

Aus dem Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW)
im Forschungsverbund Berlin e.V.

eingereicht über
den Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zu
Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien
bei Europäischen Mufflons (*Ovis orientalis musimon*) in Deutschland**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anke Wiethölter
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2009

Journal-Nr.:3324

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2009

© 2009 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-941703-52-0

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW)
im Forschungsverbund Berlin e.V.

ingereicht über
den Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zu
Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien
bei Europäischen Mufflons (*Ovis orientalis musimon*) in Deutschland**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anke Wiethölter
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2009

Journal-Nr.:3324

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Heribert Hofer
Zweiter Gutachter: PD Dr. Franz Josef Conraths
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Klaus Eulenberger

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
sheep, wild sheep, wild animals, mouflon, prion diseases, epidemiology, prevalence,
genotypes, polymerase chain reaction, Germany

Tag der Promotion: 19.10.2009

*O glücklich, wer noch hoffen kann,
Aus diesem Meer des Irrtums aufzutauchen!
Was man nicht weiß, das eben brauchte man,
Und was man weiß, kann man nicht brauchen.*

Johann Wolfgang von Goethe
„Faust. Der Tragödie erster Teil.“

INHALT

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
1 EINLEITUNG	9
2 LITERATURÜBERSICHT.....	10
2.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	10
2.1.1 Begriff und Ätiologie	10
2.1.2 Wirtsspektrum und Formen.....	11
2.1.3 Scrapie.....	13
2.1.3.1 Epidemiologie.....	13
2.1.3.2 Einfluss der Genotypen.....	16
2.1.3.3 Pathogenese.....	19
2.1.3.4 Klinik.....	20
2.1.3.5 Pathologie.....	21
2.1.3.6 Diagnostik.....	22
2.1.3.7 Verbreitung.....	23
2.1.3.8 Rechtliche Situation	23
2.2 Europäisches Mufflon.....	25
2.2.1 Taxonomie.....	25
2.2.2 Geschichte	26
2.2.3 Morphologische Merkmale	27
2.2.4 Ernährung	28
2.2.5 Verhalten und Sozialstruktur.....	28
2.2.6 Fortpflanzung	29
2.2.7 Altersbestimmung	30
2.2.8 Habitat	33
2.2.9 Verbreitung.....	33
3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	35
3.1 Populationsscreening	35
3.1.1 Material und Methoden des Populationsscreenings	35
3.1.1.1 Einteilung der Risikogebiete	36
3.1.1.2 Untersuchungszeitraum.....	41
3.1.1.3 Probandatenerhebung.....	42
3.1.1.4 Untersuchungsmaterial.....	44
3.1.1.5 TSE-Schnelltest.....	45
3.1.1.6 Bestätigungstests.....	46
3.1.1.7 Angewandte statistische Verfahren.....	46
3.1.2 Ergebnisse des Populationsscreenings	48
3.1.2.1 Zusammensetzung der untersuchten Tiere.....	48
3.1.2.2 TSE-Schnelltest.....	50
3.1.2.3 Bestätigungstests.....	51
3.1.2.4 Statistische Analyse.....	51

3.1.3	Diskussion des Populationscreenings	58
3.1.3.1	Risikogebietseinteilung	58
3.1.3.2	Untersuchungsmethoden	63
3.1.3.3	Repräsentativität der Stichprobe	64
3.1.3.4	Statistische Analyse.....	67
3.1.3.5	Ermittelte Nachweisgrenzen.....	67
3.2	Genotypisierung	70
3.2.1	Material und Methoden der Genotypisierung	70
3.2.1.1	Untersuchungsmaterial.....	70
3.2.1.2	Isolierung genomischer DNA.....	70
3.2.1.3	PCR	71
3.2.1.4	Horizontale Agarosegelelektrophorese	75
3.2.1.5	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	75
3.2.1.6	Sequenzierung.....	75
3.2.1.7	Auswertung der Sequenzen.....	76
3.2.2	Ergebnisse der Genotypisierung.....	77
3.2.2.1	Probenzusammensetzung	77
3.2.2.2	DNA-Isolierung.....	77
3.2.2.3	PCR	78
3.2.2.4	Sequenzierung.....	79
3.2.3	Diskussion der Genotypisierung	83
3.2.3.1	Untersuchungsmethoden	83
3.2.3.2	Ermittelte PrP-Genotypen	85
4	RISIKOBEWERTUNG UND EMPFEHLUNGEN.....	88
4.1	Einschätzung der Exposition.....	88
4.2	Risikobeschreibung	90
4.3	Handlungsoptionen	92
5	ZUSAMMENFASSUNG	94
6	SUMMARY.....	96
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	98
8	ANHANG	123
8.1	Muffelwildstrecken.....	123
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	141
	TABELLENVERZEICHNIS	142
	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	143
	DANKSAGUNG	144
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	146

ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
§	Paragraph
%	Prozent
>	größer als
≥	größer als oder gleich
<	kleiner als
≤	kleiner als oder gleich
a	Nukleinbase Adenin
A	Aminosäure Alanin
Apr.	April
Aug.	August
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
bp	Basenpaare
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
c	Nukleinbase Cytosin
C	Canini
ca.	circa
CRL	community reference laboratory (EU-Referenzlabor)
CWD	Chronic Wasting Disease
Dez.	Dezember
DJV	Deutscher Jagdschutz Verband
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
d. h.	das heißt
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
eng.	englisch
ENS	Enterisches Nervensystem
et al.	et alii (und andere)

EU	Europäische Union
evt.	eventuell
F	Aminosäure Phenylalanin
Feb.	Februar
g	Nukleinbase Guanin
GALT	gut associated lymphoid tissue
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
ha	Hektar, 10.000 m ²
Hrsg.	Herausgeber
I	Incisivi
ILAT	Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (seit 01.01.2009 Landeslabor Berlin-Brandenburg)
i. d. R.	in der Regel
IZW	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung
Jan.	Januar
Jun.	Juni
Jul.	Juli
K	Aminosäure Lysin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton, 10 ³ Dalton
km ²	Quadratkilometer
L	Aminosäure Leucin
M	Molares
Mär.	März
mg	Milligramm
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
min	Minute
µl	Mikroliter, 10 ⁻⁶ Liter
ml	Milliliter, 10 ⁻³ Liter
mmol/l	Millimol pro Liter
Nov.	November
NRL	Nationales Referenzlabor
NSP	National Scrapie Plan
<i>O.</i>	Gattung <i>Ovis</i>
o. ä.	oder ähnliches

OIE	Office International des Epizooties (Weltorganisation für Tiergesundheit)
Okt.	Oktober
ORF	open reading frame
P	Praemolares
PCR	polymerase chain reaction
pers.	persönlich
PK	Proteinase K
pmol	pikomol, 10^{-12} mol
PrP	Prionprotein
PrP 27-30	Proteinase-resistenter Kern des Prionproteins
PrP ^C	zelluläres Prionprotein
PrP ^{Sc}	Scrapie-assoziiertes Prionprotein
PRNP	Prionprotein-Gen
Q	Aminosäure Glutamin
R	Aminosäure Arginin
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
SD	Standardabweichung
Sep.	September
SNP	single nucleotide polymorphism
sog.	so genannt
t	Nukleinbase Thymin
T	Aminosäure Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propan-1,3-diol
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
TSN	Tierseuchennachrichten
U	Enzymeinheit
UV	ultraviolett
VO	Verordnung
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z. T.	zum Teil

1 EINLEITUNG

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind letale neurodegenerative Erkrankungen, die sowohl bei Menschen als auch bei Haus- und Wildtieren vorkommen. Auch bei Mufflons (*Ovis orientalis musimon*) in England wurde eine Form dieser Erkrankungen beschrieben (Wood et al. 1992). Dies zeigt, dass diese Wildschafe ebenso wie domestizierte Schafe empfänglich für TSE sind, was angesichts der engen stammesgeschichtlichen Verwandtschaft keine Besonderheit darstellt.

Deutschland verfügt über den zweitgrößten frei lebenden Mufflonbestand der Welt (Tomiczek und Türcke 1995; Piegert und Uloth 2005). Allerdings war Muffelwild bislang selten Gegenstand veterinärmedizinischer Untersuchungen, eine Einsendung von tot aufgefunden Tieren (Fallwild) und eine komplexe Diagnostik unterbleiben zumeist (Ludwig und Uloth 1998). Aufgrund fehlender bundesweiter Untersuchungen ist der Status von Mufflons in Bezug auf TSE vollkommen unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, eine Risikobewertung zum Vorkommen von TSE bei Mufflons in Deutschland in Verbindung mit einer Abschätzung der Empfänglichkeit (*susceptibility*) durchzuführen, um so eine Grundlage für eine umfassende Risikoanalyse zu liefern.

Die Risikobewertung ist neben dem Risikomanagement und der Risikokommunikation immer Teil einer Risikoanalyse (Codex Alimentarius Commission 2007). Im Bereich der Tierseuchen sind Risikomanagement und -kommunikation gesetzlich geregelt und obliegen dem Staat. Die Wissenschaft kann mit ihren Erkenntnissen zur Abschätzung und Bewertung des Risikos, dem sog. *risk assessment*, beitragen. Solch eine Risikobewertung umfasst im Regelfall eine Gefahrenidentifizierung (*hazard identification*) und -beschreibung (*hazard characterisation*), sowie eine Einschätzung der Exposition (*exposure assessment*) und eine Risikobeschreibung (*risk characterisation*). Ziel ist es, das Risiko ausführlich und möglichst quantitativ zu bewerten und auch auf Unsicherheiten oder fehlende Erkenntnisse transparent hinzuweisen, um anschließend dem Vorsorgeprinzip nach geeignete Schutzmaßnahmen ergreifen zu können (EU Commission 2000). Diesem Prinzip der EU Tiergesundheitsstrategie nach sollte bei Identifikation einer Gesundheitsgefährdung durch vorbeugende Maßnahmen ein hohes Niveau an Gesundheitsschutz solange sichergestellt werden, bis eine wissenschaftliche Klärung zum Ausmaß des Risikos vorliegt (EU Commission 2007).

In diesem Sinne soll diese Arbeit ein *risk assessment* für das Vorkommen von TSE bei Mufflons in Deutschland vorlegen. Die Gefahrenidentifizierung und -beschreibung erfolgt im Rahmen der Literaturübersicht. Die eigenen Untersuchungen liefern die Grundlage für eine Abschätzung der Exposition und eine Risikobeschreibung und ermöglichen abschließende Empfehlungen zum Risikomanagement.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

2.1.1 Begriff und Ätiologie

Die Bezeichnung Transmissible Spongiforme Enzephalopathie steht für übertragbare schwammartige Erkrankung des Gehirns und bezeichnet eine Gruppe von letalen neurodegenerativen Krankheiten mit genetischem, infektiösem oder auch sporadischem Hintergrund. Sowohl die Ursachen als auch der Ursprung dieser Erkrankungen waren lange Zeit umstritten. Bis heute sind viele Aspekte noch unklar oder unzureichend untersucht.

Aus Übertragungs- und Inaktivierungsversuchen wurde geschlussfolgert, dass aufgrund der Resistenz gegenüber Hitze und UV-Strahlung keine Nukleinsäuren an der Replikation beteiligt sein können (Stamp et al. 1959; Alper et al. 1967; Pattison und Jones 1967). Allerdings widersprach dies dem damaligen zentralen Dogma der molekularen Infektionsbiologie, dass Infektionserreger immer ein eigenes Genom besitzen. Griffith (1967) jedoch wies auf drei theoretisch mögliche Wege der Selbstreplikation von Proteinen hin. Zusammengeführt wurden alle Erkenntnisse von Prusiner (1982), der aufzeigte, dass das auslösende Agens zusammen mit Proteinen extrahiert und durch Proteasen und Phenol inaktiviert werden kann, während Nukleasen, Hitze und Ethanol keinen Einfluss ausüben. Nur Verfahren, die Proteine denaturieren, reduzierten gleichzeitig die Infektiosität. Er kam zu dem Schluss, dass es sich bei dem Erreger daher um ein Protein handeln müsse, und führte den Namen Prion, abgeleitet von *proteinaceous infectious particle*, analog zu Virion ein. Dementsprechend werden diese Krankheiten auch als Prionkrankheiten bezeichnet. Der gängigen Hypothese nach sind Prionen proteinöse infektiöse Partikel, die keine Nukleinsäuren enthalten (Prusiner 1997).

Es existieren jedoch auch andere Theorien zur Ätiologie von TSE, wie z. B. Infektion durch ein *slow virus* (Sigurdsson 1954), Viroide (Diener 1972), Viren (Rohwer 1984; Diringer et al. 1994), Polysaccharide (Field 1966; Alper et al. 1967), Lipide (Alper et al. 1978), Sarkosporidien (McGowan 1922) oder Spiroplasma (Bastian 2005). Bislang fehlen jedoch überzeugende Belege für diese Theorien, so konnten im Zusammenhang mit TSE nie Viren, Bakterien oder Nukleinsäuren kongruent isoliert werden. Das Prionenmodell ist daher weitestgehend anerkannt.

Lange Zeit stand die Frage nach den Möglichkeiten der Replikation eines Proteins im Vordergrund. 1985 berichteten zwei Forschungsgruppen unabhängig voneinander, dass ein zelluläres Gen in Säugetierzellen für das Prionprotein (PrP) codiert (Chesebro et al. 1985; Oesch et al. 1985). Das von nukleären Wirtsgenen exprimierte Prionprotein wird als zelluläres Prionprotein (PrP^C) bezeichnet. PrP^C ist ein membranassoziiertes Zelloberflächenprotein mit unklarer Funktion (Stahl et al. 1987). Einige Untersuchungen deuten auf kupferbindende

Eigenschaften als zentrale Aufgabe hin (Brown et al. 1997; Herms und Kretzschmar 2001). Prionprotein-Knock-out-Mäuse wiesen einen veränderten Schlaf-Wach-Rhythmus und einige elektrophysiologische Besonderheiten auf, ansonsten war jedoch ihr Verhalten und ihre Entwicklung normal (Büeler et al. 1992, Manson et al. 1994; Tobler et al. 1996). Auch Prionprotein-Knock-Out-Rinder zeigten keine Auffälligkeiten und erwiesen sich Prionen-erkrankungen gegenüber als resistent (Richt et al. 2007; Richt et al. 2008).

Wichtig ist, zwischen PrP^{C} und der krankheitsassoziierten Isoform (Scrapie-assoziiertes Prionprotein PrP^{Sc}) zu unterscheiden. PrP^{C} wird unter Einfluss von Proteinase K (PK) verdaut, PrP^{Sc} dagegen ist nahezu resistent (Barry et al. 1986). Es werden nur etwa 85 Aminosäuren vom N-Terminus des Proteins abgespalten, so dass ein Stück mit einem Molekulargewicht von 27 bis 30 kDa (PrP 27-30) unter Beibehaltung der vollen Infektiosität erhalten bleibt. Untersuchungen der Tertiärstruktur zeigten, dass PrP^{Sc} im Gegensatz zu PrP^{C} vermehrt β -Faltblatt-Strukturen anstatt α -Helices aufweist und unlösliche Aggregate bildet (Pan et al. 1993). Verbunden mit der Umwandlung von PrP^{C} in PrP^{Sc} und der folgenden Ansammlung und Ablagerung von PrP^{Sc} im Gehirn ist die Neurodegeneration.

Der Prionhypothese nach induziert und katalysiert PrP^{Sc} die Konformationsänderung von PrP^{C} zu PrP^{Sc} posttranslational (Prusiner 1991). Der konkrete Mechanismus der Konversion ist unbekannt, obschon verschiedene Theorien postuliert werden und teilweise von einem unterstützenden „Faktor X“ ausgegangen wird (Telling 1995; Smits et al. 1997; Prusiner 1998).

2.1.2 Wirtsspektrum und Formen

Prionkrankheiten treten sowohl bei Menschen als auch bei Säugetieren auf. Beim Menschen kommen sie in Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), des Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndroms (GSS), der Fatalen Familiären Insomnie (FFI) oder als Kuru vor. Bei Säugetieren sind überwiegend Wiederkäuer betroffen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Prionkrankheiten bei Säugetieren mit ihrem natürlichen Wirtsspektrum.

So kommt Chronic Wasting Disease (CWD) bei bestimmten nordamerikanischen Hirscharten vor, Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) tritt vor allem bei Rindern auf, wurde aber auch bei exotischen Huftieren in Zoos nachgewiesen (Kirkwood 2001). 2004 wurde ein BSE-Fall bei einer Ziege festgestellt (Eloit et al. 2005). Dies ist bislang der einzige natürliche Fall von BSE bei kleinen Wiederkäuern, obwohl Schafe und Ziegen durch intracerebrale Injektion oder orale Gabe experimentell mit BSE infiziert werden können (Foster et al. 1993) und BSE bei Schafen auf natürlichem Weg übertragen werden kann (Bellworthy et al. 2005).

Scrapie tritt bei Schafen und Ziegen auf. Darüber hinaus wurden in England bei sechs Mufflons aus zwei verschiedenen Gehegen klinische und histopathologische Befunde festgestellt, die auf Scrapie hindeuten (Wood et al. 1992). Frei lebende zypriotische Mufflons

(*Ovis orientalis ophion*) scheinen dagegen von Scrapie nicht betroffen zu sein (Toumazos 1991; Hadjisterkotis 1999).

Prionkrankheiten sind ebenfalls von Haus- und Großkatzen her bekannt (Feline Spongiforme Enzephalopathie – FSE) und werden mit der BSE-Epidemie in Zusammenhang gebracht (Kirkwood 2001). Weiterhin ist bei amerikanischen Nerzen aus Pelztierfarmen eine Transmissible Mink Enzephalopathie (TME) festgestellt worden (Hartsough und Burger 1965). Als Modelltiere für TSE dienen meist Hamster oder Mäuse. Diese sind experimentell infizierbar, ohne dass bislang natürlich vorkommende Prionkrankheiten bei diesen Arten belegt sind.

Tabelle 1: Natürlich vorkommende Prionkrankheiten bei Säugetieren.

Prionkrankheit	Natürlicher Wirt	Quellen
Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	Rind (<i>Bos taurus</i>)	Wells et al. 1987
	Nyala (<i>Tragelaphus angasii</i>)	Jeffrey et al. 1988
	Südafrikanischer Spießbock (<i>Oryx gazella</i>)	Kirkwood et al. 1990
	Arabischer Spießbock (<i>Oryx leucoryx</i>)	Kirkwood und Cunningham 1994
	Großer Kudu (<i>Tragelaphus strepsiceros</i>)	
Elenantilope (<i>Taurotragus oryx</i>)	Säbelantilope (<i>Oryx dammah</i>)	
	Ziege (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Eloit et al. 2005
Chronic Wasting Disease (CWD)	Wapiti (<i>Cervus elaphus nelsoni</i>)	Williams und Young 1980
	Weißwedelhirsch (<i>Odocoileus virginianus</i>)	
	Maultierhirsch (<i>Odocoileus hemionus</i>)	
Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE)	Hauskatze (<i>Felis catus</i>)	Wyatt et al. 1991
	Gepard (<i>Acinonyx jubatus</i>)	Kirkwood und Cunningham 1994
	Ozelot (<i>Leopardus pardalis</i>)	
	Puma (<i>Puma concolor</i>)	
	Tiger (<i>Panthera tigris</i>)	
Scrapie	Schaf (<i>Ovis aries</i>)	Leopoldt 1759
	Ziege (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Harcourt et al. 1974
	Mufflon (<i>Ovis orientalis musimon</i>)	Wood et al. 1992
Transmissible Mink Enzephalopathie (TME)	amerikanischer Nerz (<i>Neovison vison</i>)	Hartsough und Burger 1965

Im Folgenden soll ausführlich auf die Charakteristika von Scrapie bei Schafen eingegangen werden. Angesichts der Tatsache, dass Mufflons zur Gattung *Ovis* gehören, ist es am wahrscheinlichsten, dass natürliche Prionkrankheiten bei Mufflons in Form von Scrapie auftreten.

2.1.3 Scrapie

Scrapie ist eine alte, lang bekannte Schafkrankheit. Erste schriftliche Erwähnungen finden sich bereits 1759, in denen auf klinische Symptome wie Juckreiz und Abmagerung sowie die Möglichkeit der Ansteckung hingewiesen wird (Leopoldt 1759). Weitere Beschreibungen zeigen, dass Scrapie schon damals eine weit verbreitete und wohlbekannte Krankheit darstellte, auch wenn die Ätiologie unklar war (McGowan 1922). Zu Beginn des 19. Jahrhunderts war Scrapie in Europa unter vielen verschiedenen Namen bekannt (Schneider et al. 2007). Diese leiteten sich von den Hauptsymptomen ab, so deutet z. B. das Wort „Scrapie“ (engl. to scrape – kratzen) auf den Pruritus, die Bezeichnung „Trab“ bzw. „Traberkrankheit“ dagegen auf das veränderte Gangbild hin.

Seit 1998 wurden in Norwegen Fälle von TSE bei Schafen entdeckt, die in Klinik, Pathologie und Epidemiologie deutliche Unterschiede zu Scrapie aufwiesen und als Nor98 bezeichnet wurden (Benestad et al. 2003). Im Folgenden wurden ähnliche Fälle aus Schweden (Gavier-Widen et al. 2004), Belgien (De Bosschere et al. 2004), Irland (Onnasch et al. 2004), Portugal (Orge et al. 2004), Deutschland (Buschmann et al. 2004b) und den Falklandinseln (Epstein et al. 2005) beschrieben. Inzwischen wurden in fast allen europäischen Ländern atypische Scrapie-Fälle diagnostiziert. Retrospektive Untersuchungen zeigten, dass sich Nor98 auch bei weiter zurückliegenden Fällen identifizieren lässt. Die Entdeckung ist daher wohl als das Resultat der verstärkten TSE-Überwachung der kleinen Wiederkäufer und Weiterentwicklung der diagnostischen Methoden anzusehen. Gegenwärtig wird Nor98 nicht als eine neu entstandene Form von TSE eingestuft (Bruce et al. 2007).

Es existieren Hinweise, dass Scrapie-Erreger nicht homolog sind, sondern als eine Gruppe verschiedener Stämme mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften gelten müssen und sich dadurch im Wirt unterschiedlich ausprägen können (Groschup und Kuczus 2001; Groschup et al. 2007). Inzwischen ist zumindest eine Unterteilung in klassische bzw. typische und atypische Scrapie üblich. Unter der Bezeichnung TSE bei kleinen Wiederkäuern werden sowohl klassische und atypische Scrapie als auch BSE bei Schafen und Ziegen zusammengefasst (EFSA 2005a).

2.1.3.1 Epidemiologie

Die Epidemiologie von klassischer Scrapie zeigt, dass es zum Vorkommen wohl immer zweierlei bedarf: zum einen genetisch empfängliche Tiere und zum anderen das Vorhandensein des infektiösen Agens. Klassische Scrapie ist somit keine rein genetische

Krankheit (Parry 1962; Hunter et al. 1997a). Die genauen Wege und Mechanismen der natürlichen Übertragung sind bis heute unklar (Ryder et al. 2009).

Schon lange ist bekannt, dass klassische Scrapie bei Schafen und Ziegen horizontal, d. h. durch direkten oder indirekten Kontakt von einem Tier zum nächsten übertragen wird (Leopoldt 1759; Brotherson et al. 1968; Dickinson et al. 1974; Ryder et al. 2004). Dabei bildet die orale Aufnahme wahrscheinlich die häufigste Eintrittspforte. In Experimenten mit Schafen war sowohl eine Übertragung über die Konjunktiven (Haralambiev et al. 1973) als auch durch subkutane Injektion (Stamp et al. 1959) und Skarifizierung der Haut (Taylor et al. 1996) erfolgreich. Eine perkutane Übertragung durch Scheuern und Kratzen und die daraus resultierenden Schürfwunden könnte durchaus einen effektiven natürlichen Übertragungsweg darstellen. Auch Bluttransfusionen können bei Schafen effektiv Scrapie übertragen (Houston et al. 2008). Ferner sind iatrogene Übertragungen durch kontaminierte Impfstoffe bekannt (Gordon 1946; Caramelli et al. 2001).

Als Hauptinfektionsquelle für klassische Scrapie gilt die Nachgeburt von infizierten Schafen, die post partum von anderen Herdenmitgliedern aufgenommen wird (Pattison et al. 1972; Pattison et al. 1974). Auch im Fruchtwasser wurde Infektiosität nachgewiesen, so dass Ablammstellen als stark kontaminiert anzusehen sind. In zahlreichen Studien waren andere Ex- und Sekrete negativ, wie die Übersichten von Hoinville (1996) und Detwiler und Baylis (2003) zeigen. Allerdings kann dies auch der zu geringen Sensitivität der verwendeten Nachweismethoden geschuldet sein. Neuere Untersuchungen an mit Scrapie infizierten Hamstern als Modelltiere zeigen, dass sowohl Kot (Safar et al. 2008) als auch Urin (Gonzalez-Romero et al. 2008; Gregori et al. 2008) infektiös sind und einen weiteren Infektionsweg für klassische Scrapie darstellen können.

Vor dem Hintergrund, dass Prionen sehr resistent gegenüber Dekontaminationsverfahren sind (Taylor 2000) und Scrapie-Erreger unter Umwelteinflüssen im Boden bis zu drei Jahren infektiös bleiben (Brown und Gajdusek 1991; Seidel et al. 2007), wäre eine Anreicherung im Boden auch bei geringer Ausscheidung über Urin o. ä. denkbar. PrP^{Sc} lagert sich unter Beibehaltung der Bioverfügbarkeit und Infektiosität an die Oberflächen von Erdmineralien an (Johnson et al. 2006). Insgesamt muss von einer hohen Tenazität ausgegangen werden. So wurden in Island Scrapie-Infektionen beobachtet, die auf eine Kontamination eines alten Stallgebäudes 16 Jahre zuvor zurückgeführt werden konnten (Georgson et al. 2006).

Sowohl die direkte als auch indirekte horizontale Übertragung von klassischer Scrapie über Weiden, Stalleinrichtungen, Fahrzeuge und andere unbelebte Vektoren ist somit möglich. Durch die Verfütterung von kontaminierten tiermehlhaltigen Futtermitteln wäre eine Übertragung ebenfalls denkbar. Allerdings ist seit 2001 ein Verfütterungsverbot von tierischen Proteinen an Wiederkäuer EU-weit in Kraft (VO (EG) 999/2001). Einer Stellungnahme des Bundesinstituts für Risikobewertung nach kann davon ausgegangen werden, dass seit 2003 in Deutschland keine kontaminierten Futtermittel mehr zur

Anwendung gelangt sind (BfR 2003). Auch belebte Vektoren wie Heumilben (Wisniewski et al. 1996) oder Fliegen (Post et al. 1999) könnten eine Rolle spielen (Lupi 2003). Übertragungsversuche durch Nematoden verliefen dagegen negativ (Fitzsimmons und Pattison 1968; Gruner et al. 2004).

Die Bedeutung der vertikalen Übertragung, d. h. der Übertragung auf die nächste Generation durch Keimgewebe, Muttermilch, intrauterine oder postnatale Infektion (Wiesner und Ribbeck 2000), ist für klassische Scrapie ebenfalls relevant. Da im Sperma bislang keine Infektiosität nachgewiesen werden konnte und Übertragungsversuche mit klinisch infizierten Schafböcken negativ verliefen (Palmer 1959, Sarradin et al. 2008), steht die maternale Übertragung im Vordergrund. Eine intrauterine Infektion scheint möglich zu sein, allerdings wird die Ansammlung von PrP^{Sc} in der Plazenta nicht nur durch den Genotyp der Mutter sondern auch durch Genotypen und Lage der Embryonen beeinflusst (Andreoletti et al. 2002; Lacroux et al. 2007; Wrathall et al. 2008). Es dominieren vermutlich die peri- oder postnatalen Infektionen durch intensiven direkten Kontakt des Lammes mit infizierter Plazenta, Blut, Kot und Urin des Muttertieres. Darüber hinaus existieren Hinweise darauf, dass eine Übertragung durch Kolostrum bzw. Milch vom Schaf auf das Lamm erfolgen kann (Konold et al. 2008b). Inzwischen konnten Prionen und Infektiosität in der Milch von Scrapie-infizierten Schafen nachgewiesen werden (Lacroux et al. 2008).

Die Inkubationszeit, also die Zeit zwischen Infektion und Auftreten der ersten Symptome, ist abhängig vom Infektionsweg, der Dosis, dem Scrapie-Stamm und Genotyp des betroffenen Tieres. Nach natürlicher oder iatrogener Übertragung beträgt die Inkubationszeit bei Schafen i. d. R. mehrere Jahre. Mitunter übersteigt bei einigen Nutzungsrichtungen die Inkubationszeit die Lebenserwartung (Dickinson et al. 1975). Das erschwert eine Rückverfolgung zum möglichen Zeitpunkt der Exposition und die Bestimmung der tatsächlichen Inkubationszeit. Klassische Scrapie tritt bei Schafen unabhängig vom Geschlecht überwiegend im Alter von zwei bis fünf Jahren auf, der Durchschnitt liegt bei 3,5 Jahren (Parry 1962; Wineland et al. 1998; Lühken et al. 2007; McIntyre et al. 2008). Es sind jedoch sowohl bei jüngeren als auch bei älteren Tieren klinische Fälle belegt, wobei Tiere, die jünger als 18 Monate sind, nicht oder nur selten betroffen sind (Dickinson und Stamp 1969).

Bei zwei voneinander getrennt gehaltenen Mufflonherden in England trat Scrapie endemisch auf. Das genaue Alter war nur für ein Tier dokumentiert und betrug drei Jahre, die anderen Mufflons wurden als betagt beschrieben. Alle Tiere wurden auf Weiden gehalten und zugefüttert, allerdings nicht mit Kraftfutter, welches tierisches Protein hätte enthalten können. Die eine Mufflonherde hatte keinen Kontakt zu Hausschafen, die zweite wurde zuvor zusammen mit Soayschafen gehalten, bei denen aber nie Scrapie festgestellt wurde. Obwohl Tierbewegungen bei beiden Herden stattfanden und ein erkranktes Tier ursprünglich aus Belgien importiert worden war, konnte der Ursprung nicht geklärt werden (Wood et al. 1992). Die möglichen Übertragungswege bleiben unklar. Jedoch deuten die wenigen

epidemiologischen Anhaltspunkte bei diesen Fällen auf einen Ausbruch von klassischer Scrapie hin.

Zur Epidemiologie von atypischer Scrapie ist bislang wenig bekannt; mögliche Routen der Übertragung sind unklar (Benestad et al. 2008). Experimentell konnte atypische Scrapie auf transgene Mäuse, die ovines PrP^C überexprimieren, intracerebral übertragen werden (Le Dur et al. 2005). Eine intracerebrale Übertragung auf ein Schaf war ebenfalls erfolgreich; dieser Infektionsweg kommt allerdings nicht für eine natürliche Übertragung in Frage (Simmons et al. 2007).

Schafe mit atypischer Scrapie sind im Durchschnitt 6-7 Jahre alt und damit älter als Tiere mit klassischer Scrapie (Moum et al. 2005; Hopp et al. 2006; Lühken et al. 2007; Benestad et al. 2008). Meist tritt atypische Scrapie in Form von Einzelfällen auf (Moum et al. 2005), obgleich in großen Herden (> 500 Schafe) auch zwei oder drei Tiere betroffen sein können (Lühken et al. 2007; Konold et al. 2007). Jedoch wurden in Irland zwei positive Tiere in einer Herde von nur 18 adulten Schafen gefunden (Onnasch et al. 2004). Analysen aus Norwegen und Deutschland zeigen, dass Fälle von atypischer Scrapie im Gegensatz zu klassischer Scrapie geographisch gleichmäßig verteilt sind (Hopp et al. 2006; Lühken et al. 2007).

Dies alles deutet auf einen spontanen sporadischen Ursprung der atypischen Scrapie in Verbindung mit geringer oder gar auf natürlichem Weg ausgeschlossener Übertragung hin (Benestad et al. 2003; Moum et al. 2005; Hopp et al. 2006; Green et al. 2007). Als Risikofaktoren wurden in retrospektiven Studien große Herden (> 1000 Schafe) sowie die Gabe von Vitamin- und Mineralsupplementen identifiziert (Hopp et al. 2006; Green et al. 2007). Unterstützt wird die These des spontanen Ursprungs durch das Auftreten von atypischer Scrapie in einer zu Forschungszwecken gehaltenen Schafherde, die extra aus Neuseeland importiert und in England isoliert gehalten wurde, um eigentlich einen Scrapie-freien Status zu garantieren. Demnach wäre das spontane Auftreten von atypischer Scrapie bei Schafen mit prädisponierten Genotypen und fortgeschrittenem Alter weltweit sporadisch möglich (Simmons et al. 2009).

2.1.3.2 Einfluss der Genotypen

Schon 1968 wurde die unterschiedlich lange Inkubationszeit bei experimentell mit Scrapie infizierten Mäusen auf das als Sinc (*scrapie incubation period gene*) bezeichnete Gen mit den zwei Allelen p7 (*prolonged*) und s7 (*short*) zurückgeführt (Dickinson et al. 1968a). Analog dazu wurde beim Schaf das Sip-Gen (*scrapie incubation period*) mit den Allelen pA und sA identifiziert (Dickinson et al. 1968b). Der Entdeckung des Prionprotein-Gens (PRNP) (Chesebro et al. 1985; Oesch et al. 1985) folgte die Erkenntnis, dass PRNP, Sip- und Sinc-Gen kongruent sind (Westaway et al. 1987; Hunter et al. 1989; Goldmann et al. 1991; Moore et al. 1998). Das PRNP wurde beim Schaf auf dem Chromosom 13 lokalisiert (Iannuzzi et al. 1998) und umfasst ca. 32 Kilobasenpaare (kbp) mit drei Exons (Lee et al. 1998). Das Exon 3

ist 4 kbp lang und enthält einen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der nicht durch Introns unterbrochen wird. Die 771 bp dieses ORF codieren die 256 Aminosäuren des Prionproteins; durch posttranslationale Prozesse besteht das reife PrP anschließend aus 210 Aminosäuren (Goldmann et al. 1990).

Infektionsversuche, Fall-Kontroll-Studien und Studien zur zellfreien Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} haben gezeigt, dass Polymorphismen des PRNP an der unterschiedlichen Ausprägung von klinischen Symptomen, Länge der Inkubationszeit und damit an der Empfänglichkeit für Scrapie beteiligt sind (Goldmann et al. 1991; Hunter et al. 1991; Westaway et al. 1994; Bossers et al. 1997). Diese Polymorphismen sind überwiegend auf den Austausch einzelner Nukleotide (*single nucleotide polymorphism*, SNP), die eine Änderung der Aminosäurefolge bewirken, zurückzuführen. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die Codons an den Positionen 136, 154 und 171 des ORF. Beim Codon 136 wird die Aminosäure Valin (V) mit Empfänglichkeit, Alanin (A) dagegen mit Resistenz assoziiert (Goldmann et al. 1991; Hunter et al. 1994; Cloucard et al. 1995; Hunter et al. 1996). Schafe mit Glutamin (Q) an Position 171 werden mit hoher Empfänglichkeit, Tiere mit Arginin (R) dagegen mit Resistenz in Verbindung gebracht (Westaway et al. 1994; Cloucard et al. 1995; O'Rourke et al. 1997). Zusätzliche Polymorphismen wurden an Position 154 mit Histidin (H) bzw. Arginin und an Position 171 mit Histidin entdeckt (Goldmann et al. 1991; Laplanche et al. 1993; Belt et al. 1995). Die Genotypen werden abgekürzt durch den Einbuchstabencode der codierten Aminosäure in Verbindung mit der Position des Codons wiedergegeben, z. B. A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁/A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁. Im Folgenden werden die Positionen 136, 154 und 171 nicht ausgeschrieben (z. B. ARQ/ARQ) und nur Polymorphismen an anderen Codons werden ausdrücklich mit der Positionsnummer benannt.

Aus diesen Polymorphismen lassen sich die fünf häufigsten Haplotypen ableiten und zwar ARQ, ARR, AHQ, VRQ und ARH (Belt et al. 1995). Diese kommen nach einer aktuellen Zusammenfassung von bisher durchgeführten Genotypisierungen in Europa, Amerika und Asien im Durchschnitt in folgenden Frequenzen vor: 56 % ARQ, 30 % ARR, 6 % AHQ, 5 % VRQ, 3 % ARH (Goldmann et al. 2008). Der Haplotyp ARQ dominiert und wird auch als Wildtyp bezeichnet. Gerade bei urtümlichen Schafrassen ist der Genotyp ARQ/ARQ mit hohen Frequenzen vertreten (Hunter et al. 1997b; Thorgeirsdottir et al. 1999; Gombojav et al. 2004; Townsend et al. 2005; Babar et al. 2009). Auch bei Mufflons aus Japan und Ungarn konnte dieser Genotyp nachgewiesen werden (Seo et al. 2001; Anton et al. 2007). Abgesehen von diesen fünf häufigen Haplotypen sind noch weitere wie z. B. ARK, TRQ, AHR und VRR bekannt (Kutzer et al. 2002; Gombojav et al. 2003; Guo et al. 2003; Billinis et al. 2004). Der Einfluss dieser Genotypen auf die Empfänglichkeit kann aufgrund ihrer insgesamt geringen Frequenzen schwer abgeschätzt werden, wenngleich die Frequenz einzelner Haplotypen in einigen Herden erheblich sein kann (Goldmann et al. 2008).

Darüber hinaus sind zahlreiche Polymorphismen an anderen Positionen belegt. So weisen z. B. 25 % des Haplotyps ARQ noch zusätzliche Polymorphismen auf (Goldmann et al. 2008). Der Einfluss dieser Polymorphismen ist dabei fraglich, vereinzelt wird von einer Resistenz oder Verlängerung der Inkubationszeit berichtet wie z. B. bei AT₁₃₇RQ, AK₁₄₂RQ, ARQK₁₇₆, T₁₁₂ARQ (Vaccari et al. 2007; Laegreid et al. 2008). Insgesamt gibt es eine große Variation je nach Rasse, teilweise sogar Herde, und geografischer Herkunft. In Deutschland überwiegen die Haplotypen ARQ und ARR (Drögemüller et al. 2004).

Die häufigsten Genotypen wurden nach ihrer Empfänglichkeit gegenüber klassischer Scrapie im britischen National Scrapie Plan (NSP) in Risikogruppen von 1 bis 5 eingeteilt (Dawson et al. 1998; Defra 2003). Diese Risikogruppen sind in Tabelle 2 dargestellt. Die größte Resistenz weisen demnach Schafe des Genotyps ARR/ARR auf, Schafe des Genotyps VRQ/VRQ sind dagegen hoch empfänglich (Belt et al. 1995; Hunter 1996; Hunter et al. 1997b). In Rassen, bei denen der Genotyp VRQ/VRQ nicht vorkommt, bilden Tiere des Genotyps ARQ/ARQ die höchste Risikoklasse (Hunter et al. 1997b; Dawson et al. 1998). Somit spielen nicht nur der Genotyp, sondern auch die Rasse und der Scrapie-Stamm eine entscheidende Rolle für die Empfänglichkeit. Fälle von klassischer Scrapie bei Schafen des Genotyps ARR/ARR zeigen ebenfalls, dass diese Einteilung nicht als absolut angesehen werden darf (Ikeda et al. 1995, Groschup et al. 2007). Die Genotypen bieten somit nur eine relative Resistenz.

Tabelle 2: Einteilung der Genotypen in die Risikogruppen nach dem National Scrapie Plan.

Risikogruppe	Genotypen	Empfänglichkeit
1	ARR/ARR	Schafe mit höchster genetischer Resistenz
2	ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ	Schafe mit genetischer Resistenz
3	AHQ/AHQ AHQ/ARH AHQ/ARQ ARH/ARH ARH/ARQ ARQ/ARQ	Schafe mit geringer genetischer Resistenz
4	ARR/VRQ	Schafe mit genetischer Empfänglichkeit
5	AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	Schafe mit hoher genetischer Empfänglichkeit

Auf atypische Scrapie trifft diese Risikoeinteilung so nicht zu, es sind stattdessen überwiegend Schafe der NSP-Risikogruppen 1-3 betroffen (Benestad et al. 2008). Die am häufigsten mit atypischer Scrapie assoziierten Haplotypen sind AHQ, ARQ und ARR, wobei bei ARQ mit Phenylalanin (F) statt Leucin (L) an Position 141 ein zusätzlicher Polymorphismus beteiligt und somit hauptsächlich der Haplotyp AF₁₄₁RQ bei atypischer Scrapie vertreten ist. VRQ ist dagegen kaum mit atypischer Scrapie assoziiert, bislang ist kein Fall beim Genotyp VRQ/VRQ bekannt (Orge et al. 2004; Moum et al. 2005; Saunders et al. 2006; Lühken et al. 2007; Moreno et al. 2007).

Bei experimentellen BSE-Infektionen von Schafen hat sich gezeigt, dass ARQ/ARQ den anfälligsten Genotyp mit der kürzesten Inkubationszeit repräsentiert (Houston et al. 2003). Einige Studien deuten daraufhin, dass zusätzliche Polymorphismen (AT₁₃₇RQ, ARQK₁₇₆, ARL₁₆₈Q) protektive Effekte bieten können (Goldmann et al. 2006; Vaccari et al. 2007). Der Haplotyp AF₁₄₁RQ scheint dagegen keine Rolle zu spielen (Goldmann et al. 2006).

2.1.3.3 Pathogenese

Die Pathogenese von Scrapie ist bislang nicht restlos aufgeklärt. Hadlow et al. (1982) demonstrierten zunächst für natürliche Scrapie-Infektionen bei Schafen, dass Infektiosität sich zuerst im Darmgewebe und den regionalen Lymphknoten sammelt, sich dann auf andere lymphatische Organe ausbreitet und schließlich das Zentralnervensystem (ZNS) erreicht. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass bei klassischer Scrapie die orale Aufnahme die Haupteintrittspforte darstellt, wenn man von Hautabschürfungen und verletzten Konjunktiven absieht. Wie PrP^{Sc} aus dem Darmlumen in die Mucosa gelangt, ist umstritten (van Keulen et al. 2008). Sowohl ein Transport über M-Zellen (Heppner et al. 2001), ferritingekoppelte Endozytose (Mishra et al. 2004) als auch eine Aufnahme durch dendritische Zellen wie bei Bakterien (Rescigno et al. 2001) werden diskutiert.

Eine erste Ansammlung und Replikation erfolgt in den darmassoziierten lymphatischen Geweben (GALT), vor allem in den Peyer-Plaques des distalen Ileums, sowie in den Tonsillen. Darauf folgend lässt sich PrP^{Sc} in den tributären Lymphknoten wie den Lymphonodi retropharyngei mediales und dem Lymphocentrum mesentericum craniale nachweisen. Von dort aus erfolgt eine Verbreitung durch Blut und Lymphe in andere lymphatische Organe (Andreoletti et al. 2000; Heggebo et al. 2002; van Keulen et al. 2002; Ryder et al. 2009).

Nach Überwindung der Darmmukosa wird ebenfalls das Enterische Nervensystem (ENS) mit PrP^{Sc} infiziert, zuerst im Bereich des Duodenums und des Ileums, später erfolgt eine Ausbreitung nach kranial und kaudal. Ausgehend vom ENS steigt PrP^{Sc} wahrscheinlich entlang efferenter para- und sympathischer Nervenfasern über den Nervus vagus und die Nervi splanchnici zum ZNS auf. Die Eintrittspforte im ZNS bilden somit zum einen der Nucleus parasympathicus nervi vagi im Bereich der Medulla oblongata und zum anderen der

Nucleus sympathicus in der Pars intermedia des thorakolumbalen Rückenmarks. Darauf folgt die Ausbreitung und Replikation im ZNS (van Keulen et al. 1999; Androletti et al. 2000; van Keulen et al. 2000; Heggebo et al. 2003; Ryder et al. 2009). Zusätzlich könnten andere Wege wie die hämatogene Ausbreitung oder der Transport entlang peripherer Nerven bei der Pathogenese von Bedeutung sein (van Keulen et al. 2008).

Bei atypischer Scrapie konnte bislang kein PrP^{Sc} im lymphoretikulären System nachgewiesen werden, es scheint dort keine Ausbreitung und Replikation stattzufinden (Benestad et al. 2003; Buschmann et al. 2004b, Vidal et al. 2008). Zusätzlich unterscheidet sich das Verteilungsmuster von PrP^{Sc} im ZNS bei atypischer Scrapie deutlich von dem der klassischen Scrapie. Generell lassen sich immunhistochemisch keine Anfärbungen der Kerne des Nervus vagus finden und häufig ist die Medulla oblongata insgesamt negativ oder Anfärbungen sind begrenzt auf die Kerngebiete des Nervus trigeminus. Dagegen befinden sich meist Ansammlungen von PrP^{Sc} in der Großhirn- und Kleinhirnrinde (Benestad et al. 2003; Buschmann et al. 2004b; Gavier-Widen et al. 2004; Onnasch et al. 2004; Orge et al. 2004; Nentwig et al. 2007; Vidal et al. 2008) Dieses Verteilungsmuster deutet auf eine abweichende Pathogenese hin. So könnte atypische Scrapie durch spontane Umfaltung direkt im ZNS entstehen (Benestad et al. 2008).

Die genaue molekulare Pathogenese von Scrapie ist weiterhin unklar. Jedoch dürften Veränderung des Neurotransmittersystems und der Synapsen, sowie Untergang der Neurone durch Autophagie und Apoptose ausgelöst durch Zellstress, Neurotoxine und chronisch aktivierte Mikroglia die zentrale Rolle spielen und über verschiedene Wege zur Schädigung und damit zu klinischen Symptomen führen (Crozet et al. 2008; Soto und Estrada 2008). Die Symptome variieren je nach Lokalisation im ZNS, Wirt und Form von Scrapie.

2.1.3.4 Klinik

Rasse, Genotyp, Herkunft und Alter der betroffenen Schafe sowie Scrapie-Stamm und Phase der Erkrankung üben einen großen Einfluss auf die zu beobachtenden Symptome aus (Ulvund 2001).

Bei klassischer Scrapie können grundsätzlich drei Symptomgruppen voneinander unterschieden werden: Verhaltensstörungen, Sensibilitätsstörungen und Haltungs- bzw. Bewegungsstörungen. Als Verhaltensstörungen treten Nervosität, Apathie und Absonderung von der Herde auf. Sensibilitätsstörungen äußern sich durch Pruritus, sichtbar anhand von Wollverlust, Hautabschürfungen, Kopfüdemem oder Hämatomen an den Ohren, hervorgerufen durch Scheuern, Knabbern und Beißen, sowie Blindheit, Schluckstörungen und Hypersensibilität auf Berührung oder Lärm. Haltungs- und Bewegungsstörungen treten in Form von Tremor, Spasmen und Ataxie zu Tage (Leopoldt 1759; Parry 1962; Clark und Moar 1992; Cappuchio et al. 2001; Ulvund 2001). Bosanquet et al. (1956) beschreiben drei Stadien des klinischen Verlaufs. Zum frühen Stadium gehören Verhaltensauffälligkeiten wie

Ängstlichkeit, Stressanfälligkeit oder Absonderung von der Herde sowie beginnende Schwäche, Ataxie oder schwacher Juckreiz. Darauf folgt ein Stadium, welches durch zunehmenden Juckreiz und sich steigernde Ataxie und Abmagerung gekennzeichnet ist. Im späten Stadium folgen Muskeltremor, Inkoordination, Spasmen und Festliegen. Die Letalität beträgt 100 %. Nicht immer dominieren Ataxie oder Pruritus, auch symptomlose Verläufe mit plötzlichen Todesfällen sind bekannt (Clark et al. 1994).

Bei erkrankten Mufflons wurden Ataxie, Sensibilitätsstörungen und Tremor des Kopfes festgestellt. Zwei der Tiere waren blind, eines wies eine hochgradige Abmagerung auf. Pruritus wurde jedoch nicht beobachtet (Wood et al. 1992).

Die meisten Fälle von atypischer Scrapie wurden bislang nicht durch Verdachtsfälle anhand klinischer Symptome, sondern durch die aktive TSE-Überwachung entdeckt (Benestad et al. 2008). Häufig sind erkrankte Schafe symptomlos. Insgesamt dominieren bei atypischer Scrapie Ataxie, Ängstlichkeit und Abmagerung, wohingegen Pruritus fehlt (Benestad et al. 2003; Gavier-Widen et al. 2004; Onnasch et al. 2004; Konold et al. 2007).

2.1.3.5 Pathologie

Makroskopisch sind bei an Scrapie erkrankten Schafen keine Läsionen feststellbar. Histopathologische Veränderungen beschränken sich auf das ZNS und betreffen überwiegend die graue Substanz. Charakteristische Läsionen stellen die neuronale Degeneration, Vakuolisierung sowie die Hypertrophie und Hyperplasie von Astrozyten (Astrozytose) dar (Hewicker-Trautwein et al. 2001). Die Lokalisation und Ausprägung der histopathologischen Befunde korrelieren nicht immer mit den klinischen Symptomen (Jeffrey und Gonzalez 2007). Ferner treten je nach Genotyp, Schafrasse und Erregerstamm individuelle Unterschiede in den Läsionsprofilen auf (Wood et al. 1997; Begara-McGorum et al. 2002; Ligios et al. 2002).

Bei klassischer Scrapie ist eine Vakuolisierung sowohl des Neuropils als auch der Neurone zu beobachten. Zusätzlich treten Chromatolyse und Pyknose auf. Histopathologische Veränderungen sind auf die Medulla oblongata, die Pons, das Mittelhirn, den Thalamus und vereinzelt auch die Groß- und Kleinhirnrinde beschränkt, wobei der Schwerpunkt auf der Medulla oblongata liegt (Zlotnik 1958; Wood et al. 1997; Ligios et al. 2002). Deutlich ausgeprägt ist dort die intraneurale Vakuolisierung, vor allem im Bereich des Nucleus parasympathicus nervi vagi (Ligios et al. 2002). Erkrankte Mufflons in England wiesen fokale Neurodegeneration mit Vakuolisierung der Neurone und des Neuropils und Astrozytose im Bereich der Medulla oblongata, der Pons, dem Mittelhirn und vereinzelt auch in der Großhirnrinde auf (Wood et al. 1992). Diese histopathologischen Befunde glichen denen der klassischen Scrapie-Infektion beim Hausschaf.

Bei atypischer Scrapie überwiegt dagegen die Vakuolisierung des Neuropils, intraneurale Vakuolen lassen sich nur selten finden. Meist sind Veränderungen begrenzt auf Klein- und

Großhirnrinde. Die Kerngebiete in der Medulla oblongata weisen keine Veränderungen auf (Benestad et al. 2003; Onnasch et al. 2004; Nentwig et al. 2007; Moore et al. 2008).

2.1.3.6 Diagnostik

Aus klinischer Sicht ist Scrapie nicht zu unterscheiden von z. B. einem Ektoparasitenbefall, metabolischen Störungen, Ketose, Intoxikationen oder anderen Infektionskrankheiten wie Listeriose, Tollwut, Maedi-Visna oder Aujeszký. Somit kann basierend auf den Symptomen nur eine Verdachtsdiagnose gestellt werden, eine endgültige Diagnose kann bislang nur post mortem erfolgen, da keine evaluierten Routine-Lebendtests zur Verfügung stehen. Allerdings weisen Studien zu potentiellen Lebendtests wie z. B. eine Biopsie der Tonsillen (Schreuder et al. 1996), eine Biopsie der Nickhaut (O'Rourke et al. 1998) oder eine Biopsie der rektalen Mucosa mit enthaltenen Lymphfollikeln (Gonzalez et al. 2008) gute Ergebnisse auf.

Früher erfolgte die Post-Mortem-Diagnostik anhand der Histopathologie oder des Nachweises von Scrapie-assoziierten Fibrillen (SAF) mittels Negativ-Kontrast-Elektronenmikroskopie. Inzwischen werden routinemäßig Schnelltests angewandt, d. h. Tests, die innerhalb von 24 h abgeschlossen und nach Verordnung EG Nr. 999/2001 Anhang X zur Überwachung von TSE bei Schafen und Ziegen zugelassen sind. Aktuell umfasst der Anhang X sieben evaluierte Tests (VO (EG) 162/2009), allerdings mit unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität (EFSA 2005b; EFSA 2005c). Als Marker für Scrapie dient dabei der immunologische Nachweis von PrP^{Sc} bzw. PrP 27-30 mittels Western Blot oder enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA). Nach einem positiven oder fraglichen Schnelltestergebnis erfolgt die Anwendung von spezifischeren Bestätigungstests. Diese umfassen die histopathologische Untersuchung, die Immunhistochemie, den elektronenmikroskopischen Nachweis von SAF sowie weitere Western Blot-Protokolle und erfolgen im Nationalen Referenzlabor (NRL) (Gavier-Widen et al. 2005; Matthews et al. 2008). Anhand von Glykosilierungsmustern, Molekülmassensanalysen, Antikörperbindungsverhältnissen und Übertragungen auf Mäuse kann zwischen Scrapie und BSE unterschieden werden (Gavier-Widen et al. 2005; Gretzschel et al. 2005).

Wichtig und entscheidend für alle Tests ist das Ausgangsgewebe (Matthews et al. 2008). So ist für den Nachweis bei klassischer Scrapie im Hinblick auf die Pathogenese die Medulla oblongata prädestiniert. Für die Diagnostik bei präklinischer klassischer Scrapie eignen sich die Lymphonodi retropharyngei mediales (Ersdal et al. 2003; Langeveld et al. 2006). Bei atypischer Scrapie dagegen sind die Lymphknoten aufgrund des mangelnden Lymphotropismus zu vernachlässigen. Hier ist das Cerebellum von größter Bedeutung für die Diagnostik, da die Ansammlungen von PrP^{Sc} und die histopathologischen Veränderungen dort ausgeprägter als in der Medulla oblongata sind (Benestad et al. 2003; Konold et al. 2007; Nentwig et al. 2007; Moore et al. 2008).

Anhand des Bandenmusters in Western Blots mit mildem PK-Verdau kann zwischen klassischer und atypischer Scrapie unterschieden werden. Klassische Scrapie-Isolate weisen

drei Banden zwischen 18 und 30 kDa auf, atypische Scrapie-Isolate besitzen dagegen ein komplexes mehrbandiges Muster zwischen 13 und 31 kDa (EFSA 2005a; Arzac et al. 2007).

2.1.3.7 Verbreitung

Scrapie ist in vielen europäischen Ländern und Nordamerika endemisch, auch aus Südamerika, Asien und Afrika wurden Fälle gemeldet (OIE 2008a; OIE 2009). Australien und Neuseeland gelten seit regional begrenzten Ausbrüchen 1952 bzw. 1954 durch aus England importierte Tiere und nachfolgenden strengen Import- und Meldevorschriften als offiziell frei von Scrapie (Detwiler und Baylis 2003). Angesichts klinisch unauffälliger atypischer Scrapie-Fälle stellt sich jedoch die Frage, inwieweit der Status von Ländern ohne aktive TSE-Überwachung überhaupt beurteilbar ist (Matthews et al. 2008). Ferner wird bei den meisten offiziellen Meldungen nicht zwischen klassischer und atypischer Scrapie unterschieden. Einen Einblick in die Scrapie-Situation und -Überwachung in Europa liefert der jährliche Bericht zu TSE zusammengestellt aus den einzelnen Berichten der Mitgliedsstaaten an die EU (EU Food Safety 2009).

Das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) veröffentlicht auf seiner Homepage die Anzahl von festgestellten Scrapie-Ausbrüchen seit 1990, die sich aktuell auf 172 Ausbrüche beläuft (BMELV 2009). Dabei ist jedoch die Anzahl der Ausbrüche nicht gleichzusetzen mit der Zahl der Scrapie-Fälle, d. h. der Anzahl betroffener Schafe. Im Zeitraum Januar 2002 bis Februar 2006 wurde bei 224 Hausschafen in Deutschland Scrapie festgestellt, darunter 120 klassische Fälle in 16 Herden und 97 atypische Fälle in 88 Herden. Somit überwogen, bezogen auf das Einzeltier, die klassischen Scrapie-Fälle, bezogen auf die Herden jedoch die atypischen Fälle. Bei der geographischen Verteilung zeigte sich, dass klassische Scrapie überwiegend im Norden von Deutschland vorkommt, atypische Scrapie dagegen relativ gleichmäßig verteilt auftritt (Lühken et al. 2007).

2.1.3.8 Rechtliche Situation

Innerhalb der EU regelt die VO (EG) 999/2001 die Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter TSE. Diese Verordnung gilt unmittelbar in jedem EU-Mitgliedsstaat und muss nicht in nationales Recht umgesetzt werden.

Danach umfasst TSE bei kleinen Wiederkäuern BSE, klassische Scrapie und atypische Scrapie, wobei ein bestätigter Scrapie-Fall vom jeweiligen NRL festgestellt und BSE sicher ausgeschlossen worden sein muss. Das Kontrollsystem umfasst sowohl die Meldung und Untersuchung klinisch verdächtiger Tiere (passive Überwachung) als auch die Untersuchung von Tieren ohne TSE-Verdacht (aktive Überwachung). Im Rahmen der aktiven Überwachung muss in jedem EU-Mitgliedsstaat entsprechend der Schaf- und Ziegenpopulation eine repräsentative Mindeststichprobe von gesundgeschlachteten und verendeten oder getöteten Tieren über 18 Monaten auf TSE untersucht werden (Anhang III, VO (EG) 999/2001). Die Probenentnahme und Diagnostik hat nach Anhang X zu erfolgen, wobei zuerst ein

zugelassener Schnelltest angewendet wird und bei nicht eindeutigen oder positiven Ergebnissen mindestens ein Bestätigungstest wie Immunhistochemie, Western Blot, elektronenmikroskopischer Nachweis von SAF oder Histopathologie durchgeführt werden muss. Positive TSE-Proben von kleinen Wiederkäuern müssen mit Hilfe von diskriminierenden Tests weiter untersucht werden, um das Vorliegen von BSE auszuschließen.

Bei einem TSE-Verdacht werden zunächst das verdächtige Tier bzw. alle Körperteile amtlich verwahrt oder unschädlich beseitigt. Für den gesamten Bestand gilt eine Verbringungssperre, bis die Ergebnisse der Untersuchung vorliegen. Im Fall eines bestätigten TSE-Befundes bei Schafen werden alle Schafe und Ziegen des Haltungsbetriebes sowie mögliche Kontakttiere aus anderen Betrieben getötet und Embryonen oder Eizellen des betroffenen Tieres vernichtet. Davon sind jedoch Ausnahmen mit Hilfe einer Prionprotein-Genotypisierung der Herde möglich. So können männliche Zuchttiere des Genotyps ARR/ARR und weibliche Zuchttiere mit mindestens einem ARR- und ohne VRQ-Allel weiter zur Zucht verwendet werden. Ebenfalls von der Tötung ausgenommen werden können Schafe, die ausschließlich zur Schlachtung bestimmt sind, wenn sie mindestens ein ARR-Allel besitzen. Ein Bestand darf nach gründlicher Reinigung und Desinfektion nur mit Schafen ergänzt bzw. neu aufgebaut werden, die genetisch weitgehend resistent gegenüber klassischer Scrapie sind. Bei atypischer Scrapie kann eine Keulung des Bestandes unterbleiben, wenn der Betrieb alle Schafe und Ziegen eindeutig kennzeichnet und sich für zwei Jahre einer verstärkten TSE-Überwachung sowie einem Verbringungsverbot unterzieht (Anhang VII, VO (EG) 999/2001).

Im Rahmen der VO (EG) 999/2001 wurden als Präventionsmaßnahmen gegen TSE ein Verfütterungsverbot von tierischen Proteinen an Wiederkäuer sowie eine Selektion der Schafpopulationen auf ihre TSE-Resistenz hin eingeführt. Entsprechend dem Vorsorgeprinzip wurden darüber hinaus spezifizierte Risikomaterialien definiert und aus der Nahrungskette entfernt.

In Deutschland wird die Tierseuchenbekämpfung allgemein durch das Tierseuchengesetz geregelt (TierSG 2004). Tierseuchen im Sinne dieses Gesetzes sind Krankheiten oder Infektionen mit Krankheitserregern, die bei Tieren auftreten und auf Tiere oder Menschen übertragen werden können (§ 1). Die Durchführung der Vorschriften dieses Gesetzes obliegt den zuständigen Landesbehörden (§ 2). Nach § 9 ist jeder Verdacht oder Ausbruch einer anzeigepflichtigen Tierseuche unverzüglich der zuständigen Behörde oder dem beamteten Tierarzt anzuzeigen, damit geeignete Maßnahmen ergriffen werden können. Der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV 2004) entsprechend zählt TSE zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen. Sowie der Verdacht oder der Ausbruch von TSE amtlich festgestellt ist, greifen die Verhütungs-, Kontroll- und Tilgungsmaßnahmen nach VO (EG) 999/2001.

2.2 Europäisches Mufflon

2.2.1 Taxonomie

Mufflons gehören zur Familie der Bovidae (siehe Abbildung 1). Allerdings ist ihre genaue taxonomische Bezeichnung umstritten (Stubbe 2003).

Die Unterteilung der Gattung *Ovis* in Arten wird seit langem diskutiert. Shackleton (1997) und Grubb (2005) unterscheiden fünf Arten: *Ovis ammon* (Argali), *O. canadensis* (Dickhornschaft), *O. dalli* (Dallschaf), *O. nivicola* (Schneeschaft) und *O. orientalis* (Mufflon und Urial) bzw. *O. aries* (Mufflon, Urial und Hausschaf). Nowak (1999) unterteilt die Gattung in sieben Arten, indem er Mufflon, Urial und Hausschaf aufteilt in *O. orientalis* (Mufflon im engen Sinne), *O. vignei* (Urial) und *O. aries* (Hausschaf).

Mit Hilfe von morphometrischen Merkmalen können europäische Mufflons, Argalis, Dickhorn-, Dall- und Schneeschafe klar voneinander abgegrenzt werden; Urials dagegen nicht, da diese zwischen Argalis und europäischen Mufflons liegen (Ludwig und Knoll 1998). Ihrem diploiden Chromosomensatz nach lassen sich Arten mit 52 (*O. nivicola*), 54 (*O. dalli*, *O. canadensis*, *O. orientalis*, *O. aries*), 56 (*O. ammon*) und 58 (*O. vignei*) Chromosomen unterscheiden (Nadler et al. 1973). Es existieren auch Hybriden mit einem Chromosomensatz von 55 und 57 (Nadler et al. 1971). Da alle Wildschaffformen untereinander fertile Hybriden erzeugen können, wird z. T., dem biologischen Artbegriff im engen Sinne entsprechend, auf eine Großart, *O. ammon*, verwiesen (Ludwig und Benecke 2003).

In der hier vorliegenden Arbeit wird in Anlehnung an Shackleton (1997) und Nowak (1999) der Name *Ovis orientalis musimon* für das europäische Mufflon verwendet. Synonyme dafür sind *Ovis ammon musimon* oder *Ovis aries musimon*.

Klasse	Mammalia (Säugetiere)
Ordnung	Artiodactyla (Paarhufer)
Unterordnung	Ruminantia (Wiederkäuer)
Familie	Bovidae (Rinderartige)
Gattung	<i>Ovis</i> (Schafe)
Art	<i>Ovis orientalis</i>
Unterart	<i>Ovis orientalis musimon</i>

Abbildung 1: Einordnung des europäischen Mufflons in die zoologische Systematik.

2.2.2 Geschichte

Der Ursprung der Wildschafe liegt in Asien. Während des Pleistozäns erfolgte eine Ausbreitung im holarktischen Raum. Fossilfunde aus dem Jungpleistozän und dem Alt- bis Mittelholozän sind auf Vorder- und Mittelasien begrenzt und lassen dort auf eine autochthone Entwicklung schließen (Uerpmann 1987; Ludwig und Benecke 2003). Im Rahmen der Neolithisierung gelangten vorderasiatische Mufflons in den Mittelmeerraum und seine Inseln (von den Driesch 1995). Es ist umstritten, ob frühdomestizierte Schafe verwilderten oder gefangene Wildschafe entwichen und die rezenten Mufflonbestände der Mittelmeerinseln gründeten (von den Driesch 1995; Ludwig und Benecke 2003; Piegert 2003; Piegert und Uloth 2005).

Ausgehend von den Inseln Korsika und Sardinien wurden von Mitte des 18. Jahrhunderts an Mufflons nach Europa, vor allem nach Österreich, Ungarn, Tschechien und die Slowakei, verbracht (Uloth 1972; Uloth 1985; Piegert 2003; Piegert und Uloth 2005). In Deutschland wurden europäische Mufflons zuerst 1903 im Bereich des Forstamtes Görde (Niedersachsen) und 1906 im Bereich des Forstamtes Harzgerode (Sachsen-Anhalt) freigesetzt. Die Tiere stammten zum einen aus Sardinien und zum anderen aus den Zoos von Basel, Dresden, Frankfurt am Main, Halle, Hamburg, Leipzig und Köln (Wuttky 1963; Menzel 2003; Piegert und Uloth 2005; Piegert 2006). Das Harzgeroder Vorkommen begründete die Ostharzer Muffelpopulation, aus welcher zahlreiche andere Einbürgerungen entstanden. So wurden zwischen 1966 und 1988 über 900 Mufflons in andere Reviere innerhalb Ostdeutschlands umgesetzt (Piegert und Uloth 2005).

Das Muffelwild auf dem europäischen Festland stammt von wenigen Tieren ab, die wiederum selbst aus Inselepopulationen stammen (Piegert 1982; Hartl 1990). Die genetische Variabilität bei Mufflons ist ausgesprochen gering. Bei einer Untersuchung von 47 Genloci an vier verschiedenen Mufflonpopulationen aus Österreich betrug der durchschnittliche Polymorphiegrad, d. h. der Anteil der untersuchten Genloci, die polymorph sind, 2,2 %. Der Anteil von heterozygoten Genloci (Heterozygotiegrad) lag bei 1,1 %. Ferner konnten an 30 Genloci keine biochemisch-genetischen Unterschiede zwischen Hausschaf und Mufflon festgestellt werden (Hartl 1990). Bei einer Analyse von Blutproteinen wurden keine elektrophoretischen Unterschiede zwischen Mufflons und Hausschafen gefunden (Stratil und Bobak 1988). Auch die Analyse der mitochondrialen DNA zeigt eine enge stammesgeschichtliche Verwandtschaft zwischen Hausschafen und Mufflons (Tapio et al. 2006).

2.2.3 Morphologische Merkmale

Das europäische Mufflon ist die kleinste Wildschafart. Die Kopf-Rumpf-Länge beträgt 95-130 cm, die Schulterhöhe 65-90 cm und das Gewicht 25-50 kg (Stubbe und Stubbe 1977; Röhrs 1986; Wiesner 1987; Tomiczek und Türcke 1995).

Mufflons zählen zu den Haarschafen und wechseln abhängig vom Klima im Frühjahr und Herbst ihr Haarkleid. Die Färbung reicht von gelbbraun bis rotbraun mit einem dunklen Aalstrich. Ohrinnenseite, Maul, Unterläufe und Bauch sind weiß gefärbt (siehe Abbildung 2). Häufig dehnt sich mit zunehmendem Alter die grauweiße Gesichtsmaske aus. Das Winterhaarkleid ist kontrastreicher und dunkler, bei Widdern im Schulter- und Rückenbereich fast schwarz. In Bezug auf die Körpergröße, Hörner und Haarkleid ist ein Geschlechtsdimorphismus ausgeprägt. Muffelwiddern sind größer, besitzen eine Halsmähne, einen weißen Sattelfleck und konvergent schneckenartig gewundene Hörner. Auch Mufflonschafe können gehört sein, allerdings bilden diese keine Schneckenspitzen, sondern säbelartige Stümpfe aus (Röhrs 1986; Briedermann 1993; Tomiczek und Türcke 1995; Piegert und Uloth 2005).



Abbildung 2: Gehörntes Mufflonschaf im Sommerhaarkleid.

2.2.4 Ernährung

Durch ein großes Fassungsvermögen der Vormägen, ein enges Ostium reticulo-omasicum und der damit verbundenen Verzögerung der Futterpassage sind Mufflons auf faserreiche zellulosehaltige Pflanzen spezialisiert und gehören somit zu den Wiederkäuern des Grassfressertypes mit selektiver Äsungsweise (Drescher-Kaden 1976; Hofmann 1984; Hofmann 1989).

Das Nahrungsspektrum des Muffelwildes ist breit gefächert, abhängig vom Habitat und der Jahreszeit. Die Hauptkomponente bilden Gräser, wobei vor allem Süßgräser (Poaceae), insbesondere die Drahtschmiele (*Deschampsia flexuosa*), dominieren. Triebe, Blätter und Nadeln von Sträuchern, Laub- und Nadelbäumen sowie Kräuter, Stauden, Samen, Früchte, landwirtschaftliche Nutzpflanzen und Pilze ergänzen das Nahrungsspektrum (Stubbe 1971; Theiß-Krämer 1983; Prien und Peukert 1989; Thiele et al. 1989; Briedermann 1993; Piegert und Uloth 2005).

Diese Nahrungspräferenzen decken sich mit denen weidender Hausschafe (Schubert 1989a). Daher kann davon ausgegangen werden, dass in Gebieten, wo Mufflons und Hausschafe gemeinsam vorkommen, dieselben Äsungsflächen genutzt werden. Wenngleich systematische Untersuchungen zu Kontaktraten zwischen Mufflons und Hausschafen fehlen, so ist zumindest ein indirekter Kontakt wahrscheinlich.

Um Wildschäden zu verhindern, lang anhaltende hohe Schneelagen oder fehlende Waldmast auszugleichen, wird mitunter eine Winterfütterung des Muffelwildes durchgeführt. Dazu werden Heu, Silage, Kastanien, Eicheln, Rüben und Getreide verwendet, aber i. d. R. keine kommerziellen Kraftfuttermittel (Prien und Peukert 1989; Piegert und Uloth 2005).

2.2.5 Verhalten und Sozialstruktur

Die Aktivitätsrhythmik des Muffelwildes wird von der Nahrungsaufnahme, die 70-80 % der Aktivitätszeit abdeckt, bestimmt. Die Gesamtaktivität innerhalb von 24 h schwankt zwischen durchschnittlich 9-19 h, wobei die Hauptaktivitätsphasen mit der Dämmerung einhergehen und jeweils zu Sonnenauf- und Sonnenuntergang das Maximum erreichen (Langbein et al. 1997; Berger et al. 2003; Langbein 2003). Aber auch während der Nacht wurden Aktivitätsphasen nachgewiesen (Langbein et al. 1997; Berger et al. 2003; Fielitz und Piegert 2003; Nitze et al. 2003). Allerdings wird diskutiert, ob diese ein Ausweichen im Zusammenhang mit hohen Temperaturen, hoher Luftfeuchtigkeit und hoher Insektenbelastung darstellen oder eher mit anthropogenen Störungen wie Jagd und Tourismus zusammenhängen (Böttcher und Briedermann 1989; Langbein et al. 1997; Berger et al. 2003; Nitze et al. 2003; Piegert und Uloth 2005). Ausgeprägte Ruhephasen finden vor der Morgen- und nach der Abenddämmerung statt (Langbein et al. 1997; Berger et al. 2003).

Mufflons leben in Familienverbänden, die aus verwandten Schafen mit ihren Lämmern und Jährlingen bestehen. Jeder Familienverband wird durch ein erfahrenes Leitschaf geführt und unterliegt einer linearen Altershierarchie (Guilhem et al. 2000). Zur Geburt sondern sich die Schafe für 10-15 Tage vom Familienverband ab. Während dieser Zeit erfolgt die Prägung der Lämmer auf ihre Muttertiere (Briedermann 1989). Junge Widder wandern mit ungefähr zwei Jahren aus dem Familienverband ab und schließen sich sog. Widderclans an. Alte Widder ziehen häufig allein oder zu zweit. Die deutlichste soziale Trennung der Geschlechter ist während des Sommers zu beobachten (Le Pendu et al. 1995). Durch losen Zusammenschluss von Familienverbänden und Widdern im Herbst und Winter wachsen die Rudel an (Theiß-Krämer 1983; Böttcher und Briedermann 1989; Briedermann 1993; Tomiczek und Türcke 1995; Piegert und Uloth 2005).

Mitunter schließen sich einzelne Mufflonwidder frei gehaltenen Hausschafherden an und decken die Schafe (Borrmann 1996; Piegert und Uloth 2005). Auch der umgekehrte Fall ist bekannt: ein entwichenes Schwarzkopfschaf wurde über zwei Jahre hinweg in einem Mufflonrudel beobachtet (Borrmann 1996). Diese Berichte zeigen, dass ein direkter Kontakt zwischen Mufflons und Hausschafen möglich ist, quantitative Erhebungen gibt es dazu jedoch nicht.

2.2.6 Fortpflanzung

Mufflonschafe sind mit ca. 15-18 Monaten fortpflanzungsfähig, z. T. werden auch gut entwickelte Schaflämmer im Alter von 7-10 Monaten bereits erfolgreich gedeckt (Briedermann 1992; Michel et al. 1982). Mufflonwidder erreichen mit 18-24 Monaten die Fortpflanzungsfähigkeit und kommen in frei lebenden, etablierten Muffelwildpopulationen mit ungefähr vier Jahren zum Decken (Röhrs 1986; Lincoln 1998; Piegert und Uloth 2005).

Die Brunftzeit reicht von Oktober bis Dezember. Nach einer Tragezeit von 147-160 Tagen werden hauptsächlich von März bis Mai die Lämmer gesetzt. Bei Verlust des Frühjahrlammes oder guter Kondition der Mutterschafe führt mitunter eine zweite Brunst im Zeitraum März bis Mai zum Setzen eines weiteren Lammes im September oder Oktober (Röhrs 1986; Uloth und Prien 1989; Briedermann 1992; Tomiczek und Türcke 1995; Piegert und Uloth 2005). Das Geschlechterverhältnis schwankt je nach Mufflonpopulation und Jahr von 0,7 : 1 (männlich : weiblich) bis 1,4 : 1, liegt jedoch im Durchschnitt bei annähernd 1 : 1 (Briedermann 1992; Piegert und Uloth 2005).

Daten zur Populationsdynamik des Mufflons sind rar und stammen meist aus Auswilderungsgattern, Gehegen oder zoologischen Einrichtungen. Der Zuwachs (*recruitment*) bezeichnet den Anteil der Lämmer, die geboren werden, aufwachsen und schließlich in die adulte Population übergehen. Er setzt sich aus dem Lamm-zu-Schaf-Verhältnis (Reproduktionsindex) und der Jungtiersterblichkeit zusammen. Die beobachteten Reproduktionsindizes beim Muffelwild reichen von 0,3 : 1 bis 1,2 : 1, wobei der Anteil an

Zwillingsgeburten zwischen 1,4-26,4 % bei Gehegetieren (Piegert und Uloth 2005) und 1-3 % bei frei lebenden Populationen (Briedermann 1992) schwankt. Die Jungtiersterblichkeit wird mit 7-20 % angegeben (Piegert und Uloth 2005), dürfte aber außerhalb von Gehegen und zoologischen Einrichtungen unter Berücksichtigung von Prädatoren wie streunende Hunde, Füchse, Luchse, Wildschweine und Wölfe sowie Witterungseinflüssen wesentlich höher liegen (Tomiczek und Türcke 1995; Garel et al. 2004). Schätzungen für frei lebende Mufflonpopulationen gehen von einer Jungtiersterblichkeit von bis zu 60 % aus (Uloth 1982).

Nach Angaben aus der Literatur beträgt der Zuwachs beim Muffelwild bezogen auf die gesamte Population 18,5-40 % (Prien et al. 1982; Uloth 1982; Briedermann 1992; Tomiczek und Türcke 1995; Piegert und Uloth 2005), wobei in neueren Einschätzungen meist von 35 % ausgegangen wird (Gärtner et al. 2003, Kriebel 2003).

2.2.7 Altersbestimmung

Zur Altersschätzung beim Muffelwild können drei Merkmale herangezogen werden: das Exterieur, der Zahnwechsel und die Jahresringe der Hörner beim Mufflonwider.

Lämmer und auch Jährlinge sind etwas kleiner als die Alttiere, ihr Kopf ist runder und wird erst später länger und kantiger (vergleiche Abbildung 3 und Abbildung 7). Ältere Mufflons wirken insgesamt knochiger, der Sattelfleck und die Halsmähne bei Widdern zeichnen sich mit zunehmendem Alter deutlich ab (Piegert und Uloth 2005). Die Altersschätzung nach dem Exterieur erlaubt eine grobe Unterteilung in Lämmer und Alttiere.

Mufflons verfügen über ein typisches Wiederkäuergebiss mit folgender Milchzahnformel:

$$\frac{O_i \ O_c \ 3p}{3i \ 1c \ 3p} = 20 \text{ Zähne} \text{ und folgender Dauerzahnformel: } \frac{OI \ OC \ 3P \ 3M}{3I \ IC \ 3P \ 3M} = 32 \text{ Zähne,}$$

wobei Milchzähne mit kleinen Buchstaben und bleibende Zähne mit Großbuchstaben dargestellt sind (i/I: Incisivi, c/C: Canini, p/P: Praemolares, m/M: Molares). Zur Altersbestimmung kann der Zahnwechsel bzw. -durchbruch des Dauergebisses herangezogen werden (siehe Abbildung 3 bis Abbildung 7). Der erste hintere Backenzahn (M1) bricht mit 3-5 Monaten durch, M2 mit 10-14 Monaten und M3 mit 27-32 Monaten. Der Wechsel der Schneidezähne beginnt bei den inneren Schneidezähnen (I1) mit 17-19 Monaten, bei I2 mit 24-27 Monaten und bei I3 mit 32-34 Monaten. Zuletzt wechseln die Eckzähne (C) mit 42-46 Monaten (Rieck 1963; Stubbe und Uhlenhaut 1971; Habermehl 1985). Darüber hinaus kann die Abnutzung der Backenzähne zur Altersschätzung herangezogen werden. So erfolgt die Abnutzung der M1 im Alter von 4-6 Jahren, der M2 im Alter von 6-8 Jahren und der M3 mit 8-10 Jahren. Allerdings haben Zahnanomalien und das Nahrungsspektrum einen großen Einfluss auf den Grad der Abnutzung (Habermehl 1985, Piegert und Uloth 2005). Da ferner die Backenzähne aufgrund des geringen Öffnungswinkels des Mauls schwierig einzusehen und die einzelnen Zähne nur schlecht von einander abzugrenzen sind, ist der Wechsel der Schneide- und Eckzähne am besten zur Altersbestimmung geeignet.

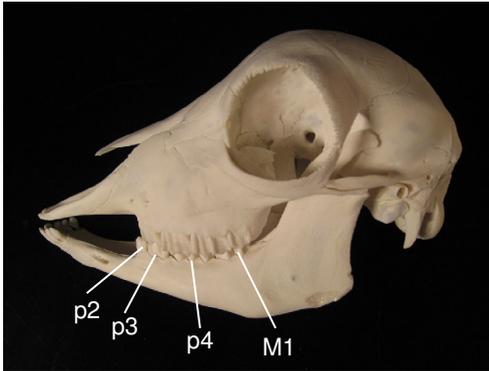


Abbildung 3: Schädel und Unterkiefer eines 5-10 Monate alten Mufflonlammes.

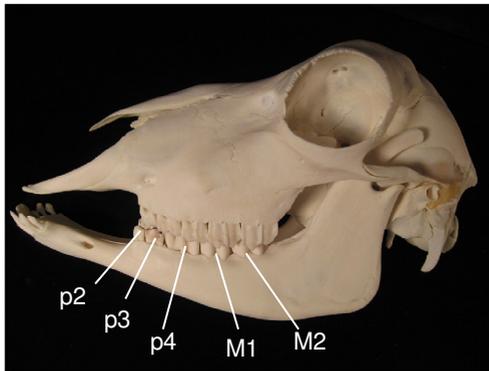


Abbildung 4: Schädel und Unterkiefer eines ca. 19 Monate alten Mufflonschafes.

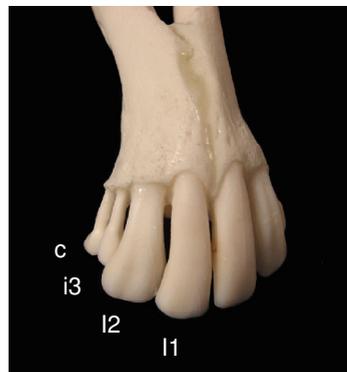
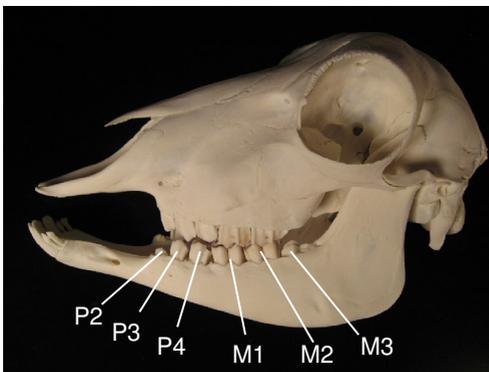


Abbildung 5: Schädel und Unterkiefer eines ca. 27 Monate alten Mufflonschafes.

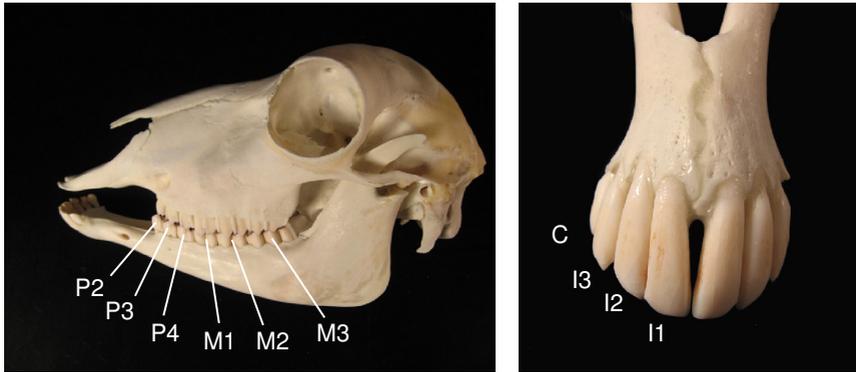


Abbildung 6: Schädel und Unterkeifer eines ca. 48 Monate alten Mufflonschafes.

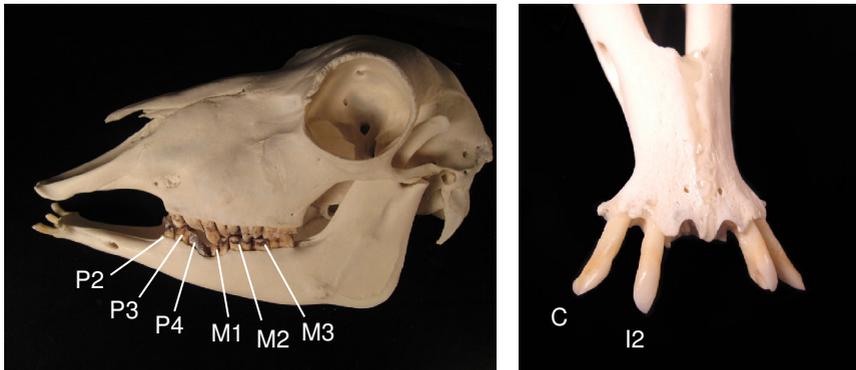


Abbildung 7: Schädel und Unterkeifer eines ca. 12 Jahre alten Mufflonschafes.

Das Hornwachstum bei Mufflonwiddern setzt mit 3-5 Monaten ein. Die Hörner, auch Schnecken genannt, sind an der Oberfläche grob gerillt. Hormonell bedingte Wachstumsverzögerungen im Herbst und Winter führen zur Ausprägung von Jahresrillen, die aus sechs dicht aneinander liegenden Wülsten bestehen. Zwischen den Jahresrillen liegen durchschnittlich 15-17 breitere Wülste. Ab dem dritten Lebensjahr erfolgt ein Rückgang des Hornwachstums und die Abschnitte zwischen den Jahresringen werden kleiner. Ab ungefähr dem zehnten Jahr ist kein nennenswertes Hornwachstum mehr festzustellen (Stubbe und Uhlenhaut 1971; Habermehl 1985; Schuh et al. 1989; Lincoln 1998). Das Abzählen der Jahresringe ermöglicht somit eine Altersschätzung von älteren Widdern, bei denen der Zahnwechsel bereits komplett vollzogen ist. Allerdings können Scheinrillen und Nichtberücksichtigung des Hornwachstums des Lammes zu einer deutlichen Altersüberschätzung führen (Rieck 1963; Piegert und Uloth 2005).

2.2.8 Habitat

Wie erfolgreiche Einbürgerungen in ganz Mitteleuropa zeigen, sind Mufflons nicht auf bestimmte Biotope festgelegt. So finden sich Mufflons an trockenen Sandstandorten auf Meereshöhe bis in die Höhenlagen der Mittelgebirge, solange die Anzahl der Schneetage begrenzt ist und sonnige Hanglagen vorhanden sind. Offene lichte Waldgebiete mit hohem Gras- und Strauchanteil werden bevorzugt (Röhrs 1986; Piegert und Uloth 2005).

Die Größe des Aktionsraumes der Mufflons ist abhängig von seiner Beschaffenheit, der Jahreszeit und dem Geschlecht. Die Angaben in der Literatur reichen von 63 ha im Sommer (Theiß-Krämer 1983), über durchschnittlich 200 ha (Le Pendu et al. 1995) bzw. 440 ha für Schafe und 580 ha für Widder (Dubois et al. 1994), bis hin zu durchschnittlich 748 ha (Fielitz und Piegert 2003) und sogar 1000 ha für Widder während der Brunft (Theiß-Krämer 1983).

Mufflons sind standorttreu. Stark frequentierte Straßen, Eisenbahnlinien und größere Flüsse bilden Barrieren und werden nur bei Gefahr, dauerhafter Störung oder langanhaltender hoher Populationsdichte überschritten (Tomiczek und Türcke 1995; Fielitz und Piegert 2003; Piegert und Uloth 2005).

2.2.9 Verbreitung

Mufflons wurden nicht nur auf dem europäischen Festland, sondern auch in den USA (Hawaii und Texas), Argentinien, Chile und auf dem Kerguelen-Archipel eingebürgert (Uloth 1972; Frisina und Frisina 1998; Piegert und Uloth 2005; Kaeuffer et al. 2007). Der weltweite Bestand wird auf rund 132.000 Stück geschätzt, davon entfallen 89 % auf Europa und 11 % auf Überseegebiete. In Europa bilden Tschechien, Deutschland und Spanien die Hauptvorkommen (je ≥ 15.000 Mufflons). Weitere nennenswerte Vorkommen (> 5.000 Mufflons) existieren in Frankreich, Ungarn, der Slowakei, Italien und Österreich. Deutschland besitzt nach Tschechien das zweitgrößte frei lebende Mufflonvorkommen der Welt mit geschätzten 20.600 Tieren in ca. 200 Populationen (Piegert und Uloth 2005).

Dem Bundesjagdgesetz nach unterliegt Muffelwild dem Jagdrecht (§ 2). Damit ist nach § 1 auch die Pflicht zur Hege, d. h. die Erhaltung eines gesunden Wildbestandes sowie die Pflege und Sicherung seiner Lebensgrundlagen, verbunden (BJagdG 1976). Allerdings darf die Hege in den meisten Bundesländern entsprechend den einzelnen Rechtsbestimmungen zur Schalenwildbewirtschaftung nur in sog. Bewirtschaftungs- oder Hochwildgebieten erfolgen. In Gebieten, die nicht als Muffelwildbewirtschaftungsgebiet festgelegt sind, ist Muffelwild i. d. R. abzuschießen und eine Hege ist nicht erwünscht. 2003 gab es in Deutschland 135 festgelegte Muffelwildbewirtschaftungsgebiete. Darüber hinaus existierten 47 Gebiete mit Muffelwildvorkommen, aber ohne offiziellen Status als Bewirtschaftungsgebiet (Böttcher 2003). Nach § 21 des Bundesjagdgesetzes darf Muffelwild als Schalenwild nur gezielt im Rahmen eines vorher genehmigten Abschussplanes erlegt werden. Die Abschusspläne müssen den jeweiligen Landesjagdgesetzen entsprechen und werden nach Geschlecht und Alter des

Wildes unterteilt. Beim Muffelwild werden Schaf- und Widderlämmer (0-1 Jahr), Schmalschafe und Jährlinge (1-2 Jahre) sowie Altschafe und Widder (> 2 Jahre) unterschieden. Ebenso erfolgt die Streckenmeldung i. d. R. getrennt nach Altersklassen. Die Kreisjahresstrecken liefern somit einen wichtigen Anhaltspunkt für die Verbreitung und Größe der Muffelwildpopulationen in Deutschland. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die detaillierten Muffelwildstrecken auf Kreisebene für die Jagdjahre 2005, 2006 und 2007 zusammengetragen (siehe Anhang 8.1).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Seit dem Auftreten von TSE bei Mufflons in England und der Feststellung, dass Mufflons mit ARQ/ARQ den gleichen PrP-Genotyp wie viele Hausschafe aufweisen können, müssen Mufflons grundsätzlich als empfänglich für TSE eingestuft werden.

Klassische Scrapie kann sowohl vertikal als auch horizontal direkt übertragen werden. Zusätzlich ist eine indirekte Übertragung, z. B. über die gemeinsame Nutzung von Stall und Weide möglich. Daraus ergeben sich in Deutschland mehrere potentielle Übertragungswege, da hierzulande große frei lebende Mufflonpopulationen in direktem und indirektem Kontakt zu Hausschafenerden stehen.

Es stellte sich daher die Frage, ob TSE – insbesondere Scrapie – bei Mufflons in Deutschland auftritt und welche PrP-Genotypen in den Mufflonpopulationen vertreten sind, um die Empfänglichkeit abschätzen zu können. Hierzu wurde im Rahmen eines durch das BMELV geförderten Projektes ein Screening durchgeführt, bei dem frei lebende Mufflons aus definierten Risikogebieten in Deutschland mittels eines schafspezifischen Schnelltestes auf TSE untersucht wurden. Zusätzlich wurde bei einer repräsentativen Anzahl Mufflons der PrP-Genotyp mittels PCR und direkter Sequenzierung bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten eine genauere Risikoabschätzung ermöglichen.

Nachfolgend werden die Methoden und Ergebnisse des Populationsscreenings (Kapitel 3.1) und anschließend die Methoden und Ergebnisse für die Genotypisierung (Kapitel 3.2) dargestellt und diskutiert. Eine zusammenfassende Betrachtung und abschließende Risikobewertung erfolgt in Kapitel 4.

3.1 Populationsscreening

3.1.1 Material und Methoden des Populationsscreenings

Untersucht wurden frei lebende Mufflons, sowohl erlegtes Wild wie auch Fallwild. Im Einklang mit der VO (EG) 999/2001 und der Erkenntnis, dass Scrapie selten bei Schafen unter 18 Monaten auftritt (Dickinson und Stamp 1969), wurden nur Mufflons in die Untersuchung miteinbezogen, bei denen bereits die ersten bleibenden Schneidezähne (I1) durchgebrochen waren (siehe 2.2.7). Um sowohl atypische als auch klassische Scrapie nachweisen zu können (siehe 2.1.3.6), wurden i. d. R. von jedem Tier die Medulla oblongata, das Cerebellum und die Lymphonodi retropharyngei mediales entnommen und mit Hilfe eines TSE-Schnelltestes untersucht.

3.1.1.1 Einteilung der Risikogebiete

Zur Planung des Screenings wurde die Annahme getroffen, dass mit einer geringen Prävalenz von TSE bei Mufflons zu rechnen sei, daher würde für eine statistisch relevante Aussage eine entsprechend hohe Stichprobenanzahl benötigt werden. Ferner wurde angenommen, dass bestimmte Risikofaktoren die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von TSE in einem Gebiet erhöhen. Deshalb wurden zunächst Risikofaktoren und -gebiete definiert, auf welche sich dann die Untersuchung konzentrieren sollte. Die Risikogebieteinteilung erfolgte auf Kreisebene, da Landkreise, kreisfreie Städte und Stadtstaaten die kleinste geographische Unterteilung darstellten, für die ausreichende Informationen erhältlich waren. Alle 2006 in Deutschland bestehenden Landkreise, kreisfreien Städte und Stadtstaaten – insgesamt 438 – wurden für die Risikogebieteinteilung analysiert und verschiedenen Risikoklassen zugeordnet.

Da erkrankte Hausschafe zweifelsohne Träger und Ausscheider von Prionen darstellen, können durch sie Prionen in die Umwelt gelangen; sowohl eine direkte als auch eine indirekte Übertragung auf Mufflons wären auf diesem Wege denkbar. Daher wurden Scrapie-Ausbrüche bei Hausschafen als ein Risikofaktor berücksichtigt. Bei klassischer Scrapie wurde die gemeinsame Nutzung von Weiden durch verschiedene Schafherden als Risikofaktor identifiziert (Hopp et al. 2001). Zudem spielen für eine Übertragung die Kontaktraten und damit auch die Tierdichten eine Rolle. Deshalb wurden die Schafdichten und die Größe des Muffelwildbestandes als Risikofaktoren miteinbezogen.

Zur Einteilung unter epidemiologischen Gesichtspunkten wurden also drei verschiedene Risikofaktoren angewandt: (1) das Vorkommen von Scrapie-Ausbrüchen bei Hausschafen, (2) die Muffelwildstrecke pro km² als Indikator für die Größe des Muffelwildbestandes und (3) die Hausschafbestände pro km² zur Abschätzung der Schafdichte. Im Nachfolgenden werden kurz die jeweiligen Quellen der Daten erläutert.

Alle Daten bezüglich des Vorkommens von Scrapie bei Hausschafen wurden der Einzelfalldokumentation des Tierseuchennachrichtensystems (TSN) entnommen. Diese Tierseuchendatenbank erfasst alle Scrapie-Neuausbrüche mit Daten wie Bundesland, Kreis, Gemeinde, Tierart und Feststellungsdatum. Diese Daten wurden freundlicherweise vom Institut für Epidemiologie des Friedrich-Loeffler-Institutes zur Verfügung gestellt. Für die Risikogebieteinteilung wurden alle amtlich festgestellten Scrapie-Neuausbrüche im Zeitraum vom 01.01.2001 bis zum 31.12.2007 berücksichtigt.

Für den Muffelwildbestand in Deutschland auf Kreisebene gibt es keine detaillierten, verlässlichen Angaben, da keine flächendeckende Erfassung im Rahmen des Wildtier-Informationensystems der Länder Deutschlands (WILD) wie z. B. für Feldhase und Fuchs durchgeführt wird (Grauer et al. 2008). Daher wurden die Jagdstrecken des Jagdjahres 2005/06 auf Kreisebene als Anhaltspunkt für die Größe des Muffelwildvorkommens

verwendet. Die Streckendaten stammen von den Landesjagdbehörden sowie von Bundes- und Landesforsteinrichtungen (pers. Mitteilungen oder Jagdberichte). Sie umfassen alle erlegten Mufflons sowie Fallwild aus Privat-, Landes- und Bundesforst eines Jagdjahres (01. April bis 31. März des Folgejahres) unterteilt nach Geschlecht und Altersklassen. Da Landkreise, kreisfreie Städte und die Stadtstaaten sehr unterschiedliche räumliche Ausdehnung besitzen, wurden die Strecken als Dichten dargestellt, die auf die Fläche des jeweiligen Landkreises bezogen sind. Die Fläche der 438 Landkreise, kreisfreien Städte und Stadtstaaten beruht auf der Feststellung des Gebietsstands der Kreise zum 31.12.2005 des Statistischen Bundesamtes (Genesis-Online Datenbank, 2006). Nach dem 31.12.2005 durchgeführte Kreisreformen in Sachsen-Anhalt (2007) und Sachsen (2008) wurden in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Die Muffelwildstreckendichte des Jagdjahres 2005 / 06 wurde mit Hilfe des jeweiligen 0,9- und 0,1-Quantils der Häufigkeitsverteilung (Computerprogramm SPSS Version 13, Firma SPSS, Chicago) in drei Kategorien Hoch (H), Mittel (M) und Niedrig (N) unterteilt:

Hoch $\geq 0,10950$ Mufflons / km²

Mittel $> 0,00279 < 0,10950$ Mufflons / km²

Niedrig $\leq 0,00279$ Mufflons / km².

Diese Kategorieneinteilung wurde gewählt, um Gebiete mit einer deutlich über bzw. unter dem Durchschnitt liegenden Muffelwildstrecke zu identifizieren.

Die Daten zu den Schafbeständen stammen von den Statistischen Landesämtern überwiegend aus dem Jahr 2003, z. T. auch aus 2001 (Bremen), 2005 (Berlin) und 2006 (Sachsen). Sie sind den statistischen Berichten zu den Ergebnissen der Allgemeinen Agrarstrukturerhebung über die Viehhaltung der landwirtschaftlichen Betriebe entnommen. Stichtag für die Erhebung ist jeweils der 3. Mai. Um die Schafdichte zu ermitteln, wurde der Schafbestand durch die Fläche des Landkreises geteilt. Das 0,1-Quantil wurde als niedrige Dichte (N), das 0,9-Quantil als hohe Dichte (H) definiert. Daraus ergaben sich folgende Kategorien mit den dazugehörigen Grenzen:

Hoch $\geq 14,20950$ Schafe / km²

Mittel $> 2,00952 < 14,20950$ Schafe / km²

Niedrig $\leq 2,00952$ Schafe / km².

Anhand der Risikofaktoren (Aufreten von Scrapie, Muffelwildstreckendichte und Hausschafdichte) wurden vier Risikoklassen definiert (siehe Tabelle 3), wobei Klasse IV das höchste und Klasse I das niedrigste Risiko für ein Vorkommen von TSE bei Mufflons darstellt.

Tabelle 3: Einteilung aller Landkreise, kreisfreien Städte und Stadtstaaten in die Risikoklassen I-IV.

Risikoklasse	Scrapie	Muffelwildstrecke / km ²	Schafe / km ²	Anzahl der Gebiete
IV	Ja	H	H	0
III	Ja	H	M	7
	Ja	H	N	0
	Ja	M	H	4
	Ja	M	M	13
	Ja	M	N	1
II	Nein	H	H	0
	Nein	H	M	5
	Nein	H	N	1
I	Nein	M	H	9
	Nein	M	M	74
	Nein	M	N	3
	Nein	N	H	20
	Nein	N	M	159
	Nein	N	N	24
	Ja	N	H	6
	Ja	N	M	72
	Ja	N	N	1
k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	39
Summe				438

k. A.: keine Angaben; Kategorie H: Hoch, M: Mittel, N: Niedrig

Risikoklasse IV ist durch das Vorkommen von Scrapie bei Hausschafen, hohe Muffelwildstreckendichten und hohe Hausschafdichten definiert. Durch Scrapie-Fälle sind Prionen als Erreger in der Umwelt potentiell vorhanden und die hohen Tierdichten lassen die besten Übertragungsmöglichkeiten und höchsten Kontaktraten vermuten.

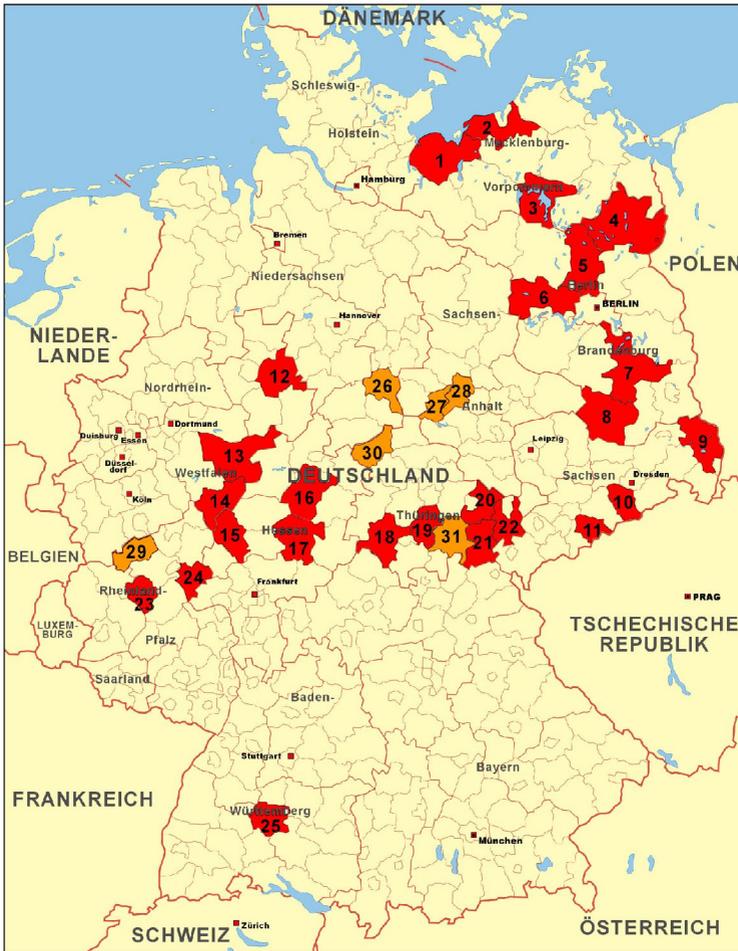
Risikoklasse III ist durch das Auftreten von Scrapie bei Hausschafen und hohe bis mittlere Muffelwildstreckendichten gekennzeichnet. Die niedrigeren Tierdichten im Vergleich zur Risikoklasse IV deuten auf potentiell geringere Kontaktraten und Übertragungsmöglichkeiten hin.

Risikoklasse II ist durch hohe Muffelwildstreckendichten ohne ein Vorkommen von Scrapie bei Hausschafen charakterisiert. Es ist anzunehmen, dass durch die hohe Mufflondichte dennoch ein erhöhtes Risiko besteht.

Risikoklasse I grenzt sich von den vorangegangenen Risikoklassen durch niedrige Muffelwildstreckendichten oder durch mittlere Muffelwildstreckendichten ohne ein Vorkommen von Scrapie bei Hausschafen ab. In dieser Klasse wird das Risiko aufgrund der geringen Übertragungsmöglichkeiten als niedrig eingestuft.

Alle 438 Landkreise, kreisfreien Städte und Stadtstaaten wurden in die Risikoklassen I-IV eingeordnet (Tabelle 3). Bei 39 Landkreisen bzw. kreisfreien Städten war eine Zuordnung aufgrund fehlender oder unzugänglicher Daten nicht möglich. Nur Gebietseinheiten mit einem erhöhten Risiko (Risikoklasse II-IV) wurden dem Studiendesign nach in die Untersuchung miteinbezogen, allerdings konnte keine Gebietseinheit der Risikoklasse IV zugeordnet werden. Gebietseinheiten der Risikoklasse I sollten im Screening nicht berücksichtigt werden, da die Wahrscheinlichkeit dort TSE bei Mufflons zu entdecken als gering eingeschätzt wurde. Zudem wäre eine systematische Beprobung in vielen Gebietseinheiten der Risikoklasse I aufgrund der zu geringen und unregelmäßigen Muffelwildstrecken sowie fehlender Muffelwildbewirtschaftung nicht möglich gewesen.

Die Risikogebietseinteilung wurde in Bezug auf die Scrapie-Ausbrüche laufend aktualisiert, so dass nach Feststellung neuer Scrapie-Fälle sieben Gebietseinheiten von Risikoklasse I in Risikoklasse III wanderten und in das Screening mit aufgenommen wurden. Alle Untersuchungsgebiete des Populationsscreenings sind in der Abbildung 8 dargestellt. Insgesamt wurden 31 Landkreise aus 10 Bundesländern beprobt.



1 Nordwestmecklenburg	12 Lippe	23 Cochem-Zell
2 Bad Doberan	13 Hochsauerlandkreis	24 Rhein-Lahn
3 Müritz	14 Siegen-Wittgenstein	25 Zollernalbkreis
4 Uckermark	15 Lahn-Dill-Kreis	26 Goslar
5 Oberhavel	16 Schwalm-Eder-Kreis	27 Quedlinburg
6 Havelland	17 Vogelsbergkreis	28 Aschersleben-
7 Dahme-Spreewald	18 SchmalkaldenMeiningen	29 Ahrweiler
8 Elbe-Elster	19 Ilm-Kreis	30 Eichsfeld
9 Niederschlesischer	20 Saale-Holzland-Kreis	31 Saalfeld-Rudolstadt
10 Weißeritzkreis	21 Saale-Orla-Kreis	
11 Mittlerer Erzgebirgskreis	22 Greiz	

Abbildung 8: Kartographische Übersicht der Untersuchungsgebiete (rot: RIII, orange: RII).

3.1.1.2 Untersuchungszeitraum

Der Zeitraum der Probensammlung erstreckte sich über die Jagdjahre 2006 / 07 und 2007 / 08, beginnend ab August 2006, jedoch abhängig von der Zustimmung der zuständigen Landesministerien und der gültigen Jagdzeiten für Muffelwild in den einzelnen Bundesländern. Nach der Verordnung über die Jagdzeiten (JagdzeitV 1977) darf Muffelwild grundsätzlich vom 01. August bis zum 31. Januar bejagt werden. Einige der beteiligten Bundesländer haben jedoch davon abweichende Regelungen (NJagdzeitVO 2001, RPJagdzeitLVO 1993, ThürJagdZVO 1999), die in Abbildung 9 dargestellt sind.

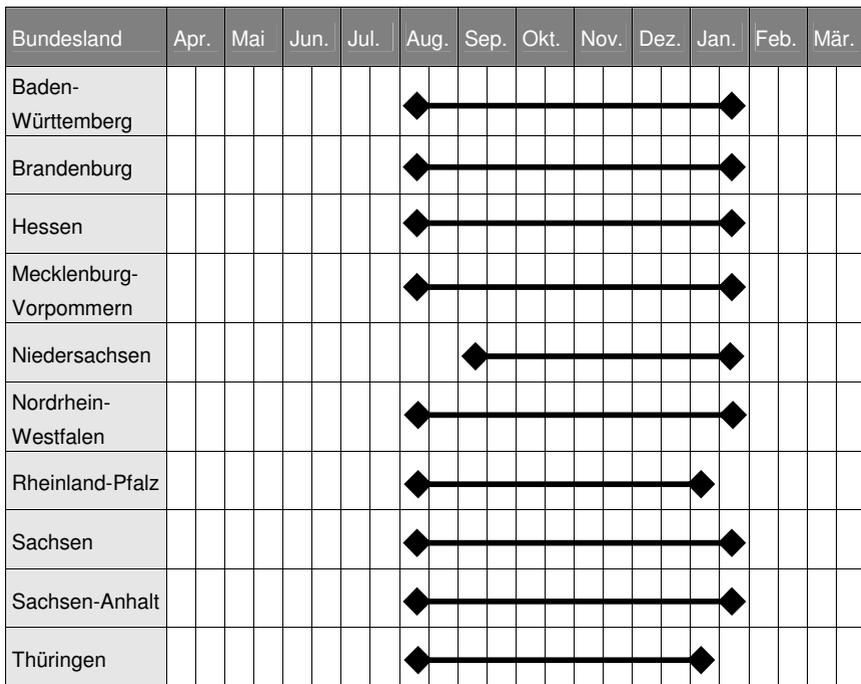


Abbildung 9: Jagdzeiten für Muffelwild während der Jagdjahre 2006 und 2007 in den beteiligten Bundesländern.

3.1.1.3 Probandatenerhebung

Zuerst wurden die für Jagd und Tierseuchen zuständigen Landesministerien über das Forschungsvorhaben informiert und um Unterstützung gebeten. Anschließend erfolgte eine Kontaktaufnahme mit der Bundesanstalt für Immobilien Sparte Bundesforst, den Landesforstanstalten, Jagdverbänden sowie den Unteren Jagdbehörden, um zu ermitteln, wer in den Untersuchungsgebieten an der Hege und Erlegung des Muffelwildes beteiligt ist. Alle Jagdausübungsberechtigten, Förster, Wildhändler und Präparatoren wurden dann sowohl schriftlich als auch telefonisch um ihre Mitwirkung gebeten. Auch Wildforschungsstellen und Landesuntersuchungsämter wurden um Unterstützung ersucht. An alle Kooperationspartner wurde Versandmaterial verschickt. Dieses bestand aus Styroporkisten und Probensets mit Tierkörpermarke, Plastikbeuteln und Probenbegleitschein mit jeweils identischer Nummer, um die Zuordnung zu gewährleisten. Mufflonschafshäupter wurden so i. d. R. per Kurierdienst an das IZW gesandt. Bei Widdern und auf großen Jagden erfolgte zumeist eine Beprobung vor Ort durch Mitarbeiter des Institutes. Als Aufwands- und Wildbretentschädigung wurden 15 Euro je Kopf gezahlt.

Mit Hilfe eines Probenbegleitscheines (Abbildung 10) wurden zu jedem beprobten Mufflon Informationen über Einsender, Ort der Erlegung bzw. Fundort, Zeitpunkt der Erlegung, Geschlecht, Alter und Herkunft des Tieres sowie Auffälligkeiten erfragt. Es wurden vier Altersklassen unterschieden: (1) 18 bis 24 Monate, (2) 25 bis 48 Monate, (3) 49 bis 72 Monate und (4) über 72 Monate. Anhand der Zahnaltersbestimmung (siehe 2.2.7) wurden die Altersangaben zu jedem Tier überprüft und ggf. berichtigt. Bei insgesamt 114 Mufflons (11 männlichen und 103 weiblichen) musste eine Korrektur der Zuordnung zu den Altersklassen erfolgen: in 57 Fällen um eine Altersklasse nach oben, in 38 Fällen um eine Altersklasse nach unten, in zehn Fällen um zwei Altersklassen nach oben und in neun Fällen um zwei Altersklassen nach unten. Nur Mufflons, die älter als 18 Monate waren, wurden in die Untersuchung miteinbezogen. Jeder Probenbegleitschein war durch eine einmalige Nummer gekennzeichnet. Diese diente der unverwechselbaren Identifikation der Proben.



Institut für Zoo- und Wildtierforschung
 Alfred-Kowalke-Str. 17, 10315 Berlin
 Fax: 030-5126104, Tel.: 030-51680
 Anke Wiethöller: Tel. 030-5168226

**STUDIE ÜBER TSE BEI MUFFLONS IN DEUTSCHLAND
 PROBENBEGLEITSCHIN**

PROBE NR. 824

Einsender: _____ **Datum:** _____

Name: _____

Strasse: _____

PLZ: _____ Ort: _____

Ort der Erlegung/ Fundort: _____

PLZ: _____ Ort: _____

Erlegungszeitpunkt: _____

ANGABEN ZUM TIER (ZUTREFFENDES BITTE ANKREUZEN):

Geschlecht: weiblich männlich

Alter: 18 – 24 Monate 2 – 4 jährig

4 – 6 jährig > 6 jährig

WEITERE ANGABEN ZUM TIER (ZUTREFFENDES BITTE ANKREUZEN):

freilebendes Wild erlegt Fallwild

Gehegewild Kraftfuttergabe ja nein

gesund krank

welche Krankheitsanzeichen: _____

Abbildung 10: Probenbegleitschein des Populationscreenings.

3.1.1.4 Untersuchungsmaterial

Zur Probenentnahme wurde das Haupt zunächst abgesetzt, d. h. vom restlichen Tierkörper getrennt. Dazu erfolgte von ventral aus eine Durchtrennung der Haut, Muskulatur und Halseingeweide entlang des Kieferwinkels auf den Ohrgrund zu. Unter starker Biegung des Hauptes nach kaudal konnten dann die Bänder und die Gelenkkapsel des Atlanto-occipitalgelenkes sowie das Rückenmark durchtrennt werden. Anschließend wurde das Haupt mit der ventralen Seite nach oben auf eine waagerechte Fläche gelegt und ein scharfer gebogener Entnahmelöffel durch das Foramen magnum entlang des Rückenmarks eingeführt. Durch Drehung um 180 ° nach rechts und links wurden dann der Hirnstamm sowie Anteile des Kleinhirns gelöst und vorsichtig durch das Foramen magnum entnommen. Diese Technik erfolgte in Anlehnung an die Empfehlungen der OIE (Matthews et al. 2008).

Die Lymphonodi retropharyngei mediales wurden unter Umgehung der Glandula mandibularis durch stumpfes Präparieren in die Tiefe zwischen den Zungen- und Schlundkopfmuskeln freigelegt und entnommen.

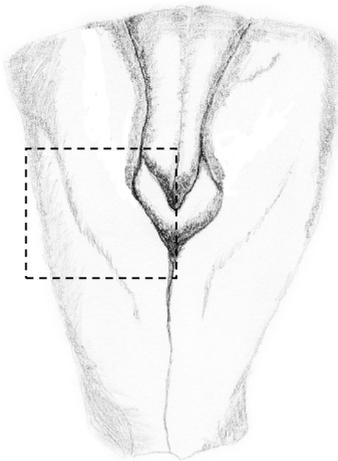


Abbildung 11: Medulla oblongata eines Mufflons, markiert ist das für den Schnelltest verwendete Gewebestück (Zeichnung: Ulf Rintisch).

Als Ausgangsmaterial für den Schnelltest dienten Anteile des Kleinhirns, ein retropharyngealer Lymphknoten sowie ein würfelförmiges Gewebestück unilateral aus der Obex-Region der Medulla oblongata das unter Schonung der Gegenseite mit einem Skalpell entnommen wurde (siehe Abbildung 11). Alle Gewebeproben wurden auslaufsicher in Schraubdeckeldosen verpackt und mit der Identifikationsnummer vom Probenbegleitschein beschriftet.

Alle eingehenden Häupter wurden am IZW bis zur Beprobung und anschließend bis zur Vorlage des Schnelltestresultates bei 4 °C gelagert und erst nach einem negativen Schnelltestergebnis entsorgt.

Die Gewebeproben für den Schnelltest wurden bei 4 °C gelagert und i. d. R. noch am gleichen Tag ins Labor (siehe 3.1.1.5) verbracht. Die Lagerung der restlichen Gewebeproben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

3.1.1.5 TSE-Schnelltest

Der TSE-Schnelltest wurde im Rahmen einer Kooperation von dem akkreditierten Labor des Berliner Institutes für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT, seit 01.01.2009 fusioniert mit dem Brandenburger Landeslabor zum Landeslabor Berlin-Brandenburg) durchgeführt. Es wurde der IDEXX HerdChek BSE – Scrapie Antigen Test Kit EIA[®] (Firma IDEXX, Maine) verwendet, zugelassen nach Anhang X Kapitel C Nr. 4 der VO (EG) 999/2001. Bei diesem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest bindet ein Polymer selektiv an PrP^{Sc}, welches dann durch monoklonale Antikörper, die auf konservierte Bereiche des Prionproteins gerichtet sind, detektiert wird. Die Antikörper sind konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, so dass nach Zugabe von Peroxidasesubstrat die Absorption der Proben bei 450 und 630 nm gemessen werden kann. Aus den Absorptionswerten (A_{450} - A_{630}) der Negativ- und Positivkontrollen wird der Mittelwert bestimmt. Der Test ist nur dann gültig, wenn der Mittelwert der Positivkontrollen $\geq 0,400$ und der Mittelwert der Negativkontrollen $< 0,150$ ist. Der Schwellenwert wird aus dem Mittelwert der Negativkontrollen plus 0,180 gebildet. Alle Proben, deren Werte unterhalb dieser Schwelle liegen, gelten als negativ.

Die Durchführung erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers. Alle drei Gewebeproben eines Tieres wurden separat getestet. Bei jedem Test wurden sowohl eine Negativ- wie auch eine Positivkontrolle im Doppelansatz mitgeführt. Je 0,25 - 0,3 g von Obex, Cerebellum und Lymphknoten wurden homogenisiert. Bei Obex und Cerebellum wurden je 120 µl Homogenat mit 30 µl Probenverdünner versetzt, bei Lymphknotenproben 100 µl Homogenat mit 50 µl Verdünner. Auf die Antigenbindungsplatte wurden anschließend 100 µl des verdünnten Homogenats aufgetragen und bei Raumtemperatur (RT) für 2-3 h stillstehend inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen zur Entfernung der Probe wurden je 100 µl Konditionierungspuffer dazugegeben und durch anschließendes dreimaliges Waschen wieder entfernt. Als nächstes erfolgte die Zugabe von 100 µl Konjugat und eine Inkubation

von 60-75 min bei RT. Überschüssiges Konjugat wurde in einem sich anschließenden Waschschrift entfernt, danach erfolgte die Zugabe von 100 μ l Substrat. Die Platte wurde abgedeckt und im Dunkeln für 15 min inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 100 μ l einmolarer Salzsäure abgestoppt (Farbumschlag von blau nach gelb) und im Anschluss die Absorption bei 450 und 630 nm photometrisch gemessen (A_{450} bzw. A_{630}).

Alle Proben mit reaktiven, d. h. fraglichen oder positiven Schnelltestergebnissen wurden zunächst wiederholt und anschließend mit Hilfe von Bestätigungstests nach Vorgaben der OIE (Matthews et al. 2008) im NRL untersucht.

3.1.1.6 Bestätigungstests

Alle weiterführenden Tests zur Bestätigung eines reaktiven Schnelltests wurden vom Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger des Friedrich-Loeffler-Institutes in seiner Eigenschaft als NRL für TSE durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die bei -20 °C gelagerten Gewebeprobe (eine Hälfte der Medulla oblongata, Anteile des Cerebellums und des Lymphonodus retropharyngeus medialis) unverzüglich zur Verfügung gestellt.

Es wurden zwei Tests angewandt, zum einen der SAF Immunoblot und zum anderen die immunhistochemische Untersuchung. Der SAF Immunoblot beruht auf einer Isolierung und Anreicherung der Scrapie-assoziierten Fibrillen aus frischem oder gefrorenem Gewebe, gefolgt von einem Western Blot (Buschmann et al. 2004b; Gretzschel et al. 2005; CRL TSE 2007). Bei der immunhistochemischen Untersuchung werden auf formalinfixiertes Gewebe Antikörper aufgebracht, um PrP^{Sc} bei der anschließenden histologischen Untersuchung sichtbar zu machen (Buschmann et al. 2004b; Gretzschel et al. 2005).

3.1.1.7 Angewandte statistische Verfahren

Die vorliegende Arbeit umfasst sowohl Aspekte der exploratorischen als auch der konfirmatorischen Datenanalyse. Zur statistischen Auswertung wurde das Computerprogramm SPSS 13 verwendet.

Mit Hilfe des Binomialtestes wurde untersucht, ob die empirische Verteilung der dichotomen Variable Geschlecht mit der Ausprägung männlich und weiblich signifikant von der Verteilung in der Auswahlpopulation abweicht. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgesetzt.

Mittels des Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten (r_s) wurde der Zusammenhang von Muffelwildstreckendichte und Hausschafsdichte analysiert. Dabei nimmt r_s immer einen Wert zwischen -1 und +1 ein ($-1 \leq r_s \leq +1$). Bei $r_s = +1$ besteht ein monotoner positiver Zusammenhang, bei $r_s = -1$ ein negativer und bei $r_s = 0$ kein monotoner Zusammenhang.

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze des durchgeführten Screenings wurde nach Cannon und Roe (1982) d, die Anzahl der erkrankten Tiere, die in der Population enthalten sein könnten geschätzt. Die Schätzung nutzt die hypergeometrische Verteilung mit einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95 % nach folgender Formel:

$$d = \left(1 - \beta^{\frac{1}{n}} \right) \times \left(N - \frac{n-1}{2} \right)$$

mit n: Stichprobenanzahl, N: Umfang der untersuchten Population und β wurde auf 0,05 gesetzt. Die gewählte Sicherheitswahrscheinlichkeit entspricht den Vorgaben der EU (VO (EG) 999/2001) und den Empfehlungen der OIE (OIE 2008b). Mit Hilfe von d kann die Prävalenz bestimmt werden, bei der mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit mindestens ein untersuchtes Mufflon aus der Stichprobe hätte positiv sein müssen (Minimumprävalenzlevel, MPL).

$$MPL = \frac{d \times 100}{N}$$

Zunächst wurde die Stichprobenanzahl der Auswahlpopulation (Kreienbrock und Schach 2005), d. h. allen während des Untersuchungszeitraumes in den Untersuchungsgebieten erlegten oder tot aufgefundenen Mufflons, die über 18 Monate alt waren, gegenübergestellt. Zur Quantifizierung der Auswahlpopulation wurden die Jagdstrecken inklusive Fallwild der Jagdjahre 2006 / 07 und 2007 / 08 der Landkreise, kreisfreien Städte und Stadtstaaten aufgeteilt auf die einzelnen Altersklassen erfragt. Anschließend konnte anhand dessen für jede Gebietseinheit die Anzahl aller über 18 Monate alten, erlegten und verendeten Mufflons während des Untersuchungszeitraumes bestimmt werden. Alle Gebietseinheiten einer Risikoklasse wurden zu einer Auswahlpopulation zusammengefasst, da das Risiko innerhalb einer Klasse als einheitlich angesehen und jeweils die gleichen Kriterien bei der Einteilung angewandt wurden (siehe 3.1.1.1).

Im Anschluss wurde die Population von adulten Mufflons in den Risikogebietseinheiten während des Untersuchungszeitraumes (Zielpopulation) geschätzt und das Minimumprävalenzlevel für diese Zielpopulation ermittelt. Die Schätzung der Zielpopulation wurde dadurch ermöglicht, dass Muffelwildpopulationen in Deutschland systematisch bewirtschaftet (siehe 2.2.9) und i. d. R. konstant gehalten werden. Daher ist der Abschuss dem Zuwachs gleichzusetzen. Der Abschuss wiederum wird in der Jagdstatistik durch die Jagdstrecke ohne Fallwild wiedergegeben.

Im Einklang mit der Literatur (siehe 2.2.6) wurde in der hier vorliegenden Arbeit von einem Zuwachs von durchschnittlich 35 % zur adulten Population ausgegangen. Bei allen

Untersuchungsgebieten, die zwei Jagdsaisons lang beprobt wurden, wurde daher zur Schätzung der Zielpopulation der Abschluss des Jagdjahres 2006 verwendet, sowie der Zuwachs eines Jahres zur geschätzten adulten Population addiert. Für Gebiete, die nur im Jagdjahr 2007 beprobt wurden, wurde die Strecke dieses Jagdjahres zu Grunde gelegt.

Ferner wurde eine Sensitivitätsanalyse mit MPL als Zielvariable und N als Einflussvariable durchgeführt. Dazu wurde N variiert und die Differenz von N der Differenzänderung des Minimumprävalenzlevels gegenüber gestellt.

Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind in Kapitel 3.1.2.4 dargestellt und werden in den Kapiteln 3.1.3 und 4 diskutiert.

3.1.2 Ergebnisse des Populationsscreenings

In diesem Abschnitt wird zunächst die Zusammensetzung der Stichproben erläutert und anschließend sowohl der Auswahl- als auch der Zielpopulation gegenübergestellt. Aus Datenschutzgründen wird die genaue Herkunft der einzelnen Proben nicht aufgeführt. Alle Proben werden nur mit der Tieridentifikationsnummer benannt.

3.1.2.1 Zusammensetzung der untersuchten Tiere

Von August 2006 bis Oktober 2008 wurden 823 Mufflons aus 38 Landkreisen und einem Stadtstaat untersucht, davon 324 Mufflons im Jagdjahr 2006, 496 Mufflons im Jagdjahr 2007 und 3 Mufflons im Jagdjahr 2008. Der Hauptteil der Proben wurde während der Jagdsaisons gesammelt; außerhalb der Saisons fielen durch Ausnahmeabschlussgenehmigungen und Fallwild Proben von insgesamt 11 Tieren an.

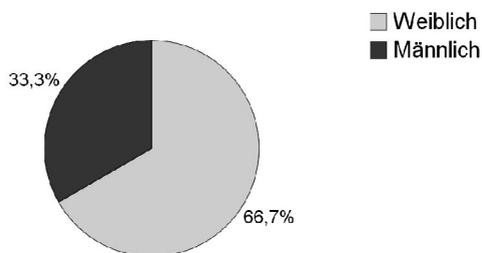


Abbildung 12: Geschlechterverhältnis der untersuchten Mufflons (n = 823).

Das Geschlechterverhältnis der untersuchten Mufflons ist graphisch in Abbildung 12 dargestellt. Insgesamt waren 67 % (n = 549) der Tiere weiblich und 33 % (n = 274) männlich. In der Auswahlpopulation dagegen waren 54 % der Mufflons weiblich und 46 % männlich. Um zu untersuchen, ob weibliche Tiere in der Stichprobe im Vergleich zur

Auswahlpopulation überrepräsentiert sind, wurde der Binomialtest angewandt. Geprüft wurde die Vorhersage, dass der Anteil der weiblichen Mufflons in der Stichprobe dem Anteil in der Auswahlpopulation entspricht und Unterschiede rein zufällig bedingt sind. Der p-Wert, d. h. die Wahrscheinlichkeit den empirischen Wert der Stichprobe (67 %) unter Berücksichtigung des erwarteten Wertes (54 %) zu erhalten, ging gegen null und lag damit unterhalb des festgelegten Signifikanzniveaus von 0,05. Somit ist der Anteil der weiblichen Mufflons in der Stichprobe signifikant höher als in der Auswahlpopulation (Binomialtest, $n = 823$, $p = 0,000$).

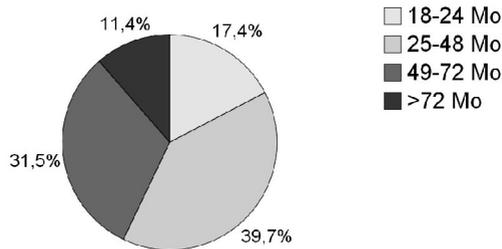


Abbildung 13: Altersverteilung der untersuchten Mufflons ($n = 823$).

Die Altersverteilung innerhalb der Stichprobe ist in Abbildung 13 dargestellt. 143 Mufflons stammten aus der Altersklasse 18 bis 24 Monate, 327 Mufflons aus der Altersklasse 25 bis 48 Monate, 259 Mufflons aus der Altersklasse 49 bis 72 Monate und 94 Mufflons waren über 72 Monate alt. In jeder Altersklasse überwog der Anteil von weiblichen Tieren wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist.

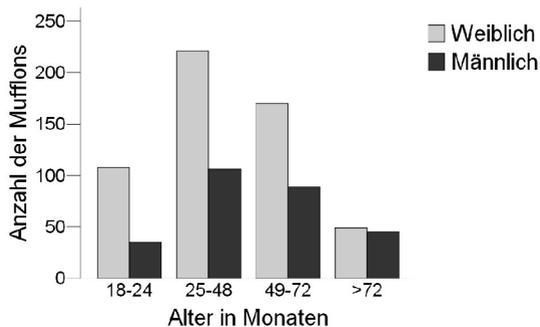


Abbildung 14: Geschlechterverteilung in den beprobten Altersklassen ($n = 823$).

Ein Mufflon stammte aus einer zoologischen Einrichtung, die anderen 822 Mufflons waren frei lebend. Von diesen wurden 810 erlegt, 12 Tiere waren Fallwild, d. h. sie kamen ohne jagdliche Einwirkung zu Tode, darunter 6 Verkehrsunfälle.

Bei 42 Mufflons wurden durch den Einsender auf dem Probenbegleitschein folgende pathologischen Veränderungen und Symptome vermerkt: Klauenerkrankungen oder Klauenprobleme ($n = 20$), Verletzungen bzw. Brüche an den Gliedmaßen ($n = 8$), Abmagerung ($n = 6$), Störung des zentralen Nervensystems ($n = 5$) und Einwachsen der Hörner im Hals-Kopf-Bereich ($n = 3$). Bei zwei Tieren konnte am IZW mikroskopisch ein Befall mit Haarbalgmilben (vermutlich *Demodex ovis*) im Zwischenklauenspalt festgestellt werden. Ansonsten war eine genauere Anamnese, Untersuchung oder Verifizierung nicht möglich, da i. d. R. nur der Kopf zur Probenentnahme vorlag.

3.1.2.2 TSE-Schnelltest

Von den 823 untersuchten Mufflons konnten insgesamt 2.453 Gewebeproben genommen werden. Bedingt durch Autolyse, Kopfschüsse oder besondere Präparationswünsche war es nicht immer möglich, das Probentriplett von jedem Tier zu erhalten. Daher gelangten insgesamt 822 Obex-, 820 Cerebellum- und 811 Lymphknotenproben zur Einsendung an das ILAT und wurden dort mittels IDEXX Herdchek Scrapie EIA auf PrP^{Sc} untersucht.

Zwei der 2.453 untersuchten Gewebeproben waren reaktiv, d. h. ihr Absorptionswert lag geringfügig über dem Schwellenwert. Der initiale Absorptionswert der Obex-Probe Nr. 1275 betrug 0,289 bei einem Schwellenwert von 0,219. Die Wiederholung ergab einen Wert von 0,322 bzw. 0,251 (Schwellenwert = 0,186). Diese Probe stammte von einem 4-6 jährigen Widder aus Sachsen-Anhalt, der ohne besondere Auffälligkeiten erlegt worden war. Ferner waren sowohl Cerebellum als auch der retropharyngeale Lymphknoten des gleichen Tieres unauffällig im Schnelltest (Absorptionswert Cerebellum = 0,072; Lymphknoten = 0,045). Bei einem 18-24 Monate alten Schaf aus Mecklenburg-Vorpommern (Nr. 938) betrug der Absorptionswert der Lymphknotenprobe initial 0,481 (Schwellenwert = 0,229) und bei der Wiederholung 0,587 (Schwellenwert = 0,209). Auch bei diesem Tier lagen keine klinischen Auffälligkeiten vor und die Proben von Obex und Cerebellum waren im Schnelltest negativ (Absorptionswert Obex = 0,050; Cerebellum = 0,042). Alle durchgeführten Läufe waren gültig, da die Mittelwerte der Positivkontrollen immer bei $\geq 0,400$ und alle Mittelwerte der Negativkontrollen bei $< 0,150$ lagen (siehe 3.1.1.5). Daher wurden beide Proben und damit die Mufflons 1275 und 938 als Scrapie-Verdachtsfälle eingestuft.

Bei allen anderen 2.451 Gewebeproben lag der Absorptionswert der Gewebeproben deutlich unter dem Schwellenwert, so dass alle übrigen 821 Mufflons als TSE-negativ eingestuft wurden.

3.1.2.3 Bestätigungstests

Durch das Nationale Referenzzentrum für Transmissible Spongiforme Enzephalopathien wurden die Proben der Mufflons 1275 und 938 mittels SAF Immunoblot und Immunhistochemie untersucht (siehe 3.1.1.6). Beide Tests waren bei allen Gewebeproben der beiden Tiere negativ. Es konnte kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Somit konnten die Scrapie-Verdachtsfälle nach den Ergebnissen des Schnelltestes nicht bestätigt werden. Alle 823 untersuchten Mufflons waren demnach PrP^{Sc}-negativ.

Tabelle 4 stellt die Fehlklassifikation des Schnelltestes dar. Daraus lässt sich eine Spezifität von 99,92 % für den Schnelltest ableiten. Zur Sensitivität können keine Angaben gemacht werden, da mufflonpezifisches Positivmaterial nicht verfügbar war.

Tabelle 4: Fehlklassifikation des TSE-Schnelltestes.

Schnelltestergebnis	Weiterführende Testergebnisse	
	Positiv	Negativ
Reaktiv	0	2
Negativ	nicht untersucht	2.451

3.1.2.4 Statistische Analyse

Um mögliche systematische Zusammenhänge zwischen den Parametern für die Klassifizierung von Risikogebietseinheiten zu erkennen, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman angewandt. Damit wurden die Muffelwildstreckendichte und die Hausschafdichte zum einen für alle Landkreise, kreisfreien Städte und Stadtstaaten und zum anderen für die Untersuchungsgebietseinheiten (RII-RIII) analysiert.

Für alle Kreise (n = 399) betrug der Koeffizient $r_s = 0,090$. Bei den Untersuchungsgebietseinheiten (n = 31) lag der Koeffizient bei $r_s = -0,098$. Wie auch die Streudiagramme der Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen, lässt sich kein Zusammenhang zwischen der Muffelwildstreckendichte und der Schafdichte feststellen.

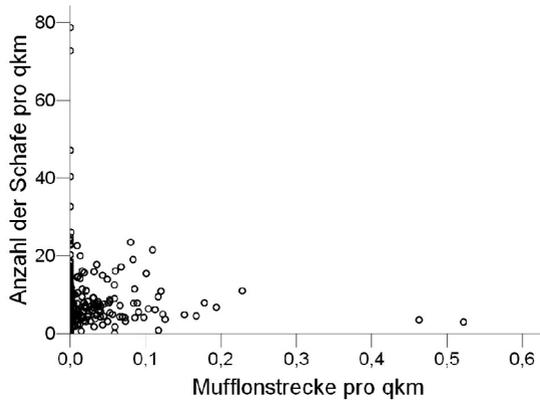


Abbildung 15: Streudiagramm mit den Merkmalen Hausschafdicthe und Muffelwildstrecken- dicthe für alle Kreise (n = 399).

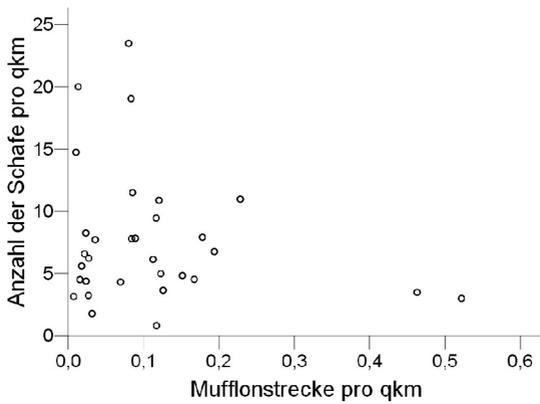


Abbildung 16: Streudiagramm mit den Merkmalen Hausschafdicthe und Muffelwildstrecken- dicthe für die Untersuchungsgebietseinheiten (n = 31).

Im Folgenden sollen die Nachweisgrenzen des Screenings dargestellt werden. Dazu wurde zuerst die Studienpopulation betrachtet und dann der Auswahl- und Zielpopulation (siehe 3.1.1.7) gegenübergestellt.

Alle zwischen August 2006 und Oktober 2008 auf TSE untersuchten Mufflons ($n = 823$) waren negativ, die Prävalenz in der Studienpopulation (P_S) betrug somit null ($P_S = 0$). Um Rückschlüsse auf die Auswahlpopulation ziehen zu können, mussten die untersuchten Mufflons den einzelnen Risikoklassen zugeordnet werden. Wie Abbildung 17 zeigt, stammten aus den Untersuchungsgebieten der Risikoklasse III 510 Tiere (62 %) und aus Gebietseinheiten der Klasse II 238 Tiere (29 %). Aus der Risikoklasse I wurden 71 Mufflons (9 %) untersucht. Von der Zuordnung mussten ferner aus unterschiedlichen Gründen vier Tiere ausgenommen werden. Drei der untersuchten Mufflons wurden erst im Jagdjahr 2008 / 09 und damit außerhalb des Untersuchungszeitraumes erlegt. Ein Mufflon stammte aus einer zoologischen Einrichtung und konnte daher nicht mit frei lebenden Tieren verglichen werden.

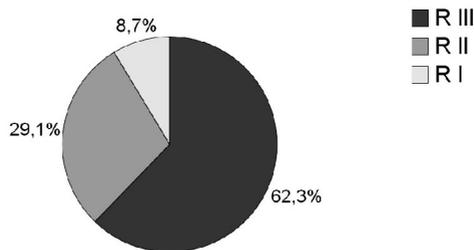


Abbildung 17: Aufteilung der untersuchten Mufflons auf die Risikoklassen ($n = 819$).

Die Auswahlpopulationen wurden anhand der Jagdstrecken ermittelt (siehe 3.1.1.7). In Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 sind die Untersuchungsgebiete mit Stichprobenumfang und Größe der Auswahlpopulation nach Risikoklassen getrennt dargestellt. Da die Risikogebietseinteilung aktualisiert wurde und neue Untersuchungsgebiete hinzukamen, erstreckte sich der Untersuchungszeitraum z. T. nur auf das Jagdjahr 2007 / 08. Solche Gebiete sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Tabelle 5: Stichprobenanzahl, Größe der Auswahl- und Zielpopulation von Untersuchungsgebieten der Risikoklasse III.

Landkreis	Risikoklasse	n Probenanzahl	N Auswahlpopulation	N Zielpopulation
Bad Doberan	III	9	31	96
Cochem-Zell	III	25	282	930
Dahme-Spreewald*	III	17	33	103
Elbe-Elster	III	61	184	683
Greiz	III	25	123	282
Havelland	III	56	67	162
Hochsauerlandkreis	III	29	196	652
Ilm-Kreis	III	42	103	301
Lahn-Dill-Kreis	III	10	15	39
Lippe	III	6	9	23
Mittlerer Erzgebirgskreis*	III	28	83	426
Müritz	III	6	25	42
Niederschlesischer Oberlausitzkreis	III	43	220	613
Nordwestmecklenburg*	III	4	23	77
Oberhavel*	III	7	65	246
Rhein-Lahn-Kreis	III	19	159	355
Saale-Holzland-Kreis	III	24	126	370
Saale-Orla-Kreis	III	13	194	478
Siegen-Wittgenstein*	III	30	88	380
Schmalkalden- Meiningen*	III	6	31	143
Schwalm-Eder-Kreis*	III	6	27	111
Uckermark	III	19	97	336
Vogelsbergkreis*	III	7	14	57
Weißeritzkreis	III	13	38	73
Zollernalbkreis	III	5	12	35
Gesamt	III	510	2.245	7.013

n: Stichprobenanzahl entsprechend der Formel zur Schätzung der Anzahl der erkrankten Tiere; N: Größe der Population entsprechend der Formel zur Schätzung der Anzahl der erkrankten Tiere; *: Gebiete wurden nur im Jagdjahr 2007 / 08 beprobt

Tabelle 6: Stichprobenanzahl, Größe der Auswahl- und Zielpopulation von Untersuchungsgebieten der Risikoklasse II.

Landkreis	Risikoklasse	n Probenanzahl	N Auswahlpopulation	N Zielpopulation
Ahrweiler	II	11	155	432
Aschersleben- Staßfurt	II	9	29	135
Eichsfeld*	II	37	61	289
Saalfeld-Rudolstadt	II	47	348	852
Quedlinburg	II	123	332	937
Goslar*	II	11	38	149
Gesamt	II	238	963	2.794

n: Stichprobenanzahl entsprechend der Formel zur Schätzung der Anzahl der erkrankten Tiere; N: Größe der Population entsprechend der Formel zur Schätzung der Anzahl der erkrankten Tiere; *: Gebiete wurden nur im Jagdjahr 2007 / 08 beprobt

Tabelle 7: Stichprobenanzahl, Größe der Auswahl- und Zielpopulation von Probengebieten der Risikoklasse I sowie allen Gebieten dieser Risikoklasse.

Landkreis	Risikoklasse	n Probenanzahl	N Auswahlpopulation	N Zielpopulation
Altmarkkreis Salzwedel	I	36	269	660
Gütersloh	I	13	13	19
Marburg-Biedenkopf	I	9	75	193
Nordvorpommern	I	1	7	27
Oberbergischer Kreis	I	1	31	35
Parchim	I	3	11	31
Region Hannover	I	8	23	35
Summe		73	429	1.000
Gesamt	I	73	4.238	16.347

n: Stichprobenanzahl entsprechend der Formel zur Schätzung der Anzahl der erkrankten Tiere; N: Größe der Population entsprechend der Formel zur Schätzung der Anzahl der erkrankten Tiere

Tabelle 8 enthält die Schätzungen für die Anzahl der kranken Tiere (d) und die Minimumprävalenzlevel (MPL) in der Auswahlpopulation. Dabei ist davon auszugehen, dass die wahren TSE-Prävalenzen in den Auswahlpopulationen geringer als die ermittelten Minimumprävalenzlevel sind, da ansonsten mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit mindestens ein Mufflon im Screening positiv gewesen wäre.

Das Minimumprävalenzlevel ist abhängig von der Stichprobenanzahl (n) und der Größe der untersuchten Population (N). Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen die Minimumprävalenzlevel in Abhängigkeit des beprobten Anteils der Auswahlpopulation für die Risikoklasse III ($N_A = 2245$) und Risikoklasse II ($N_A = 963$). So läge z. B. das $MPL_{A_{RIII}}$ bei 0,08 %, wenn 90 % dieser Auswahlpopulation beprobt worden wäre. Wenn dagegen 90 % der Auswahlpopulation der Risikoklasse II beprobt worden wären, läge das erreichte $MPL_{A_{RII}}$ bei 0,19 %. Dies zeigt, dass selbst mit hohen beprobten Anteilen der Auswahlpopulation das MPL sich nicht beliebig senken lässt.

Um eine Aussagen über die Zielpopulation treffen zu können, musste diese zuerst geschätzt werden. Dabei wurde davon ausgegangen, dass der Abschuss eines Jagdjahres den Zuwachs widerspiegelt. Der Zuwachs wurde auf 35 % der adulten Population geschätzt (siehe 3.1.1.7). Die Zielpopulationen sind Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 zu entnehmen. In Tabelle 8 sind die Schätzungen von d und des MPL für die Zielpopulation aufgeführt.

Aus dieser Schätzung lässt sich ablesen, dass in den Risikogebieten der Klasse III die TSE-Prävalenz für adulte Mufflons im Untersuchungszeitraum mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit unter 0,56 % lag. In Gebieten der Klasse II lag die Prävalenz mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % unter 1,2 %. Für Gebiete der Risikoklasse I kann von einer Prävalenz von unter 4,12 % ausgegangen werden.

Tabelle 8: Stichprobenanzahl (n), Populationsgrößen (N), Anzahl der kranken Tiere (d) und Minimumprävalenzlevel (MPL) bezogen auf die verschiedenen Populationen.

Population	n	N	d	MPL in %
Studienpopulation	823	823	0	0
Auswahlpopulation RIII	510	2.245	11,66	0,519
RII	238	963	10,56	1,097
RI	71	4.238	173,65	4,097
Zielpopulation RIII	510	7.013	39,58	0,564
RII	238	2.794	33,47	1,198
RI	71	16.347	673,94	4,122

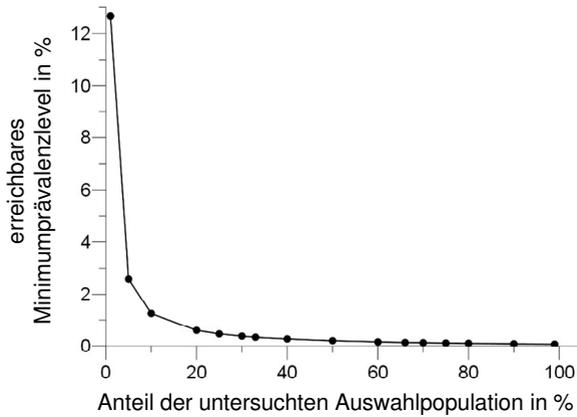


Abbildung 18: Erreichbares Minimumprävalenzlevel in Abhängigkeit des beprobten Anteils der Auswahlpopulation der Risikoklasse III.

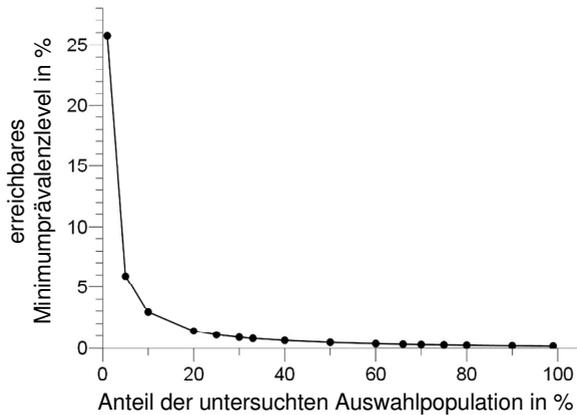


Abbildung 19: Erreichbares Minimumprävalenzlevel in Abhängigkeit des beprobten Anteils der Auswahlpopulation der Risikoklasse II.

Die durchgeführte Sensitivitätsanalyse mit Variation der Größe der untersuchten Population (N) ergab, dass eine Änderung von N um 1 % zu einer Änderung des MPL um 0,01-0,04 % führt. Das MPL ist daher nicht für N empfindlich; die Größe der untersuchten Population hat einen sehr geringen Einfluss.

3.1.3 Diskussion des Populationscreenings

3.1.3.1 Risikogebietseinteilung

Bei der Planung der Untersuchungen wurde die mögliche Prävalenz für TSE bei Mufflons als gering eingeschätzt. Daher sollten im Rahmen des Screenings Mufflons nicht flächendeckend in ganz Deutschland, sondern gezielt in Risikogebieten beprobt werden. Durch diese Beprobung konnten alle Anstrengungen auf sorgfältig ausgewählte Untersuchungsgebiete konzentriert und so aus allen Gebietseinheiten mit erhöhtem Risiko Proben gesammelt werden.

Die Risikogebietseinteilung stützte sich auf verschiedene Übertragungshypothesen von TSE auf frei lebende Mufflons: zum einen durch direkten und indirektem Kontakt zu infizierten Hausschafen und zum anderen durch direkten oder indirekten Kontakt zu anderen, infizierten Mufflons. Ausgehend davon wurden Faktoren identifiziert, die die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass TSE bei Mufflons auftritt. Dazu gehören das Vorkommen des Erregers in dem entsprechenden Gebiet sowie hohe Tierdichten, von welchen sich potentiell hohe intra- und interspezifische Kontaktraten ableiten lassen. Die gewählten Kriterien der Risikoeinteilung (Scrapie-Neuaustrüche, Muffelwildstreckendichte und Schafsdichte) entsprechen diesen risikoe erhöhenden Faktoren.

Die Daten dieser Parameter stammten aus sehr unterschiedlichen Quellen. So lagen Daten zum Vorkommen von Scrapie bei Hausschafen in Deutschland auf Kreisebene zunächst nicht vor. In den jährlichen Berichten der EU zu BSE und Scrapie (EU Food Safety 2009) finden sich nur Angaben für Deutschland insgesamt. Das BMELV veröffentlicht nur Zahlen für Bundesländer (BMELV 2009). Auf Nachfrage wurde an die einzelnen Landesministerien verwiesen. Schriftliche Anfragen an alle Landesministerien sowie an das NRL für TSE erbrachten nicht die gewünschten Daten. Aufgrund der Unterstützung durch das Institut für Epidemiologie des Friedrich-Loeffler-Institutes konnte schließlich auf zuvor anonymisierte Daten des Tierseuchennachrichtensystems zugegriffen werden. In dieser Datenbank werden jedoch nur Primärfälle verzeichnet. Diese sind nicht gleichzusetzen mit der Anzahl von erkrankten Tieren, da ein Neuaustruch mehrere Tiere umfassen kann oder neu erkrankte Tiere einem alten Ausbruch epidemiologisch zugeordnet werden können und dann nicht als TSN-Eintrag erfasst werden. Daher fand die Anzahl der Neuaustrüche pro Landkreis keine Berücksichtigung bei der Risikoeinteilung. Es besteht dadurch die Möglichkeit, dass nicht alle Gebietseinheiten mit Scrapie-Vorkommen bei Hausschafen in der Risikogebietseinteilung erfasst und Fokuse verpasst wurden. Insgesamt war festzustellen, dass eine vollständige Übersicht aller Scrapie-Fälle in Deutschland schlichtweg fehlt und keine offiziellen Daten vorliegen.

Einzelne Personen oder Hegegemeinschaften besitzen zwar durch jahrelange Erfahrung einen guten Überblick über ihren Wildbestand vor Ort, aber es existieren in Deutschland keine

durch direkte oder indirekte Wildzählung ermittelten detaillierten Daten zum Muffelwildbestand auf Gemeinde- oder Kreisebene. Daher wurde zur Risikogebietseinteilung auf die Muffelwildstrecken zurückgegriffen. Das bietet zwei Vorteile: erstens wird der Abschuss geplant, repräsentiert den Zuwachs der Population und erlaubt dadurch Rückschlüsse auf die Populationsgröße; zweitens lässt sich die Entwicklung der Jagdstrecken über die Jahre hinweg beobachten, da die Streckenmeldungen jährlich von den Unteren Jagdbehörden aus den einzelnen Meldungen der Jagdausübungsberechtigten zusammengetragen werden. Einzelheiten werden durch die Landesjagdgesetze der Bundesländer geregelt. Danach müssen die Jagdausübungsberechtigten eigenverantwortlich eine aktuelle Abschussliste inklusive Fallwild führen und an die Behörde nach Wildart, Geschlecht und Altersklassen getrennt melden. In den meisten Bundesländern erfolgt diese Meldung jeweils nach Abschluss eines Jagdjahres. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Streckenmeldungen in Bezug auf die Anzahl der Mufflons von der Wirklichkeit abweichen. Ursachen dafür könnten in einer fehlerhaften Abschussliste, Zahlendrehern oder Verwechslungen beim Übertragen und Zusammenfassen liegen. Bei den eigenen Erhebungen der Jagdstrecken 2007 auf Kreisebene (siehe Anhang 8.1) wurden in sechs Bundesländern Abweichungen von 1 bis 59 Tieren im Vergleich zu den Angaben der Unteren Jagdbehörden festgestellt, die sich auf solche Versehen zurückführen ließen. Der Vorteil bei der Streckenermittlung beim Muffelwild im Vergleich beispielsweise zum Schwarzwild besteht jedoch darin, dass es in den meisten Revieren etwas Besonderes darstellt und zahlenmäßig nicht so stark vertreten ist. So handelt es sich bei den Abschussangaben der einzelnen Kreise um den Zahlenbereich 1-300, der sich wesentlich besser nachvollziehen lässt als Abschlüsse im vierstelligen Bereich.

Die Daten zu den Hausschafbeständen stammen von den Statistischen Landesämtern aus Jahren, in denen eine Totalerhebung durchgeführt wurde. Diese Totalerhebung ist eine Befragung aller Betriebsleiter, deren Betriebe eine bestimmte Größe (z. B. > 2 ha landwirtschaftlich genutzte Fläche oder > 20 Schafe) überschreiten. Dabei gilt das Betriebsbesitzprinzip, welches besagt, dass der gesamte Besitz immer unter der Adresse des Hauptbetriebes erfasst wird, selbst wenn die Tiere dort nicht gehalten werden. Ferner werden nach dem Geheimhaltungsprinzip keine Zahlen veröffentlicht, wenn daraus Rückschlüsse auf einzelne Betriebe gezogen werden könnten. Daher sind die Daten nur als Größenordnung und nicht als genaue absolute Bestände zu verstehen. Inwiefern diese Bestandsdaten von der Realität abweichen, lässt sich nicht quantifizieren. Genauere Daten müssten den Tierseuchenkassen vorliegen, da bei diesen jeder Schafhalter zur Meldung und Beitragszahlung für seine Tiere je nach Standort verpflichtet ist. Allerdings sind diese Daten nicht öffentlich zugänglich.

Um die Flächenunterschiede zwischen kreisfreien Städten und Landkreisen zu berücksichtigen, wurden die Hausschafbestände und die Muffelwildstrecken als Dichte mit

der Einheit km² dargestellt. Unabhängig davon wären auch bei Verwendung der absoluten Zahlen alle Untersuchungsgebiete Bestandteil des Screenings gewesen.

Bei der Planung des Screenings wurden zur Risikogebietseinteilung Landkreise, kreisfreie Städte und Stadtstaaten als kleinste Ebene herangezogen. Viele Landkreise jedoch sind flächenmäßig sehr groß, wie der Landkreis Uckermark mit 3.058 km² als der flächenmäßig größte Landkreis Deutschlands gut verdeutlicht. Somit ist innerhalb der Landkreise nicht immer eine Überschneidung der Lebensräume von Mufflons und Schafen oder eine geographische Nähe zum Scrapie-Ausbruch gegeben. Darüber hinaus orientiert sich die hier gewählte administrative Einteilung nicht an Habitaten oder einzelnen Populationen. Erfahrungen mit CWD in Nordamerika zeigen, dass die Ausbreitung von TSE bei Wildtieren durchaus von der Landschaftscharakteristik, natürlichen Barrieren, räumlicher Trennung der einzelnen Populationen und der Habitatnutzung abhängig ist (Blanchong et al. 2008). Daher wäre eine feinere Unterteilung wie z. B. auf Ebene der Gemeinden oder einzelner Mufflonpopulationen erstrebenswert gewesen.

Die dafür benötigten Jagdstrecken- und Hausschafbestandsdaten werden nur mit Bezug zu administrativen Grenzen erhoben, so verteilt sich die Jagdstrecke einiger Muffelwildvorkommen auf mehrere Landkreise und kann nur bedingt auf das einzelne Muffelwildeinstandsgebiet heruntergebrochen werden. Auf Gemeindeebene wiederum waren keine Daten zu den Muffelwildstrecken und Hausschafbeständen erhältlich, da diese generell nur auf Kreisebene erhoben werden. Daher konnte zur Risikogebietseinteilung nur die administrative Einteilung in Kreise, kreisfreien Städte und Stadtstaaten herangezogen werden.

Wünschenswert wäre zweifelsohne eine Analyse auf Basis einzelner Weiden gewesen. Das hätte die Identifizierung von Hotspots ermöglicht, also von Orten, an denen ein indirekter oder sogar ein direkter Kontakt zwischen einem an Scrapie erkrankten Hausschaf und Mufflons denkbar ist. Eine Grundvoraussetzung dafür stellt die Kenntnis einzelner Muffelwildpopulationen und ihre räumliche Ausdehnung unter Beachtung natürlicher und anthropogener Grenzen wie z. B. Flüsse, Autobahnen und Bahnlinien dar. Diese Charakterisierung lässt sich durch eine Zusammenarbeit mit Jagdbehörden und Jagdübungsberechtigten vor Ort bewerkstelligen. Eine weitere Voraussetzung ist eine vollständige Übersicht aller Scrapie-Fälle bei Hausschafen mit geographischen Standortangaben zum erkrankten Tier inklusive Haltungsform und ggf. dem letzten Ablammort. Fruchtwasser und Plazenta stellen die Hauptinfektionsquellen dar (Pattison et al. 1972; Pattison et al. 1974) und Prionen können in der Umwelt offensichtlich jahrelang infektiös bleiben (Georgsson et al. 2006). Weiterhin sind der Scrapie-Typ, die Anzahl der erkrankten Schafe in der Herde und die Genotypen der erkrankten Tiere von Interesse. Anhand dieser Angaben könnte jeder Scrapie-Fall auf Überschneidungen mit Mufflonhabitaten untersucht und anschließend eine gezielte Gebietsauswahl für eine aktive TSE-Überwachung bei Mufflons getroffen werden. Bislang ist nur von klassischer Scrapie die

Übertragung auf natürlichem Weg belegt (siehe 2.1.3.1). Daher sollte den Gebieten mit klassischer Scrapie besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, ausgehend von allen Scrapie-Neuaustrüchen seit 2001 Hotspots zu identifizieren. Abbildung 20 und Abbildung 21 stellen zwei schematisierte Beispiele dar und erläutern, wie ein Hotspot zustande kommt. In beiden Fällen befindet sich ein Muffelwildeinstandsgebiet weniger als 3 km Luftlinie von der Weide des Scrapie-infizierten Schafes entfernt. Dennoch können beide Gebiete nicht automatisch als Hotspots bezeichnet werden. Zusätzlich ist eine genaue Analyse der geographischen Beschaffenheit vor Ort notwendig. Diese zeigt im Fall der Abbildung 20, dass die von Scrapie-infizierten Schafen genutzte Weide direkt an den Wald grenzt und außerhalb des Ortes liegt. Eine erkennbare Barriere für Mufflons liegt nicht vor. Daher ist ein Kontakt – indirekt wie auch direkt – möglich. Beim zweiten Gebiet (Abbildung 21) stellt sich die geographische Beschaffenheit dagegen anders dar. Zwar existiert auch hier eine räumliche Nähe zwischen Wald und Schafweide, jedoch sind beide durch eine Autobahn getrennt. Diese stellt eine Barriere für Mufflons dar. Insofern ist in diesem Fall nicht von einem Kontakt auszugehen und das Gebiet kann nicht als Hotspot bezeichnet werden.

Nach diesem Schema wurden sechs Gebiete als mögliche Hotspots identifiziert. In drei Fällen trat in diesen Hotspots klassische Scrapie, in den anderen dagegen atypische Scrapie auf. Alle Hotspots waren in das Screening integriert und Mufflons aus diesen Gebieten wurden beprobt. Insgesamt scheiterte eine komplette Identifikation aller möglichen Hotspots jedoch an einer unvollständigen Liste aller Scrapie-Fälle sowie an fehlenden Angaben zu Scrapie-Typ, Genotyp oder geographischer Lage. Das Problem liegt z. T. darin begründet, dass die Ausführung des Tierseuchenrechts den Landesbehörden obliegt und für Tierseuchenfälle der Amtstierarzt des jeweiligen Kreises zuständig ist. Scrapie-Infektionen besitzen keine hohe Priorität, da sie nicht als Zoonosen eingestuft werden und ihnen ein geringer wirtschaftlicher Einfluss zugeschrieben wird. Daher werden häufig nur unzureichende epidemiologische Daten erhoben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier angewandte Risikogebietseinteilung mit allen Ausgangsdaten das Beste und Genaueste darstellt, was mit großem technischen und personellen Aufwand erhoben werden konnte und somit zwar nicht als das Ideal, aber als das nach gegenwärtiger Datenlage bestmöglich Machbare bezeichnet werden kann.

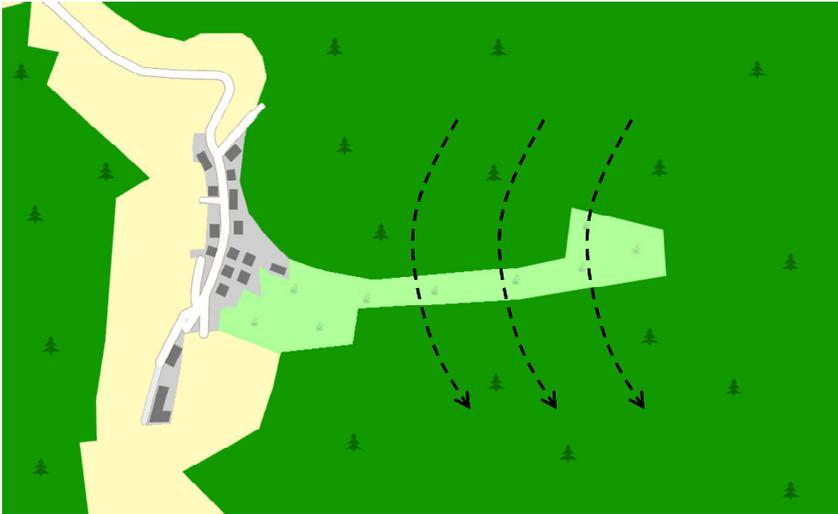


Abbildung 20: Schematisiertes Beispiel eines Hotspots (hellgrün: Schafweide; dunkelgrün: Wald; Pfeile: Raumnutzung der Mufflons).



Abbildung 21: Schematisiertes Beispiel eines Gebietes, das die Hotspotkriterien nicht erfüllt (hellgrün: Schafweide; dunkelgrün: Wald; Pfeile: Raumnutzung der Mufflons).

3.1.3.2 Untersuchungsmethoden

TSE-Schnelltests sollten in einem akkreditierten Labor erfolgen, um die Standards nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 (Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien) zu erfüllen und durch ein entsprechendes Qualitätsmanagement sowie der Teilnahme an kontrollierten Ringversuchen die korrekte Testdurchführung und Testauswertung sicherzustellen (Buschmann et al. 2004c). Daher wurden alle Schnelltests vom Landeslabor Berlin-Brandenburg (früher ILAT) durchgeführt. Der verwendete IDEXX Herdchek BSE – Scrapie Antigen Test ist zwar nicht für Mufflons validiert, wohl aber für Hausschafe. Dieser Umstand dürfte vernachlässigbar sein, da die Sequenz des PRNP bei beiden gleich ist (eigene Untersuchungen und Seo et al. 2001). Der IDEXX Herdchek BSE – Scrapie zählt unter den sieben aktuell zugelassenen Schnelltests (VO (EG) 162/2009) zu denen mit den niedrigsten Nachweisgrenzen. Er besitzt nach den EU-Zulassungsunterlagen eine hohe analytische Sensitivität und detektiert klassische Scrapie noch bei Verdünnungen von 1:2.000 und 1:4.000. Die Sensitivität und Spezifität bei der Untersuchung von 1.245 Hirnstammproben lagen jeweils bei 100 %. Die Sensitivität bei 1.227 Lymphknotenproben lag bei 94,1 %, die Spezifität bei 99,1 %. Somit wird dieser Schnelltest zur Erkennung von klassischer und atypischer Scrapie im Hirnstamm sowie atypischer Scrapie im Cerebellum empfohlen (EFSA 2005c). Bei einem Vergleich von drei Schnelltests unter Feldbedingungen schnitt der IDEXX Herdchek BSE – Scrapie am besten ab. Er wies eine Sensitivität von 99,3 % auf und erkannte auch atypische Scrapie (Bozzetta et al. 2008).

Bei den eigenen Untersuchungen (3.1.2.2) wies der IDEXX-Test für alle Mufflonproben eine Spezifität von 99,92 % auf. Dieser Wert befindet sich in Einklang mit den Zulassungsunterlagen. Die Sensitivität des Testes mit Mufflongewebe konnte nicht untersucht werden, da im Rahmen des Screenings kein PrP^{Sc}-haltiges Mufflongewebe gewonnen werden konnte und von den Fällen aus England nur ungeeignetes in Paraffin eingebettetes Gewebe zur Verfügung stand. Es ist allerdings davon auszugehen, dass auch die Sensitivität im Bereich der oben genannten Werte liegen dürfte und der IDEXX-Test optimal für das Screening geeignet war. Jedoch können TSE-Schnelltests der Obex-Region unter Umständen präklinische Fälle nicht detektieren und führen somit zu einer Unterschätzung der Prävalenz (Langeveld et al. 2006; Reckzeh et al. 2007). Gleiches gilt auch für atypische Scrapie unter Berücksichtigung des besonderen PrP^{Sc}-Verteilungsmusters (Benestad et al. 2003). Bei dem hier durchgeführten Screening wurden daher von jedem Mufflon i. d. R. Obex-Region, Teile des Cerebellums und der retropharyngealen Lymphknoten jeweils separat getestet. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, einzelne Mufflons irrtümlich als negativ klassifiziert zu haben, gering. Eine Überprüfung aller im Schnelltest negativen Tiere durch weiterführende Tests war praktisch nicht durchführbar.

Zur Durchführung der Bestätigungstests im NRL wurden je eine Hälfte der Medulla oblongata, Teile des Cerebellums sowie Teile eines Lymphonodus retropharyngeus medialis

verwendet. Diese Gewebe wurden zuvor bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Dies stellt keine optimalen Bedingungen für die immunhistochemische Untersuchung dar, da durch gefrierendes Wasser in den Zellen Artefakte gebildet werden können. Im Regelfall lassen sich die Gewebeschnitte dennoch beurteilen, jedoch sollte in solchen Fällen die immunhistochemische Untersuchung nie allein als Bestätigung verwendet werden (Matthews et al. 2008). Bei beiden Verdachtsfällen wurde daher zusätzlich auch der SAF Immunoblot angewandt. Laut Aussage des NRL waren beide Methoden gut durchführbar und lieferten eindeutige, negative Befunde. Insofern wurden alle 2.453 Gewebeproben als PrP^{Sc}-negativ und alle 823 untersuchten Mufflons als TSE-negativ eingestuft.

3.1.3.3 Repräsentativität der Stichprobe

Die Erhebung der Stichprobe kann als eine stratifizierte Beprobung angesehen werden, da alle Gebietseinheiten nach Risikoklassen eingeteilt und zusammengefasst analysiert wurden. Dadurch wurde sichergestellt, dass Gebietseinheiten mit einem erhöhten Risiko für TSE bei Mufflons angemessen beprobt wurden und alle in der Stichprobe vertreten sind. Es hätte auch eine kleinteiligere Untergliederung der Risikoklassen gewählt werden können, aber der Informationszugewinn dadurch erschien fraglich und eine Senkung der Stichprobenanzahl mit gleichzeitiger Erhöhung der Nachweisgrenzen wäre die Folge gewesen. Insofern stellt die gewählte Stratifizierung in vier Risikoklassen nach Scrapie-Ausbrüchen und Tierdichten einen guten Kompromiss zwischen einer sinnvollen Schichtung und aussagekräftigen Nachweisgrenzen dar.

Die Stichprobe wurde aus der Jagdstrecke der Gebietseinheiten gezogen, wobei nur Mufflons, die älter als 18 Monate waren, berücksichtigt wurden. Die gleiche Altersgrenze findet auch Anwendung in den Vorschriften zur Überwachung bei Schafen (Anhang III, VO (EG) 999/2001), da bei jüngeren Schafen TSE nur selten zu diagnostizieren ist (Dickinson und Stamp 1969). Die erlegten Mufflons wurden entsprechend einem Abschussplan nach Geschlecht und Alter geschichtet zufällig geschossen. Bedingt durch die Probenentnahme aus der gesamten Jagdstrecke inklusive Fallwild liegt eine Auswahlverzerrung (*selection bias*) vor, da augenscheinlich kranke Tiere unabhängig vom Abschussplan erlegt werden müssen. Durch eine Untersuchung klinisch auffälliger Tiere wird die Wahrscheinlichkeit, TSE zu entdecken, jedoch erhöht.

Da die Anzahl der untersuchten Tiere nicht immer proportional zum jeweiligen Mufflonbestand war, kann die Aufteilung der Proben nach ihrer Herkunft nicht als ideal eingestuft werden. So schwankte der Anteil der Stichprobe an der Auswahlpopulation von Gebietseinheit zu Gebietseinheit stark. Die Verfasserin hatte jedoch keinen Einfluss auf den Abschuss der Mufflons und die Beteiligung der Jagdausübungsberechtigten war regional sehr unterschiedlich. Daher kann eine Verzerrung durch systematische Nichtteilnahme (*response bias*) nicht ausgeschlossen werden. Es erfolgte jedoch eine intensive Kontaktaufnahme jeweils zu Beginn der Jagdsaisonen. Zuerst wurden Behörden und Verbände schriftlich um

ihre Mitwirkung gebeten. Anschließend erfolgte die Kontaktaufnahme hinunter bis zu jedem einzelnen Jagdausübungsberechtigten eines Untersuchungsgebietes zuerst schriftlich und falls erforderlich mehrfach telefonisch. Überwiegend traten dabei Ausfälle der ersten Art, d. h. Ausfälle, die sich neutral und nicht verzerrend auswirken (Kreienbrock und Schach 2005), wie z. B. eine altersbedingte Aufgabe der Jagd, auf. Mitunter waren jedoch Jagdausübungsberechtigte nicht bereit, sich zu beteiligen. Ob es sich dabei wirklich um Ausfälle der zweiten Art (nicht-neutrale) handelte und kranke Mufflons bewusst nicht untersucht werden sollten, konnte nicht festgestellt werden. Diesbezüglich ist jedoch nichts bekannt geworden. Zudem hielt sich eine Nichtteilnahme in Grenzen, wozu auch die Aufwandsentschädigung von 15 Euro je Tier beigetragen haben dürfte. So verweigerten zwar einzelne Personen die Teilnahme, aber nie ein ganzes Gebiet oder eine ganze Hegegemeinschaft, so dass aus jedem Untersuchungsgebiet Proben gewonnen werden konnten. Der *response bias* dürfte daher moderat ausgefallen sein und keinen wesentlichen Einfluss haben.

Die Aufteilung der untersuchten Mufflons nach ihrem Geschlecht ergab einen Anteil von 67 % weiblicher Mufflons in der Stichprobe, was einem Verhältnis von männlich zu weiblich von 0,5 : 1 entspricht. Ein Vergleich mit der Grundgesamtheit konnte nicht durchgeführt werden, da verlässliche Populationsdaten zu Mufflons in Deutschland nicht vorliegen und die wenigen Angaben in der Literatur stark schwanken (siehe 2.2.6). Daher wurde die Studienpopulation mit der Auswahlpopulation (Anteil weiblicher Mufflons 54 %) verglichen. Der statistischen Analyse (Binomialtest) nach ist das Geschlechterverhältnis der Stichprobe nicht repräsentativ für die Auswahlpopulation (siehe 3.1.2.1). Die hier festgestellten Abweichungen wurden wahrscheinlich dadurch hervorgerufen, dass Muffelwidder durch ihre Hörner eine wertvolle Jagdtrophäe darstellen und daher nur ungern und entsprechend seltener zur Beprobung überlassen wurden. Trotz ausführlicher Information, der Zusicherung, dass die Trophäe nicht beschädigt wird, und der angebotenen Beprobung vor Ort im Beisein des Erlegers konnten nicht alle Zweifel ausgeräumt und nicht alle Jagdausübungsberechtigten überzeugt werden. Dies führte letzten Endes dazu, dass Widder in der Stichprobe unterrepräsentiert sind. Allerdings ist von Scrapie bislang nicht bekannt, dass eine Prädisposition eines Geschlechts vorliegt, beide Geschlechter sind anteilsmäßig gleich stark vertreten (Parry 1962, Wineland et al. 1998).

Die Altersverteilung der untersuchten Tiere stellte sich wie folgt dar: 17 % der Mufflons waren 18-24 Monate alt, 40 % 25-48 Monate, 32 % 49-72 Monate und 11 % waren über 72 Monate alt. Ein Vergleich mit der Auswahlpopulation gestaltete sich jedoch schwierig, da die Jagdstrecken in anderen Altersklassen und je nach Bundesland verschieden erhoben werden. So werden bei weiblichen Mufflons meist nur Schmalschafe (12-24 Monate) und Altschafe (> 24 Monate) unterschieden, die Widder dagegen in 3-4 Klassen unterteilt erfasst und z. T. die Lämmer nicht nach Geschlechtern getrennt aufgeführt. Ferner richten sich die Angaben nach den Alterseinschätzungen der Erleger. Eigene Erhebungen (siehe 3.1.1.3) haben gezeigt,

dass das angegebene Alter auf dem Probenbegleitschein bei 13,9 % der untersuchten Mufflons nicht mit dem Zahnalter in Einklang zu bringen war. Daher wurde der Altersverteilung der Stichprobe ein idealisiertes Populationsmodell gegenübergestellt, dass von folgender Verteilung der adulten Population ausgeht: 22 % der adulten Tiere sind 12-24 Monate alt, 53 % 25-72 Monate und 25 % sind über 72 Monate alt (Telle 1979). Demnach wären in der Stichprobe vor allem Mufflons über 72 Monaten mit 11 % unterrepräsentiert. Das lässt sich damit begründen, dass der Wert der Trophäe mit zunehmendem Alter beim Widder steigt und eine Beprobung somit unwahrscheinlicher wurde. Den Schwerpunkt der Stichprobe bilden die Altersklassen 25-72 Monate mit insgesamt 72 %, der damit in der für klassische Scrapie relevanten Altersklasse von 2-5 Jahren liegt (Parry 1962; Wineland et al. 1998; Lühken et al. 2007; McIntyre et al. 2008). 11 % der untersuchten Mufflons stammen aus der Altersklasse > 72 Monate, die mit dem Durchschnittsalter von atypischer Scrapie bei Hausschafen von 6-7 Jahren übereinstimmt (Moum et al. 2005; Hopp et al. 2006; Lühken et al. 2007; Benestad et al. 2008).

Insgesamt verteilt sich die Anzahl der untersuchten Tiere ungleichmäßig auf die einzelnen Jagdjahre. Das hängt zum einen mit den zeitversetzt erfolgten Zustimmungen der Landesministerien und dem damit verbundenen Beginn der Probensammlung zusammen. So waren z. T. schon die Abschusspläne 2006 erfüllt, bis das Forschungsvorhaben zu den Jagdausübungsberechtigten vor Ort durchgedrungen war. Zudem herrschte während der ersten Jagdsaison überwiegend mildes Wetter und insgesamt ein geringerer Abschuss (vergleiche Anhang 8.1: Muffelwildstrecke 2006: 5.539 und 2007: 6.541). Zum anderen wurde die Risikogebieteinteilung überarbeitet und aktualisiert, so dass infolgedessen in der zweiten Jagdsaison insgesamt mehr Gebiete beprobt wurden.

In der Risikoklasse III wurden 23 % der zugehörigen Auswahlpopulation beprobt, in der Risikoklasse II 25 %. Insgesamt sind diese Anteile im Hinblick auf die Nachweisgrenzen niedrig, eine höhere Stichprobenzahl wäre wünschenswert gewesen. Bedingt durch den schleppenden Beginn, das Wetter, die Trophäenträgerproblematik und die unterschiedliche Unterstützungsbereitschaft konnten jedoch nicht mehr Mufflons untersucht werden. 1,68 % der Auswahlpopulation der Risikoklasse I wurden ungeplant beprobt. Diese Fehlproben waren bedingt durch die Angabe von falschen Erlegungsorten oder anderen Missverständnissen sowie gut gemeinte Einsendungen auf eigene Kosten der Erleger.

Insgesamt ist die Stichprobe der untersuchten Mufflons groß genug um sie, bei Kenntnisnahme der oben genannten Faktoren, als annähernd repräsentativ und zufällig anzusehen. Laut Kretienbrock und Schach (2005) kann: „[...] eine epidemiologische Untersuchung niemals frei von Fehlern sein. Damit ist es für die Interpretation einer epidemiologischen Studie unerlässlich, das Ausmaß der Fehlertypen zu beschreiben [...]“

3.1.3.4 Statistische Analyse

Die statistische Sicherheit für die Bestimmung der Nachweisgrenzen des Screenings wurde in Anlehnung an die Empfehlungen der OIE und der VO (EG) 999/2001 auf 95 % gesetzt. Bei einer Festsetzung von 99 % hätte dies einen drastischen Anstieg der erforderlichen Stichprobenanzahl bedeutet. Die verwendete Formel nach Cannon und Roe (siehe 3.1.1.7) geht von einem perfekten diagnostischen Test mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % aus und setzt eine unendlich große Population voraus (Thrusfield 2005). Bei der vorliegenden Untersuchung ist die Population jedoch groß genug, um diesen Punkt zu vernachlässigen. Da bislang kein TSE-Schnelltest für Mufflons validiert wurde, fehlen spezifische Angaben zur Sensitivität und Spezifität. Aus den eigenen Untersuchungen ergab sich eine Spezifität von 99,92 % für den IDEXX-Test. Durch die anschließenden Bestätigungstests kann jedoch für das gesamte Screening von einer Spezifität von 100 % ausgegangen werden. Daten zur Sensitivität beim Schaf (100 % bei Hirnstammgewebe, 94,1 % bei Lymphknotenproben und unter Feldbedingungen insgesamt 99,3 %) können mit großer Wahrscheinlichkeit analog auf das Mufflon übertragen werden. Insgesamt ergeben sich somit nur geringe Abweichungen zu einem perfekten Test. Daher ist dieser Aspekt vernachlässigbar.

Es sollte beachtet werden, dass die potentielle Anzahl der kranken Tiere in der Population (d) und die Minimumprävalenzlevel (MPL) konservative Schätzungen darstellen und somit eher zu hoch als zu niedrig eingeschätzt wurden.

3.1.3.5 Ermittelte Nachweisgrenzen

Im Rahmen des Screening mit dem IDEXX Herdchek BSE – Scrapie wurde in der Stichprobenpopulation kein TSE-positives Tier gefunden; die beobachtete Prävalenz betrug somit null. Bezogen auf die Auswahlpopulation (Jagdstrecke im Beprobungszeitraum inklusive Fallwild und über 18 Monate alt) lag die Nachweisgrenze der Untersuchung für die Risikoklasse III bei 0,52 % und für die Risikoklasse II bei 1,1 %. Das bedeutet, dass mit 95-prozentiger Sicherheit die Prävalenz von TSE in der Auswahlpopulation der Risikoklasse III weniger als 0,52 %, respektive 1,1 % in Risikoklasse II betrug.

Auf die einzelnen Zielpopulationen (geschätzte Population der über 18 Monate alten Mufflons im Beprobungszeitraum) bezogen, ergaben sich vergleichbare Nachweisgrenzen. So lag mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit die Prävalenz in der Zielpopulation der Risikoklasse III unter 0,56 % und in der Risikoklasse II unter 1,2 %. Allerdings liegen diesen Nachweisgrenzen die Schätzungen der Zielpopulationen anhand der Jagdstrecke und Zuwachs zu Grunde und solche Populationsschätzungen sind problematisch. Die Genauigkeit der Schätzung ist jedoch in diesem Fall nicht entscheidend, da der Sensitivitätsanalyse nach die Populationsgröße keinen sensitiven Einfluss auf das Minimumprävalenzlevel hat.

Selbst wenn die Populationsschätzungen ungenau wären, würde dies keinen nennenswerten Einfluss auf die ermittelten Nachweisgrenzen ausüben (siehe 3.1.2.4).

Unter Berücksichtigung der in dieser Studie gewonnenen Informationen lässt sich eine Plausibilitätsaussage über die externe Population, d. h. auf das gesamte Muffelwildvorkommen in Deutschland bezogen, treffen. Da sämtliche Gebiete mit einem erhöhten Risiko für das Vorkommen von TSE bei Mufflons beprobt wurden (RIII und RII) und kein Tier der Studienpopulation positiv war, lässt sich daraus schlussfolgern, dass die eigentliche Prävalenz innerhalb der Risikogebiete unterhalb der Nachweisgrenzen liegen muss. In Gebieten, auf die weniger Risikokriterien zutreffen und die somit über ein geringeres Risiko verfügen, ist von einer noch geringeren Prävalenz auszugehen. Somit dürfte die Prävalenz von TSE bezogen auf die externe Population in Deutschland unterhalb der Nachweisgrenzen liegen. Dadurch kann in Deutschland ein epizootisches Vorkommen von TSE ausgeschlossen werden; allerdings nicht das Auftreten von Einzelfällen. Darauf weisen ebenfalls die Proben aus Gebieten der Risikoklasse I hin. Diese waren allesamt negativ, wenngleich keine planmäßige Beprobung aller Gebiete dieser niedrigen Risikoklasse erfolgte. Mit Hilfe der ungeplanten Proben konnten Nachweisgrenzen für die Auswahl- und Zielpopulation der Risikoklasse I in Höhe von 4,097 % bzw. 4,12 % bestimmt werden. Diese Nachweisgrenzen beruhen jedoch auf einer kleinen Stichprobe und sind daher nur als ungefähre Werte zu verstehen.

Bei Mufflons auf der Insel Zypern konnten anhand von histopathologischen Untersuchungen keine Scrapie-Läsionen festgestellt werden (Toumazos 1991; Hadjisterkotis 1999), obwohl dort mit 8,9 bzw. 17 % die höchste Scrapie-Prävalenz innerhalb der EU bei Hausschafen bzw. Ziegen auftritt (EU Food Safety 2009). Allerdings wurden nur 17 Mufflons, davon neun frei lebende, untersucht. Zusätzlich fehlen Angaben sowohl zu den geographischen Verhältnissen als auch zu möglichen Kontakten zwischen Schafen, Ziegen und Mufflons. Daher kann ein Vorkommen von TSE bei Mufflons auf Zypern nicht ausgeschlossen werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Eine generelle Resistenz der Mufflons gegenüber TSE kann daraus nicht abgeleitet werden.

Wie ein Bericht aus England zeigt, sind Mufflons durchaus empfänglich für Prionen und können klinisch an Scrapie erkranken. Über Jahre hinweg trat dort Scrapie in zwei getrennt gehaltenen Mufflonherden mit einer Prävalenz von 14-33 % auf. Der Ursprung der Prionkrankheit bei diesen in menschlicher Obhut gehaltenen Tieren ist unklar, es gibt keine Hinweise auf eine Übertragung von Hausschafen zu den Mufflons (Wood et al. 1992). Die hohe Prävalenz bei diesen Gehegetieren lässt sich jedoch nicht auf frei lebende Mufflons in Deutschland verallgemeinern. Wie die ermittelten Nachweisgrenzen verdeutlichen, liegt die Prävalenz hier unterhalb von 0,56 bzw. 1,2 %.

Eine vergleichende Untersuchung in 20 EU Ländern zur Prävalenz von atypischer und klassischer Scrapie in geschlachteten und verendeten Schafen ergab Werte zwischen 0,032 %

und 0,15 %, im Durchschnitt 0,0812 % (Fediaevsky et al. 2008). Deutschland hat sich an dieser Untersuchung nicht beteiligt und offizielle Zahlen zur Scrapie-Prävalenz bei Schafen in Deutschland liegen bislang nicht vor. Aus Berichten des BMELV sowie der EU lassen sich die Anzahl der getesteten Schafe und die gemeldeten Scrapie-Ausbrüche für Deutschland bestimmen (BMELV 2007, BMELV 2008, EU Food Safety 2009). Im Vergleichszeitraum Januar 2006 bis Dezember 2007 wurden in Deutschland insgesamt 85.795 Schafe untersucht, davon waren 39 Scrapie-positiv. Das ergibt eine auf der Ebene der Auswahlpopulation vergleichbare Prävalenz von 0,045 %. Allerdings wird bei dieser Rechnung nur die Anzahl der Neuausbrüche berücksichtigt. Nach Angaben des nationalen Referenzlabors (pers. Mitteilung) wurde in den Jahren 2006 und 2007 bei 59 Hausschafen Scrapie festgestellt. Dies würde, bezogen auf die 85.795 getesteten Schafe, eine Prävalenz von 0,069 % bedeuten. Hochgerechnet auf den gesamten Hausschafbestand in Deutschland mit ungefähr 2.537.791 Tieren (Genesis-Online Datenbank 2008) ergäbe sich eine Prävalenz von 0,0023 % oder 2,3 Fällen pro 10.000 Schafe.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Scrapie-Prävalenzen beim Hausschaf unterhalb der Nachweisgrenzen des Screenings liegen. Insofern kann ein Vorkommen von TSE bei Mufflons nicht ausgeschlossen werden, da die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass die Scrapie-Prävalenz bei Mufflons der bei Hausschafen entspricht oder darunter liegt. Insgesamt waren die Stichprobenzahlen zu gering, um solch niedrige Nachweisgrenzen zu erreichen. Die Ermittlung der maximal möglichen Nachweisgrenzen (siehe 3.1.2.4) verdeutlicht jedoch, dass keine Stichprobenerhebung ausreicht, um solche Minimumprävalenzlevel abzudecken. So würden, selbst wenn 90 % der Auswahlpopulation beprobt worden wären, die Nachweisgrenzen nur bei 0,08 % für die Risikoklasse III und bei 0,19 % für die Risikoklasse II und damit noch immer oberhalb der Hausschafprävalenzen liegen. Wenn man die Scrapie-Prävalenz von 2,3 Fällen pro 10.000 Schafe auf den Mufflonbestand in Deutschland überträgt, ist davon auszugehen, dass maximal 4-5 Mufflons in ganz Deutschland TSE-positiv sein dürften. Dies wäre nur mit einer Vollerhebung auszuschließen.

Eine Untersuchung einer Population in Bezug auf das Freisein von einer Krankheit mit absoluter Sicherheit erfordert idealerweise die Untersuchung aller Tiere und einen perfekten Test (Cameron und Baldock 1998). Das ist nicht praktikabel. Insofern stellt das durchgeführte Screening einen guten Kompromiss zwischen erreichter Nachweisgrenze, Aussagekraft und Kosten dar.

3.2 Genotypisierung

Über die Verteilung der PrP-Genotypen beim Muffelwild gibt es bislang keine Informationen. Um die potentielle Empfänglichkeit des europäischen Mufflons für Scrapie abschätzen zu können, wurde eine Genotypisierung des ORF des Prionprotein-Gens (2.1.3.2) mittels PCR und direkter Sequenzierung durchgeführt.

3.2.1 Material und Methoden der Genotypisierung

3.2.1.1 Untersuchungsmaterial

Alle Tiere aus dem Screening (siehe 3.1) wurden nach ihrer geographischen Herkunft (Erlegungsort) geordnet. Aus jedem Gebiet wurde eine bestimmte Anzahl von Mufflons zufällig ausgewählt (Tabelle 19). Die Anzahl richtete sich dabei nach der Größe und räumlichen Ausdehnung der einzelnen Muffelwildbestände. Bei kleinen, geographisch isolierten Populationen wurden 3-5 Tiere als ausreichend eingeschätzt. Bei großen und räumlich weit verbreiteten Populationen wurden 10-20 Tiere genotypisiert, um auch geringe Allelfrequenzen zu detektieren. Zum Teil limitierte die Probenanzahl aus dem Screening die zur Verfügung stehenden Tiere. Eine Unterteilung in einzelne Muffelwildgebiete war nicht immer möglich.

Als Ausgangsmaterial diente ursprünglich für die TSE-Untersuchung entnommenes Gewebe aus dem Rhombencephalon, das bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde.

3.2.1.2 Isolierung genomischer DNA

Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des Kits DNeasy[®] Blood & Tissue (Firma Qiagen, Hilden), wobei die DNA nach Lyse der Zellen selektiv an eine Siliziumdioxid-Membran gebunden wird. Proteine, Kationen und andere verunreinigende Substanzen werden durch nachfolgende Waschschrte und Zentrifugation entfernt. Anschließend wird die aufgereinigte DNA in Wasser oder Puffer gelöst. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Für die Extraktion wurden 20-25 mg Gehirngewebe abgewogen, mit 180 μl Lysis-Puffer (Buffer ATL) und 20 μl PK versetzt und im Thermoschüttler (HTMR-133, Firma HLC Bio Tech, Bovenden) bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 350 min^{-1} für 3 bis 4 Stunden lysiert. Nach der Zugabe von 200 μl Puffer AL und 200 μl 100-prozentigem Ethanol wurde die Probe auf die Spin-Säule übertragen und für 2-3 min bei 8000 min^{-1} und RT zentrifugiert (Centrifuge 5415R Firma Eppendorf, Hamburg). Danach erfolgten zwei Waschschrte mit 500 μl Puffer AW1 und Zentrifugation (1 min, 8000 min^{-1} , RT) bzw. 500 μl Puffer AW 2 und Zentrifugation (5 min, 13200 min^{-1} , RT). Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 200 μl AE-Puffer und Zentrifugation (1 min, 8000 min^{-1} , RT) eluiert.

Im Anschluss wurden die Proben mit Hilfe des NanoDrop® Spectrophotometers ND-1000 (Firma Thermo Fisher Scientific, Wilmington) auf ihre Nukleinsäurenkonzentration und mögliche Kontamination mit Proteinen hin überprüft. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) dient dabei als Maß für die Reinheit (Sambrook und Russell 2001). Die Lagerung der DNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

3.2.1.3 PCR

Unter der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) versteht man die selektive Amplifizierung von ausgewählten DNA-Fragmenten mittels thermostabiler DNA-Polymerasen und Primeroligonukleotiden (Saiki et al. 1985; Mullis und Faloona 1987; Saiki et al. 1988).

Das hier verwendete Primerpaar p294 und p295 (Seo et al. 2001) amplifiziert ein 862 bp langes DNA-Fragment des Exons 3, das vollständig den ORF des PrP-Gens beinhaltet. Die Primeroligonukleotide wurden entsprechend den Angaben (siehe Tabelle 9) von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH synthetisiert.

Tabelle 9: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer.

Primer	Sequenz	Position PrP-Gen
p294 (<i>sense</i>)	5'-ggg cat ttg atg ctg aca cc-3'	22233–22252
p295 (<i>antisense</i>)	5'-caa cct ggc aaa gat taa gaa g-3'	23073–23094

Die Amplifizierung der Targetsequenz erfolgte im Thermocycler TGradient® (Firma Biometra, Göttingen) mit einem Standard-PCR-Ansatz von 50 µl. Es wurden je 2 µl Probenmaterial als Template eingesetzt und eine Negativkontrolle mitgeführt. Alle PCR-Produkte wurden anschließend bis zur Aufreinigung bei 4 °C gelagert.

Um unverfälschte PCR-Produkte zu erhalten und somit sicher zu gehen, dass keine Fehler der Polymerase amplifiziert und später sequenziert werden, wurden verschiedene Polymerasen verwendet (Dunning et al. 1988; Eckert und Kunkel 1991).

3.2.1.3.1 Taq-Polymerase

Taq-Polymerasen sind hitzebeständige DNA-Polymerasen des Bakteriums *Thermus aquaticus* ohne 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, sog. *proof reading*-Funktion (Tindall und Kunkel 1988). Hier wurde die GoTaq® DNA Polymerase der Firma Promega (Madison, USA) verwendet. Der Standardansatz und die Zyklusparameter sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 10: 50 µl-Standard-PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase.

Bestandteil	Volumen in µl
Nukleasefreies Wasser	34,9
5X Colourless GoTaq® Puffer	10
10 mmol/l dNTPs	1
50 pmol Primer p294	1
50 pmol Primer p295	1
0,5 U GoTaq® DNA Polymerase	0,1
Probenmaterial	2

Tabelle 11: Zyklusparameter für PCR mit Taq-Polymerase.

Schritt	Temperatur in °C	Dauer in s	Zyklusanzahl
Denaturierung	95	90	35
Annealing	58	90	35
Elongation	72	60	35

3.2.1.3.2 Pfu-Polymerase

Die DNA-Polymerase des Archaeobakteriums *Pyrococcus furiosus* wird als Pfu-Polymerase bezeichnet. Sie besitzt eine *proof reading*-Funktion, weshalb die Synthesefehlerrate sechs- bis zehnmals geringer ist als bei Taq-Polymerasen (Cline et al. 1996; Lundberg et al. 1991). Folgende Standards wurden im Zusammenhang mit der Pfu DNA Polymerase® (Firma Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet:

Tabelle 12: 50 µl-Standard-PCR-Ansatz mit Pfu-Polymerase.

Bestandteil	Volumen in µl
Nukleasefreies Wasser	35,5
10X Pfu Puffer mit MgSO ₄	5
2 mmol/l dNTPs	5
50 pmol Primer p294	1
50 pmol Primer p295	1
1,25 U Pfu DNA Polymerase®	0,5
Probenmaterial	2

Tabelle 13: Zyklusparameter für PCR mit Pfu-Polymerase.

Schritt	Temperatur in °C	Dauer in s	Zyklusanzahl
Denaturierung	95	90	35
Annealing	58	90	35
Elongation	72	60	35

3.2.1.3.3 Phusion

Die Phusion[®] High Fidelity DNA Polymerase (Firma Finnzymes, Espoo) ist eine Pyrococcus-ähnliche DNA-Polymerase, die mit einer die Prozessivität steigernden Domäne fusioniert ist und in *Escherichia coli* synthetisiert wird (Wang et al. 2004). Auch diese Polymerase hat eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität und somit laut Herstellerangaben eine ca. 50-fach geringere Fehlerrate als Taq-Polymerasen (Finnzymes 2008). In den folgenden Tabellen sind die Standardansätze und Zyklusparameter angegeben.

Tabelle 14: 50 µl-Standard-PCR-Ansatz mit Phusion-Polymerase.

Bestandteil	Volumen in µl
Nukleasefreies Wasser	33
5X Phusion [®] Puffer mit MgCl ₂	10
10 mmol/l dNTPs	1
50 pmol Primer p294	1
50 pmol Primer p295	1
3% Dimethylsulfoxid (DMSO)	1,5
1 U Phusion [®] Polymerase	0,5
Probenmaterial	2

Tabelle 15: Zyklusparameter für PCR mit Phusion-Polymerase.

Schritt	Temperatur in °C	Dauer in s	Zyklusanzahl
Denaturierung	95	90	35
Annealing	62	90	35
Elongation	72	60	35

3.2.1.4 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Die Überprüfung der Amplifizierung erfolgte anschließend durch Elektrophorese in einem 3-prozentigen Agarosegel mit Ethidiumbromidzusatz (3,5 µl / 50 ml Gellösung) als Nukleinsäurefarbstoff. Tris-Acetat-EDTA (TAE) diente als Laufpuffer. Je 7 µl PCR-Produkt wurden mit 1 µl 6X Orange DNA Loading Dye (Firma Fermentas) gefärbt, auf das Gel aufgetragen und liefen zusammen mit 4 µl O'Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Firma Fermentas) als Amplifizierungsmarker bei 90 Volt für 60 min. Die Auswertung und Dokumentation wurde über einem UV-Transilluminator durchgeführt.

3.2.1.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Alle PCR-Produkte, die in der Gelelektrophorese eine Bande von erwarteter Länge (862 bp) aufwiesen, wurden mit Hilfe des Kits NucleoSpin[®] Extract II (Firma Machery-Nagel, Düren) aufgereinigt. Dem Testprinzip nach wird die darin enthaltene DNA in Gegenwart von chaotropen Salzen an eine Siliziumdioxid-Membran gebunden. Durch anschließende Wasch- und Zentrifugationsschritte mit ethanolhaltigem Puffer werden Salze, Primer, Enzyme und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) entfernt.

Nach Zugabe von je 257 µl NT Puffer wurden die PCR-Produkte auf die Spin-Säulen aufgetragen und für 1 min bei 12000 min⁻¹ und RT zentrifugiert (Heraeus Biofuge[®] Fresco, Firma Kendro, Hanau). Der Waschschritt erfolgte mit 600 µl Waschlösung NT3 unter Zentrifugation (1 min, 12000 min⁻¹, RT). Anschließend wurde die Spin-Säule nochmals für 2 min bei 13000 min⁻¹ und RT zentrifugiert, um sämtliche Ethanolreste zu entfernen. Danach wurden zur Elution 50 µl 37 °C warmes nukleasefreies Wasser (HPLC-Wasser, Firma Carl Roth, Karlsruhe) auf die Membran gegeben und für 1 min bei 12000 min⁻¹ und RT zentrifugiert. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die so aufgereinigten PCR-Produkte bei -20 °C gelagert.

3.2.1.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung des PCR-Produktes wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Es wurde das BigDye Terminator[®] v3.1 Cycle Sequencing Kit (Firma Applied Biosystems, Foster City) verwendet. Bei dieser der PCR sehr ähnlichen Methode, wird ein Teil der dNTPs durch fluoreszierende Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) ersetzt. Wenn ddNTPs von der Polymerase eingebaut werden, findet ein Kettenabbruch statt. Das Ergebnis sind unterschiedlich lange DNA-Fragmente, deren letzte Base jeweils fluoreszenzmarkiert ist. Durch anschließende Elektrophorese werden die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Die unterschiedlichen Fluoreszenzen werden detektiert, wodurch sukzessiv die Basenreihenfolge bestimmt werden kann.

Im Rahmen der Sequenzierreaktion wurden die gleichen Primer wie für die PCR (siehe Tabelle 9) verwendet. Von jedem Mufflon wurden sowohl Hin- als auch Rückstrang sequenziert. Ein typischer 10 µl Reaktionsansatz ist in Tabelle 16 dargestellt. Die Reaktion erfolgte in 25 Zyklen im Thermocycler TGradient[®] mit folgenden Einstellungen: 10 s bei 96 °C und 90 s bei 60 °C.

Tabelle 16: 10 µl-Ansatz für die Sequenzierreaktion.

Bestandteil	Volumen in µl
50 pmol Primer p294 oder p295	1
5X Sequenzier-Puffer	1
BigDye [®] v3.1	2
PCR-Produkt	6

Anschließend wurde das Reaktionsprodukt mit dem BigDye Xterminator[®] Purification Kit (Firma Applied Biosystems) von überschüssigen dNTPs und ddNTPs, sowie Salzen und Enzymen befreit. Diese lagerten sich nach Zugabe der Kitreagenzien (45 µl SAM[®] Solution und 10 µl BigDye XTerminator[®] Solution), vortexen (20 min, 1800 min⁻¹, MixMate, Firma Eppendorf) und Zentrifugation (2 min, 2000 min⁻¹, Heraeus Multifuge[®] 3L, Firma Kendro) unlöslich auf dem Boden der Reaktionsgefäße bzw. -platten ab. Der Überstand wurde mittels Kapillarelektrophorese im 3130xl Genetic Analyzer (Firma Applied Biosystems) aufgetrennt und analysiert.

3.2.1.7 Auswertung der Sequenzen

Die Daten wurden mit der 3130xl Genetic Analyzer Data Collection[®] Software v3.0 (Firma Applied Biosystems) erhoben. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms MacVector[®] 8.0 (Firma Accelrys, San Diego). Alle erhaltenen Sequenzen wurden mit Genbank-Eintragungen (NCBI 2008) verglichen und manuell überprüft.

3.2.2 Ergebnisse der Genotypisierung

3.2.2.1 Probenzusammensetzung

Insgesamt wurden von 246 Tieren aus 40 Muffelwildbeständen die PrP-Genotypen bestimmt (siehe Tabelle 19). Wie in Kapitel 3.2.1.1 erläutert, wurden Proben des Screenings nach dem Erlegungsort gruppiert. Abbildung 22 stellt das Geschlechterverhältnis und die Altersstruktur der genotypisierten Mufflons dar. 165 Tiere (67 %) waren weiblich, 81 (33 %) männlich. Aus der Altersklasse 18-24 Monate stammten 47 Tiere (19 %), aus der Altersklasse 25-48 Monate 96 (39 %) und aus der Altersklasse 49-72 Monate 72 (29 %) Mufflons. 31 (13 %) Mufflons waren über 72 Monate alt.

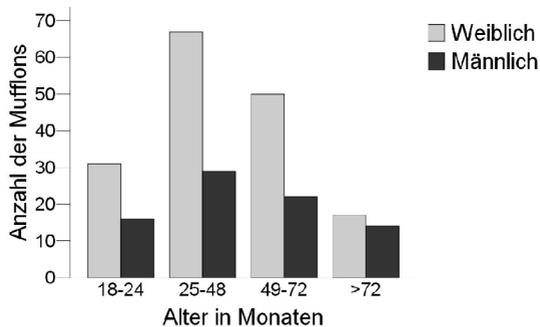


Abbildung 22: Altersstruktur und Geschlechterverteilung der genotypisierten Mufflons (n=246).

3.2.2.2 DNA-Isolierung

Von 246 Mufflons wurde, wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben, die genomische DNA isoliert und im Anschluss photometrisch auf die Nukleinsäurenkonzentration und Reinheit überprüft. Die DNA-Konzentration betrug $72,32 \pm 34,17 \text{ ng} / \mu\text{l}$ (Mittel \pm SD). Der Quotient 260/280 (siehe 3.2.1.2) lag bei $1,55 \pm 0,08$ (Mittel \pm SD).

3.2.2.3 PCR

Die in Kapitel 3.2.1.3 aufgezählten Standardansätze und Thermocyclerbedingungen führten i. d. R. zur Amplifizierung eines ca. 900 bp langen DNA-Stückes (Abbildung 23). Es fiel auf, dass die verschiedenen Polymerasen zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. So waren in der Agargelelektrophorese bei Verwendung der Taq-Polymerase die Banden stets am deutlichsten ausgeprägt (Abbildung 23 A), bei der Pfu- und Phusion-Polymerase (Abbildung 23 B bzw. C) hingegen traten mitunter auch schwächere, zusätzliche Banden auf.

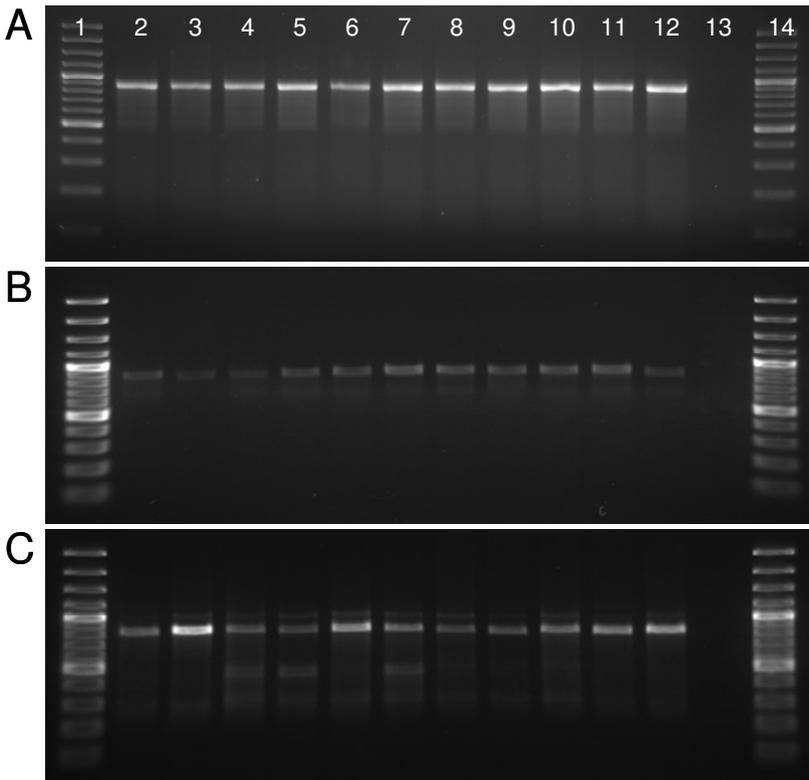


Abbildung 23: Gelelektrophorese der PCR-Produkte (A: Taq-Polymerase, B: Pfu-Polymerase, C: Phusion-Polymerase; 1 + 14: 100 Basenpaarmarker, 2-12: Proben, 13: Negativkontrolle).

3.2.2.4 Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden nach der Kettenabbruchmethode (siehe 3.2.1.6) direkt sequenziert. Von 213 Tieren (87 %) waren sowohl Hin- als auch Rückstrang eindeutig lesbar, bei 33 Tieren (13 %) konnte nur jeweils ein Strang ausgewertet werden. Das Augenmerk galt dabei dem 771 bp umfassenden ORF des Prionprotein-Gens. Alle erhaltenen Sequenzen wurden mit den Genbankeinträgen U67922 (Schaf), AB060288 und AB060289 (beides Mufflon) verglichen (siehe 3.2.1.7) und in ihre entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt (siehe Abbildung 24). Besonderes Interesse galt den Codons 136, 141, 154, und 171, da vor allem diese mit der Varianz der Scrapie-Empfänglichkeit assoziiert werden (siehe 2.1.3.2).

MVKSH I GSW I L V L F V A M W S D V G L C K K R P K P G G G W N T G G S R Y P G Q G S P G G N ²⁵ ⁵⁰
R Y P P Q G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G G W G Q G G S H S ⁷⁵ ¹⁰⁰
Q W N K P S K P K T N M K H V A G A A A G A V V G G L G G Y M L G S A M S R P L I H F G N D Y E D ¹²⁵ ¹⁵⁰
R Y Y P E N M Y R Y P N Q V Y Y R P V D Q Y S N Q N N F V H D C V N I T V K Q H T V T T T K G E N ¹⁷⁵ ²⁰⁰
F T E T D I K I M E R V V E Q M C I T Q Y Q R E S Q A Y Y Q R G A S V I L F S S P P V I L L I S F L ²²⁵ ²⁵⁰
I F L I V G

Abbildung 24: Aminosäuresequenz des Prionproteins der untersuchten Mufflons als Einbuchstabencode. Markiert sind die Aminosäuren an den Positionen 136, 141, 154 und 171.

Tabelle 17 stellt die Basentriplets und Aminosäuresubstitutionen dieser Codons dar. Beim Codon 136 codiert das Basentriplett Guanin, Cytosin und Cytosin die Aminosäure Alanin. Durch das Codon Cytosin, Thymin und Thymin an Stelle 141 wird Leucin codiert. Cytosin, Guanin und Thymin ergeben die Aminosäure Arginin an Stelle 154 und Cytosin, Adenin und Guanin entsprechen der Aminosäure Glutamin an Position 171. Alle Sequenzen der 246 untersuchten Mufflons waren an diesen Codons identisch. Damit wiesen alle Tiere – unabhängig von Ihrem Herkunftsort – den gleichen PrP-Genotyp AL₁₄₁RQ/AL₁₄₁RQ auf (siehe Tabelle 19).

Tabelle 17: PrP-Haplotypen der untersuchten Mufflons.

n	Codon	Triplet	AS	Frequenz der Haplotypen in %
459	136	gcc	Alanin (A)	100
459	141	ctt	Leucin (L)	100
459	154	cgt	Arginin (R)	100
459	171	cag	Glutamin (Q)	100

n: Anzahl der sequenzierten DNA-Stränge; AS: Aminosäuresubstitution; Nukleinbasen: a: Adenin; c: Cytosin; g: Guanin; t: Thymin

Darüber hinaus wurden an zwei Stellen SNPs detektiert: zum einen Adenin oder Cytosin an Position 691 des Codons 231 und zum anderen Cytosin oder Guanin im Codon 237 an Position 711. Es ließen sich zwei Allele unterscheiden: Allel 1 mit Adenin an der Position 691 und Cytosin an der Position 711 und Allel 2 mit Cytosin an Position 691 und Guanin an Position 711. 38 (15 %) der untersuchten Mufflons waren homozygot in Bezug auf das Allel 1, 131 (53 %) Mufflons dagegen in Bezug auf das Allel 2. Die übrigen 77 Tiere (31 %) waren heterozygot, d. h. sie wiesen an Position 691 sowohl Adenin als auch Cytosin und an Position 711 Cytosin und Guanin auf. Dies war durch überlagerte Peaks im Chromatogramm gut zu erkennen. Wie aus Tabelle 18 ersichtlich ist, haben diese Polymorphismen jedoch keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz und stellen daher stille Mutationen dar.

Tabelle 18: Darstellung der SNPs mit Basentriplets, Aminosäuresubstitution (AS) und Allelfrequenz.

Allel	Codon	Triplet	AS	Allelfrequenz in %
1	231	agg	Arginin	31
	237	ctc	Leucin	
2	231	cgg	Arginin	69
	273	ctg	Leucin	

Nukleinbasen: a: Adenin; c: Cytosin; g: Guanin; t: Thymin

Die Sequenzen der beiden Allele sind unter der Nummer FJ792605 (Allel 1) bzw. FJ792606 (Allel 2) in der genetischen Datenbank GenBank hinterlegt und in Abbildung 25 dargestellt.

Tabelle 19: Probenanzahl (n) und PrP-Haplotypfrequenzen je Muffelwildvorkommen.

Bundesland	Region	n	PrP-Haplotypenfrequenz in %				
			ARR	AHQ	ARH	ARQ	VRQ
BB	Hohenbuckoer Heide	20	0	0	0	100	0
BB	Friesack	5	0	0	0	100	0
BB	Göttlin-Wudicke	5	0	0	0	100	0
BB	Liebenberg	3	0	0	0	100	0
BB	Blumberg	3	0	0	0	100	0
BB	Mahlendorf	3	0	0	0	100	0
BW	Balingen	3	0	0	0	100	0
HE	Lahn-Dill	3	0	0	0	100	0
HE	Marburg-Biedenkopf	5	0	0	0	100	0
HE	Jesberg-Neukirchen	3	0	0	0	100	0
HE	Alsfeld	3	0	0	0	100	0
HE	Schlit	2	0	0	0	100	0
MV	Mandelshagen	7	0	0	0	100	0
MV	Müritz	3	0	0	0	100	0
MV	Klützer Winkel	3	0	0	0	100	0
MV	Marnitz	3	0	0	0	100	0
NI	Seesen	5	0	0	0	100	0
NI	Springe	3	0	0	0	100	0
NRW	Stukenbrock	5	0	0	0	100	0
NRW	Hochsauerland	10	0	0	0	100	0
NRW	Lügde	3	0	0	0	100	0
NRW	Lippspringe	2	0	0	0	100	0
NRW	Siegen-Wittgenstein	10	0	0	0	100	0
RP	Kesseling	5	0	0	0	100	0
RP	Cochem-Zell	10	0	0	0	100	0
RP	Nastätten	5	0	0	0	100	0
SN	Heinzebank	10	0	0	0	100	0
SN	Königshainer Berge	10	0	0	0	100	0
SN	Cunnersdorf	5	0	0	0	100	0
ST	Ostharz	26	0	0	0	100	0
ST	Arendsee-Diesdorf	10	0	0	0	100	0
TH	Heiligenstadt-Ershausen	10	0	0	0	100	0
TH	Weida	5	0	0	0	100	0
TH	Arnstadt	5	0	0	0	100	0
TH	Tännich	10	0	0	0	100	0
TH	Reinstädt	5	0	0	0	100	0
TH	Stadtroda	5	0	0	0	100	0
TH	Orlatal	5	0	0	0	100	0
TH	Leutenberg	5	0	0	0	100	0
TH	Neubrunn-Jüchsen	3	0	0	0	100	0

BB: Brandenburg; BW: Baden-Württemberg; HE: Hessen; MV: Mecklenburg-Vorpommern; NI: Niedersachsen; NRW: Nordrhein-Westfalen; RP: Rheinland-Pfalz; ST: Sachsen-Anhalt; SN: Sachsen; TH: Thüringen

```

Mufflon Allel 1 1 ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGTGGCCAT 50
Mufflon Allel 2 1 ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGTGGCCAT 50

Mufflon Allel 1 51 GTGGAGTGACGTGGGCCTCTGCAAGAAAGCGACCAAAACCTGGCGGAGGAT 100
Mufflon Allel 2 51 GTGGAGTGACGTGGGCCTCTGCAAGAAAGCGACCAAAACCTGGCGGAGGAT 100

Mufflon Allel 1 101 GGAACACTGGGGGGAGCCGATACCCGGGACAGGGCAGTCCTGGAGGCAAC 150
Mufflon Allel 2 101 GGAACACTGGGGGGAGCCGATACCCGGGACAGGGCAGTCCTGGAGGCAAC 150

Mufflon Allel 1 151 CGCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGAGGTGG 200
Mufflon Allel 2 151 CGCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGAGGTGG 200

Mufflon Allel 1 201 CTGGGGCCAAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGCT 250
Mufflon Allel 2 201 CTGGGGCCAAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGCT 250

Mufflon Allel 1 251 GGGGACAGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGTGGTAGCCACAGT 300
Mufflon Allel 2 251 GGGGACAGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGTGGTAGCCACAGT 300

Mufflon Allel 1 301 CAGTGGAAACAAGCCCAGTAAGCCAAAAAACAACATGAAGCATGTGGCAGG 350
Mufflon Allel 2 301 CAGTGGAAACAAGCCCAGTAAGCCAAAAAACAACATGAAGCATGTGGCAGG 350

Mufflon Allel 1 351 AGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGG 400
Mufflon Allel 2 351 AGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGG 400

Mufflon Allel 1 401 GAAGTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGCAATGACTATGAGGAC 450
Mufflon Allel 2 401 GAAGTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGCAATGACTATGAGGAC 450

Mufflon Allel 1 451 CGTTACTATCGTGAAAAACATGTACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTACAG 500
Mufflon Allel 2 451 CGTTACTATCGTGAAAAACATGTACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTACAG 500

Mufflon Allel 1 501 ACCAGTGGATCAGTATAGTAACCAGAAACAACCTTTGTGCATGACTGTGTCA 550
Mufflon Allel 2 501 ACCAGTGGATCAGTATAGTAACCAGAAACAACCTTTGTGCATGACTGTGTCA 550

Mufflon Allel 1 551 ACATCACAGTCAAGCAACACACAGTCAACCACCACCACCAAGGGGGAGAAC 600
Mufflon Allel 2 551 ACATCACAGTCAAGCAACACACAGTCAACCACCACCACCAAGGGGGAGAAC 600

Mufflon Allel 1 601 TTCACCGAAACTGACATCAAGATAATGGAGCGAGTGGTGGAGCAAAATGTG 650
Mufflon Allel 2 601 TTCACCGAAACTGACATCAAGATAATGGAGCGAGTGGTGGAGCAAAATGTG 650

Mufflon Allel 1 651 CATCACCCAGTACCAGAGAGAATCCAGGCTTATTACCAAAAGGGGGCAA 700
Mufflon Allel 2 651 CATCACCCAGTACCAGAGAGAATCCAGGCTTATTACCAAAAGGGGGCAA 700

Mufflon Allel 1 701 GTGTGATCCTCTTTTCTTCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTTCCTC 750
Mufflon Allel 2 701 GTGTGATCCTCTTTTCTTCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTTCCTC 750

Mufflon Allel 1 751 ATTTTTCTCATAGTAGGATAG 771
Mufflon Allel 2 751 ATTTTTCTCATAGTAGGATAG 771
    
```

Abbildung 25: Sequenzen der Allele 1 und 2 des Prionproteins bei Mufflons. Markiert sind die SNPs an den Positionen 691 und 711.

3.2.3 Diskussion der Genotypisierung

3.2.3.1 Untersuchungsmethoden

Die ursprüngliche Entnahme der Proben erfolgte nicht steril und z. T. unter Feldbedingungen; jedoch wurden für jedes Tier neues Besteck und neue Einweghandschuhe verwendet, um eine mögliche Kreuzkontamination der Proben mit Prionen zu verhindern. Gleiche Vorsichtsmaßnahmen wurden bei der Zerteilung des Gewebes zur DNA-Isolierung angewandt. So wurde für jede Probe eine neue sterile Skalpellklinge verwendet. Eine Kreuzkontamination bei der DNA-Präparation ist daher auszuschließen.

Die erhaltene durchschnittliche DNA-Konzentration war mit 72,32 ng/μl gering und schwankte zwischen Individuen stark ($s = 34,13 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Dies ist dem unterschiedlichen Zustand der Gewebeproben zuzuschreiben. Teilweise wurden Mufflons bei Jagden direkt nach der Erlegung beprobt und die Proben direkt gekühlt, andere dagegen waren weniger frisch. Darüber hinaus wurde die DNA-Konzentration jeder Probe nur einmal photometrisch bestimmt und natürliche Messschwankungen somit nicht berücksichtigt. Der Wert diene als Anhaltspunkt, ob die DNA-Isolation erfolgreich durchgeführt wurde. Das Absorptionsverhältnis 260/280 lag im Mittel bei 1,55 und damit unter dem zu erwartenden Wert für reine Nukleinsäuren von 1,7-1,9. Dies spricht für eine Verunreinigung der isolierten DNA mit Proteinen, Phenolen oder anderen Kontaminanten (Sambrook und Russell 2001). Durch einen zu kurzen PK-Verdau könnte es zu einer Koisolierung von Proteinen mit der DNA gekommen sein. Allerdings ist das Absorptionsverhältnis 260/280 immer abhängig vom pH-Wert des Elutionspuffers und liegt im sauren Milieu immer etwas unter dem Erwartungswert (Wilfinger et al. 1997). Sowohl Quantität als auch Qualität der isolierten DNA waren ausreichend für die anschließend durchgeführte PCR.

Mit den in Kapitel 3.2.1.3 angegebenen Standardansätzen und Zyklusparametern konnte die Amplifizierung des ORF des PRNP durchgeführt werden. Bedingt durch die unterschiedliche Wiedergabetreue und Ausbeute der einzelnen Polymerasen (Eckert und Kunkel 1991) ergaben sich verschiedene Bandenmuster bei der Gelelektrophorese (siehe Abbildung 23). So traten gerade bei den Polymerasen mit den niedrigeren Synthesefehlerraten (Pfu und Phusion) schwächere und auch kürzere Banden auf. Bei der Isolierung und Sequenzierung der kurzen Banden stellte sich heraus, dass diese Bruchstücke des PRNP und keine Kontaminationen waren. Ferner wiesen auch die mitgeführten Negativkontrollen keine Banden auf. Die erhaltenen unterschiedlichen Bandenmuster sind dadurch zu erklären, dass Polymerasen mit einer höheren Wiedergabetreue, sog. *fidelity*, besondere Anforderungen an die PCR stellen und aufgrund einer geringeren Syntheserate meist weniger effizient bei der Amplifizierung sind (Eckert und Kunkel, 1991, Piotrowski 2003). Nach einer anschließenden Aufreinigung, bei der Primer und überschüssige Nukleotide entfernt wurden, war eine Sequenzierung der PCR-Produkte möglich. Dabei kam der Vorteil dieser Polymerasen zum Tragen, nämlich dass

durch ihre hohe Wiedergabetreue Lesefehler und damit Fehler in der ermittelten Nukleotidsequenz ausgeschlossen werden können.

Die Genotypisierung im Massendurchsatz beim Schaf in Folge der Resistenzzüchtung erfolgte lange Zeit mit Hilfe des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP). Dabei wird die isolierte DNA mit Restriktionsenzymen verdaut. Durch Nukleotid- und Restriktionsstellenunterschiede entstehen unterschiedlich lange Fragmente, so dass die verschiedenen Fragmentmuster dann den entsprechenden Genotypen zu geordnet werden können (Goldmann et al. 1991; Garcia-Crespo et al. 2004; Lühken et al. 2004). Inzwischen stehen weitere Methoden wie die Real-time PCR (Garcia-Crespo et al. 2004; Johnson et al. 2007) oder PCR mit Schmelzkurvenanalyse (Schütz et al. 2006) zur Verfügung. Allerdings zielen diese Methoden nur auf bestimmte Nukleotidsequenzen oder Codons und eignen sich somit nicht zur Analyse eines unbekanntes Genoms. In solchen Fällen ist die direkte Sequenzierung allen anderen Methoden vorzuziehen, weil nur sie Informationen über jedes Nukleotid liefert und dadurch alle Polymorphismen entdeckt werden können (Hunter 2001). Sie stellt den derzeitigen *gold standard* dar (Kwok und Duan 2003). Auch eine Klonierung mit anschließender Sequenzierung einer ausreichenden Anzahl von Klonen liefert Informationen zu jedem Nukleotid. Allerdings birgt das Klonieren die Gefahr einzelner Polymeraselesefehler, die bei der Sequenzierung des PCR-Produktes übergangen werden (Pääbo und Wilson 1988; Saiki et al. 1988). Ferner ist eine Klonierung zeit- und kostenintensiv. Für die vorliegende Untersuchung war sie nicht erforderlich, da die erhaltenen Sequenzen eindeutig waren und anhand derer Allele und Prionprotein-Genotypen durch den Vergleich von homo- und heterozygoten Tieren zweifelsfrei bestimmt werden konnten (Kwok et al. 1994).

Von jedem Tier wurden Hin- und Rückstrang sequenziert, um zwei Informationen zur Nukleotidsequenz zu erhalten und damit die Sicherheit zu erhöhen. Alle Chromatogramme wurden manuell kontrolliert und die erhaltenen Sequenzen mit Genbankeintragen verglichen. Von 87 % der genotypisierten Mufflons waren sowohl Hin- als auch der Rückstrang eindeutig les- und auswertbar; bei 13 % war nur ein sequenzierter Strang gut lesbar. Auf eine erneute Sequenzierung des komplementären Stranges wurde verzichtet, da keine Abweichungen zu erwarten gewesen wären.

3.2.3.2 Ermittelte PrP-Genotypen

Durch direkte Sequenzierung konnte die 771 Basenpaare umfassende codierende Sequenz des Prionproteins ermittelt und daraus auf die Sequenz der 256 codierten Aminosäuren geschlossen werden. Unter den 246 genotypisierten Mufflons zeigte sich unabhängig von Geschlecht, Alter und Herkunft eine deutliche Homologie. So waren die Nukleotidsequenzen zu 99,7 %, die Aminosäuresequenzen sogar zu 100 % identisch. Die Abweichungen in der Nukleotidsequenz waren bedingt durch zwei Einzelnukleotidpolymorphismen an Position 691 (a bzw. c) und 711 (c bzw. g). Diese Polymorphismen hatten jedoch keine Änderung der codierten Aminosäuren zur Folge und stellten somit stille Mutationen dar. Infolge dessen waren alle Aminosäuresequenzen der Mufflons identisch. Allerdings konnten somit zwei Allele unterschieden werden: Allel 1 (691a, 711c) mit einer Frequenz von 31 % und Allel 2 (691c, 711g) mit einer Frequenz von 69 % in der Studienpopulation.

Die Analyse von zwei Mufflons aus dem Naturkundemuseum Tokio von Seo et al. (2001) zeigte dort die gleichen Allele und ebenfalls den Genotyp ARQ/ARQ. Aufgrund der geringen Tieranzahl war jedoch keine Aussage zur Allelfrequenz möglich. Bei einer Untersuchung des PRNP an 26 Mufflons aus Ungarn traten zwei Genotypen auf: ARQ/ARQ (n = 24) und ARQ/ARR (n = 2) (Anton et al. 2007). Diese Mufflons stammten zum einen aus einem Wildpark (Nógrádi Vadaspark) und zum anderen von einem Privatzüchter (pers. Mitteilung István Anton). Allerdings ist die Abstammung sämtlicher Tiere unklar und es ist offen, inwieweit diese Tiere reinrassig waren oder evt. eine Einkreuzung von Hausschafen und dadurch möglicherweise ein Eintrag des Haplotyps ARR stattgefunden hat.

Bei anderen Wildschafen fehlen bislang verlässliche Angaben zur Variabilität (Goldmann 2008), auch wenn sich in der Datenbank GenBank zwölf Einträge zum Prionprotein des Dickhornschafes, *Ovis canadensis*, (GenBank-Nummern: AF166334, AY769957, DQ648467-73 und DQ648475-77) sowie eine Sequenz eines Dallschafes, *Ovis dalli*, (DQ648474) befinden. Fast alle diese Tiere weisen zwar an den Codons 136, 154 und 171 den Genotyp ARQ auf – mit Ausnahme von AHQ bei einem Dickhornschaf (DQ648473) – dafür treten Polymorphismen und Aminosäurenunterschiede an anderen Codons auf. Insgesamt weisen diese Wildschafe damit mehr Variabilität als die hier untersuchten Mufflons auf.

Die gleichen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen sind ebenfalls von verschiedenen Hausschafressen her bekannt (u. a. Belt et al. 1995; Lee et al. 1998). Normalerweise treten jedoch beim Hausschaf mehrere Polymorphismen und unterschiedliche Genotypen auf (siehe 2.1.3.2). Das ARQ-Allel kommt in jeder Schafrasse vor, ist sehr häufig dominant und wird daher als Wildtyp-Allel bezeichnet (Smits et al. 1997; Babar et al. 2008). Vor allem in alten Hausschafressen tritt es mit hohen Allelfrequenzen auf, wie z. B. mit 92 % bei Soay (Hunter et al. 1997b), 98,7 % bei North Ronaldsay, 96,5 % bei Castlemilk Moorit (Townsend et al. 2005) und bei isländischen Schafen mit 78,9-82,5 % (Thorgeirsdottir et al. 1999). Bei drei archaischen pakistanischen Schafrassen (Buchi, Kachi und Thalli) wurde der Genotyp

ARQ/ARQ zu 100 % nachgewiesen. Auch bei diesen kommen stille Mutationen an Position 691 (Adenin bzw. Cytosin) vor, allerdings dominiert bei den pakistanischen Schafen im Gegensatz zu den Mufflons Adenin mit 50-90 % Anteil je nach Rasse (Babar et al. 2009).

Diese Untersuchungen zeigen, dass ARQ/ARQ bei ursprünglichen Schafrassen, Wildschafen und Mufflons der dominierende Genotyp ist und ggf. auch den einzig vorhandenen Genotyp repräsentiert. Untersuchungen an Schafrassen aus Zentral- und Südasien lassen vermuten, dass andere Genotypen erst durch Kultivierung und Kreuzung in diese Rassen gelangt sind (Gombojav et al. 2004; Babar et al. 2008). Aus der gleichen Region stammen auch die Vorfahren der europäischen Mufflons (siehe 2.2.2). Insofern wäre es denkbar, dass der ursprüngliche PrP-Genotyp bis heute in den Mufflonpopulationen erhalten geblieben ist.

Die deutschen Populationen stammen von wenigen Tieren aus den Inselpopulationen von Korsika und Sardinien ab, wobei Mufflons aus bestimmten Kernvorkommen wie z. B. dem Osthartz wiederum als Gründertiere für andere Einbürgerungen dienten (Piegert 2006; Piegert und Uloth 2005). Insofern ist von einer engen Verwandtschaft und geringer genetischer Variabilität der Mufflons untereinander auszugehen (Hartl 1990). Zwar wurden z. T. auch Einkreuzungen mit anderen Schafrassen vorgenommen, aber sog. Blendlinge waren meist unerwünscht und das Ziel war es, Mufflons möglichst unverfälscht zu erhalten (Piegert und Uloth 2005). Auch wenn einzelne Verpaarungen mit Hausschafen nicht ausgeschlossen werden können, spricht doch vieles dafür, dass ARQ/ARQ nicht nur der dominante, sondern der einzige Genotyp bei Mufflons in Deutschland ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden nicht flächendeckend aus ganz Deutschland Mufflons genotypisiert. Daher ist die Stichprobe für Deutschland nicht repräsentativ und es ist möglich, dass seltene oder auch regional begrenzt vorkommende Allele unentdeckt geblieben sind. Allerdings wurden Muffelwildvorkommen wie die Region Osthartz, welche wesentlich zur Einbürgerung beigetragen hat, verstärkt untersucht (n = 26). Dabei konnten keine anderen Allele identifiziert werden, was dem Hintergrund der Einbürgerungsgeschichte und der angenommen geringen Variabilität (siehe 2.2.2) entspricht.

Eine Verwandtschaftsanalyse der genotypisierten Tiere war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Daher ist die Unabhängigkeit der Stichproben innerhalb der einzelnen Regionen nur eingeschränkt gewährleistet und eine direkte Verwandtschaft der Tiere kann – vor allem unter Berücksichtigung der Sozialstrukturen (siehe 2.2.5) – nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt stellt dies die bislang umfangreichste Untersuchung zum Prionprotein-Genotyp bei Mufflons weltweit dar. Auch wenn das Vorkommen von anderen Allelen nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden kann, so ist die Wahrscheinlichkeit doch als sehr gering einzuschätzen und es ist davon auszugehen, dass ARQ/ARQ den PrP-Genotyp der deutschen Muffelwildpopulation repräsentiert.

Nach dem britischen National Scrapie Plan (siehe 2.1.3.2) wird der Genotyp ARQ/ARQ der Klasse 3 zugeordnet und gilt damit als genetisch wenig resistent für Scrapie. Allerdings gilt diese Einteilung nur für klassische Scrapie und muss im Zusammenhang mit den anderen in einer Schafrasse vorkommenden Allelen betrachtet werden. So sind in Herden, in denen der Genotyp VRQ/VRQ nicht auftritt, meist Schafe des Genotyps ARQ/ARQ von Scrapie betroffen (Hunter et al. 1997b; Goldmann 2008). Die Berichte der EU-Mitgliedsstaaten zu Scrapie aus den Jahren 2006 und 2007 zeigen, dass 60 bzw. 68 % aller atypischen und klassischen Scrapie-Fälle bei Schafen des Genotyps ARQ/ARQ auftraten, obwohl in einer zufälligen Stichprobe nur 18 bzw. 13 % der Schafe diesen Genotyp aufwiesen (EU Food Safety 2009). Allerdings stellt dies nur eine grobe Zusammenfassung dar und spiegelt nicht die Situation in einzelnen Ländern wieder. So dominierten z. B. in den Niederlanden im Jahr 2007 Scrapie-Fälle in Genotypen der NSP-Klasse 5, beim Genotyp ARQ/ARQ dagegen wurde kein einziger Scrapie-Fall festgestellt. In Deutschland jedoch traten von 2002 bis 2006 93,1 % der klassischen und 25 % der atypischen Scrapie-Fälle bei Schafen des Genotyps ARQ/ARQ auf (Lühken et al. 2007). Weiterhin konnte der Genotyp ARQ/ARQ mit einer erhöhten Empfänglichkeit bei experimentellen BSE-Infektionen assoziiert werden. Die Inkubationszeit war bei solchen homozygoten Tieren am kürzesten (Houston et al. 2003).

In den letzten Jahren wurden in Verbindung mit dem Genotyp ARQ/ARQ weitere Polymorphismen entdeckt. So wird den Allelen AT₁₃₇RQ, ARQK₁₇₆ und ARL₁₆₈Q ein protektiver Zusammenhang vor klassischer Scrapie- bzw. experimenteller BSE-Infektion nachgesagt (Goldmann et al. 2006; Vaccari et al. 2006; Vaccari et al. 2009). Moum et al. (2005) konnten dagegen zeigen, dass das Allel AF₁₄₁RQ mit atypischer Scrapie in Norwegen assoziiert ist. Bei den hier analysierten Mufflons kam jedoch keines dieser Allele vor, so dass weder von einer Senkung noch von einer Erhöhung der Empfänglichkeit ausgegangen werden kann. Die Einteilung der Genotypen nach dem NSP sollte mit Vorsicht beurteilt werden. Insbesondere die Zuordnung des Genotyps ARQ/ARQ ist zu überdenken.

Wie das Auftreten von Scrapie bei Mufflons in England (Wood et al. 1992) zeigt, sind diese grundsätzlich empfänglich. Auch aus genetischer Sicht kann keine Resistenz gegen TSE festgestellt werden. Dem Genotyp ARQ/ARQ entsprechend können Mufflons als hochempfindlich für klassische Scrapie und BSE und als empfänglich für atypische Scrapie eingestuft werden. Zur genaueren Abklärung und als Beweis wäre die Durchführung von Infektionsversuchen erforderlich. Die beobachteten Einzelnukleotidpolymorphismen stellen stille Mutationen dar. Auch wenn in anderen Studien festgestellt wurde, dass stille Mutationen einen Einfluss auf die Stabilität der mRNA haben und dadurch an der Ätiologie von Krankheiten beteiligt sein können (Duan et al. 2003; Capon et al. 2004), kann dies hier wohl ausgeschlossen werden. Die hier beim Mufflon beschriebenen SNPs sind ebenfalls von Hausschafen her bekannt (Belt et al. 1995; Bahar et al. 2009) und ein Zusammenhang mit der Empfänglichkeit für TSE konnte bislang nicht festgestellt werden.

4 RISIKOBEWERTUNG UND EMPFEHLUNGEN

Die ersten Teile der Risikobewertung, *hazard identification* und *hazard characterisation*, sind in Kapitel 2.1 dargestellt. Dort wurden die Ätiologie, Pathogenese und Epidemiologie von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien – insbesondere von Scrapie – erläutert. Im Folgenden soll nun die Einschätzung der Exposition (*exposure assessment*) und die Risikobeschreibung (*risk characterisation*) vorgenommen werden. Die Bewertung des Risikos erfolgt dabei qualitativ. Abbildung 26 zeigt eine Übersicht der möglichen Bewertungen und ihrer Interpretationen. Abschließend werden verschiedene Handlungsoptionen erläutert.

Bewertung	Interpretation
vernachlässigbar	bedarf keiner weiteren Betrachtung
gering	liegt unterhalb des im Mittel zu erwartenden Maßes
mäßig	im Mittel zu erwarten
wahrscheinlich	vernünftigerweise zu erwarten
hoch	liegt oberhalb des im Mittel zu erwartenden Maßes

Abbildung 26: Qualitative Bewertungsmöglichkeiten des Risikos und ihre entsprechenden Interpretationen (nach OIE 2004).

4.1 Einschätzung der Exposition

Da anzunehmen ist, dass aufgrund der engen stammesgeschichtlichen Verwandtschaft zwischen Mufflons und Hausschafen eine sehr geringe Speziesbarriere besteht, kommt vor allem den Hausschafen eine bedeutende Rolle bei der potentiellen Übertragung zu. Eine Exposition der Mufflons ist auf verschiedenen Wegen denkbar. Durch einen direkten Kontakt mit infizierten Schafen könnten Mufflons Prionen ausgesetzt werden. Sporadisch kommen durchaus direkte Kontakte zwischen Mufflons und Schafen vor (Bormann 1996; Piegert und Uloth 2005). Die enge Sozialstruktur der Mufflons fördert eine Exposition untereinander. Mufflonwidder besitzen ein größeres Streifgebiet als Mufflonschafe (Theiß-Krämer 1983; Dubois et al. 1994) und könnten durch den wechselnden Kontakt zu Familienverbänden zur Verbreitung beitragen. Eine weitere Möglichkeit der Exposition ergibt sich aus einem indirekten Kontakt über die gemeinsame Nutzung des Habitats mit infizierten Tieren. Da sich Ernährungsstrategie, Raumnutzung und Witterungsschutzverhalten von Hausschafen und Mufflons in vielen Punkten gleichen (Schubert 1989a; Schubert 1989b), kann es zu einer Überschneidung der Habitate kommen. Allerdings ist die potentielle gemeinsame Nutzung

von Weiden durch Mufflons und Schafe regional unterschiedlich intensiv und vor allem abhängig von der Lage der Schafweiden. Ruhige Ortsrandlagen in Waldnähe oder Waldweiden innerhalb von Muffelwildeinstandsgebieten müssen dafür als besonders günstig angesehen werden. Weitere Prionenquellen können kontaminierte Futtermittel oder organische Dünger darstellen. Das Expositions- und Übertragungsrisiko ist jedoch je nach Form der TSE unterschiedlich zu beurteilen.

Klassische Scrapie ist eine der wenigen Prionkrankheiten die sowohl direkt als auch indirekt horizontal übertragen werden kann (siehe 2.1.3.1). Seit 2001 wurden jedes Jahr in Deutschland zwischen 3 und 43 Scrapie-Neuaustritte (klassische und atypische) amtlich festgestellt (BMELV 2009). Somit sind Prionen als infektiöses Agens in der Umwelt vorhanden. Vor allem im Boden bleibt die Infektiosität lange erhalten, so dass im Versuch mit Hamstern Transmissionen über die orale Route noch nach 29 Monaten erfolgreich waren (Seidel et al. 2007). Vor allem das Unterpflügen von Schafmist zur Entsorgung aus einem Scrapie-positiven Stall (Hüttner et al. 2004) könnte eine Infektionsquelle darstellen. Epidemiologische Untersuchungen aus Island legen nahe, dass sogar noch 16 Jahre nach einer Kontamination der Umwelt eine Übertragung möglich ist (Georgsson et al. 2006). Eine Exposition der Mufflons indirekt oder direkt durch infizierte Schafe ist daher grundsätzlich möglich. Allerdings sind Quantität und Qualität dieses Expositionsrisikos schwer einschätzbar und variieren mit Sicherheit regional stark. Im Rahmen der durchgeführten Weidenanalyse (siehe 3.1.3.1) konnten drei Gebiete ermittelt werden, in denen klassische Scrapie bei Schafen auftrat und eine gemeinsame Weidennutzung von Mufflons und Schafen wahrscheinlich ist. In diesen Hotspots ist das Risiko der Exposition hoch. Zugleich besteht bei klassischer Scrapie auch die Möglichkeit der Exposition von Mufflons untereinander. Zum einen weisen alle Tiere den eigenen Untersuchungen zufolge den gleichen Genotyp und damit die gleiche Empfänglichkeit auf. Zum anderen wird die Exposition durch die sozialen Kontakte und Familienverbände (siehe 2.2.5) begünstigt. Das Expositionsrisiko für klassische Scrapie der Mufflons untereinander ist als hoch einzuschätzen, sobald ein Mufflon infiziert ist.

Für atypische Scrapie ist eine Expositionsabschätzung schwierig, da wissenschaftliche Erkenntnisse zum Ursprung und zur Übertragung lückenhaft sind (siehe 2.1.3.1). Im Rahmen der Weidenanalyse wurden drei Hotspots festgestellt, an denen atypische Scrapie auftrat. Solange allerdings die Übertragung von atypischer Scrapie auf natürlichen Routen nicht nachgewiesen wird, ist das Expositionsrisiko vernachlässigbar.

Da BSE bei Schafen bislang nicht natürlich vorkommt, besteht kein Risiko der Exposition von Mufflons durch Kontakt zu Schafen. Allerdings müsste im Falle einer Feststellung von BSE bei Schafen in Deutschland eine neue Bewertung vorgenommen werden. Eine Exposition durch kontaminierte Futtermittel ist zu vernachlässigen, da heutzutage nur selten eine Winterfütterung des Muffelwildes erfolgt, keine Mischfuttermittel eingesetzt werden

(siehe 2.2.4) und seit 2003 davon ausgegangen werden kann, dass Futtermittel in Deutschland frei von Kontaminationen mit verbotenen tierischen Proteinen und Fetten sind (BfR 2003).

4.2 Risikobeschreibung

Im durchgeführten Screening konnte keine Form von TSE bei Mufflons festgestellt werden, obwohl gezielt alle Gebiete mit einem erhöhten Vorkommensrisiko und die relevanten Altersklassen beprobt wurden. Die erreichten Nachweisgrenzen bezogen auf die adulten Populationen in den Untersuchungsgebieten lagen bei 0,56 % (RIII) bzw. 1,2 % (RII). Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben weiterhin gezeigt, dass Mufflons den PrP-Genotyp ARQ/ARQ besitzen und demnach genetisch wenig resistent gegen TSE sind. Ein negativer TSE-Test bei Schafen mit einem empfänglichen Genotyp besitzt zudem eine höhere Aussagekraft als ein negativer Test bei nicht empfänglichen Genotypen, denn ein Test bei solchen Tieren wäre höchst wahrscheinlich selbst dann negativ, wenn die Herde infiziert wäre (Durand et al. 2009). Trotzdem kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass Prionkrankheiten mit einer geringeren Prävalenz in den Populationen vorkommen. Die Erhebung stellt eine Stichproben- und keine Vollerhebung dar. Es besteht durchaus das Risiko, das TSE bei Mufflons auftreten könnte, wie auch schon Diringer et al. (1994) sowie Ludwig und Uloth (1998) vermuteten. Allerdings muss das Risiko regional differenziert im Zusammenhang mit dem Expositionsrisiko betrachtet werden. Dabei spielt vor allem die Form der TSE (klassische Scrapie, atypische Scrapie oder BSE) eine entscheidende Rolle.

Klassische Scrapie ist eine Infektionskrankheit, deren Inzidenz von dem Vorkommen des infektiösen Agens in der Umwelt und genetisch empfänglichen Schafen abhängig ist (Thorgeirsdottir et al. 1999). Diese beiden Voraussetzungen treffen auch auf Muffelwildpopulationen in Deutschland zu. Bedingt durch die stammesgeschichtliche Verwandtschaft und den direkten und indirekten Kontakt mit infizierten Schafen wäre eine Übertragung von klassischer Scrapie auf Mufflons möglich. In Hotspots ist die Eintrittswahrscheinlichkeit dieses Risikos als hoch bis wahrscheinlich, in den übrigen Gebieten dagegen als mäßig bis gering einzuschätzen. Das aktuelle Vorkommen von klassischer Scrapie bei Mufflons dürfte – wenn überhaupt – zwar gering sein, die Empfänglichkeit der Mufflons ist jedoch hoch. Der Genotyp ARQ/ARQ repräsentiert bei Schafrassen, in denen VRQ/VRQ nicht auftritt, die höchste Risikoklasse für klassische Scrapie (Hunter et al. 1997b; Dawson et al. 1998). Ausgehend von der unterschiedlichen Empfänglichkeit der Genotypen bei Schafen müsste der Genotyp ARQ/ARQ bei Mufflons analog dazu die höchste Empfänglichkeit für klassische Scrapie aufweisen und zwar bei allen Mufflons gleichermaßen. Daher besteht ein weiterer Risikoaspekt darin, dass sich, begünstigt durch die Sozialstruktur und den einheitlichen Genotyp, klassische Scrapie in frei lebenden Muffelwildpopulationen in Deutschland etablieren könnte. Auf diese Weise könnten Mufflons zu einem Reservoir und einer neuen Infektionsquelle für Hausschafe oder andere Wildtiere

werden. Unter der Voraussetzung, dass klassische Scrapie initial in frei lebenden Muffelwildpopulationen auftritt, ist das Risiko der Verbreitung unter Mufflons untereinander aufgrund des Genotyps als hoch einzuschätzen. Da Mufflons derzeit in kein Monitoring miteinbezogen sind, würde ein Eintrag von Prionen wahrscheinlich erst sehr spät bemerkt werden und somit die Entstehung einer Enzootie begünstigen. Dann wäre, wie die Erfahrungen mit klassischer Scrapie auf Zypern und Island gezeigt haben, von einer hohen Verbreitung und Inzidenz auszugehen und das Habitat wäre für Jahrzehnte kontaminiert (Toumazos 1991; Georgsson et al. 2006). Eine Tilgung wäre mit größten Schwierigkeiten verbunden, da alle Kontroll- und Präventionsmaßnahmen für Scrapie (siehe 2.1.3.8) nicht auf frei lebende Tiere ausgelegt sind. Anhand des durchgeführten Screenings kann eine klassische Scrapie-Enzootie bei Mufflons in Deutschland momentan mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Trotzdem darf die Möglichkeit des Auftretens von Einzelfällen, die aufgrund der Nachweisgrenzen nicht ausgeschlossen werden können, mit den möglichen Konsequenzen nicht vernachlässigt werden.

Sowohl der Ursprung als auch die Übertragung von atypischer Scrapie sind unklar, auch ein spontanes sporadisches Auftreten kommt in Betracht (siehe 2.1.3.1). Momentan können Einzelfälle von atypischer Scrapie bei Mufflons in Deutschland anhand des durchgeführten Screenings nicht ausgeschlossen werden. Ihrem Genotyp ARQ/ARQ nach sind Mufflons, den Erkenntnissen bei Schafen nach zu urteilen, für atypische Scrapie grundsätzlich empfänglich. Allerdings konnte der Haplotyp AF₁₄₁RQ, der als prädisponiert für atypische Scrapie gilt (Moum et al. 2005), bei den untersuchten Mufflons nicht festgestellt werden. Zudem gilt atypische Scrapie als wenig kontagiös, so dass, solange keine neueren Erkenntnisse vorliegen, die Gefährdung ausgehend von atypischer Scrapie als gering bis vernachlässigbar eingestuft werden kann.

Das Risiko in Bezug auf BSE stellt sich folgendermaßen dar: Schafe können experimentell mit BSE infiziert werden (Foster et al. 1993) und eine maternale Übertragung scheint bei Schafen möglich zu sein (Bellworthy et al. 2005). Dabei ist der Genotyp ARQ/ARQ am empfänglichsten für BSE (Houston et al. 2003). Diesen Genotyp besaßen alle untersuchten Mufflons. Da bislang trotz intensiver Überwachung kein Fall von BSE bei Schafen festgestellt wurde, ist das Risiko, dass BSE bei Mufflons auftritt, zu vernachlässigen. Eine neue Bewertung müsste jedoch erfolgen, sobald BSE-Fälle bei Schafen bekannt werden. Da die Symptome von klassischer Scrapie und BSE bei Schafen klinisch nicht klar voneinander abgrenzbar sind (Konold et al. 2008a), besteht das Risiko, dass BSE mit Scrapie verwechselt oder durch Scrapie maskiert wird (Baylis et al. 2002). Daher sollten dem Vorsorgeprinzip nach TSE-positive Tiere nicht in die Lebensmittelkette oder zu anderer Verwertung gelangen, wengleich Scrapie nach derzeitigem Wissenstand als nicht auf den Menschen übertragbar gilt. Pro Jahr gelangen in Deutschland rund 100.000-120.000 kg Mufflonwildbret in die menschliche Nahrungskette (DJV 2008).

4.3 Handlungsoptionen

Bei Abwägung des Handlungsspielraumes muss bedacht werden, dass alle Präventions-, Kontroll- und Tilgungsmaßnahmen bei frei lebenden Mufflons nicht oder nur eingeschränkt durchführbar sind. Die einzelnen Mufflonpopulationen sind in ihrer Größe und Ausdehnung nicht genau bestimmbar, geschweige denn einschränkbar, und die Tiere sind nicht individuell gekennzeichnet. Auch eine Dekontamination des Habitats wäre nicht durchführbar. Insofern sind alle Maßnahmen der VO (EG) 999/2001 bei TSE-Verdacht und -Feststellung bei Schafen hinfällig und nicht direkt auf Mufflons übertragbar. Selbst ein behördlich angeordneter Totalabschuss des Muffelwildes ist bei größeren Populationen nicht einfach zu bewerkstelligen und kaum kontrollierbar. Das Hauptaugenmerk muss deshalb – im Einklang mit der Tiergesundheitsstrategie der EU (EU Commission 2007) – auf dem vorbeugenden Handeln liegen. Vor allem darf eine Enzootie von klassischer Scrapie nicht begünstigt werden. Nach der VO (EG) 999/2001 werden bei Hausschafen zur Verhütung von TSE Überwachungs- und Resistenzzuchtprogramme durchgeführt. Im begrenzten Rahmen wären Präventionsmaßnahmen auch bei Mufflons möglich.

Zumindest eine passive Überwachung (*passive surveillance*) sollte flächendeckend stattfinden, d. h. auffällige Mufflons, die z. B. ZNS-Symptome aufweisen, abgemagert oder blind sind, sollten unverzüglich zur Einsendung an die entsprechenden Landesuntersuchungsämter gelangen. Diese Symptome sind jedoch nicht eindeutig und treten auch bei anderen Erkrankungen des Muffelwildes in Europa wie z. B. der *Western European tickborne encephalitis* (W-TBE) oder der Zeckenparalyse auf (Bago et al. 2002; Konjevic et al. 2007). Allerdings könnte eine passive Überwachung mit erweiterter Diagnostik einen guten allgemeinen Überblick über den Gesundheitsstatus der einzelnen Mufflonpopulationen bieten und wertvolle Informationen zur Epidemiologie von anderen Erkrankungen wie z. B. Bluetongue Disease oder Parasitosen liefern. Untersuchungen der Obex-Region, des Kleinhirns und der retropharyngealen Lymphknoten mit einem hoch sensitiven Schnelltest wären geeignet, um falsch negative TSE-Befunde auszuschließen. Eine TSE-Probenentnahme ist bei Mufflons, ähnlich wie bei Schafen, relativ unkompliziert über das Foramen magnum ohne Beeinträchtigung der Trophäe möglich (siehe 3.1.1.4). Mit diesen Aufgaben müssten die Landesuntersuchungsämter betraut werden. Langfristig gesehen könnte so, in Verbindung mit einer PrP-Genotypisierung der getesteten Mufflons, das Vorkommen von klassischer Scrapie bei Mufflons in Deutschland ausgeschlossen werden (Durand et al. 2009). Der Erfolg einer passiven Überwachung ist jedoch stark abhängig von den Jagdausübungsberechtigten, da sie im Regelfall die einzigen sind, die das Wild lebend und nach der Erlegung zu Gesicht bekommen und beurteilen. Dies unterstreicht die Relevanz, die Jagdausübungsberechtigten für dieses Thema zu sensibilisieren. Es besteht diesbezüglich dringender Aufklärungs- und Nachbesserungsbedarf. Wünschenswert wäre eine bundesweite Einrichtung, die sich mit dem Monitoring von Tierseuchen bei Wildtieren befasst und einheitlich als Kompetenzstelle und

langfristiger Ansprechpartner dient. Wie der letzte Ausbruch der Schweinepest bei Wildschweinen in NRW (LANUV 2009) verdeutlicht, sind auch andere Tierseuchen bei Wildtieren aktuell.

Bei Scrapie-Neuausbrüchen sollte in Zukunft immer eine genaue epidemiologische Ausbruchsuntersuchung erfolgen, die Scrapie-Typ, Genotyp der betroffenen Tiere, geographische Lage der Weiden, mögliches Vorkommen von Mufflons in der Umgebung und Kontaktmöglichkeiten umfasst. Dazu sollte sowohl eine dementsprechende Anpassung des epidemiologischen Fragebogens als auch eine Sensibilisierung der Amtstierärzte erfolgen. Falls Hotspots mit klassischer Scrapie identifiziert werden können, sollte in diesen Gebieten eine aktive Überwachung (*active surveillance*) installiert werden. Diese Überwachung müsste, in Ermangelung eines geeigneten TSE-Lebendtestes, zumindest alle erlegten und tot aufgefundenen Mufflons umfassen, da in solchen Gebieten das Expositions- und Übertragungsrisiko sowie die Auftrittswahrscheinlichkeit am höchsten sind.

Eine Resistenzzucht gegen Scrapie, wie bei Hausschafen üblich, kann bei frei lebenden Mufflons nicht durchgeführt werden. Weder die Möglichkeiten zur Genotypisierung aller Tiere noch einer gezielten Verpaarung sind gegeben. Selbst bei in Gattern gehaltenem Muffelwild ist die Resistenzzucht nicht möglich, da ARQ bislang das einzige festgestellte Allel innerhalb des deutschen Vorkommens darstellt. Eine Züchtung ausgerichtet auf den Haplotyp ARR und die damit verbundene relative genetische Resistenz wäre theoretisch durch Einkreuzung von Muffelwild aus anderen Herkünften möglich. So wurde bei zwei ungarischen Mufflons der Haplotyp ARR festgestellt (Anton et al. 2007). Allerdings könnte dies auf eine Kreuzung mit Hausschafen zurückzuführen sein (Gombojav et al. 2004; Babar et al. 2008). Bei den restlichen 24 ungarischen Mufflons und anderen Untersuchungen (eigene Erhebung; Seo et al. 2001) konnte nur der Genotyp ARQ/ARQ nachgewiesen werden. Eine Einkreuzung von Hausschafen in den Wildbestand kann kein Ziel der Erhaltung der Wildschafe sein und stellt keine Lösung des Problems dar.

Scrapie und BSE sind anzeigepflichtige Tierseuchen, deren Regelung in den Händen der Bundes- und Landesregierungen liegt. Daher werden sowohl das Risikomanagement als auch die Risikokommunikation von politischen Entscheidungen reglementiert. Es bleibt zu hoffen, dass Maßnahmen ergriffen und Empfehlungen weitergeleitet werden, um das Bewusstsein für das potentielle Vorkommen und die Folgen von TSE bei Mufflons zu wecken.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE), sog. Prionkrankheiten, sind letale neurodegenerative Erkrankungen, die sowohl beim Menschen als auch bei Haus- und Wildtieren vorkommen. Nach dem Auftreten von TSE bei Mufflons in England und vor dem Hintergrund, dass Deutschland den zweitgrößten Mufflonbestand der Welt besitzt, stellte sich die Frage, ob TSE auch bei Mufflons in Deutschland vorkommen. Ziel dieser Studie war es zu klären, (1) mit welcher Prävalenz Prionkrankheiten bei Mufflons in Deutschland auftreten und (2) welche genetische Empfänglichkeit die Populationen aufweisen. Dazu wurden ein Populationsscreening und eine Genotypisierung des Prionprotein-Gens (PRNP) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten eine genauere Risikoabschätzung ermöglichen.

Für das Screening wurden alle Landkreise je nach Auftreten von Scrapie-Ausbrüchen bei Hausschafen, der Mufflonstrecke sowie der Schafdichte in verschiedene Risikoklassen unterteilt. Das Screening wurde auf Kreise der Risikoklassen III und II, in denen die Wahrscheinlichkeit TSE bei Mufflons zu entdecken als höher eingeschätzt wurde, beschränkt. Innerhalb dieser Risikogebiete wurden während der Jagdjahre 2006 und 2007 erlegte oder tot aufgefundene Mufflons, die älter als 18 Monate waren, beprobt. Um sowohl klassische als auch atypische Scrapie diagnostizieren zu können, wurden i. d. R. von jedem Tier der Hirnstamm, das Kleinhirn und die retropharyngealen Lymphknoten entnommen und von einem akkreditierten Labor mittels eines hoch sensitiven Schnelltestes (IDEXX HerdChek BSE-Scrapie) untersucht.

Zur Genotypisierung des PRNP wurden Tiere aus jeder in das Screening miteinbezogenen Muffelwildregion per Zufall ausgewählt. Als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion diente für die TSE-Untersuchung entnommenes Gehirngewebe. Mittels PCR wurde ein 862 Basenpaare langes DNA-Fragment amplifiziert, aufgereinigt und anschließend sequenziert. Alle erhaltenen Sequenzen wurden mit verfügbaren Genbankeintragen von Schaf und Mufflon verglichen und in ihre entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Hauptaugenmerk lag auf der 771 Basenpaare umfassenden proteincodierenden Sequenz des PRNP. Besonderes Interesse galt den Codons 136, 154 und 171, da vor allem diese mit der Varianz der Scrapie-Empfänglichkeit assoziiert werden.

Insgesamt wurden 2.453 Gewebeproben von 823 Mufflons aus 38 Landkreisen und einem Stadtstaat untersucht. Das krankheitsassoziierte Prionprotein (PrP^{Sc}) konnte in keiner Gehirn- oder Lymphknotenprobe nachgewiesen werden. Alle untersuchten Mufflons waren TSE-negativ. Zur weiteren Auswertung und Schätzung der Nachweisgrenzen wurden alle Gebiete einer Risikoklasse zusammengefasst. In den Risikogebieten der Klasse III lag die TSE-Prävalenz für adulte Mufflons im Untersuchungszeitraum mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit unter 0,56 %, in Risikogebieten der Klasse II unter 1,2 %.

Im Rahmen der Genotypisierung wurden die Prionprotein-Genotypen von 246 Tieren aus 40 Muffelwildregionen bestimmt. Die Analyse der Sequenzen zeigte, dass – unabhängig von ihrem Herkunftsort – alle Mufflons den gleichen Genotyp ARQ/ARQ aufwiesen. Unter Berücksichtigung der Einbürgerungsgeschichte ist es wahrscheinlich, dass dieser den einzig vorhandenen Genotyp des gesamten Bestandes in Deutschland darstellt.

Die vorliegende Arbeit ist die weltweit umfangreichste Untersuchung zu TSE und Prionprotein-Genotypen an frei lebenden Mufflons. Gegenwärtig gibt es keine Hinweise dafür, dass Prionkrankheiten bei Mufflons in Deutschland vorkommen. Allerdings können Einzelfälle anhand der Nachweisgrenzen nicht ausgeschlossen werden. Das durchgeführte Screening stellt eine Stichproben- und keine Vollerhebung dar. Ihrem Genotyp nach zu urteilen sind Mufflons hochempfindlich für klassische Scrapie und BSE und empfänglich für atypische Scrapie. In einigen Gebieten Deutschlands besteht durch potentiellen direkten und indirekten Kontakt zu Scrapie-positiven Hausschafen ein hohes Expositionsrisiko für Mufflons. Um einen gesunden Wildbestand dauerhaft zu gewährleisten und dem Vorsorgeprinzip zu entsprechen, sollten Mufflons in die TSE-Überwachung miteinbezogen werden. Daher sollten alle klinisch auffälligen Mufflons einer veterinärmedizinischen Untersuchung inklusive eines TSE-Schnelltestes unterzogen und somit in die passive Überwachung integriert werden. In Gebieten mit einem hohen Expositionsrisiko durch klassische Scrapie sollte eine aktive Überwachung, d. h. eine Untersuchung aller erlegten oder tot aufgefundenen Mufflons, erfolgen.

6 SUMMARY

A Survey in the European Mouflon (*Ovis orientalis musimon*) on Transmissible Spongiform Encephalopathies in Germany

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), also known as prion diseases, represent a group of fatal neurodegenerative disorders in humans and several free-ranging and captive mammalian species. A report of scrapie in mouflon from England and the fact that Germany's free-ranging mouflon population is the second largest in the world raised the question if mouflon in Germany are affected by TSEs. Therefore, the aim of this survey was (1) to examine the prevalence of prion diseases in mouflon from Germany, and (2) to determine the genetic susceptibility of the populations. Thus a population screening for prion diseases and a sequence analysis of the prion protein gene (PRNP) were carried out. According to the results, a detailed risk assessment was aimed for.

All administrative districts in Germany were divided into risk categories defined by the number of reported scrapie cases in domestic sheep, the number of hunted mouflon per year, and the abundance of sheep. Screening included districts of risk categories III and II where the probability to discover TSEs in mouflon was highest. Mouflon ewes and rams older than 18 months collected from hunting bags during the hunting seasons 2006/2007 and 2007/2008 were sampled. In order to detect classical and atypical scrapie cases, samples were taken from brain stem, cerebellum and retropharyngeal lymph nodes. The samples were analysed by an accredited laboratory using a highly sensitive rapid test (IDEXX HerdChek BSE-scrapie).

Mouflon of all screening districts were chosen at random for PRNP genotyping. Brain tissue samples were used for DNA extraction and subsequent PCR amplification and sequencing of an 862 base pair long DNA fragment. All sequences received were compared with gene bank submissions of sheep and mouflon and translated into their amino acid sequences. Focus was the 771 base pair long prion protein coding sequence, especially codons 136, 154, and 171, since these are associated to TSE susceptibility.

A total of 2,453 tissue samples of 823 mouflon from 39 administrative districts were analysed. Protease resistant prion protein (PrP^{Sc}) was not detected in any of the examined brain and lymph node samples; all mouflon were TSE negative. All samples from districts of the same risk category were pooled for further analysis and estimation of the detection limits with a probability of 95 percent. TSE prevalence in adult mouflon during the sample period was less than 0.56 % in districts of risk category III and 1.2 % in districts of risk category II.

Genotyping of the PRNP sequence of 246 mouflon was performed. The sequence-based analysis showed that all tested mouflon carried the same ARQ/ARQ genotype. Thus the genotype is independent of the geographic origin and appears to reflect naturalisation history.

Accordingly, it can be assumed that ARQ/ARQ is the only existing genotype in mouflon in Germany.

This study represents the most comprehensive survey on TSE and prion protein genotypes in free-ranging mouflon. At present, evidence of prion diseases in the German mouflon population has not been found. However, it cannot be entirely ruled out that prion diseases are present in the populations at very low prevalence, since a sample survey was performed. Results of the genotyping indicate that mouflon are genetically highly susceptible to classical scrapie and BSE and susceptible to atypical scrapie. In addition a potential direct and indirect contact to scrapie-infected domestic sheep results in a high exposure risk for mouflon in certain areas. Mouflon should be included in the TSE surveillance to ascertain a sound free-ranging population and to meet the precaution principle. Passive surveillance should be performed on all clinically conspicuous mouflon, including a veterinary examination and a rapid test. Active surveillance, i.e. examination of all hunted and fallen mouflon, is advisable for all areas with a high exposure risk to classical scrapie.

7 LITERATUR

- Alper T, Cramp WA, Haig DA und Clarke MC (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acids? *Nature* 214, 764-766.
- Alper T, Haig DA und Clarke MC (1978). The scrapie agent: evidence against its dependence for replication on intrinsic nucleic acid. *Journal of General Virology* 41, 503-516.
- Andreoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, van Keulen L, Schelcher F, Elsen JM und Lantier F (2000). Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology* 81, 3115-3126.
- Andreoletti O, Lacroux C, Chabert A, Monnereau L, Tabouret G, Lantier F, Berthon P, Eychenne F, Lafond-Benestad, S, Elsen JM und Schelcher F (2002). PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *Journal of General Virology* 83, 2607-2616.
- Anton I, Zsolnai A, Fesüs L, Kovacs A, Kukovics S, Molnar A, Olath J und Javor A (2007). Scrapie in sheep 4. Prion genotype frequencies in mouflons and domestic hair and shedding wool sheep. *Hungarian Veterinary Journal* 129, 610-614.
- Arsac JN, Andreoletti O, Bilheude JM, Lacroux C, Benestad SL und Baron T (2007). Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerging Infectious Diseases* 13, 58-65.
- Babar ME, Farid A, Benkel BF, Ahmad J, Sajid IA, Imran M, Hussain T und Nadeem A (2008). Genetic variability at seven codons of the prion protein gene in nine Pakistani sheep breeds. *Journal of Genetics* 87, 187-190.
- Babar ME, Farid A, Benkel BF, Ahmad J, Nadeem A und Imran M (2009). Frequencies of PrP genotypes and their implication for breeding against scrapie susceptibility in nine Pakistani sheep breeds. *Molecular Biology Reports* 36, 561-565.
- Bago Z, Bauder B, Kolodziejek J, Nowotny N und Weissenböck H (2002). Tickborne encephalitis in a mouflon (*Ovis ammon musimon*). *Veterinary Record* 150, 218-220.
- Barry RA, Kent SB, McKinley MP, Meyer RK, DeArmond SJ, Hood LE und Prusiner SB (1986). Scrapie and cellular prion proteins share polypeptide epitopes. *Journal of Infectious Diseases* 153, 848-854.
- Bastian FO (2005). Spiroplasma as a candidate agent for the transmissible spongiform encephalopathies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64, 833-838.
- Baylis M, Houston F, Kao RR, McLean AR, Hunter N und Gravenor MB (2002). BSE – a wolf in sheep’s clothing? *Trends in Microbiology* 10, 563-570.

- Begara-McGorum I, Gonzalez L, Simmons M, Hunter N, Houston F und Jeffrey M (2002). Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *Journal of Comparative Pathology* 127, 59-68.
- Bellworthy SJ, Dexter C, Stack M, Chaplin M, Hawkins SA, Simmons MM, Jeffrey M, Gonzalez L und Hill P (2005). Natural transmission of BSE between sheep within an experimental flock. *Veterinary Record* 157, 206.
- Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, Bos-de Ruijter J, Gielkens AL und Smits MA (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *Journal of General Virology* 76, 509-517.
- Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA und Bratberg B (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Veterinary Record* 153, 202-208.
- Benestad SL, Arsac JN, Goldmann W und Nöremark M (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Veterinary Research* 39:19.
- Berger A, Scheibe KM, Scheibe A und Eichhorn K (2003). Aktivitäts- und Äsungsmuster beim Mufflon im Jahresverlauf. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 28, 375-382.
- BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2003). Anhebung der Altersgrenze für BSE-Tests bei Schlachtrindern von 24 auf 30 Monate. Stellungnahme des BfR vom 22.12.2003. http://www.bfr.bund.de/cm/208/anhebung_der_altersgrenze_fuer_bse_tests.pdf. 21.05.2009.
- Billinis C, Psychas V, Leontides L, Spyrou V, Argyroudou S, Vlemmas I, Leontides S, Sklaviadis T und Papadopoulos O (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *Journal of General Virology* 85, 547-554.
- BJagdG (1976). Bundesjagdgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 29.09.1976. Zuletzt geändert am 26.03.2008. *Bundesgesetzblatt* 1, 2849.
- Blanchong JA, Samuel MD, Scribner KT, Weckworth BV, Langenberg JA und Filcek KB (2008). Landscape genetics and the spatial distribution of chronic wasting disease. *Biology Letters* 4, 130-133.
- BMELV (2007). Durchgeführte Untersuchungen auf Scrapie an Schafen und Ziegen 2006. http://www.bmelv.de/cln_045/nn_753460/DE/07-SchutzderTiere/Tierseuchen/Scrapie/UntersuchungenScrapieSchafeZiegen2006.html. 05.02.2009.
- BMELV (2008). Durchgeführte Untersuchungen auf Scrapie an Schafen und Ziegen 2007. http://www.bmelv.de/cln_045/nn_753460/DE/07-SchutzderTiere/Tierseuchen/Scrapie/UntersuchungenScrapieSchafeZiegen2007.html. 05.02.2009.

- BMELV (2009). Anzahl der bestätigten TSE (Scrapie)-Fälle in Deutschland seit 1990. http://www.bmelv.de/cln_044/nn_753460/DE/07-SchutzderTiere/Tierseuchen/Scrapie/TSE-FaelleGesamt.html__nnn=true. 26.01.2009.
- Borrmann K (1996). Muffelwidder auf Abwegen. *Unsere Jagd* 10/96, 40-41.
- Bosanquet FD, Daniel PM und Parry HB (1956). Myopathy in sheep; its relationship to scrapie and to dermatomyositis and muscular dystrophy. *Lancet* 271, 737-746.
- Bossers A, Belt PB, Raymond GJ, Caughey B, De Vries R und Smits MA (1997). Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the *in vitro* conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4931-4936.
- Böttcher W (2003). Die gegenwärtige Verteilung der Vorkommensgebiete „Muffelwild“ in Deutschland nach den Rechtsverordnungen der einzelnen Bundesländer im Jahr 2002. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 28, 191-198.
- Böttcher W und Briederemann L (1989). Der Einfluß von Verhaltensweisen des Muffelwildes auf seine Bejagung. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 16, 43-48.
- Bozzetta E, Nappi R, Crudeli S, Loprevite D, Mellis PG, Gastaldi D, Meloni D, Mazza M, Colussi S, Ingravalle F, Nonno R und Ligios C (2008). TSE active surveillance in small ruminants: how much can we trust rapid tests? *Prion 2008 Book of Abstracts*, 153.
- Briederemann L (1989). Beobachtungen zum Geburtsverhalten und zur Mutterfamilienbildung beim Mufflon (*Ovis ammon musimon* Schreber, 1782). *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 16, 117-126.
- Briederemann L (1992). Ergebnisse von Untersuchungen zur Reproduktion des Mufflons (*Ovis ammon musimon*). *Zeitschrift für Jagdwissenschaften* 38, 16-25.
- Briederemann L (1993). Unser Muffelwild. 1. Auflage, Morschen-Heina.
- Brotherston JG, Renwick CC, Stamp JT und Zlotnik I (1968). Spread of scrapie by contact to goats and sheep. *Journal of Comparative Pathology* 78, 9-17.
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D und Kretzschmar H (1997). The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature* 390, 684-687.
- Brown P und Gajdusek DC (1991). Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* 337, 269-270.
- Bruce ME, Nonno R, Foster J, Goldmann W, Di Bari M, Esposito E, Benestad SL, Hunter N und Agrimi U (2007). Nor98-like sheep scrapie in the United Kingdom in 1989. *Veterinary Record* 160, 665-666.

- Burger D und Hartsough GR (1965). Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *Journal of Infectious Diseases* 115, 393-399.
- Buschmann A, Biacabe AG, Ziegler U, Bencsik A, Madec JY, Erhardt G, Lühken G, Baron T und Groschup MH (2004a). Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *Journal of Virological Methods* 117, 27-36.
- Buschmann A, Lühken G, Schultz J, Erhardt G und Groschup MH (2004b). Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrP^{ARR/ARR}). *Journal of General Virology* 85, 2727-2733.
- Buschmann A, Ziegler U und Groschup MH (2004c). Standardization of BSE rapid test performances and experiences gathered during the implementation of large-scale testing. *Accreditation and Quality Assurance* 9, 191-197.
- Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M und Weissmann C (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.
- Cameron AR und Baldock FC (1998). A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Preventive Veterinary Medicine* 34, 1-17.
- Cannon RM und Roe RT (1982). *Livestock disease surveys – a field manual for veterinarians*. 1. Auflage. Canberra.
- Capucchio MT, Guarda F, Pozzato N, Coppolino S, Caracappa S und Di Marco V (2001). Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: a comparative study in sheep and goats. *Journal of Veterinary Medicine. A Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 48, 23-31.
- Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, Barker JN und Trembath RC (2004). A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Human Molecular Genetics* 13, 2361-2368.
- Caramelli M, Ru G, Casalone C, Bozetta E, Acutis PL, Calella A und Forloni G (2001). Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. *Veterinary Record* 148, 531-536.
- Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, Garon C und Haase A (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315, 331-333.
- Clark AM und Moar JA (1992). Scrapie: a clinical assessment. *Veterinary Record* 130, 377-378.

- Clark AM, Dawson M und Scott AC (1994). Scrapie associated fibrils in found dead sheep. *Veterinary Record* 134, 650-651.
- Cline J, Braman JC und Hogrefe HH (1996). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 24, 3546-3551.
- Cloucard C, Beaudry P, Elsen JM, Milan D, Dussaucy M, Bounneau C, Schelcher F, Chatelain J, Launay JM und Laplanche JL (1995). Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *Journal of General Virology* 76, 2097-2101.
- Codex Alimentarius Commission (2007). Working principles for risk analysis for food safety for application by governments. CAC/GL62-2007. 1. Auflage. Rom.
- CRL TSE European Community Reference Laboratory (2007). Fresh tissue diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in cattle and sheep. http://www.defra.gov.uk/vla/science/sci_tse_rl_diagnosis.htm. 14.11.2008.
- Crozet C, Beranger F und Lehmann S (2008). Cellular pathogenesis in prion diseases. *Veterinary Research* 39:44.
- Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD und Hunter N (1998). Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Veterinary Record* 142, 623-625.
- De Bosschere H, Roels S, Benestad SL und Vanopdenbosch E (2004). Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Veterinary Record* 155, 707-708.
- Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra) 2003. National Scrapie Plan for Great Britain. <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/othertses/scrapie/nsp.htm>. 25.03.2009.
- Detwiler LA und Baylis M (2003). The epidemiology of scrapie. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 22, 121-143.
- Dickinson AG, Fraser H und Outram GW (1975). Scrapie incubation time can exceed natural lifespan. *Nature* 256, 732-733.
- Dickinson AG, Stamp JT und Renwick CC (1974). Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *Journal of Comparative Pathology* 84, 19-25.
- Dickinson AG und Stamp JT (1969). Experimental scrapie in Cheviot and Suffolk sheep. *Journal of Comparative Pathology* 79, 23-26.
- Dickinson AG, Meikle VM und Fraser H (1968a). Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *Journal of Comparative Pathology* 78, 293-299.

- Dickinson AG, Stamp JT, Renwick CC und Rennie JC (1968b). Some factors controlling the incidence of scrapie in cheviot sheep injected with a cheviot-passaged scrapie agent. *Journal of Comparative Pathology* 78, 313-321.
- Diener TO (1972). Is the scrapie agent a viroid? *Nature: New Biology* 235, 218-219.
- Diringer H, Beekes M und Oberdieck U (1994). The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Annals of the New York Academy of Sciences* 724, 246-258.
- DJV Deutscher Jagdschutz Verband Jagdonline (2008). Wildbretaufkommen im Jagdjahr 2006 / 2007 und 2005 / 2006 Bundesrepublik Deutschland. http://www.jagd-online.de/datenfakten/?meta_id=250. 09.02.2009.
- Drescher-Karden U (1976). Untersuchungen am Verdauungstrakt von Reh, Damhirsch und Mufflon. Mitteilung 1: Gewichtserhebungen und Kapazitätsmessungen am Verdauungstrakt, insbesondere am Pansen-Haubenraum von Reh, Damhirsch und Mufflon. *Zeitschrift für Jagdwissenschaften* 22, 184-190.
- Drögemüller C, De Vries F, Hamann H, Leeb T und Distl O (2004). Breeding German sheep for resistance. *Veterinary Record* 154, 257-260.
- Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J und Gejman PV (2003). Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Human Molecular Genetics* 12, 205-216.
- Dubois M, Bon R, Cransac N und Maublanc ML (1994). Dispersal patterns of Corsican mouflon ewes: importance of age and proximate influences. *Applied Animal Behaviour Science* 42, 29-40.
- Dunning AM, Talmud P und Humphries SE (1988). Errors in the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 16, 10393.
- Durand B, Martinez MJ, Calavas D und Ducrot C (2009). Comparison of strategies for substantiating freedom from scrapie in a sheep flock. *BMC Veterinary Research* 5:16.
- Eckert KA und Kunkel TA (1991). DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods and Applications* 1, 17-24.
- EFSA (2005a). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on classification of atypical transmissible spongiform encephalopathy (TSE) cases in small ruminants. *EFSA Journal* 276, 1-30.
- EFSA (2005b). Scientific report of the European Food Safety Authority on the evaluation of rapid post mortem TSE tests intended for small ruminants. *EFSA Scientific Report* 31, 1-17.

- EFSA (2005c). Scientific report of the European Food Safety Authority on the evaluation of rapid post mortem TSE tests intended for small ruminants 2nd. EFSA Scientific Report 49, 1-16.
- Eloit M, Adjou K, Culpier M, Fontaine JJ, Hamel R, Lilin T, Messiaen S, Andreoletti O, Baron T, Bencsik A, Biacabe AG, Beringue V, Laude H, Le Dur A, Vilotte JL, Comoy E, Deslys JP, Grassi J, Simon S, Lantier F und Sarradin P (2005). BSE agent signatures in a goat. *Veterinary Record* 156, 523-524.
- Epstein V, Pointing S und Halfacre S (2005). Atypical scrapie in the Falkland Islands. *Veterinary Record* 157, 667-668.
- Ersdal C, Ulvund MJ, Benestad SL und Tranulis MA (2003). Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Veterinary Pathology* 40, 164-174.
- EU Commission (2000). Communication from the Commission on the precautionary principle. 02.02.2000, Brüssel, COM(2000) 1.
- EU Commission (2007). Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions on a new animal health strategy for the European Union (2007-2013) where "prevention is better than cure". 19.09.2007, Brüssel, COM(2007) 539.
- EU Food Safety (2009). Annual reports of Member states on BSE and scrapie 2001-2007. http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/annual_reps_en.htm. 26.01.2009.
- Fediaevsky A, Tongue SC, Nöremark M, Calavas D, Ru G und 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.
- Field EJ (1966). Transmission experiments with multiple sclerosis: an interim report. *British Medical Journal* 2, 564-565.
- Fielitz U und Piegert H (2003). Zum Territorialverhalten des Muffelwildes im Ostharz. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 28, 417-425.
- Finnzymes (2008). Advantages of Phusion[®] DNA polymerases. http://www.finnzymes.com/pcr/phusion_advantages.html#fidelity. 29.10.2008.
- Fitzsimmons WM und Pattison IH (1968). Unsuccessful attempts to transmit scrapie by nematode parasites. *Research in Veterinary Science* 9, 281-283.
- Foster JD, Hope J und Fraser H (1993). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Veterinary Record* 133, 339-341.

- Frisina MR und Frisina M (1998). Phenotype evaluation of free-ranging European mouflon (*Ovis orientalis musimon*) on Kahuku Ranch, South Point Hawaii. Northern Wild Sheep and Goat Council 11, 229-234.
- Garcia-Crespo D, Oporto B, Gomez N, Nagore D, Benedicto L, Juste RA und Hurtado A (2004). PrP polymorphisms in Basque sheep breeds determined by PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time PCR. Veterinary Record 154, 717-722.
- Garel M, Loison A, Gaillard JM, Cugnasse JM und Maillard D (2004). The effects of a severe drought on mouflon lamb survival. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 271, 471-473.
- Gärtner S, Uloth W, Stubbe C, Böttcher W und Müller KH (2003). Status und Entwicklung der Muffelwildpopulationen zur Jahrtausendwende in Thüringen. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung 28, 267-273.
- Gavier-Widen D, Nöremark M, Benestad S, Simmons M, Renström L, Bratberg B, Elvander M und Hard af Segerstad C (2004). Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 16, 562-567.
- Gavier-Widen D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A und Simmons M (2005). Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 17, 509-527.
- Genesis-Online Datenbank, Statistisches Bundesamt Deutschland (2006). Code 11111-0002 Feststellung des Gebietsstands der Kreise Stichtag 31.12.2005. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/logon>. 10.11.2008.
- Genesis-Online Datenbank, Statistisches Bundesamt Deutschland (2008). Code 41311-0001 Allgemeine Erhebung über die Viehbestände 2007. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/logon>. 05.02.2009.
- Georgsson G, Sigurdarson S und Brown P (2006). Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. Journal of General Virology 87, 3737-3740.
- Goldmann W (2008). PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. Veterinary Research 39:30.
- Goldmann W, Hunter N, Foster JD, Salbaum JM, Beyreuther K und Hope J (1990). Two alleles of a neuronal protein gene linked to scrapie in sheep. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 2476-2480.
- Goldmann W, Hunter N, Benson G, Foster JD und Hope J (1991). Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the *Sip* gene. Journal of General Virology 72, 2411-2417.

- Goldmann W, Houston F, Stewart P, Perucchini M, Foster J und Hunter N (2006). Ovine prion protein variant A136R154L168Q171 increases resistance to experimental challenge with bovine spongiform encephalopathy agent. *Journal of General Virology* 87, 3741-3745.
- Gombojav A, Ishiguro N, Horiuchi M, Serjmyadag D, Byambaa B und Shinagawa M (2003). Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *Journal of Veterinary Medical Science* 65, 75-81.
- Gombojav A, Ishiguro N, Horiuchi M und Shinagawa M (2004). Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds. *Journal of Veterinary Medical Science* 66, 1293-1295.
- Gonzalez L, Dagleish MP, Martin S, Dexter G, Steele P, Finlayson J und Jeffrey M (2008). Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Veterinary Record* 162, 397-403.
- Gonzalez-Romero D, Barria MA, Leon P, Morales R und Soto C (2008). Detection of infectious prions in urine. *FEBS Letters* 582, 3161-3166.
- Gordon WS (1946). Advances in veterinary research. *Veterinary Record* 58, 516-523.
- Grauer A, Greiser G, Heyen B, Klein R, Muchin A, Strauß E, Wenzelides L und Winter A (2008). Wildtier-Informationssystem der Länder Deutschlands. Status und Entwicklung ausgewählter Wildtierarten in Deutschland, Jahresbericht 2007. 1. Auflage. Bonn.
- Green DM, Rio Vilas VJ, Birch CP, Johnson J, Kiss IZ, McCarthy ND und Kao RR (2007). Demographic risk factors for classical and atypical scrapie in Great Britain. *Journal of General Virology* 88, 3486-3492.
- Gregori L, Kovacs GG, Alexeeva I, Budka H und Rohwer RG (2008). Excretion of transmissible spongiform encephalopathy infectivity in urine. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1406-1412.
- Gretschel A, Buschmann A, Eiden M, Ziegler U, Lühken G, Erhardt G und Groschup MH (2005). Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *Journal of Veterinary Medicine B* 52, 55-63.
- Griffith JS (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043-1044.
- Groschup MH und Kuczius T (2001). Die TSE-Erregerstämme. In: Hörnlimann B, Riesmer D und Kretzschmar H (Hrsg.). *Prionen und Prionkrankheiten*. 1. Auflage, Berlin, 117-131.

- Groschup MH, Lacroux C, Buschmann A, Lühken G, Mathey J, Eiden M, Lugan S, Hoffmann C, Espinosa JC, Baron T, Torres JM, Erhardt G und Androletti O (2007). Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerging Infectious Diseases* 13, 1201-1207.
- Grubb P (2005). Order Artiodactyla. In: Wilson DE und Reeder DM (Hrsg.). *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference*. 3. Auflage, Baltimore, 637-722.
- Gruner L, Elsen JM, Vu Tien Khang J, Eychenne F, Caritez JC, Jacquiet P, Androletti O, Sarradin P, Cortet J, Richer N und Leroux H (2004). Nematode parasites and scrapie: experiments in sheep and mice. *Parasitology Research* 93, 493-498.
- Guilhem C, Bideau E, Gerard JF und Maublanc ML (2000). Agonistic and proximity patterns in enclosed mouflon (*Ovis gmelini*) ewes in relation to age, reproductive status and kinship. *Behavioural Processes* 50, 101-112.
- Guo X, Kupfer DM, Fitch GQ, Roe BA und DeSilva U (2003). Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP) gene. *Animal Genetics* 34, 303-305.
- Habermehl KH (1985). *Altersbestimmung bei Wild- und Pelztieren*. 2. Auflage, Hamburg und Berlin.
- Hadjisterkotis N (1999). Gefahren für das Zypriische Mufflon aufgrund des Vorkommens als einzelne Restpopulationen in einem einzigen Verbreitungsgebiet. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 45, 27-34.
- Hadlow WJ, Kennedy RC und Race RE (1982). Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *Journal of Infectious Diseases* 146, 657-664.
- Haralambiev H, Ivanov IV, Vesselinova A und Mermerski M (1973). An attempt to induce scrapie in local sheep in Bulgaria. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 20, 701-709.
- Harcourt RA und Anderson MA (1974). Naturally-occurring scrapie in goats. *Veterinary Record* 86, 504.
- Hartl GB (1990). Genetische Variabilität beim Mufflon (*Ovis ammon musimon*). *Zeitschrift für Jagdwissenschaften* 36, 95-103.
- Hartsough GR und Burger D (1965). Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *Journal of Infectious Diseases* 115, 387-392.
- Heggebo R, Press CM, Gunnes G, Gonzalez L und Jeffrey M (2002). Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. *Journal of General Virology* 83, 479-489.

- Heggebo R, Gonzalez L, Press CM, Gunnes G, Espenes A und Jeffrey M (2003). Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *Journal of General Virology* 84, 1327-1338.
- Hepppner FL, Christ AD, Klein MA, Prinz M, Fried M, Kraehenbuhl JP und Aguzzi A (2001). Transepithelial prion transport by M cells. *Nature Medicine* 7, 976-977.
- Hermes JW und Kretzschmar H (2001). Die Funktion des zellulären Prion-Proteins PrP^C als kupferbindendes Protein an der Synapse. In: Hörnlimann B, Riesmer D und Kretzschmar H (Hrsg.). *Prionen und Prionkrankheiten*. 1. Auflage, Berlin, 74-80.
- Hewicker-Trautwein M, Hadlow WJ, Detwiler L, Williams ES und Pohlenz J (2001). Die Pathologie der Prionkrankheiten beim Tier. In: Hörnlimann B, Riesmer D und Kretzschmar H (Hrsg.). *Prionen und Prionkrankheiten*. 1. Auflage, Berlin, 225-230.
- Hofmann RR (1984). Feeding habits of mouflon (*Ovis ammon musimon*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*) in relation to the morphophysiological adaption of their digestive tracts. *Northern Wild Sheep and Goat Council* 4, 341- 355.
- Hofmann RR (1989). Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* 78, 443-457.
- Hoinville LJ (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 15, 827-852.
- Hopp P, Ulvund MJ und Jarp J (2001). A case-control study on scrapie in Norwegian sheep flocks. *Preventive Veterinary Medicine* 51, 183-198.
- Hopp P, Omer MK und Heier BT (2006). A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. *Journal of General Virology* 87, 3729-3736.
- Houston F, Goldmann W, Chong A, Jeffrey M, Gonzalez L, Koster J, Parnham D und Hunter N (2003). BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature* 423, 498.
- Houston F, McCutcheon S, Goldmann W, Chong A, Foster J, Sisó S, Gonzalez L, Jeffrey M und Hunter N (2008). Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood* 112, 4739-4745.
- Hüttner K, Kiupel H und Dey E (2004). Angewandte Risikobewertung zur Bewirtschaftung von Stallanlagen und Weideflächen in einem von Scrapie betroffenen Bestand in Mecklenburg-Vorpommern. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 117, 226-229.
- Hunter N (2001). Der PrP-Genotyp als Marker für die Scrapie-Empfänglichkeit. In: Hörnlimann B, Riesmer D und Kretzschmar H (Hrsg.). *Prionen und Prionkrankheiten*. 1. Auflage, Berlin, 502-505.

- Hunter N, Foster JD, Dickinson AG und Hope J (1989). Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep. *Veterinary Record* 124, 364-366.
- Hunter N, Foster JD, Benson G und Hope J (1991). Restriction fragment length polymorphisms of the scrapie-associated fibril protein (PrP) gene and their association with susceptibility to natural scrapie in British sheep. *Journal of General Virology* 72, 1287-1292.
- Hunter N, Goldmann W, Smith G und Hope J (1994). The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Archives of Virology* 137, 171-177.
- Hunter N, Foster JD, Goldmann W, Stear MJ, Hope J und Bostock C (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Archives of Virology* 141, 809-824.
- Hunter N, Cairns D, Foster JD, Smith G, Goldmann W und Donnelly K (1997a). Is scrapie solely a genetic disease? *Nature* 386, 137.
- Hunter N, Goldmann W, Foster JD, Cairns D und Smith G (1997b). Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. *Veterinary Record* 141, 137-140.
- Iannuzzi L, Palomba R, Di Meo GP, Perucatti A und Ferrara L (1998). Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 81, 202-204.
- Ikeda T, Horiuchi M, Ishiguro N, Muramatsu Y, Grathwohl KU und Shinagawa M (1995). Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *Journal of General Virology* 76, 2577-2581.
- JagdzeitV (1977). Verordnung über die Jagdzeiten vom 02.04.1977. Zuletzt geändert am 25.04.2002. *Bundesgesetzblatt* 1, 531.
- Jeffrey M und Gonzalez L (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 33, 373-394.
- Johnson CJ, Phillips KE, Schramm PT, McKenzie D, Aiken JM und Pedersen JA (2006). Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathogens* 2:e32.
- Johnson ML, Evoniuk JM, Stoltenow CL, O'Rourke KI und Redmer DA (2007). Development of an assay to determine single nucleotide polymorphisms in the prion gene for the genetic diagnosis of relative susceptibility to classical scrapie in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 73-77.

- Kaeuffer R, Coltman DW, Chapuis JL, Pontier D und Reale D (2007). Unexpected heterozygosity in an island mouflon population founded by a single pair of individuals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 274, 527-533.
- Kirkwood JK (2001). Portrait der Prionkrankheiten bei Zootieren. In: Hörnlimann B, Riesmer D und Kretzschmar H (Hrsg.). *Prionen und Prionkrankheiten*. 1. Auflage, Berlin, 181-185.
- Kirkwood JK, Wells GA, Wilesmith JW, Cunningham AA und Jackson SI (1990). Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Veterinary Record* 127, 418-420.
- Kirkwood JK und Cunningham AA (1994). Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Veterinary Record* 135, 296-303.
- Konjevic D, Janicki Z, Severin K, Stanko M, Zivicnjak T, Slavica A und Staresina V (2007). An outbreak of tick paralysis in free-ranging mouflon (*Ovis ammon musimon*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38, 585-587.
- Konold T, Davis A, Bone G, Bracegirdle J, Everitt S, Chaplin M, Saunders GC, Cawthraw S und Simmons MM (2007). Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. *BMC Veterinary Research* 3:2.
- Konold T, Bone G, Vidal-Diez A, Tortosa R, Davis A, Dexter G, Hill P, Jeffrey M, Simmons MM, Chaplin MJ, Bellworthy SJ und Berthelin-Baker C (2008a). Pruritus is a common feature in sheep infected with the BSE agent. *BMC Veterinary Research* 4:16.
- Konold T, Moore SJ, Bellworthy SJ und Simmons HA (2008b). Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Veterinary Research* 4:14.
- Kreienbrock L und Schach S (2005). *Epidemiologische Methoden*. 4. Auflage, München.
- Kriebel A (2003). Das Muffelwild in Sachsen-Anhalt. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 28, 245-249.
- Kutzer T, Pfeiffer I und Brenig B (2002). Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 119, 201-208.
- Kwok PY, Carlson C, Yager TD, Ankener W und Nickerson DA (1994). Comparative analysis of human DNA variations by fluorescence-based sequencing of PCR products. *Genomics* 23, 138-144.
- Kwok PY und Duan S (2003). SNP discovery by direct DNA sequencing. In: Kwok PY. *Single nucleotide polymorphisms – methods and protocols*. 1. Auflage, Totowa, 71-84.

- Lacroux C, Corbiere F, Tabouret G, Lugan S, Costes P, Mathey J, Delmas JM, Weisbecker JL, Foucras G, Cassard H, Elsen JM, Schelcher F und Andreoletti O (2007). Dynamics and genetics of PrP^{Sc} placental accumulation in sheep. *Journal of General Virology* 88, 1056-1061.
- Lacroux C, Simon S, Benestad SL, Maillet S, Mathey J, Lugan S, Corbière F, Cassard H, Costes P, Bergonier D, Weisbecker JL, Moldal T, Simmons H, Lantier F, Feraudet-Tarisse C, Morel N, Schelcher F, Grassi J und Andréoletti O (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathogens* 4:e1000238.
- Laegreid WW, Clawson ML, Heaton MP, Green BT, O'Rourke KI und Knowles DP (2008). Scrapie resistance in ARQ sheep. *Journal of Virology* 82, 10318-10320.
- Langbein J (2003). Untersuchungen zu Verhaltensbudgets und zur Stabilität von Verhaltensrhythmen bei freilebendem Muffelwild. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 28, 365-373.
- Langbein J, Scheibe KM und Eichhorn K (1997). Verhaltensmuster und Budgets einzelner Verhaltensweisen bei freilebenden Wildschafen (*Ovis ammon musimon* PALLAS, 1811). *Zeitschrift für Jagdwissenschaften* 43, 35-47.
- Langeveld JP, Jacobs JG, Erkens JH, Bossers A, van Zijderveld FG und van Keulen LJ (2006). Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Veterinary Research* 2:19.
- LANUV Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (2009). Schweinepest bei Wildschweinen in NRW. <http://www.lanuv.nrw.de/agrar/tierseuchen/schweinepest.htm>. 06.03.2009.
- Laplanche JL, Chatelain J, Westaway D, Thomas S, Dussaucy M, Brugere-Picoux J und Launay JM (1993). PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 15, 30-37.
- Le Dur A, Beringue V, Andreoletti A, Reine F, Lai TL, Baron T, Bratberg B, Vilotte JL, Sarradin P, Benestad SL und Laude H (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16031-16036.
- Lee IY, Westaway D, Smit AF, Wang K, Seto J, Chen L, Acharya C, Ankener M, Baskin D, Cooper C, Yao H, Prusiner SB und Hood LE (1998). Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Research* 8, 1022-1037.

- Leopoldt JG (1759). Der Trab ist auch eine Krankheit der Schaaf, und ist ansteckend. Von denen mancherlen Krankheiten des Schaafviehes. In: Christian Friedrich Günthern. Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirtschaft. Fünf Theile. Berlin und Glogau.
- Le Pendu Y, Briedermann L, Gerard JF und Maublanc ML (1995). Inter-individual associations and social structure of a mouflon population (*Ovis orientalis musimon*). *Behavioural Processes* 34, 67-80.
- Ligos C, Jeffrey M, Ryder SJ, Bellworthy SJ und Simmons MM (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *Journal of Comparative Pathology* 127, 45-57.
- Lincoln GA (1998). Reproductive seasonality and maturation throughout the complete life-cycle in mouflon ram (*Ovis musimon*). *Animal Reproduction Science* 53, 87-105.
- Ludwig A und Knoll J (1998). Multivariate morphometrische Analysen der Gattung *Ovis* Linnaeus, 1758 (Mammalia, Caprinae). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 63, 210-219.
- Ludwig A und Benecke N (2003). Zur Systematik und Paläontologie der Gattung *Ovis*. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 28, 35-45.
- Ludwig C und Uloth W (1998). Slow-Virusinfektionen beim Muffelwild (*Ovis ammon musimon*) – Vorkommen, Forschungsbedarf und Mitarbeit. *Beiträge zur jagd- und Wildforschung* 23, 139-142.
- Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA und Mathur EJ (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108, 1-6.
- Lupi O (2003). Could ectoparasites act as vectors for prion diseases? *International Journal of Dermatology* 42, 425-429.
- Lühken G, Buschmann A, Groschup MH und Erhardt G (2004). Prion protein allele A136H154Q171 is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Archives of Virology* 149, 1571-1580.
- Lühken G, Buschmann A, Brandt H, Eiden M, Groschup MH und Erhardt G (2007). Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Veterinary Research* 38, 65-80.
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I und Hope J (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Molecular Neurobiology* 8, 121-127.
- Matthews D, Simmons MM, Stack M und Wells GA (2008). Scrapie. In: OIE (Hrsg.). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 6. Auflage, Paris, 1048-1057.

- McGowan JP (1922). Scrapie in sheep. *Scottish Journal of Agriculture* 5, 365-375.
- McIntyre KM, Gubbins S, Goldmann W, Hunter N und Baylis M (2008). Epidemiological characteristics of classical scrapie outbreaks in 30 sheep flocks in the United Kingdom. *PloS One* 3:e3994.
- Menzel K (2003). Herrmann Löns, Oscar Louis Tesdorpf und das Muffelwild – Ein jagdhistorischer Disput. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 28, 47-53.
- Michel G, Elze K und Uloth W (1982). Eierstock- und Gebärmutteruntersuchungen bei Mufflons zwecks Ermittlung der Fruchtbarkeitssituation in zwei Populationen. *Wildbiologie und Wildbewirtschaftung* 2, 282-285.
- Mishra RS, Basu S, Gu Y, Luo X, Zou WQ, Mishra R, Li R, Chen SG, Gambetti P, Fujioka H und Singh N (2004). Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *Journal of Neuroscience* 24, 11280-11290.
- Moore RC, Hope J, McBride PA, McConnell I, Selfridge J, Melton DW und Manson JC (1998). Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc und Prni are congruent. *Nature Genetics* 18, 118-125.
- Moore SJ, Simmons M, Chaplin M und Spiropoulos J (2008). Neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in naturally occurring atypical scrapie cases in Great Britain. *Acta Neuropathologica* 116, 547-559.
- Moreno CR, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Cazeau G, Andreoletti O, Chadi S, Elsen JM und Calavas D (2007). Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie? *Archives of Virology* 152, 1229-1232.
- Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Moum T und Benestad SL (2005). Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *Journal of General Virology* 86, 231-235.
- Mullis KB und Faloona FA (1986). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.
- Nadler CF, Lay DM und Hassinger JD (1971). Cytogenetic analyses of wild sheep populations in Northern Iran. *Cytogenetics* 10, 137-152.
- Nadler CF, Korobitsina RS, Hoffmann R und Vorontzow N (1973). Cytogenic differentiation, geographic distribution und domestication in Palearctic sheep (*Ovis*). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 38, 109-125.
- NCBI (2008). Entrez Nucleotide Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>. 03.11.2008.

- Nentwig A, Oevermann A, Heim D, Botteron C, Zellweger K, Drögemüller C, Zurbriggen A und Seuberlich T (2007). Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS Pathogens* 3:e82.
- Nitze M, Fuchs K, Stier N und Roth M (2003). Raumnutzung von Muffelwild in landwirtschaftlich geprägten Einstandsgebieten Sachsens. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 28, 407-415.
- NJagdzeitVO (2001). Niedersächsische Verordnung über Jagdzeiten vom 06.08.2001. *Niedersächsisches Gesetz- und Verordnungsblatt* 2001, 593.
- Nowak RM (1999). *Walker's mammals of the World*. 6. Auflage, Baltimore und London.
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB und Weissmann C (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-746.
- OIE (2004). *Handbook on import risk analysis for animals and animal products*. Volume I Introduction and qualitative risk analysis. 1. Auflage, Paris.
- OIE (2008a). Handistatus II. <http://www.oie.int/hs2/report.asp>. 28.04.2009.
- OIE (2008b). Terrestrial animal health code. Article 1.4.6. Surveillance to demonstrate freedom from disease / infection. 17. Auflage, http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.1.4.htm. 07.01.2009.
- OIE (2009). World Animal Health Information Database (WAHID) Interface. <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home>. 28.04.2009.
- Onnasch, H, Gunn HM, Bradshaw BJ, Benestad SL und Bassett HF (2004). Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Veterinary Record* 155, 636-637.
- Orge L, Galo A, Machado C, Lima C, Ochoa C, Silva J, Ramos M und Simas JP (2004). Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *Journal of General Virology* 85, 3487-3491.
- O'Rourke KI, Holyoak GR, Clark WW, Mickelson JR, Wang S, Melco RP, Besser TE und Foote WC (1997). PrP genotypes and experimental scrapie in orally inoculated Suffolk sheep in the United States. *Journal of General Virology* 78, 975-978.
- O'Rourke KI, Baszler TV, Parish SM und Knowles DP (1998). Preclinical detection of PrP^{Sc} in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *Veterinary Record* 142, 489-491.
- Palmer AC (1959). Attempt to transmit scrapie by injection of semen from an affected ram. *Veterinary Record* 71, 664.

- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE und Prusiner SB (1993). Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 90, 10962-10966.
- Parry HB (1962). Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep. Heredity 17, 75-105.
- Pattison IH und Jones KM (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. The Veterinary Record 80, 2-9.
- Pattison IH, Hoare MN, Jebbett JN und Watson WA (1972). Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. Veterinary Record 90, 463-468.
- Pattison IH, Hoare MN, Jebbett JN und Watson WA (1974). Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. British Veterinary Journal 130, 65-68.
- Pääbo S und Wilson AC (1988). Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. Nature 334, 387-388.
- Piegert H (1982). Populationsgenetische Untersuchungen an Muffelwildvorkommen in der DDR. Wildbiologie und Wildbewirtschaftung 2, 286-298.
- Piegert H (2003). Zur Geschichte und Verbreitung des Muffelwildes (*Ovis gmelini musimon*) auf dem Festland Europas. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung 28, 27-33.
- Piegert H (2006). 100 Jahre Muffelwild im Harz. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung 31, 13-34.
- Piegert H und Uloth W (2005). Der europäische Mufflon. 2.Auflage, Hamburg.
- Piotrowski M (2003) Enzyme für molekularbiologisches Arbeiten. In: Seyffert W (Hrsg.). Lehrbuch der Genetik. 2.Auflage, Berlin, 1077-1082.
- Post K, Riesner D, Walldorf V und Mehlhorn H (1999). Fly larvae and pupae as vectors for scrapie. Lancet 354, 1969-1970.
- Prien S und Peukert R (1989). Erkenntnisse zur Ernährung und Fütterung des Muffelwildes. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung 16, 26-34.
- Prien S, Peukert R und Telle R (1982): Ergebnisse und Aufgaben bei der Bewirtschaftung des Muffelwildes (*Ovis ammon musimon* Pallas) in der DDR. Wildbiologie und Wildbewirtschaftung 2, 208-235.
- Prusiner SB (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 216, 136-144.

- Prusiner SB (1997). Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278, 245-251.
- Reckzeh C, Hoffmann C, Buschmann A, Buda S, Budras KD, Reckling KF, Bellmann S, Knobloch H, Erhardt G, Fries R und Groschup MH (2007). Rapid testing leads to the underestimation of the scrapie prevalence in an affected sheep and goat flock. *Veterinary Microbiology* 123, 320-327.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP und Ricciardi-Castagnoli P (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology* 2, 361-367.
- Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, Sathiyaseelan T, Vargas F, Sathiyaseelan J, Wu H, Matsushita H, Koster J, Kato S, Ishida I, Soto C, Robl JM und Kuroiwa Y (2007). Production of cattle lacking prion protein. *Nature Biotechnology* 25, 132-138.
- Richt JA, Hamir AN, Kuroiwa Y, Vargas F, Kunkle RA, Schönenbrücher H, Kanthasamy A und Robl JM (2008). Prion protein-deficient cattle are resistant to prion disease. *Book of Abstracts Prion 2008*, 40.
- Rieck W (1963). Die Muffelwildebürgerung im Kaufunger Wald. *Zeitschrift für Jagdwissenschaften* 9, 14-28.
- Rohwer RG (1984). Scrapie infectious agent is virus-like in size and susceptibility to inactivation. *Nature* 308, 658-662.
- Röhrs M (1986). *Ovis ammon musimon* (Pallas, 1811) – Mufflon. In: Niethammer J und Krapp F (Hrsg.). *Handbuch der Säugetiere Europas*. Band 2/II Paarhufer. 1. Auflage, Wiesbaden, 435-449.
- RPJagdzeitLVO (1993). Landesverordnung über die Änderung der Jagdzeiten und über die Erklärung zum jagdbaren Tier vom 09.08.1993. *Gesetz- und Verordnungsblatt Rheinland-Pfalz* 1993, 442.
- Ryder S, Dexter G, Bellworthy S und Tongue S (2004). Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural condition using lymphoid tissue biopsy. *Research in Veterinary Science* 76, 211-217.
- Ryder SJ, Dexter GE, Heasman L, Warner R und Moore SJ (2009). Accumulation and dissemination of prion protein in experimental sheep scrapie in the natural host. *BMC Veterinary Research* 5:9.
- Safar JG, Lessard P, Tamgüney G, Freyman Y, Deering C, Letessier F, Dearmond SJ und Prusiner SB (2008). Transmission and detection of prions in feces. *Journal of Infectious Diseases* 198, 81-89.

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA und Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Ehrlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook J und Russell DW (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3. Auflage, Woodbury.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Sarradin P, Melo S, Barc C, Lecomte C, Andreoletti O, Lantier F, Dacheux JL, und Gatti JL (2008). Semen from scrapie-infected rams does not transmit prion infection to transgenic mice. *Reproduction* 135, 415-418.
- Saunders GC, Cawthraw S, Mountjoy SJ, Hope J und Windl O (2006). PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. *Journal of General Virology* 87, 3141-3149.
- Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP und Smits MA (1996). Preclinical test for prion diseases. *Nature* 381, 563.
- Schubert M (1989a). Ernährungsstrategien und Pflanzenbevorzugung bei weidenden Hausschafen. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 16, 77-87.
- Schubert M (1989b). Raumnutzung und Witterungsschutzverhalten bei Haus- und Wildschafen. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 16, 133-141.
- Schütz E, Scharfenstein M und Brenig B (2006). Genotyping of ovine prion protein gene (PRNP) variants by PCR with melting curve analysis. *Clinical chemistry* 52, 1426-1429.
- Schuh J, Jacob A und Stubbe M (1989). Beitrag zur Wulstbildung an den Schnecken des Mufflonwidders. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 16, 97-101.
- Seidel B, Thomzig A, Buschmann A, Groschup MH, Peters R, Beekes M und Tertytze K (2007). Scrapie agent (strain 236k) can transmit disease via the oral route after persistence in soil over years. *PloS One* 2:e435.
- Seo SW, Hara K, Kubosaki A, Nasu Y, Nishimura T, Saeki K, Matsumoto Y, Endo H und Onodera T (2001). Comparative analysis of the prion protein open reading frame nucleotide sequences of two wild ruminants, the moufflon and golden takin. *Intervirology* 44, 359-363.

- Sigurdsson B (1954). Rida, a chronic encephalitis of sheep. With general remarks on infections, which develop slowly, and some of their special characteristics. *British Veterinary Journal* 110, 341-354.
- Shackleton DM (1997). Wild sheep and goats and their relatives: status survey and conservation action plan for Caprinae. 1. Auflage, Gland und Cambridge.
- Simmons MM, Konold T, Simmons HA, Spencer YI, Lockey R, Spiropoulos J, Everitt S und Clifford D (2007). Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Veterinary Research* 3:20.
- Simmons HA, Simmons MM, Spencer YI, Chaplin MJ, Povey G, Davis A, Ortiz-Pelaez A, Hunter N, Matthews D und Wrathall AE (2009). Atypical scrapie in sheep from a UK research flock which is free from classical scrapie. *BMC Veterinary Research* 5:8.
- Smits MA, Bossers A und Schreuder BE (1997). Prion protein and scrapie susceptibility. *The Veterinary Quarterly* 19, 1001-105.
- Soto C und Estrada LD (2008). Protein misfolding and neurodegeneration. *Archives of Neurology* 65, 184-189.
- Stahl N, Borchelt DR, Halsó K und Prusiner SB (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240.
- Stamp JT, Brotherston JG, Zlotnik I, Mackay JM und Smith W (1959). Further studies on scrapie. *Journal of Comparative Pathology* 69, 268-280.
- Stratil A und Bobak P (1988). Comparison of biochemical polymorphisms in mouflon and sheep: isoelectric differences in haemoglobins and quantitative variation of mouflon haemopexin. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry* 90, 159-162.
- Stubbe C (1971). Zur Ernährung des Muffelwildes in der Deutschen Demokratischen Republik. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 7, 103-123.
- Stubbe I und Stubbe W (1977). Körpermaße und Gewichtsentwicklung des Harzer Muffelwildes. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 10, 113-126.
- Stubbe M (2003). Bemerkungen zur wissenschaftlichen Namensgebung des Muffelwildes. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 28, 20.
- Stubbe M und Uhlenhaut K (1971). Kraniologische Untersuchungen am Harzer Muffelwild – *Ovis ammon musimon* (Pallas, 1811). *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 7, 143-156.
- Tapio M, Marzanov N, Ozerov M, Cinkulov M, Gonzarenko G, Kiselyova T, Murawski M, Viinalass H und Kantanen J (2006). Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asia areas. *Molecular Biology and Evolution* 23, 1776-1783.

- Taylor DM (2000). Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. *The Veterinary Journal* 159, 10-17.
- Taylor DM, McConnell I und Fraser H (1996). Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice. *Journal of General Virology* 77, 1595-1599.
- Telle R (1979). Untersuchungen zu ausgewählten Problemen der Bewirtschaftung des Muffelwildes in der DDR. Dissertation Technische Universität Dresden.
- Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ und Prusiner SB (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90.
- Theiß-Krämer H (1983). Etho-ökologische Untersuchungen am Mufflon (*Ovis ammon musimon* Schreber 1782) unter gatter- und Freilandbedingungen. Studien zum stoffwechselbedingtem Verhalten und zum Sozialsystem an einer individualmarkierten Population. Schriften des Arbeitskreises Wildbiologie und Jagdwissenschaften an der Justus-Liebig-Universität Giessen, Heft 12, Stuttgart.
- Thiele E, Peukert R und Prien S (1989). Die Nahrungswahl des Muffelwildes im Einstandsgebiet Ostharz in Abhängigkeit von der Jahreszeit. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 16, 71-77.
- Thorgeirsdottir S, Sigurdarson S, Thorisson HM, Georgsson G und Palsdottir A (1999). PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *Journal of General Virology* 80, 2527-2534.
- Thrusfield MV (2005). *Veterinary epidemiology*. 3. Auflage, Oxford.
- ThürJagdZVO (1999). Thüringer Verordnung über die Bestimmung weiterer Tierarten, die dem Jagdrecht unterliegen und über die Jagdzeiten vom 08.06.1999. *Gesetz- und Verordnungsblatt für den Freistaat Thüringen* 1999, 381. Geändert durch Verordnung vom 01.08.2007. *Gesetz- und Verordnungsblatt für den Freistaat Thüringen* 2007, 103.
- TierSeuchAnzV (2004). Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der Fassung der Bekanntmachung vom 03.11.2004. Zuletzt geändert am 06.04.2009. *Bundesgesetzblatt* 1, 2764.
- TierSG (2004). Tierseuchengesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 22.06.2004. Zuletzt geändert am 13.12.2007. *Bundesgesetzblatt* 1, 1260.
- Tindall KR und Kunkel TA (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27, 6008-6013.

- Tobler I, Gaus SE, Beboer T, Achermann P, Fischer M, Rüllicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA und Manson JC (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639-642.
- Tomiczek H und Türcke F (1995). *Das Muffelwild*. 3. Auflage, Hamburg.
- Toumazos P (1988). First report of ovine scrapie in Cyprus. *British Veterinary Journal* 144, 98-100.
- Toumazos P (1991). Scrapie in Cyprus. *British Veterinary Journal* 147, 147-154.
- Townsend SJ, Warner R und Dawson M (2005). PrP genotypes of rare breeds of sheep in Great Britain. *Veterinary Record* 156, 131-134.
- Uerpmann HP (1987). The ancient distribution of ungulate mammals in the Middle East. Beihefte zum Tübinger Atlas des Vorderen Orients, Reihe A, Nr. 27, Wiesbaden.
- Uloth W (1972). To the history of the distribution, introduction and cross-breeding of the tyrrhenis mouflon in Europe and oversea. *Acta Theriologica* 17, 412-413.
- Uloth W (1982). Zur Reproduktionsleistung von Mufflon-Populationen in ausgewählten Biotopen des Mittelgebirges. *Wildbiologie und Wildbewirtschaftung* 2, 276-281.
- Uloth W und Prien S (1985). The history of introductions of mouflon sheep (*Ovis ammon musimon*, Schreber 1782) in Central and Eastern Europe, and the development and management of these wild sheep populations. Northern Wild sheep and Goat Council Special Report, 133-137.
- Uloth W und Prien S (1989). Zu den Brunft- und Setzzeiten bei Wildschafen bzw. Mufflons. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 16, 127-132.
- Ulvund MJ (2001). Die Klinik der Scrapie. In: Hönlmann B, Riesmer D und Kretzschmar H (Hrsg.). *Prionen und Prionkrankheiten*. 1. Auflage, Berlin, 284-289.
- Vaccari G, D'Agostino C, Nonno R, Rosone F, Conte M, Di Bari MA, Chiappini B, Esposito E, De Grossi L, Giordani F, Marcon S, Morelli L, Borroni R und Agrimi U (2007). Prion protein alleles showing a protective effect on the susceptibility of sheep to scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *Journal of Virology* 81, 7306-7309.
- Vaccari G, Scavia G, Sala M, Cossedu G, Chiappini B, Conte M, Esposito E, Lorenzetti R, Perfetti G, Marconi P, Scholl F, Barbaro K, Bella A, Nonno R und Agrimi U (2009). Protective effect of the AT137RQ and ARQK176 PrP alleles against classical scrapie in Sarda breed sheep. *Veterinary Research* 40:19.
- van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP und Smits MA (1999). Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *Journal of Comparative Pathology* 121, 55-63.

- van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP und Smits MA (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Archives of Virology Supplementum* 16, 57-71.
- van Keulen LJ, Vromans ME und van Zijderveld FG (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 110, 23-32.
- van Keulen LJ, Vromans ME, Dolstra CH, Bossers A und van Zijderveld FG (2008). TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Veterinary Research* 39:24.
- Vidal E, Tortosa R, Costa C, Benavides J, Francino O, Sanchez-Robert E, Perez V und Pumarola M (2008). Lack of PrP^{Sc} immunostaining in intracranial ectopic lymphoid follicles in a sheep with concomitant non-suppurative encephalitis and Nor98-like atypical scrapie: a case report. *Veterinary Journal* 177, 283-288.
- VO (EG) 999/2001. Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter spongiformer Enzephalopathien vom 22.05. 2001. Zuletzt geändert durch VO 220/2009 vom 11.03.2009. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* 31.05.2001 L 147, 1.
- VO (EG) 162/2009. Verordnung zur Änderung der Anhänge III und X der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* 27.02.2009 L 55, 11.
- van den Driesch A (1995). Domestic ruminants: their incorporation and role in early rural societies. *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. Proceedings of the eighth International Symposium on Ruminant Physiology*, 1-20.
- Wang Y, Prosen DE, Mei L, Sullivan JC, Finney M und Vander Horn PB (2004). A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Research* 32, 1197-1207.
- Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M und Bradley R (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Veterinary Record* 121, 419-420.
- Westaway D, Goodman PA, Miranda CA, McKinley MP, Carlson GA und Prusiner SB (1987). Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51, 651-662.
- Westaway D, Zuliani V, Cooper CM, Da Costa M, Neumann S, Jenny AL, Detwiler L und Prusiner SB (1994). Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes and Development* 8, 959-969.
- Wiesner E und Ribbeck R (2000). *Lexikon der Veterinärmedizin*. 4. Auflage, Stuttgart.

- Wiesner H (1987). Mufflon. In: Gabrisch K und Zwart P (Hrsg.). Krankheiten der Wildtiere: exotische und heimische Tiere in der Tierarztpraxis. 1. Auflage, Hannover, 515-530.
- Wilfinger WW, Mackey K und Chomczynski P (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22, 474-481.
- Williams ES und Young S (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *Journal of Wildlife Diseases* 16, 89-98.
- Wisniewski HM, Sigurdarson S, Rubenstein R, Kascsak RJ und Carp RI (1996). Mites as vectors for scrapie. *Lancet* 347, 1114.
- Wood JL, Lund LJ und Done SH (1992). The natural occurrence of scrapie in moufflon. *Veterinary Record* 130, 25-27.
- Wood JL, McGill IS, Done SH und Bradley R (1997). Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Veterinary Record* 140, 167-174.
- Wrathall AE, Holyoak GR, Parsonson IM und Simmons HA (2008). Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques. *Theriogenology* 70, 725-745.
- Wuttky K (1963). Der Verlauf der Einbürgerung des Muffelwildes im Ostharz, dargestellt nach den Aktenunterlagen. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 3, 23-38.
- Wyatt JM, Pearson GR, Smerdon TN, Gruffydd-Jones TJ, Wells GA und Wilesmith JW (1991). Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Veterinary Record* 129, 233-236.
- Zlotnik I (1958). The histopathology of the brain stem of sheep affected with natural scrapie. *Journal of Comparative Pathology* 68, 148-166.

8 ANHANG

8.1 Muffelwildstrecken

Die hier dargestellten Tabellen zeigen die Muffelwildstrecken der Jagdjahre 2005, 2006 und 2007 in den einzelnen Bundesländern. Für jede kreisfreie Stadt bzw. Landkreis sind Widder (W), Schafe (S), Lämmer (L) und die Gesamtsumme (Σ) getrennt dargestellt. Fallwild (F) ist, soweit es diesen Kategorien nicht zugeordnet werden konnte, separat aufgeführt. Die Strecken umfassen sowohl Eigenjagdbezirke, gemeinschaftliche Jagdbezirke sowie Landes- und Bundesforst. Die Einteilung der Landkreise und kreisfreien Städte entspricht dem Stand vom 31.12.2005. Danach durchgeführte Kreisreformen wurden nicht berücksichtigt.

Stadtstaat	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Berlin	5	8	-	13	6	3	0	9	7	5	1	13
Bremen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hamburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Baden- Württemberg	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Baden-Baden	1	5	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Freiburg im Breisgau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heidelberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heilbronn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Karlsruhe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Mannheim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pforzheim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stuttgart	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ulm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alb-Donau- Kreis	3	4	1	8	0	3	0	3	3	2	4	9
Biberach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bodenseekreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Böblingen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Breisgau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Calw	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Emmendingen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enzkreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esslingen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Freudenstadt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Göppingen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heidenheim	5	2	3	10	3	2	1	6	5	2	2	9

Baden- Württemberg	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Heilbronn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hohenlohe- kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Karlsruhe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Konstanz	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Lörrach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ludwigsburg	3	1	2	6	6	4	1	11	5	3	4	12
Main-Tauber- Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neckar-Oden- wald-Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ortenaukreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ostalbkreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rastatt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ravensburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rems-Murr- Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reutlingen	1	0	0	1	0	0	0	0	3	2	3	8
Rhein- Neckar-Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rottweil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schwäbisch Hall	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schwarzwald- Baar-Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sigmaringen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tübingen	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Tuttlingen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Waldshut	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Zollernalb- kreis	4	4	4	12	1	4	4	9	3	4	4	11
Gesamt	17	16	10	43	10	14	6	30	21	14	17	52

Bayern	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Amberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ansbach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aschaffen- burg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Augsburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bamberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bayreuth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erlangen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fürth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hof	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ingolstadt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kaufbeuren	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kempten	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Landshut	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Memmingen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
München	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nürnberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Passau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Regensburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rosenheim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schwabach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schweinfurt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Straubing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Weiden in der Oberpfalz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Würzburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aichach- Friedberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Altötting	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amberg- Sulzbach	1	8	4	13	4	3	4	11	5	7	5	17
Kreis Ansbach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis A- schaffenburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis Augsburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bad Kissingen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bad Tölz- Wolfrats- hausen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis Bamberg	1	8	9	18	2	14	10	26	6	16	13	35
Kreis Bayreuth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bayern	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Berchtesgaderener Land	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cham	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis Coburg	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Dachau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Deggendorf	0	0	0	0	3	0	0	3	1	0	2	3
Dillingen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dingolfing-Landau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Donau-Ries	0	0	0	0	0	2	8	10	1	4	22	27
Ebersberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eichstätt	10	18	10	38	7	14	8	29	3	8	9	20
Erding	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erlangen-Höchstadt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Forchheim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Freising	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Freyung-Grafenau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fürstenfeldbruck	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis Fürth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Garmisch-Partenkirchen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Günzburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haßberge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis Hof	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kelheim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kitzingen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kronach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kulmbach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Landsberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis Landshut	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lichtenfels	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lindau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Main-Spessart	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Miesbach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Miltenberg	1	1	0	2	1	1	0	2	0	0	0	0
Mühlendorf a. I.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis München	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neuburg-Schrobenhausen	0	0	2	2	1	0	1	2	2	4	5	11

Bayern	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Neumarkt in der Oberpfalz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neustadt an der Aisch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neustadt an der Waldnaab	0	0	0	0	1	2	1	4	0	0	0	0
Neu-Ulm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nürnberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Land												
Oberallgäu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ostallgäu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis Passau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pfaffenhofen an der Ilm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Regen	1	2	2	5	1	4	1	6	3	1	1	5
Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Regensburg												
Rhön-Grabfeld	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rosenheim												
Roth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rottal-Inn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schwandorf	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schweinfurt												
Starnberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Straubing-Bogen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tirschenreuth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Traunstein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unterallgäu	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	3
Weilheim-Schongau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Weißenburg-Gunzenhausen	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Wunsiedel im Fichtelgebirge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Würzburg												
Gesamt	14	37	27	78	20	40	33	93	25	40	59	124

Brandenburg	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07					Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	F	Σ	W	S	L	Σ
Brandenburg an der Havel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cottbus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Frankfurt (Oder)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Potsdam	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Barnim	37	37	–	74	22	11	15	0	48	14	12	6	32
Dahme- Spreewald	36	35	–	71	11	11	7	1	30	9	24	3	36
Elbe-Elster	63	103	120	286	46	58	73	0	177	50	30	70	170
Havelland	12	11	14	37	10	13	19	0	42	9	13	17	39
Märkisch- Oderland	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Oberhavel	16	22	10	48	17	12	12	0	41	25	40	21	86
Oberspre- wald-Lausitz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oder-Spree	23	34	27	84	36	30	28	4	98	63	40	37	140
Ostprignitz- Ruppin	5	8	9	22	7	7	7	0	21	5	11	10	26
Potsdam- Mittelmark	2	4	2	8	2	2	3	0	7	4	2	4	10
Prignitz	22	29	15	66	8	7	12	0	27	15	12	8	35
Spree-Neiße	6	3	7	16	8	3	6	0	17	14	2	2	18
Teltow- Fläming	31	45	41	117	46	60	41	0	147	54	66	37	157
Uckermark	20	30	22	72	18	33	36	3	90	21	35	49	105
Gesamt	273	361	268	902	227	261	257	18	763	283	287	265	834

Hessen	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Darmstadt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Frankfurt am Main	0	2	0	2	2	2	1	5	2	2	0	4
Kassel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Offenbach am Main	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wiesbaden	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bergstraße	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Darmstadt- Dieburg	1	3	3	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Fulda	2	6	14	22	1	2	6	9	1	3	6	10
Gießen	11	20	19	50	9	9	4	22	7	7	3	17
Groß-Gerau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hersfeld- Rotenburg	1	1	1	3	1	0	0	1	0	0	1	1
Hochtaunus- kreis	0	0	0	0	1	1	1	3	4	5	4	13
Kassel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lahn-Dill- Kreis	4	1	6	11	3	3	4	10	2	7	7	16
Limburg- Weilburg	2	1	0	3	1	2	3	6	4	14	18	36
Main-Kinzig- Kreis	1	0	0	1	1	1	1	3	2	0	0	2
Main-Taunus- Kreis	1	1	2	4	2	5	3	10	2	3	5	10
Marburg- Biedenkopf	20	22	20	62	20	15	15	50	20	20	23	63
Odenwald- kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Offenbach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rheingau- Taunus-Kreis	7	10	16	33	9	7	20	36	17	16	30	63
Schwalm- Eder-Kreis	25	18	12	55	25	26	8	59	14	13	12	39
Vogelsberg- kreis	9	12	13	34	4	8	8	20	7	7	6	20
Waldeck- Frankenberg	20	18	22	60	18	20	19	57	16	22	21	59
Werra- Meißner-Kreis	5	6	5	16	1	2	3	6	4	8	5	17
Wetteraukreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt	109	122	134	365	98	103	96	297	102	127	141	370

Mecklenburg Vorpommern	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Greifswald	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neubranden- burg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Rostock	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schwerin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stralsund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wismar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bad Doberan	11	13	13	37	5	14	6	25	2	10	8	20
Demmin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Güstrow	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	1
Ludwigslust	0	2	2	4	0	0	0	0	0	1	0	1
Mecklenburg- Strelitz	3	2	3	8	3	0	4	7	1	0	0	1
Müritz	5	4	3	12	3	4	4	11	9	9	4	22
Nordvor- pommern	3	3	4	10	1	3	3	7	0	3	3	5
Nordwest- mecklenburg	9	13	10	32	24	18	12	54	17	6	4	27
Ostvor- pommern	3	2	1	6	1	3	0	4	1	0	2	3
Parchim	5	1	0	6	5	2	1	8	3	1	0	4
Rügen	3	4	2	9	0	0	11	11	6	3	4	13
Uecker- Randow	28	35	33	96	17	8	19	44	13	14	11	38
Gesamt	71	79	72	222	59	52	60	171	52	48	36	136

Nieder- sachsen	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Braunschweig	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Delmenhorst	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Emden	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oldenburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Osnabrück	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salzgitter	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Wilhelms- haven	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wolfsburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ammerland	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aurich	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grafschaft Bentheim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Celle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cloppenburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cuxhaven	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diepholz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Emsland	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Friesland	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gifhorn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Goslar	24	47	42	113	29	17	15	61	19	19	14	52
Göttingen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hameln- Pyrmont Region	2	4	18	24	1	1	11	13	5	2	18	25
Hannover	11	4	9	24	8	0	1	9	15	0	3	18
Harburg	12	16	13	41	17	23	15	55	23	21	15	59
Helmstedt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hildesheim	2	7	15	24	3	5	1	9	6	8	7	21
Holzminde	2	4	4	10	4	3	2	9	5	0	1	6
Leer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lüchow- Dannenberg	23	20	11	54	19	8	8	35	12	8	2	22
Lüneburg	5	0	8	13	3	3	1	7	2	1	1	4
Nienburg	6	2	1	9	5	6	2	13	6	4	1	11
Weser Northeim	29	31	32	92	19	8	13	40	19	6	4	29
Oldenburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Osnabrück	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Osterholz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Osterode am Harz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Peine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rotenburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schaumburg	17	26	15	58	12	19	20	51	21	31	14	66

Nieder- sachsen	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Soltau- Fallingböstel	4	6	3	13	5	7	7	19	4	6	3	13
Stade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uelzen	4	4	1	9	3	2	0	5	3	1	1	5
Vechta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Verden	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wesermarsch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wittmund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wolfenbüttel	2	3	4	9	2	3	7	12	2	4	6	12
Gesamt	144	174	176	494	130	105	103	338	142	112	90	344

Nordrhein- Westfalen	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Aachen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bielefeld	4	3	2	9	1	3	1	5	0	2	5	7
Bochum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bonn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Botrop	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dortmund	0	0	0	0	0	3	2	5	2	2	1	5
Duisburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Düsseldorf	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Essen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gelsenkirchen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hagen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hamm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Herne	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Köln	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Krefeld	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leverkusen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mönchen- gladbach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mülheim an der Ruhr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Münster	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oberhausen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Remscheid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Solingen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wuppertal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kreis Aachen	3	6	4	13	4	4	3	11	2	7	8	17
Borken	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coesfeld	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Düren	8	10	18	36	13	13	16	42	9	15	18	42
Ennepe-Ruhr- Kreis	4	0	0	4	0	0	0	0	0	0	5	5
Euskirchen	8	17	21	46	28	26	31	85	31	24	28	83
Gütersloh	0	1	0	1	0	2	3	5	5	4	5	14
Heinsberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Herford	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hochsauer- landkreis	46	55	73	174	38	53	78	169	50	55	66	171
Höxter	10	7	8	25	9	10	6	25	9	9	11	29
Kleve	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Lippe	5	6	11	22	4	1	1	6	2	2	2	6
Märkischer Kreis	0	0	4	4	1	1	3	5	2	2	6	10
Mettmann	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Minden- Lübbecke	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Nordrhein- Westfalen	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Oberbergisch- er Kreis	7	22	8	37	0	4	5	9	13	14	10	37
Olpe	1	0	0	1	1	0	0	1	4	3	0	7
Paderborn	6	9	8	23	6	8	10	24	12	12	16	40
Reckling- hausen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhein-Erft- Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhein-Kreis Neuss	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rheinisch- Bergischer Kreis	4	2	2	8	3	3	3	9	2	3	4	9
Rhein-Sieg- Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Siegen- Wittgenstein	46	47	46	139	33	55	44	132	43	45	45	133
Soest	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinfurt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Viersen	0	0	0	0	1	0	1	2	2	0	3	5
Warendorf	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wesel	3	0	1	4	3	0	0	3	3	0	3	6
Gesamt	158	185	206	594	145	186	207	538	191	199	236	626

Rheinland- Pfalz	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08				
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	F	Σ
Frankenthal (Pfalz)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kaiserslautern	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Koblenz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Landau in der Pfalz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ludwigshafen am Rhein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mainz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neustadt an der Wein- straße	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pirmasens	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Speyer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trier	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Worms	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Zweibrücken	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ahrweiler	62	51	27	140	53	27	32	112	39	36	37	0	112
Altenkirchen (Westerwald)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alzey-Worms	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bad Dürkheim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bad Kreuznach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bernkastel- Wittlich	14	27	28	69	21	22	19	62	16	23	23	5	67
Birkenfeld	26	15	10	51	16	29	20	65	41	22	23	0	86
Cochem-Zell	74	141	118	333	57	97	87	241	51	77	78	0	206
Daun	9	13	6	28	6	15	10	31	9	13	10	0	32
Donnersberg- kreis	28	26	11	65	22	26	14	62	14	25	15	0	54
Bitburg-Prüm	21	34	30	85	23	37	21	81	24	34	21	0	79
Germersheim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kaiserslautern	1	0	0	1	2	0	0	2	1	0	0	0	1
Kusel	6	5	7	18	9	7	3	19	6	6	3	0	15
Mainz-Bingen	7	10	9	26	12	13	9	34	14	11	5	0	30
Mayen- Koblenz	24	27	23	74	15	64	67	146	45	73	37	0	155
Neuwied	11	17	5	33	9	20	21	50	20	26	21	0	67
Rhein- Hunsrück- Kreis	4	4	2	10	3	10	5	18	8	11	11	1	31
Rhein-Lahn- Kreis	40	25	23	88	43	35	14	92	41	40	26	0	107

Rheinland- Pfalz	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08				
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	F	Σ
Rhein-Pfalz- Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Südliche Weinstraße	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Südwestpfalz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trier- Saarburg	10	34	36	80	20	36	37	93	17	33	17	8	75
Westerwald- kreis	11	13	12	36	14	15	26	55	16	17	12	0	45
Gesamt	348	442	347	1137	325	453	385	1163	362	447	339	14	1162

Saarland	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Merzig- Wadern	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Neunkirchen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Regionalver- band Saar- bücken	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saarlouis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saarpfalz- Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
St. Wendel	8	7	9	24	2	4	2	8	4	6	0	10
Gesamt	9	7	9	25	2	4	2	8	4	6	0	10

Sachsen	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08				
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	F	Σ
Chemnitz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dresden	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Görlitz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hoyerswerda	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leipzig	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plauen	2	2	2	6	6	4	1	11	3	6	6	0	15
Zwickau	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2	0	8
Annaberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6	7
Aue-Schwarz- enberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bautzen	4	6	9	19	3	5	6	14	3	3	6	1	13
Chemnitzer Land	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Delitzsch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Döbeln	13	4	11	28	10	7	15	32	7	10	11	2	30
Freiberg	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6	4	0	14
Kamenz	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
Leipziger Land	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Löbau-Zittau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Meißen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittlerer Erzgebirgs- kreis	13	12	25	50	14	9	11	34	43	40	66	0	149
Mittweida	5	2	7	14	7	10	9	26	7	7	13	0	27
Muldental- kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Niederschle- sischer Ober- lausitzkreis	67	89	68	224	47	49	63	159	62	62	56	0	180
Riesa- Großenhain	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sächsische Schweiz	21	33	38	92	19	20	24	63	37	54	49	0	140
Stollberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Torgau- Oschatz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vogtlandkreis	13	22	24	59	21	20	17	58	27	26	33	0	86
Weißeritzkreis	11	20	22	53	10	2	7	19	15	11	4	0	30
Zwickauer Land	0	0	0	0	0	0	0	0	5	18	9	0	32
Gesamt	149	190	206	545	137	126	153	416	217	248	260	9	734

Sachsen- Anhalt	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Dessau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Halle (Saale)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Magdeburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Altmarkkreis Salzwedel	50	97	77	224	41	73	57	171	51	104	89	244
Anhalt-Zerbst	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	2
Aschersleben- Staßfurt	37	47	43	127	27	0	8	35	1	1	6	8
Bernburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bitterfeld	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Bördekreis	4	6	8	18	3	7	6	16	1	10	5	16
Burgenland- kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Halberstadt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jerichower Land	11	8	5	24	8	7	6	21	7	8	5	20
Köthen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mansfelder Land	6	3	7	16	3	8	7	18	2	6	8	16
Merseburg- Querfurt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ohrekreis	17	20	16	53	11	20	19	50	14	37	19	70
Quedlinburg	64	90	128	282	65	78	100	243	87	102	117	306
Saalkreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sangerhausen	3	2	4	9	2	6	5	13	1	2	6	9
Schönebeck	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stendal	29	27	41	97	27	51	51	129	44	46	54	144
Weißenfels	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wernigerode	6	10	8	24	9	10	9	28	8	6	5	19
Wittenberg	4	3	3	10	2	1	2	5	5	2	4	11
Gesamt	231	313	340	884	199	261	271	731	221	326	318	865

Schleswig- Holstein	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Flensburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kiel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lübeck	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neumünster	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dithmarschen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Herzogtum Lauenburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nordfriesland	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ostholstein	17	13	18	48	5	1	3	9	4	0	0	4
Pinneberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plön	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rendsburg- Eckernförde	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schleswig- Flensburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Segeberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinburg	4	2	4	10	5	3	5	13	1	4	12	17
Stormarn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt	21	15	22	58	10	4	8	22	5	4	12	21

Thüringen	Strecke 2005 / 06				Strecke 2006 / 07				Strecke 2007 / 08			
	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ	W	S	L	Σ
Eisenach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erfurt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gera	2	1	5	8	6	0	0	6	1	1	0	2
Jena	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
Suhl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Weimar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Altenburger Land	4	3	2	9	3	4	0	7	4	4	3	11
Eichsfeld	27	34	52	113	16	32	37	85	28	33	40	101
Gotha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Greiz	26	42	37	105	17	27	29	73	33	46	47	126
Hildburg- hausen	7	15	11	33	5	10	7	22	4	19	14	37
Ilm-Kreis	17	27	28	72	24	31	23	78	33	15	27	75
Kyffhäuser- kreis	19	53	41	113	25	36	43	104	23	44	50	117
Nordhausen	17	18	13	48	13	20	8	41	10	14	14	38
Saale-Holz- land-Kreis	26	12	30	68	21	32	43	96	32	41	61	134
Saale-Orla- Kreis	27	53	54	134	30	52	42	124	51	61	57	169
Saalfeld- Rudolstadt	34	91	111	236	56	81	84	221	82	129	128	339
Schmalkalden -Meiningen	22	48	27	97	21	29	18	68	17	14	19	50
Sömmerda	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sonneberg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unstrut- Hainich-Kreis	0	2	7	9	0	2	4	6	4	5	7	16
Wartburgkreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Weimarer Land	15	15	18	48	5	11	13	29	13	11	9	33
Gesamt	243	414	436	1093	242	367	351	960	336	438	476	1250

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Einordnung des europäischen Mufflons in die zoologische Systematik..... 25

Abbildung 2: Gehörntes Mufflonschaf im Sommerhaarkleid..... 27

Abbildung 3: Schädel und Unterkiefer eines 5-10 Monate alten Mufflonlammes. 31

Abbildung 4: Schädel und Unterkiefer eines ca. 19 Monate alten Mufflonschafes..... 31

Abbildung 5: Schädel und Unterkiefer eines ca. 27 Monate alten Mufflonschafes..... 31

Abbildung 6: Schädel und Unterkiefer eines ca. 48 Monate alten Mufflonschafes..... 32

Abbildung 7: Schädel und Unterkiefer eines ca. 12 Jahre alten Mufflonschafes. 32

Abbildung 8: Kartographische Übersicht der Untersuchungsgebiete. 40

Abbildung 9: Jagdzeiten für Muffelwild während der Jagdjahre 2006 und 2007 in den beteiligten Bundesländern. 41

Abbildung 10: Probenbegleitschein des Populationscreenings. 43

Abbildung 11: Medulla oblongata eines Mufflons. 44

Abbildung 12: Geschlechterverhältnis der untersuchten Mufflons..... 48

Abbildung 13: Altersverteilung der untersuchten Mufflons. 49

Abbildung 14: Geschlechterverteilung in den beprobten Altersklassen. 49

Abbildung 15: Streudiagramm mit den Merkmalen Hausschafdichte und Muffelwildstreckendichte für alle Kreise. 52

Abbildung 16: Streudiagramm mit den Merkmalen Hausschafdichte und Muffelwildstreckendichte für die Untersuchungsgebietseinheiten. 52

Abbildung 17: Aufteilung der untersuchten Mufflons auf die Risikoklassen..... 53

Abbildung 18: Erreichbares Minimumprävalenzlevel in Abhängigkeit des beprobten Anteils der Auswahlpopulation der Risikoklasse III. 57

Abbildung 19: Erreichbares Minimumprävalenzlevel in Abhängigkeit des beprobten Anteils der Auswahlpopulation der Risikoklasse II..... 57

Abbildung 20: Schematisiertes Beispiel eines Hotspots. 62

Abbildung 21: Schematisiertes Beispiel eines Nicht-Hotspots..... 62

Abbildung 22: Altersstruktur und Geschlechterverteilung der genotypisierten Mufflons..... 77

Abbildung 23: Gelelektrophorese der PCR-Produkte. 78

Abbildung 24: Aminosäuresequenz des Prionproteins der untersuchten Mufflons als Einbuchstabencode..... 79

Abbildung 25: Sequenzen der Allele 1 und 2 des Prionproteins bei Mufflons..... 82

Abbildung 26: Qualitative Bewertungsmöglichkeiten des Risikos und ihre entsprechenden Interpretationen..... 88

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Natürlich vorkommende Prionkrankheiten bei Säugetieren.	12
Tabelle 2: Einteilung der Genotypen in die Risikogruppen nach dem National Scrapie Plan. 18	
Tabelle 3: Einteilung aller Landkreise, kreisfreien Städte und Stadtstaaten in die Risikoklassen I-IV.	38
Tabelle 4: Fehlklassifikation des TSE-Schnelltestes.	51
Tabelle 5: Stichprobenanzahl, Größe der Auswahl- und Zielpopulation von Untersuchungs- gebieten der Risikoklasse III.	54
Tabelle 6: Stichprobenanzahl, Größe der Auswahl- und Zielpopulation von Untersuchungs- gebieten der Risikoklasse II.	55
Tabelle 7: Stichprobenanzahl, Größe der Auswahl- und Zielpopulation von Probengebieten der Risikoklasse I sowie allen Gebieten dieser Risikoklasse.	55
Tabelle 8: Stichprobenanzahl, Populationsgrößen, Anzahl der kranken Tiere und Minimum- prävalenzlevel bezogen auf die verschiedenen Populationen.	56
Tabelle 9: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer.	71
Tabelle 10: 50 µl-Standard-PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase.	72
Tabelle 11: Zyklusparameter für PCR mit Taq-Polymerase.	72
Tabelle 12: 50 µl-Standard-PCR-Ansatz mit Pfu-Polymerase.	73
Tabelle 13: Zyklusparameter für PCR mit Pfu-Polymerase.	73
Tabelle 14: 50 µl-Standard-PCR-Ansatz mit Phusion-Polymerase.	74
Tabelle 15: Zyklusparameter für PCR mit Phusion-Polymerase.	74
Tabelle 16: 10 µl-Ansatz für die Sequenzierreaktion.	76
Tabelle 17: PrP-Haplotypen der untersuchten Mufflons.	80
Tabelle 18: Darstellung der SNPs mit Basentriplets, Aminosäuresubstitution und Allelfrequenz.	80
Tabelle 19: Probenanzahl und PrP-Haplotypfrequenzen je Muffelwildvorkommen.	81

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Wiethölter A, Frölich K und Stefanski V (2009). Prionkrankheiten beim Muffelwild in Deutschland. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung 34, xx-xx (im Druck).

Wiethölter A, Kramer M, Frölich K, Stefanski V (2008). Risk assessment of transmissible spongiform encephalopathies in European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) from Germany. Prion 2008, Madrid, Spanien, 08.10.-10.10.2008. Book of Abstracts, 89.

Wiethölter A, Kramer M, Frölich K, Stefanski V (2008). A survey for transmissible spongiform encephalopathies in European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) in Germany. 8th Conference of the European Wildlife Disease Association, Rovinj, Kroatien, 02.10.-05.10.2008. Book of Abstracts, 94-95.

Wiethölter A, Frölich K, Stefanski V (2008). First results from a survey on prion diseases in European mouflon. 7th Congress of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, Leipzig, Deutschland, 30.04.-03.05.2008. Proceedings EAZWV, 447-449.

Wiethölter A, Frölich K, Stefanski V (2007). First results from a study on prion diseases in European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) in Germany. Prion 2007, Edinburgh, UK, 26.-28.09.2007. Book of Abstracts, 99.

Wiethölter A, Frölich K, Stefanski V (2007). Survey on transmissible spongiform encephalopathies in European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) in Germany - a preliminary report. Edinburgh, UK, 16.-20.05.2007. Verh ber Erkrq Zootiere 43, 341.

DANKSAGUNG

Die Förderung des Vorhabens erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn PD Dr. Dr. K. Frölich bin ich für die Überlassung des Themas zu Dank verpflichtet. Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Hofer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Übernahme des Themas und die anregenden Diskussionen zur statistischen Auswertung. Herrn PD Dr. V. Stefanski danke ich ebenfalls für die Übernahme des Themas sowie für die Möglichkeit eigenständig zu arbeiten und für alle gewährten Freiheiten. Mein ganz besonderer Dank gilt allen technischen Assistentinnen und studentischen Hilfskräften des Projektes E. Blackwell, G. Dröge, A. Endler, N. Furchheim, S. Grohe, J. Jonas, R. Spließ, U. Träger, N. Walk und W. Wuttke für die großartige Unterstützung bei der Probensammlung und Datenabfrage bei den Behörden. Herzlichen Dank an Z. Mezö für die tatkräftige Unterstützung in der Sektionshalle und auf so mancher Jagd und an K. Pohle für die Einweisung in die PCR-Strecke. Ferner gilt der Forschungsgruppe 2 mein Dank für die Hilfe und Tipps zum Sequenzieren, namentlich Dr. J. Fickel und D. Lieckfeldt. Bei den Bibliothekarinnen B. Peters und C. Greulich bedanke ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei allen Fragen zur Literaturrecherche und die Unterstützung bei der Literaturbeschaffung – selbst aus dem 18. Jahrhundert. Ein spezieller Dank geht an Kristin Mühldorfer, Susanne Schilling, Dr. Gudrun Wibbelt, Katja Goller und Astrid Günther-Weigl für schöne gemeinsame Kongressteilnahmen, nette Tierparkspaziergänge und immer ein offenes Ohr.

Für das Untersuchungsmaterial sei allen Jagdausübungsberechtigten, Förstern, Wildhändlern und Präparatoren herzlich gedankt. Ohne sie wäre die gesamte Studie nicht durchführbar gewesen. Den Landesministerien, Jagdbehörden, Landesuntersuchungsämtern und Wildforschungsstellen gilt mein Dank für die gewährte Unterstützung. Bei Herrn Dr. M. Kramer möchte ich mich ganz besonders für seine wertvollen Anregungen und fachlichen Diskussionen bedanken. Dem ILAT danke ich für die stets zuverlässige Durchführung der Schnelltests. Mein weiterer Dank gilt dem Nationalen Referenzlabor für die Durchführung der Bestätigungstests.

Ein großes Dankeschön geht an Birgit Schulze und Nicole Walk für die bereitwillige, kurzfristige Durchsicht dieser Arbeit, an Kathrin Dietze für ihre konstruktive Kritik und Englischhilfe sowie an Ulf Rintisch für die tolle Zeichnung der Obex-Region.

Meinen Eltern danke ich von Herzen dafür, dass sie mir stets den nötigen Rückhalt gegeben und mich bei meiner Ausbildung unterstützt haben. Sie waren immer für mich da.

Ein besonderer Dank geht an meinen Bruder für die Hilfe beim Einarbeiten in das Mac-Betriebssystem und die geduldige Betreuung als Systemadministratorsersatz. Du hattest immer ein offenes Ohr bei allen Anrufen bezüglich der Instituts-Macs und hast mir manchen Gang zu Gravis erspart. Inzwischen weiß ich, wozu ein Firewire-Kabel gut ist. Dankeschön!

Meinem Mann danke ich von ganzem Herzen für den Crashkurs in Projektmanagement und BWL, die Einweihung in die Geheimnisse von Formatvorlagen bei MS Office, die Einführung in die Bildbearbeitung mit Freehand und Photoshop, die Englischhilfe sowie den kritischen Designblick auf alle Layouts. Es tut mir leid, dass Du häufig als Blitzableiter und Frustschutz erhalten musstest. Danke für deine Liebe, all deine Unterstützung, und dass du gemeinsam mit mir durchgehalten und immer an mich geglaubt hast.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 14.07.2009

Anke Wiethölter

ISBN 978-3-941703-52-0



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.de>**