

OTKRIVANJE SVINJA SKLONIH MALIGNOJ HIPERTERMIJI (STRES- SINDROMU)

Đ. Senčić

Sažetak

Sklonost svinja malignoj hipertermiji (stres sindromu) posljedica je intenzivne i jednostrane selekcije na visoku mesnatost. Najmanja je učestalost stresu sklonih svinja u populacijama velikog jorkšira, a najveće kod izrazito mesnatih pasmina svinja (pietren, belgijski landras). Svinje sklone stres sindromu obilježavaju slabija vitalnost, češća iznenadna uginuća, osobito tijekom transporta, slabija plodnost, te izražena mesnatost uz učestaliju pojavu mesa lošije kakvoće (blijedo, mekano, vodnjikavo, tzv. BMV meso). Za otkrivanje stresu sklonih svinja postoji više postupaka (metoda), a najčešće se primjenjuju: halotan test, CK test i metoda lančane reakcije polimerazom. Zbog bržeg provođenja i pouzdanosti, metoda lančane reakcije polimerazom je najprihvatljivija.

Uvod

Poželjne učinke selekcije - bolju plodnost, tovnost, a osobito mesnatost svinja prate, na žalost, i negativne pojave - slabija vitalnost, veća sklonost stres-sindromu (Porcine Stress Syndrome - PSS) i proizvodnja blijedog, mekanog i vodnjikavog mesa (Pale Soft Exudative - PSE). Sklonost svinja stres-sindromu i proizvodnja mesa lošije kvalitete u etiopatogenetskoj su vezi. Etiologija im je vrlo kompleksna - uvjetovani su genetskim, ali i paragenetskim čimbenicima. Zbog velikih financijskih gubitaka, uzrokovanih slabijom vitalnošću i iznenadnim uginućima stres-osjetljivih svinja, njihovom slabijom plodnošću i pojavom mesa lošije kvalitete, ovom problemu se u svijetu, a posljednjih godina i u nas, poklanja sve više pozornosti u ispitivanjima.

Svinje sklone stres-sindromu obilježava naglašeno razvijena muskulatura, osobito butna, pojačana somatotropna (STH) i oslabljena tireosomatotropna (TSH) i adreno-kortikotropna (ACTH) aktivnost hipofize, niska podražajna razina centralnog živčanog sustava i umanjena funkcionalnost krvotoka. Zbog poremećenog neuro-hormonalnog stanja i oslabljene konstitucije, svinje suvremenih mesnatih pasmina sve se teže prilagođavaju na promjenjene i, osobito, na nepovoljne uvjete okoliša (stresore). Daljnjom selekcijom, uz primjenu isključivo konvencionalnih metoda za postizanje genetskog napretka, može se očekivati daljnje slabljenje bioloških funkcija i otpornosti svinja na nepovoljne čimbenike okoliša.

U intenzivnoj proizvodnji svinje su stalno izložene utjecaju različitih stresora.

Dr. sc. Đuro Senčić, Poljoprivredni fakultet Osijek

Utjecaj stresora može prouzročiti iznenadno uginuće stres-osjetljivih svinja, osobito u vrijeme transporta, kada su izložene naglom fizičkom i psihičkom opterećenju. Ukoliko svinje ipak ne uginu, mogu se razviti različiti oblici miopatije (atrofija kaudalne butne muskulature, nekroza leđne muskulature i ponekad miokarda), a post-mortalno tzv. BMV (bljedilo, mekano i vodnjikavo) meso ili, rjeđe, tzv. TČS (tvrdo, često i suho) meso.

U cilju suzbijanja pojave stres-sindroma (PSS) i sprečavanja proizvodnje mesa lošije kvalitete (BMV), stres-osjetljive svinje treba izlučiti iz rasploda. Otkriti se mogu na više načina:

- analizom aktivnosti mišićnih enzima u krvnoj plazmi (laktodehidrogenaze - LDH, kreatin kinaze - CK, aldolaza dehidrogenaze - ALD, glutamat-piruvatne transaminaze - GOT, malat-dehidrogenaze - MDH),
- analizom aktivnosti hormona u krvnoj plazmi (adrenalin, glukokortikoidi, tiroksin i dr.),
- mjerenjem sadržaja metabolita glikolize (glukoza, mliječna kiselina),
- određivanjem hemolitičkih pokazatelja (hemoglobin, hematokrit, broj stanica),
- određivanjem svojstava mišićnog tkiva biopsijom mišića,
- određivanjem osjetljivosti na anestetik halotan (halotan- test),
- određivanjem tipova krvnih grupa i enzimskih sustava, tj. genetičkih markera u krvi,
- metodom lančane reakcije polimerazom (PCR).

U praksi se primjenjuje samo nekoliko postupaka: halotan-test, određivanje kreatin-kinaze (CK-test), određivanje genetskih markera u krvi i metoda lančane reakcije polimerazom.

CK - test

Ovim testom određuje se aktivnost enzima kreatin-kinaze u krvi 12 - 20 sati nakon standardiziranog napora (stresa) koji u svinje uzrokuje morfološko i funkcionalno oštećenje tkiva i povećanje propustljivosti sarkolema za enzime mišića i njihov prijelaz u krv. Standardizirani napor, koji će izazvati blagu miopatiju (mišićnu degeneraciju), može se izazvati npr. trčanjem svinja na 100 m ili preparatom Myostres (Bichard, 1984.), koji se primjenjuje subkutano ili intramuskularno. Myostres aktivira motorični sustav uz izazivanje drhtavice i simptoma sličnih onima kod PSS: otežano disanje, ubrzani puls, povećanje temperature tijela, naizmjenično bljedilo i crvenilo kože. Krv treba uzimati iz ušne vene, jer se ubadanjem igle kroz mišić unose u venu i enzimi iz mišića u kojima je aktivnost CK i do 1000 puta veća nego u krvi.

Nedostaci CK-testa, kao metode za dijagnosticanje stres- osjetljivosti svinja, su:

- teže laboratorijsko dokazivanje enzima, uz potrebu strogog standardiziranja i pažljivosti,
- velika varijabilnost sadržaja CK u životinja zbog značajnog utjecaja čimbenika okoliša,
- kasno dobivanje jasnih rezultata, tek u poodmakloj fazi razvoja mišića, kod tjelesne mase od oko 60 kg.

Halotan-test

Druga mogućnost otkrivanja stres-osjetljivosti svinja je primjena halotan-testa. Test se temelji na pojavi da svinje sklone stresu, pri inhaliranju halotana reagiraju specifičnim simptomima malignog hipertermnog sindroma (Malignant Hyperthermia Syndrome - MHS): grčenje udova, pjegasto crvenilo kože, ubrzano disanje, tahikardija i hipertermija (Sybesma i Eikelenboom, 1969.). Životinje s opisanim simptomima su tzv. halotan-pozitivne (stres-osjetljive), dok one koje pri udisanju narkotika halotana ne reagiraju opisanim pojavama, već dolazi do opuštanja muskulature, spadaju u skupinu tzv. halotan-negativnih (stres-rezistentnih) životinja.

Pri provođenju halotan-testa postoje razlike u uvjetima narkoze: količina kisika, koncentracija halotana, trajanje narkoze i dob odnosno masa svinja. Najčešće se za testiranje uzima prasid tjelesne mase od 18 - 30 kg i izlaže 4 - 5 minuta udisanju mješavine kisika i 3 - 5% halotana. Kod svinja s pojavom MHS-a, narkoza se odmah prekida, kako ne bi došlo do acidoznog šoka i uginuća.

Pozitivna reakcija na halotan uvjetovana je autosomnim recesivnim genom "n", smještenim u lokusu Hal. Simptome MHS-a pokazuju samo homozigotno-recesivne životinje (Hal^{nn}), dok su dominantni homozigoti (Hal^{NN}) i heterozigoti (Hal^{Nn}) rezistentni na halotan.

"Halotan-gen" (n) ima značajan utjecaj na mesnatost svinjskih polovica. Neprekidnom selekcijom na povećanje mesnatosti svinja, bez istovremene selekcije na stres-rezistentnost, može se očekivati daljnje povećanje frekvencije "Halotan-gena" u populacijama mesnatih pasmina svinja. Selekcijom na otpornost prema halotanu ne mora se obvezatno očekivati i pogoršanje mesnatosti svinja, jer i među halotan-negativnim životinjama ima onih s izraženom mesnatošću, na što ukazuje i značajna varijabilnost mesnatosti kod halotan-negativnih svinja. Halotan-test je sastavni dio postupka procjenjivanja uzgojnih vrijednosti svinja (osobito nerastova u performans testu) u svim zemljama s naprednim svinjogojstvom. Neprekidnim radom na otkrivanju halotan-pozitivnih svinja, njihova se učestalost može značajno smanjiti.

S obzirom na osjetljivost na halotan, tj. sklonost stres- sindromu, postoji velika varijabilnost između pasmina. Svinje velikog jorkšira, duroka i hempšira skoro su potpuno stres- rezistentne, dok je kod izrazito mesnatih pasmina - belgijskog i njemačkog landrasa, a osobito pietrena (i do 100%), velika učestalost stres-osjetljivih životinja. Razlike u frekvenciji stres-osjetljivih svinja postoje i između populacija unutar pasmina.

Između stres-osjetljivih (halotan-pozitivnih, Hal^+) i stres- rezistentnih (halotan-negativnih, Hal^-) svinja postoje značajne razlike glede proizvodnih sposobnosti. Stres-osjetljive (Hal^+) svinje inferiornije su glede brzine rasta, ali i troše manje hrane za kg prirasta. Polovice halotan- pozitivnih svinja imaju više mišićnog tkiva i veće udjele vrijednijih dijelova - butova, leđa i plečki, tj. bolju strukturu u odnosu na polovice halotan-negativnih svinja. Međutim, mišićno tkivo halotan-pozitivnih svinja slabije je kvalitete, na što ukazuju niži pH_1 (mjereno 45' post mortem) i pH_2 (mjereno 24 sata post mortem), slabija sposobnost vezanja vode i konzistencija, kao i učestalija pojava BMV-mesa.

Učestalost pojave blijedog, mekanog i vodnjikavog (BMV) mesa u našim klaoni-
STOČARSTVO 49:1995 (1-2) 59-64

cama nedovoljno je ispitana. BMV-meso ima lošiji okus i slabiju tehnološku vrijednost, što se ogleda u većem kaliranju za vrijeme hlađenja, smrzavanja, dimljenja, kuhanja i pečenja, kao i nedovoljnom upijanju sastojaka salamure.

Halotan-pozitivne svinje imaju i lošija reproduktivna svojstva. Halotan-pozitivne krmače daju manje živo rođene i odbite prasadi, te imaju veće gubitke prasadi za vrijeme dojenja.

Nedostatak halotan-testa je što se njegovom primjenom ne mogu otkriti heterozigotne životinje (Hal^{Nn}) koje su fenotipski halotan-negativne, ali su nosioci recesivnog gena. Zbog toga i halotan-negativni roditelji mogu dati halotan-pozitivne potomke. Problem otkrivanja heterozigotnih životinja riješen je nakon što je utvrđena povezanost lokusa Hal s nekim drugim lokusima, koji nemaju recesivan karakter.

Test prema krvnim markerima

Genski lokus koji kontrolira reakciju svinja na halotan (Hal) nalazi se na istom kromosomu s genskim lokusom koji kontrolira sustav krvne grupe H, s lokusom koji upravlja sintezom enzima fosfoheksizoizomeraze - PHI i enzima 6-fosfoglukodehidrogenaze - 6-PGD, s lokusom za sustav krvne grupe S, te lokusom za postalbumin 2 - PO₂.

Genski lokus PHI određuju dva kodominantna alela, PHI^A i PHI^B pa prema tome postoje životinje s tri različita genotipa: PHI^{AA}, PHI^{BB} i PHI^{AB}, odnosno s tri različite varijante PHI enzima eritrocita. Alelni gen PHI^B najčešće je udružen s Halⁿ genom, što ukazuje na mogućnost primjene polimorfizma PHI u selekciji protiv stres sindroma u svinja i loše kakvoće mesa. Polimorfizam enzima PHI određuje se elektroforezom na škrobnom i agaroznom gelu i specifičnim bojanjem elektroforezograma (Detter i sur., 1968.; Gahne i Juneja, 1985.).

Slično lokusu PHI i lokus 6-PGD ima dva kodominantna alela, A i B, koji određuju elektroforetske varijante enzima 6- fosfogluko dehidrogenaze.

Lokus krvne grupe S sastavljen je od dva alela, S i s, a daje genotipove SS, Ss i ss. Nažalost, kod ovog lokusa ne mogu se serološki razlikovati SS i Ss životinje.

Lokus za serum-protein postalbumin-2 (PO₂) je pod kontrolom alela F i S, s tri genotipa: FF, FS i SS.

H je višealelni lokus krvne grupe. U literaturi se uglavnom razmatraju samo dva alela, H^a i H⁻, pri čemu je H⁻ složeni alel što uključuje sve alele koji ne proizvode antigen krvne grupe H^a. Nakon što je otkrivena povezanost između sistema krvne grupe H i kvalitete mesa (Jensen, 1976.), u Danskoj je od 1976. do 1979. godine primjenjivana selekcija pomoću markera (Marker Assisted Selection - MAS) u cilju popravljivanja indeksa kvalitete mesa (tzv. KK indeks). Kod svinja krvne grupe H^a, utvrđen je visoko signifikantan višak PSE mesa, tako da je početni pristup bio da se eliminiraju sve H (a+) svinje. Ovo je utjecalo na povećanje indeksa kvalitete mesa na zadovoljavajuću razinu, smanjenje pojave PSE mesa i frekvencije Halⁿ gena kod danskog landrasa. Međutim, povezanost između H krvne grupe i kvalitete mesa je u međuvremenu nestala, te je u Danskoj 1979. godine opisana selekcija prekinuta, a selekcija pomoću markera koristi se samo kod problematičnih stada (Andersen, 1985.). Lokusi koji su usko vezani s Hal lokusom, tzv. lokusi "markeri", mogu se

koristiti u selekciji protiv Halⁿ gena, odnosno stres-sindroma u svinja (PSS) i lošije kvalitete (PSE) mesa.

Elektroforezom i imunokemijskim metodama mogu se u krvi utvrditi proizvodi gena tijesno povezanih s Halⁿ genom, pri čemu ovi geni mogu poslužiti kao njegovi genetski markeri. Izbor gena-markera (alela) pri selekciji protiv Halⁿ gena, odnosno stres-sindroma i slabe kvalitete mesa zavisi o određenoj populaciji svinja.

Metoda lančane reakcije polimerazom (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Noviji način otkrivanja nositelja gena za malignu hipertermiju (stres sindrom u svinja) je metoda lančane reakcije polimerazom (Saiki i sur., 1988.). Ova metoda, u odnosu na halotan test, omogućava testiranje u kratkom vremenu većeg broja životinja i otkrivanje svih nositelja mutiranog gena. U zapadnoeuropskim zemljama ovaj test je obvezatan za sva matična stada svinja.

Novija su genetska istraživanja pokazala da je za pojavu maligne hipertermije odgovoran gen RYRI (Otsu i sur., 1991.; Fuji i sur., 1991.). Ovaj gen proizvodi membranski protein sarkoplazmatskog retikuluma mišića koji kontrolira protok kalcijevih iona u retikulum i iz retikuluma tijekom kontrakcije mišića. Ako se u tom proteinu mutacijom aminokiselina arginin na mjestu 615 zamijeni cistinom, stvara se nenormalni proizvod koji uzrokuje nagomilavanja kalcijevih iona u citoplazmi, simptome maligne hipertermije i uginuće životinje.

Za analiziranje gena RYRI metodom PCR-a, stanice tkiva treba razoriti i iz njih osloboditi DNA. Testiranje većeg broja uzoraka sastoji se od sakupljanja uzoraka, izolacije DNA, obrade restrikcijskim enzimom i elektroforeze. Uzorke krvi treba skupljati u sterilne epruvete u kojima je antikoagulans (EDTA), a treba ih čuvati na 4°C do tjedan dana ili smrznuti na -85°C.

Za izoliranje DNA treba u 50 µl krvi dodati pufer za razaranje stanica. Leukociti se izdvajaju centrifugiranjem, ispiru i podvrgavaju djelovanju proteinaze K preko noći. Proteinaza se nakon toga inaktivira zagrijavanjem. U smjesu treba dodati specijalni PCR-pufer, deoksiribonukleotid (200 µM), DNA- polimerazu (tzv. Tag-polimeraza) koja je aktivna i pri visokim temperaturama (50 µU) i posebna DNA "klice" koje služe za otpočinjanje i tijek reakcije (1 mg/ml). Smjesa se stavlja u poseban uređaj (DNA Thermal Cycler "Perkin Elmer", SAD) koji automatski mijenja temperaturu reakcije. Nakon 1-2 sata reakciju treba zaustaviti i u smjesu dodati restrikcijski enzim Hgi-AI zajedno s puferom. Smjesu treba inkubirati na 60°C 1-2 sata, a nakon toga nanijeti na agarozni gel i elektroforezom razdvojiti DNA po veličini. S obzirom da se u gelu nalazi etidijbromid, razdvojene DNA-vrpce mogu se vidjeti pod UV-svjetlom. Moguće su tri kombinacije DNA-vrpce u gelu:

1. dvije vrpce (genotip N/N)
2. tri vrpce (genotip n/n)
3. četiri vrpce (genotip N/n).

Metoda PCR-a je značajno brža i pouzdanija pri otkrivanju stresu sklonih svinja u odnosu na halotan test.

Zaključak

Za otkrivanje stresu sklonih svinja postoji više postupaka (metoda), a najčešće se primjenjuju: halotan test, CK test i metoda lančane reakcije polimerazom. Zbog bržeg provođenja i pouzdanosti i mogućnosti otkrivanja heterozigotnih životinja, za primjenu je najprihvatljivija metoda lančane reakcije polimerazom (PCR).

LITERATURA

1. Andresen, E. (1985): Selection against PSS by means Blood typing. EES Seminar of the Evulation of Meat Quality in Pigs, Dublin.
2. Bichardt, K. (1984): Pathogenese und Behandlungsmöglichkeiten der Myopathien beim Schwein. Der praktische Tierarzt, 65, 10, 841-844.
3. Dettler, J.C., Way, P.O., Giblett, E.R., Baughan, M.A., Hopkinson, D.A., Povey, S., Harris, H. (1968): Inherited variations in human phosphohexose isomerase. Ann. Hum. Genet., 31, 329-338.
4. Gahne, B., Juneja, R.K. (1985): Prediction of the halothane (Hal) genotypes of pigs by deducing Hal, Phi, PO2, PGD haplotypes of parents and offspring: results from a large-scale practice in Swedish breeds. Anim. Blood Groups Biochem. Genet., 16, 265-283.
5. Fuji, I., Otsu, K., Zorzato, F., Leon, De S., Khanna, V.K., Weiler, J.E., O'Brien, P.J., Mc Lennan, D.H. (1991): Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor that is associated with malignant hyperthermia. Science, 253, 448-451.
6. Jensen, P., Staun, H., Nielsen, P.B., Moustgard, J. (1976): Undersøgelse over sammenhangen mellem blodtypesystem Hog points for kodfarve hos svin. Medd. Statens Husdyrbrugsforsog, No. 83.
7. Otsu, K., Khanna, V.K., Archibald, A.L., Mc Lennan, D.H. (1991): Cosegregation of porcine malignant hyperthermia and a probable causal mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families. Genomics, 11, 744-750.
8. Saiki, R.A., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-494.
9. Sybesma, W., Eikelenboom, G. (1969): Malignant Hyperthermia Syndrome in pigs. Neth. J. vet. sci, 2, 155-160.