

SAMENVATTING

Konzo is een neurologische aandoening die gekenmerkt wordt door een plots beginnende en blijvende verlamming van de benen. Dit komt vooral voor bij kinderen en vrouwen op vruchtbare leeftijd. Wortels van bittere maniok (*Manihot esculenta* Crantz) en daarvan afgeleide producten die een hoog gehalte aan cyanogenen bevatten, kunnen acute cyanide vergiftiging veroorzaken met symptomen als braken, duizeligheid, maagpijn, flauwte, hoofdpijn en diarree. Konzo werd toegeschreven aan een langdurige chronische inname van cyanide in bittere maniokwortels die onvoldoende geroot werden. Maniok is een belangrijke basis voor het dagelijkse voedsel van meer dan een half miljard mensen verspreid over de hele wereld, evenwel bevat het cyanogen glycosiden, voornamelijk linamarine dat na enzymatische omzetting tot cyanohydrine aanleiding kan geven tot het giftige blauwzuur (HCN) na verdere enzymatische of spontane omzetting. Alhoewel er voldoende aanwijzingen zijn voor een verband tussen de ziekte konzo en de consumptie van bittere cassave, blijft het pathologisch mechanisme van de ziekte onduidelijk. Men vermoedt dat zowel HCN als zijn metabolieten (2-aminothiazolin-4-carbonzuur, cyanaat en isothiocyanaat) een rol spelen in de pathologie maar er is geen proefdier model om dit te bevestigen. Wel staat vast dat de enzymatische omzetting van cyanide naar thiocyanaat (80% van het cyanide wordt langs die weg gedetoxifieerd) gebruik maakt van zwavel afkomstig van de zwavelhoudende aminozuren methionine en cysteine.

In dit werk wordt het voorkomen van de konzo ziekte in Popokabaka, in de Bandundu provincie van de Democratische Republiek Kongo bestudeerd. Uit diezelfde regio kwam het eerste gepubliceerde verslag over konzo in 1938. Mogelijke associaties tussen de ziekte met gezinsgebonden factoren en met het eetpatroon van de bevolking die

hoofdzakelijk maniok eet, werden onderzocht. Konzo komt nog steeds voor in die regio met een incidentie van 1.3 ‰ in 2002. Meer vrouwen dan mannen waren aangetast en er werd geen informatie over de levensverwachting van de patiënten gevonden. Zowel geslacht als burgerlijke stand vertoonden een statistische associatie met de kans op konzo. Maniok was het dominante bestanddeel van de voeding in praktisch elk gezin en werd minstens eenmaal per dag gegeten als luku, een dikke pasta van maniokmeel en water. Als bijgerechten werd voornamelijk maniok bladeren en lokaal geteelde bonen gegeten. Alhoewel die bijgerechten rijker zijn aan eiwit is de kwaliteit van dit eiwit laag door een gebrek aan zwavelhoudende aminozuren.

De 'cossettes', de gerote en gedroogde maniok wortels die het voornaamste voedingsbestanddeel vormen en de maniokbladeren die het voornaamste bijgerecht vormen in de regio werden onderzocht. De dagelijkse hoeveelheid werd bepaald, het gehalte aan en de dagelijkse inname van cyanogeen en de hoeveelheid zwavelhoudende aminozuren vereist voor de detoxificatie ervan werd berekend. De vrije en totale aminozuren in de maniok producten werden bepaald om eventuele inherente toxinen op te sporen, om de kwaliteit van de proteïne te bepalen en om te kunnen vergelijken met de dagelijkse vereisten voor kinderen en volwassenen. Er werd berekend dat kinderen van 1 tot 9 jaar dagelijks 0,4 tot 1,1 mg HCN equivalenten innemen in 241 tot 389 g maniok producten, hoofdzakelijk van 'cossettes'. Matig actieve volwassen mannen en vrouwen namen 0,6 tot 1,5 mg HCN equivalenten in per dag van 390 tot 532 g maniok producten bereid uit 'cossettes', in de veronderstelling dat 60% van de dagelijkse energievereisten voldaan worden door maniokwortels die 1,6 tot 2,8 mg HCN equivalenten bevatten per kg droog gewicht. We vonden geen potentieel giftige niet-proteïne aminozuren in

maniokwortels. Lysine en leucine zijn de limiterende aminozuren terwijl methionine slechts voor 13% bijdraagt in het lage gehalte van zwavelhoudende aminozuren van de 'cossettes'. Er werd berekend dat, indien alleen maniok gegeten wordt, de dagelijkse behoefte aan methionine voor kinderen van 1 tot 9 jaar slechts voor 60% voldaan is, terwijl aan de dagelijkse behoefte van de volwassenen wel voldaan wordt indien 60% van de dagelijkse energiebehoefte uit maniokproducten (het nationale gemiddelde). De maniokbladeren die wel rijker zijn aan proteïne maar eveneens arm zijn aan methionine, kunnen dit gebrek bij kinderen in gebieden met konzo niet compenseren. De maniokbladeren als bijgerecht kunnen ook een bijkomende bron van cyanide zijn indien dit onvoldoende lang gekookt wordt wegens een gebrek aan brandhout, de enige beschikbare brandstof voor de bereiding. Zwavelhoudende aminozuren zijn noodzakelijk voor de detoxifiëring van cyaniden afkomstig van maniokwortels die onvoldoende groot werden, maar ook van de bladeren die onvoldoende lang gekookt werden.

In een epidemiologische studie werden urinestalen en stalen van de maniokbloem van verschillende gezinnen onderzocht met de bedoeling de voedselveiligheid na te gaan, de inname van cyanogenen te berekenen en een mogelijk verband na te gaan met de zwavelmetabolieten taurine en thiocynaat in de urine. Drie generaties na het eerste gedocumenteerd voorkomen van konzo in deze regio blijft er nog steeds een hoog risico voor de blootstelling aan cyanide van maniokbloem. In de helft van de gezinnen is het cyanidegehalte in maniokbloem hoger dan de door de Wereld Gezondheid Organisatie en de FAO aanbevolen grens van 10µg HCN equivalent/g bloem. De helft van de urinestalen bevatten meer dan 300 µmol/l thiocynaat. Dit wijst op een grote overmaat aan cyanide inname. Alhoewel men geen significante correlatie vond, wijst de lage

concentratie taurine, de eindmetabooliet van de zwavelhoudende aminozuren, op een hoog verbruik van zwavel voor de detoxifiëring van cyanide met vorming van thiocynaat.

De bevolking van Popokabaka is nog steeds blootgesteld aan een te hoog cyanogeen gehalte uit de maniokvoeding en misschien ook aan cyanogenen uit de omgeving. Dit verhoogt het risico voor konzo in die regio waar die verlammeende ziekte nog steeds voorkomt. Een beter gevarieerd en gebalanceerd dieet, dat rijker is aan methionine, is noodzakelijk voor een meer efficiënte detoxifiëring van cyanide in het menselijke lichaam.

RESUME

Konzo est un désordre neurologique caractérisé par un début soudain d'une paralysie permanente des membres inférieurs. Les enfants d'au moins trois ans et les femmes en âge de procréer sont les plus affectés. La consommation des tubercules de manioc et de leurs produits dérivés contenant une grande quantité de cyanogènes peut causer une intoxication pouvant se manifester par des vomissements, des nausées, des vertiges, des douleurs abdominales, la faiblesse, des maux de tête et la diarrhée. Konzo a été attribué à une haute consommation de cyanure des tubercules de manioc amer insuffisamment traité. Le manioc, aliment de base très important pour plus d'un demi milliard d'habitants de la planète, contient des glucosides cyanogéniques, principalement la linamarine qui après conversion enzymatique en cyanohydrines, peut libérer spontanément ou enzymatiquement un produit toxique, l'acide cyanhydrique. Bien que le lien évident entre la maladie konzo et la consommation du manioc amer insuffisamment traité soit établi, les mécanismes pathogéniques du konzo restent encore à élucider. L'acide cyanhydrique et ses métabolites (acide 2-aminothiazoline-4-carboxylique, cyanate, thiocyanate) ont été suspectés de jouer un rôle dans la pathogénicité du konzo chez l'être humain mais il n'y a pas encore de modèle animal pour s'en assurer ou le confirmer. En effet, la conversion enzymatique du thiocyanate à partir du cyanure (environ 80 % de cyanure est transformé par cette voie) nécessite le soufre provenant des acides aminés soufrés, la méthionine et la cystéine.

Notre travail rapporte l'apparition des cas de konzo à Popokabaka, province de Bandundu, R. D. Congo, une des régions incluse dans la première publication sur le konzo en 1938. Nous décrivons l'association entre le konzo et les facteurs socio-

économiques liés au ménage et, les habitudes alimentaires des populations consommant le manioc. Le konzo continue à sévir dans cette région de Popokabaka avec une incidence de 1.3 ‰ en 2002. La paralysie affecte plus de femmes que d'hommes et nous n'avons trouvé aucune publication sur l'espérance de vie (ou sur la mortalité) des personnes atteintes de konzo. Le genre et l'état civil des chefs de ménage sont associés au degré de prévalence de konzo dans les différentes localités de la région. L'alimentation dans la contrée est largement dominée par le manioc. Presque tous les ménages consomment au moins une fois par jour du luku, pâte obtenue après cuisson et malaxage de la farine de manioc dans de l'eau bouillante. Les principaux aliments d'accompagnement du luku, les feuilles de manioc et le niébé, sont limités en acides aminés soufrés.

Nous avons analysé les cossettes de manioc (produit dérivé des tubercules de manioc roui et séché) et les feuilles de manioc, respectivement aliment de base et principal aliment d'accompagnement dans la région, pour estimer la quantité de cyanogènes résiduels consommée journallement et la quantité d'acides aminés soufrés disponibles pour la détoxification de ces cyanogènes. Nous avons déterminé les acides aminés libres et totaux dans les cossettes et les feuilles de manioc pour détecter la présence inhérente des acides aminés non protéiniques potentiellement toxiques, pour évaluer la qualité de leur protéine alimentaire et la comparer aux besoins recommandés en acides aminés des enfants et des adultes. Nous avons trouvé une consommation journalière estimée de 0,4 à 1,1 mg HCN équivalent dans 241 à 389 g de luku et de 0,6 à 1,5 mg HCN équivalent dans 390 à 532 g de luku respectivement chez les enfants âgés de 1 à 9 ans et chez les adultes (masculin et féminin) avec une activité modérée lorsque 60 % de l'énergie alimentaire journalière requise provient du manioc de 1,6 et de 2,8 mg HCN équivalent

par kg de produit sec. Aucun acide aminé non protéinique potentiellement toxique n'a été détecté dans les produits dérivés du manioc. La lysine et la leucine sont des acides aminés limitants et le contenu en méthionine est très bas contribuant pour environ 13 % du total des acides aminés soufrés dans les cossettes de manioc. Les enfants âgés de 1 à 9 ans ne peuvent pas s'attendre à satisfaire leurs besoins recommandés en méthionine tandis que les adultes peuvent les satisfaire à partir de la quantité requise calculée pour satisfaire 60 % de l'énergie alimentaire journalière mais pas assez pour la détoxification de cyanure et le métabolisme normal. Les feuilles de manioc, quantitativement riches en protéines mais limitées en acides aminés soufrés, ne peuvent pas compenser la déficience alimentaire en acides aminés soufrés occasionnée par l'aliment de base dans les régions affectées par le konzo. Nous concluons aussi que les feuilles de manioc peuvent être une autre source non négligeable de cyanogène alimentaire dans cette région. En effet les feuilles de manioc requièrent pour leur détoxification une longue cuisson et avec, le manque d'électricité et de gaz, la rareté de bois de chauffage pour la préparation des aliments, il y a risque d'écourter le temps de cuisson et par conséquent de consommer des aliments insuffisamment cuits.

Les acides aminés soufrés sont essentiels pour la détoxification des cyanogènes résiduels contenus dans le manioc (tubercules ou feuilles) insuffisamment traité ou cuit.

Les échantillons de manioc prélevés auprès des ménages ainsi que ceux des urines obtenus des participants sélectionnés au hasard pour une étude épidémiologique que nous avons effectuée ont été examinés pour évaluer l'innocuité de la farine de manioc prête à la cuisson puis à la consommation, pour déterminer la charge en cyanogène et apprécier la relation potentielle entre les métabolites soufrés urinaires, la taurine et le thiocyanate.

Il y a un risque élevé d'exposition alimentaire aux cyanogènes dû à la consommation du manioc insuffisamment traité dans cette région où le konzo est rapporté depuis trois générations. La farine de manioc prélevée dans plus de la moitié des ménages contenait un taux de cyanogène au dessus du seuil de 10 ppm fixé par la FAO et l'OMS. Les urines de plus de la moitié des participants contenaient plus de 300 umol de thiocyanate par litre. Ce qui suggère qu'il y a une charge importante en cyanure. Par ailleurs, ces urines accusaient aussi une concentration très basse en taurine (produit du métabolisme des acides aminés soufrés), suggérant que le soufre est préférentiellement orienté dans la détoxification du cyanure par la formation du thiocyanate, bien que nous n'avons presque pas trouvé de corrélation entre la taurine urinaire et le thiocyanate.

La population de Popokabaka reste toujours grandement exposé aux cyanogènes alimentaires du manioc et peut être aussi aux cyanogènes environnementaux. La prévention de risque élevé d'apparition de cas de konzo dans la région requiert une alimentation suffisante, variée et équilibrée particulièrement riche en méthionine pour permettre une détoxification effective du cyanure par l'organisme en laissant assez d'acides aminés soufrés pour le reste des besoins métaboliques de l'organisme.

SUMMARY

Konzo is a neurological disorder characterized by paralysis of the legs of sudden onset, which occurs particularly in children and women of childbearing age. Consumption of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its products that contain large amounts of cyanogens may cause acute cyanide poisoning with symptoms of vomiting, nausea, dizziness stomach pains, weakness, headache and diarrhea. Konzo has been attributed to the high dietary cyanide exposure from insufficiently processed roots of bitter cassava. Cassava which is an important staple food for more than half a billion inhabitants worldwide contains cyanogenic glycosides, mainly linamarin that after enzymatic conversion to cyanohydrins, may release spontaneously or enzymatically the toxic hydrogen cyanide (HCN). Although evidence to link the disease with consumption of bitter cassava has been established, the pathogenic mechanism of konzo remains unclear. HCN and its metabolites (2-aminothiazoline-4-carboxylic acid, cyanate and thiocyanate) have been suspected to play a role in the pathogenicity in humans but there is no animal model to ascertain or to confirm. However the enzymatic conversion of thiocyanate from cyanide (about 80 % of cyanide is transformed by this route) requires sulfur coming from amino acids containing sulfur methionine and cysteine.

In this work, we reported the occurrence of konzo disease in Popokabaka, Province of Bandundu, D R Congo, one of the areas included in the first published report on konzo in 1938. We described associated household factors involved in the disease and the dietary pattern of the cassava consuming populations. Konzo is still occurring in this area with an incidence rate of 1.3‰ in 2002. The disease affected a larger proportion of females than males and no reports on the life expectancy of konzo patients were found. Gender and

marital status of heads of household were associated with the degree of prevalence of konzo. The diet was largely dominated by cassava and almost all households consumed at least once daily luku, the stiff porridge from the cassava flour. Major foods such as cassava leaves and cowpeas consumed as side-dishes to the staple food luku are of poor quality in protein especially in sulphur containing amino acids.

We analysed processed cassava roots 'cosettes', as the major staple food and cassava leaves, as the major side-dishes to the staple food in the region to estimate the quantity of daily intake of cyanogen and the amount of sulphur amino acid required for their detoxification. We determine free and total amino acids in the cassava products to investigate the presence of inherent potentially toxic nonprotein amino acids, to evaluate the dietary protein quality and to compare with the amino acid requirements of children and adults. We estimated that children (1-9yr) consumed daily about 0.4 to 1.1 mg of HCN equivalent in 241 to 389 g of cassava product from the 'cosettes and moderately active female or male consumed 0.6 to 1.6 mg of HCN equivalent in 390 to 532 g cassava product from the 'cosettes' when 60% of the daily energy required are provided by cassava roots of 1.6 and 2.8 mg HCN equivalent per kg dry weight. No potentially toxic nonprotein amino acids were detected in cassava products. Lysine and Leucine were the limiting amino acids factors and methionine content was very low and contributed for about 13 % in the total sulphur containing amino acids in the 'cosettes'. We found that children of 1 to 9 years old cannot expect to meet methionine requirement whereas adults can meet sulphur requirement from the calculated quantity required to satisfy 60 % of the daily energy from the staple food. Cassava leaves which was found to be quantitatively rich in protein but of poor quality with sulphur containing amino acids as the most

limiting amino acids, cannot compensate the dietary deficiency in sulphur containing amino acids in the staple food in konzo affected areas. We stated also that cassava leaves could be an additional source of dietary cyanogen in the region. The leaves require prolonged cooking and with the unavailability of electricity or gas and scarcity of firewood they are consumed after a short cooking time.

Sulfur amino acids are essential for detoxification of the residual cyanogens in the insufficiently processed cassava roots and also in the improperly cooked cassava leaves.

Samples of cassava flour from households and samples of urine obtained from selected participants in an epidemiological study were examined to monitor the safety of the flour intended to be consumed, to check cyanogen overload and to assess a potential relation between urinary sulphur metabolites taurine and thiocyanate. There is a high risk of dietary cyanogen exposure from cassava flour in this region where konzo was first reported three generations ago. Cassava flour from more than half of the households had total cyanogen above the WHO/FAO recommended safe limit (10 µg HCN equivalent/kg cassava flour). The urine samples from half of the participants contained more than 300 µmol/l of thiocyanate. This suggested a high cyanide overload. The low concentration in taurine found suggested that more sulphur is directed to the detoxification of cyanide by formation of thiocyanate, although urinary taurine and thiocyanate were slightly or not correlated.

The populations of Popokabaka are still highly exposed to dietary cassava and perhaps to environmental cyanogens. The increased risk of konzo in this region where the paralytic disease is still occurring requires a better balanced diet, particularly richer in methionine, to allow efficient detoxification of cyanide in the body.