi se više traka radi vizualizacije pomoću western imunoblota u rasponu od približno 11 do 31 kD. Kako je atipični skrejpj PrP^{Sc} manje otporan na varenje dejstvom proteinaze K od klasičnog skrejpja PrP^{Sc}, koriste se optimizovane tehnike za otkrivanje atipičnog grebeža u kojima je u postupku smanjena koncentracija ovog enzima. Atipični soj skrejpja pokazao je, nakon varenja proteinazom K, višepojasni obrazac. Ovi izolati su pokazali petopojasni uzorak oko 31, 27, 21, 18 i 11 kDa. [28]

Originalna tehnika korišćena za dijagnozu BSE-a, poznata pod nazivom naziva „WOAH western imunoblot tehnika“ se oslanja na ekstrakciju deterdžentom velike količine svežeg uzorka mozga (nominalno 2-4 g) nakon čega sledi ultracentrifugiranje radi koncentrisanja PrP i na kraju sledi tretman proteinazom K. Ova tehnika se takođe može koristiti za otkrivanje klasičnog i atipičnog skrejpja. [33]

Dijagnoza zasnovana na detekciji priona u limfnim čvorovima ovaca i koza može poboljšati aktivni nadzor skrejpja i za govedu spongiformnu encefalopatiju (BSE).

Sa veličinama uzoraka koje omogućavaju ponavljanje testiranja i lokacijom koja je lako dostupna prilikom klanja, retrofaringealni limfni čvorovi (RLN) se smatraju odgovarajućim organima za testiranje.

Western blot (WB) homogenata mozga je, u principu, tehnika koja je pogodna i za detektovanje i za razlikovanje grebeži od BSE. WB je obezbedio brzu dijagnostiku u RLN i proučavanje biohemijskih karakteristika PrP^{Res}. Optimalna detekcija PrP^{Res} u RLN pomoću WB je postignuta pravilnom obradom tkiva, izborom antitela i uključivanjem koraka za PrP^{Res} koncentraciju. Analize su obavljene na tri različita izvora ovaca:

1. U studiji sa pretkliničkim slučajevima grebeža, WB RLN od inficiranih ovaca genotipa VRQ/VRQ polimorfne PrP aminokiseline 136, 154 i 171 - omogućile su dijagnozu 14 meseci ranije u poređenju sa WB moždanog stabla.
2. Uzorci sakupljeni od ovaca sa potvrđenim skrejpjem u toku programa pasivnog i aktivnog nadzora u periodu 2002-2003 dali su pozitivne rezultate u zavisnosti od genotipa. Sve ovce sa genotipovima ARH/VRQ, VRQ/VRQ i ARQ/VRQ su bile pozitivne za PrP^{Res}, ali ARQ/ARQ i ARR/VRQ nisu svi bili pozitivni.
3. U eksperimentalnoj BSE studiji, detekcija PrP^{Res} kod svih 11 ARQ/ARQ ovaca, uključujući 7 pretkliničkih slučajeva, bila je moguća. U svim slučajevima, WB i IHC su bili skoro jednako osetljivi. Štaviše, BSE infekcija se može razlikovati od infekcije skrejpja bržom elektroforetskom migracijom PrP^{Res}. Koristeći dvostruko bojenje antitela sa odabranim monoklonskim antitelima kao što su 12B2 i L42, ove razlike u migraciji bi se mogle iskoristiti za nedvosmisleni diferencijaciju između BSE i skrejpja. [34]

4.6.6. Imunohistohemijske metode

Imunohistohemijska metoda (IHC) otkriva PrP^{Sc} in situ, omogućavajući detekciju patološkog proteina, njegovu distribuciju u tkivu, njegovu ćelijsku lokaciju i karakteristike njegove morfološke akumulacije.

Detekcija PrP^{Sc} IHC tehnikama omogućava dijagnostiku grebeža pre nego što histopatološke lezije pojave u CNS ili kada su one minimalne ili neuverljive. Isto tako, nekoliko studija je pokazalo sposobnost IHC da otkrije PrP^{Sc} u tkivima u kojima nije bilo moguće izvršiti histopatološku dijagnozu, zbog autolize ili zamrzavanje uzorka. Naslage PrP^{Sc} povezane sa histopatološkim lezijama ili u oblastima gde nema vakuolizacije ili gde je vakuolizacija minimalna.

Imunobojenje je obično bilateralno i nalazi se uglavnom u moždanom stablu. Međutim, često se distribuira po CNS-u. Različiti tipovi specifičnog imunološkog bojenja PrP naslaga kod skrejpja su detaljno opisani i okarakterisani:

- Intranuronski: diseminovani granularni depoziti u neuronskom perikarionu.
- Intraglijalno: diseminovane granularne ili ovoidne naslage u citoplazmi glijne ćelije.
- Povezano sa glijom: radijalni depoziti povezani sa glijom ćelijama.
- Subprijalna: multifokalne ili kontinuirane akumulacije, povezane sa glijom ćelijama ispod pia mater.
- Perivaskularno: naslage povezane sa glijom ćelijama, ali lokalizovane oko krvnih sudova.
- Subependimsko: depoziti, generalno diskontinuirani, smešteni u sloju glijne ćelije koji se nalazi ispod ependimskih ćelija ventrikularnog sistema.
- Ependimski: naslage na apikalnim ivicama ćelije ependima:
- Linearni: debele naslage u linearnoj organizaciji.
- Fini punktati: male granule u neuropilu.
- Grubi punktati: sličan prethodnom, ali sa većim naslagama nepravilnog oblika.
- Koalescentne: naslage u neuropilu koje se sastoje od fuzije nakupina grubih čestica PrP, formirajući amorfne mase, ili strukturu nalik mrežici.
- Perineuronalni: fine naslage oko neuronskog perikariona i neuriti.
- Plakovi: velike akumulacije Prp fibrilarnog i zračnog oblika, tipično lokalizovane oko krvnih sudova.

Kod atipičnog skrejpja, karakteristično taloženje PrP^{Sc} sive i bele materije je fino tačkasto do krupno zrnasto. Ne karakteriše ga intraneuronsko bojenje, a taloženje u moždanom stablu je retko.

Mali mozak je jedna od najvažnijih oblasti u taloženju PrP^{Sc} kod atipičnog skrejpja, a takođe supstancija nigra je takođe pokazala perineuronsko i linearno bojenje kod ove bolesti.[23]

Akumulacija PrP^{Sc} u mozgu ovaca obolelih od skrejpja prikazuje se imunohistohemijskom metodom (IHC) na materijalu fiksiranom formalinom, primenom različitih tehnika demaskiranja epitopa i korišćenje odgovarajućih antitela protiv PrP. Prepoznavanje specifičnih morfoloških imuno-obeležanih konfiguracija, kao i obrazaca neuroanatomske distribucije pružaju osnovu za potvrdnu dijagnozu klasičnog i atipičnog grebeža. [33]

Rađena je studija koja je ispitala da li se PrP^{Res} može detektovati u mozgu ovaca sa skrejpjem imunohistohemijom (IHC). Odgovarajuća IHC procedura je razvijena korišćenjem moždanog tkiva hrčaka kojima je inokulisan agens prenosive encefalopatije kune. Uzorci tkiva su fiksirani u PLP koji je sadržao paraformaldehid u koncentraciji od 0,125%. Pre primene IHC tehnike, delovi tkiva su deparafinizovani i tretirani mravljom kiselinom da bi se istovremeno poboljšala PrP^{Res} imunoreaktivnost i degradirala PrP^{Sen}. Primarno antitelo je dobijeno od zeca imunizovanog na PrP^{Res} ekstrahovan iz mozga miševa sa eksperimentalno izazvanim grebežom. IHC je pregledan mozak 21 ovce sa histopatološki potvrđenim skrejpjem.

U svim uzorcima, PrP^{Res} je bio široko rasprostranjen po celom moždanom stablu. Bojenje je bilo posebno intenzivno u telima neuronskih ćelija i oko krvnih sudova. IHC tehnika je uspešno otkrila PrP^{Res} u uzorcima mozga koji su bili zamrznuti ili koji su bili ozbiljno autolizovani pre fiksacije u PLP. Mozak od 11 ovaca sa sumnjom na skrejpji, koji nisu histološki utvrđeni pozitivnim na skrejpji, su takođe pregledani IHC. PrP^{Res} je pronađen u 4 od ovih uzorka. Sekcije mozga iz 14 klinički zdravih ovci nisu imale PrP^{Res} koji se može detektovati. Rezultati ove studije pokazuju da je IHC detekcija PrP^{Res} ekvivalentna, a možda i superiornija, histopatologiji za dijagnozu skrejpja kod ovaca. Štaviše, IHC je primenljivo na tkiva koja imaju autolitičke promene ili artefakte obrade koji sprečavaju zadovoljavajuće histopatološke procene lezija skrejpja. [35]

4.6.7. Brzi testovi

Brzi dijagnostički testovi su odobreni za otkrivanje uzročnika u nervnom tkivu zaraženih životinja. Svaka tehnika koja ima za cilj suzbijanje ovih bolesti mora biti naučno dokazana i rigorozno potvrđena od strane EU. Ove tehnike omogućavaju dijagnozu velikog broja životinja u relativno kratkom vremenu. U većini ovih brzih testova, prečišćavanje prionskih proteina je zasnovano na biohemijskim razlikama između ova dva proteina. Dakle, većina njih se zasniva na varenju PrP^C proteolitičkim enzimima (proteinaza K) i otpornosti PrP^{Sc} na ovaj enzim. Konačno, svi brzi testovi uključuju korak koji se sastoji od denaturacije rezistentne frakcije PrP^{Sc}, kako bi se omogućilo njeno vezivanje sa antitelom koje prepoznaje denaturisani PrP^{Sc}. [22]

Brzi testovi se oslanjaju na optimizaciju reagenasa koji se koriste za ekstrakciju i varenje i specifičnih antitela za detekciju. Većina brzih testova koristi uzorke manje od 0,5 g i mnogi alati za uzorkovanje su dizajnirani za poduzorkovanje preciznih količina. Međutim, da bi se omogućilo dodatno testiranje savetuje se uzimanje najmanje 1g za početni uzorak. Ako je dostupno dovoljno tkiva, neke laboratorije koriste WB za potvrdu bilo kakvih slabo pozitivnih uzoraka koji se inicijalno otkrivaju brzim testom. Povećana količina ili koncentracija PrP^{Res} ekstrahovana ultracentrifugiranjem iz većeg alikvota moždanog tkiva može poboljšati osetljivost.

Brzi testovi nejasno identifikuju klasični i atipični skrejpi, ali imajući u vidu razlike u taloženju PrP^{Sc}, izbor uzorka je relevantan za potvrdu bolesti. U slučaju klasičnog grebeža, moždano stablo je najteže pogođeno područje, dok je u slučaju atipičnog skrejpija mali mozak tipično najviše pogođen. [33]

4.6.8. In vitro metode – PMCA i QuIC

Novije in vitro metode, kao što je konverzija izazvana kvakingom (quaking-induced conversion – QuIC) i ciklično povećanje pogrešno savijenog proteina (protein misfolding cyclic amplification – PMCA) se sve više koriste za povećanje dijagnostičke osetljivosti, iako nijedna nije zvanično odobrena.

Ove metode koriste PrP^C kao supstrat i agregacija proteina se vrši kroz višestruke cikluse, kako bi se postiglo uvećanje čak i veoma malih količina PrP^{Sc}, a PMCA takođe pokazuje potencijal za razlikovanje soja agensa. PMCA test je konceptualno analogan PCR. Za PMCA metodu, uzorak koji sadrži PrP^{Sc} se dodaje u supstrat homogenata mozga od životinje bez TSE, koja se zatim podvrgava naizmeničnim koracima inkubacije i ultrazvuka. Male količine PrP^{Sc} koje se ne mogu detektovati, se na kraju umnožavaju dovoljno da se mogu detektovati Western blot ili ELISA analizom.

U skorije vreme, upotreba PK-osetljivog rekombinantnog PrP u PMCA testu smanjila je vreme potrebno za izvođenje testa sa 3 nedelje na nekoliko dana. Kada se uzorak koji sadrži PrP^{Sc} doda homogenatu mozga koji sadrži rekombinantni PrP osetljiv na PK, rekombinantni PrP koji se ne može detektovati se konvertuje pomoću ultrazvuka u rekombinantni PrP otporan na PK koji se može detektovati pomoću. PMCA test ne može da pojača atipične sojeve skrejpja. Trenutno, PMCA test se ne koristi kao dijagnostički alat zbog potencionalne spontane konverzije, koja bi za posledicu imala lažno pozitivne rezultate testova, što bi moglo dovesti do nepotrebnih ograničenja kretanja životinja ili depopulacije stada. [33]

Alternativa PMCA testu je QuIC metoda. Originalna QuIC tehnika identifikovala je prione iz uzorka u roku od jednog dana i oslanjala se na Western blot analizu. Poboljšana tehnika koja se zove QuIC u realnom vremenu (real-time QuIC) koristi čitač ploča i meri fluorescenciju tioflavina T kada je u interakciji sa amiloidnim fibrilima. Intenzitet fluorescencije se povećava kao odgovor na formiranje amiloida. Uz uspostavljanje standardne krive, ova tehnika se može koristiti za kvantifikaciju količine priona u uzorku.

Nedavno opisana varijacija QuIC-a nazvana endpoint QuIC koristi termomikser umesto čitača ploča za protresanje uzoraka. Postoje razlike u pragovima detekcije za prione između konvencionalnog real time QuIC i endpoint QuIC u različitim vremenskim intervalima. Real time QuIC tehnika je takođe korišćena za razlikovanje sojeva priona. [28]

4.7.Diferencijalna dijagnoza

Skrepie treba razlikovati od:

1. Morbus Aujeszky (lažno besnilo) – akutno kontagiozno virusno oboljenje izazvano Alphaherpesvirusom;
2. Besnila – akutna fatalna zarazna bolest izazvana virusom iz roda Lyssavirus;
3. Listerioza – bakterijska bolest izazvana bakterijom *Listeria monocytogenes*;
4. Maedi-Visna (progresivna pneumonija ovaca) – kontagiozna bolest ovaca i koza, izazvana virusom iz roda Lentivirus;
5. Metabolička oboljenja: ketoza i hipomagnezijemija;
6. Intoksikacije. [8]

4.8. Terapija i profilaksa

Kao ni za ostale prionske bolesti, tako ni za skrejpri ne postoji adekvatna terapija i oboljenje se završava smrću. Prognoza je svakako nepovoljna. [8]

Kontrolne mere za klasični i atipični skrejpri uključuju pasivni nadzor nad životinjama koje su imale moguće kliničke znake skrejprija ili aktivni nadzor prema utvrđenim planovima uzorkovanja određenog broja malih preživara. Prilikom nadzora vrši se testiranje uzoraka nervnog tkiva nakon klanja histopatološki ili raznim testovima na prione (npr. Western blot ili raznim drugim testovima). Takođe, kontrolna mera je i odstranjivanje SRM (specifičnog rizičnog materijala). SRM za ovce i koze starije od 12 meseci ili sa izbijenim stalnim sekutićima su lobanja (isključujući rogove, ali uključujući mozak i oči) i kičmena moždina. [1]

5 ZAKLJUČAK

Transmisivne spongiformne encefalopatije predstavljaju grupu progresivnih neurodegenerativnih oboljenja koja imaju veliki značaj u veterinarskoj i humanoj medicini. Njihova osnovna karakteristika jeste dug period inkubacije, postepeno napredovanje patoloških promena u centralnom nervnom sistemu i letalan ishod, jer za ova oboljenja ne postoji efikasna terapija. Bovina spongiformna encefalopatija (BSE) i skrejpi predstavljaju značajne prionske bolesti preživara koje se razlikuju prema epidemiološkim karakteristikama, kliničkoj slici i pojedinim patološkim promjenama, ali imaju zajedničku osobinu da dovode do progresivnog oštećenja nervnog tkiva. Kod BSE posebno je značajna povezanost sa upotrebom hrane kontaminirane prionima, dok je skrejpi važan zbog svog prisustva kod ovaca i koza i potrebe za njegovim razlikovanjem od drugih nervnih oboljenja. Pored klasičnih, opisani su i atipični oblici ovih bolesti, što dodatno naglašava značaj primene odgovarajućih dijagnostičkih metoda.

Pravovremeno prepoznavanje sumnjivih životinja predstavlja važan segment kontrole ovih oboljenja. Promene u ponašanju, poremećaji koordinacije, preosjetljivost na spoljašnje nadražaje, progresivno mršavljenje i drugi neurološki simptomi mogu ukazati na postojanje prionske bolesti. Ipak, konačna potvrda zahtijeva primjenu odgovarajućih laboratorijskih metoda, među kojima značajno mjesto zauzimaju histopatološki pregled, imunohistohemijska analiza, ELISA i Western blot. Aktivni i pasivni nadzor omogućavaju otkrivanje sumnjivih slučajeva, praćenje pojavljivanja bolesti i pravovremeno preduzimanje propisanih mera.

Poseban značaj ima kontrola bovine spongiformne encefalopatije zbog njenog zoonotskog potencijala i povezanosti sa nastankom Creutzfeldt–Jakobove bolesti kod ljudi. Zakonska regulativa i kontinuirani veterinarski nadzor imaju ključnu ulogu u sprečavanju širenja prionskih bolesti, zaštiti zdravlja životinja i očuvanju bezbednosti hrane. Dosadašnje iskustvo u kontroli BSE pokazuje da sprovođenje preventivnih mera može značajno smanjiti učestalost oboljenja i rizik za zdravlje ljudi. Zbog toga je neophodno održavati efikasan sistem nadzora, unapređivati dijagnostičke postupke i dosledno primjenjivati propisane mere kontrole.

6 LITERATURA

1. Bojan B., Higijena mesa, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, 2023., 105-107
2. Badiola, J. J., & Otero Garcia, A. (2026). *Bovine Spongiform Encephalopathy*. MSD Veterinary Manual.
3. Centers for Disease Control and Prevention. (2024). *Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) | Mad cow disease*. U.S. Department of Health & Human Services.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2004). Bovine spongiform encephalopathy in a dairy cow --- Washington State, 2003. *MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report*, 52(53), 1280–1285.
5. Animal and Plant Health Inspection Service. (2026). *Disease Alert: Bovine Spongiform Encephalopathy*. U.S. Department of Agriculture.
6. Centers for Disease Control and Prevention. (2024). *Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) | Mad cow disease*. U.S. Department of Health & Human Services.
7. Marković, D., & Marković, M. (2004). Prioni i prionske bolesti. *Glasnik pulske bolnice*, 1(1), 5–11.
8. Sonja R., Miroslav V., Bosiljka Đ., Infektivne bolesti životinja – Specijalni deo, Sonja Radojčić autorsko izdanje, Beograd, 2011., 639-651
9. Radić, M. (2010). *Transmisibilne spongiformne encefalopatije (sin. Prionske bolesti)*. Veterina.info.
10. Andrews A.H., Blowey R.W., Boyd H., Eddy R.G., *Bovine medicine, Diseases and Husbandry of Cattle*, 2nd edition, Blackwell Science, UK 2004., 901-911
11. World Organisation for Animal Health (WOAH). (2023). *Bovine spongiform encephalopathy*.
12. Bovine spongiform encephalopathy. (2026, 14. oktobar). U *Wikipedia*.
13. Peter D. C., Kenneth W. H., Stanley H. D., Walter G., Radostits O. M., *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*, 11th edition, Elsevier, St. Louis, Missouri, 2017., 1287-1992

14. Radostits O. M., Gay C. C., Hinchcliff K. W., Constable P. D., Veterinary medicine: a textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats, 10th edition, Saunders Elsevier, Edinburgh 2006., 1446-1452
15. Jubb, Kennedy, and Palmer's, Pathology of domestic animals, 6th edition, Elsevier, St. Louis, Missouri 2016., 347-350
16. Iulini, B., Vallino Costassa, E., Corona, C., Meloni, D., Favole, A., Mazza, M., Caramelli, M., Maurella, C., & Casalone, C. (2017). Classical and Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy: Epidemiology, Pathogenesis and Diagnosis. U Y. Tutar (Ur.), *Prion - An Overview* (str. 1–21). IntechOpen.
17. Biffiger, M., Zwald, D., Kaufmann, L., Bransch, A., Würzler, B., Malik, E., Moser, P., Schaller, O., Meyer, R., Erni, G., & Casal, J. I. (1999). Detection of bovine spongiform encephalopathy-specific PrP^{Sc} by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3502–3510.
18. Belize Livestock Producers' Association (BLPA). (2023). *Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)*.
19. California Department of Food and Agriculture. (2026). *Livestock with Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)*.
20. Baylis, M., & Goldmann, W. (2004). The genetics of scrapie in sheep and goats. *Current Molecular Medicine*, 4(4), 385–396
21. Huang, Z., Prusiner, S. B., & Cohen, F. E. (1996). Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Folding & Design*, 1(1), 13–19
22. Fast C, Groschup MH. Prions and Diseases: Volume 2, Animals, Humans and the Environment. Springer New York; 2013.
23. Acín, C., Bolea, R., Monzón, M., Monleón, E., Moreno, B., Filali, H., Marín, B., Sola, D., Betancor, M., Guijarro, I. M., Toledano, A., López-Pérez, Ó., Pumarola, M., Badiola, J. J., & Luján, L. (2021). Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats. Review on the Etiology, Genetic Factors, Pathogenesis, Diagnosis, and Control Measures of Both Diseases. *Animals*, 11(3), 691.

24. Redman, C. A., Coen, P. G., Matthews, L., Lewis, R. M., Dingwall, W. S., Foster, J. D., Chase-Topping, M. E., Hunter, N., & Woolhouse, M. E. J. (2002). Comparative epidemiology of scrapie outbreaks in individual sheep flocks. *Epidemiology & Infection*, 128(3), 513–521.
25. Lühken, G., Buschmann, A., Brandt, H., Eiden, M., Groschup, M. H., & Erhardt, G. (2007). Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Veterinary Research*, 38(1), 65–80.
26. Fediaevsky, A., Tongue, S. C., Nöremark, M., Calavas, D., Ru, G., & Hopp, P. (2008). A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Veterinary Research*, 4, 19.
27. Bielanski, A., & de Koeijer, A. (2016). Prenatal transmission of scrapie in sheep and goats: A case study for veterinary public health. *Open Veterinary Journal*, 6(3), 194–214.
28. Cassmann, E. D., & Greenlee, J. J. (2020). Pathogenesis, detection, and control of scrapie in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 81(7), 600–614.
29. Healy A M, Weavers E, McElroy M, Gomez-Parada M, Collins J D, O’Doherty E, Sweeney T, Doherty M L. The Clinical Neurology of Scrapie in Irish Sheep. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 908–916
30. Vargas F, Bolea R, Monleón E, Acín C, Vargas A, I. De Blas I, Luján L, Badiola J J. Clinical characterisation of natural scrapie in a native Spanish breed of sheep. *Veterinary Record* 2005; 156: 318-319
31. D’Angelo A, Maurella C, Bona C, Borrelli A, Caramelli M, Careddu M E, Jaggy A, Ru G. Assessment of clinical criteria to diagnose scrapie in Italy. *The Veterinary Journal* 2007; 174: 106–112
32. World Organisation for Animal Health (WOAH). (2026). *Reference Laboratories: Criteria and internal rules*.
33. Adalsteinsson, S., Albertsdottir, E., Sigurdarson, S., Thorgeirsson, S., & Jonmundsson, J. V. (2006). A case-control study of scrapie in flocks in Iceland. *BMC Veterinary Research*, 2, 19
34. J M, A L, Taylor W D, Marsh R F, Rubenstein R, Race R E. Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 309-316
35. Murray, H. (2015, 11. august). *Scrapie 101 for Sheep and Goat Producers*. Animal Science with Extension, University of Delaware.