

Wissenschaftliche Einrichtungen Veterinary Public Health
Institut für Fleischhygiene und -technologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger
Friedrich-Loeffler-Institut
Insel Riems

Immunhistochemische Untersuchungen zum Vorkommen von Scrapie-Prionprotein in ovinen Gewebe

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Claudia Reckzeh
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2010
Journal-Nr.: 3433

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard Fries
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Martin Groschup
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael Schmidt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

scrapie, immunohistochemistry, nervous system, lymphatic system,
sheep, goats

Tag der Promotion: 08.03.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-071-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinem Vater

Abkürzungsverzeichnis

Das Abkürzungsverzeichnis ist angelehnt an die üblichen Abkürzungen der englischsprachigen Literatur.

A	Alanin
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CH ₂ O ₂	Ameisensäure
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CWD	Chronic Wasting Disease
DEFRA	Ministerium für Umweltschutz, Nahrungsmittelerzeugung, Landwirtschaft und Fischerei im Vereinigten Königreich (Department for Environment, Food and Rural Affairs)
DMNV	Nucleus motorius dorsalis nervi vagi in der Medulla oblongata
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENS	Enterisches Nervensystem
F	Phenylalanin
FDC	Follikulär Dendritische Zellen
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
G	Genotypklasse
GALT	gut associated lymphoid tissue
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
H	Histidin
H.-E.-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HCl	Salzsäure
IHC	Immunhistochemie

IMG	Intramuralganglion
INNT	Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger des Friedrich- Loeffler- Institutes, Insel Riems
kDa	Kilo-Dalton
L	Leucin
LF	Lymphfollikel
LRS	Lymphoretikuläres System
mab	Monoklonaler Antikörper
M-Zellen	„microfold“ oder „membranous“ cells
N	Stickstoff
N.	Nervus
NaOCl	Natriumhydrochlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NI.	Nodus lymphaticus
NII.	Nodi lymphatici
Null-mab	Monoklonaler Antikörper für die Negativ-Kontrolle in der IHC
OIE	Internationales Tierseuchenamt (Office International des Epizooties)
PAS-Reaktion	Periodic Acid Schiff'-Reaktion
PK	Proteinase K
PMCA	Protein Misfolding Cyclic Amplification
Prion	<i>Proteinaceous infectious particle</i>
Prnp	<i>Prionprotein</i> -Gen
PrP	Prionprotein
PrP ^C	Physiologisches, zelluläres Prionprotein
PrP-Gen	Prionprotein-Gen
PrP ^{Sc}	Pathologisches Scrapie-Prionprotein
PRRS	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome
Q	Glutamin

R	Arginin
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
Sinc-Gen	Scrapie incubation gen
Sip-Gen	Scrapie incubation period gen
SRM	Spezifizierte Risikomaterialien
TBS	Tris-buffered saline
TMB	Tingible body macrophages
TME	Transmissible Enzephalopathie der Nerze
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
V	Valin
vCJK	Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Anzahl nachgewiesener Scrapie-Fälle beim Schaf seit 1985 in Deutschland (Balkema-Buschmann und Groschup 2010)	10
Abb. 3.1: Chronologie der untersuchten Herde	32
Abb. 3.2: Diagnostische Vorgehensweise bei der Untersuchung der Gewebeprobe.....	36
Abb. 4.1: Verteilung der positiven Ergebnisse der Immunhistochemie	49
Abb. 4.2: Scrapie positives Schaf Nr. 26, Ileum	51
Abb. 4.3: Scrapie positives Schaf Nr. 333, Ileum	51
Abb. 4.4: Scrapie positives Schaf Nr. 9, Tonsilla palatina.....	51
Abb. 4.5: Scrapie positives Schaf Nr. 85, NI. retropharyngeus lateralis	51
Abb. 4.6: Scrapie positives Schaf Nr. 333, Drittes Augenlid	52
Abb. 4.7: Scrapie positives Schaf Nr. 205, Milz	52
Abb. 4.8: Scrapie positives Schaf Nr. 85, NI. cervicalis superficialis	52
Abb. 4.9: Scrapie positives Schaf Nr. 26, Plexus solaris.....	53
Abb. 4.10: Scrapie positives Schaf Nr. 191, Plexus solaris.....	53
Abb. 4.11: Scrapie negatives Schaf Nr. 30, Hämosiderin	53
Abb. 4.12: Scrapie negatives Schaf, Autolyse	53

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Transmissible Spongiforme Enzephalopathien beim Menschen	3
Tab. 2.2: Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bei Tieren	4
Tab. 2.3: Ausbrüche und Anzahl betroffener Schafe von klassischer und atypischer Scrapie in Deutschland (Balkema-Buschmann und Groschup 2010)	10
Tab. 2.4: Beziehung zwischen PrP-Gen-Varianten und dem Erkrankungsrisiko bei Exposition und daraus resultierende Einteilung in Genotypklassen (DEFRA 2005).....	18
Tab. 3.1: Verteilung der Genotypen innerhalb der Schafherde.....	33
Tab. 3.2: Charakterisierung der untersuchten weiblichen Schafe	34
Tab. 3.3: Charakterisierung der untersuchten Böcke	34
Tab. 3.4: Von den getöteten Tieren für diese Studie zusätzlich entnommene Gewebeproben:	35
Tab. 4.1: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der potenziellen Eintrittspforten	45
Tab. 4.2: Nachweis von PrP ^{Sc} in den unterschiedlichen Geweben bei 13 Schafen (Immunhistochemie).....	50
Tab. 4.3: Gegenüberstellung der immunhistochemischen und histologischen Ergebnisse ...	55
Tab. 9.1: Gliederung der VO (EG) 999/2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter Transmissibler Spongiformer Enzephalopathien vom 22.05.2001 (zuletzt geändert am 11.03.2009).....	95
Tab. 9.2: Änderungen und Ergänzungen der VO (EG) 999/2001 (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften).....	96
Tab. 9.3: Histomorphologische Charakterisierung der potenziellen Eintrittspforten.....	98
Tab. 9.4: Histomorphologische Charakterisierung der Gewebe, die den potenziellen Eintrittspforten nachgeordnet sind.....	101
Tab. 9.5: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der potenziellen Eintrittspforten	103
Tab. 9.6: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Organe, die den potenziellen Eintrittspforten nachgeordnet sind	106
Tab. 9.7: Verteilung der Genotypen	107

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	2
2.1.1 TSE beim Menschen	2
2.1.2 TSE der Tiere außer Scrapie	3
2.1.3 Scrapie.....	6
2.1.3.1 Klinik.....	6
2.1.3.2 Epidemiologie.....	9
2.2 Der Erreger der TSEn	11
2.2.1 Struktur und biochemische Eigenschaften.....	11
2.2.1.1 TSE-Stämme.....	12
2.2.2 Erregerinaktivierung.....	13
2.2.3 Übertragbarkeit und genetisch bedingte Empfänglichkeit.....	14
2.2.3.1 Natürliche und experimentelle Übertragbarkeit	14
2.2.3.2 Genetisch bedingte Empfänglichkeit	15
2.2.4 Pathogenese.....	18
2.2.4.1 Erregeraufnahme und -verbreitung.....	19
2.2.4.2 Infektion von GALT (gut associated lymphoid tissue).....	19
2.2.4.3 Infektion der nicht zum GALT gehörenden lymphatischen Gewebe	20
2.2.4.4 Neuroinvasion	20
2.2.4.5 Ausbreitung in andere Gewebe	21
2.3 Diagnostik	22
2.3.1 Post-mortem-Untersuchungen.....	23
2.3.1.1 Schnelltests	24
2.3.1.2 Immunhistochemie	25
2.3.2 Ante-mortem-Untersuchungen.....	25
2.4 Überwachung, Prävention und Bekämpfung von TSEn, insbesondere von Scrapie	26
2.4.1 TSE-Überwachung	27
2.4.2 Prävention und Bekämpfung.....	28
2.5 Ziel dieser Untersuchung	31
3. MATERIAL UND METHODEN	32
3.1 Tiergut	32
3.1.1 Chronologie der Schaf- und Ziegenherde	32
3.1.2 Probenahme	35

3.2	Methoden	36
3.2.1	Histologische Präparation	36
3.2.2	Lichtmikroskopische Untersuchungen	37
3.2.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	37
3.2.2.2	Immunhistologische Methoden	37
3.2.2.3	Antikörper und Seren	38
3.2.2.4	Lösungen und Puffer	38
3.2.2.5	Evaluierung der Methodik	40
3.2.2.6	Angewandte Methodik	40
3.2.2.7	Immunhistologische Kontrollen	42
3.2.2.8	Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen	42
4.	ERGEBNISSE	43
4.1	Ergebnisse der histomorphologischen Charakterisierung	43
4.2	Absolute Zahl der Nachweise von PrP ^{Sc} mittels Immunhistochemie	46
4.3	Nachweise von PrP ^{Sc} unter Berücksichtigung der potenziellen Eintrittspforten	47
4.4	Nachweis von PrP ^{Sc} in den Organen, die den potenziellen Eintrittspforten nachgeordnet sind	48
4.5	Genüberstellung der Ergebnisse der Immunhistochemie und der Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen	54
5.	DISKUSSION	58
5.1	Ziel der Arbeit	58
5.2	Probenmaterial und Untersuchungsmethoden	58
5.3	Ergebnisse	60
5.3.1	Genotyp	60
5.3.2	Prävalenz	61
5.3.3	Eintrittspforten	63
5.3.4	Verbreitung des Erregers im Tierkörper	63
5.3.5	Aussagekraft des TSE-Schnelltests in Bezug auf die tatsächliche Prävalenz von Scrapie	64
5.3.6	Ante-mortem-Tests	65
5.4	Fazit	67
6.	ZUSAMMENFASSUNG	68
7.	SUMMARY	70
8.	LITERATURVERZEICHNIS	72
8.1	Zitierte Literatur	72

8.2	Zitierte Rechtsvorschriften	94
9.	ANHANG	95
9.1	Die Verordnung (EG) 999/2001: Gliederung und Änderungen	95
9.2	Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen	98
10.	DANKSAGUNG	108
11.	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	109
	Selbständigkeitserklärung	110

1. Einleitung

Die Scrapie (Traberkrankheit) der Schafe gilt als Prototyp der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE), da sie bereits seit dem 18. Jahrhundert bekannt ist. Es handelt sich um eine nicht fieberhafte, progressive, degenerative, stets tödlich verlaufende TSE der Schafe, selten der Ziegen, die fast weltweit vorkommt. Sie ist gekennzeichnet durch die Akkumulation von pathologischem Prionprotein (PrP^{Sc}) in diversen Geweben und durch degenerative Veränderungen des Zentralen Nervensystems (ZNS).

Lange Zeit wurde dieser Erkrankung wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Erst als Hadlow 1959 die Idee äußerte, dass die Scrapie der Schafe und die Kuru der Ureinwohner Neuguineas, die vorher nicht in Zusammenhang gebracht wurden, miteinander verwandt sein könnten, setzte ein bis heute anhaltendes Forschungsinteresse ein.

Bei dem Erreger handelt es sich nach Stanley B. Prusiners „Protein-only-Hypothese“ um ein Protein, das als Prion (*proteinaceous infectious particle*) bezeichnet wird. Man unterscheidet zwei Isoformen des Prionproteins, die physiologische, zelluläre Form (PrP^{C}) und das pathogene Scrapie- Prionprotein (PrP^{Sc}).

Mehreren Forschungsgruppen gelang bereits der Nachweis von PrP^{Sc} in Organen des lymphatischen Systems, bevor dieses im ZNS detektiert werden konnte.

Um die Aussagekraft des Untersuchungsmaterials Obex für den TSE-Status des Tieres und die tatsächliche Prävalenz von Scrapie in einer betroffenen Herde festzustellen, wurde daher in dieser Arbeit eine Untersuchung von Schafen mit empfänglichem Genotyp und negativem Befund im Stammhirn (Obex) durchgeführt. Des Weiteren sollen mit der Studie die möglichen Eintrittspforten, damit auch die Nützlichkeit verschiedener Proben für eine Antemortem-Untersuchung und die Verteilung von PrP^{Sc} im Tierkörper überprüft werden. Die Untersuchung der Wege und Mechanismen, über die die Prionen in einen Wirt eindringen und sich in dessen Organismus verteilen, kann dazu beitragen, effektive Infektionskontrollstrategien zu entwickeln und die diagnostischen Maßnahmen zu verbessern.

2. Literaturübersicht

2.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Die Bezeichnung Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE) umfasst eine Gruppe von übertragbaren, stets tödlich verlaufenden, neurodegenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems mit einer charakteristisch sehr langen Inkubationszeit. Die TSEn sind sowohl beim Menschen als auch bei Tieren bekannt. Sie werden auch als Prionerkrankungen bezeichnet, womit auf die Ätiologie hingewiesen wird (siehe 2.2).

2.1.1 TSE beim Menschen

Zu den Prionerkrankungen des Menschen gehören die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Kuru, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom und die Fatale Familiäre Insomnie. Man unterscheidet dabei sporadische, genetisch-bedingte und infektiös-bedingte Erkrankungen. Demenz und Ataxie sind die charakteristischen Symptome der klassischen CJK beim Menschen. Nach der Übertragung des BSE-Erregers auf den Menschen wurde ferner eine Variante der CJK beobachtet (Tab. 2.1).

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK), die erstmals von Hans Gerhard Creutzfeldt (1920) und Alfons Jakob (1921) beschrieben wurde, ist die häufigste humane spongiforme Enzephalopathie. Von der sporadischen CJK (sCJK) sind Frauen geringfügig häufiger betroffen als Männer. Das Alter der Erkrankten liegt zwischen 60 und 70 Jahren (Zerr und Poser 2002). Der Auslöser der Erkrankung ist noch unbekannt. Zufällige Strukturänderungen des Prionoproteins (PrP) oder spontane somatische Mutationen im PrP-Gen werden als Ursachen für die Entstehung der sCJK diskutiert. Iatrogene Übertragungen der CJK wurden mehrfach nach der Verwendung von Korneatransplantaten von an CJK-Verstorbenen, durch kontaminiertes chirurgisches Besteck, intrazerebrale Elektroden zur Aufnahme eines Elektroenzephalogramms, nach Dura mater-Transplantationen oder durch die Behandlung mit infektiösen menschlichen Wachstumshormonen aus der Hypophyse (Duffy et al. 1974; Koch et al. 1985) festgestellt. Die familiäre CJK wird hingegen autosomal-dominant vererbt. Unterschiedliche Punkt- und Insertionsmutationen im PrP-Gen wurden in betroffenen Familien festgestellt (Windl et al. 1999). Bei der Variante der CJK (vCJK), die erstmals 1996 in Großbritannien beschrieben wurde (Will et al. 1996), sind im Vergleich zur sporadischen CJK ungewöhnlich junge Patienten meist zwischen 16 und 48 Jahren betroffen. Die mittlere Krankheitsdauer bis zum Eintreten des Todes ist mit vierzehn Monaten gegenüber sechs Monaten bei der sporadischen CJK verlängert (Zerr und Poser 2002). Das Gehirn weist ein abweichendes pathologisches Läsionsprofil auf sowie in 100 % der Fälle sogenannte "floride" Amyloid-Plaques. Die vCJK wird mit der Aufnahme BSE-kontaminierter Nahrung in Zusammenhang gebracht (Bruce et al. 1997).

Kuru bei den Eingeborenen in Papua-Neuginea wurde erstmals 1957 von Gajdusek und Zigas beschrieben. Die Übertragung erfolgte durch kannibalische Totenrituale, bei denen Gewebe von Verstorbenen verzehrt oder auf der Haut verrieben wurden. Innere Organe und das Gehirn wurden vorwiegend von Frauen und Kindern verzehrt, was dazu führte, dass diese häufiger als Männer erkrankten. Die durchschnittliche Inkubationszeit wird auf zwölf Jahre geschätzt. Seit dem Verbot dieser Rituale in den späten 1950er Jahren ist die Zahl der Erkrankungen deutlich zurückgegangen (Will 2003).

Das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (Gerstmann et al. 1936) wird auf eine Punktmutation im PrP-Gen zurückgeführt, wobei sich je nach Mutation eine unterschiedliche klinische Symptomatik ergibt.

Die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) wurde erstmals 1986 in Italien beschrieben (Lugaresi et al.). Sie ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die ebenfalls durch eine Punktmutation im PrP-Gen bedingt ist. Sie verläuft klinisch mit einer nicht therapierbaren progredienten Schlaflosigkeit, Hyperaktivität des Sympathikus und motorischen Störungen.

Tab. 2.1: Transmissible Spongiforme Enzephalopathien beim Menschen

TSE-Erkrankung	Typ	Übertragungsweg
Sporadische CJK	Sporadisch	Unbekannt, somatische Mutation oder spontane Konversion von PrP ^C zu PrP ^{Sc}
Iatrogene CJK	Infektiös	Unbeabsichtigter Kontakt zu CJK-kontaminierten Geweben bei chirurgischen Eingriffen
Familiäre CJK	Genetisch	Assoziiert mit Mutationen im PrP-Gen
Neue Variante CJK	Infektiös	Ingestion von BSE-kontaminierter Nahrung, Transfusion von Blut vCJK-infizierter Spender
Kuru	Infektiös	Ritualisierter Kannibalismus
GSS	Genetisch	Assoziiert mit Mutationen im PrP-Gen
FFI	Genetisch	Assoziiert mit Mutationen im PrP-Gen

CJK: Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom

FFI: Fatale Familiäre Insomnie

2.1.2 TSE der Tiere außer Scrapie

In Tabelle 2.2 sind die Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien der Tiere (außer Scrapie, siehe dazu 2.1.3) mit den betroffenen Gattungen und dem Übertragungsweg zusammengefasst.

Tab. 2.2: Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bei Tieren

TSE-Erkrankung	Betroffene Gattungen	Übertragungsweg
BSE	Rinder, exotische Wiederkäuer	Ingestion von Prionen-kontaminiertem Futter
CWD	Edelhirsche, Großohrhirsche, Weißwedelhirsche	Horizontal, vermutlich auch vertikal
FSE	Hauskatzen, Wildkatzen	Ingestion von Prionen-kontaminiertem Futter
TME	Nerze	Vermutlich Ingestion von Prionen-kontaminiertem Futter

BSE: Bovine Spongiforme Enzephalopathie

CWD: Chronic Wasting Disease

FSE: Feline Spongiforme Enzephalopathie

TME: Transmissible Mink Enzephalopathie

Die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) wurde Mitte der achtziger Jahre erstmals in Großbritannien beobachtet (Wells et al. 1987). Weltweit wurden seitdem mehr als 180.000 Fälle diagnostiziert, wobei die allermeisten Fälle im Vereinigten Königreich aufgetreten sind. Die BSE-Epidemie ist höchstwahrscheinlich auf die Verfütterung von Kraftfutter zurückzuführen, welches unzureichend erhitztes Tiermehl enthielt. Dieses könnte über verarbeitete Schafkadaver mit dem Scrapie-Erreger kontaminiert worden sein (Wilesmith et al. 1988), eine Kontamination durch sporadische BSE-Fälle beim Rind wird ebenfalls diskutiert (Eddy 1995). Die Theorie der Übertragung durch Tiermehl wird bestätigt durch den deutlichen Rückgang der BSE-Erkrankungen seit dem EU-weiten Verbot der Verfütterung von Tiermehl an landwirtschaftliche Nutztiere im Januar 2001 (VO (EG) 999/2001).

Die durchschnittliche Inkubationszeit beträgt fünf Jahre. Erste Anzeichen einer BSE-Infektion sind Gewichtsverlust und verminderte Milchleistung. Die neurologischen Symptome äußern sich durch Verhaltensänderungen, Ataxie, Paresen und Hyperästhesie (Wells et al. 1987; Wilesmith et al. 1988; Braun et al. 1998).

Die BSE wurde über kontaminierte Nahrung auch auf den Menschen und andere Spezies übertragen. So wird eine Verbindung zwischen BSE und dem Auftreten der vCJK des Menschen als gesichert angesehen (Bruce et al. 1997), da beide TSEn bei der experimentellen Übertragung auf die Maus sehr ähnliche Inkubationszeiten und pathologische Läsionsprofile aufweisen. Die neuropathologischen Veränderungen bei Mäusen mit vCJK und Mäusen mit BSE waren schwache bis mäßige Vakuolisierung der grauen Substanz in Hypothalamus, Medulla oblongata und Septum und stärkere Vakuolisierung des Nucleus cochlearis. Auch experimentell mit BSE infizierte Rhesusaffen zeigten identische pathologische Veränderungen im Gehirn wie an vCJK verstorbene

Menschen (Lasmezas et al. 1996).

Im Jahre 2001 wurde in der EU die Durchführung eines BSE-Schnelltests bei allen Schlachtrindern, die älter als 30 Monate und für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, vorgeschrieben (VO (EG) 999/2001). Zum 01.01.2009 konnte in Deutschland die Altersgrenze für die zu testenden Schlacht- und gefallenen Tiere auf 48 Monate heraufgesetzt werden (VO (EG) 571/2008). Bis zum 14.01.2010 wurden 413 deutsche BSE-Fälle diagnostiziert.

Die BSE wurde auch auf einige Wildwiederkäuer in Zoologischen Gärten (Kirkwood et al. 1990; 1993; Kirkwood und Cunningham 1994) über das Futter übertragen. Betroffen waren Tiere folgender Arten: Antilope (*Tragelaphus angasi*), Elanantilope (*Taurotragus oryx*), Großer Kudu (*Tragelaphus strepsiceros*), Spießbock (*Oryx gazella*), Arabischer Oryx (*Oryx leucoryx*) und Säbelantilope (*Oryx dammah*).

In Großbritannien wurde von Fällen von Spongiformer Enzephalopathie bei Hauskatzen und in Zoologischen Gärten gehaltenen Wildkatzen berichtet (Willoughby et al. 1992). Auch aus Deutschland und Frankreich gibt es Berichte über das Vorkommen von FSE bei in Zoologischen Gärten gehaltenen Wildkatzen (Lezmi et al. 2003; Eiden et al. 2010). Die betroffenen Katzen waren älter als zwei Jahre und zeigten anfangs Verhaltensänderungen, später auch Ataxie, Tremor, Hypermetrie und Hyperästhesie. Die betroffenen Wildkatzen in Zoologischen Gärten waren Leoparden, Geparden und Puma. Die Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) wird ebenfalls auf die Aufnahme von mit Prionen kontaminiertem Futter zurückgeführt (Wyatt et al. 1991; Leggett et al. 1990).

Als Bestätigung einer kausalen Verbindung zwischen den vCJK- und FSE-Fällen einerseits und der BSE bei Rindern kann die Charakterisierung der Erregerstämme durch Übertragung auf Mäuse angesehen werden, die zeigte, dass es sich um denselben TSE-Stamm handelt (Bruce et al. 1994; 1997; Fraser et al. 1992).

Die Chronic Wasting Disease (CWD) ist die einzige bekannte Prionerkrankung, die Hirscharten in den Vereinigten Staaten und Kanada und damit freilebende Wildtiere betrifft. Erste Berichte über das Auftreten der CWD wurden Anfang der 80er Jahre veröffentlicht (Williams und Young 1980; 1982). Ursprung und genauer Übertragungsweg der Erkrankung sind noch ungeklärt. Epidemiologische Studien deuten jedoch auf eine horizontale Übertragung durch die Aufnahme von Futter oder Wasser hin, das mit infektiösen Sekreten, Exkreten oder anderen Geweben (zum Beispiel Plazenta) kontaminiert wurde. Allerdings wird auch eine vertikale Transmission nicht ausgeschlossen. Die betroffenen Tiere sind typischerweise älter als zwei Jahre. Die ersten klinischen Symptome der CWD sind sehr subtil und beinhalten Gewichtsverlust und Verhaltensänderungen. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium zeigen sich exzessive Salivation, schlaffe Gesichtsmuskulatur,

Regurgitation von Pansensaft, Pansenatonie, Polyurie und Polydipsie. Die Tiere sterben sieben bis acht Monate nach Auftreten erster klinischer Symptome.

Die Überwachung der CWD innerhalb der EU ist durch die Entscheidung (2007/182/EG) vom 19.03.2007 geregelt.

Die Transmissible Mink Enzephalopathie (TME) der Nerze wurde erstmals 1947 in Wisconsin und Minnesota auf Nerzfarmen festgestellt und wurde später auch in der DDR und in anderen Ländern beobachtet (Hartsough et al. 1965, Hartung et al. 1970). Seitdem gab es jedoch nur wenige Ausbrüche der Krankheit. Erkrankte Tiere zeigen ein verändertes Verhalten mit gesteigerter Aggression, Hyperästhesie und Ataxie. Epidemiologische Studien zeigen, dass die TME vermutlich durch Fütterung mit Scrapie-infiziertem Schaffleisch entstanden ist (Marsh und Bessen 1993).

2.1.3 Scrapie

Scrapie (Traberkrankheit) ist die älteste bei Tieren bekannte Transmissible Spongiforme Enzephalopathie. Es handelt sich um eine nicht-fieberhafte, progressive, degenerative, stets tödlich verlaufende Erkrankung der kleinen Wiederkäuer.

2.1.3.1 Klinik

Die Inkubationszeit der Scrapie liegt zwischen mehreren Monaten und vier Jahren. Schafe erkranken meist in einem Alter von 18 Monaten bis zu fünf Jahren. Die ersten klinischen Symptome sind oft schwer zu erkennen, da sie sich in nur geringen Verhaltensänderungen wie Ruhelosigkeit, hängenden Ohren, erhöhter Aggressivität oder Nervosität äußern. Später zeigen sich weitere Verhaltensstörungen wie Schreckhaftigkeit, Ängstlichkeit, Hyperästhesie (Überempfindlichkeit auf Berührung, Licht oder Lärm), unruhiger oder eigenartig starrer Blick, hochgestellte Ohren, eigenartiges Lippenspiel (Gnubbern), Ohrenzittern, nickende und seitliche Kopfbewegungen, vermehrte Salivation, Zusammenstürzen beim Ergreifen und beim Erschrecken. Ein wichtiges Symptom, das auch zum englischsprachigen Namen „Scrapie“ führte (to scrape = sich kratzen), ist der starke Juckreiz. Die Tiere stampfen mit den Gliedmaßen, sie benagen und scheuern Schwanzansatz, Kruppe, seitliche Brustwand und Beine. Dabei kommt es zur Beschädigung des Vlieses, verbunden mit partiellem Wollausfall, und nicht selten zu Verletzungen der Haut. Der deutsche Name „Traberkrankheit“ beruht auf den pathognomonischen Bewegungsstörungen: hypermetrischer, traberartiger Gang mit den Vorderbeinen sowie hahnentrittartiger Gang der Hinterhand. Andererseits führt eine Nachhandschwäche zu einem unsicheren und schwankenden Gang, zum Schleifen der

Zehen auf dem Boden, zu unkoordinierten Bewegungen, zum Stolpern und zum Zusammenknicken in den Gelenken. Gelegentlich kann auch ein Tremor des Kopfes oder des gesamten Körpers beobachtet werden. Die erkrankten Schafe magern trotz erhaltenem oder sogar gesteigertem Appetit zusehends ab, nur wenige verfetten. Es kommt zum Festliegen in Seitenlage und schließlich zum Verenden. Die Krankheitsdauer beträgt meist zwischen einem und mehreren Monaten, kann aber auch ungewöhnlich kurz sein (Behrens 1979; Capucchio et al. 2001; Healy et al. 2003; Vargas et al. 2005; D'Angelo et al. 2007).

Der Krankheitsverlauf ist jedoch nicht immer durch ausgeprägte klinische Symptome gekennzeichnet. So gibt es auch Berichte über subklinische TSE-Erkrankungen, bei denen das betroffene Tier entweder überhaupt keine klinischen Symptome entwickelt oder es erliegt einer anderen Erkrankung, bevor TSE-typische klinische Symptome auftreten (Hill und Collinge 2003).

Die klinischen Erscheinungen bei der Ziege sind denen des Schafes weitgehend ähnlich. Hyperästhesie, Ataxie und Pruritus gehören auch bei Ziegen zu den häufigsten Symptomen, jedoch gibt es einige Unterschiede. Als erstes Zeichen wird oft Widersetzlichkeit beim Melken beobachtet (Andrews et al. 1992; Wood et al. 1992). Capucchio et al. (2001) beschreiben erhöhte Aggressivität der Scrapie-infizierten Ziegen als ein charakteristisches Symptom.

Differentialdiagnosen

Das Spektrum an Differentialdiagnosen ist besonders im frühen Krankheitsstadium sehr breit. Erkrankungen, die mit Verhaltensstörungen, Sensibilitätsstörungen und Juckreiz, Haltungs- und Bewegungsstörungen oder langsam fortschreitender Abmagerung einhergehen, sind differentialdiagnostisch in Betracht zu ziehen. Beispiele dafür sind Listeriose, Tollwut, Ektoparasitenbefall, Borna'sche Krankheit, Aujeszky'sche Krankheit, Botulismus, Maedi/Visna, Lungenadenomatose, Paratuberkulose, Ketosen und Vergiftungen (Kümper 1994; Maurer et al. 2005). Im späteren Verlauf der klinischen Erkrankung sind meist einige der typischen Symptome so gut ausgeprägt, dass bei entsprechender Erfahrung eine klinische Verdachtsdiagnose gestellt werden kann.

Atypische Scrapie

Neben der klassischen Scrapie wird seit Einführung der intensivierten, EU weiten Scrapie-Überwachung aus nahezu allen EU-Mitgliedsstaaten auch von sogenannten „atypischen Scrapie-Fällen“ berichtet (Benestad et al. 2003; Buschmann et al. 2004a, Buschmann et al. 2004b; Orge et al. 2004). Diese Fälle lassen sich von der klassischen Form durch unterschiedliche biochemische Erregereigenschaften des akkumulierten PrP^{Sc} sowie die veränderte Erregerverteilung im Gehirn abgrenzen. So werden sie aufgrund der geringen Proteinase K-Resistenz des PrP^{Sc} nicht von allen TSE-Schnelltests erfasst (Buschmann et al. 2004a). Während es sich bei der klassischen Scrapie um eine Herdenerkrankung handelt, sind bei der atypischen Scrapie meist nur einzelne Tiere betroffen (Gretzschel et al. 2005; Lühken et al. 2007). Außerdem sind häufiger Tiere betroffen, deren Genotyp mit Resistenz gegenüber klassischer Scrapie assoziiert wird (Buschmann et al. 2004b; Orge et al. 2004). Es können Tiere aller Altersklassen erkranken (Lühken et al. 2007). Das klinische Erscheinungsbild ähnelt dem der klassischen Scrapie mit Ataxie, Schreckhaftigkeit und Abmagerung. Dagegen fehlen häufig die typischen Symptome Juckreiz und Vliesverlust. Außerdem konnte eine Akkumulation von PrP^{Sc} in lymphatischen Geweben bisher nicht nachgewiesen werden (Benestad et al. 2003). Es wird diskutiert, ob es sich bei der atypischen Scrapie eher um eine sporadische als um eine infektiöse Erkrankung handelt, ähnlich der sporadischen CJK des Menschen (Benestad et al. 2003; Lühken et al. 2007). Dafür spricht auch das Auftreten eines Falles atypischer Scrapie auf den Falkland-Inseln (Epstein et al. 2005), sowie eine gleichmäßige Prävalenz in der EU, im Gegensatz zu klassischer Scrapie, die in unterschiedlichen Häufigkeiten auftritt.

BSE beim kleinen Wiederkäuer

Da eine experimentelle Übertragung von BSE auf Schaf und Ziege (Foster et al. 1993) bereits gelungen ist, ist auch eine natürliche Übertragung nicht auszuschließen. Auch Schafe und Ziegen müssen in größerem Umfang mit BSE-kontaminierten Futtermitteln in Kontakt gekommen sein. In der Tat wurde im Jahr 2005 von einem BSE-Fall bei einer Ziege in Frankreich berichtet (Eloit et al. 2005). Eine weitere natürliche BSE-Infektion wurde bei einer Ziege im Vereinigten Königreich diagnostiziert (GoatBSE 2009).

2.1.3.2 Epidemiologie

Die erste gesicherte Beschreibung über das Auftreten von Scrapie bei Schafen erfolgte nach McGowan 1732 in Großbritannien (McGowan 1922). Andere Autoren sind der Auffassung, dass es sich hierbei um ein Missverständnis handelt und datieren das erste Auftreten auf 1750 (Schneider et al. 2007). In jedem Falle aber ist diese Erkrankung bereits seit über 250 Jahren bekannt und gilt somit als Prototyp der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien. Lange Zeit jedoch wurde der Scrapie wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Erst als Hadlow 1959 die Idee äußerte, dass die Scrapie der Schafe und die Kuru der Ureinwohner Neuguineas, die vorher nicht miteinander in Zusammenhang gebracht wurden, verwandt sein könnten (Hadlow 1959), wuchs das Interesse an Scrapie.

Scrapie ist fast weltweit verbreitet. Die Verbreitung der Erkrankung geschah vermutlich durch den Import inkubierender Schafe. Australien und Neuseeland sind trotz ausgeprägter Schafindustrie derzeit Scrapie-frei. Strenge Import-, Quarantäne- und Ausrottungsbestimmungen haben die Einschleppung der Krankheit offensichtlich erfolgreich verhindert (Hoinville 1996; Detwiler und Baylis 2003).

Genauere Daten über die Prävalenz der Scrapie in den einzelnen Ländern sind schwer zu erfassen, da am lebenden Tier keine sichere Diagnosestellung möglich ist. In Großbritannien zum Beispiel wird nach einer Umfrage unter den Landwirten vermutet, dass ein Drittel aller Schafherden infiziert ist (Morgan et al. 1990). In den Niederlanden gaben bei einer ähnlichen Umfrage 6 % der Landwirte an, mindestens einmal einen Scrapie-Fall in der Herde beobachtet zu haben (Schreuder 1993).

Die Situation in Deutschland ist der Abbildung 2.1 und der Tabelle 2.3 zu entnehmen. Von Mitte des 19. Jahrhunderts bis Anfang des 20. Jahrhunderts verursachte die Scrapie in Deutschland große wirtschaftliche Verluste. Zwischen 1945 und 1985 sind in der Bundesrepublik Deutschland jedoch keine Fälle mehr bekannt geworden. Erst 1985 trat die Erkrankung hier wieder auf (Straub und Weiland 1992). In der DDR wurde Scrapie bereits 1973 bei 60 Schafen einer Herde diagnostiziert (Hiepe et al. 1973). In Abbildung 2.1 ist die Anzahl der Scrapie-positiven Schafe in Deutschland seit 1985 dargestellt. Der deutliche Anstieg positiver Befunde seit 2002 fällt mit der Einführung der aktiven Scrapie-Überwachung nach VO (EG) 999/2001 zeitlich zusammen.

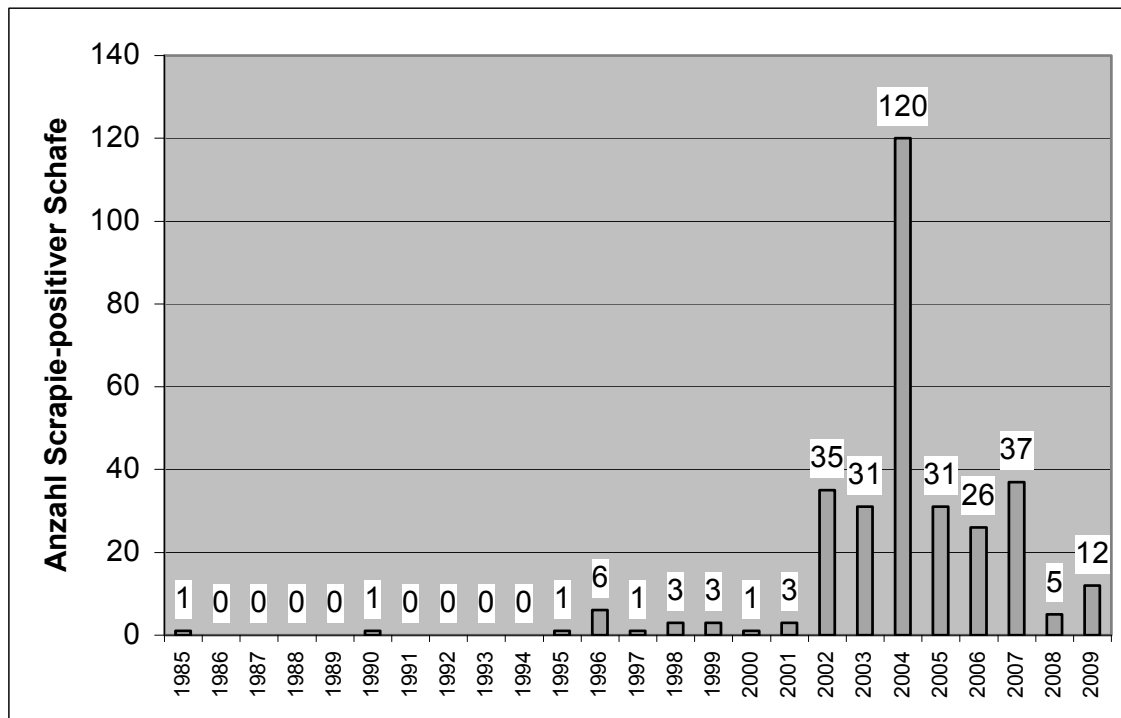


Abb. 2.1: Anzahl nachgewiesener Scrapie-Fälle beim Schaf seit 1985 in Deutschland (Balkema-Buschmann und Groschup 2010)

In Tabelle 2.3 sind die Anzahl der Scrapie-Ausbrüche, unterteilt nach klassischer und atypischer Scrapie, und die Anzahl der jeweils betroffenen Tiere in Deutschland seit 2002 aufgeführt. Aus der großen Zahl der Ausbrüche und der geringen Zahl betroffener Tiere bei der atypischen Scrapie kann man ablesen, dass es sich bei der atypischen Scrapie eher um eine Einzeltierkrankung handelt.

Tab. 2.3: Ausbrüche und Anzahl betroffener Schafe von klassischer und atypischer Scrapie in Deutschland (Balkema-Buschmann und Groschup 2010)

	Klassische Scrapie		Atypische Scrapie		Total	
	Anzahl der Ausbrüche	Anzahl der Schafe	Anzahl der Ausbrüche	Anzahl der Schafe	Anzahl der Ausbrüche	Anzahl der Schafe
2002	4	26	9	9	13	35
2003	4	11	18	20	22	31
2004	6	78	37	42	43	120
2005	4	4	25	27	29	31
2006	2	3	19	23	21	26
2007	6	15*	20	21*	27	37
2008	0	0	5	5	5	5
2009	0	0	12	12	12	12
Total	26	137	145	159	172	297

*Plus ein Fall TSE-positiv, aber Unterscheidung klassisch/atypisch nicht möglich

Natürlich vorkommende Scrapie bei Ziegen wurde erstmals 1942 in Frankreich beschrieben (Chelle 1942). Weitere Scrapie-Fälle bei Ziegen wurden unter anderem beschrieben in Kanada (Stemshorn 1975), Zypern (Toumazos 1991; Toumazos und Alley 1989), Finnland (OIE 2002), Griechenland (Leontides et al. 2000), Italien (Capucchio et al. 1998), Schweiz (Fankhauser et al. 1982), Großbritannien (Brotherston et al. 1968; Harcourt 1974; Andrews et al. 1992; Goldmann et al. 1996) und in den USA (Hourrigan et al. 1969; Hadlow et al. 1980). In Deutschland ist bisher noch kein TSE-Fall bei einer Ziege festgestellt worden (Stand: September 2010).

2.2 Der Erreger der TSEn

In den 50er Jahren wurde aufgrund der beobachteten langen Inkubationszeiten angenommen, dass es sich bei dem Erreger der TSEn um ein „langsames“ Virus handelt. Dies führte zur Klassifizierung von Scrapie als „Slow virus infection“ (Sigurdsson 1954). Es konnte jedoch weder ein krankheitsassoziiertes Virus noch eine entsprechende Immunantwort nachgewiesen werden. Daher geht man nach dem heutigen Stand des Wissens von der „Protein-only-Hypothese“ aus, die Prusiner 1982 aufstellte. Danach handelt es sich beim Erreger der TSEn um ein unkonventionelles, infektiöses Protein, das als Prion (*proteinaceous infectious particle*) bezeichnet wird und allein krankheitsverursachend sein soll. Obwohl Prusiners Hypothese noch nicht vollständig bewiesen werden konnte, wird sie im Gegensatz zur Virus-Hypothese von Diringier (1994) und Manuelidis (1994) und der Virino-Hypothese von Dickinson und Outram (1988) von den meisten Wissenschaftlern akzeptiert.

2.2.1 Struktur und biochemische Eigenschaften

Das Prionprotein (PrP) existiert in einer physiologischen, wirtsspezifischen, zellulären Form (PrP^C) im nicht infizierten Wirt und als Hauptkomponente des krankheitsauslösenden Agens der TSEn (PrP^{Sc}, Sc steht für Scrapie).

Das PrP^{Sc} ist im Gegensatz zum PrP^C partiell resistent gegenüber einer Proteinase K-Verdau (Oesch et al. 1985) und auch ungewöhnlich unempfindlich gegenüber Strahlung und anderen Agenzien. Diese Tatsachen führten schon früh zu der Annahme, dass der Erreger keine eigene Nukleinsäure enthält, sondern nur aus Protein besteht. Ein wirtseigenes chromosomales Gen kodiert für das Prionprotein (Chesebro et al. 1985, Oesch et al. 1985). Dieses Gen lässt sich bei allen bisher untersuchten Säuger- und Vogelarten nachweisen.

Das normale Prionprotein (PrP^C) wird in den meisten Körpergeweben exprimiert, am meisten jedoch im Nervengewebe (Bendheim et al. 1992; Horiuchi et al. 1995). Die zelluläre Isoform ist ein 33-35 kDa Glycoprotein mit zwei N-Glycosylierungsstellen, das durch einen

Glycosylphosphatidylinositolanker (GPI) an der äußeren Zellmembran verankert ist (Stahl et al. 1987). Seine Sekundärstruktur ist reich an α -Helices (42 %) und beinhaltet wenige β -Faltblattstrukturen (3 %) (Pan et al. 1993). Die genaue Funktion des PrP^C ist immer noch unklar. Es soll aber eine Rolle in Anti-Oxidant-Systemen und im zellulären Kupfer-Stoffwechsel spielen (Brown et al. 1997). Büler et al. (1992) beschrieben, dass sich transgene Mäuse ohne PrP (PrPnull-Mäuse) normal entwickeln und verhalten. Tobler et al. (1996) hingegen beobachteten eine Abweichung im circadianen Aktivitäts- und Schlafrythmus bei derartigen PrPnull-Mäusen.

Im Laufe der TSE-Erkrankung kommt es zu posttranslationalen Konformationsänderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur des PrP. Dadurch erhöht sich die Anzahl an β -Faltblattstrukturen auf etwa 47 % (Pan et al. 1993; Caughey et al. 1991). Diese aggregieren aufgrund hoher Hydrophobizität zu amyloidähnlichen Strukturen, den Scrapie-assoziierten Fibrillen (SAF) oder Prion-Rods (Diringer et al. 1983; Hope et al. 1986; Lehmann und Harris 1995). Dies resultiert in einer erhöhten Resistenz des PrP^{Sc} gegenüber proteolytischen Enzymen. Durch die Einwirkung des Enzyms Proteinase K kommt es lediglich zu einer Abspaltung von etwa 68 Aminosäuren am N-Terminus des PrP und damit zu einer charakteristischen Reduktion des Molekulargewichts auf 27-30 kDa. Diese Eigenschaft wird bei fast allen diagnostischen Methoden genutzt.

Die Umwandlung des normalen Wirtsproteins (PrP^C) zu der aggregierten Form (PrP^{Sc}) ist das grundlegende Ereignis im Krankheitsgeschehen der TSE (Hunter 1997), wobei der Mechanismus der Konversion noch immer nicht aufgeklärt ist. Gemäß dem Heterodimer-Modell (Prusiner 1991) erfolgt die Konversion durch Anlagerung eines PrP^{Sc} an das zelluläre Protein. Dies startet einen katalytischen Prozess, bei dem das neu entstandene PrP^{Sc} weitere Konversionen induziert. Diese Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} konnte auch *in vitro* im zellfreien System nachgestellt werden, induziert durch PrP^{Sc} selbst (Kocisko et al. 1994, Caughey et al. 1999), was Prusiners Hypothese stützt. Saborio et al. (2001) entwickelten daraus die „Protein Misfolding Cyclic Amplification“ (PMCA). Mithilfe der PMCA können durch *In vitro*-Konversion sehr geringe Mengen an PrP^{Sc} derartig vermehrt werden, dass sie detektierbar werden.

2.2.1.1 TSE-Stämme

Pattison und Millson (1960) entdeckten bei experimentell mit zwei unterschiedlichen Scrapie-Isolaten infizierten Ziegen zwei verschiedene klinische Bilder und schlossen daraus auf unterschiedliche Erregerstämme. Später wurden weitere unterschiedliche Prionstämme in verschiedenen Spezies identifiziert, die sich in Inkubationszeit und Läsionsprofil (detaillierte

Beschreibung der neuropathologischen Befunde) in bestimmten Mauslinien unterscheiden.

Für einen standardisierten Vergleich der Stämme erfolgt eine Übertragung auf Labortiere (Mäuse und/oder Hamster). Als Unterscheidungskriterien werden die klinische Symptomatik, Inkubationszeit, Übertragbarkeit, histopathologisches Läsionsprofil, Ausmaß der Resistenz gegenüber Proteinase K, Verhalten bei Inaktivierungsversuchen und PrP^{Sc}-Glykosylierung herangezogen.

Die TSE-Stammcharakteristika bleiben auch nach Passagierung in verschiedenen Spezies oder Genotypen stabil. Das zeigt, dass das Agens seine eigenen stammspezifischen Informationen trägt (Bruce 1993; Bruce et al. 1994; Bruce 2003).

Bei Scrapie bei Schafen und Ziegen können mehrere verschiedene Erregerstämme unterschieden werden.

Bei der BSE beim Rind hingegen wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass weltweit nur ein einzelner BSE-Stamm existiert. Die Stamm-Typisierung in Mäusen hat gezeigt, dass dieser BSE verursachende Stamm sowohl Hauskatzen als auch Wiederkäuer in Zoologischen Gärten infiziert hat und auch bei Menschen mit vCJK isoliert wurde (Bruce et al. 1994; Bruce et al. 1997). Allerdings wurde kürzlich das Auftreten atypischer BSE-Fälle bei über acht Jahren alten Rindern berichtet (Casalone et al. 2004; Buschmann et al. 2006; Baron et al. 2007). Diese Fälle unterscheiden sich von der klassischen BSE unter anderem hinsichtlich des Molekulargewichts und des Glycosylierungsmusters des PrP sowie der betroffenen Hirnregionen und den dabei auftretenden Ablagerungsmustern. So kann davon ausgegangen werden, dass noch mindestens zwei weitere BSE-Stämme existieren.

2.2.2 Erregerinaktivierung

Zahlreiche Studien zeigen, dass sich der TSE-Erreger durch eine hohe Resistenz gegenüber physikalischen und chemischen Inaktivierungsversuchen auszeichnet. Herkömmliche Desinfektionsmaßnahmen, die erfolgreich zur Abtötung konventioneller Mikroorganismen angewendet werden, bleiben meist wirkungslos (Taylor 1993). Oft lässt sich nur eine Senkung der Infektiosität erreichen, nicht aber eine komplette Inaktivierung. Eine totale Inaktivierung können nur starke Alkalien (Natronlauge) und Oxidationsmittel (Natriumhypochlorit) bewirken. Einen weiteren Hinweis auf die extreme Resistenz der Prionen geben auch die akzidentellen Übertragungen, wie zum Beispiel die Übertragung von Scrapie durch eine Formalin-inaktivierte Louping Ill-Vakzine (Robinson 1996) oder die BSE-Epidemie, bei der Tiermehle verfüttert wurden, die in Tierkörperbeseitigungsanlagen einer Hitzebehandlung bei 80°C bis 90°C unterzogen worden waren (Wilesmith et al. 1991). Eine hohe Tenazität der Prionen gegenüber Austrocknung, hohen Umwelttemperaturen und

Sonneneinstrahlung ist ebenfalls bekannt (Brown und Gajdusek 1991).

Für die Resistenz der Prionen sind offensichtlich die geordnete Tertiärstruktur des PrP^{Sc} und seine Tendenz zur Bildung von Aggregaten mit amyloider Struktur, die als Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) oder Prion-Rods bezeichnet werden, von entscheidender Bedeutung (Hörnlimann et al. 2001a).

Im Beschluss 603 des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe werden wirksame Inaktivierungs- und Dekontaminationsverfahren empfohlen.

Eine effektive Deaktivierung von PrP^{Sc} wird erreicht mit 1M Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) oder 2,5%iger Natriumhypochlorit-Lösung (NaOCl) mit jeweils mindestens einer Stunde Einwirkzeit. Diese Mittel eignen sich besonders für nicht autoklavierbare Oberflächen und Materialien, haben aber den Nachteil einer korrosiven Wirkung.

Eine besonders wirksame Methode ist die Kombination von Autoklavieren bei 121°C und die Verwendung von 1M NaOH (Taylor 2000).

Alkohole wie Ethanol und Propanol haben keine inaktivierende Wirkung auf Prionen. Herkömmliche alkoholische Händedesinfektionsmittel eignen sich daher nicht zur Desinfektion Prionen-kontaminierter Haut. Empfohlen wird nach Kontamination eine sofortige Behandlung mit 2,5%iger Natriumhypochlorit-Lösung oder 5-10 minütige Dekontamination mit 1M NaOH (Raeber und Aguzzi 2001).

Formalin inaktiviert den TSE-Erreger nicht, sondern stabilisiert ihn. Die Infektiosität in formalinfixiertem Gewebe für die Arbeit in der Histologie kann aber um den Faktor 10⁷ herabgesetzt werden durch die Dekontamination des Gewebes mit 98%iger Ameisensäure (CH₂O₂) vor der Routineeinbettung (Brown et al. 1990). Eine Ameisensäurebehandlung bewirkt jedoch keine vollständige Inaktivierung. Im Verlauf der Herstellung feingeweblicher Schnitte verringert eine zweite (10-minütige) Inkubation der bereits auf Objektträger aufgezogenen Schnitte in Ameisensäure nochmals die Infektiosität.

2.2.3 Übertragbarkeit und genetisch bedingte Empfänglichkeit

2.2.3.1 Natürliche und experimentelle Übertragbarkeit

Bereits 1936 gelang Cuillé und Chelle der Nachweis des infektiösen Charakters von Scrapie durch experimentelle Übertragungen auf Schafe und Ziegen (Cuillé und Chelle 1936; Cuillé und Chelle 1938). Anfang der 60er Jahre wurden erstmals Mäuse experimentell mit Scrapie infiziert (Chandler 1961; Zlotnik und Rennie 1963).

Der natürliche Übertragungsweg der klassischen Scrapie innerhalb einer Schafherde ist primär perinatal/horizontal (Hadlow et al. 1982). Dabei spielt der direkte Kontakt des

neugeborenen Lamms und anderer Herdenmitglieder mit den Nachgeburten infizierter Mutterschafe eine wichtige Rolle (Pattison et al. 1972; Dickinson et al. 1974; Race et al. 1998). Durch die infizierten Plazenten kommt es auch zu einer Kontamination der Weiden und Ställe. Das Weideland kann dann angesichts der großen physikalischen und chemischen Stabilität des Erregers über mehrere Jahre für Schafe infektiös bleiben (Hagenaars et al. 2003; Brown und Gajdusek 1991; Seidel et al. 2007). Eine diaplazentare Übertragung scheint ebenfalls stattzufinden, jedoch ist ihre Bedeutung wesentlich geringer als der direkte postnatale Kontakt (Onodera et al. 1993; Andreoletti et al. 2002). Eine Übertragung von Herde zu Herde erfolgt meist durch infizierte Tiere im Inkubationsstadium.

Es sind zwei Fälle bekannt, bei denen es zu einer iatrogenen Übertragung von Scrapie durch die Anwendung von Vakzinen kam, bei deren Herstellung kontaminiertes Hirnmaterial von Schafen verwendet wurde (Robinson 1996; Caramelli et al. 2001; Zanusso et al. 2003). Es handelte sich um Impfstoffe gegen Louping Ill in Schottland und gegen *Mycoplasma agalactiae* in Italien. Durch beide Zwischenfälle kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Scrapie-Inzidenz in den betroffenen Ländern.

In Versuchen mit Mäusen konnte auch eine Infektion mit Scrapie-Erregern über die Konjunktiven nachgewiesen werden (Scott et al. 1993). Außerdem gelang eine Infektion mit Scrapie über Läsionen der Haut bei immunkompetenten Mäusen (Taylor et al. 1996). Versuche an Hamstern zeigten eine erfolgreiche Scrapie-Infektion durch Inokulation in die Zahnpulpa (Ingrosso et al. 1999).

Infektionsstudien haben weiterhin gezeigt, dass das Blut bestimmter Spezies, sowohl während der klinischen als auch in der präsymptomatischen Phase der Erkrankung, Prionen enthalten kann, die somit übertragen werden können (Hunter et al. 2002; Saá et al. 2006). So konnten Schafe mit dem BSE-Erreger durch Bluttransfusion von asymptomatischen, infizierten Tieren infiziert werden (Hunter et al. 2002). Auch bei der menschlichen Prionerkrankung vCJK scheint eine Übertragung über das Blut möglich zu sein. Die vCJK-Infektion von drei Patienten wurde mit einer Transfusion von Blut symptomfreier Spender assoziiert. Die zum Zeitpunkt der Blutentnahme klinisch gesunden Spender verstarben später an vCJK (Llewelyn et al. 2004; Peden et al. 2004).

2.2.3.2 Genetisch bedingte Empfänglichkeit

Ausschlaggebend für eine TSE-Empfänglichkeit ist die Expression von PrP^c. Transgene Mäuse, die das Prionprotein-Gen nicht tragen, sind unempfindlich gegenüber Scrapie (Büler et al. 1993). Implantiert man solchen Mäusen jedoch Neuronen ins Gehirn, die PrP^c bilden, so entstehen nach experimenteller, intrazerebraler Infektion in den entsprechenden Regionen TSE-spezifische histopathologische Veränderungen. Nach peripherer Inokulation

gelingt dies nicht. Somit scheint das PrP^C sowohl für lokale Entwicklung der Läsionen als auch für den Erregertransport zum ZNS von entscheidender Bedeutung zu sein (Blättler et al. 1997). Dies unterstützt Prusiners Prion-Hypothese (Prusiner 1982).

Obwohl Scrapie eine Infektionskrankheit ist, besteht ein starker genetischer Einfluss auf die Krankheitsempfänglichkeit, bei der das Prionprotein-Gen von zentraler Bedeutung ist (Hunter et al. 1997). Bei der experimentellen Infektion ist die Inkubationszeit von verschiedenen Parametern abhängig, dazu gehören der Genotyp des Empfängertiers, der TSE-Stamm sowie die Dosis und Applikationsart des infektiösen Agens. Das Gen, welches das Prionprotein kodiert und damit auch die TSE-Inkubationszeit beeinflusst, wird als *Prnp* bezeichnet. Dickinson et al. (1968) postulierten ein *Sinc*-Gen (Scrapie incubation gen) bei der Maus, das die Inkubationszeit beeinflusst. Das analoge Gen beim Schaf wurde als *Sip*-Gen (Scrapie incubation period) bezeichnet. Nach den Erkenntnissen von Moore (1998) entsprechen diese Gene tatsächlich dem Prnp. Das Prnp des Schafes weist in einer Reihe von Codons sowohl in individuellen Schafen als auch in bestimmten Schafelinien oder -rassen variable Allele auf. Dabei sind die Polymorphismen an drei Positionen (Codon 136, 154 und 171) von besonderer Bedeutung für die Dauer der Inkubationszeit, die Pathologie und die klinischen Symptome der klassischen Scrapie (Goldmann et al. 1991, Goldmann et al. 1994). Durch die Polymorphismen wird die Aminosäuresequenz beeinflusst, was die Struktur des PrP^C verändern kann. Das kann dazu führen, dass die Prionstruktur stabilisiert oder destabilisiert wird. Somit können sich Teile des PrP^C mit geringerer oder höherer Wahrscheinlichkeit von der α -helikalen Struktur in eine β -Faltblattstruktur umfalten (Prusiner 1998).

Die essentiellen Codons für die Empfänglichkeit der klassischen Scrapie liegen beim Schaf an den Positionen 136, 154 und 171 des Prnp (Hunter 1997) mit folgenden möglichen Aminosäurepolymorphismen:

- Codon 136: Valin (V) oder Alanin (A)
- Codon 154: Arginin (R) oder Histidin (H)
- Codon 171: Arginin (R), Glutamin(Q) oder Histidin (H)

Basierend auf diesen drei Codons kommen insgesamt fünf verschiedene Allele vor, nämlich VRQ, ARQ, ARH, AHQ und ARR. Die Genotypen, die sich aus diesen Allelen ergeben, weisen unterschiedliche Empfänglichkeiten für Scrapie auf. Bei den einzelnen Schafrassen ist das Vorkommen dieser Allele nicht einheitlich.

Die Allele ARR (Alanin-Arginin-Arginin) werden mit Resistenz gegenüber natürlicher Scrapie assoziiert und die Allele VRQ (Valin-Arginin-Glutamin) mit höchster Empfänglichkeit, insbesondere wenn sie homozygot vorliegen (Goldmann et al. 1990; Hunter 1996; 1997;

Hunter et al. 1997; Elsen et al. 1999). Weltweit existierte lange Zeit nur ein unbestätigter Bericht von klassischer Scrapie in einem PrP^{ARR/ARR}-Schaf (Ikeda et al. 1995), der erst kürzlich durch einen weiteren Bericht aus Deutschland und Frankreich bestätigt wurde (Groschup et al. 2007). Untersuchungen deuten darauf hin, dass PrP^{ARR/ARR}-Schafe eine geringe Empfänglichkeit gegenüber einer experimentellen oralen Infektion sowohl mit dem Scrapie- als auch mit dem BSE-Agens aufweisen (O'Rourke et al. 1997; Bossers et al. 2000; Jeffrey et al. 2001). Jedoch können PrP^{ARR/ARR}-Schafe nicht als absolut genetisch resistent gegenüber TSE-Erkrankungen angesehen werden, da eine intrazerebrale Inokulation mit BSE zur Erkrankung und Ausprägung klinischer Symptome geführt hat (Houston 2003). Außerdem ist zu beachten, dass atypische Scrapiefälle bei Schafen mit wenigstens einem ARR-Allel regelmäßig vorkommen (Benestad et al. 2003; Buschmann et al. 2004; Lühken et al. 2006).

Die Allele ARQ, ARH und AHQ verhalten sich abhängig von der Rasse unterschiedlich (Hunter 1997; Thorgeirsdottir et al. 1999). Bei Schafrassen, in denen VRQ-Allele selten vorkommen, wird PrP^{ARQ} mit erhöhter Scrapie-Empfänglichkeit assoziiert (Hunter et al. 1994, Elsen et al. 1999), was auch im deutschen Schafbestand der Fall ist (Lühken et al. 2006). Die Rolle des ARH-Allels ist nicht genau geklärt. Bei Texel-Schafen verhält es sich wahrscheinlich neutral (Belt et al. 1995). Für das AHQ-Allel bei Romanov-Schafen wird von Elsen et al. (1999) ein protektiver Einfluss beschrieben. Dagegen beschreiben Tranulis et al. (1999) zwei Scrapie-Fälle bei AHQ-homozygoten Schafen norwegischer Rassen.

Wie in Tabelle 2.4 dargestellt, können die verschiedenen möglichen Allelkombinationen je nach Scrapie-Empfänglichkeit in Genotypklassen eingeteilt werden. Tiere der Genotypklasse 1 zeigen die höchste, diejenigen der Klasse 5 die geringste Resistenz gegenüber klassischer Scrapie.

Es ist noch ungeklärt, ob die Scrapieinfektion in Scrapie-resistenten Genotypen persistiert und ob Tiere dieser Genotypen dann als subklinische Träger zur Verbreitung der Infektion beitragen.

Im Zusammenhang mit atypischer Scrapie hat ein weiterer Polymorphismus, nämlich an Position 141 (Leucin (L) oder Phenylalanin (F)) besondere Aufmerksamkeit erhalten. Das Vorhandensein von F an dieser Position in Kombination mit dem Kodon ARQ scheint die Empfänglichkeit für atypische Scrapie deutlich zu erhöhen (Moum et al. 2005, Lühken et al. 2006)

Auch bei der Ziege wurden bereits mehrere Mutationen im Prnp beschrieben (Goldmann et al. 1996; Bossers et al. 2000; Billinis et al. 2002; Papisavva-Stylianou et al. 2005; Acutis et al. 2006). Diese scheinen, wie beim Schaf, Einfluss auf die Inkubationszeit zu haben, jedoch ist die Verbindung zwischen Polymorphismus und TSE-Empfänglichkeit nicht so stark

ausgeprägt wie beim Schaf.

Tab. 2.4: Beziehung zwischen PrP-Gen-Varianten und dem Erkrankungsrisiko bei Exposition und daraus resultierende Einteilung in Genotypklassen (DEFRA 2005)

Genotyp	Genotypklasse	Erkrankungsrisiko
ARR/ARR	G 1	Die Schafe weisen die höchste genetische Resistenz auf.
ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ	G 2	Die Schafe sind genetisch resistent, sollten aber nur nach sorgfältiger Selektion für die weitere Zucht eingesetzt werden.
AHQ/AHQ AHQ/ARH AHQ/ARQ ARH/ARH ARH/ARQ ARQ/ARQ	G 3	Die Schafe weisen eine geringe genetische Resistenz auf und sollten nur nach sorgfältiger Selektion weiter züchterisch genutzt werden.
ARR/VRQ	G 4	Die Schafe sind genetisch Scrapie-empfindlich und sollten nicht in der Zucht eingesetzt werden.
AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	G 5	Die Schafe sind am empfindlichsten für Scrapie. Sie sollten nicht in der Zucht eingesetzt werden.

A = Alanin; V = Valin; R = Arginin; H = Histidin; Q = Glutamin

2.2.4 Pathogenese

Zu den grundlegenden Erkenntnissen über die Pathogenese von Scrapie beim kleinen Wiederkäuer gelangte man erst in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts (Pattison und Millson 1962; Eklund et al. 1967; Dickinson et al. 1974).

Prion-Erkrankungen rufen keine Immunantwort hervor. Dies ist jedoch nicht durch eine nachweisbare immunologische Fehlfunktion oder Suppressorzellaktivität, sondern wahrscheinlich durch die Tatsache bedingt, dass infektiöses PrP^{Sc} und PrP^C identische Aminosäuresequenzen besitzen (Mabbot et al. 1998). Im Gegensatz dazu zeigen PrP-Knock

out-Mäuse (transgene Mäuse, die das Prionprotein nicht exprimieren) eine Immunantwort gegen PrP (Blättler et al. 1997).

2.2.4.1 Erregeraufnahme und -verbreitung

Schafe infizieren sich unter natürlichen Bedingungen durch orale Erregeraufnahme. Auch wenn in Versuchen gezeigt wurde, dass sowohl normales als auch pathologisches Prionprotein durch die Verdauungssäfte fast vollständig verdaut werden (Jeffrey et al. 2006, Sales 2006), passiert das noch verbleibende abnorme Prionprotein die intakte Darmschranke und gelangt bald darauf in die Lymphe. Dies geschieht in gleicher Weise sowohl bei Schafen empfänglicher Genotypen als auch bei resistenten Schafen (Sales 2006).

Hochspezialisierte Epithelzellen, sogenannte M-Zellen („microfold“ oder „membranous“ cells), im follikelassoziierten Epithel der Peyer'schen Platten sind vermutlich wichtige Eintrittspforten für den Erreger (Press et al. 2004). Diese Zellen sind spezialisiert auf den transepithelialen Transport von Makromolekülen und Partikeln, um für das Immunsystem Inhalte aus dem Lumen des Intestinums zu sammeln (Neutra et al. 1996). Sie können von manchen Mikroorganismen (zum Beispiel *Salmonella typhi* und *typhimurium*) ausgenutzt werden, um in die Tunica mucosa zu gelangen (Jones et al. 1994). Die Transzytose des Scrapie-Agens auf die basolaterale Seite des Epithels durch M-Zellen wurde im In-vitro-System nachgewiesen (Heppner et al. 2001). Als weitere mögliche Orte der Erregeraufnahme werden auch Enterozyten (Jeffrey et al. 2006) und die Fortsätze dendritischer Zellen (Mabbot und MacPherson 2006) diskutiert.

An der Ausbreitung des Erregers über Lymph- und Blutgefäße sind vermutlich Follikulär Dendritische Zellen (FDC) und „Tingible-Body-Macrophages“ (TMB) beteiligt, da in ihnen große Mengen von PrP^{Sc} immunhistochemisch nachgewiesen werden konnten (McBride et al. 1992; Jeffrey et al. 2000; Huang und MacPherson 2003).

2.2.4.2 Infektion von GALT (gut associated lymphoid tissue)

In mehreren Studien an Texel-Schafen (van Keulen et al. 1996; van Keulen et al. 1999; van Keulen et al. 2002) konnte gezeigt werden, dass die Tonsilla palatina, die Peyer'schen Platten des kaudalen Jejunum und des Ileums und die dazugehörigen drainierenden Lymphknoten (Lymphonodi retropharyngeales, Lymphonodi jejunales und Lymphonodi ileocaecales) die ersten Orte sind, an denen PrP^{Sc} nachgewiesen werden kann. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Andreoletti et al. (2000) an Romanov-Schafen. Sie wiesen PrP^{Sc} in den Peyer'schen Platten und in den drainierenden Mesenteriallymphknoten nach. Daher

werden die GALT-Gewebe des Oropharynx und des Darmes als Haupteintrittspforte für eine natürliche Scrapie-Infektion angesehen (Hadlow et al. 1982; Heggebo et al. 2000; van Keulen et al. 2002).

Die Verteilung von PrP^{Sc} im Tierkörper ist nicht bei jedem Tier gleich. Sie scheint abhängig vom Genotyp des betroffenen Tieres zu sein. Bei Schafen, die das Allel VRQ homozygot tragen, ist eine sehr frühe Akkumulation von PrP^{Sc} in lymphatischen Geweben bereits bei Lämmern im Alter von zwei Monaten zu beobachten (Andreoletti et al. 2000). In der klinischen Phase der Erkrankung erfolgt die Akkumulation von PrP^{Sc} bei PrP^{VRQ/VRQ} Schafen allerdings sowohl in lymphatischen als auch in neuronalen Geweben. Bei Schafen mit den Allelen VRQ/ARR ist PrP^{Sc} nur im ZNS nachweisbar, nicht in lymphatischen Geweben. Diese Tatsache führte zu der Annahme, dass Schafe mit wenigstens einem ARR-Allel das PrP^{Sc} im lymphatischen Gewebe nicht akkumulieren (van Keulen et al. 1996; van Keulen et al. 2002; Andreoletti et al. 2000; Jeffrey et al. 2002; Ersdal et al. 2005). Dafür sprechen auch die Untersuchungen an PrP^{ARR/ARR}-Schafen mit atypischer Scrapie, bei denen in ausgewählten lymphatischen Geweben ebenfalls keine Akkumulation von PrP^{Sc} festgestellt werden konnte (Benestad et al. 2003). Ersdal et al. (2003), Houston et al. (2002) und Gonzalez et al. (2006) schließen jedoch aus ihren Beobachtungen, dass PrP^{Sc} unabhängig vom Genotyp im lymphoretikulären System von erkrankten Tieren detektiert werden kann.

2.2.4.3 Infektion der nicht zum GALT gehörenden lymphatischen Gewebe

Von den lymphatischen Geweben des Verdauungstrakts wandert der Erreger über die Lymphe zu lymphatischen Geweben, die nicht zum Verdauungstrakt gehören, wie zur Milz und zu anderen Körperlymphknoten. Die Invasion der lymphatischen Gewebe kann aber auch später retrograd über infizierte Nervenbahnen erfolgen (Andreoletti et al. 2000; Heggebo et al. 2002; van Keulen et al. 2002).

2.2.4.4 Neuroinvasion

Der Magen-Darm-Trakt ist reich an autonomer Innervation. Es gibt zwei autonome Plexus: den Auerbach'schen Plexus oder Plexus myentericus zwischen den beiden Muskelschichten der Darmwand sowie den Meissner'schen Plexus oder Plexus submucosus in der Tunica submucosa. Zusammen bilden sie das enterische Nervensystem (ENS).

Bedingt durch die unmittelbare Nachbarschaft der Peyer'schen Platten zum enterischen Nervensystem beginnt hier die Neuroinvasion, auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist. Bekannt ist aber, dass die Ausbreitung von Prionen von der Peripherie ins ZNS von PrP-haltigem Gewebe abhängig ist (Brandner et al. 1996).

Die Neuroinvasion des Scrapie-Erregers wurde intensiv am Hamster untersucht (Baldauf et al. 1997; Beekes et al. 1998; McBride et al. 2001). Dabei zeigte sich, dass der Infektionsprozess im Bereich der thorakalen Wirbelsäule ins Rückenmark eindringt und dass eine alternative Route unter Umgehung des Rückenmarks existiert. Die Ausbreitung erfolgt zum einen über efferente parasymphatische Fasern, die die thorakalen und abdominalen Eingeweide innervieren, zum Nucleus motorius dorsalis nervi vagi (DMNV) in der Medulla oblongata. Das PrP^{Sc} breitet sich dann in weitere Kerngebiete der Medulla aus: Nucleus tractus solitarii, Area postrema, Nucleus ambiguus und Nuclei vestibulares. Die andere Ausbreitungsmöglichkeit führt den Erreger über das Ganglion mesentericum craniale und das Ganglion coeliacum sowie über sympathische Fasern des Nervus splanchnicus zum Rückenmark in die Substantia intermediolaterale zwischen dem achten und zehnten Thorakalwirbel. Von dort erfolgt die weitere Ausbreitung nach cranial und caudal.

Untersuchungen von van Keulen et al. (2000; 2002) an Schafen zeigten ähnliche Ergebnisse.

2.2.4.5 Ausbreitung in andere Gewebe

Akkumulationen von pathologischem Prionprotein konnten mittlerweile nicht nur in neuronalen und lymphoretikulären Geweben nachgewiesen werden, sondern auch in einigen anderen Körpergeweben. Besonders im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen anderer Genese wurde PrP^{Sc} in sonst unbeteiligten Geweben entdeckt. Dies ist dadurch zu erklären, dass Follikulär Dendritische Zellen (FDC), B-Lymphozyten und andere Komponenten des Immunsystems nicht nur eine Rolle bei chronischen Entzündungsprozessen spielen, sondern auch wichtig sind für den Transport und die Replikation von Prionen (Brown et al. 2000; Mabbot und MacPherson 2006).

Die Infektion von Mäusen mit Scrapie, welche zusätzlich an Nephritis, Pankreatitis oder Hepatitis leiden, verursachte in einer Studie von Heikenwalder et al. (2005) eine Akkumulation von PrP^{Sc} an den Orten der Entzündung. Untersuchungen von Ligios et al. (2005) weisen darauf hin, dass das Zusammentreffen von natürlichen chronisch-entzündlichen Prozessen und natürlicher Scrapie die Ablagerung von PrP^{Sc} auch auf sonst nicht betroffene Gewebe beim Schaf erweitern können. So gelang der Nachweis von PrP^{Sc} im Gewebe der Milchdrüse mit chronischer Mastitis in klinisch Scrapie-kranken Schafen (Ligios et al. 2005). Nicht entzündete Milchdrüsen Scrapie-kranker Schafe waren dagegen frei von PrP^{Sc}. Diese Ergebnisse geben Anlass zur Annahme, dass die Koexistenz von Entzündung eines exkretorischen Organs und Prionerkrankung beim Schaf auch zu einer Kontamination der Sekrete mit Prionen führt und somit ein Kofaktor für die horizontale

Übertragung innerhalb einer Herde sein könnte.

Jeffrey et al. (2001) beobachteten Ablagerungen von PrP^{Sc} im Abomasum von Scrapie-infizierten Schafen an durch Magen-Darmparasiten (Helminthen) entzündlich veränderten Läsionen.

Seeger et al. (2005) gelang die Übertragung von Scrapie auf transgene Mäuse durch intrazerebrale Injektion von Urin Scrapie-infizierter Mäuse, die gleichzeitig an chronischer Nephritis litten.

Aber auch unabhängig von einer begleitenden Entzündung zeigten Sisó et al. (2006) eine signifikante Akkumulation von pathologischen Prionprotein in den Nieren natürlich und experimentell infizierter Schafe.

Auch in den Speicheldrüsen von Scrapie-infizierten Schafen gelang der Nachweis von PrP^{Sc} (Vascellari et al. 2007). Dies ist ein Hinweis darauf, dass auch der Speichel Scrapie-infizierter Tiere bei der horizontalen Übertragung eine Rolle spielen könnte.

Hamster akkumulieren nach experimenteller oraler Infektion mit Scrapie PrP^{Sc} in der Skelettmuskulatur von Gliedmaßen, Kopf, Rücken und Schulter und in der Zunge (Thomzig et al. 2003). Den Weg der Prionen in die Muskulatur erklärt Thomzig (2004) mit zentrifugaler Ausbreitung der Infektion von spinalen Motorneuronen zu den Muskelfasern. Auch in der Muskulatur natürlich und experimentell mit Scrapie infizierter Schafe wird PrP^{Sc} akkumuliert, wenn auch mit 5.000fach geringerer Infektiosität als im Gehirn (Andreoletti et al. 2004).

In Epithel und Muskelschicht der Zunge von natürlich mit Scrapie infizierten Schafen konnten auch Casalone et al. (2004) PrP^{Sc} nachweisen.

Abhängig vom PrP-Genotyp des Fetus konnte eine Akkumulation von PrP^{Sc} in Plazenten von Scrapie inkubierenden Mutterschafen nachgewiesen werden. Keine Akkumulation fand man dagegen in Plazenten von PrP^{ARR/VRQ}-Schafen. Das verstärkt das Interesse einer Selektion von ARR- Allelen für eine Resistenzzucht zur Scrapie-Kontrolle (Lacroux et al. 2007).

2.3 Diagnostik

Die Klinik der TSEn ist sehr unspezifisch und zeigt individuell unterschiedliche Symptome. Daher kann klinisch, vor allem im Frühstadium, nur eine Verdachtsdiagnose gestellt werden.

Außerdem konnten bisher beim Schaf wie auch bei anderen Spezies keine spezifischen, TSE-assoziierten Veränderungen der hämatologischen Parameter oder der Liquorwerte identifiziert werden (Ulvund 2001).

Der einzige derzeit bekannte Marker für das infektiöse Agens, das TSEn verursacht, ist das

krankheitsspezifische Prionprotein PrP^{Sc}. Für die endgültige Diagnose ist der Nachweis von PrP^{Sc} im ZNS oder im lymphoretikulären Gewebe notwendig.

2.3.1 Post-mortem-Untersuchungen

Die zurzeit angewendeten zugelassenen Tests zur Feststellung einer Prionerkrankung benötigen als Untersuchungsmaterial Gehirn und können somit nur post mortem angewendet werden. Bei Rindern, Schafen und Ziegen wird dafür routinemäßig die Obexregion im Stammhirn verwendet, da in den dort lokalisierten Kerngebieten die frühesten Ablagerungen von PrP^{Sc} im Gehirn zu erwarten sind. Beim Schaf ist insbesondere der dorsale Vaguskern betroffen (Andreoletti et al. 2000). Eine Ausnahme bildet die atypische Scrapie, bei der in der Regel die höchsten Konzentrationen an PrP^{Sc} im Kleinhirn zu finden sind (Baron et al. 2007; Buschmann et al. 2006).

Für den Nachweis von TSEn gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die Diagnose kann durch die histologische Untersuchung des ZNS gestellt werden. Das histologische Bild ist jedoch bei den unterschiedlichen Prionkrankheiten nicht einheitlich. Bei Scrapie zeigt sich eine typische Vakuolisierung und Degeneration der Ganglienzellen, vor allem in den Kerngebieten der Medulla oblongata, in Pons, Klein- und Mittelhirn, die aber nicht immer eindeutig ist. Die spongiformen Läsionen des Hirngewebes sind meist bilateral symmetrisch und befinden sich vorwiegend in der grauen Substanz. Sie sind bedingt durch interstitielle, peri- und intraneuronale Vakuolisierung und ergeben bei der lichtmikroskopischen Untersuchung ein schwammartiges (spongiformes) Erscheinungsbild. Im fortgeschrittenen Stadium spricht man vom „Status spongiosus“. Andere degenerative Veränderungen wie Kernpyknose, Chromatolyse oder Schrumpfung der Perikarya kommen regelmäßig vor, sind aber nicht pathognomonisch. Die Läsionen sind meist auch von einer Astrozytose (Gliose) begleitet, die aber auch bei anderen Erkrankungen des Gehirns auftritt. Entzündliche Reaktionen fehlen (Zlotnik 1958; Parry 1960; Fraser 1976).

Das PrP^{Sc} lässt sich auch immunhistologisch durch Markierung mit spezifischen Antikörpern im histologischen Schnitt nachweisen (Miller et al. 1993; Hardt et al. 2000). Man findet es als unterschiedlich diffuse oder feingranuläre Ablagerungen im Neuropil, auf der Oberfläche der Neuronen oder intraneuronal. Dichte Akkumulationen von PrP^{Sc} werden als „Plaques“ bezeichnet und weisen Eigenschaften von Amyloid auf, kommen bei Scrapie aber nur gelegentlich vor.

Eine weitere Möglichkeit ist die Markierung von PrP^{Sc} mittels Antikörper im Gehirnhomogenat. Die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt mittels eines weiteren markierten Antikörpers im ELISA oder nach elektrophoretischer Auftrennung im

Western-Blot. Auf diesen Methoden beruhen auch die nach der Schlachtung durchgeführten Schnelltests.

Ebenfalls diagnostisch anwendbar ist der elektronenmikroskopische Nachweis von sogenannten Scrapie-assoziierten Fibrillen (SAF). Diese Methode ist jedoch am wenigsten sensitiv.

Der sensitivste Nachweis von TSEn, aber auch der langwierigste und aufwändigste, ist die Übertragung auf Labortiere. Besonders transgene Mäuse, die das Rinder- oder Schaf-Prion-Gen tragen, eignen sich für den Infektionsversuch. Außerdem kann im Maus-Bioassay eine weitere Charakterisierung des Erregers und eine Typisierung der unterschiedlichen Scrapie-Stämme vorgenommen werden (Fraser et al. 1968; Vilotte et al. 2001; Bruce 2003).

Im Tierversuch konnte eine Infektiosität auch in Abwesenheit von detektierbarem PrP^{Sc} nachgewiesen werden (Lasmézas et al. 1997). Es handelte sich um eine Übertragung des BSE-Agens auf Mäuse, wobei der Erreger erst die Speziesbarriere überschreiten musste. Die Autoren halten es für wahrscheinlich, dass bei Übertragung auf andere Spezies PrP^{Sc} erst nach Adaptation des Agens an den neuen Wirt akkumuliert wird und auch andere Faktoren als PrP^{Sc} als infektiöses Agens übertragen werden.

2.3.1.1 Schnelltests

Im Rahmen der aktiven Überwachung der TSEn ist die Untersuchung von Stichproben aus verendeten Tieren und den Schlachttieren mittels Schnelltest EU-weit seit 01. Juli 2001 nach der VO (EG) 999/2001 vorgeschrieben.

Die für diese obligatorischen Untersuchungen von Gehirnmateriale von Rindern und kleinen Wiederkäuern zugelassenen Schnelltests sind in Anhang X Kapitel C der VO (EG) 999/2001 in der Fassung vom 27.02.2009 (VO (EG) 162/2009) aufgelistet. Die gegenwärtig routinemäßig angewendeten Methoden der Schnelltests basieren entweder auf einem Western-Blot oder einem ELISA. Als Untersuchungsmaterial dient Hirnstammgewebe (Obex), aus dem für die Untersuchung ein Homogenat hergestellt wird.

In diesem Homogenat erfolgt eine Markierung von PrP^{Sc} mittels spezifischer Anti-PrP-Antikörper. Jedoch können die derzeit verwendeten Antikörper nicht zwischen PrP^{Sc} und PrP^C unterscheiden. Die Unterscheidung erfolgt durch die unterschiedliche Abbaubarkeit durch proteolytische Enzyme wie Proteinase K (PK). Die Struktur des normalen PrP ist für den enzymatischen Abbau vollständig zugänglich und wird deshalb mit PK auch vollständig abgebaut. Vom PrP^{Sc} werden dagegen nur ca. 68 N-terminale Aminosäuren abgebaut (Oesch et al. 1985). Dies führt zu einem spezifischen PrP-Fragment, das nur noch 27-30 kDa groß ist (ursprünglich 33-35 kDa). Somit muss ein Hirnhomogenat zuerst mit PK

behandelt werden, um das proteasesensitive PrP^c zu entfernen. Im Western-Blot werden die verbliebenen Proteine nach der PK-Behandlung auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und dann auf eine Polyvinylmembran übertragen. Nach Inkubation dieser Membran mit einem Anti-PrP-Antikörper, an den ein Markerenzym gekoppelt ist, kann die Menge und Position des restlichen PrP mittels Farbstoffen oder Chemilumineszenz visualisiert werden (Schaller et al. 1999; Cooley et al. 2001; Grassi 2003).

Alternativ zum Western-Blot kann der Nachweis auch mittels ELISA geführt werden. Dabei werden die nach dem PK-Verdau übrig gebliebenen Proteine auf eine Mikrotiterplatte gegeben, an die bereits ein primärer monoklonaler Anti-PrP-Antikörper gebunden ist. An die während der Inkubation gebildeten Immunkomplexe lagert sich ein im nachfolgenden Schritt zugefügter Enzym-markierter Anti-Antikörper an. Die Visualisierung erfolgt durch Zugabe eines chromogenen Substrats und anschließende photometrische Auswertung (Grassi et al. 2001).

2.3.1.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) gehört zu den Bestätigungsmethoden für einen positiven Schnelltest. Sie eignet sich zum Nachweis von PrP^{Sc} in neuronalen und lymphatischen Geweben (Miller et al. 1993; van Keulen et al. 1995).

Das PrP^{Sc} wird dabei mittels eines spezifischen Anti-PrP-Antikörpers im histologischen Präparat nachgewiesen. Es stehen mittlerweile diverse Antikörper zur Verfügung, die jeweils an unterschiedliche Epitope des PrP binden (Harmeyer et al. 1998; Garssen et al. 2000; Hardt et al. 2000).

Für einige der in der IHC eingesetzten Antikörper wird eine Proteinase K-Vorbehandlung zur Demaskierung der Antigene angewendet. Für manche Antikörper sind weitere Vorbehandlungen wie Kochen im Dampfdruckkochtopf oder Erhitzen in der Mikrowelle notwendig, um die Antigen-Antikörper-Reaktion zu verbessern (Miller et al. 1993).

2.3.2 Ante-mortem-Untersuchungen

Es wäre sehr nützlich, schon während der präklinischen Phase eine gesicherte Diagnose stellen zu können. In verschiedenen Studien (van Keulen et al. 2000; Androletti et al. 2000) wurde daher die Tatsache genutzt, dass PrP^{Sc} im lymphoretikulären System akkumuliert wird. Schreuder et al. (1996; 1998) gelang es, PrP^{Sc} in Tonsillenbiopsaten nachzuweisen. O'Rourke et al. (2000; 2002) beschäftigten sich mit dem Nachweis von PrP^{Sc} in

Lymphfollikeln der Nickhaut und Gonzalez et al. (2005; 2006) und Espenes et al. (2005) wiesen PrP^{Sc} in den lymphatischen Geweben von Biopstaten der Rektumschleimhaut nach.

Race et al. (1998) boten mit dem Nachweis von PrP^{Sc} in Plazenta-Proben mittels Immunoblot sogar eine nicht invasive Möglichkeit für die Überwachung und Ante-mortem-Diagnostik von Scrapie in Schafherden.

Dabei ist aber zu beachten, dass immer nur ein positives Ergebnis aussagekräftig ist. Bei negativen Ergebnissen kann die TSE-Freiheit dagegen nicht belegt werden. Außerdem ist die Gewinnung von auswertbarem Biopsiematerial unter Praxisbedingungen sehr aufwändig. Für Massen-Screeningprogramme wäre die Untersuchung leichter zugänglicher Probenmaterialien wie Blut oder Urin wünschenswert. Von BSE-infizierten Schafen und von vCJK-infizierten Menschen ist bereits bekannt, dass Prionen über Blut übertragen werden können (Houston et al. 2000; Hunter et al. 2002; Llewelyn et al 2004; Peden et al. 2004), jedoch sind diese, wenn überhaupt, in so geringen Konzentrationen vorhanden, dass sie mit herkömmlichen Nachweisverfahren nicht detektiert werden können. Castilla et al. (2005) und Saá et al. (2006) beschreiben die „Protein Misfolding Cyclic Amplification Technology“ als ein neues Verfahren, mit dem es ihnen gelang, im Blut von präklinischen Tieren PrP^{Sc} nachzuweisen. Jedoch ist diese Nachweismethode noch nicht soweit ausgereift, dass sie routinemäßig eingesetzt werden könnte.

Shaked et al. (2001) wiesen PrP^{Sc} nach einem besonderen Anreicherungsverfahren im Urin von Scrapie-infizierten Hamstern, BSE-infizierten Rindern und CJK-erkrankten Menschen nach, teilweise sogar vor dem Auftreten erster klinischer Symptome. Aber auch die Untersuchung von Urin hat als In-vivo-Test für Prionerkrankungen noch keine Praxisreife erlangt.

2.4 Überwachung, Prävention und Bekämpfung von TSEn, insbesondere von Scrapie

Durch die Verordnung (EG) 999/2001 vom 22. Mai 2001, zuletzt geändert am 11. März 2009 durch die Verordnung (EG) 220/2009 ist der Umgang mit TSEn EU-weit einheitlich geregelt. Sie beinhaltet Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter TSEn und wird ständig durch Änderungsverordnungen dem aktuellen Stand der Wissenschaft angepasst (Tabelle 2.5 und 2.6).

Das deutsche Tierseuchengesetz (in der Fassung vom 22.06.2004) enthält Vorschriften für die Ein-, Durch- und Ausfuhr von Tieren und tierischen Erzeugnissen, unter anderem zur Abwehr der Einschleppung von Tierseuchen aus dem Ausland. Außerdem enthält es Vorschriften für die Bekämpfung der Tierseuchen im Inland. Auf Grundlage des § 10 des

Tierseuchengesetzes wurde die Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 03.11.2004, zuletzt geändert am 06.04.2009, erlassen. Diese besagt, dass es sich bei allen Formen der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien um anzeigepflichtige Tierseuchen handelt. Anzeigepflichtig sind Ausbruch und Verdacht.

2.4.1 TSE-Überwachung

Das Überwachungssystem für Prionkrankheiten kann unterteilt werden in die aktive und die passive Überwachung (Hörnlimann et al.2001b).

Die passive Überwachung (Monitoring) beschränkt sich auf die Untersuchung von Wiederkäuern mit neurologischen Erscheinungen mit dem Hauptziel der Erkennung von möglichst vielen klinischen Verdachtsfällen. Tierhalter und praktizierende Tierärzte spielen hier eine wichtige Rolle. Aber auch alle anderen Personen, die mit lebenden Rindern, Schafen und Ziegen arbeiten, wie auch Viehhändler, besonders auch Schlachthoftierärzte und amtliche Fleischkontrolleure, die im Rahmen der Schlacht tieruntersuchung auffällige neurologische Befunde erheben, tragen zur passiven Überwachung bei. Dafür ist eine genaue Kenntnis der typischen Symptome von BSE und Scrapie erforderlich.

Verdächtige Tiere müssen getötet und im Nationalen Referenzlabor untersucht werden. Im Falle der Bestätigung des Verdachts müssen Bekämpfungsmaßnahmen eingeleitet werden (siehe 2.4.2).

Die aktive Überwachung (Screening) wird in spezifischen Zielgruppen und Risikokohorten durchgeführt mit dem Ziel der zusätzlichen Erkennung aller infizierten, aber klinisch unauffälligen Tiere. Dies kann anhand von Stichprobenschlüsseln erfolgen (z. B. TSE-Überwachung kleiner Wiederkäuer, CWD-Überwachung), oder es werden wie beim Rind alle Tiere ab einem bestimmten Alter (Schlachttiere ab 48 Monate, gefallene oder notgeschlachtete Tiere ab 24 Monate) untersucht.

Anhang III, Kapitel A II der VO (EG) 999/2001, zuletzt geändert durch VO (EG) 162/2009 vom 26.02.2009, beinhaltet die Mindestanforderungen an ein Programm zur Überwachung von Scrapie bei Schafen und Ziegen. Für Schafe ist die Regelung in den einzelnen EU-Mitgliedsstaaten unterschiedlich, in Abhängigkeit vom Schafbestand. In Deutschland müssen mindestens 10.000 für den menschlichen Verzehr geschlachtete Schafe, die über 18 Monate alt sind oder bei denen mindestens zwei bleibende Schneidezähne das Zahnfleisch durchbrochen haben, untersucht werden. Auch für Ziegen ist die vorgeschriebene Stichprobenzahl in den einzelnen Mitgliedsstaaten nicht einheitlich. In Deutschland müssen alle für den menschlichen Verzehr geschlachteten Ziegen auf TSEn untersucht werden. Bei nicht für den menschlichen Verzehr geschlachteten oder verendeten Schafen und Ziegen ist,

ebenfalls abhängig von der Population, jeweils ein Mindestprobenumfang vorgeschrieben (Verordnung (EG) 727 vom 26.6 2007).

Experimentelle Untersuchungen zeigen, dass auch Schaf und Ziege an BSE erkranken können (Foster et al. 2001). Somit besteht theoretisch die Möglichkeit, dass in einer Scrapie-infizierten Schafpopulation unerkannt der BSE-Stamm zirkuliert, welcher wiederum infektiös für Rinder und andere Spezies ist. Im Jahr 2005 ist bereits ein Fall von natürlicher BSE bei einer Ziege in Frankreich bekannt geworden (Eloit et al. 2005). Da es sich bei BSE um eine Zoonose handelt, ist es wichtig, jeden TSE-Fall beim kleinen Wiederkäuer auf das Vorliegen von Scrapie oder BSE zu differenzieren (Verordnung (EG) 162/2009).

Die Untersuchung der vorgeschriebenen Stammhirnproben erfolgt mittels Schnelltest im zuständigen Landesuntersuchungsamt oder in lizenzierten Privatlabors. Jede Probe, die ein reproduzierbares, reaktives Ergebnis gemäß den Auswertekriterien des jeweiligen Tests aufweist, muss im nationalen Referenzlabor für TSEn (in Deutschland das Friedrich-Loeffler-Institut auf der Insel Riems) bestätigt werden. Dies erfolgt mittels einer vom Internationalen Tierseuchenamt in Paris (Office International des Epizooties, OIE) anerkannten Bestätigungsmethode (Histopathologie, Immunhistochemie (IHC), Elektronenmikroskopie oder SAF-Immunoblot). Am häufigsten werden die IHC und der SAF-Immunoblot angewendet.

2.4.2 Prävention und Bekämpfung

Zu den Präventionsmaßnahmen gegen TSEn gehören die individuelle und dauerhafte Kennzeichnung aller Schafe und Ziegen sowie deren Erfassung mittels nationaler Tieridentifikationssysteme mit zentralem Tierregister und Tierverkehrskontrollen (nationale Viehverkehrsverordnung in der Fassung vom 30. April 2008). Damit wird die Rückverfolgbarkeit von betroffenen Tieren oder Kontakttieren zu den Herkunftsbeständen gesichert und die Erhebung von epidemiologisch relevanten Daten ermöglicht.

In einem Scrapie-freien Land ist es das Ziel, die Einschleppung der Erkrankung aus einem betroffenen Land zu verhindern bzw. in Ländern, in denen Scrapie endemisch vorkommt, die Verbreitung zwischen den Herden zu unterbinden. Daher muss der Zukauf aus endemisch verseuchten Gebieten begrenzt gehalten werden bzw. sollte der Zukauf von Zuchttieren nur aus Herden, in denen bisher keine Scrapie aufgetreten ist, erfolgen. Die Scrapie-Freiheit der Tiere könnte zuvor z. B. auch durch Untersuchungen von Tonsillenbiopтатаen geprüft werden (Detwiler und Baylis 2003).

Australien und Neuseeland sind Beispiele für Länder, in denen durch strenge Import-, Quarantäne- und Ausrottungsbestimmungen die Einschleppung der Scrapie verhindert

werden konnte (Hoinville 1996; Detwiler und Baylis 2003).

Die Verfütterung von unzureichend erhitztem, mit dem Scrapie-Erreger kontaminiertem Tiermehl wird als Ursprung der BSE-Epidemie angesehen (Wilesmith et al. 1988). Daher besteht gemäß Artikel 7 und Anhang IV der VO (EG) 999/2001 (letzte Änderung am 26.02.2009 durch VO (EG) 163/2009) ein Verbot der Verfütterung von aus Säugetieren gewonnenen Proteinen an Nutztiere. Auch Milch und Milcherzeugnisse von Tieren mit klassischer Scrapie dürfen nicht an Wiederkäuer verfüttert werden (VO (EG) 103/2009).

Bei der Schlachtung werden die Gewebe, von denen ein hohes potenzielles Infektionsrisiko ausgeht, gemäß Anhang V der VO (EG) 999/2001 (zuletzt geändert durch VO (EG) 357/2008) als spezifizierte Risikomaterialien (SRM) aus der Nahrungskette ausgeschlossen, sie müssen gesondert behandelt und durch Verbrennen oder Vergraben entsorgt werden. Gleiches gilt für alle Körperteile von Tieren mit positivem oder nicht eindeutigen Befund im Schnelltest.

Zum SRM beim Rind gehören ohne Altersbegrenzung die Tonsillen, der Darmtrakt vom Duodenum bis zum Rektum und das Mesenterium, bei mehr als zwölf Monate alten Rindern auch der Schädel ohne Unterkiefer aber inklusive Hirn, Augen und das Rückenmark sowie bei mehr als 30 Monate alten Rindern zusätzlich die Wirbelsäule ohne Schwanzwirbel, Dorn- und Querfortsätze der Hals-, Brust- und Lendenwirbel, Crista sacralis mediana und Kreuzbeinflügel aber einschließlich Spinalganglien.

Als SRM bei Schaf und Ziege, die über 12 Monate alt sind oder bei denen ein bleibender Schneidezahn das Zahnfleisch durchbrochen hat, gelten der Schädel einschließlich Gehirn und Augen, die Tonsillen und das Rückenmark sowie Milz und Ileum aller Altersklassen.

Die starke Verbindung zwischen Scrapie und dem PrP-Genotyp eröffnet die Möglichkeit der Scrapie-Bekämpfung durch züchterische Selektion resistenter Genotypen (VO (EG) 260/2003). Dafür ist die Genotypisierung aller Zuchttiere und gezielte Auswahl von Zuchtschafen, basierend auf ihrem PrP-Genotyp, notwendig, um das Ziel der Erhöhung der Häufigkeit des ARR Allels und die gleichzeitige Reduktion des VRQ Allels, das zur TSE-Anfälligkeit beiträgt, zu erreichen. Grundlage hierfür bietet in Deutschland die TSE-Resistenzzuchtverordnung vom 17.10.2005, zuletzt geändert am 07.11.2006. Es dürfen nur Schafböcke oder Samen von Schafböcken zur Zucht verwendet werden, die kein VRQ-Allel aufweisen. Ein Schafbock, der Träger eines VRQ-Allels ist, muss geschlachtet oder kastriert werden. Ebenso dürfen weibliche Schafe, die Träger eines VRQ-Allels sind, nur unmittelbar zur Schlachtung aus dem Bestand verbracht werden.

Ein Schafbestand kann als TSE-resistent anerkannt werden, wenn alle Schafe des Bestandes dem Genotyp ARR/ARR angehören oder die Nachkommen ausschließlich von Schafböcken mit dem Genotyp ARR/ARR abstammen.

Die Selektion auf das ARR-Allel bietet jedoch keine absolute Resistenz, da die Klassifizierung nur anwendbar ist auf klassische Scrapie, nicht aber auf atypische Scrapie, die in Deutschland inzwischen wesentlich häufiger als die klassische Form auftritt. Ferner besteht die Möglichkeit, dass sich das Agens der klassischen Scrapie an den bisher resistenten Genotyp adaptiert und auch bei homozygoten Tieren klassische Scrapie auftreten könnte (Buschmann und Groschup 2005).

Zu bedenken ist bei der Selektion auf Scrapie-Resistenz aber auch, dass es negative Auswirkungen auf andere Qualitäten wie Wolle, Milchleistung oder Fleisch geben kann, die bei der Selektion auf den PrP-Genotyp nicht berücksichtigt werden. Gernand et al. (2005) konnten bei ihrer Untersuchung für die meisten Merkmale keine Assoziationen zwischen Prion-Protein-Gen und den Leistungseigenschaften beim Schaf beobachten. Jedoch deutet sich für das Merinolandschaf feinere Wolle für homozygote ARR-Träger an.

Die Möglichkeit, PrP-defiziente Schafe zu züchten bietet sich nicht an, da diese Tiere zwar unempfindlich gegenüber Scrapie wären (Büler et al. 1993), es dadurch aber zu einer Genverarmung kommen würde und sich auch andere, nicht kalkulierbare Schäden als Folge des fehlenden PrP-Gens ergeben könnten (Collinge 1994; Tobler et al. 1996).

Maßnahmen nach Feststellung

Bis zum Inkrafttreten der Verordnung (EG) 999/2001 am 01. Juli 2001 wurden bei der Diagnose Scrapie in Deutschland die gesamte Herde und alle potenziellen Kontakttiere gekeult und unschädlich beseitigt .

Die VO (EG) 999/2001 und Ergänzungen eröffnen die Möglichkeit, einen Teil der Herde zu erhalten durch Ermittlung der Genotypen aller Tiere der betroffenen Herde. Alle Zuchtböcke vom Genotyp PrP^{ARR/ARR}, alle Mutterschafe mit wenigstens einem ARR-Allel und keinem VRQ-Allel und Lämmer mit wenigstens einem ARR-Allel, wenn sie zur Schlachtung vorgesehen sind, können von der Keulung ausgeschlossen werden.

Für atypische Scrapie gelten aber inzwischen andere Eradikationsmaßnahmen, da die Erkrankung nur selten innerhalb einer Herde übertragen wird. Deshalb reicht es aus, nur das betroffene Schaf zu keulen, aber die ganze betroffene Herde sollte zur Sicherheit bei der Schlachtung einem TSE-Test unterzogen werden.

Weiterhin ist es wichtig, von infizierten Tieren benutzte Ställe und Weiden langfristig von Schafen und Ziegen frei zu halten, da dort noch jahrelang infektiöse Erreger vorhanden sein können (Seidel et al. 2007).

Um eine Übertragung innerhalb der Herde zu verhindern, muss auf eine gute Ablammhygiene geachtet werden, da der Erreger mit der Nachgeburt und dem Fruchtwasser infizierter Tiere ausgeschieden wird (Race et al. 1998).

2.5 Ziel dieser Untersuchung

Ziel dieser Untersuchung war es, die Aussagekraft des in der Scrapie-Überwachung routinemäßig verwendeten Untersuchungsmaterials Obex für den TSE-Status des Tieres zu überprüfen. Der Erreger ist, anderen Untersuchungen zufolge, in den Organen des lymphatischen Systems bereits nachweisbar bevor dieser im Gehirn detektiert werden kann.

Um die tatsächliche Prävalenz von Scrapie in einer betroffenen Herde festzustellen, wurde daher in dieser Arbeit eine Untersuchung von Schafen mit empfänglichem Genotyp und negativem Befund im Stammhirn (Obex) durchgeführt.

Außerdem sollten die möglichen Eintrittspforten und Verteilungswege des Scrapie-Erregers im Tierkörper und damit auch die Verwendbarkeit verschiedener Gewebe für einen Scrapie-Nachweis am lebenden Tier überprüft werden.

3. Material und Methoden

3.1 Tiergut

Aus einer natürlich mit Scrapie infizierten gemischten Schaf- und Ziegenherde standen nach der Keulung und der amtlichen Probenahme die Tierkörper von 175 genetisch empfänglichen Tieren für weitere Beprobungen zur Verfügung. Es handelte sich um 169 Schafe der Rasse Schwarzkopf-Merino-Mix und sechs deutsche Edelziegen einer Wanderherde aus Sachsen-Anhalt.

3.1.1 Chronologie der Schaf- und Ziegenherde

Die Herde wurde in den Jahren 1991 und 1992 aus zwei Beständen in Sachsen-Anhalt und Brandenburg aufgebaut. Anfang 2004 umfasste sie 517 Mutterschafe, 74 Lämmer, 12 Böcke und sechs Ziegen.

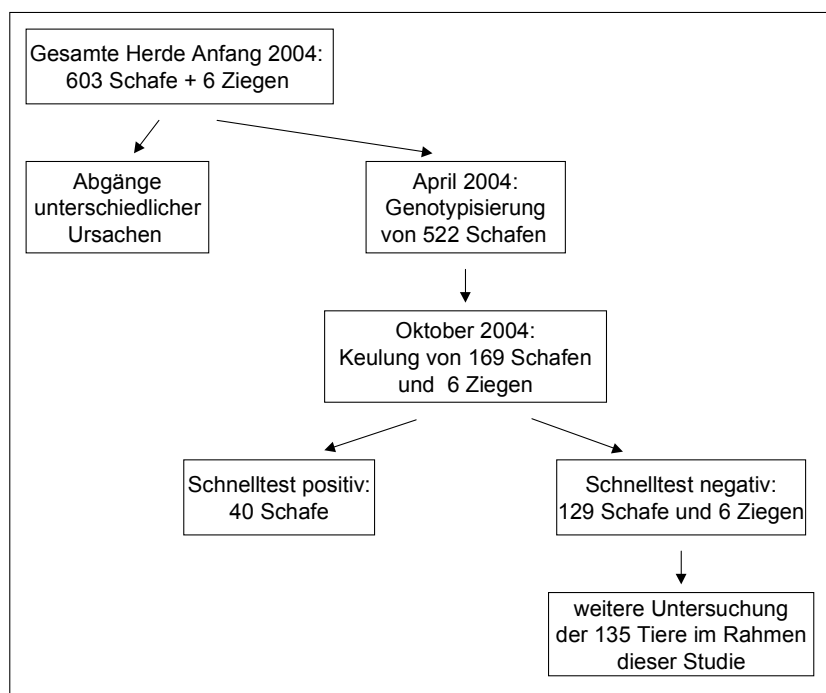


Abb. 3.1: Chronologie der untersuchten Herde

Ende des Jahres 2003 wurden aus dieser Herde drei Schafe zur Schlachtung nach Niedersachsen verkauft. Bei der vorgeschriebenen Stichprobenuntersuchung (VO (EG) 999/2001) wurden zwei Tiere positiv auf Scrapie getestet.

Für alle reaktiven Ergebnisse im Schnelltest erfolgte eine Bestätigung im Friedrich-Loeffler-Institut, dem nationalen Referenzlabor für die BSE- und Scrapie-Diagnostik auf der Insel Riems, mittels vom Internationalen Tierseuchenamt (OIE) anerkannten

Bestätigungsuntersuchungen (OIE 2004).

Im März 2004 wurden weitere Tiere der Herde Scrapie reaktiv getestet, woraufhin der Seuchenverdacht geäußert und nach der Bestätigung durch das nationale Referenzlabor eine Bestandssperre auferlegt wurde.

Das Auftreten der Krankheit war bereits 1979/1980 in einem Nachbardorf beobachtet worden.

Im April 2004 erfolgte eine Sequenzanalyse der Codons 136, 154 und 171 des Schaf PrP Gens (Genotypisierung) bei den adulten Schafen der Herde. 522 Tiere wurden untersucht. Die genaue Verteilung der Genotypen innerhalb der Schafherde ist Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Am 06. Mai 2004 erfolgte die amtliche Feststellung der Tierseuche Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE) durch den Amtstierarzt des Kreises.

Tab. 3.1: Verteilung der Genotypen innerhalb der Schafherde

Genotypklasse	Genotyp	gesamte Herde (522 Tiere)	im Obex reaktive Schafe (40 Tiere)	in der vorliegenden Studie untersuchte Schafe (129 Tiere)
G 1	ARR/ARR	94	0	0
G 2	ARR/AHQ	4	0	0
	ARR/ARH	0	0	0
	ARR/ARQ	244	0	4
G 3	AHQ/AHQ	0	0	0
	AHQ/ARH	0	0	0
	AHQ/ARQ	16	2	13
	ARH/ARH	0	0	0
	ARH/ARQ	0	0	0
	ARQ/ARQ	157	38	105
G 4	ARR/VRQ	3	0	3
G 5	AHQ/VRQ	0	0	0
	ARH/VRQ	0	0	0
	ARQ/VRQ	4	0	4
	VRQ/VRQ	0	0	0

Zur Tilgung der Scrapie wurde entsprechend der VO (EG) 260/2003 zur Änderung der VO (EG) 999/2001 verfahren. Für alle Schafe der empfänglichen Genotypenklassen G 3, G 4 und G 5, die Böcke der Genotypenklasse G 2 und alle Ziegen bestand die Notwendigkeit der Tötung und Beseitigung. Die Schafe aus der wenig empfänglichen Klasse G 1 und die

weiblichen Tiere der Klasse G 2 konnten zur Weiterzucht im Bestand belassen werden.

Noch vor der Keulung verendeten zwischen April und September 2004 eine nicht genau bekannte Anzahl an Schafen, von der zehn Tiere positiv auf Scrapie getestet wurden. Diese Schafe wurden nicht in die vorliegende Untersuchung mit einbezogen.

Die Tötung und amtliche Beprobung (Obex) der genetisch empfänglichen Schafe und Ziegen wurde für den 05. Oktober 2004 festgelegt, da im Rahmen des hier beschriebenen Projektes in der Zeit davor an der Herde Verhaltensbeobachtungen durch das Institut für Zoo- und Wildtierkunde, Berlin durchgeführt wurden.

Insgesamt wurden schließlich 168 Schafe und sechs Ziegen getötet. Ein Tier verendete am Tag vor der Keulung. Von diesem Tier wurde ebenfalls eine Obexprobe entnommen, die im Schnelltest ein reaktives Ergebnis zeigte. Es wurden keine weiteren Körperproben entnommen. Von den 175 Obexproben zeigten 40 Proben im Schnelltest ein reaktives Ergebnis (Abb. 3.1). Alle reaktiv getesteten Schafe gehörten der Genotypenklasse G 3 an, 38 davon mit der Allelkombination ARQ/ARQ und zwei mit der Allelkombination AHQ/ARQ. Weitere Angaben zu Geburtsjahr und Genotyp der in dieser Studie untersuchten Schafe sind den Tabellen 3.2 und 3.3 zu entnehmen.

Tab. 3.2: Charakterisierung der untersuchten weiblichen Schafe

Geburtsjahr	Genotypenklasse	Anzahl
1998	G 3	1
1999	G 3	3
	G 4	1
2000	G 3	10
	G 4	1
2001	G 3	38
	G 5	1
2002	G 3	23
	G 4	1
	G 5	1
2003	G 3	24
2004	G 3	1
Keine Angaben	G 3	17
	G 5	2

Tab. 3.3: Charakterisierung der untersuchten Böcke

Geburtsjahr	Genotypenklasse	Anzahl
< 2000	G 2	4
	G 3	1

3.1.2 Probenahme

Zusätzlich zu den amtlich vorgeschriebenen Obexproben wurden nach der Tötung aus verschiedenen Körperregionen weitere Gewebeproben entnommen. Diese Proben bilden die Grundlage für die vorliegende Arbeit. Sie sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

In dieser Studie wurden ausschließlich die Körpergewebe der 135 Tiere untersucht, die im Obex nicht reaktiv waren, um zu herauszufinden, in wieweit in anderen Körpergeweben bereits eine PrP^{Sc}-Ablagerung stattgefunden hatte.

Tab. 3.4: Von den getöteten Tieren für diese Studie zusätzlich entnommene Gewebeproben:

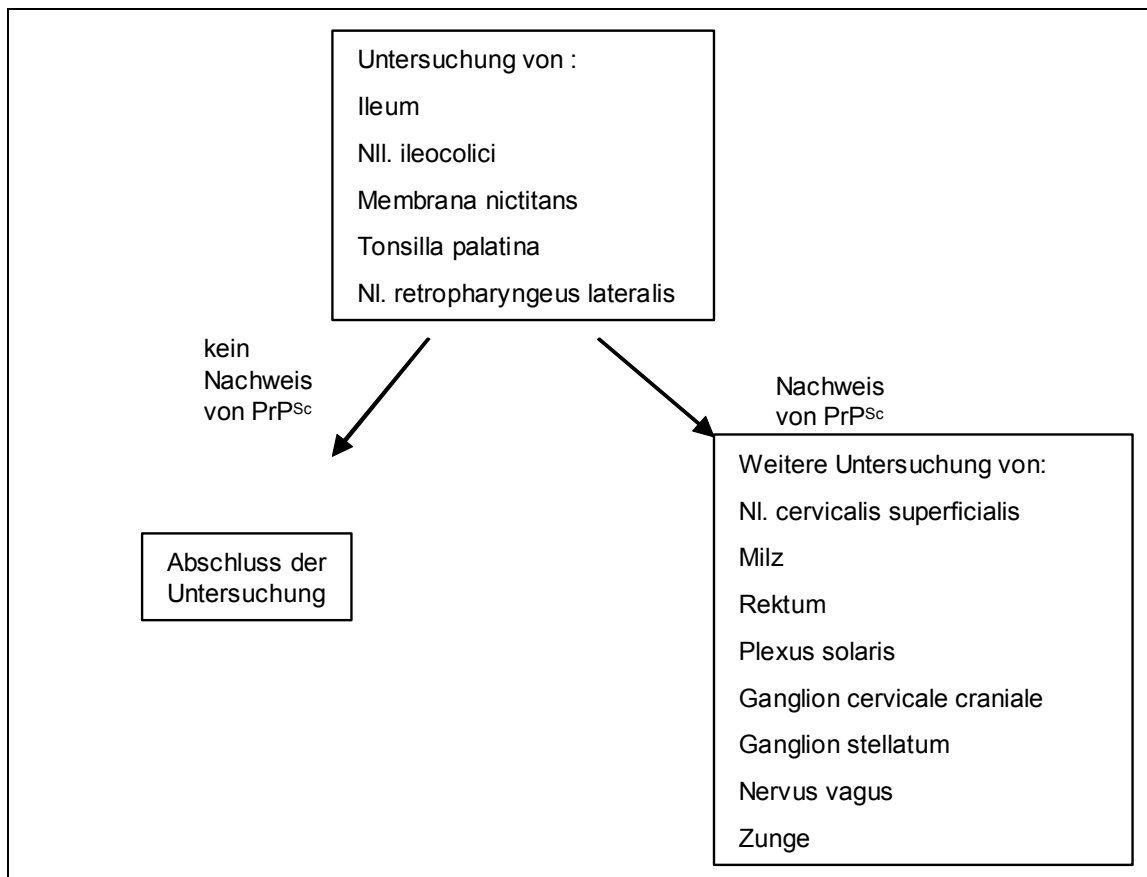
Lymphatische Gewebe	Peripheres Nervensystem	Verdauungstrakt
Nll. ileocolici Membrana nictitans Tonsilla palatina NI. retropharyngeus lateralis (bzw. NI. mandibularis) NI. cervicalis superficialis Milz	Plexus solaris (Plexus coeliacus + Plexus mesentericus cranialis) Ganglion cervicale craniale Ganglion stellatum Nervus vagus	Ileum Rektum Zunge (Corpus und Apex linguae)

Nll. Nodi lymphatici

Bei sieben Tieren konnten bei der Probenahme der NI. retropharyngeus lateralis nicht entnommen werden. Stattdessen erfolgte die Entnahme des NI. mandibularis.

Die Proben wurden nach Entnahme, Fixierung und Zwischenlagerung am Landesuntersuchungsamt für Gesundheits-, Umwelt- und Verbraucherschutz in Stendal, im Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger (INNT), nationales Referenzlabor für die BSE- und Scrapie-Diagnostik auf der Insel Riems bearbeitet.

Für diese Arbeit standen insgesamt 1.602 Proben der im Obex negativ getesteten 129 Schafe und sechs Ziegen zur Verfügung. Immunhistologische Untersuchungen auf PrP^{Sc} wurden an Proben des Ileums, der Nll. ileocolici sowie des NI. retropharyngeus lateralis, der Tonsilla palatina und der Membrana nictitans von allen 135 Tieren durchgeführt. Diese Organe wurden ausgewählt, da es sich hier um die potenziellen Eintrittspforten des infektiösen Agens bzw. um für Ante-mortem-Untersuchungen leicht zugängliche Organe handelt. Gelang der Nachweis von PrP^{Sc} in einem der genannten Gewebe, so wurden, wie in Abbildung 3.2 dargestellt, von dem betroffenen Tier alle weiteren vorhandenen Körperproben untersucht.



NII. Nodi lymphatici

Abb. 3.2: Diagnostische Vorgehensweise bei der Untersuchung der Gewebeprobe

3.2 Methoden

3.2.1 Histologische Präparation

Die Proben wurden nach der Entnahme in 4%igem, neutral gepuffertem Formalin fixiert. Der Zugschnitt der Gewebe erfolgte so, dass die entscheidenden Strukturen der Untersuchung zugänglich wurden. Zwei bis vier Anschnitte einer Probe wurden in einer Einbettkassette zusammengefasst, um möglichst viele Regionen der Probe in einer Schnittserie analysieren zu können. Die zugeschnittenen Proben wurden zur Reduktion der Infektiosität eine Stunde lang in 98 - 100%iger Ameisensäure (Nr. 1.00264.250, Merck) inkubiert. Danach wurden die Proben für 40 Minuten mit Leitungswasser gespült. Die Entwässerung und Einbettung in Paraffin (Histosec® Pastillen ohne DMSO, Nr. 115161, Merck) fand im Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat Leica ASP300 nach dem Standardverfahren statt. Das Ausgießen und Aufblocken der Paraffinblöcke erfolgte an der Paraffinausgießstation EG1140 der Firma Leica. Mit dem Rotationsmikrotom Leica RM 2135 wurden für die immunhistochemischen Untersuchungen 3 µm dicke und für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung) 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf SuperFrost

Plus-Objekträger der Firma Menzel aufgezogen und über Nacht im Wärmeschrank bei 60°C inkubiert.

Das Zuschneiden der Formalinproben und die Herstellung von Paraffinschnitten erfolgten unter den Sicherheitsbestimmungen für ein L 3** Labor (Biostoff-Verordnung vom 27.01.1999).

3.2.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen

3.2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Von allen Organschnitten, die immunhistologisch untersucht werden sollten, wurde zunächst eine H.-E.-Färbung angefertigt. Es erfolgte eine histomorphologische Charakterisierung hinsichtlich der histopathologisch erfassbaren Alterationen (siehe Befundbeschreibung der H.-E.-Färbung zu Tab. 9.3 und 9.4). In Einzelfällen wurden zusätzlich Spezialfärbungen angewendet, nämlich die Gram-Färbung, die Ziehl-Neelsen-Färbung sowie die PAS-Reaktion (Periodic Acid Schiff' Reaction). Alle Färbungen erfolgten nach den allgemeingültigen Färbetechniken (Romeis 1989).

3.2.2.2 Immunhistologische Methoden

Die in dieser Studie durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen erfolgten mittels der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Dabei handelt es sich um eine sehr sensitive, indirekte immunhistochemische Nachweismethode, bei der die hohe Affinität von Avidin zu Biotin genutzt wird. Zuerst kommt ein spezifischer, unmarkierter, gegen das Antigen der Probe (hier PrP) gerichteter Antikörper als Primärantikörper zum Einsatz. Im zweiten Schritt wird als Sekundärantikörper ein mit Biotin markierter Antikörper, der spezifisch gegen die Immunglobuline der Spezies gerichtet ist, von der der Primärantikörper stammt, auf den Gewebeschnitt gegeben. An den biotinylierten Antikörper bindet das im nächsten Schritt hinzugegebene Avidin, an das wiederum eine biotinylierte Meerrettichperoxidase bindet (Avidin-Biotin-Komplex). Die Sichtbarmachung der Antikörperbindung erfolgt durch die Reaktion der Peroxidase mit dem Chromogen Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB). Es entsteht ein braunes Farbprodukt, das in Alkohol und organischen Lösungsmitteln unlöslich ist (Noll und Schaub-Kuhnen 2000).

3.2.2.3 Antikörper und Seren

Primärantikörper:

Der monoklonale Antikörper (mab) L42 wurde als Primärantikörper gegen das Epitop 145-163 des Schaf PrP in einer Verdünnung von 1:250 (in TBS + 10 % Ziegenserum + 0,03 % Natriumacid) eingesetzt (Harmeyer et al. 1998; Hardt et al. 2000). Der Antikörper lag als Kulturüberstand von Maus-Hybridomzellen vor. Er detektiert PrP von Rind, Schaf, Mensch und Nerz.

Zur Verifizierung positiver Ergebnisse wurde der monoklonale Antikörper mab 2G11 (Institut Pourquier, Montpellier, Frankreich, P01610), gerichtet gegen das Epitop 146-182 des Schaf PrP, in einer Verdünnung von 1:250 verwendet.

Sekundärantikörper:

Als Sekundärantikörper wurde 1:200 in TBS + 10 % Ziegenserum + 0,03 % Natriumacid verdünntes, biotinyliertes Ziege-anti-Maus IgG (Vector Laboratories, Burlingame, BA-9200) eingesetzt.

Kontrollantikörper:

Als Negativ-Kontrollantikörper (sogenannter Null-mab) wurde ein monoklonaler Antikörper gegen GP₅ des PRRS-Virus (Klon p11/d26, Dr. E. Weiland, Tübingen) (Weiland et al. 1999) eingesetzt. Das Serum wurde 1:600 mit TBS + 10 % Ziegenserum + 0,03 % Natriumacid verdünnt.

ABC-Komplex:

Als ABC-Komplex für den monoklonalen Primärantikörper diente der Peroxidase-gekoppelte Avidin-Biotin-Komplex von Vector Laboratories Vectastain[®]Elite[®] ABC Kit.

3.2.2.4 Lösungen und Puffer

Proteinase K-Stammlösung (1 mg/ml):

10 mg Proteinase K in 1 ml Aqua bidest lösen. Diese Lösung wird in 9 ml Aqua bidest gegeben.

Proteinase K-Puffer pH 8,3 (500 ml):10 x Stammlösung:

30,28 g Tris (Gibco BRL, 15504-012)

1,46 g EDTA (Carl Roth, 8043.2)

5 ml Tween (Sigma, P-1379)

Nacheinander in 400 ml Aqua bidest lösen, pH-Wert von 8,3 mit 37 % HCl einstellen und Lösung mit Aqua bidest auf 500 ml auffüllen.

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung ad 1000 ml Aqua bidest

Tris-buffered saline (TBS pH 7,6) (0,5 M Tris, 8 % NaCl)10 x Stammlösung:

60,57 g Tris (Gibco BRL, 15504-012)

80,00 g NaCl (Roth, 9265.1)

in 800 ml Aqua bidest lösen, pH-Wert von 7,6 mit 37 % HCl einstellen und Lösung mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen.

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung ad 1000 ml Aqua bidest

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol (Merck, 104716)

Aqua bidest ad 1000 ml

Zugabe von 500 ml 0,1 M HCl

Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lsg (DAB):

100 mg DAB (Fluka 32750) in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer), Lösung filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch 70 µl H₂O₂ (30 %) (Merck, 107210) zugeben.

Mayer's saures Hämatoxylin

1 g Hämalaun (Hämatoxylin Merck 4305) in 1000 ml Aqua bidest lösen

0,2 g NaJO₃ und 50 g Kalialaun in der Hämatoxylinlösung unter Schütteln lösen

50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure hinzufügen

3.2.2.5 Evaluierung der Methodik

Zunächst wurde in Vorversuchen die Methodik zum Nachweis von PrP^{Sc} in Gewebeschnitten von Schafen optimiert. Dazu wurde an mehreren Gewebeschnitten des lymphoretikulären Systems (LRS) Scrapie infizierter Schafe diejenige Kombination von Vorbehandlungsschritten der Präparate und Konzentration der eingesetzten Antikörper erarbeitet, die zu optimalen immunhistochemischen Ergebnissen führte. Als Vergleichsstandard dienten dabei die unter Verwendung desselben Primärantikörpers erzielten Ergebnisse der in der Routinediagnostik im INNT eingesetzten immunhistochemischen Färbung im Färbeautomaten Immunostainer Ventana Discovery.

3.2.2.6 Angewandte Methodik

Die in Tabelle 3.4 genannten Gewebeproben wurden folgendermaßen behandelt:

Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchungen

Vorbehandlung

1. Entparaffinierung und Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe:
 - a) 2 x je 3 min Xylol
 - b) 2 x je 3 min Isopropanol
 - c) 2 min 96 % Ethanol
 - d) 2 min 70 % Ethanol
 - e) 2 min 50 % Ethanol
2. 15 min Inkubation in 98 - 100%iger Ameisensäure
3. 5 min unter fließendem Leitungswasser spülen
4. Inaktivierung der endogenen Peroxidase durch H₂O₂ (3%ig) in Methanol für 30 min
5. 3 x waschen in Tris-buffered saline (TBS)
6. 15 min Behandlung mit Proteinase K (PK) in 1 x PK-Puffer im 37°C-Wasserbad
7. 3 x waschen in TBS

Antigennachweis

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in Shandon Coverplates (Thermo Electron Corporation, 7219925)
2. Auftragen des Primäantikörpers mab L42, Inkubation über Nacht bei 4°C
3. 3 x waschen mit TBS
4. Auftragen des Sekundäantikörpers, 30 min Inkubation
5. 3 x waschen mit TBS
6. Auftragen des ABC-Komplexes (Avidin-Biotin-Komplex), 30 min Inkubation
7. 3 x waschen mit TBS
8. Färbung mit DAB (Fluka, 32750), dafür Objektträger aus den Coverplates in DAB Küvette überführen, 10 min inkubieren
9. 3 x waschen mit TBS

Gegenfärbung

1. kurz in aqua dest. spülen
2. 10 min Gegenfärbung mit Hämatoxylin
3. 15 min unter fließendem Leitungswasser bläuen
4. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe:
 - a) 2 min 50 % Ethanol
 - b) 2 min 70 % Ethanol
 - c) 2 min 96 % Ethanol
 - d) 2 x je 2 min Isopropanol
 - e) 2 x je 3 min Xylol
5. Eindecken der Schnitte mit Entellan (Merck)

Für die Verifizierung positiver Ergebnisse wurde bei Punkt 2 des Antigennachweises der Antikörper mab 2G11 anstelle des mab L42 aufgetragen. Außerdem fand für den mab 2G11 folgende, vom genannten Protokoll abweichende Vorbehandlung Anwendung:

1. - 6. wie oben aufgeführt
7. 15 min autoklavieren im Dampfkochtopf bei 121°C
8. 5 min abkühlen lassen in TBS

3.2.2.7 Immunhistologische Kontrollen

Für jede immunhistologisch untersuchte Gewebeprobe wurde ein Kontrollschnitt (Null-mab) der jeweiligen Probe mitgeführt. Bei diesem wurde anstelle des Primärantikörpers mab L42 oder mab 2G11 ein monoklonaler Antikörper gegen das PRRS-Virus (Weiland et al. 1999) aufgetragen.

Als Positivkontrolle wurden Schnitte lymphatischer Organe positiv getesteter Schafe mitgeführt.

Als Negativkontrolle dienten Gehirnschnitte bereits negativ getesteter Schafe.

3.2.2.8 Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen

Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte mit dem Standardmikroskop Axioskop 2 plus (ZEISS) unter Verwendung von 10 x, 20 x und 40 x Objektiven.

Als positiv wurden gewebsassoziierte, in der Schnittebene liegende, hell- bis dunkelbraune, granuläre bis globuläre Reaktionsprodukte gewertet, die im Kontrollschnitt nicht nachweisbar waren.

Homogen hell-beige Färbungen, vor allem im Bereich von Entnahme- und Bearbeitungsartefakten, sowie Hämosiderin als eisenhaltiges Pigment, das sich auch in der Negativkontrolle als braunes grobscholliges Material nachweisen ließ, wurden als negativ gewertet. Ebenfalls als negativ gewertet wurden teils homogene, teils granuläre Reaktionsprodukte in Bereichen mit starker Autolyse, die vor allem im Ileum angetroffen wurden.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der histomorphologischen Charakterisierung

Alle untersuchten Organschnitte wurden für eine Charakterisierung hinsichtlich der histopathologisch erfassbaren Alterationen einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Die Ergebnisse sind zusammengefasst in der Tabelle 4.1 dargestellt. Die Organe Nll. ileocolici, Nl. retropharyngeus lateralis und Tonsilla palatina wiesen bei verschiedenen Tieren mehrere histopathologische Befunde auf.

Alle auswertbaren Ileumproben zeigten gering- bis mittelgradige Enteritiden. In den meisten Fällen (80 %) handelte es sich um eine mittelgradige, akute, oberflächliche, eosinophile Enteritis. 15,6 % der Proben waren wegen starker Autolyse histomorphologisch nicht auswertbar.

In den Nll. ileocolici konnten aktivierte Lymphfollikel, Sinushistiozytose und Depletion unterschiedlicher Ausprägung beobachtet werden. Bei einem Schaf (Nr. 343) zeigte der Lymphknoten eine nekrotisierende granulomatöse Lymphadenitis. In den zusätzlich durchgeführten Spezialfärbungen (Gram- und Ziehl-Neelsen-Färbung) sowie der PAS-Reaktion (Periodic Acid Schiff'-Reaktion) waren keine erregerspezifischen Strukturen nachweisbar.

Der Nl. retropharyngeus lateralis (bzw. der Nl. mandibularis) zeigte bei 74 % der Tiere eine hochgradige Resorption von Blut, die vermutlich tötungbedingt entstand. Außerdem konnten unterschiedliche Aktivierungszustände und Sinushistiozytose dargestellt werden. Bei einem Schaf (Nr. 488) wurde eine granulomatöse Lymphadenitis festgestellt mit Bakterienkolonien, Zelldetritus und Nekrosen. In der PAS-Reaktion gelang ebenfalls der Nachweis von Bakterienkolonien. In der Gram-Färbung waren keine erregerspezifischen Strukturen nachweisbar. Die Ziehl-Neelsen-Färbung erbrachte keinen Hinweis auf säurefeste Stäbchenbakterien.

Die Untersuchung der Tonsilla palatina ergab bei 28,1 % der Tiere den Nachweis von Sarkosporidien. Außerdem wurde bei 59,3 % der Tiere eine gering- oder mittelgradige, akute, fokale, oberflächliche, eitrig Tonsillitis festgestellt.

77 % der Tiere litten an einer mittelgradigen chronischen Konjunktivitis.

Die Untersuchung der Zervikallymphknoten ergab Blutresorption, aktivierte Lymphfollikel, Sinushistiozytose und Depletion unterschiedlicher Ausprägung.

Die eosinophile Enteritis, die im Ileum beobachtet wurde, zeigte sich auch bei neun der 13 Rektumproben.

Alle 13 Proben der Milz waren ohne besonderen Befund.

Die Untersuchungen der nervalen Gewebe Plexus solaris, N. vagus, Ganglion stellatum und Ganglion cervicale craniale zeigten in einem Fall beim Plexus solaris sowie bei demselben Tier und bei zwei weiteren Schafen im Ganglion cervicale craniale eine fokale, geringgradige, nicht eitrige Ganglionitis.

In allen zwölf vorhandenen Proben der Zunge wurden Sarkosporidien und lymphoplasmazelluläre Infiltrationen beobachtet.

Tab. 4.1: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der potenziellen Eintrittspforten

Organ	Histologischer Befund	Absolute Zahl der Befunde	Relative Zahl der Befunde (%)
Ileum	ohne besonderen Befund	0	0,0
	mittelgradige akute oberflächliche eosinophile Enteritis	108	80,0
	mittelgradige akute tiefe eosinophile Enteritis	1	0,7
	mittelgradige chronische oberflächliche eosinophile Enteritis	1	0,7
	mittelgradige akute oberflächliche lymphohistiozytäre Enteritis	1	0,7
	geringgradige akute oberflächliche eosinophile Enteritis	3	2,2
	keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar	21	15,6
Nil. ileocolici	ohne besonderen Befund	2	1,5
	geringgradige Aktivierung	26	19,3
	mittelgradige Aktivierung	99	73,3
	geringgradige Sinushistiozytose	55	40,7
	mittelgradige Sinushistiozytose	34	25,2
	geringgradige Depletion	24	17,8
	mittelgradige Depletion	18	13,3
	hochgradige Depletion	1	0,7
	nekrotisierende granulomatöse Lymphadenitis	1	0,7
	keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar	4	3,0
NI. retro-pharyngeus lateralis	ohne besonderen Befund	3	2,2
	Blutresorptionslymphknoten	100	74,1
	geringgradige Aktivierung	8	5,9
	mittelgradige Aktivierung	12	8,9
	hochgradige Aktivierung	3	2,2
	geringgradige Sinushistiozytose	13	9,6
	mittelgradige Sinushistiozytose	3	2,2
	granulomatöse Lymphadenitis	1	0,7
	keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar	6	4,4
	Tonsilla palatina	ohne besonderen Befund	35
geringgradige akute fokale oberflächliche eitrige Tonsillitis		41	30,4
mittelgradige akute fokale oberflächliche eitrige Tonsillitis		39	28,9
Sarkosporidiose		38	28,1
keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar		3	2,2
Membrana nictitans	ohne besonderen Befund	4	3,0
	mittelgradige chronische Konjunktivitis	104	77,0
	geringgradige chronische Konjunktivitis	25	18,5
	hochgradige chronische Konjunktivitis	1	0,7
	geringgradige akute Konjunktivitis	1	0,7
	keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar	0	0,0

4.2 Absolute Zahl der Nachweise von PrP^{Sc} mittels Immunhistochemie

Die vorangegangene Untersuchung von 169 Schafen und sechs Ziegen mittels Schnelltest im Obex erbrachte bei 40 Schafen ein positives Ergebnis. Die 135 nicht-reaktiven Tiere wurden in verschiedenen anderen Geweben auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} immunhistochemisch untersucht. Bei 13 Schafen (9,6 %) der 135 untersuchten Tiere wurde PrP^{Sc} in verschiedenen Organen nachgewiesen (Abb. 4.1). In Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung zusammengefasst. Alle untersuchten Proben der sechs Ziegen waren negativ. Somit waren 53 der 169 untersuchten Schafe mit Prionen infiziert. Das entspricht einer Prävalenz von 31,4 % bezogen auf die hier untersuchten genetisch empfänglichen Schafe.

Die 13 Schafe mit positiven Ergebnissen gehörten der Genotypklasse 3 an, entweder mit dem Genotyp ARQ/ARQ (neun Fälle) oder mit dem Genotyp ARQ/AHQ (vier Fälle), sie waren zwischen einem und fünf Jahren alt (Tabelle 4.2).

Insgesamt konnten in 60 Proben aus neun unterschiedlichen Geweben von 13 Tieren Akkumulationen von PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Abbildung 4.1 zeigt zusammenfassend die Verteilung der positiven Ergebnisse in der Immunhistochemie (IHC) in den untersuchten Organen. Bei keinem Schaf gelang ein PrP^{Sc}-Nachweis in allen 13 untersuchten Proben. Die höchste Anzahl an positiven Ergebnissen wurde bei einem zweijährigen Schaf (Nr. 85) mit neun positiven Geweben festgestellt. Die am häufigsten positiven Organe waren die Tonsilla palatina und der Nodus lymphaticus (NI.) retropharyngeus lateralis mit je neun positiven Ergebnissen. Da der NI. retropharyngeus lateralis bei sieben Tieren nicht aufgefunden werden konnte, wurde an seiner Stelle der NI. mandibularis entnommen und untersucht. In zwei Fällen konnten auch dort PrP^{Sc}-Ablagerungen nachgewiesen werden. Zur Vereinfachung wird hier zusammenfassend vom NI. retropharyngeus lateralis berichtet, auch in den beiden beschriebenen Fällen, in denen der NI. mandibularis ersatzweise entnommen worden war.

Ileum, NI. cervicalis superficialis und Milz zeigten bei jeweils acht Tieren positive Ergebnisse. Der Nachweis von PrP^{Sc} im peripheren Nervensystem (Plexus solaris) gelang in sechs Fällen. Alle sechs Schafe zeigten auch in der immunhistochemischen Untersuchung der Intramuralganglien des Ileum ein positives Ergebnis, drei davon auch in den Intramuralganglien des Rektum. Das Gewebe mit der geringsten Anzahl positiver Ergebnisse war das Dritte Augenlid (zwei Tiere). Diese beiden Schafe zeigten insgesamt die weiteste Ausbreitung von PrP^{Sc} im lymphoretikulären Gewebe mit acht und neun positiven Organen. Im Ganglion cervicale craniale, im Ganglion stellatum, im Nervus vagus sowie in den Zungenproben gelang der Nachweis von PrP^{Sc} nicht.

Die Abbildungen 4.2 bis 4.9 zeigen beispielhaft ausgewählte positiv befundene Organe. Die Abbildungen 4.2 und 4.3 zeigen den Nachweis von PrP^{Sc} im Ileum, zum einen in den Intramuralganglien der Tunica muscularis (Abb. 4.2) und zum anderen in den Lymphfollikeln der Tunica submucosa (Abb. 4.3).

Die Abbildungen 4.4 bis 4.8 zeigen PrP^{Sc}-Akkumulationen in lymphatischen Geweben.

Aufgrund der gleichen Struktur aller Lymphknoten wurde auf eine Abbildung der Nll. ileocolici verzichtet. Stattdessen wurden IHC-Ergebnisse des Nl. retropharyngeus (Abb. 4.5) und des Nl. cervicalis superficialis (Abb. 4.8) stellvertretend für alle drei positiv befundenen Lymphknoten abgebildet. Bei den Zellen in den lymphatischen Geweben, in denen PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte, handelt es sich hauptsächlich um große mononukleäre Zellen, vermutlich Makrophagen. In Abb. 4.7 (Milz) zeigen sich neben den groben plaqueartigen Granula auch feine netzartige braungefärbte Strukturen, die auf Follikulär-dendritische Zellen schließen lassen.

Abb. 4.9 und 4.10 zeigen zwei sehr unterschiedlich starke Akkumulationen von PrP^{Sc} im Plexus solaris. Während sich in Abb. 4.9 sehr deutliche grobkörnige braune Granula am Zellrand, intrazellulär und auch im Neuropil befindet, zeigt Abb. 4.10 nur sehr feine Granula, die hauptsächlich am Zellrand lokalisiert ist.

Die Abbildungen 4.11 und 4.12 zeigen unspezifische Reaktionen, die sich ähnlich der PrP^{Sc}-Akkumulation als braune Granula darstellen, die jedoch durch den Vergleich mit dem dazugehörigen Negativ-Kontrollschnitt (Null-mab) als unspezifisch eingestuft werden konnten.

Bei den sechs Ziegen und bei 116 Schafen konnte kein PrP^{Sc} in den Geweben dieser Eintrittspforten nachgewiesen werden. Diese Tiere wurden als TSE-negativ betrachtet und die Untersuchung an dieser Stelle abgeschlossen.

4.3 Nachweise von PrP^{Sc} unter Berücksichtigung der potenziellen Eintrittspforten

Als potenzielle Eintrittspforten für das infektiöse Agens wurden für den Darm das Ileum und die Nll. ileocolici, für den Kopf der Nl. retropharyngeus lateralis (bzw. der Nl. mandibularis) und die Tonsilla palatina von allen 135 Tieren immunhistologisch untersucht. Im Ileum konnte insgesamt achtmal PrP^{Sc} nachgewiesen werden, in vier Fällen sowohl in den Intramuralganglien des enterischen Nervensystems als auch in den Lymphfollikeln, dreimal nur in den Intramuralganglien und einmal nur in den Lymphfollikeln (Abb. 4.2 und 4.3). Die Nll. ileocolici zeigten in sieben Fällen positive Ergebnisse. Somit konnte in der potenziellen

Eintrittspforte Darm, also im Ileum und/oder in den Nll. ileocolici, bei elf der untersuchten Schafe PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Bei sieben dieser elf Schafe gelang der Nachweis von PrP^{Sc} auch im GALT-Gewebe des Oropharynx, nämlich in der Tonsille und in den Nl. retropharyngeus lateralis bzw. Nl. mandibularis. Vier Tiere zeigten dagegen PrP^{Sc}-Akkumulationen nur im Darm (Tab. 4.2).

Bei zwei Tieren erfolgte ein Nachweis von PrP^{Sc} ausschließlich im Nl. retropharyngeus lateralis und der Tonsille, dies ohne ein positives Ergebnis im Darm.

Alle neun Schafe, bei denen PrP^{Sc} im Nl. retropharyngeus lateralis bzw. im Nl. mandibularis nachgewiesen werden konnte, zeigten auch Akkumulationen von PrP^{Sc} in der Tonsilla palatina.

Die Membrana nictitans wurde ebenfalls von allen Tieren untersucht, da es sich um ein sehr leicht zugängliches Untersuchungsmaterial handelt, das auch für Ante-mortem-Untersuchungen genutzt werden könnte. Zwei Tiere zeigten dort Ablagerungen von PrP^{Sc}.

4.4 Nachweis von PrP^{Sc} in den Organen, die den potenziellen Eintrittspferten nachgeordnet sind

Als nachgeordnete Organe wurden der Nl. cervicalis superficialis, die Milz, das Rektum, der Plexus solaris, das Ganglion cervicale craniale, das Ganglion stellatum, der Nervus vagus und die Zunge untersucht. Diese Proben wurden nur bei den 13 Schafen untersucht, die bereits an den Eintrittspferten PrP^{Sc} akkumuliert hatten. Die Ergebnisse sind Tabelle 4.2 zu entnehmen.

Bei elf Schafen konnte in mindestens einem weiteren Organ PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Zwei Schafe (Nr. 435 und Nr. 499) zeigten nur in den Eintrittspferten positive Ergebnisse, nicht in den nachgeordneten Geweben.

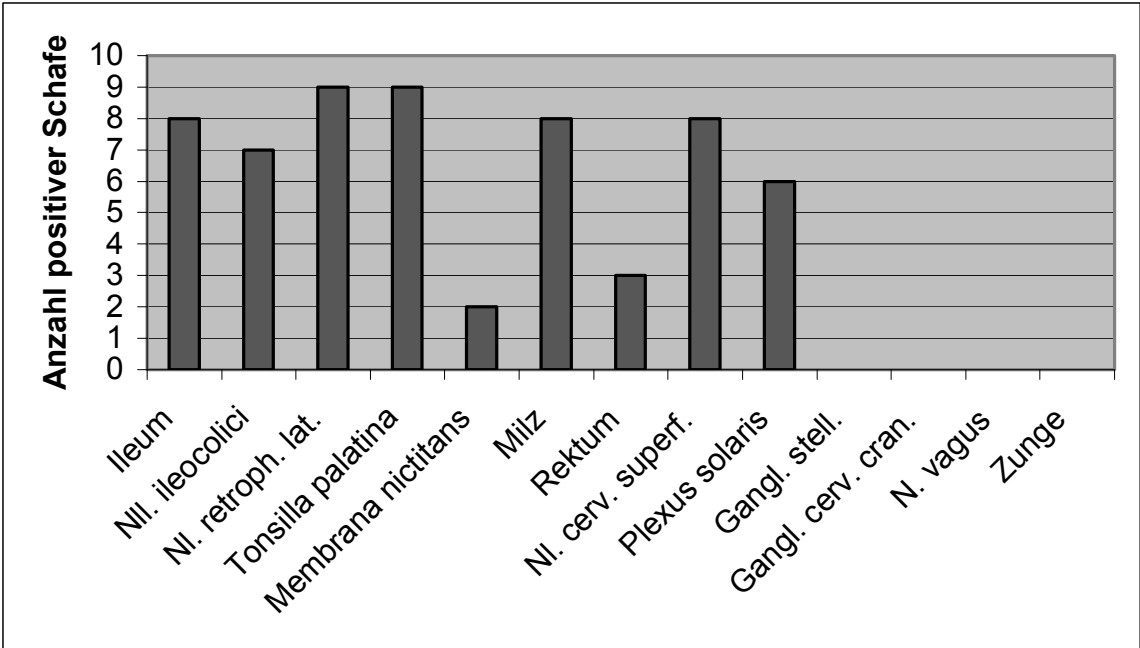


Abb. 4.1: Verteilung der positiven Ergebnisse der Immunhistochemie

Tab. 4.2: Nachweis von PrP^{Sc} in den unterschiedlichen Geweben bei 13 Schafen (Immunhistochemie)

Schaf	PrP-Genotyp	Geburtsjahr	Ileum		NII. ileocolici	NI. retropharyngeus lateralis	Tonsilla palatina	Membrana nictitans	Milz	NI. cervicalis superficialis	Rektum (IMG)	Plexus solaris	Total
			IMG	LF									
9	ARQ/ARQ	2003	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	4
26	ARQ/ARQ	2002	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	5
85	ARQ/ARQ	2002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
191	AHQ/ARQ	2003	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	3
205	ARQ/ARQ	2003	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	5
260	AHQ/ARQ	2003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
326	ARQ/ARQ	1999	-	-	+	+ [*]	+	-	+	+	-	-	5
333	ARQ/ARQ	2001	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8
374	AHQ/ARQ	2002	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	7
425	ARQ/ARQ	1999	-	+	-	+ [*]	+	-	+	+	-	-	5
435	ARQ/ARQ	2001	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
463	ARQ/ARQ	2001	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	4
499	AHQ/ARQ	2002	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2
Total			8		7	9	9	2	8	8	3	6	60

* NI. mandibularis

IMG Intramuralganglion

LF Lymphfollikel

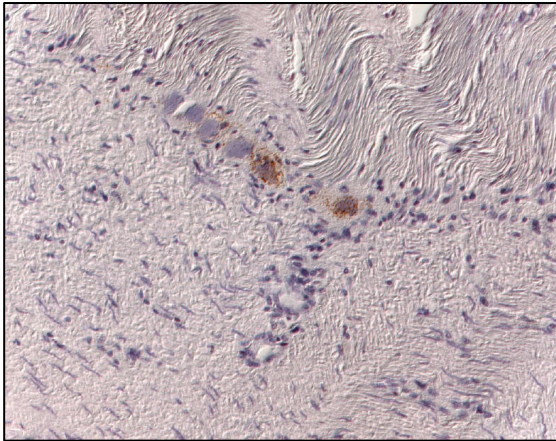
Nachweise von PrP^{Sc} in den potenziellen Eintrittspforten

Abb. 4.2: Scrapie positives Schaf Nr. 26
Akkumulation von PrP^{Sc} in den
Intramuralganglien des Ileum

mab L42

Vergrößerung 200 x

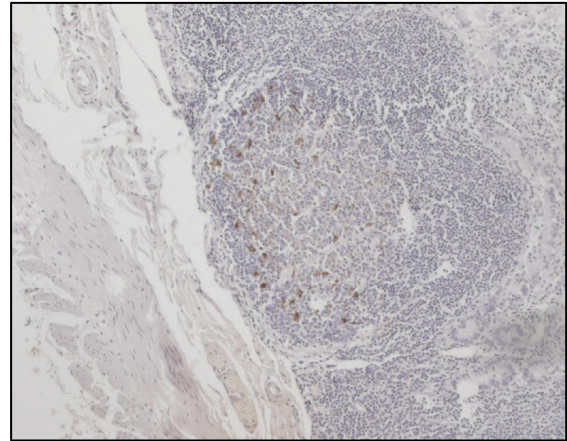


Abb. 4.3: Scrapie positives Schaf Nr. 333
Akkumulation von PrP^{Sc} in einem
Lymphfollikel des Ileum

mab L42

Vergrößerung 200 x

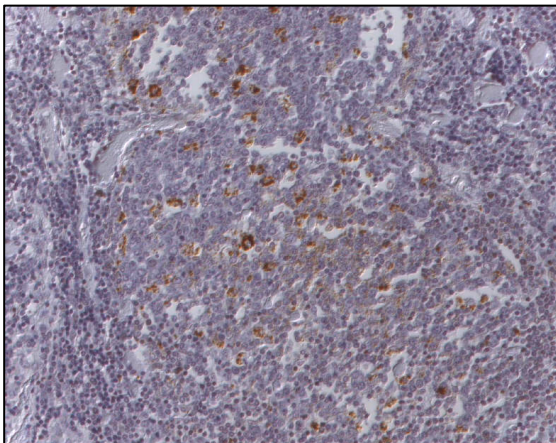


Abb. 4.4: Scrapie positives Schaf Nr. 9
Akkumulation von PrP^{Sc} in einem
Lymphfollikel der Tonsilla palatina

mab L42

Vergrößerung 200 x

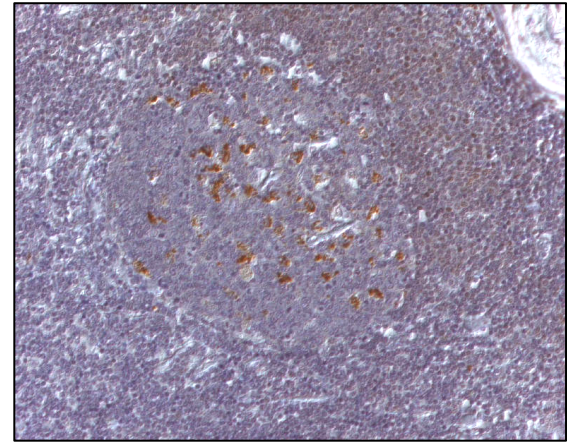


Abb. 4.5: Scrapie positives Schaf Nr. 85
Akkumulation von PrP PrP^{Sc} in einem
Lymphfollikel des NI. retropharyngeus
lateralis

mab L42

Vergrößerung 200 x

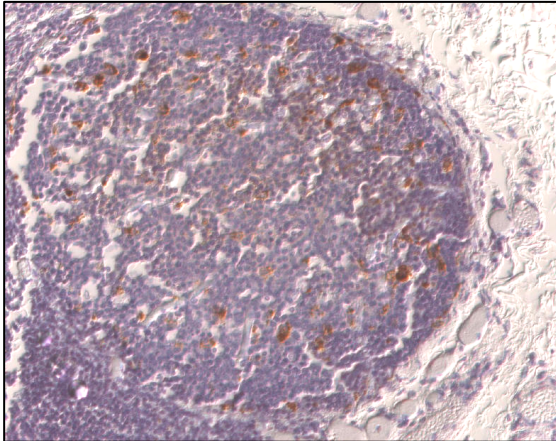


Abb. 4.6: Scrapie positives Schaf Nr. 333
Akkumulation von PrP^{Sc} in einem
Lymphfollikel des Dritten Augenlides

mab L42

Vergrößerung 200 x

**Nachweise von PrP^{Sc} in den Organen, die den potenziellen Eintrittspforten
nachgeordnet sind**

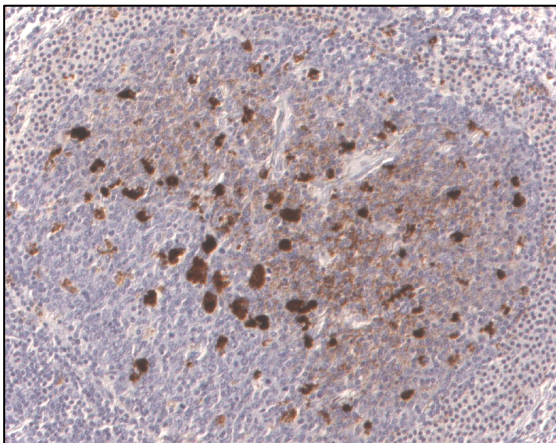


Abb. 4.7: Scrapie positives Schaf Nr. 205
Akkumulation von PrP^{Sc} in der weißen
Pulpa der Milz

mab L42

Vergrößerung 200 x

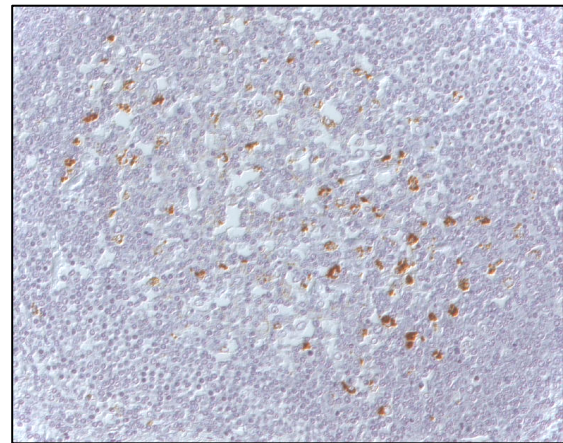


Abb. 4.8: Scrapie positives Schaf Nr. 85
Akkumulation von PrP^{Sc} in einem
Lymphfollikel des NI. cervicalis
superficialis

mab L42

Vergrößerung 200 x

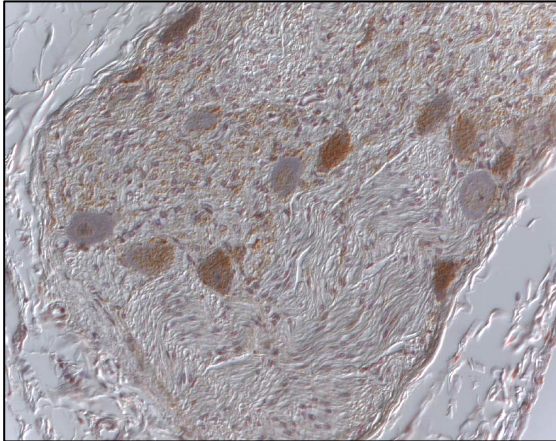


Abb. 4.9: Scrapie positives Schaf Nr. 26
Akkumulation von PrP^{Sc} im Plexus solaris
mab L42
Vergrößerung 200 x

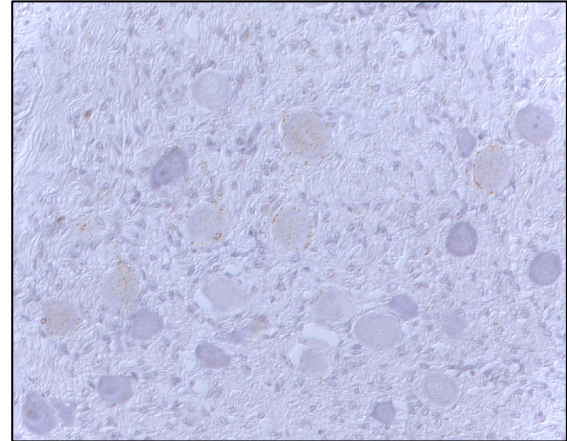


Abb. 4.10: Scrapie positives Schaf Nr. 191
Akkumulation von PrP^{Sc} im Plexus solaris
mab L42
Vergrößerung 200 x

Unspezifische Reaktionen

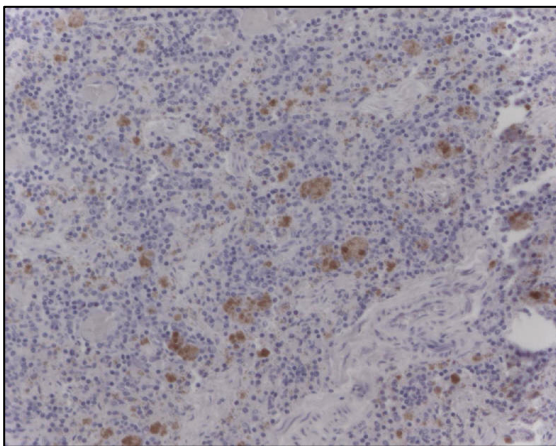


Abb. 4.11: Scrapie negatives Schaf Nr. 30
Hämosiderin in Siderophagen im NI.
ileocolicus
Vergrößerung 200 x

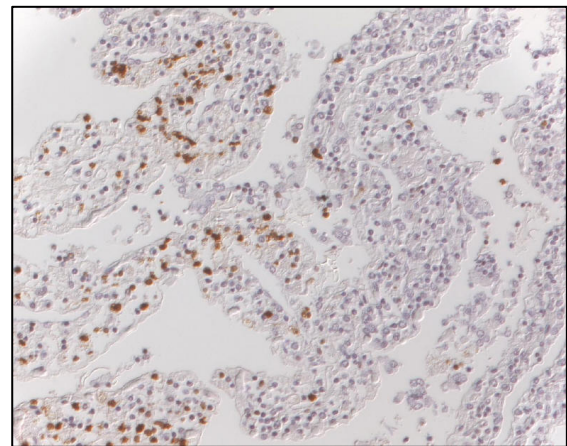


Abb. 4.12: Scrapie negatives Schaf
Unspezifische Reaktion in einem Ileum
mit starker Autolyse
mab L42
Vergrößerung 200 x

4.5 Genüberstellung der Ergebnisse der Immunhistochemie und der Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen

In Tabelle 4.3 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung (IHC) auf PrP^{Sc} den histopathologischen Befunden der H.-E.-Färbung gegenübergestellt.

Bei den 13 positiven Tieren finden sich im Ileum in acht Fällen sowohl PrP^{Sc} als auch ein histologischer Befund. In fünf Fällen wurde eine Enteritis diagnostiziert ohne Nachweis von Prionen.

Die Nll. ileocolici zeigten bei sieben Tieren gleichzeitig histologische Veränderungen und PrP^{Sc}-Akkumulationen, während sechs Tiere nur histologische Befunde aufwiesen.

Bei neun Schafen war der Nl. retropharyngeus lateralis immunhistochemisch und histopathologisch auffällig und bei vier Schafen nur histopathologisch verändert.

Die Tonsilla palatina war in sieben der 13 Schafe positiv in der IHC und der Histologie, zweimal in beiden Untersuchungen negativ, zweimal in der IHC positiv aber histologisch unauffällig und zweimal histologisch verändert aber ohne Nachweis von Prionen.

Beide Tiere, die in der Membrana nictitans positiv waren, zeigten histologische Veränderungen. Zehn der 13 Schafe zeigten eine Konjunktivitis bei negativer IHC und eines war in beiden Untersuchungen ohne besonderen Befund.

Tab. 4.3: Gegenüberstellung der immunhistochemischen und histologischen Ergebnisse

Spezies	Tier Nr.	Ileum		Nil. ileocolici		NI. retropharyngeus lateralis		Tonsilla palatina		Membrana nictitans	
Schaf	3	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
Schaf	7	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	8	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	9	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Schaf	18	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
Schaf	26	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	30	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	35	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	36	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	45	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	49	2	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	54	0	1	0	1	0	1	2	2	0	1
Schaf	59	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	63	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	64	0	1	0	1	0	1	2	2	0	1
Schaf	66	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	74	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	75	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	79	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	85	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Schaf	87	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	90	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	92	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	100	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	101	0	1	0	1	0*	1*	0	0	0	1
Schaf	102	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	104	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	107	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	108	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	109	0	1	0	1	0*	1*	0	0	0	1
Schaf	111	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	112	0	2	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	125	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	128	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	142	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	148	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	149	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	151	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	157	0	2	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	163	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	164	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	174	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	175	0	2	2	2	0	1	0	0	0	1

Spezies	Tier Nr.	Ileum		Nil. ileocolici		NI. retropharyngeus lateralis		Tonsilla palatina		Membrana nictitans	
Schaf	186	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	189	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	191	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	195	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	198	0	1	0	1	2	2	0	1	0	1
Schaf	203	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	205	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Schaf	206	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	211	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	213	0	2	0	1	2	8	0	0	0	1
Schaf	214	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	217	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	225	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	230	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	231	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	235	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	239	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	240	0	1	2	2	0	1	0	1	0	1
Schaf	247	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	253	0	2	0	1	2	2	0	1	0	1
Schaf	260	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	262	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	266	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	267	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	273	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Schaf	274	0	1	0	1	0*	1	0	1	0	0
Schaf	280	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	284	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	293	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	296	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	298	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	299	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	304	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	306	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	312	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	316	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	320	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	326	0	1	1	1	1*	1*	1	0	0	1
Schaf	327	0	1	0	1	2	2	0	1	0	1
Schaf	333	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Schaf	335	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	343	0	1	0	1	2	2	0	1	0	1
Schaf	346	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	351	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	353	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	356	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	374	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Schaf	378	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	380	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1

Spezies	Tier Nr.	Ileum		Nil. ileocolici		NI. retropharyngeus lateralis		Tonsilla palatina		Membrana nictitans	
Schaf	385	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	394	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	395	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	396	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	399	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	407	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	409	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	414	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	417	0	1	2	2	0	1	0	1	0	1
Schaf	419	0	2	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	422	2	2	2	2	0	1	0	1	0	1
Schaf	425	1	1	0	1	1*	1*	1	1	0	1
Schaf	435	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	440	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	445	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	447	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Schaf	448	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	449	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	452	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	461	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	463	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
Schaf	466	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
Schaf	471	0	1	0	1	2	2	0	1	0	1
Schaf	472	0	1	0	1	0	1	2	2	0	1
Schaf	473	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	474	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	480	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	481	0	1	0	1	2	1	0	1	0	1
Schaf	483	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	485	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	488	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
Schaf	490	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
Schaf	493	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	499	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
Schaf	513	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Schaf	547	0	1	0	1	0*	1*	0	1	0	1
Schaf	768	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Ziege	205	0	2	0	1	0	0	0	1	0	1
Ziege	253	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Ziege	254	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1
Ziege	255	0	1	0	1	0*	1*	0	1	0	1
Ziege	257	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Ziege	261	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1

*NI. mandibularis

Linke Spalte des jeweiligen Organs: Ergebnis der IHC

Rechte Spalte des jeweiligen Organs: Ergebnis der Histologie

0 negativ bzw. ohne besonderen Befund

1 positiv bzw. histopathologisch verändert

2 keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar

5. Diskussion

5.1 Ziel der Arbeit

In dieser Studie wurden Gewebeproben von sechs Ziegen und 129 Schafen empfänglicher Genotypen aus einer natürlich mit klassischer Scrapie infizierten Herde auf das Vorliegen und die fortschreitende Ausbreitung einer Scrapie-Infektion untersucht. Alle 135 Tiere hatten bei der vorangegangenen Untersuchung des Stammhirns mittels Schnelltest ein negatives Ergebnis gezeigt. Ziel der Studie war es einerseits, die Aussagekraft der TSE-Schnelltestuntersuchung des Stammhirns für den TSE-Status des Tieres zu überprüfen und andererseits die tatsächliche Prävalenz von Scrapie in einer betroffenen Herde festzustellen. Des Weiteren sollten mit der Studie mögliche Eintrittspforten sowie die Verteilung bzw. das Vordringen von PrP^{Sc} im Tierkörper aufgedeckt werden. Die Ergebnisse der Studie ermöglichen darüber hinaus Aussagen über die diagnostische Relevanz der Ante-mortem-Untersuchung verschiedener peripherer lymphatischer Gewebe.

Es zeigte sich, dass 13 (10 %) der 129 Schafe trotz des negativen Schnelltestergebnisses aus der Obexregion in peripheren Geweben bereits PrP^{Sc} akkumuliert hatten. Dies ist allerdings nicht der Spezifität oder Sensitivität des Tests anzulasten.

5.2 Probenmaterial und Untersuchungsmethoden

Die Probenahme erfolgte nicht unmittelbar nach der Tötung der Tiere. Daher hatten bereits autolytische Prozesse eingesetzt, so dass ein Teil der Ileum-Proben aufgrund starker Autolyse für eine histomorphologische Charakterisierung nicht mehr auswertbar war.

Bei sieben Tieren konnte bei der Probenahme der NI. retropharyngeus lateralis nicht aufgefunden werden. An seiner Stelle wurde ersatzweise der NI. mandibularis entnommen. In zwei der sieben Proben des NI. mandibularis konnte PrP^{Sc} nachgewiesen werden.

Der NI. mandibularis, entlässt seine Lymphe in den NI. retropharyngeus lateralis (Vollmerhaus 1984). Dies lässt vermuten, dass auch der NI. retropharyngeus lateralis in den beiden positiven Fällen, in denen dieser Lymphknoten nicht zur Untersuchung zur Verfügung stand, PrP^{Sc} aufgewiesen hätte. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass in den Fällen, in denen der NI. mandibularis ein negatives Ergebnis erbracht hatte, durchaus eine PrP^{Sc}-Akkumulation im fehlenden NI. retropharyngeus lateralis hätte nachgewiesen werden können. Das Einzugsgebiet des NI. retropharyngeus lateralis umfasst nämlich zusätzlich zur Lymphe des NI. mandibularis auch die Durchflußlymphe des NI. parotideus, die Haut der Parotisgegend und tiefere Partien der oberen Nackengegend.

Die untersuchten Gewebe wurden nach der Probenahme mehrere Monate in Formalin gelagert, bevor sie für die weitere Untersuchung präpariert wurden. Die Standardfixierungsdauer in Formalin beträgt etwa 24 Stunden. Eine längere Fixierungsdauer kann die Qualität der Gewebe für histologische Untersuchungen negativ beeinflussen. Formalin inaktiviert den TSE-Erreger jedoch nicht, sondern stabilisiert ihn (Brown et al. 1990). Demnach ist ein negativer Einfluss von Formalin auf die immunhistochemischen Ergebnisse wenig wahrscheinlich.

Auch die Dekontamination des Gewebes mit 98%iger Ameisensäure vor der Routineeinbettung und die zweite Inkubation in Ameisensäure der bereits auf Objektträger aufgezogenen Schnitte strapazieren histologische Präparate.

Die Auswertbarkeit der hier untersuchten Gewebe wurde jedoch von Fixierung und Dekontamination nicht beeinträchtigt, auch die immunhistochemische Untersuchung wurde durch Autolyse nicht beeinträchtigt, denn der Nachweis von PrP^{Sc} gelang hier auch in stark autolytischem Material.

Da nur jeweils Ausschnitte der verschiedenen Organe untersucht werden konnten, wurde der Versuch unternommen, die untersuchte Fläche zu vergrößern. Von jeder Probe wurden zwei bis vier Anschnitte in einer Einbettkassette zusammengefasst und mindestens je zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen, um möglichst viele Regionen der Probe in einer Schnittserie analysieren zu können. Bedingt durch die Arbeitstechnik können Gewebeabschnitte mit Akkumulationen von PrP^{Sc} übergangen worden sein. Folglich ist nur ein positives Ergebnis aussagekräftig. Mit der Anfertigung von Serienschnitten könnte dieses Risiko minimiert werden.

Die Follikel, in denen PrP^{Sc} nachgewiesen wurde, wurden nicht ausgezählt, da wie oben beschrieben nur ein Ausschnitt des Organs betrachtet werden konnte und damit keine Aussage über die Anzahl tatsächlich positiver Follikel gemacht werden konnte. Damit ist eine quantitative Gewichtung der Ergebnisse nicht möglich.

In Konsequenz wurde nur festgestellt, ob PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte oder nicht. Die Intensität und Ausdehnung der Reaktion wurde nicht mit einbezogen.

In verschiedenen Arbeiten wurde das Rektum als geeignetes Untersuchungsmaterial für Ante-mortem-Untersuchungen vorgeschlagen (Gonzalez et al. 2005, 2006, Espenes et al. 2005). Für diese Untersuchungen wurden Proben 1 bis 2 cm cranial des Übergangs zwischen Rektum- und Afterschleimhaut entnommen, die durchschnittlich acht Lymphfollikel für die Auswertung enthielten (Espenes et al. 2005). Diese Kriterien fanden bei der Probenahme für diese Studie keine Anwendung. Die hier gezogenen Proben wiesen weniger als acht Follikel auf. Daher sind die Ergebnisse nur eingeschränkt mit oben genannten

Studien vergleichbar. Außerdem ist zu beachten, dass im Gegensatz zu den anderen Studien bei den hier untersuchten Rektumproben in allen drei positiven Fällen PrP^{Sc} ausschließlich in den Intramuralganglien (IMG) nachweisbar war, nicht aber in den Lymphfollikeln.

Die Gewebeproben der Tonsilla palatina wiesen wie in den Untersuchungen von Schreuder et al. (1998) gefordert, mindestens drei Lymphfollikel für eine angemessene Einschätzung auf.

O'Rourke et al. (2000; 2002) legten in ihren Untersuchungen des Dritten Augenlids eine Mindestanzahl von vier bzw. sechs Lymphfollikeln für die Auswertbarkeit zugrunde. Diese Forderung wurde auch bei den hier beschriebenen Untersuchungen erfüllt.

Zuerst erfolgte die Untersuchung der potenziellen Eintrittspforten für den Erreger. Wenn hier kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte, wurde das Tier als Scrapie-negativ betrachtet und auf die Untersuchung der übrigen Körperproben verzichtet, da davon ausgegangen wurde, dass ein Organ nicht wieder negativ wird, wenn einmal PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte. In der Literatur findet sich keine Bestätigung für das Gegenteil.

Wurde PrP^{Sc} nachgewiesen, so erfolgte die weitere Untersuchung aller vorhandenen Proben auf dem Wege, der für das Voranschreiten jeweils angenommen wird.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Genotyp

Diese Studie umfasst die Untersuchung von Schafen der Genotypklassen G 2 bis G 5, die als genetisch empfänglich eingestuft werden bzw. im Rahmen von Eradikationsmaßnahmen gekeult werden müssen.

Der häufigste Genotyp in der Herde war ARR/ARQ (G 2) mit 244 Tieren, von denen jedoch nur vier Böcke von der Keulung und Untersuchung betroffen waren. In keinem der untersuchten Gewebe der vier Tiere konnte PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Der am zweithäufigsten vertretene Genotyp war ARQ/ARQ (G 3) mit 157 Tieren. Die meisten Scrapie-infizierten Tiere der Herde gehörten in diese Gruppe: 38 Schafe waren bereits im Obex positiv und weitere neun Tiere in peripheren Geweben. Der Genotyp ARQ/AHQ (G 3) hatte 16 Vertreter in der Herde. Zwei Tiere waren schon im Schnelltest positiv und zusätzlich vier Schafe in der weitergehenden Untersuchung. Also gehören alle positiv getesteten Schafe zur Genotypklasse G 3.

In der untersuchten Herde befanden sich nur wenige Tiere der empfänglichsten Klasse G 5, nämlich vier Schafe mit dem Genotyp ARQ/VRQ. Die Genotypen AHQ/VRQ, ARH/VRQ und VRQ/VRQ lagen in der Herde nicht vor.

Dies stützt die Beobachtungen von Hunter et al. (1994), Elsen et al. (1999) und Vascellari et al. (2005), die zeigten, dass bei Schafrassen, in denen VRQ-Allele selten vorkommen, PrP^{ARQ} mit erhöhter Scrapie-Empfänglichkeit assoziiert ist.

Bei Untersuchungen von Jeffrey et al. (2002) und Thorgeirsdottir et al. (2002) scheinen die Genotypen ARQ/ARQ oder AHQ/ARQ eher resistenter gegenüber Scrapie zu sein. Die dort untersuchten Schafherden zeigten das VRQ-Allel jedoch in einer deutlich höheren Frequenz als die Tiere in dieser Studie.

Die unterschiedlichen Genotypen zeigten bei den Tieren dieser Untersuchung keine spezifischen Unterschiede in der Verteilung des PrP^{Sc} im Tierkörper (Tab. 4.3).

5.3.2 Prävalenz

In der hier untersuchten Herde waren auffallend viele Tiere von Scrapie betroffen. Die Untersuchung von 169 Schafen und sechs Ziegen mittels Schnelltest im Obex erbrachte bei 40 Schafen ein positives Ergebnis. Durch die weitere Untersuchung der 135 nicht reaktiven Tiere konnte bei weiteren 13 Schafen PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Somit waren 53 von 169 untersuchten Schafen mit Prionen infiziert. Das entspricht einer Prävalenz von 31,4 %, bezogen auf die hier untersuchten genetisch empfänglichen Schafe (weibliche Tiere der Genotypklassen G 3, G 4 und G 5 sowie männliche Tiere der Klassen G 2 und G 3).

Bezieht man die positiven Befunde auf die gesamte Herde, die zum Zeitpunkt der Genotypisierung 522 Schafe umfasste, so ergibt sich eine Prävalenz für die Herde von 10,2 %, wenn man davon ausgeht, dass alle nicht untersuchten Tiere nicht infiziert waren. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Verbleib und damit auch der Scrapie-Befund von 15 Tieren der Genotypklasse G 3 ungeklärt ist. Eine nicht bekannte Zahl an Schafen der Herde verstarb zwischen Genotypisierung und Keulung. Zehn dieser Schafe wurden positiv auf Scrapie getestet. Weiter ist zu berücksichtigen, dass nur die nach heutigem Stand des Wissens für klassische Scrapie genotypisch empfänglichen Tiere gekeult und untersucht wurden. Alle Schafe der Klasse G 1 und die weiblichen Tiere der Klasse G 2 wurden in der Herde belassen. Somit könnte die tatsächliche Herdenprävalenz noch höher liegen.

In einer Studie von Thorgeirsdottir et al. (2002) an 65 isländischen Schafen einer Scrapie-infizierten Herde konnte bei 38,5 % der genetisch empfänglichen Tiere eine subklinische Infektion nachgewiesen werden.

Ersdal et al. (2003) wiesen bei 35 % der Schafe einer von Scrapie betroffenen Herde in Norwegen Akkumulationen von PrP^{Sc} nach.

Bei ähnlichen Untersuchungen im Rahmen von Eradikationsmaßnahmen in Italien stellten Vascellari et al. (2005) eine deutlich niedrigere Prävalenz von 5,2 % fest.

Die histomorphologischen Untersuchungen zeigten, dass sich die Herde in einem schlechten Gesundheitszustand befand. Folgende Befunde konnten unter anderem erhoben werden: Enteritis, Tonsillitis, Konjunktivitis und Nachweis von Sarkosporidien (Tabelle 9.3 und 9.4). Dies könnte ein möglicher Grund für die hohe Scrapie-Durchseuchung innerhalb der Herde gewesen sein. Durch die eosinophile Enteritis und die Besiedlung mit Parasiten könnte die Barrierefunktion der Darmwand geschwächt gewesen sein, was das Eindringen der Prionen begünstigt haben kann. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass durch Entzündungszellen die Verteilung von PrP^{Sc} im Tierkörper begünstigt wurde. Alle acht im Ileum positiven Tieren hatten einen histologischen Befund. Allerdings zeigten alle auswertbaren Ileum-Proben entzündliche Darmveränderungen, so dass man nicht auf einen direkten Zusammenhang mit der Prioneninfektion schließen darf.

Beide Tiere, die in der Membrana nictitans positiv waren, zeigten histologisch eine Konjunktivitis. 129 weitere Tiere zeigten ebenfalls histologische Veränderungen, jedoch ohne Nachweis von PrP^{Sc} (Tab. 4.3).

Akkumulationen von pathologischem Prionprotein wurden im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen sogar in Körpergeweben, die sonst nicht an einer Prioninfektion beteiligt waren, beobachtet (Jeffrey et al. 2001, Heikenwalder et al. 2005, Ligios et al. 2005). Follikulär Dendritische Zellen (FDC), B-Lymphozyten und andere Komponenten des Immunsystems spielen eine Rolle bei chronischen inflammatorischen Prozessen und sie sind außerdem wichtig für den Transport und die Replikation von Prionen (Brown et al. 2000, Mabbot und MacPherson 2006).

Es konnte in dieser Untersuchung keine Häufung von PrP^{Sc} in entzündeten Geweben festgestellt werden. 77 % der Tiere litten an einer mittelgradigen chronischen Konjunktivitis und 80 % an einer mittelgradigen akuten oberflächlichen eosinophilen Enteritis, aber nur zwei (1,5 %) bzw. acht (6,2 %) der Tiere zeigten dort Akkumulationen von PrP^{Sc}.

Auch ein Zusammenhang zwischen den nicht TSE-spezifischen histopathologischen Befunden und den positiven Befunden der immunhistochemischen Untersuchungen auf PrP^{Sc} konnte nicht hergestellt werden.

Der Ursprung der Erkrankung in dieser Herde, in der das älteste von Scrapie betroffene Tier 1999 geboren wurde, ist ungeklärt. Die große Anzahl positiver Tiere spricht aber für eine lange Geschichte der Infektion in der Herde.

Keine der Ziegen dieser Studie zeigte Akkumulationen von PrP^{Sc}. Die geringe Anzahl mit nur sechs untersuchten Tieren lässt jedoch keine abschließende Beurteilung zu.

5.3.3 Eintrittspforten

Bei elf der 13 positiven Schafe konnten im Ileum und/oder in den Lnn. ileocolici PrP^{Sc}-Ablagerungen nachgewiesen werden. Dies bestätigt den Darm als potenzielle Eintrittspforte und unterstützt die Ergebnisse von Heggebo et al. (2000) und van Keulen et al. (2002).

Bei sieben dieser elf Schafe gelang der Nachweis von PrP^{Sc} auch im lymphatischen Gewebe des Oropharynx, nämlich in der Tonsilla palatina und im NI. retropharyngeus lateralis bzw. im NI. mandibularis. Dies deutet auf einen möglichen simultanen Eintritt des Erregers über das lymphatische Gewebe des Verdauungstraktes in Kopf und Darm. Die lymphatischen Gewebe des Oropharynx können aber auch als alleinige Eintrittsmöglichkeit unabhängig vom Darm nicht ausgeschlossen werden, da zwei Tiere nur PrP^{Sc} in Tonsille und NI. retropharyngeus lateralis zeigten. Vier Tiere zeigten an den möglichen Eintrittspforten nur Akkumulationen im Darm.

Das Gewebe mit der geringsten Anzahl positiver Ergebnisse war das Dritte Augenlid (zwei Tiere). Diese beiden Schafe zeigten mit acht und neun positiven Organen insgesamt die weiteste Ausbreitung von PrP^{Sc} in den untersuchten Geweben. Dies lässt vermuten, dass erst bei weit fortgeschrittener Verbreitung im Tierkörper das PrP^{Sc} im Dritten Augenlid nachweisbar wird. Möglich wäre auch eine retrograde Infektion, nachdem bereits das Gehirn betroffen ist. Allerdings waren diese Tiere im Schnelltest im Obex negativ. Die Eigenschaft des Dritten Augenlids als Eintrittspforte wäre somit eher von experimentellem Interesse. Auch die Eignung dieser Probe für die präklinische Ante-mortem-Diagnostik ist mit diesem Ergebnis in Frage gestellt, da die Erkrankung für einen PrP^{Sc}-Nachweis schon weit fortgeschritten sein muss.

5.3.4 Verbreitung des Erregers im Tierkörper

Die Verbreitung des Erregers im Tierkörper auf dem lymphatischen Weg (van Keulen et al. 2002) wird bestätigt durch die Nachweise von PrP^{Sc} im NI. retropharyngeus lateralis bzw. NI. mandibularis (zehn Tiere), im NI. cervicalis superficialis (acht Tiere) und in der Milz (neun Tiere).

Die Tatsache, dass alle Tiere, die im Plexus solaris (Ganglion mesentericum craniale + Ganglion coeliacum) ein positives Ergebnis zeigten, auch in den Intramuralganglien des Ileum und die Hälfte der Tiere auch im Rektum positiv waren, ist eine Bestätigung für den Transfer von PrP^{Sc} zum Nervensystem und dessen Akkumulation im peripheren Nervensystem (zum Beispiel ENS, Ganglion coeliacum), wie auch van Keulen et al. (2000) postulierte.

In den neuronalen Geweben Ganglion cervicale craniale, Ganglion stellatum und Nervus vagus gelang kein Nachweis von PrP^{Sc}. Das kann am Stadium der Übertragung des Erregers liegen, aber auch oben genannte technische Gründe können nicht ausgeschlossen werden. In jedem Falle scheint dieser Weg hier weniger relevant gewesen zu sein.

Auch in den Zungenproben konnte kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden. In den Untersuchungen von Corona et al. (2006) wurde PrP^{Sc} in den Zungen von Schafen nachgewiesen, die bereits im Gehirn positiv waren und damit in einem fortgeschritteneren Krankheitsstadium. So wäre es denkbar, dass die Zunge erst retrograd über die mit Nervengewebe assoziierten Geschmacksknospen infiziert wird.

Die positiven Tiere waren zwischen ein und fünf Jahren alt (Tabelle 4.3) und zeigten zwischen ein und neun positive Gewebe. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Schafe und der Anzahl positiver Gewebe hergestellt werden. Dies lässt vermuten, dass der Grad der positiven Reaktion mehr von den Umständen der Infektion (Infektionsdosis und -weg) als vom Alter der Tiere abhängt.

5.3.5 Aussagekraft des TSE-Schnelltests in Bezug auf die tatsächliche Prävalenz von Scrapie

Die Untersuchung mittels Schnelltest im Obex von 169 Schafen und sechs Ziegen erbrachte bei 40 Schafen ein positives Ergebnis. Durch die Untersuchung weiterer Gewebe der 135 im Obex nicht reaktiven Tiere konnte bei weiteren 13 Tieren Akkumulation von PrP^{Sc} nachgewiesen werden.

Untersuchungen von Schreuder et al. (1996) und Jeffrey et al. (2001) an Tonsillenbiopsaten zeigen übereinstimmend, dass infizierte Tiere etwa ein Jahr vor dem Auftreten klinischer Symptome Akkumulationen von PrP^{Sc} in den Tonsillen aufwiesen. Daraus lässt sich schließen, dass die Schafe dieser Studie, die im Gehirn negativ, aber positiv in lymphatischen Geweben waren, sich in der Inkubationszeit befanden und später klinische Scrapie entwickelt hätten. Auch wenn solche Tiere nur subklinische Träger sind, bei denen die Erkrankung niemals ausgebrochen wäre, besteht dennoch die Gefahr der Infektion anderer Tiere durch die mögliche horizontale und vertikale Übertragung des Erregers

innerhalb der Herde und in andere Bestände.

Die derzeitige Strategie der EU für die aktive und passive Überwachung von Scrapie basiert auf der Untersuchung des ZNS mittels Schnelltest. Diese Studie zeigt, dass von den insgesamt 53 Schafen, bei denen PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte, 24,5 % (13 Schafe) nicht vom Schnelltest erfasst worden sind. Das sind bezogen auf die Anzahl untersuchter Schafe der Herde 7,7 %.

Somit schließt ein negatives Schnelltestergebnis die Akkumulation von PrP^{Sc} in peripheren Geweben nicht aus. Damit wird die aktuelle Prävalenz von Scrapie deutlich unterschätzt, wenn die Daten nur auf der Untersuchung des ZNS basieren. Denkbar wäre, Felduntersuchungen über den Anteil der unerkannt vorhandenen PrP^{Sc}-Träger in den Herden vorzunehmen, um diese Fehlquote besser einschätzen zu können.

Die zusätzliche Untersuchung zum Beispiel der Tonsillen in Kombination mit dem Schnelltest aus Obex-Gewebe hat den Nachweis von Scrapie in dieser Studie von 75,5 % auf 92,5 % gesteigert. Dies bestätigt die Ergebnisse von Monleón et al. (2005), die darlegen, dass die ergänzende Untersuchung lymphatischer Gewebe genauere Resultate bezüglich der Scrapie-Prävalenz liefert.

Die alleinige Untersuchung von lymphatischem Gewebe, wie Gonzalez et al. (2006) vorschlagen, ist nicht zu empfehlen, da Schafe mit klassischer Scrapie, die ein ARR-Allel tragen, PrP^{Sc} nicht im lymphatischen Gewebe akkumulieren (van Keulen et al. 1996; 2002; Andreatti et al. 2000; Jeffrey et al. 2002; Ersdal et al. 2005). Ebenso würden atypische Scrapie-Fälle übersehen werden, bei denen im lymphatischen Gewebe PrP^{Sc} ebenfalls nicht nachweisbar ist (Gavier-Widen et al. 2005).

5.3.6 Ante-mortem-Tests

Obwohl TSEn beim Menschen seltene Erkrankungen sind, verleiht der nachgewiesene Zusammenhang zwischen der neuen Variante von Creutzfeld-Jacob (vCJK) beim Menschen und Boviner Spongiformer Enzephalopathie (BSE) beim Rind (Bruce et al. 1997) durch die lange Inkubationszeit einer frühen präklinischen Diagnose hohe Priorität, um eine weitere Verbreitung der Krankheit zu minimieren. Dies gilt auch für die TSEn der kleinen Wiederkäuer - aus wirtschaftlichen Gründen wie auch angesichts des letztlich nicht auszuräumenden zoonotischen Risikos.

Schreuder et al. (1998) gelang es, PrP^{Sc} in Tonsillenbiopsaten nachzuweisen. O'Rourke et al. (2000; 2002) beschäftigten sich mit dem Nachweis von PrP^{Sc} in Lymphfollikeln der Nickhaut und Gonzalez et al. (2005; 2006) und Espenes et al. (2005) wiesen PrP^{Sc} in lymphatischen

Gewebe der Rektumschleimhaut nach. Auch hier ist aber zu beachten, dass nur ein positives Ergebnis aussagekräftig ist. Bei negativen Ergebnissen kann nicht ausgeschlossen werden, dass an anderer Stelle im Gewebe eine Reaktion erfolgt ist.

Nach den Daten dieser Studie scheinen Ante-mortem-Tests an Rektum- und Nickhaut-Proben nicht zuverlässig. Allerdings waren in dem Untersuchungsmaterial Rektum nicht ausreichend Lymphfollikel enthalten, um sie nach den Kriterien von Gonzalez und Espenes auswerten zu können. Außerdem waren in den Proben der beschriebenen Herde die positiven Reaktionen nur in Intramuralganglien des Rektums nachweisbar. Die Abwesenheit von detektierbarem PrP^{Sc} in den Rektumproben der Schafe muss also vorsichtig interpretiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass derartig auswertbare Biopate nicht einfach zu gewinnen sind.

Das Dritte Augenlid zeigte bei nur zwei Tieren positive Ergebnisse, und zwar bei beiden Schafen mit den meisten positiven Geweben (nämlich acht bzw. neun von je 13 untersuchten Geweben). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Verbreitung im Körper schon sehr ausgedehnt sein muss, bis das Dritte Augenlid erreicht wird, wenn die Infektion nicht über die Konjunktiven erfolgte. Somit wäre dieses Gewebe für eine Nutzung zu einer frühen präklinischen Diagnosestellung ungeeignet. Das widerspricht den Studien von O'Rourke et al. (2000; 2002) und Vargas et al. (2006), die Untersuchungen an Biopaten des Dritten Augenlides zur Scrapie-Diagnose durchführten und als geeignetes Material empfohlen haben.

Am zuverlässigsten scheint die Untersuchung der Tonsillen, da hier neun von 13 in der IHC positiv reagierten. Das bestätigt die Untersuchungen von Schreuder et al. (1998). Außerdem gehört die Tonsille als potenzielle Eintrittspforte zu den ersten Orten, an denen PrP^{Sc} nachgewiesen werden kann (van Keulen et al. 1996; 1999; 2002), anders als Rektum und Drittes Augenlid. Das zeigt den Informationswert dieser Probenqualität für eine frühe präklinische Ante-mortem-Diagnostik. Auch hier gilt jedoch, dass ein negativer Befund eine Infektion mit Scrapie nicht ausschließen kann. Zusätzlich kann die Gewinnung von Tonsillenmaterial schwierig sein.

5.4 Fazit

Die Daten zeigen, dass mittels einer Post-mortem-Untersuchung des Obex mittels Schnelltest, Schafe, die sich in der präklinischen Phase der Scrapie befinden, nicht vollständig erfasst werden. Die alleinige Untersuchung von Gehirnmateriale führt zu einer Unterschätzung der Scrapie-Prävalenz in einer Herde. Dagegen kann die Untersuchung von lymphatischen Geweben infizierte Tiere bereits im präklinischen Stadium der Erkrankung detektieren. Daher wäre eine Kombination beider Untersuchungsmaterialien für die Erhebung der exakten Prävalenz erfolgsversprechend, jedoch praktisch nicht realisierbar.

Die Eintrittspforten und die Verbreitung des Erregers im Tierkörper, die in anderen Studien dargelegt wurden, konnten weitgehend bestätigt werden.

Als geeignetes Probenmaterial für eine Ante-mortem-Untersuchung hat sich in dieser Studie die Tonsilla palatina herausgestellt. Weniger gute Ergebnisse brachte hier die Untersuchung des Rektums und des Dritten Augenlides.

6. Zusammenfassung

Aus einer natürlich mit Scrapie infizierten Herde standen Gewebeproben von sechs Ziegen und 169 Schafen mit empfänglichen Genotypen zur Verfügung, die auf das Vorhandensein des Scrapie-Erregers untersucht wurden. 40 Schafe zeigten bei der Untersuchung des Stammhirns mittels Schnelltest ein positives Ergebnis. Die 129 Schafe und sechs Ziegen, die im Stammhirn negativ waren, wurden in weiteren Geweben untersucht. Ziel der Untersuchung war einerseits, die Aussagekraft des Untersuchungsmaterials Obex für den TSE-Status des Tieres und andererseits, die tatsächliche Prävalenz von Scrapie in einer betroffenen Herde festzustellen. Außerdem sollten mit der Studie die möglichen Eintrittspforten, damit auch der Informationswert verschiedener Proben für eine Antemortem-Diagnostik und die Verteilung von PrP^{Sc} im Tierkörper dargelegt werden.

Die immunhistologischen Untersuchungen auf PrP^{Sc} wurden an Gewebeproben des Ileums, der NI. ileocolici sowie des NI. retropharyngeus lateralis, der Tonsilla palatina und der Membrana nictitans von allen 135 Tieren durchgeführt. Gelang der Nachweis von PrP^{Sc} in einem der genannten Gewebe, so wurden auch die weiteren vorhandenen Proben des Tieres untersucht (NI. cervicalis superficialis, Milz, Rektum, Plexus solaris, Ganglion cervicale craniale, Ganglion stellatum, Nervus vagus, Zunge).

Es zeigte sich, dass 13 (10 %) der 129 untersuchten Schafe trotz des negativen Schnelltestergebnisses aus der Obexregion bereits PrP^{Sc} in peripheren Geweben akkumuliert hatten. Von den insgesamt 53 Schafen, bei denen PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte, sind somit 13 Schafe (24,5 %) nicht vom Schnelltest erfasst worden. Das sind bezogen auf die Anzahl untersuchter Schafe der Herde 7,7 %.

Die am häufigsten positiven Organe waren die Tonsilla palatina und der NI. retropharyngeus lateralis mit je neun positiven Ergebnissen. Ileum, NI. cervicalis superficialis und Milz zeigten je acht positive Ergebnisse. Der Nachweis von PrP^{Sc} im peripheren Nervensystem (Plexus solaris) gelang in sechs Fällen. Alle sechs Schafe zeigten ebenfalls ein positives Ergebnis in der Immunhistochemie in den Intramuralganglien des Ileum, drei davon auch in den Intramuralganglien des Rektum. Das Gewebe mit der geringsten Anzahl positiver Ergebnisse war das Dritte Augenlid bei zwei Tieren.

Alle untersuchten Proben der sechs Ziegen waren negativ.

Diese Studie zeigt, dass durch eine Post-mortem-Untersuchung des Obex mittels Schnelltest, Schafe in der präklinischen Phase der Scrapie nicht vollständig erfassbar sind. Die Scrapie-Prävalenz wird also bei der alleinigen Untersuchung von Gehirnmateriale deutlich unterschätzt. Die Untersuchung von lymphatischen Geweben kann infizierte Tiere bereits in

der präklinischen Phase der Erkrankung detektieren. So wäre die Kombination beider Untersuchungsmaterialien für die Erhebung der tatsächlichen Prävalenz geeignet.

Die Eintrittspforten und die Verbreitung des Erregers im Tierkörper, die in anderen Studien dargelegt wurden, konnten weitgehend bestätigt werden.

Als aussagekräftiges Probenmaterial für eine Ante-mortem-Untersuchung hat sich in dieser Studie die Tonsilla palatina herausgestellt. Weniger gute Ergebnisse brachte hier die Untersuchung des Rektums und des Dritten Augenlides.

7. Summary

Immunohistochemical analysis for deposits of scrapie-prionprotein in ovine tissues

Six goats and 169 sheep carrying the genotype susceptible for PrP^{Sc} from a flock naturally infected with classical scrapie were culled and investigated for scrapie using a rapid test on brainstem material (obex). Forty sheep turned out to be TSE-positive.

The remaining 135 animals (with a negative test result in the obex region) were further investigated for the accumulation of PrP^{Sc} in selected lymphatic and neuronal tissue samples in order to reveal the actual prevalence in this affected flock and to assess the validity of the brain stem based rapid test result. Furthermore potential ports of entry of the agent and its spread throughout the body as well as the usefulness of certain tissues for an antemortem diagnosis were investigated.

The following tissues were investigated immunohistochemically from all 135 animals: ileum, ileocolic lymph node, retropharyngeal lymph node, tonsils and third eyelid.

If PrP^{Sc} in one of the above mentioned tissues was detected, other tissues were checked for the presence of PrP^{Sc} (superficial cervical lymph node, spleen, rectum, solar plexus, ganglion cervicale craniale, ganglion stellatum, vagus nerve and tongue).

In another 13 (10 %) out of 129 investigated sheep PrP^{Sc} was detected in peripheral tissues.

In total, 53 sheep tested positive for PrP^{Sc}. That means that 24,5 % (13 sheep) had not been detected using rapid test in the brain stem. Referring to the number of investigated sheep 7,7 % of them were positive.

The tissues producing positive results most frequently in this study were the tonsil and the retropharyngeal lymph node each with nine positive results, while ileum, superficial cervical lymph node and spleen were positive in eight sheep respectively.

In the solar plexus PrP^{Sc} was detected in six sheep which also showed PrP^{Sc} in the enteric nervous system of the ileum and three of them also of the rectum. Only two sheep were positive in the third eyelid.

All investigated tissues from the six goats tested negative.

In conclusion, this study shows that a negative result of the rapid test for brain stem samples does not exclude the presence of PrP^{Sc} in peripheral tissues. In consequence, the actual prevalence of scrapie is significantly underestimated when it is only based on brainstem samples. Moreover this study shows that lymphatic tissues such as the retropharyngeal lymph node and the tonsil are meaningful tissues for a closer investigation, if more

information about the TSE-state of an animal is of any interest.

In all, this study supports possible ports of entry as well as the postulates of a progress of PrP^{Sc} from the periphery to the CNS.

The results from third eyelid and rectum samples do not support the usefulness of antemortem tests using these tissues. But an investigation of the tonsils provides an opportunity for early diagnosis.

8. Literaturverzeichnis

8.1 Zitierte Literatur

Andreoletti, O., C. Lacroux, A. Chabert, L. Monnereau, G. Tabouret, F. Lantier, P. Berthon, F. Eychenne, S. Lafond-Benestad, J. M. Elsen, F. Schelcher (2002):
PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission.
J. Gen. Virol. **83**, 2607-2616

Andreoletti, O., P. Berthon, D. Marc, P. Sarradin, J. Grosclaude, L. van Keulen, F. Schelcher, J. M. Elsen, F. Lantier (2000):
Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie.
J. Gen. Virol. **81**, 3115-3126

Andreoletti, O., S. Simon, C. Lacroux, N. Morel, G. Tabouret, A. Chabert, S. Lugan, F. Corbiere, P. Ferre, G. Foucras, h. Laude, F. Eychenne, J. Grassi, F. Schelcher (2004):
PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie.
Nat. Med. **10**, 591-593

Andrews, A. H., R. Laven, J. G. Matthews (1992):
Clinical observations on four cases of scrapie in goats.
Vet. Rec. **130**, 101

Baldauf, E., M. Beekes, H. Diringier (1997):
Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord.
J. Gen. Virol. **78**, 1187-1197

Baron, T, A. G. Biacabe, J. N. Arzac, S. Benestad, M. H. Groschup (2007):
Atypical transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants.
Vaccine **25**, 5625-5630

Beekes, M., P. A. McBride, E. Baldauf (1998):
Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie.
J. Gen. Virol. **79**, 601-607

Behrens, H. (1979):
In: Lehrbuch der Schafkrankheiten.
Verlag Paul Parey, Berlin S. 34-36

Bendheim, P. E., H. R. Brown, R. D. Rudelli, L. J. Scala, N. L. Goller, G. Y. Wen, R. J. Kascsak, N. R. Cashman, D. C. Bolton (1992):
Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein.
Neurology **42**, 149-156

Benestad, S.L., P. Sarradin, B. Thu, J. Schonheit, M. A. Tranulis, B. Bratberg (2003):
Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98.
Vet. Rec. **153**, 202-208

Billinis C., C. H. Panagiotidis, V. Psychas, S. Argyroudou, A. Nicolaou, S. Leontides, O. Papadopoulos, T. Sklaviadis (2002):
Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie.
J. Gen. Virol. **83**, 713-721

Blättler, T., S. Brandner, A. J. Raeber, M. A. Klein, T. Voigtlander, C. Weissmann, A. Aguzzi (1997):
PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain.
Nature **389**, 69-73

Bossers A, R. de Vries, M. A. Smits (2000):
Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP.
J. Virol. **74**, 1407-1414

Brandner, S., A. Raeber, A. Sailer, T. Blättler, M. Fischer, C. Weissmann, A. Aguzzi (1996):
Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **93**, 13148–13151

Braun, U., E. Schicker, N. Pusterla, M. Schönmann (1998):
Klinische Befunde bei 50 Kühen mit boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE)
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **111**, 27-32

Brotherston, J. G., C. C. Renwick, J. T. Stamp, I. Zlotnik, I. H. Pattison (1968):
Spread of scrapie by contact to goats and sheep.
J. Comp. Pathol. **78**, 9-17

Brown, D. R., K. Qin, J. W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P. E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway, H. Kretzschmar (1997):
The cellular prion protein binds copper in vivo.
Nature **390**, 684-687

Brown, K. L., K. Stewart, D. Ritchie, H. Fraser, W. I. Morrison, M. E. Bruce (2000):
Follicular dendritic cells in scrapie pathogenesis.
Arch. Virol. Suppl. **16**, 13-21

Brown, P., A. Wolff, D. C. Gajdusek (1990):
A simple and effective method for inactivating virus infectivity in formalin-fixed tissue samples from patients with Creutzfeldt-Jakob disease.
Neurology **40**, 887-890

Brown, P., D. C. Gajdusek (1991):
Survival of scrapie virus after 3 years' interment.
Lancet **337**, 269-270

Brown, P., J. P. Brandel, M. Preece, T. Sato (2006):
Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: the waning of an era.
Neurology **67**, 389-393

Brown, P., P. P. Liberski, A. Wolff, D. C. Gajdusek (1990):
Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications.
J. Infect. Dis. **161**, 467-472

Bruce, M. (1993):
Scrapie strain variation and mutation.
Br. Med. Bull. **49**, 822-838

- Bruce, M. E. (2003):
TSE strain variation.
Br. Med. Bull. **66**, 99-108
- Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser, C. J. Bostock (1997):
Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent.
Nature **389**, 498-501
- Bruce, M., A. Chree, I. McConnell, J. Foster, G. Pearson, H. Fraser (1994):
Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier.
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **343**, 405-411
- Büler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, C. Weissmann (1993):
Mice devoid of PrP are resistant to scrapie.
Cell **73**, 1339-1347
- Büler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, C. Weissmann (1992):
Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein.
Nature **356**, 577-582
- Buschmann A., G. Lühken, J. Schultz, G. Erhardt, M. H. Groschup (2004b):
Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR).
J. Gen. Virol. **85**, 2727-2733
- Buschmann, A., A. G. Biacabe, U. Ziegler, A. Bencsik, J. Y. Madec, G. Erhardt, G. Lühken, T. Baron, M. H. Groschup (2004a):
Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests.
J. Virol. Methods. **117**, 27-36
- Buschmann, A., A. Gretzschel, A. G. Biacabe, K. Schiebel, C. Corona, C. Hoffmann, M. Eiden, T. Baron, C. Casalone, M. H. Groschup (2006):
Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization.
Vet. Microbiol. **117**, 103-116
- Buschmann, A., M. H. Groschup (2005):
TSE eradication in small ruminants--quo vadis?
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **118**, 365-371
- Buschmann, A., M. H. Groschup (2010):
Persönliche Mitteilung
- Capucchio, M. T., F. Guarda, M. C. Isaia, S. Caracappa, V. Di Marco (1998):
Natural occurrence of scrapie in goats in Italy.
Vet. Rec. **143**, 452-453
- Capucchio, M. T., F. Guarda, N. Pozzato, S. Coppolino, S. Caracappa, V. Di Marco (2001):
Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: a comparative study in sheep and goats.
J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med. **48**, 23-31

Caramelli, M., G. Ru, C. Casalone, E. Bozzetta, P. L. Acutis, A. Calella, G. Forloni (2001): Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*.
Vet. Rec. **148**, 531-536

Casalone, C., C. Corona, M. I. Crescio, F. Martucci, M. Mazza, G. Ru, E. Bozzetta, P. L. Acutis, M. Caramelli (2005): Pathological prion protein in the tongues of sheep infected with naturally occurring scrapie.
J. Virol. **79**, 5847-5849

Casalone, C., G. Zanusso, P. Acutis, S. Ferrari, L. Capucci, F. Tagliavini, S. Monaco, M. Caramelli (2004): Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **101**, 3065-3070

Castilla, J., P- Saa, C. Soto (2005): Detection of prions in blood.
Nat. Med. **11**, 982-985

Caughey, B. W., A. Dong, K. S. Bhat, D. Ernst, S. F. Hayes, W. S. Caughey (1991): Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy.
Biochemistry **30**, 7672-7680

Caughey, B., G. J. Raymond, S. A. Priola, D. A. Kocisko, R. E. Race, R. A. Bessen, P. T. Lansbury Jr, B. Chesebro (1999): Methods for studying prion protein (PrP) metabolism and the formation of protease-resistant PrP in cell culture and cell-free systems. An update.
Mol. Biotechnol. **13**, 45-55

Chandler, R.L. (1961): Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material.
Lancet **24**, 1378-1379

Chelle, P.L. (1942): A case of trembling in the goat
Bull. Acad. Vet. Fr. **15**, 294-295

Chesebro, B., R. Race, K. Wehrly, J. Nishio, M. Bloom, D. Lechner, S. Bergstrom, K. Robbins, L. Mayer, J. M. Keith (1985): Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain.
Nature **315**, 331-333

Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke, J. G. Jefferys (1994): Prion protein is necessary for normal synaptic function.
Nature **370**, 295-297

Cooley, W. A., J. K. Clark, S. J. Ryder, L. A. Davis, S. S. Farrelly, M. J. Stack (2001): Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in the UK.
J. Comp. Pathol. **125**, 64-70

- Corona, C., C. Casalone, P. L. Acutis, M. I. Crescio, F. Martucci, B. Iulini, C. L. Florio, P. Gazzuola, G. Perfetti, C. Bona, G. Ru, M. Caramelli (2006):
Detection of pathological prion protein in the tongue of sheep infected with naturally occurring scrapie.
Vet. Res. Commun. **30**, 239-240
- Creutzfeld, H. G. (1920):
Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems.
Z. Neurol. Psychiatr. **57**, 1-18
- Cuillé, J., P. L. Chelle (1936):
La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?
C. R. Acad. Sci. Paris **203**, 1552-1554
- Cuillé, J., P. L. Chelle (1938):
La tremblante du mouton est bien inoculable.
C. R. Acad. Sci. Paris **206**, 78-79
- D'Angelo, A., C. Maurella, C. Bona, A. Borrelli, M. Caramelli, M. Elena Careddu, A. Jaggy, G. Ru (2007):
Assessment of clinical criteria to diagnose scrapie in Italy.
Vet. J. **174**, 106-112
- Department for Environment, Food and rural Affairs (DEFRA) (2005):
NSP Genotypes Table.
<http://www.defra.gov.uk>
- Deslys, J. P., J. Grassi (2005):
Test de dépistage de ESST animales: présent et futur
Pathol. Biol. (Paris) **53**, 221-228
- Detwiler, L. A., M. Baylis (2003):
The epidemiology of scrapie.
Rev. Sci. Tech. **22**, 121-143
- Dickinson, A. G., G. W. Outram (1988):
Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis.
Ciba. Found. Symp. **135**, 63-83
- Dickinson, A. G., J. T. Stamp, C. C. Renwick (1974):
Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep.
J. Comp. Pathol. **84**, 19-25
- Dickinson, A. G., V. M. Meikle, H. Fraser (1968):
Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice.
J. Comp. Pathol. **78**, 293-299
- Diringer, H., H. Hilmert, D. Simon, E. Werner, B. Ehlers (1983):
Towards purification of the scrapie agent.
Eur. J. Biochem. **134**, 555-560
- Diringer, H., M. Beekes, U. Oberdieck (1994):
The nature of the scrapie agent: the virus theory.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **724**, 246-258

Doherr, M. G., N. Hunter (2001):

Die Scrapie-Bekämpfung: international empfohlene Maßnahmen.

In: Hörnlimann, B., D. Riesner und H. Kretzschmar: Prionen und Prionkrankheiten.

De Gruyter Verlag, Berlin, New York, S. 497-501

Duffy, P., J. Wolf, G. Collins, A. G. DeVoe, B. Streeten, D. Cowen (1974):

Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease.

N. Engl. J. Med. **290**, 692-693

Eddy, R. G. (1995):

Origin of BSE.

Vet. Rec. **137**, 648

Eiden M., C. Hoffmann, A. Balkema-Buschmann, M. Müller, K. Baumgartner, M. H. Groschup (2010):

Biochemical and immunohistochemical characterization of feline spongiform encephalopathy in a German captive cheetah.

J. Gen. Virol. **91**, 2874-2883

Eklund, C. M., R. C. Kennedy, W. J. Hadlow (1967):

Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse.

J. Infect. Dis. **117**, 15-22

Eloit, M., K. Adjou, M. Couplier, J. J. Fontaine, R. Hamel, T. Lilin, S. Messiaen, O.

Andreoletti, T. Baron, A. Bencsik, A. G. Biacabe, V. Beringue, H. Laude, A. Le Dur, J. L.

Vilotte, E. Comoy, J. P. Deslys, J. Grassi, S. Simon, F. Lantier, P. Sarradin (2005):

BSE agent signatures in a goat.

Vet. Rec. **156**, 523-524

Elsen, J.M., Y. Amigues, F. Schelcher, V. Ducrocq, O. Andreoletti, F. Eychenne, J. V.

Khang, J. P. Poivey, F. Lantier, J. L. Laplanche (1999):

Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov.

Arch. Virol. **144**, 431-445

Epstein, V., S. Pointing, S. Halfacre (2005):

Atypical scrapie in the Falkland Islands.

Vet. Rec. **157**, 667-668

Ersdal, C., M. J. Ulvund, A. Espenes, S. L. Benestad, P. Sarradin, T. Landsverk (2005):

Mapping PrP^{Sc} propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes.

Vet. Pathol. **42**, 258-274

Ersdal, C., M. J. Ulvund, S. L. Benestad, M. A. Tranulis (2003):

Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie.

Vet. Pathol. **40**, 164-174

Espenes, A., C. M. Press, T. Landsverk, M. A. Tranulis, M. Aleksandersen, G. Gunnes, S. L. Benestad, R. Fuglestveit, M. J. Ulvund (2006):

Detection of PrP(Sc) in Rectal Biopsy and Necropsy Samples from Sheep with Experimental Scrapie.

J. Comp. Pathol. **134**, 115-125

- Fankhauser, R., M. Vandeveld, R. Zwahlen (1982):
Scrapie in Switzerland?
Schweiz. Arch. Tierheilkd. **124**, 227-232
- Foster, J. D., D. Parnham, A. Chong, W. Goldmann, N. Hunter (2001):
Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats
Vet. Rec. **148**, 165-171
- Foster, J. D., J. Hope, H. Fraser (1993):
Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats.
Vet. Rec. **133**, 339-341
- Fraser, H. (1976):
The pathology of a natural and experimental scrapie.
Front. Biol. **44**, 267-305
- Fraser, H., A. G. Dickinson (1968):
The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice.
J. Comp. Pathol. **78**, 301-311
- Fraser, H., M. E. Bruce, A. Chree, I. McConnell, G. A. Wells (1992):
Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice.
J. Gen. Virol. **73**, 1891-1897
- Gajdusek, D. C., V. Zigas (1957):
Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of "kuru" in the native population.
N. Engl. J. Med. **257**, 974-978
- Garssen, G. J., L. J. Van Keulen, C. F. Farquhar, M. A. Smits, J. G. Jacobs, A. Bossers, R. H. Melen, J. P. Langeveld (2000):
Applicability of three anti-PrP peptide sera including staining of tonsils and brainstem of sheep with scrapie.
Microsc. Res. Tech. **50**, 32-39
- Gavier-Widen, D., M. J. Stack, T. Baron, A. Balachandran, M. Simmons (2005):
Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review.
J. Vet. Diagn. Invest. **17**, 509-527
- Gernand, E., H. Lenz, U. Moog, R. Waßmuth (2005):
Untersuchung von Assoziationen zwischen dem Prion-Protein-Gen und Leistungseigenschaften beim Schaf an Stations- und Felddaten.
Arch. Tierz., Dummerdorf **48**, 383-395
- Gerstmann, J., E. Sträussler, I. Scheinker (1936):
Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen Alterns.
Z. Neurol. Psychiatr. **154**, 736-776
- GoatBSE (European goatBSE project) (2009):
Scrapie der Ziege – Aktueller Überblick zur Situation in Europa
<http://www.goatbse.eu>

- Goldmann, W., N. Hunter, G. Benson, J. D. Foster, J. Hope (1991):
Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene.
J. Gen. Virol. **72**, 2411-2417
- Goldmann, W., N. Hunter, G. Smith, J. Foster, J. Hope (1994):
PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie.
J. Gen. Virol. **75**, 989-995
- Goldmann, W., N. Hunter, J. D. Foster, J. M. Salbaum, K. Beyreuther, J. Hope (1990):
Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 2476-2480
- Goldmann, W., T. Martin, J. Foster, S. Hughes, G. Smith, K. Hughes, M. Dawson, N. Hunter (1996):
Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period.
J. Gen. Virol. **77**, 2885-2891
- Gonzalez, L., M. Jeffrey, S. Siso, S. Martin, S. J. Bellworthy, M. J. Stack, M. J. Chaplin, L. Davis, M. P. Dagleish, H. W. Reid (2005):
Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa.
Vet. Rec. **156**, 846-847
- Gonzalez, L., M. P. Dagleish, S. J. Bellworthy, S. Siso, M. J. Stack, M. J. Chaplin, L. A. Davis, S. A. Hawkins, J. Hughes, M. Jeffrey (2006):
Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa.
Vet. Rec. **158**, 325
- Grassi, J. (2003):
Pre-clinical diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies using rapid tests.
Transfus. Clin. Biol. **10**, 19-22
- Gretzschel, A., A. Buschmann, M. Eiden, U. Ziegler, G. Luhken, G. Erhardt, M. H. Groschup (2005):
Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods.
J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health **52**, 55-63
- Groschup, M. H., C. Lacroux, A. Buschmann, G. Lühken, J. Mathey, M. Eiden, S. Lugan, C. Hoffmann, J. C. Espinosa, T. Baron, J. M. Torres, G. Erhardt, O. Andreoletti (2007):
Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France.
Emerg. Infect. Dis. **13**, 1201-1207
- Hadlow, W. J. (1959):
Scrapie and kuru.
Lancet **2**, 289-290
- Hadlow, W. J., R. C. Kennedy, R. E. Race (1982):
Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus.
J. Infect. Dis. **146**, 657-664

- Hadlow, W. J., R. C. Kennedy, R. E. Race, C. M. Eklund (1980):
Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural scrapie.
Vet. Pathol. **17**, 187-199
- Hagenaars, T. J., C. A. Donnelly, N. M. Ferguson, R. M. Anderson (2003):
Dynamics of a scrapie outbreak in a flock of Romanov sheep-estimation of transmission parameters.
Epidemiol. Infect. **131**, 1015-1022
- Harcourt, R. A. (1974):
Naturally-occurring scrapie in goats.
Vet. Rec. **94**, 504
- Hardt, M., T. Baron, M. H. Groschup (2000):
A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies.
J. Comp. Pathol. **122**, 43-53
- Harmeyer, S., E. Pfaff, M. H. Groschup (1998):
Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants.
J. Gen. Virol. **79**, 937-945
- Hartsough, G. R., D. Burger (1965):
Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations.
J. Infect. Dis. **115**, 387-392
- Hartung J., H. Zimmermann, U. Johannsen (1970)
Infektiöse Enzephalopathie beim Nerz. 1. Mitteilung: Klinisch-epizootiologische und experimentelle Untersuchungen.
Monatsh. Veterinärmed. **25**, 385-388
- Healy, A. M., E. Weavers, M. McElroy, M. Gomez-Parada, J. D. Collins, E. O'Doherty, T. Sweeney, M. L. Doherty (2003):
The clinical neurology of scrapie in Irish sheep.
J. Vet. Intern. Med. **17**, 908-916
- Heggebo, R., C. M. Press, G. Gunnes, K. I. Lie, M. A. Tranulis, M. Ulvund, M. H. Groschup, T. Landsverk (2000):
Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent.
J. Gen. Virol. **81**, 2327-37
- Heggebo, R., C. M. Press, G. Gunnes, L. Gonzalez, M. Jeffrey (2002):
Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep.
J. Gen. Virol. **83**, 479-489
- Heikenwalder, M., N. Zeller, H. Seeger, M. Prinz, P. C. Klohn, P. Schwarz, N. H. Ruddle, C. Weissmann, A. Aguzzi (2005):
Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions.
Science **307**, 1107-1110

Heppner, F. L., A. D. Christ, M. A. Klein, M. Prinz, M. Fried, J. P. Kraehenbuhl, A. Aguzzi (2001):

Transepithelial prion transport by M cells.
Nat. Med. **7**, 976-977

Hiepe, T., V. Bergmann, R. Jungmann (1973):

Beitrag zur klinischen und pathomorphologischen Diagnostik der Traberkrankheit des Schafes - Vorläufige Mitteilung.
Monatsh. Veterinärmed. **28**, 905-907

Hill, A. F., J. Collinge (2003):

Subclinical prion infection in humans and animals.
Br. Med. Bull. **66**, 161-170

Hill, A. F., J. Collinge (2003):

Subclinical prion infection.
Trends Microbiol. **11**, 578-584

Hoinville, L. J. (1996):

A review of the epidemiology of scrapie in sheep.
Rev. Sci. Tech. **15**, 827-852

Hope, J., L. J. Morton, C. F. Farquhar, G. Multhaup, K. Beyreuther, R. H. Kimberlin (1986):

The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP).
EMBO J. **5**, 2591-2597

Horiuchi, M., N. Yamazaki, T. Ikeda, N. Ishiguro, M. Shinagawa (1995):

A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep.
J. Gen. Virol. **76**, 2583-2587

Hörnlimann, B., A. Leutwiler, R. C. Oberthür, H.-R. Widmer (2001a):

Die chemische Desinfektion und Inaktivierung von Prionen.
In: Hörnlimann, B., D. Riesner und H. Kretzschmar: Prionen und Prionkrankheiten.
De Gruyter Verlag, Berlin, New York, S. 381-388

Hörnlimann, B., M. G. Doherr, M. H. Groschup (2001b):

Die Überwachung der Prionkrankheiten des Tieres.
In: Hörnlimann, B., D. Riesner und H. Kretzschmar: Prionen und Prionkrankheiten.
De Gruyter Verlag, Berlin, New York, S. 272-276

Hourrigan, J. L., A. L. Klingsporn, H. A. McDaniel, M. N. Riemenschneider (1969):

Natural scrapie in a goat.
J. Am. Vet. Med. Assoc. **154**, 538-539

Houston, E. F., S. I. Halliday, M. Jeffrey, W. Goldmann, N. Hunter (2002):

New Zealand sheep with scrapie-susceptible PrP genotypes succumb to experimental challenge with a sheep-passaged scrapie isolate (SSBP/1).
J Gen Virol. **83**, 1247-1250

Houston, F., J. D. Foster, A. Chong, N. Hunter, C. J. Bostock (2000):

Transmission of BSE by blood transfusion in sheep.
Lancet **356**, 999-1000

Houston, F., W. Goldmann, A. Chong, M. Jeffrey, L. Gonzalez, J. Foster, D. Parnham, N. Hunter (2003):
Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection.
Nature **423**, 498

Hunter, N. (1997):
PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE.
Trends Microbiol. **5**, 331-334

Hunter, N., J. Foster, A. Chong, S. McCutcheon, D. Parnham, S. Eaton, C. MacKenzie, F. Houston (2002):
Transmission of prion diseases by blood transfusion.
J Gen Virol. **83**, 2897-2905

Hunter, N., L. Moore, B. D. Hosie, W. S. Dingwall, A. Greig (1997):
Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland.
Vet. Rec. **140**, 59-63

Hunter, N., W. Goldmann, G. Smith, J. Hope (1994):
The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie.
Arch. Virol. **137**, 171-177

Hunter, N., W. Goldmann, J. D. Foster, D. Cairns, G. Smith (1997):
Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep.
Vet Rec. **141**, 137-140

Ikeda, T., M. Horiuchi, N. Ishiguro, Y. Muramatsu, G. D. Kai-Uwe, M. Shinagawa (1995):
Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan.
J. Gen. Virol. **76**, 2577-2581

Ingrosso, L., F. Pisani, M. Pocchiari (1999):
Transmission of the 263K scrapie strain by the dental route.
J. Gen. Virol. **80**, 3043-3047

Jakob, A. (1921):
Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (Spastische Pseudosklerose – Encephalomyopathie mit disseminierten Degenerationsherden).
Z. Neurol. Psychiatr. **64**, 147-228

Jeffrey, M., G. McGovern, S. Martin, C. M. Goodsir, K. L. Brown (2000):
Cellular and sub-cellular localisation of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep.
Arch. Virol. Suppl. **16**, 23-38

Jeffrey, M., I. Begara-McGorum, S. Clark, S. Martin, J. Clark, M. Chaplin, L. Gonzalez (2002):
Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland.
J. Comp. Pathol. **127**, 264-273

Jeffrey, M., L. Gonzalez, A. Chong, J. Foster, W. Goldmann, N. Hunter, S. Martin (2006):
Ovine infection with the agents of scrapie (CH1641 isolate) and bovine spongiform
encephalopathy: immunochemical similarities can be resolved by immunohistochemistry.
J. Comp. Pathol. **134**, 17-29

Jeffrey, M., L. Gonzalez, A. Espenes, C. Press, S. Martin, M. Chaplin, L. Davis, T.
Landsverk, C. Macaldowie, S. Eaton, G. McGovern (2006):
Transportation of prion protein across the intestinal mucosa of scrapie-susceptible and
scrapie-resistant sheep.
J. Pathol. **209**, 4-14

Jeffrey, M., S. Martin, J. Barr, A. Chong, J. R. Fraser (2001)
Onset of accumulation of PrPres in murine ME7 scrapie in relation to pathological and PrP
immunohistochemical changes.
J. Comp. Pathol. **124**, 20-28

Jeffrey, M., S. Martin, J. R. Thomson, W. S. Dingwall, I. Begara-McGorum, L. Gonzalez
(2001):
Onset and distribution of tissue prp accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as
demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies.
J. Comp. Pathol. **125**, 48-57

Jeffrey, M., S. Martin, L. Gonzalez, J. Foster, J. P. Langeveld, F. G. van Zijderveld, J.
Grassi, N. Hunter (2006):
Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat
transmissible spongiform encephalopathies.
J Comp Pathol. **134**, 171-181

Jeffrey, M., S. Ryder, S. Martin, S. A. Hawkins, L. Terry, C. Berthelin-Baker, S. J. Bellworthy
(2001):
Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1.
Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera.
J. Comp. Pathol. **124**, 280-289

Jones, B. D., N. Ghori, S. Falkow (1994):
Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the
specialized epithelial M cells of the Peyer's patches.
J. Exp. Med. **180**, 15-23

Kirkwood, J. K., A. A. Cunningham (1994):
Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the
British Isles.
Vet. Rec. **135**, 296-303

Kirkwood, J. K., A. A. Cunningham, G. A. Wells, J. W. Wilesmith, J. E. Barnett (1993):
Spongiform encephalopathy in a herd of greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*):
epidemiological observations.
Vet. Rec. **133**, 360-364

Kirkwood, J. K., G. A. Wells, J. W. Wilesmith, A. A. Cunningham, S. I. Jackson (1990):
Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu
(*Tragelaphus strepsiceros*).
Vet. Rec. **127**, 418-420

- Koch, T. K., B. O. Berg, S. J. De Armond, R. F. Gravina (1985):
Creutzfeldt-Jakob disease in a young adult with idiopathic hypopituitarism. Possible relation to the administration of cadaveric human growth hormone.
N. Engl. J. Med. **313**, 731-733
- Kocisko, D. A., J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury, B. Caughey (1994):
Cell-free formation of protease-resistant prion protein.
Nature **370**, 471-474
- Kümper, H. (1994):
Scrapie aus klinischer Sicht.
Tierärztl. Prax. **22**, 115-120
- Lacroux, C., F. Corbiere, G. Tabouret, S. Lugan, P. Costes, J. Mathey, J. M. Delmas, J. L. Weisbecker, G. Foucras, H. Cassard, J. M. Elsen, F. Schelcher, O. Andreoletti (2007):
Dynamics and genetics of PrPSc placental accumulation in sheep.
J. Gen. Virol. **88**, 1056-1061
- Lasmezas, C. I., J. P. Deslys, O. Robain, A. Jaegly, V. Beringue, J. M. Peyrin, J. G. Fournier, J. J. Hauw, J. Rossier, D. Dormont (1997):
Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein.
Science **275**, 402-405
- Lasmezas, C. I., J. P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, F. Lamoury, D. Dormont, O. Robain, J. Ironside, J. J. Hauw (1996):
BSE transmission to macaques.
Nature **381**, 743-744
- Leggett, M. M., J. Dukes, H. M. Pirie (1990):
A spongiform encephalopathy in a cat.
Vet Rec. **127**, 586-588
- Lehmann, S., D. A. Harris (1995):
A mutant prion protein displays an aberrant membrane association when expressed in cultured cells.
J Biol Chem. **270**, 24589-24597
- Leontides, S., V. Psychas, S. Argyroudis, A. Giannati-Stefanou, E. Paschaleri-Papadopoulou, T. Manousis, T. Sklaviadis (2000):
A survey of more than 11 years of neurologic diseases of ruminants with special reference to transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in Greece.
J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health **47**, 303-309
- Lezmi, S., A. Bencsik, E. Monks, T. Petit, T. Baron (2003):
First case of feline spongiform encephalopathy in a captive cheetah born in France: PrP(sc) analysis in various tissues revealed unexpected targeting of kidney and adrenal gland.
Histochem. Cell Biol. **119**, 415-422
- Ligos, C., C. J. Sigurdson, C. Santucci, G. Carcassola, G. Manco, M. Basagni, C. Maestrale, M. G. Cancedda, L. Madau, A. Aguzzi (2005):
PrPSc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis.
Nat Med. **11**, 1137-1138

Llewelyn, C. A., P. E. Hewitt, R. S. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie, R. G. Will (2004):

Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion.
Lancet **363**, 417-421

Lugaresi, E., P. Montagna, A. Baruzzi, P. Cortelli, P. Tinuper, M. Zucconi, P. L. Gambetti, R. Medori (1986):

Familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease.
Rev. Neurol. **142**, 791-792

Lühken, G., A. Buschmann, H. Brandt, M. Eiden, M. H. Groschup, G. Erhardt (2007):
Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases.
Vet. Res. **38**, 65-80

Mabbott, N. A., C. F. Farquhar, K. L. Brown, M. E. Bruce (1998):

Involvement of the immune system in TSE pathogenesis.
Immunol. Today. **19**, 201-203

Mabbott, N. A., G. G. MacPherson (2006):

Prions and their lethal journey to the brain.
Nat. Rev. Microbiol. **4**, 201-211

Manuelidis, L. (1994):

Dementias, neurodegeneration, and viral mechanisms of disease from the perspective of human transmissible encephalopathies.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **724**, 259-281

Marsh, R. F., R. A. Bessen (1993):

Epidemiologic and experimental studies on transmissible mink encephalopathy.
Dev. Biol. Stand. **80**, 111-118

Maurer, E., C. Botteron, F. Ehrensperger, R. Fatzer, A. Jaggy, C. Kolly, M. Meylan, A.

Zurbriggen, M. G. Doherr (2005):

Scrapie-Überwachung in der Schweiz. I. Klinische Aspekte von neurologischen Erkrankungen bei Schaf und Ziege.
Schweiz. Arch. Tierheilkd. **147**, 425-433

McBride, P. A., W. J. Schulz-Schaeffer, M. Donaldson, M. Bruce, H. Diringer, H. A.

Kretzschmar, M. Beekes (2001):

Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves.
J. Virol. **75**, 9320-9327

McBride, P. A., P. Eikelenboom, G. Kraal, H. Fraser, M. E. Bruce (1992):

PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice.
J. Pathol. **168**, 413-418

McGowan, J. P. (1922)

Scrapie in Sheep

Scottish J. Agric. **5**, 365-375

Miller, J. M., A. L. Jenny, W. D. Taylor, R. F. Marsh, R. Rubenstein, R. E. Race (1993):

Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie.
J. Vet. Diagn. Invest. **5**, 309-316

- Monleon, E., M. Monzon, P. Hortells, R. Bolea, C. Acin, F. Vargas, J. J. Badiola (2005):
Approaches to Scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on
central nervous and lymphoreticular systems.
J. Virol. Methods **125**, 165-171
- Moore, R. C., J. Hope, P. A. McBride, I. McConnell, J. Selfridge, D. W. Melton, J. C. Manson
(1998):
Mice with gene targetted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are
congruent.
Nat. Genet. **18**, 118-125
- Morgan, K. L., K. Nicholas, M. J. Glover, A. P. Hall (1990):
A questionnaire survey of the prevalence of scrapie in sheep in Britain.
Vet. Rec. **127**, 373-376
- Neutra, M. R., A. Frey, J. P. Kraehenbuhl (1996):
Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization.
Cell **86**, 345-348
- Noll, S., S. Schaub-Kuhnen (2000):
In: Höfler, H., K.-M. Müller: *Praxis der Immunhistochemie.*
Urban & Fischer Verlag, München, Jena, S. 17, 70-72
- Oberthür, R. C. (2001):
Die Inaktivierung von Prionen durch Hitze.
In: Hörnlimann, B., D. Riesner und H. Kretzschmar: *Prionen und Prionkrankheiten.*
De Gruyter Verlag, Berlin, New York, S. 389-398
- Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry,
P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood (1985):
A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein.
Cell **40**, 735-746
- OIE (Office International des Epizooties) (2002):
Multiannual animal disease status.
http://www.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=61&c_mald=56
- OIE (Office International des Epizooties) (2004):
Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00074.htm
- Onodera, T., T. Ikeda, Y. Muramatsu, M. Shinagawa (1993):
Isolation of scrapie agent from the placenta of sheep with natural scrapie in Japan.
Microbiol. Immunol. **37**, 311-316
- Orge, L., A. Galo, C. Machado, C. Lima, C. Ochoa, J. Silva, M. Ramos, J. P. Simas (2004):
Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal
J. Gen. Virol. **85**, 3487-3491
- O'Rourke, K. I., J. V. Duncan, J. R. Logan, A. K. Anderson, D. K. Norden, E. S. Williams, B.
A. Combs, R. H. Stobart, G. E. Moss, D. L. Sutton (2002):
Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of
flocks of sheep in Wyoming.
Clin. Diagn. Lab. Immunol. **9**, 966-971

- O'Rourke, K. I., T. V. Baszler, T. E. Besser, J. M. Miller, R. C. Cutlip, G. A. Wells, S. J. Ryder, S. M. Parish, A. N. Hamir, N. E. Cockett, A. Jenny, D. P. Knowles (2000):
Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue.
J. Clin. Microbiol. **38**, 3254-3259
- Pan, K. M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen (1993):
Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **90**, 10962-10966
- Papasavva-Stylianou P., M. Kleanthous, P. Toumazos, P. Mavrikiou, P. Loucaides (2007):
Novel polymorphisms at codons 146 and 151 in the prion protein gene of Cyprus goats, and their association with natural scrapie.
Vet. J. **173**, 459-462
- Pattison, I. H., G. C. Millson (1960):
Further observations on the experimental production of scrapie in goats and sheep.
J. Comp. Pathol. **70**, 182-193
- Pattison, I. H., G. C. Millson (1962):
Distribution of the scrapie agent in the tissues of experimentally inoculated goats.
J. Comp. Pathol. **72**, 233-244
- Pattison, I. H., M. N. Hoare, J. N. Jebbett, W. A. Watson (1972):
Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep.
Vet. Rec. **90**, 465-468
- Peden, A. H., M. W. Head, D. L. Ritchie, J. E. Bell, J. W. Ironside (2004):
Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient.
Lancet **364**, 527-529
- Press, C. M., R. Heggebo, A. Espenes (2004):
Involvement of gut-associated lymphoid tissue of ruminants in the spread of transmissible spongiform encephalopathies.
Adv. Drug Deliv. Rev. **56**, 885-899
- Prusiner, S. B. (1982):
Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.
Science **216**, 136-144
- Prusiner, S. B. (1991):
Molecular biology of prion diseases.
Science **252**, 1515-1522
- Prusiner, S. B. (1998):
Prions.
Proc Natl Acad Sci U S A. **95**, 13363-13383
- Prusiner, S. B., D. C. Bolton, D. F. Groth, K. A. Bowman, S. P. Cochran, M. P. McKinley (1982):
Further purification and characterization of scrapie prions.
Biochemistry. **21**, 6942-6950

Race, R., A. Jenny, D. Sutton (1998):
Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen,
and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis.
J. Infect. Dis. **178**, 949-953

Race, R., B. Chesebro (1998):
Scrapie infectivity found in resistant species.
Nature **392**, 770

Raeber, A. J., A. Aguzzi (2001):
Die Prävention von Prionenkrankheiten im Forschungslabor.
In: Hörnlimann, B., D. Riesner und H. Kretzschmar: Prionen und Prionkrankheiten.
De Gruyter Verlag, Berlin, New York, S. 427-431

Robinson, M. M. (1996):
Transmissible encephalopathies and biopharmaceutical production.
Dev. Biol. Stand. **88**, 237-241

Romeis, B. (1989):
In: Mikroskopische Technik.
Urban & Schwarzberg, München, Wien, Baltimore, S. 215, 235, 441, 651-652

Saá, P., J. Castilla, C. Soto (2006):
Presymptomatic detection of prions in blood.
Science **313**, 92-94

Saborio, G. P., B. Permanne, C. Soto (2001):
Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding.
Nature **411**, 810-813

Sales, N. (2006):
What can we learn from the oral intake of prions by sheep?
J. Pathol. **209**, 1-3

Schaller, O., R. Fatzer, M. Stack, J. Clark, W. Cooley, K. Biffiger, S. Egli, M. Doherr, M.
Vandeveld, D. Heim, B. Oesch, M. Moser (1999):
Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use
as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy
(BSE).
Acta. Neuropathol. (Berl). **98**, 437-443

Schneider, K., H. Fangerau, W. H. Raab (2007):
Die frühe Geschichte der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien am Beispiel der
Traberkrankheit (Scrapie).
Nervenarzt **78**, 156-165

Schreuder, B. E., L. J. van Keulen, M. E. Vromans, J. P. Langeveld, M. A. Smits (1998):
Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie.
Vet. Rec. **142**, 564-568

Schreuder, B. E., L. J. van Keulen, M. E. Vromans, J. P. Langeveld, M. A. Smits (1996):
Preclinical test for prion diseases.
Nature **381**, 563

Schreuder, B. E., M. C. de Jong, J. J. Pekelder, P. Vellema, A. J. Broker, H. Betcke (1993):
Prevalence and incidence of scrapie in The Netherlands: a questionnaire survey.
Vet Rec. **133**, 211-214

Scott, J. R., J. D. Foster, H. Fraser (1993):
Conjunctival instillation of scrapie in mice can produce disease.
Vet. Microbiol. **34**, 305-309

Seeger, H., M. Heikenwalder, N. Zeller, J. Kranich, P. Schwarz, A. Gaspert, B. Seifert, G. Miele, A. Aguzzi (2005):
Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion.
Science **310**, 324-326

Seidel B., A. Thomzig, A. Buschmann, M. H. Groschup, R. Peters, M. Beekes, K. Terytze (2007):
Scrapie Agent (Strain 263K) can transmit disease via the oral route after persistence in soil over years.
PLoS ONE **2**, 435

Shaked, G. M., Y. Shaked, Z. Kariv-Inbal, M. Halimi, I. Avraham, R. Gabizon (2001):
A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases.
J. Biol. Chem. **276**, 31479-31482

Sigurdsson, B. (1954):
Rida – A chronic encephalitis of sheep – With general remarks on infections wich develop slowly and some of their special characteristics.
Br. Vet. J. **110**, 341-354

Sisó, S., L. Gonzalez, M. Jeffrey, S. Martin, F. Chianini, P. Steele (2006):
Prion protein in kidneys of scrapie-infected sheep.
Vet. Rec. **159**, 327-328

Stahl, N., D. R. Borchelt, K. Hsiao, S. B. Prusiner (1987):
Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid.
Cell **51**, 229-240

Stemshorn, B. W. (1975):
Un cas de tremblante naturelle chez une chèvre.
Can. Vet. J. **16**, 84-86

Straub, O. C., Weiland F. (1992):
Nachweis der Traberkrankheit bei Schafen in Deutschland.
Tierärztl. Umschau **47**, 338-342

Taylor, D. M. (1993):
Inactivation of SE agents.
Br. Med. Bull. **49**, 810-821

Taylor, D. M. (2000):
Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review.
Vet. J. **159**, 10-17

- Taylor, D. M., I. McConnell, H. Fraser (1996):
Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice.
J. Gen. Virol. **77**, 1595-1599
- Thomzig, A., C. Kratzel, G. Lenz, D. Kruger, M. Beekes (2003):
Widespread PrPSc accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie.
EMBO Rep. **4**, 530-533
- Thomzig, A., W. Schulz-Schaeffer, C. Kratzel, J. Mai, M. Beekes (2004):
Preclinical deposition of pathological prion protein PrPSc in muscles of hamsters orally exposed to scrapie.
J. Clin. Invest. **113**, 1465-1472
- Thorgeirsdottir, S., G. Georgsson, E. Reynisson, S. Sigurdarson, A. Palsdottir (2002):
Search for healthy carriers of scrapie: an assessment of subclinical infection of sheep in an Icelandic scrapie flock by three diagnostic methods and correlation with PrP genotypes.
Arch Virol. **147**, 709-722
- Thorgeirsdottir, S., S. Sigurdarson, H. M. Thorisson, G. Georgsson, A. Palsdottir (1999):
PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep.
J. Gen. Virol. **80**, 2527-2534
- Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride, J. C. Manson (1996):
Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein.
Nature **380**, 639-642
- Toumazos, P. (1991):
Scrapie in Cyprus.
Br. Vet. J. **147**, 147-154
- Toumazos, P., M. R. Alley (1989):
Scrapie in goats in Cyprus.
N.Z. vet.J. **37**, 160-162
- Ulvund, M. J. (2001):
Die Klinik der Scrapie.
In: Hörnlimann, B., D. Riesner und H. Kretzschmar: Prionen und Prionkrankheiten.
De Gruyter Verlag, Berlin, New York, S. 284-289
- van Duijn, C. M., N. Delasnerie-Laupretre, C. Masullo, I. Zerr, R. de Silva, D. P. Wientjens, J. P. Brandel, T. Weber, V. Bonavita, M. Zeidler, A. Alperovitch, S. Poser, E. Granieri, A. Hofman, R. G. Will (1998):
Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD).
Lancet **351**, 1081-1085
- van Keulen L. J., B. E. Schreuder, R. H. Melen, M. Poelen-van den Berg, G. Mooij-Harkes, M. E. Vromans, J. P. Langeveld (1995):
Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie.
Vet. Pathol. **32**, 299-308

- van Keulen, L. J., B. E. Schreuder, M. E. Vromans, J. P. Langeveld, M. A. Smits (1999): Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J. Comp. Pathol.* **121**, 55-63
- van Keulen, L. J., B. E. Schreuder, M. E. Vromans, J. P. Langeveld, M. A. Smits (2000): Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch. Virol. Suppl.* **16**, 57-71
- van Keulen, L. J., B. E. Schreuder, R. H. Meloen, G. Mooij-Harkes, M. E. Vromans, J. P. Langeveld (1996): Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1228-1231
- van Keulen, L. J., M. E. Vromans, F. G. van Zijderveld (2002): Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS.* **110**, 23-32
- Vargas, F., L. Lujan, R. Bolea, E. Monleon, I. Martin-Burriel, A. Fernandez, I. De Blas, J. J. Badiola (2006): Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *J. Vet. Intern. Med.* **20**, 187-193
- Vargas, F., R. Bolea, E. Monleon, C. Acin, A. Vargas, I. De Blas, L. Lujan, J. J. Badiola (2005): Clinical characterisation of natural scrapie in a native Spanish breed of sheep. *Vet. Rec.* **156**, 318-320
- Vascellari, M., G. M. Aufiero, R. Nonno, U. Agrimi, G. Vaccari, L. Basilicata, C. Falcaro, M. Mancin, S. Marcon, F. Mutinelli (2005): Diagnosis and PrP genotype target of scrapie in clinically healthy sheep of Massese breed in the framework of a scrapie eradication programme. *Arch. Virol.* **150**, 1959-1976
- Vascellari, M., R. Nonno, F. Mutinelli, M. Bigolaro, M. A. Di Bari, E. Melchiotti, S. Marcon, C. D'Agostino, G. Vaccari, M. Conte, L. De Grossi, F. Rosone, F. Giordani, U. Agrimi (2007): PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J. Virol.* **81**, 4872-4876
- Vilotte, J. L., S. Soulier, R. Essalmani, M. G. Stinnakre, D. Vaiman, L. Lepourry, J. C. Da Silva, N. Besnard, M. Dawson, A. Buschmann, M. Groschup, S. Petit, M. F. Madelaine, S. Rakatobe, A. Le Dur, D. Vilette, H. Laude (2001): Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J. Virol.* **75**, 5977-5984
- Vollmerhaus B.(1984):
In: Nickel, R., A. Schummer, E. Seiferle: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane.
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, S. 417-418
- Weiland, E., M. Wiczorek-Krohmer, D. Kohl, K. K. Conzelmann, F. Weiland (1999): Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Veterinary Microbiology* **66**, 171-186

- Wells G. A., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson, R. Bradley (1987):
A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle.
Vet. Rec. **121**, 419-420
- Wilesmith, J. W., G. A. Wells, M. P. Cranwell, J. B. Ryan (1988):
Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies.
Vet. Rec. **123**, 638-644
- Wilesmith, J. W., J. B. Ryan, M. J. Atkinson (1991):
Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin.
Vet. Rec. **128**, 199-203
- Will, R. G. (2003):
Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru.
Br. Med. Bull. **66**, 255-265
- Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman, P. G. Smith (1996):
A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK.
Lancet **347**, 921-925
- Williams, E. S., S. Young (1980):
Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy.
J. Wildl. Dis. **16**, 89-98
- Williams, E. S., S. Young (1982):
Spongiform encephalopathy of Rocky Mountain elk.
J. Wildl. Dis. **18**, 465-471
- Willoughby, K., D. F. Kelly, D. G. Lyon, G. A. Wells (1992):
Spongiform encephalopathy in a captive puma (*Felis concolor*).
Vet. Rec. **131**, 431-434
- Windl, O., A. Giese, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr, K. Skworc, S. Arendt, C. Oberdieck, M. Bodemer, S. Poser, H. A. Kretzschmar (1999):
Molecular genetics of human prion diseases in Germany.
Hum. Genet. **105**, 244-252
- Wood, N., S. H. Done, G. C. Pritchard, M. J. Wooldridge (1992):
Natural scrapie in goats: case histories and clinical signs.
Vet. Rec. **131**, 66-68
- Wyatt, J. M., G. R. Pearson, T. N. Smerdon, T. J. Gruffydd-Jones, G. A. Wells, J. W. Wilesmith (1991):
Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats.
Vet. Rec. **129**, 233-236
- Zanusso, G., C. Casalone, P. Acutis, E. Bozzetta, A. Farinazzo, M. Gelati, M. Fiorini, G. Forloni, M. S. Sy, S. Monaco, M. Caramelli (2003):
Molecular analysis of iatrogenic scrapie in Italy.
J. Gen. Virol. **84**, 1047-1052

Zerr, I., S. Poser (2002):

Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD. With special emphasis on laboratory tests.

APMIS. **110**, 88-98

Zlotnik, I. (1958):

The histopathology of the brain stem of sheep affected with experimental scrapie.

J. Comp. Pathol. **68**, 428-438

Zlotnik, I., J.C. Rennie (1963):

Further observations on the experimental transmission of scrapie from sheep and goats to laboratory mice.

J. Comp. Pathol. **73**, 150-162

8.2 Zitierte Rechtsvorschriften

Entscheidung der Kommission (2007/182/EG) über eine Erhebung über Chronic Wasting Disease bei Hirschartigen vom 19.03.2007
Amtsblatt der Europäischen Union L 84

Verordnung (EG) 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22.05.2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler Enzephalopathien
Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 147 vom 31.05.2001

Das deutsche Tierseuchengesetz vom 22.06.2004, zuletzt geändert am 13.12.2007
BGBl. I, S. 2930

Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 3.11.2004, zuletzt geändert am 18.12.2009
BGBl. I, S. 3939

Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoff-Verordnung) vom 27.01.1999, zuletzt geändert am 18.12.2008
BGBl. I, S. 2768

Verordnung zum Schutz gegen die Verschleppung von Tierseuchen im Viehverkehr (Viehverkehrsverordnung) vom 06.07.2007, zuletzt geändert am 17.06.2009
BGBl. I, S. 1337

9. Anhang

9.1 Die Verordnung (EG) 999/2001: Gliederung und Änderungen

Tab. 9.1: Gliederung der VO (EG) 999/2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter Transmissibler Spongiformer Enzephalopathien vom 22.05.2001 (zuletzt geändert am 11.03.2009)

Kapitel I (Art. 1–4)	Allgemeine Bestimmungen
Kapitel II (Art. 5)	Feststellung des BSE-Status
Kapitel III (Art. 6–10)	TSE-Verhütung
Kapitel IV (Art. 11–14)	TSE-Kontrolle und TSE-Tilgung
Kapitel V (Art. 15–18)	Inverkehrbringen und Ausfuhr
Kapitel VI (Art. 19–21)	Referenzlabors, Probenahmen, Testmethoden und Kontrollen
Kapitel VII (Art. 22-26)	Übergangs- und Schlussbestimmungen
Anhang I	Spezifische Begriffsbestimmungen
Anhang II	Feststellung des BSE-Status
Anhang III	Überwachungssystem
Anhang IV	Fütterung
Anhang V	Spezifizierte Risikomaterialien
Anhang VI	Normen für bestimmte tierische Erzeugnisse
Anhang VII	Tilgung Transmissibler Spongiformer Enzephalopathien
Anhang VIII	Inverkehrbringen und Ausfuhr
Anhang IX	Einfuhr von lebenden Tieren, Embryonen und Eizellen sowie von tierischen Erzeugnissen
Anhang X	Referenzlabors, Probenahmen und Labormethoden
Anhang XI	Übergangsmaßnahmen

Tab. 9.2: Änderungen und Ergänzungen der VO (EG) 999/2001 (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften)

	Datum	Inhalt, geänderte Anhänge
VO (EG) 1248/2001	22.06.2001	III, X ,XI
VO (EG) 1326/2001	29.06.2001	VII, XI
VO (EG) 270/2002	14.02.2002	1326/ 2001
VO (EG) 1494/2002	21.08.2002	III, VII, XI
VO (EG) 260/2003	12.02.2003	I
VO (EG) 650/2003	10.04.2003	Einführen
VO (EG) 1128/2003	16.06.2003	Übergangsmaßnahmen
VO (EG) 1053/2003	19.06.2003	X, Referenzlabors
VO (EG) 1139/2003	27.06.2003	Berichtigung
VO (EG) 1234/2003	10.07.2003	Berichtigung
VO (EG) 1809/2003	15.10.2003	Ausnahmen
VO (EG) 1915/2003	30.10.2003	VII, VIII, IX
VO (EG) 2245/2003	19.12.2003	III
VO (EG) 836/2004	28.04.2004	Ausnahmen
VO (EG) 876/2004	29.04.2004	VIII
VO (EG) 1471/2004	18.08.2004	XI
VO (EG) 1492/2004	23.08.2004	Tilgung von TSEn, SRM, Handel mit Samen und Embryonen
VO (EG) 1993/2004	19.11.2004	Portugal
VO (EG) 36/2005	12.01.2005	III, X
VO (EG) 214/2005	09.02.2005	Ziegen
VO (EG) 260/2005	16.02.2005	Schnelltests
VO (EG) 932/2005	08.06.2005	Übergangsmaßnahmen
VO (EG) 1292/2005	05.08.2005	IV, Tierernährung
VO (EG) 1974/2005	02.12.2005	X, XI, Referenzlabors, SRM
VO (EG) 253/2006	05.02.2006	Schnelltests und Maßnahmen bei Schafen und Ziegen
VO (EG) 339/2006	24.02.2006	XI, Einfuhrbestimmungen
VO (EG) 657/2006	10.04.2006	Aufhebung der Entscheidungen 98/256/EG, 98/351/EG und 1999/514/EG
VO (EG) 688/2006	04.05.2006	III, XI
VO (EG) 1041/2006	07.07.2006	III, Überwachung Schaf
VO (EG) 1923/2006	18.12.2006	Separatorenfleisch, passive und aktive Überwachung, BSE-Status, Züchtungsprogramme
VO (EG) 722/2007	25.06.2007	II, V, VI, VII, IX, XI

VO (EG) 727/2007	26.06.2007	II, III, VII, X
VO (EG) 1275/2007	29.10.2007	IX
VO (EG) 1428/2007	04.12.2007	VII
VO (EG) 21/2008	11.01.2008	X
VO (EG) 315/2008	04.04.2008	X
VO (EG) 357/2008	22.04.2008	V
VO (EG) 553/2008	17.06.2008	VII
VO (EG) 571/2008	19.06.2008	III
VO (EG) 746/2008	17.06.2008	VII
VO (EG) 956/2008	29.09.2008	IV
VO (EG) 103/2009	03.02.2009	VII, IX
VO (EG) 162/2009	26.02.2009	III, X
VO (EG) 163/2009	26.02.2009	IV
VO (EG) 220/2009	11.03.2009	Durchführungsbefugnisse

9.2 Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen

Tab. 9.3: Histomorphologische Charakterisierung der potenziellen Eintrittspforten

Spezies	Tier Nr.	Ileum	Nll. ileocolici	NI. retropharyngeus lateralis	Tonsilla palatina	Membrana nictitans
Schaf	3	1	0	1	1	1
Schaf	7	1	1,3	1	0	1
Schaf	8	1	2,4	1	1,3	1
Schaf	9	1	2,3	1	1	1
Schaf	18	4	0	1	0	1
Schaf	26	1	3,5	1	1,3	4
Schaf	30	1	1,4	1	1	1
Schaf	35	1	1	3,5	3	1
Schaf	36	2	1	1	3	1
Schaf	45	1	1,3	3,5	3	2
Schaf	49	6	2,3	4	1	1
Schaf	54	1	2,3	2,5	4	1
Schaf	59	6	1	3,5	0	1
Schaf	63	6	2	3	1	1
Schaf	64	1	2	1	4	2
Schaf	66	1	1,7	1	1,3	1
Schaf	74	1	2,3	1	3	1
Schaf	75	1	2,3	1	0	1
Schaf	79	1	2,4,6	1	0	1
Schaf	85	1	2	2	1,3	2
Schaf	87	1	2,3,6	1	0	1
Schaf	90	1	2,4,6	3,5	1	1
Schaf	92	1	1,5	1	0	1
Schaf	100	1	2,6	1	0	1
Schaf	101	1	2,6	2,5*	0	2
Schaf	102	1	2,6	1	1	1
Schaf	104	1	1,3,6	1	0	1
Schaf	107	1	1,3,6	3	1	2
Schaf	108	6	2,3,6	1	1,3	1
Schaf	109	1	1,5	3*	0	1
Schaf	111	1	2,6	1	0	1
Schaf	112	6	2,5	1	0	1
Schaf	125	1	2,4,5	1	1	1
Schaf	128	1	1,5	1	2	1
Schaf	142	6	2,4	1	2,3	1
Schaf	148	1	1,6	1	2,3	1
Schaf	149	1	2,3,5	1	0	1
Schaf	151	1	2	4,6	2	1
Schaf	157	6	2,6	1	0	1
Schaf	163	1	2,3,6	1	3	1
Schaf	164	1	2,5	1	0	1

Spezies	Tier Nr.	Ileum	Nll. ileocolici	NI. retropharyngeus lateralis	Tonsilla palatina	Membrana nictitans
Schaf	174	3	2,6	1	3	1
Schaf	175	6	9	1	0	1
Schaf	186	1	2,3,5	1	3	1
Schaf	189	1	2	1	0	1
Schaf	191	1	2,4,6	1	0	1
Schaf	195	6	2,4,5	1	1	1
Schaf	198	1	2,4	8	2	1
Schaf	203	1	2,3,5	1	1	1
Schaf	205	1	1,3,5	1	0	0
Schaf	206	1	2,4,5	1	3	1
Schaf	211	1	1,3	2,5	3	1
Schaf	213	6	1,4	8	0	2
Schaf	214	1	2	1	1	1
Schaf	217	6	2	1	3	1
Schaf	225	1	2,4,5	2,5	0	1
Schaf	230	6	2,5	1	3	1
Schaf	231	1	1	1	0	1
Schaf	235	6	2,3	1	1	1
Schaf	239	1	2	1	2	1
Schaf	240	1	9	1	1	1
Schaf	247	1	2,6	1	3	2
Schaf	253	6	2	8	3	1
Schaf	260	1	2,4	1	0	1
Schaf	262	1	2	1	1,3	1
Schaf	266	1	2,3	1	2,3	2
Schaf	267	1	1	1	2	2
Schaf	273	1	2,3	1	1	0
Schaf	274	1	1	1	2,3	0
Schaf	280	1	2,3	5	2,3	2
Schaf	284	1	2,3	1	2	2
Schaf	293	1	2,3	1	0	1
Schaf	296	1	2	1	0	2
Schaf	298	1	2,3	1	2,3	1
Schaf	299	1	2,4,5	1	1	2
Schaf	304	1	2,4,5	1	1	1
Schaf	306	1	2,4	1	1	1
Schaf	312	1	2,3	1	2	1
Schaf	316	1	2,3	1	2	1
Schaf	320	1	2,3	1	3	2
Schaf	326	1	2,4	1	0	2
Schaf	327	1	2,3	8	2	1
Schaf	333	1	2,3	1	2	1
Schaf	335	1	2,4	1	2	1
Schaf	343	1	8	8	1	1
Schaf	346	1	2,4,5	1	2	1
Schaf	351	1	2,3	1	2,3	1
Schaf	353	1	2,3	1	2	1
Schaf	356	1	2	1	2	1
Schaf	374	1	2,3	1	2	1

Spezies	Tier Nr.	Ileum	NII. ileocolici	NI. retropharyngeus lateralis	Tonsilla palatina	Membrana nictitans
Schaf	378	1	2,4	1	0	1
Schaf	380	1	2,3	1	1	1
Schaf	385	6	2,4,5	1	3	1
Schaf	394	1	2,3	1	2	1
Schaf	395	1	2,3	1	0	1
Schaf	396	1	2	1	0	1
Schaf	399	1	2,4	1	1	1
Schaf	407	1	1,3	1	3	2
Schaf	409	1	2,3	1	0	1
Schaf	414	1	2,3	1	1	2
Schaf	417	1	9	1	2	1
Schaf	419	6	2,4	1	0	1
Schaf	422	6	9	1	2,3	1
Schaf	425	1	3	1*	2	2
Schaf	435	1	2,4	1	1	1
Schaf	440	1	2,3	1	1	2
Schaf	445	1	2,3	3,5	1,3	1
Schaf	447	1	2,3	2,5	0	1
Schaf	448	1	2,3,5	1	3	2
Schaf	449	1	2,5	1	2	1
Schaf	452	1	2,4	1	2	1
Schaf	461	1	2,4,5	1	2	2
Schaf	463	1	2,3	1	2,3	2
Schaf	466	1	2,4,5	0	2	2
Schaf	471	1	1,4	8	1	1
Schaf	472	1	1,4	5	4	1
Schaf	473	6	4	1	1,3	1
Schaf	474	1	1	1	1	1
Schaf	480	1	2,3	1	1,3	1
Schaf	481	1	2,3	2	2	1
Schaf	483	1	2	1	2	1
Schaf	485	1	2,4	1	2,3	1
Schaf	488	1	2,3,5	7	2	0
Schaf	490	1	2,3	0	2,3	3
Schaf	493	1	2,3,6	1	2	1
Schaf	499	1	2,3	1	2	1
Schaf	513	6	1,4	1	1,3	1
Schaf	547	1	1	1	1	2
Schaf	768	1	2,3	4,6	1	1
Ziege	205	6	1,3	0	1	1
Ziege	253	5	2,4	3	1	1
Ziege	254	6	2,4,6	3,6	2	1
Ziege	255	1	2,3	3	1	2
Ziege	257	5	2	3,5	0	1
Ziege	261	5	2,3	2	0	1

Tab. 9.4: Histomorphologische Charakterisierung der Gewebe, die den potenziellen Eintrittspforten nachgeordnet sind

Schaf Nr.	Milz	Rektum	Plexus solaris	Ganglion stellatum	Ganglion cervicale craniale	Nl. cervicalis superficialis dorsalis	N. vagus	Zunge
9	0	1	0	0	0	1	0	1,4
26	0	0	0	0	0	1	2	1,4
85	0	1	0	0	1	3,6	0	1,4
191	0	0	1	0	1	1	0	3,4
205	0	0	0	2	0	3	0	1,4
260	0	2	0	2	0	2	2	1,2,4
326	0	0	0	0	1	2,5	0	3,4
333	0	1	0	0	0	2	0	2,4
374	0	1	0	0	0	1	2	1,4
425	0	2	0	0	0	3,7	0	1,4
435	0	3	0	0	0	1	0	5
463	0	1	0	0	0	1	0	3,4
499	0	1	0	0	0	1	0	1,4

Befundbeschreibung der H.-E.-Färbung

Ileum

- 0 ohne besonderen Befund
- 1 mittelgradige akute oberflächliche eosinophile Enteritis
- 2 mittelgradige akute tiefe eosinophile Enteritis
- 3 mittelgradige chronische oberflächliche eosinophile Enteritis
- 4 mittelgradige akute oberflächliche lymphohistiozytäre Enteritis
- 5 geringgradige akute oberflächliche eosinophile Enteritis
- 6 keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar

Nll. ileocolici

- 0 ohne besonderen Befund
- 1 geringgradige Aktivierung
- 2 mittelgradige Aktivierung
- 3 geringgradige Sinushistiozytose
- 4 mittelgradige Sinushistiozytose
- 5 geringgradige Depletion
- 6 mittelgradige Depletion
- 7 hochgradige Depletion
- 8 nekrotisierende granulomatöse Lymphadenitis
- 9 keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar

Nl. retropharyngeus lateralis

- 0 ohne besonderen Befund
- 1 Blutresorptionslymphknoten
- 2 geringgradige Aktivierung
- 3 mittelgradige Aktivierung
- 4 hochgradige Aktivierung
- 5 geringgradige Sinushistiozytose
- 6 mittelgradige Sinushistiozytose
- 7 granulomatöse Lymphadenitis
- 8 keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar

Tonsilla palatina

- 0 ohne besonderen Befund
- 1 geringgradige akute fokale oberflächliche eitrige Tonsillitis
- 2 mittelgradige akute fokale oberflächliche eitrige Tonsillitis
- 3 Sarkosporidiose
- 4 keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar

Membrana nictitans

- 0 ohne besonderen Befund
- 1 mittelgradige chronische Konjunktivitis
- 2 geringgradige chronische Konjunktivitis
- 3 hochgradige chronische Konjunktivitis
- 4 geringgradige akute Konjunktivitis

Milz

- 0 ohne besonderen Befund

NI. cervicalis superficialis

- 0 ohne besonderen Befund
- 1 Blutresorptionslymphknoten
- 2 geringgradige Aktivierung
- 3 mittelgradige Aktivierung
- 4 hochgradige Aktivierung
- 5 geringgradige Sinushistiozytose
- 6 mittelgradige Sinushistiozytose
- 7 mittelgradige Depletion
- 8 keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar

Rektum

- 0 ohne besonderen Befund
- 1 geringgradige chron. oberflächliche eosinophile Enteritis
- 2 multifok. geringgradige akute oberflächliche eosinophile Enteritis
- 3 geringgradige akute tiefe eosinophile Enteritis

Ganglion cervicale craniale

Ganglion stellatum

Plexus solaris

- 0 ohne besonderen Befund
- 1 fokale geringgradige nicht eitrige Ganglionitis
- 2 keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar

N. vagus

- 0 ohne besonderen Befund
- 2 keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar

Zunge

- 0 ohne besonderen Befund
- 1 geringgradige perivasculäre lymphoplasmazelluläre Infiltrationen
- 2 geringgradige lymphoplasmazelluläre Infiltrationen
- 3 geringgradige lymphoplasmazelluläre Infiltrationen mit geringgradiger Beteiligung eosinophiler Granulozyten
- 4 Sarkosporidiose
- 5 keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar

Tab. 9.5: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der potenziellen Eintrittspforten

Spezies	Tier Nr.	Ileum	NI. ileocolici	NI. retropharyngeus lateralis	Tonsilla palatina	Membrana nictitans
Schaf	3	0	0	0	0	0
Schaf	7	0	0	0	0	0
Schaf	8	0	0	0	0	0
Schaf	9	0	1	1	1	0
Schaf	18	0	0	0	0	0
Schaf	26	1	1	0	0	0
Schaf	30	0	0	0	0	0
Schaf	35	0	0	0	0	0
Schaf	36	0	0	0	0	0
Schaf	45	0	0	0	0	0
Schaf	49	2	0	0	0	0
Schaf	54	0	0	0	2	0
Schaf	59	0	0	0	0	0
Schaf	63	0	0	0	0	0
Schaf	64	0	0	0	2	0
Schaf	66	0	0	0	0	0
Schaf	74	0	0	0	0	0
Schaf	75	0	0	0	0	0
Schaf	79	0	0	0	0	0
Schaf	85	1	1	1	1	1
Schaf	87	0	0	0	0	0
Schaf	90	0	0	0	0	0
Schaf	92	0	0	0	0	0
Schaf	100	0	0	0	0	0
Schaf	101	0	0	0*	0	0
Schaf	102	0	0	0	0	0
Schaf	104	0	0	0	0	0
Schaf	107	0	0	0	0	0
Schaf	108	0	0	0	0	0
Schaf	109	0	0	0*	0	0
Schaf	111	0	0	0	0	0
Schaf	112	0	0	0	0	0
Schaf	125	0	0	0	0	0
Schaf	128	0	0	0	0	0
Schaf	142	0	0	0	0	0
Schaf	148	0	0	0	0	0
Schaf	149	0	0	0	0	0
Schaf	151	0	0	0	0	0
Schaf	157	0	0	0	0	0
Schaf	163	0	0	0	0	0
Schaf	164	0	0	0	0	0
Schaf	174	0	0	0	0	0
Schaf	175	0	2	0	0	0

Spezies	Tier Nr.	Ileum	Nil. ileocolici	NI. retropharyngeus lateralis	Tonsilla palatina	Membrana nictitans
Schaf	186	0	0	0	0	0
Schaf	189	0	0	0	0	0
Schaf	191	1	0	0	0	0
Schaf	195	0	0	0	0	0
Schaf	198	0	0	2	0	0
Schaf	203	0	0	0	0	0
Schaf	205	0	1	1	1	0
Schaf	206	0	0	0	0	0
Schaf	211	0	0	0	0	0
Schaf	213	0	0	2	0	0
Schaf	214	0	0	0	0	0
Schaf	217	0	0	0	0	0
Schaf	225	0	0	0	0	0
Schaf	230	0	0	0	0	0
Schaf	231	0	0	0	0	0
Schaf	235	0	0	0	0	0
Schaf	239	0	0	0	0	0
Schaf	240	0	2	0	0	0
Schaf	247	0	0	0	0	0
Schaf	253	0	0	2	0	0
Schaf	260	1	0	0	0	0
Schaf	262	0	0	0	0	0
Schaf	266	0	0	0	0	0
Schaf	267	0	0	0	0	0
Schaf	273	0	0	0	0	0
Schaf	274	0	0	0*	0	0
Schaf	280	0	0	0	0	0
Schaf	284	0	0	0	0	0
Schaf	293	0	0	0	0	0
Schaf	296	0	0	0	0	0
Schaf	298	0	0	0	0	0
Schaf	299	0	0	0	0	0
Schaf	304	0	0	0	0	0
Schaf	306	0	0	0	0	0
Schaf	312	0	0	0	0	0
Schaf	316	0	0	0	0	0
Schaf	320	0	0	0	0	0
Schaf	326	0	1	1*	1	0
Schaf	327	0	0	2	0	0
Schaf	333	1	1	1	1	1
Schaf	335	0	0	0	0	0
Schaf	343	0	0	2	0	0
Schaf	346	0	0	0	0	0
Schaf	351	0	0	0	0	0
Schaf	353	0	0	0	0	0
Schaf	356	0	0	0	0	0
Schaf	374	1	1	1	1	0
Schaf	378	0	0	0	0	0
Schaf	380	0	0	0	0	0

Spezies	Tier Nr.	Ileum	NI. ileocolici	NI. retropharyngeus lateralis	Tonsilla palatina	Membrana nictitans
Schaf	385	0	0	0	0	0
Schaf	394	0	0	0	0	0
Schaf	395	0	0	0	0	0
Schaf	396	0	0	0	0	0
Schaf	399	0	0	0	0	0
Schaf	407	0	0	0	0	0
Schaf	409	0	0	0	0	0
Schaf	414	0	0	0	0	0
Schaf	417	0	2	0	0	0
Schaf	419	0	0	0	0	0
Schaf	422	2	2	0	0	0
Schaf	425	1	0	1*	1	0
Schaf	435	1	0	0	0	0
Schaf	440	0	0	0	0	0
Schaf	445	0	0	0	0	0
Schaf	447	0	0	0	0	0
Schaf	448	0	0	0	0	0
Schaf	449	0	0	0	0	0
Schaf	452	0	0	0	0	0
Schaf	461	0	0	0	0	0
Schaf	463	0	0	1	1	0
Schaf	466	0	0	0	0	0
Schaf	471	0	0	2	0	0
Schaf	472	0	0	0	2	0
Schaf	473	0	0	0	0	0
Schaf	474	0	0	0	0	0
Schaf	480	0	0	0	0	0
Schaf	481	0	0	2	0	0
Schaf	483	0	0	0	0	0
Schaf	485	0	0	0	0	0
Schaf	488	0	0	0	0	0
Schaf	490	0	0	0	0	0
Schaf	493	0	0	0	0	0
Schaf	499	0	0	1	1	0
Schaf	513	0	0	0	0	0
Schaf	547	0	0	0*	0	0
Schaf	768	0	0	0	0	0
Ziege	205	0	0	0	0	0
Ziege	253	0	0	0	0	0
Ziege	254	0	0	0	0	0
Ziege	255	0	0	0*	0	0
Ziege	257	0	0	0	0	0
Ziege	261	0	0	0	0	0

*NI. mandibularis

0 negativ

1 positiv

2 keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar

Tab. 9.6: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Organe, die den potenziellen Eintrittspferten nachgeordnet sind

Schaf Nr.	Milz	Rektum	Plexus solaris	Ganglion stellatum	Ganglion cervicale craniale	Nl. cervicalis superficialis dorsalis	N. vagus	Zunge
9	0	0	0	0	0	1	0	0
26	1	1	1	0	0	0	2	0
85	1	1	1	0	0	1	0	0
191	0	1	1	0	0	0	0	0
205	1	0	0	2	0	1	0	0
260	0	0	1	2	0	0	2	0
326	1	0	0	0	0	1	0	0
333	1	0	1	0	0	1	0	0
374	1	0	1	0	0	1	2	0
425	1	0	0	0	0	1	0	0
435	0	0	0	0	0	0	0	2
463	1	0	0	0	0	1	0	0
499	0	0	0	0	0	0	0	0

0 negativ

1 positiv

2 keine Probe vorhanden bzw. nicht auswertbar

Tab. 9.7: Verteilung der Genotypen

Genotyp klasse	Genotyp	gesamte Herde (522 Tiere)	im Obex reaktive Schafe (40 Tiere)	in weiteren Geweben untersuchte Schafe (129 Tiere)	in weiteren Geweben positive Schafe (13 Tiere)
G 1	ARR/ARR	94	0	0	0
G 2	ARR/AHQ	4	0	0	0
	ARR/ARH	0	0	0	0
	ARR/ARQ	244	0	4	0
G 3	AHQ/AHQ	0	0	0	0
	AHQ/ARH	0	0	0	0
	AHQ/ARQ	16	2	13	4
	ARH/ARH	0	0	0	0
	ARH/ARQ	0	0	0	0
	ARQ/ARQ	157	38	105	9
G 4	ARR/VRQ	3	0	3	0
G 5	AHQ/VRQ	0	0	0	0
	ARH/VRQ	0	0	0	0
	ARQ/VRQ	4	0	4	0
	VRQ/VRQ	0	0	0	0

10. Danksagung

Ich bedanke mich sehr bei Herrn Univ. Prof. Dr. Fries für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die jederzeit gewährte Unterstützung und die geduldige Betreuung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des INNT danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut auf Riems, besonders Herrn Prof. Dr. Groschup, der die Bearbeitung der Proben am INNT ermöglicht hat.

Ich danke Frau Dr. Balkema-Buschmann für die fachliche und moralische Unterstützung und die stets produktiven Vorschläge.

Frau Dr. Hoffmann danke ich für die gewährte Unterstützung bei der Auswertung und für die stete Ermutigung zum Literaturstudium.

Frau Meinke möchte ich für die praktische Unterstützung und Hilfestellung bei der Laborarbeit danken.

Herrn Balkema danke ich für die gute Laune im BSE-Labor.

Außerdem danke ich allen Helfern, die an der Zerlegung der Schafe und der Probenahme beteiligt waren.

Vielen Dank an meine Schwester für die akribische Korrektur der Rechtschreibung sowie an meinen Neffen und meine Nichte für die Hilfe beim Sortieren der Paper.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Mutter und meinem Freund bedanken, die mir das Studium und die Durchführung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht und mich immer in allem unterstützt haben.

11. Publikationsverzeichnis

Vorträge

Reckzeh, C., C. Hoffmann, A. Buschmann, S. Buda, K. D. Budras, K. F. Reckling, S. Bellmann, H. Knobloch, R. Fries, M. H. Groschup:
Nachweis von PrPSc in ovinen Geweben mit negativen Schnelltestbefunden im Obex –
Histomorphologische und immunhistochemische Untersuchungen
6. Fachtagung Fleisch- und Geflügelfleischhygiene für Angehörige der Veterinärverwaltung,
Berlin, 01.03.2006

Reckzeh, C., C. Hoffmann, A. Buschmann, S. Buda, K. D. Budras, K. F. Reckling, S. Bellmann, R. Fries, M. H. Groschup:
Immunhistologische Untersuchungen zum Nachweis von pathologischem Prionprotein in
ausgewählten Körpergeweben präklinischer Schafe einer natürlich mit Scrapie infizierten
Herde
49. Tagung der Fachgruppe „Pathologie“ in der Deutschen Veterinärmedizinischen
Gesellschaft, Berlin, 19.04.2006

Originalmitteilungen

Reckzeh, C., C. Hoffmann, A. Buschmann, S. Buda, K. D. Budras, K. F. Reckling, S. Bellmann, H. Knobloch, R. Fries, M. H. Groschup (2007):
Rapid testing leads to the underestimation of the scrapie prevalence in an affected sheep
and goat flock
Veterinary Microbiology **123**, 320–327

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit „Immunhistochemische Untersuchungen zum Vorkommen von Scrapie-Prionprotein in ovinen Geweben“ selbständig und ohne weitere als die angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Claudia Reckzeh