

# Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bei Rind und Schaf - Aktueller Stand in Diagnostik und Forschung

Dr. Anne Buschmann

Dr. Ute Ziegler

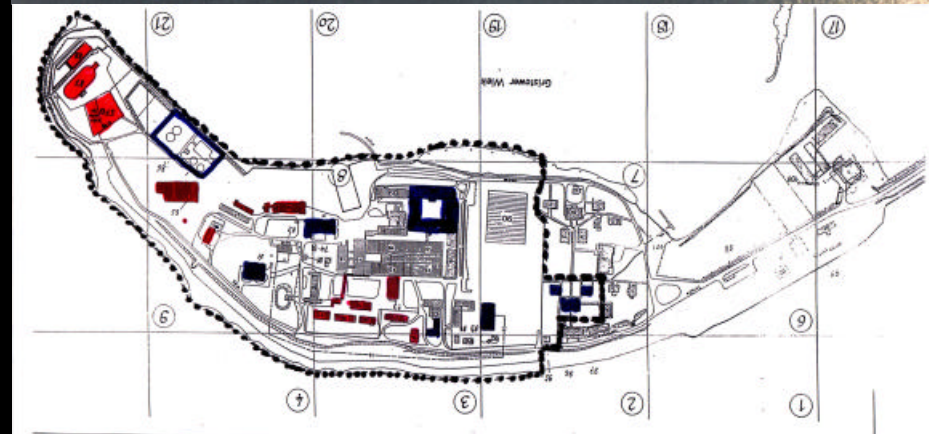
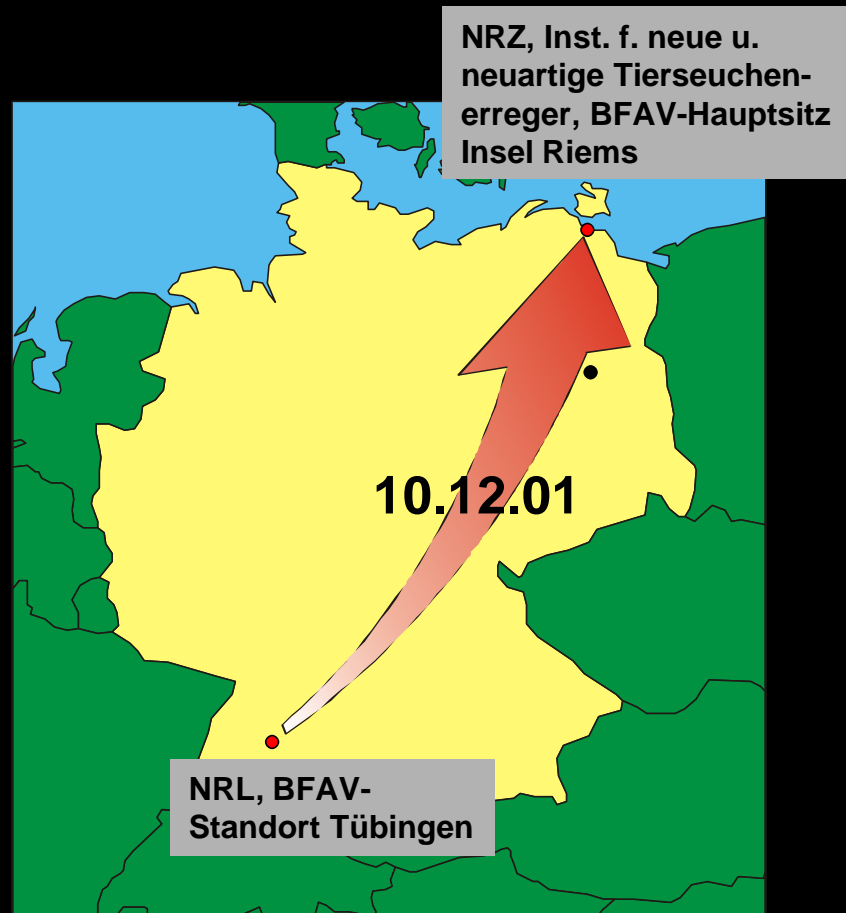
PD Dr. Martin H. Groschup



Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger  
an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere  
Insel Riem



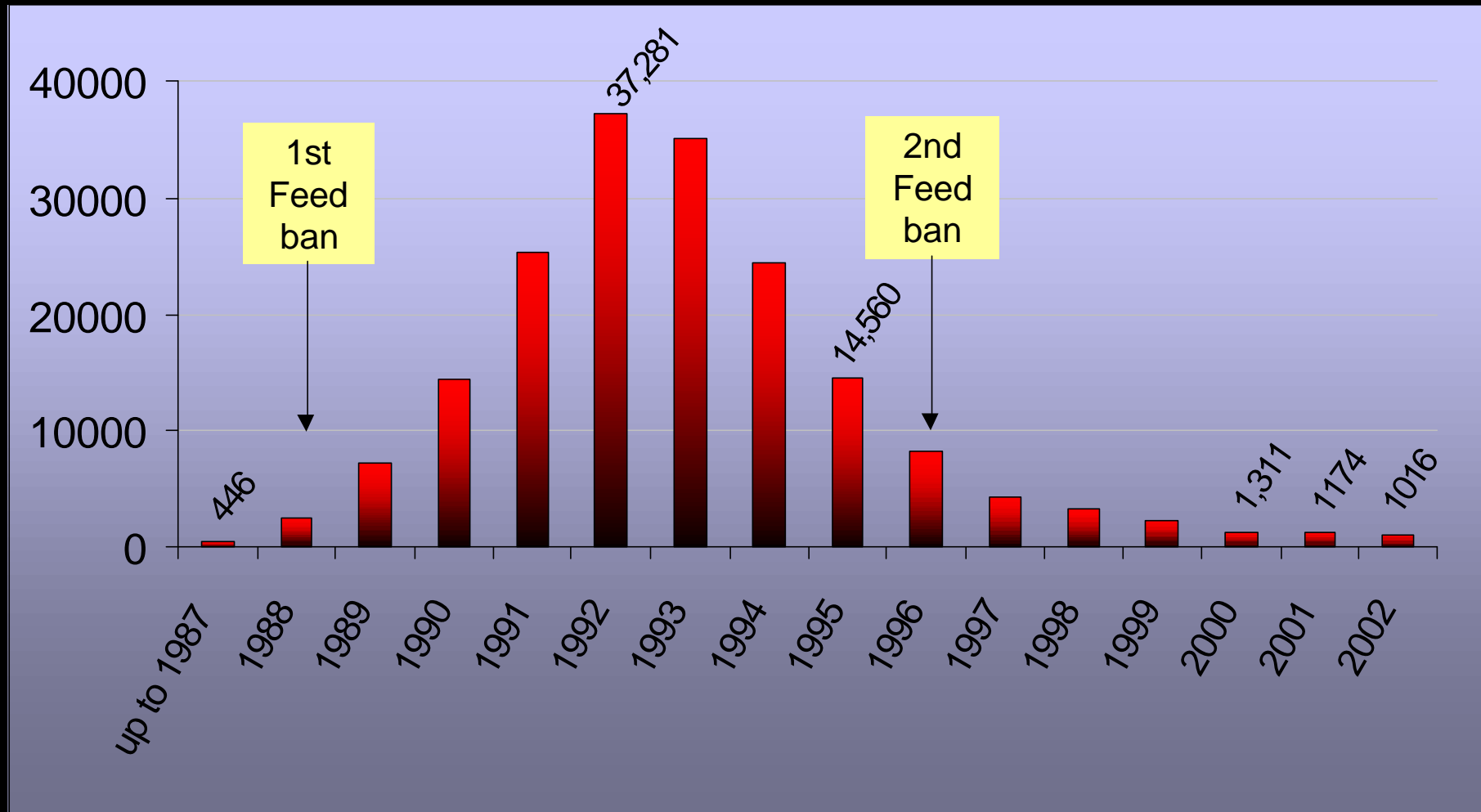
# Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere

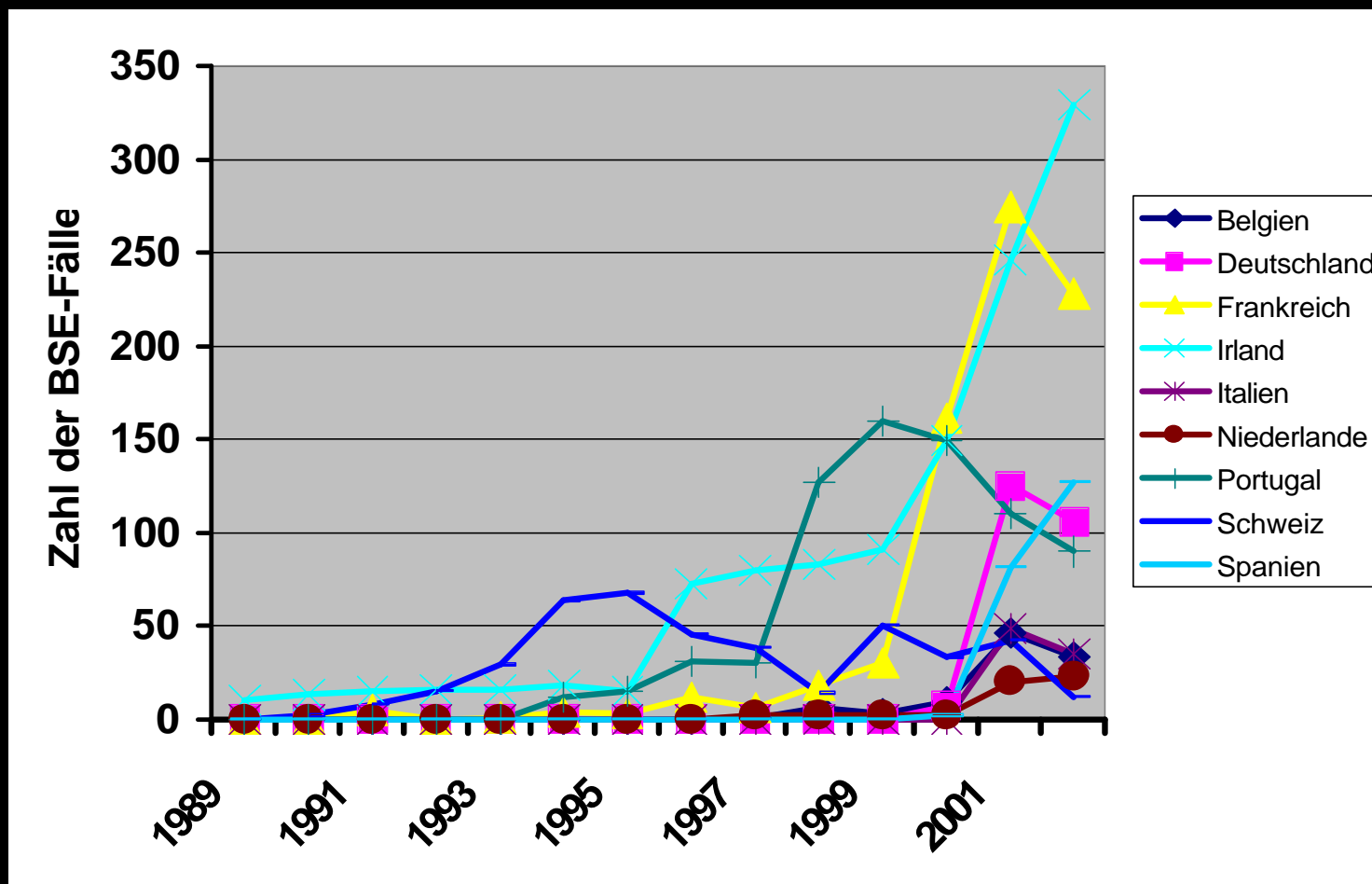


# Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSEs) bei Mensch und Tier

Krankheit	Ursache	Wirt	Erstbeschreibung
Scrapie	infektiös	Schaf, Ziege	1759
Transmissible Mink Encephalopathy	infektiös	Nerz	1947
Chronic Wasting Disease	infektiös	Elch, Wapiti-Hirsch	1967
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK)	sporadisch erblich infektiös	Mensch	1920
Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)	erblich sporadisch	Mensch	1936
Kuru	infektiös	Mensch	1957
Fatal Familiar Insomnie (FFI)	erblich	Mensch	1986
<b>Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)</b>	<b>infektiös</b>	<b>Rind</b>	<b>1986</b>
Feline Spongiforme E.	infektiös	Katzen	1991
Variante CJK (vCJK)	infektiös	Mensch	1996

# BSE-Fälle im VK





# BSE in Deutschland

---



**2000: 7 BSE-Fälle**

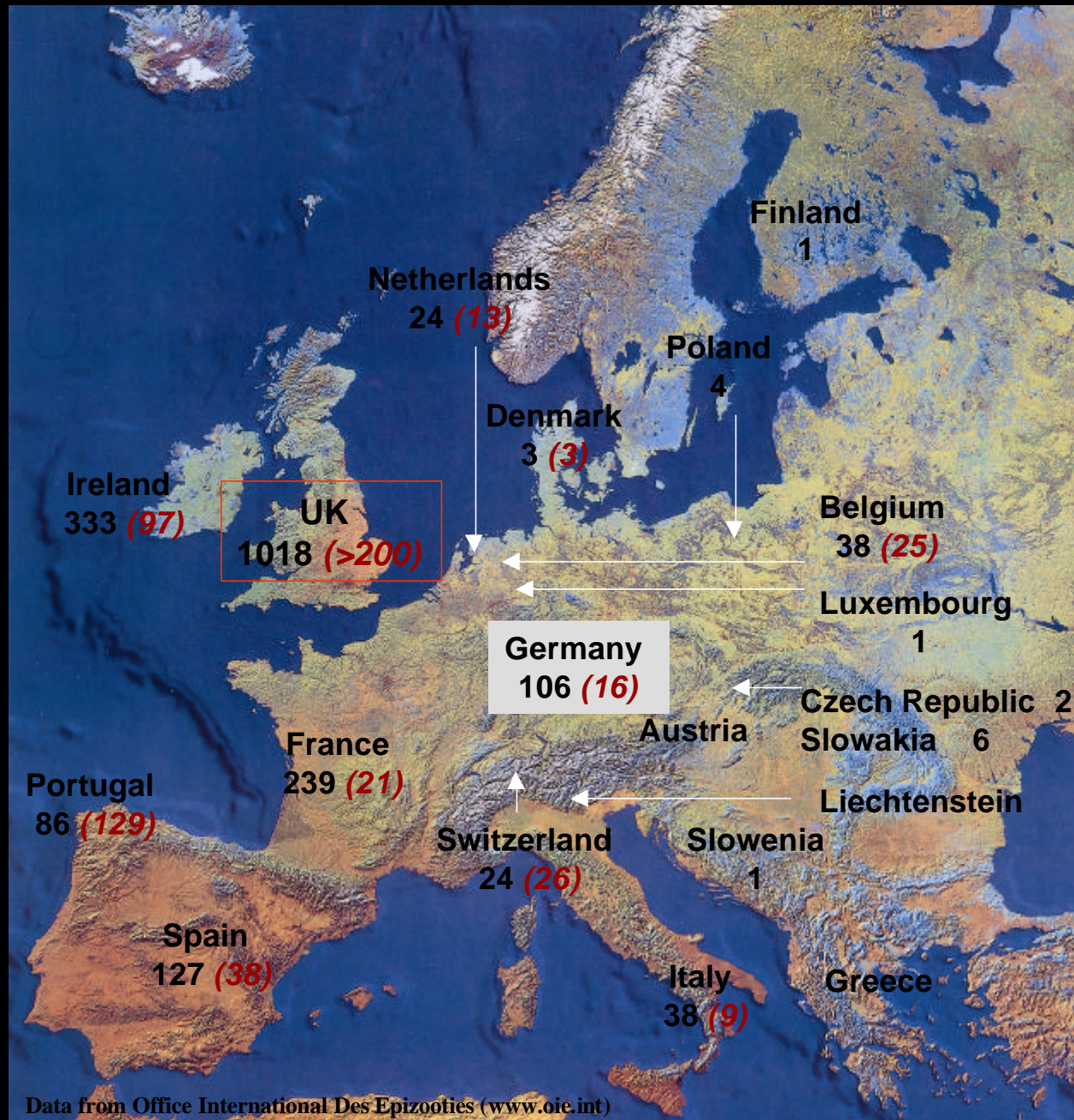
**2001: 125 BSE-Fälle**

**2002: 106 BSE-Fälle**

**2003: 5 BSE-Fälle bis 26.3.**



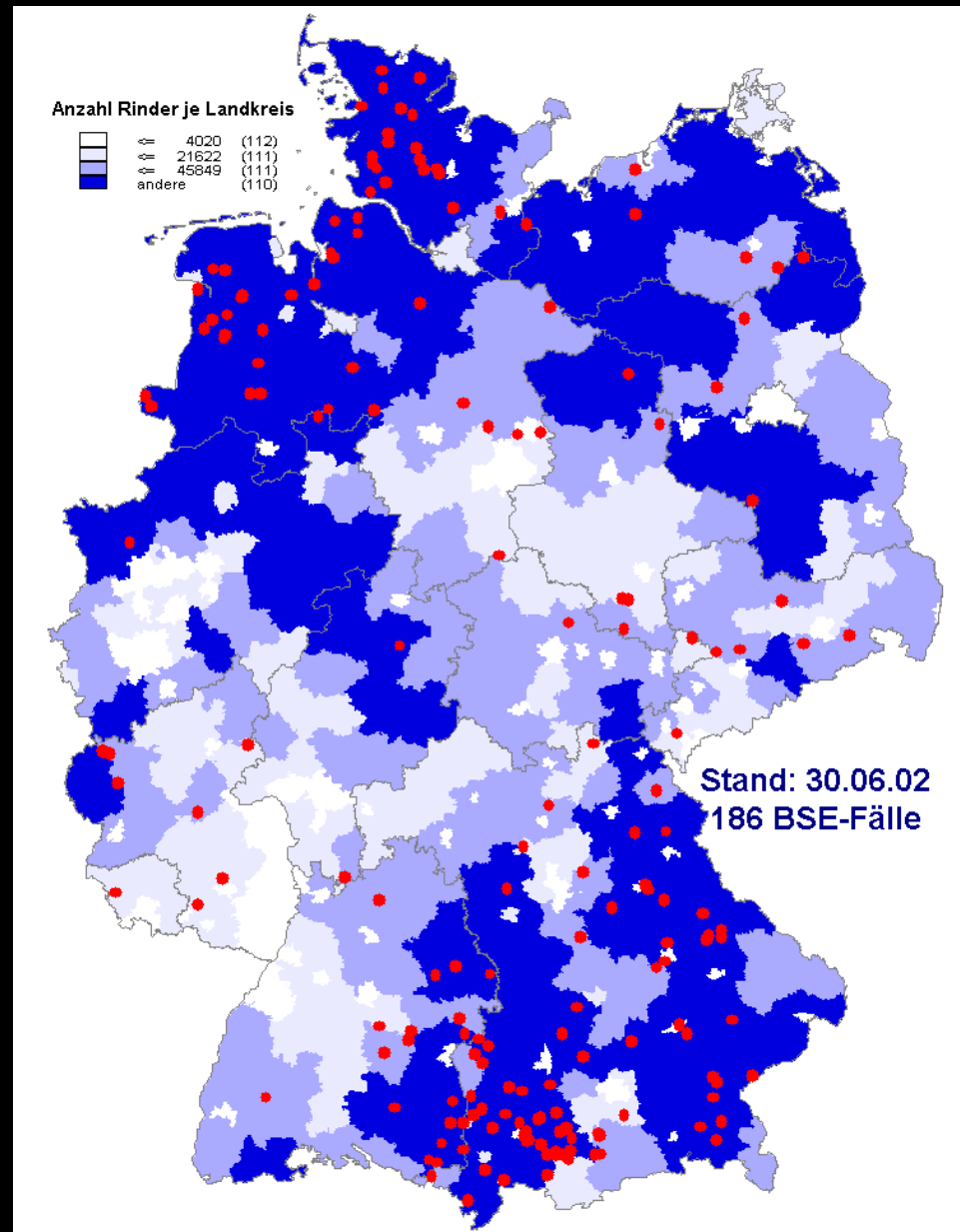
# BSE-Fälle im Jahr 2002



Data from Office International Des Epizooties ([www.oie.int](http://www.oie.int))

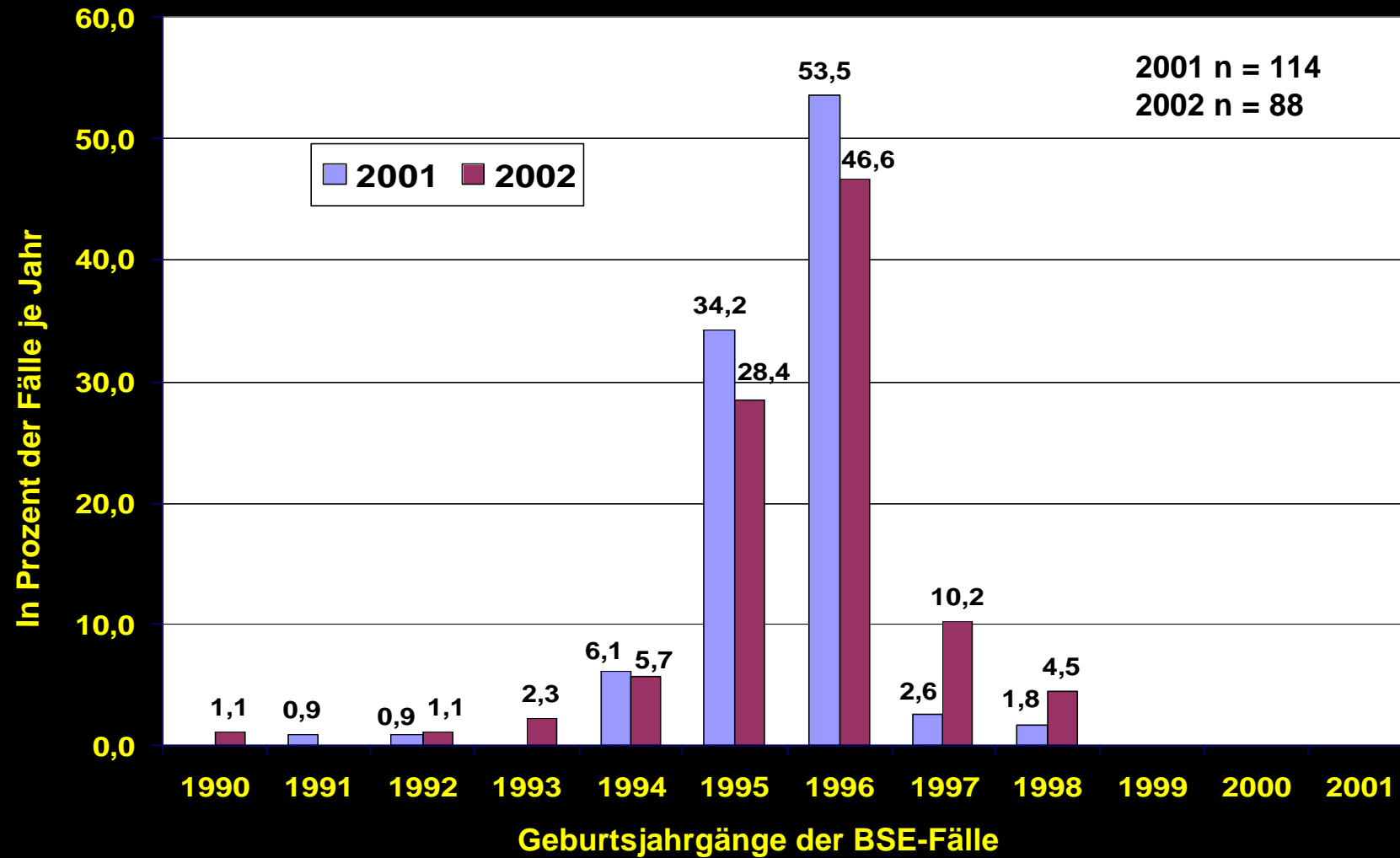
**Zahl der BSE-Fälle pro Mill. Rinder >30 Mon.**

# Regionale Verteilung der BSE-Fälle in Deutschland

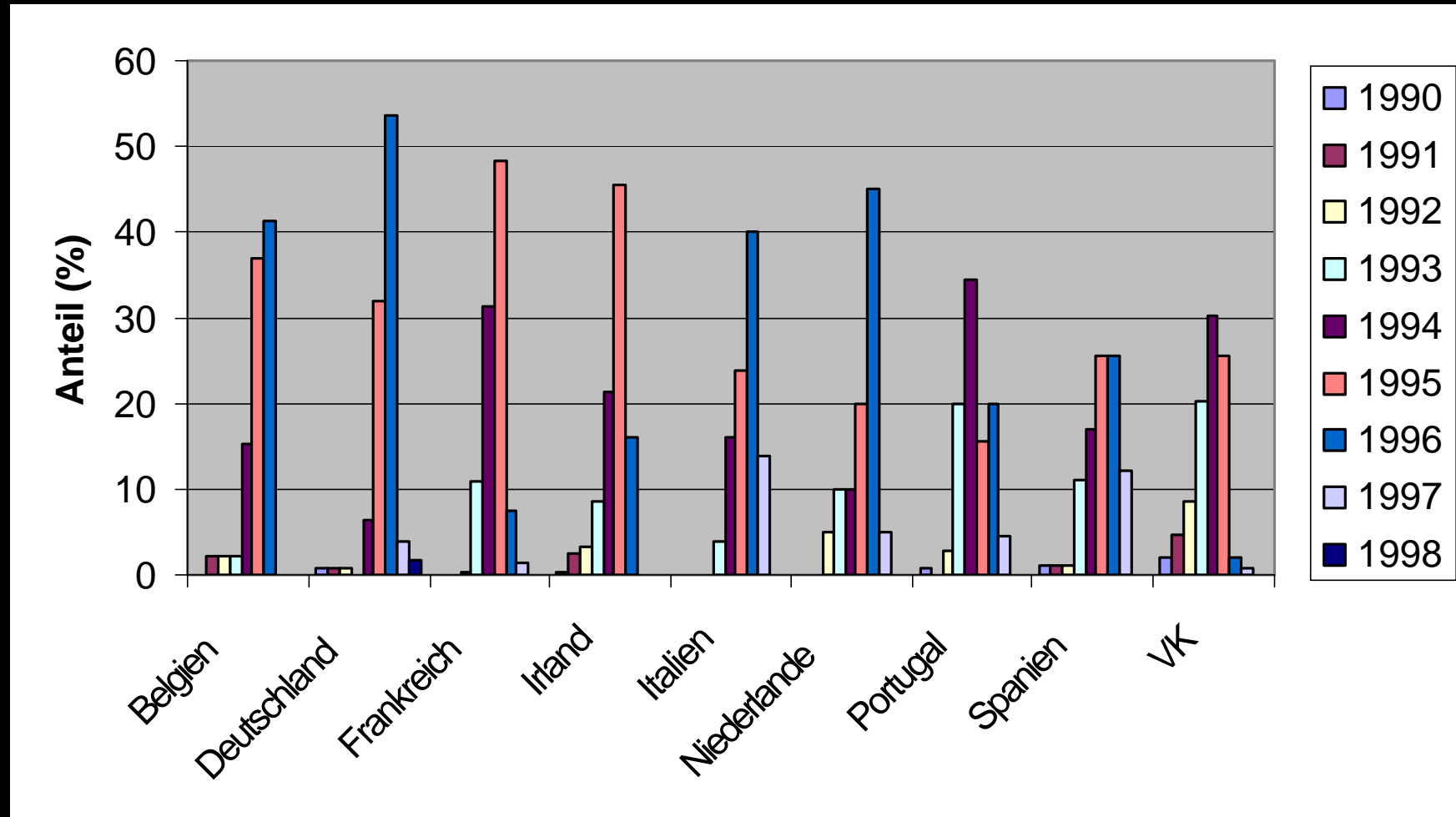




## Geburtsjahrgänge der BSE-Rinder 2001 und 2002

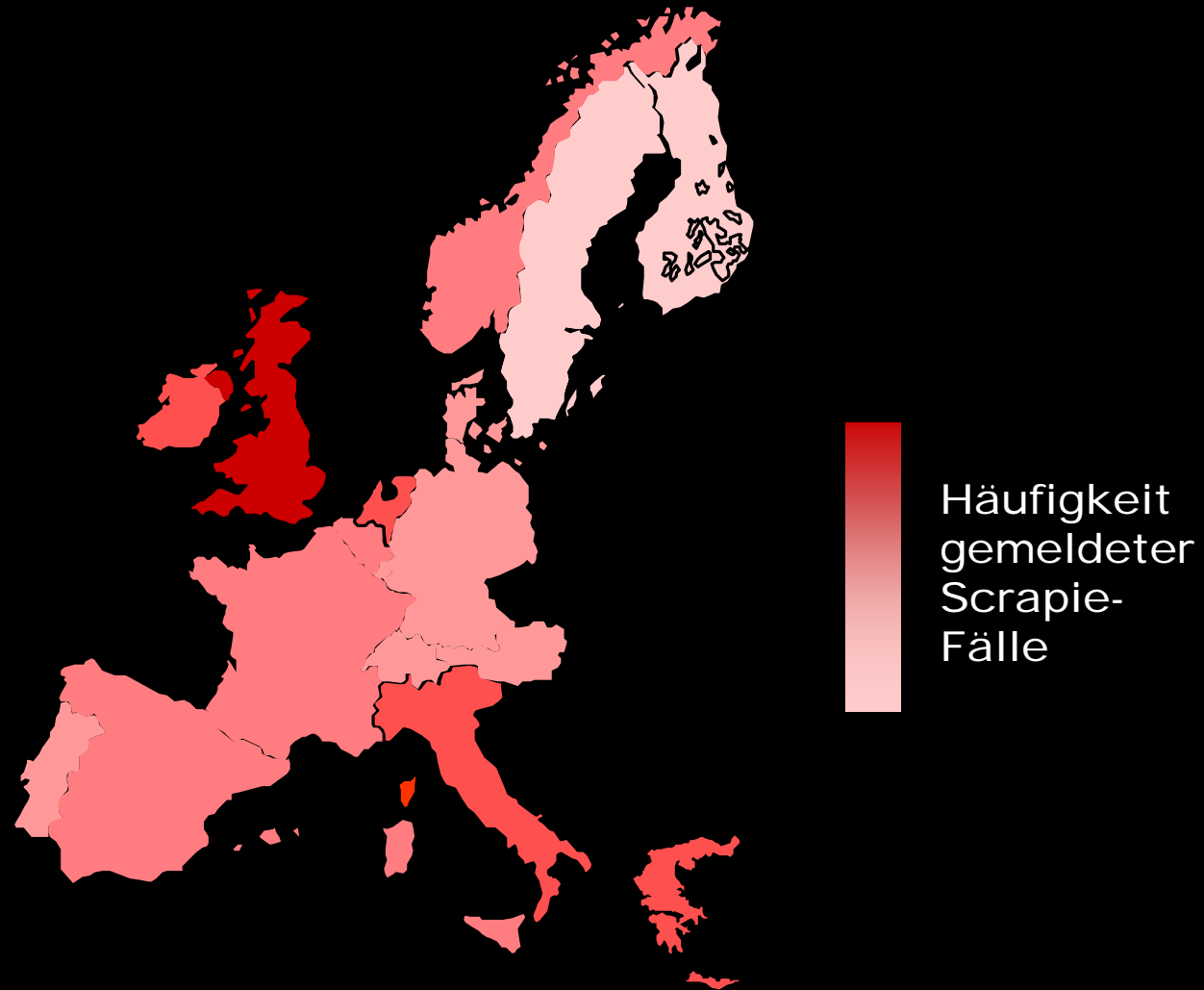


# Geburtsjahrgänge der BSE-Rinder in Europa 2001

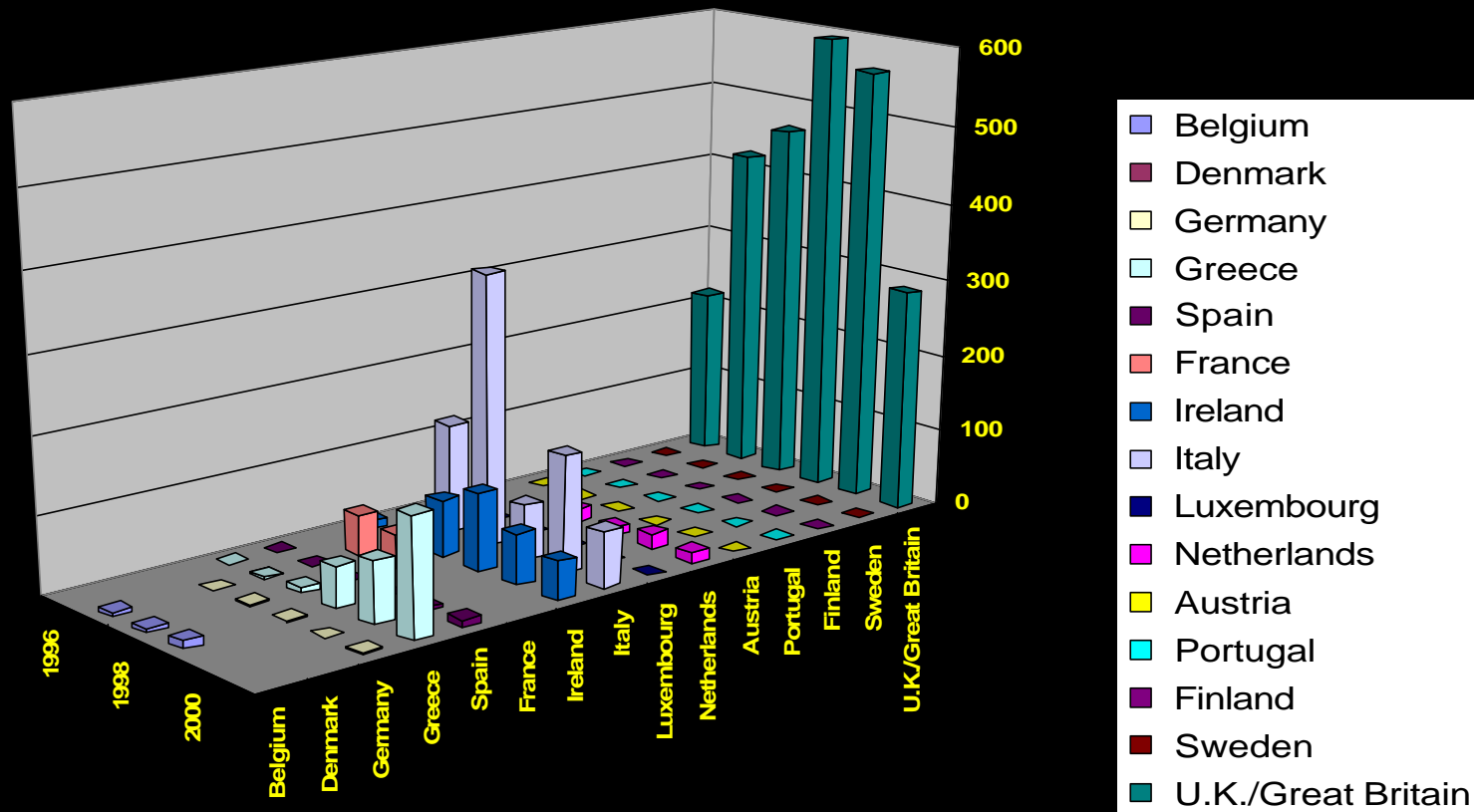


Daten: Europäische Kommission, Report on the Monitoring and Testing of Bovine Animals for the Presence of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), Juni 2002

# Geschätzte Scrapie-Situation in der EU



# Vorkommen der Scrapie in Europa 1996 - 2001



Daten für manche Länder inkomplett

# Scrapie-Überwachung nach der Verordnung EG 999/2001

## Untersuchung von Schlachtieren

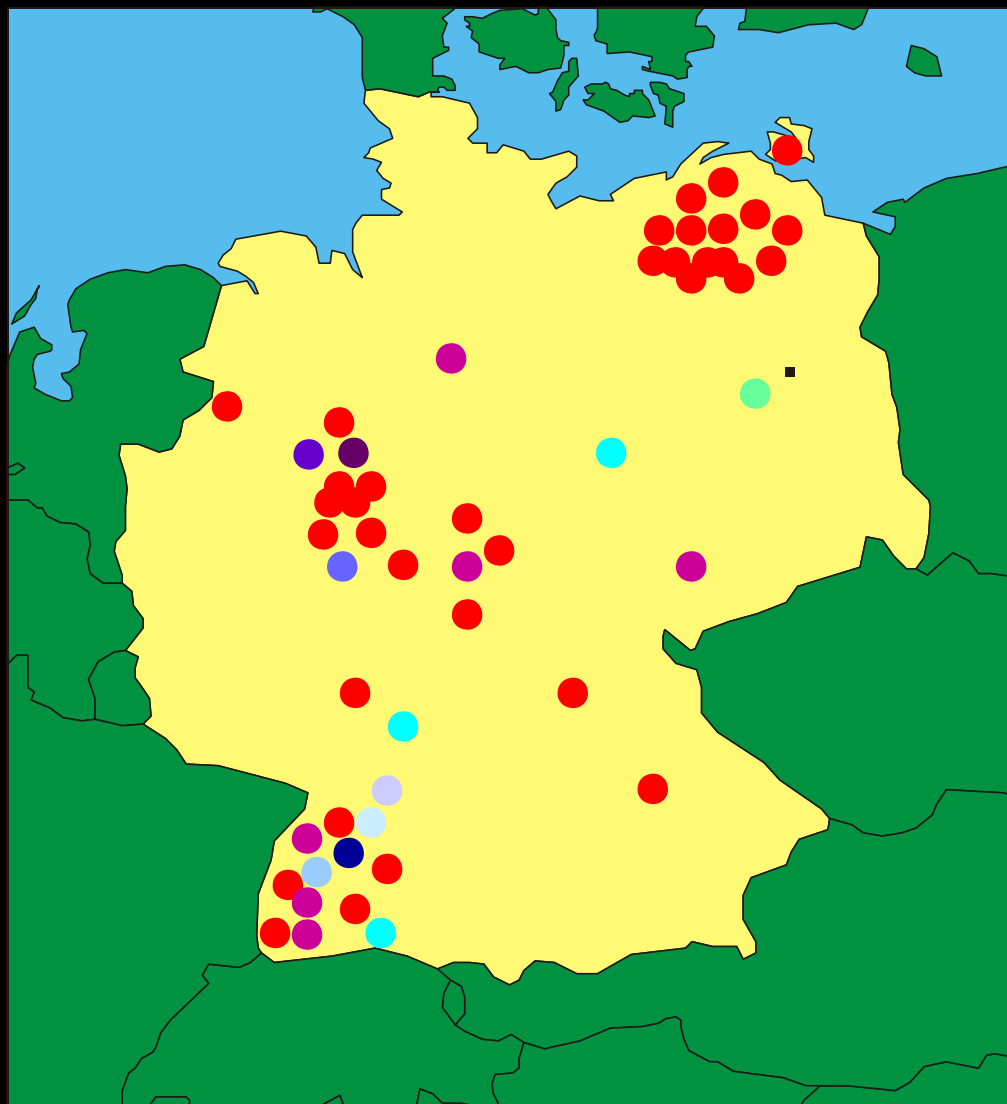
Mitgliedsstaat	Minimaler Stichprobenumfang pro Jahr
Belgien	3 750
Dänemark	3 000
Deutschland	60 000
Griechenland	60 000
Spanien	60 000
Frankreich	60 000
Irland	60 000
Italien	60 000
Luxemburg	250
Niederlande	39 000
Österreich	8 200
Portugal	22 500
Finnland	1 900
Schweden	5 250
Großbritannien	60 000

## Untersuchung von Notschlachtungen und verendeten Tieren

Mitgliedsstaat	Minimaler Stichprobenumfang pro Jahr
Belgien	450
Dänemark	400
Deutschland	6 000
Griechenland	6 000
Spanien	6 000
Frankreich	6 000
Irland	6 000
Italien	6 000
Luxemburg	30
Niederlande	5 000
Österreich	1 100
Portugal	6 000
Finnland	250
Schweden	800
Großbritannien	6 000



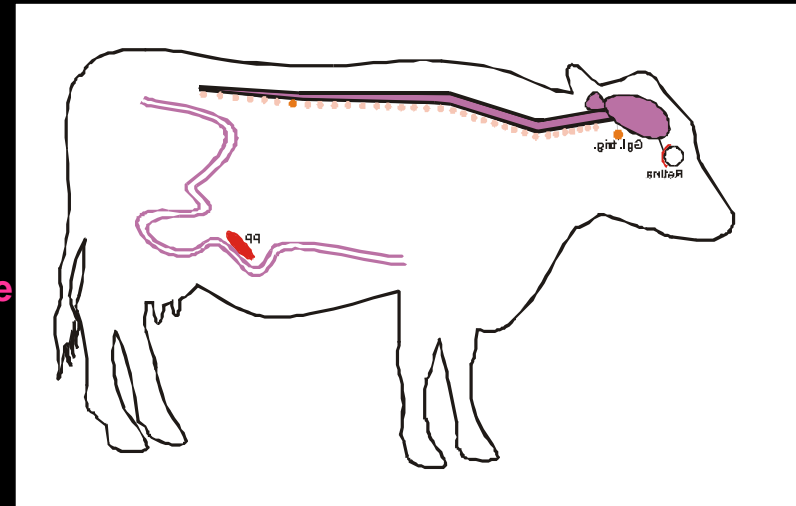
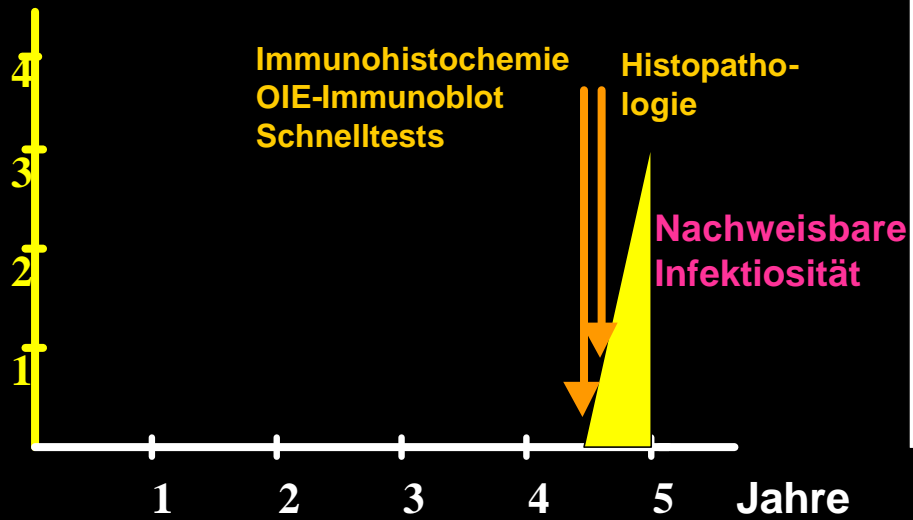
# Scrapie-Fälle in Deutschland seit 1985



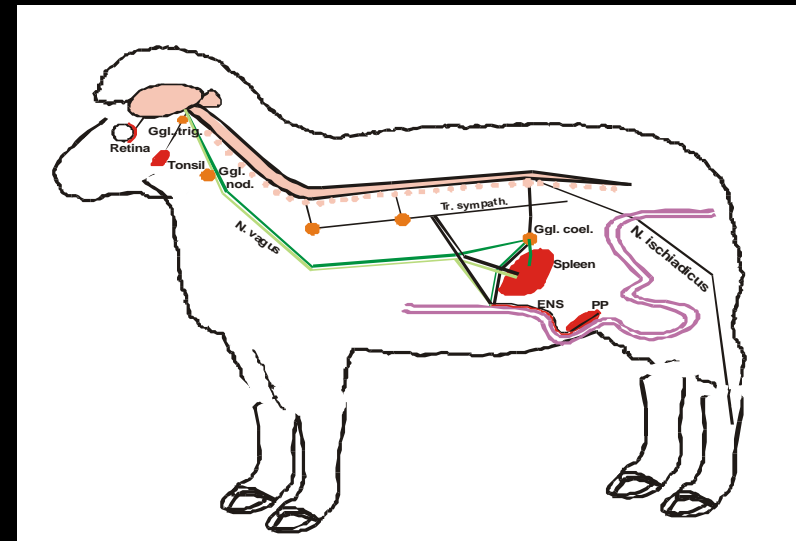
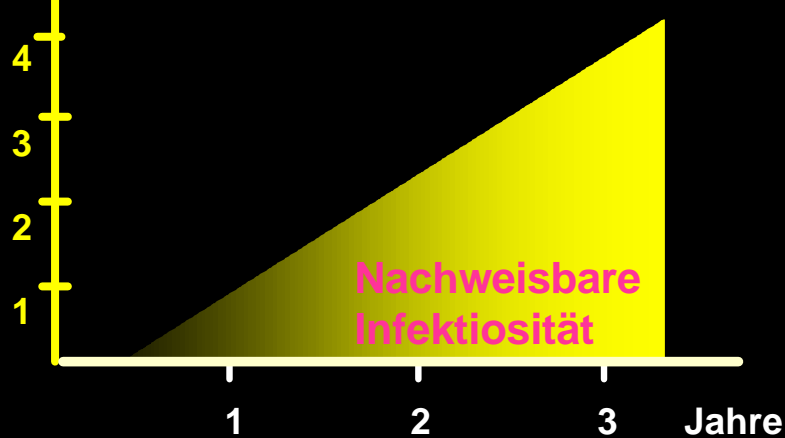
- 1985
- 1990
- 1991
- 1995
- 1996
- 1997
- 1998
- 1999
- 2001
- 2002
- 2003

# TSE-Pathogenese bei Rind und Schaf

log 10 (LD<sub>50</sub>)  
Maus bioassay



log 10 (LD<sub>50</sub>)  
Maus bioassay



# BSE and Scrapie Strain Typing

Inoculation of sheep scrapie  
brain sample in 90 mice



**RIII**



**C57BI**



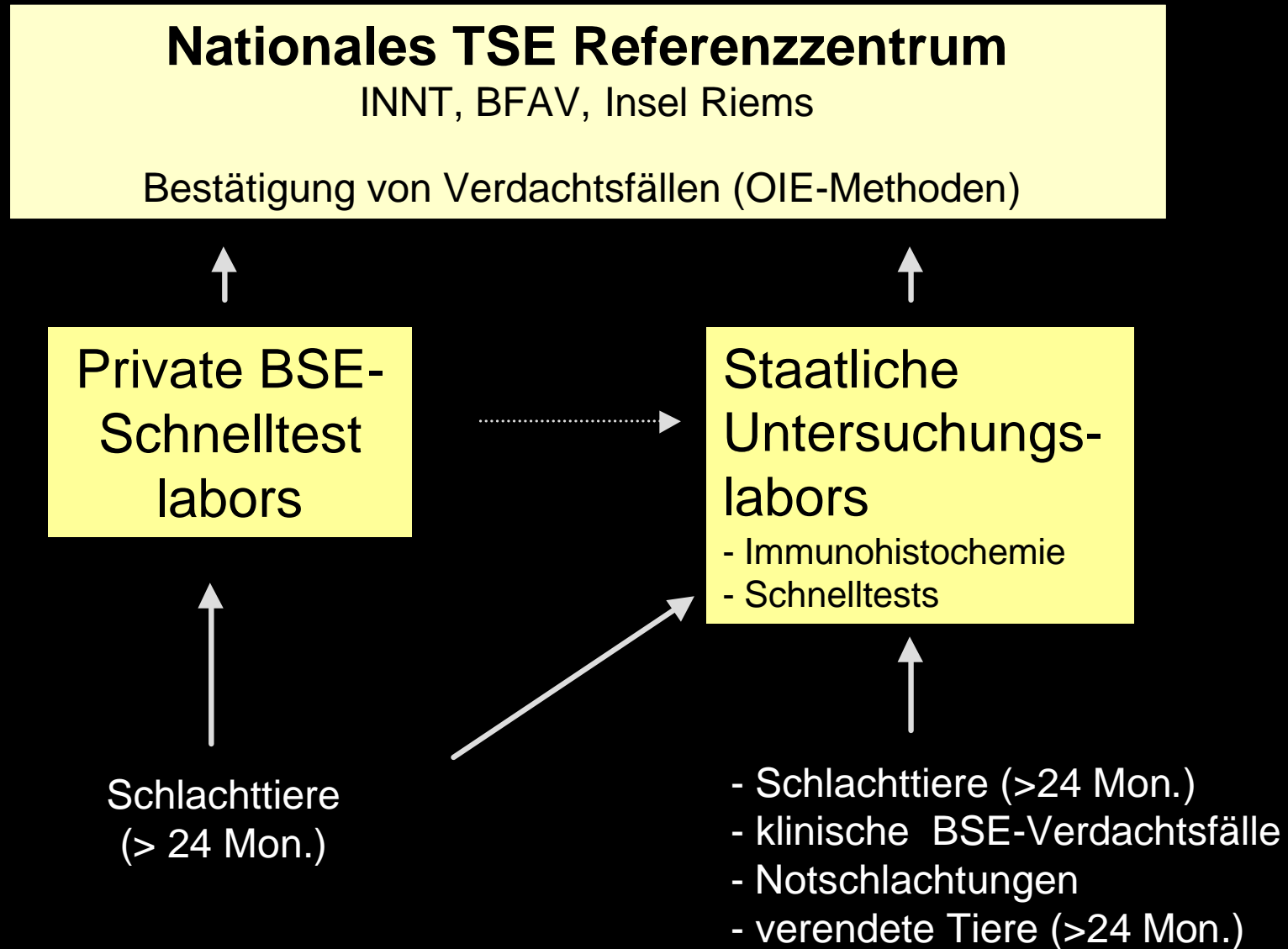
**VM95**

- \* Incubation time
- \* brain lesion profile

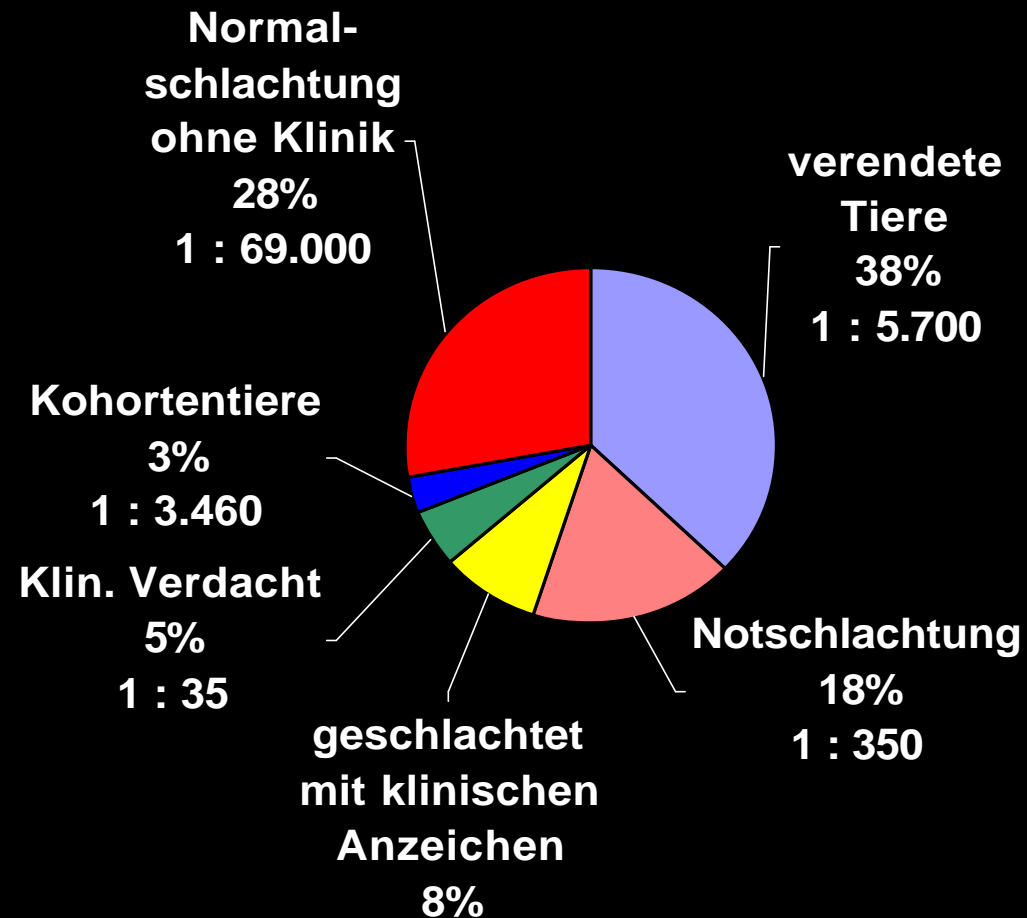
- \* Glycotyping
- \* Proteinase K cleavage site
- \* Long term Proteinase K resistance

# BSE-Überwachung in Deutschland

---



# Untersuchungsanlass der deutschen BSE-Fälle (n = 114)





# BSE-Post-Mortem-Tests

Nachweis der Infektiosität

Maus bioassay (Zeit-, Kosten- und Arbeitsintensiv)

Neuro-Morphologie

Histopathologie

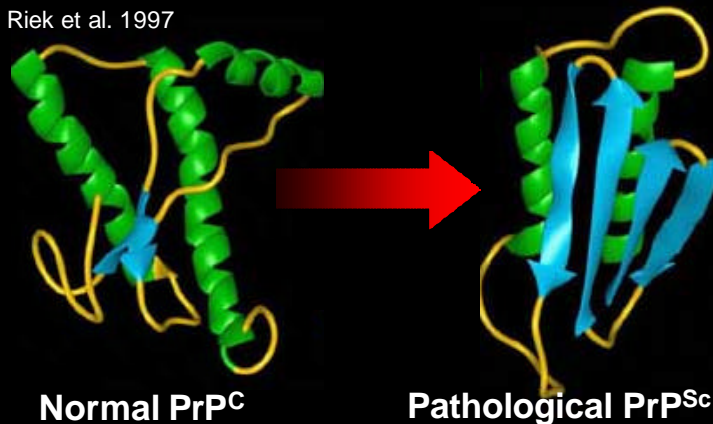
Nachweis des Prion  
Proteins

BSE-Schnelltests

OIE immunoblot

Immunohistochemie

Riek et al. 1997



## Properties of PrP<sup>Sc</sup>

- Protease-Resistance
- Fibrillogenesis (Hydrophobicity)
- Specific Antigenicity (lack of discriminating antibody)

# BSE Lebendtests

## Surrogatmarker

## PrP-Überexpression auf peripheren Leucozyten

(Boehringer Ingelheim)

**U-PrP** (Gabizon et al., 2001)

**14-3-3 protein in Liquor** (Repairgenics, Mainz)

**EDRF im Blut** (Hunter et al. 2001)

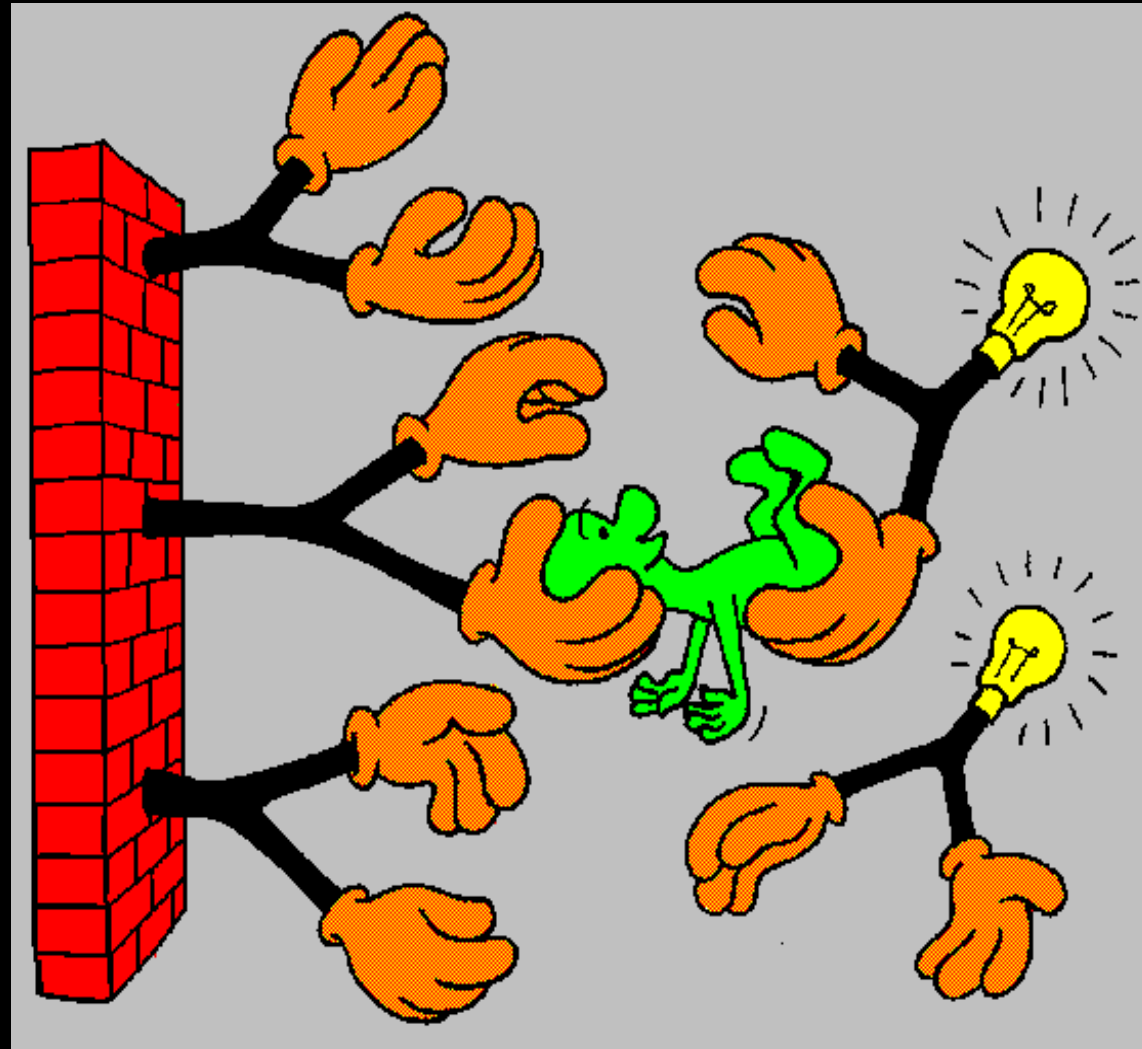
**spez. RNA im Blut** (Göttinger Lebendtests)

## Verhaltenstest

(U. Braun)



# PRINCIPLE OF THE BIORAD-CEA TEST: TWO-SITE IMMUNOMETRIC ASSAY

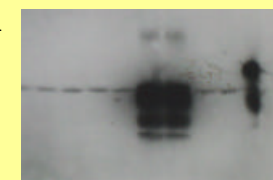
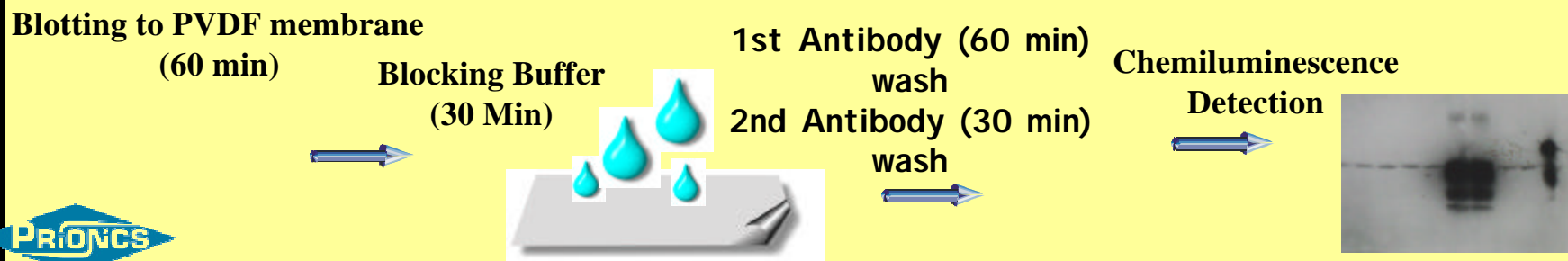
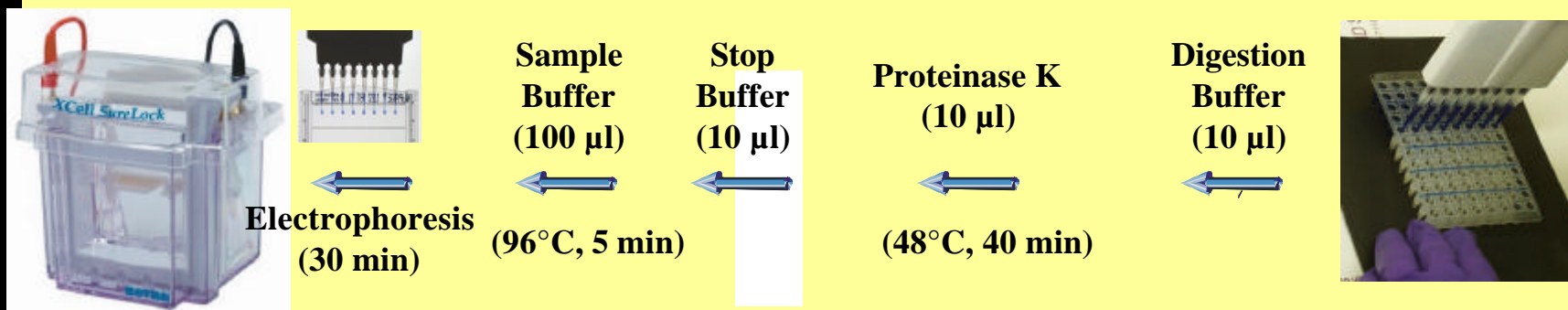
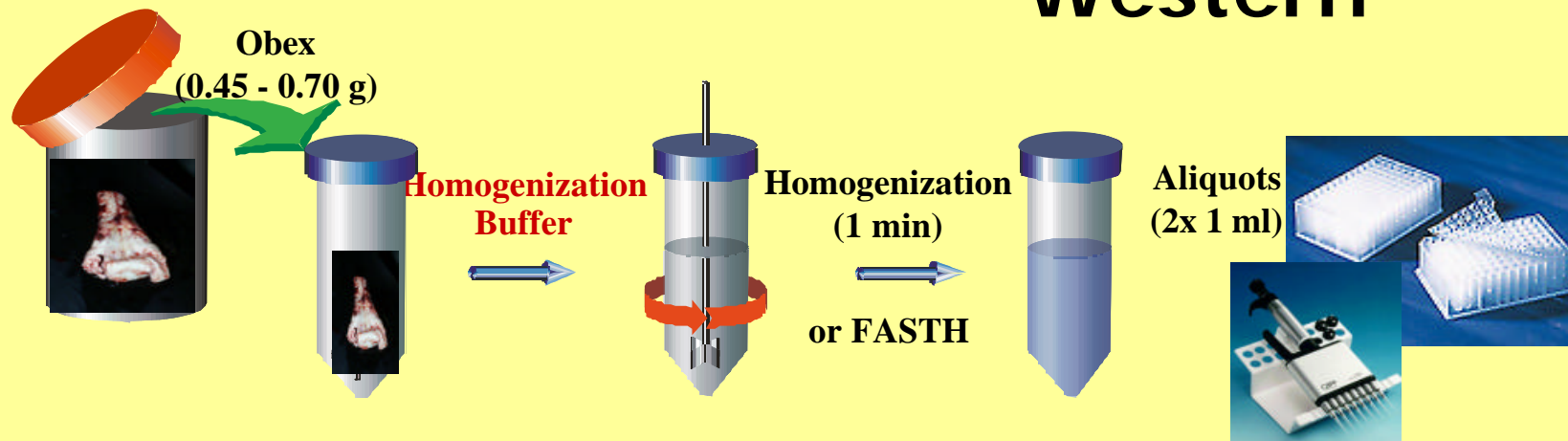


# Test steps of Prionics<sup>®</sup>-Check

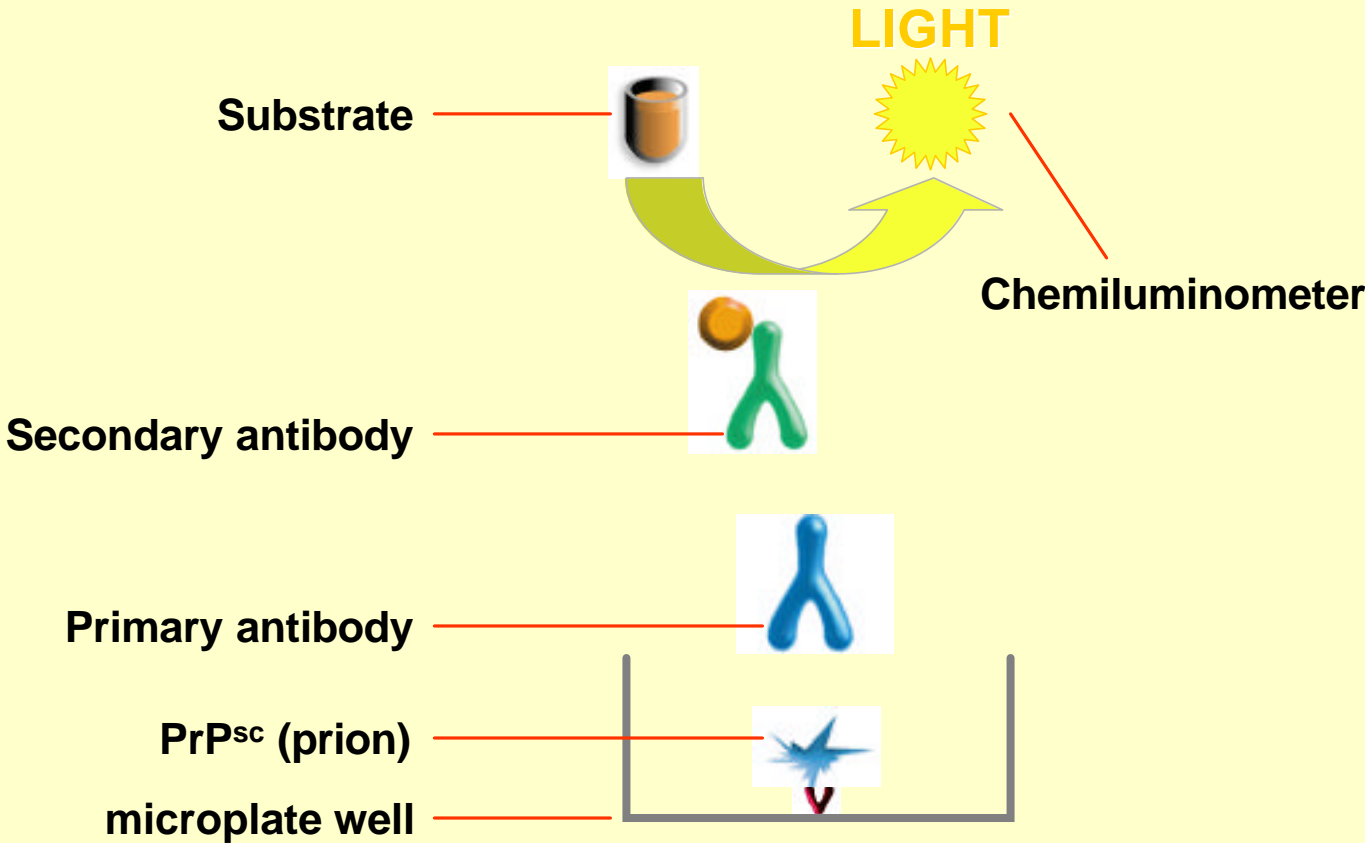


Diagnostics

## Western



# Enfer TSE ELISA





**Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger  
an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere**

---

**Hoheitliche Aufgaben des Nationalen Referenzzentrums für BSE/Scrapie**

- **Bestätigung von TSE-Verdachtsfällen (OIE-Methoden)**

## OIE-ImmunoBlot

---

4 g

Hirnhomogenat

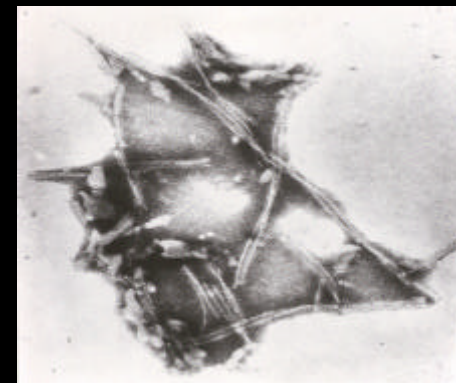
↓  
Ultrazentrifugation

↓  
Proteinase K Verdau

↓  
Ultrazentrifugation

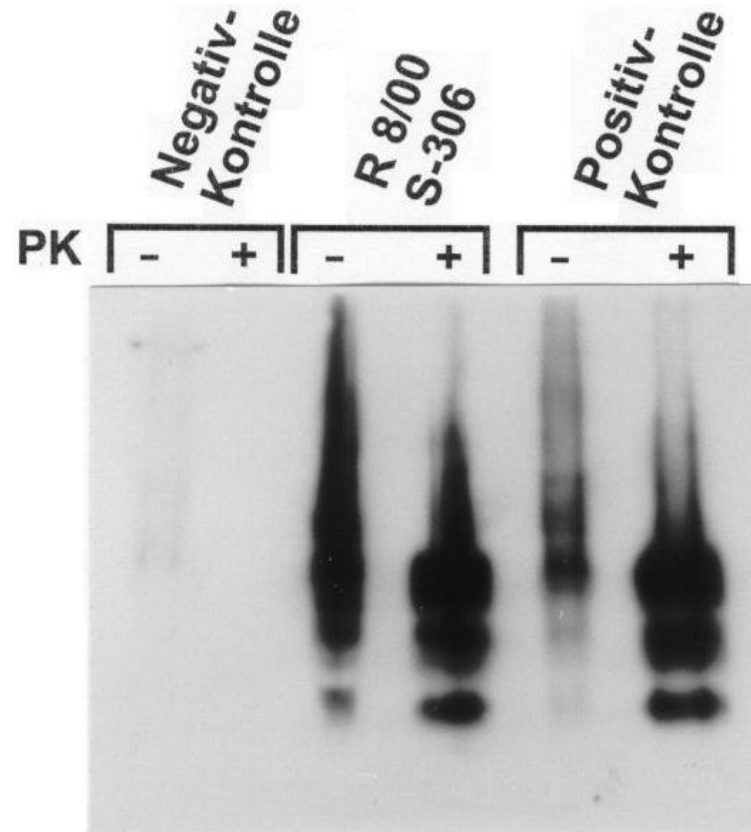
↓  
1500 mg

↓  
SDS-PAGE  
ImmunoBlot



# OIE-Immuno blot

BSE-Verdachtsfall R 8/00 , Labor-Nr. 306/00

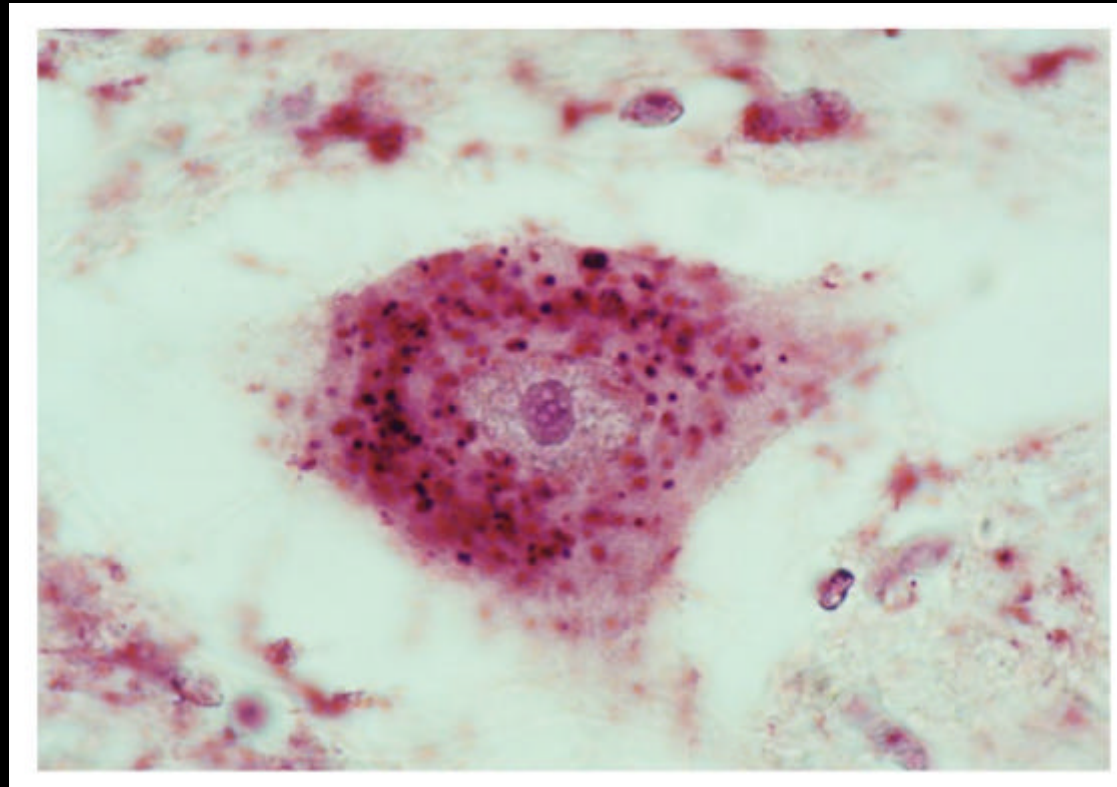


O.I.E.  
Immuno blot  
mAK P4

## OIE-empfohlener Bestätigungstest: Immunohistochemie

---

- Vorbehandlung nach veröffentlichter Methode
- an der BFAV entwickelt
- Färbung im Autostainer
- Antikörper: L42, P4, F99, F89, SAF70, 6H4



## Untersuchungszahlen an der BFAV (Stand 26.03.03)

---

	<b>BSE- Verdacht</b>	<b>bestätigte BSE-Fälle</b>	<b>Scrapie- Verdacht</b>	<b>bestätigte Scrapie-Fälle</b>
<b>1998</b>	<b>52</b>	<b>0</b>	<b>34</b>	<b>3</b>
<b>1999</b>	<b>9</b>	<b>1 (Portugal)</b>	<b>7</b>	<b>3</b>
<b>2000</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>1</b>
<b>2001</b>	<b>224</b>	<b>125</b>	<b>4</b>	<b>3</b>
<b>2002</b>	<b>177</b>	<b>106</b>	<b>40</b>	<b>35</b>
<b>2003</b>	<b>34</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>7</b>



# **Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere**

---

## **Hoheitliche Aufgaben des Nationalen Referenzzentrums für BSE/Scrapie**

- **Bestätigung von TSE-Verdachtsfällen (OIE-Methoden)**
- **BSE-Schnelltests: Evaluierung**
  - Zulassung nach Tierimpfstoff-Verordnung**
  - Chargenprüfungen**

# Zulassung von BSE-Schnelltests in Deutschland

---

<b>Prionics Check<sup>®</sup> Immunoblot</b>	<b>zugelassen</b>
<b>BioRad Platelia<sup>®</sup></b>	<b>zugelassen</b>
<b>Enfer ( Abbott)</b>	<b>zugelassen</b>
<b>Repairgenics (14-3-3 in CSF)</b>	<b>Verfahren läuft</b>
<b>Prionics LIA</b>	<b>Verfahren läuft</b>

# **Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere**

---

## **Hoheitliche Aufgaben des Nationalen Referenzzentrums für BSE/Scrapie**

- **Bestätigung von TSE-Verdachtsfällen (OIE-Methoden)**
- **Schnelltests: Evaluierung**
  - **Zulassung nach Tierimpfstoffverordnung**
  - **Chargenprüfung und -freigabe**
- **Beratung und Überwachung der BSE-Schnelltestlabors (Ringversuche)**



## Zahl der BSE-Schnelltestlabors in Deutschland

	Prionics	BioRad	Gesamtzahl der Labors
Staatl. + 'Halb'- Staatl. Labors	8* + 2	19* + 5	32
Private Labors	5	20	25
Total	15	44	57

\* 2 Labors beide Verfahren

# Proficiency-Testing (BSE-Ringtest)



## Schwierigkeiten

- Anfangs kaum verfügbares BSE-Probenmaterial
- Kaum verfügbare definierte (?) schwach-positive Referenzproben
- Inhomogenität der PrP<sup>res</sup>-Ablagerungen im Gewebe
- Erheblicher Probenverbrauch durch jeden Testdurchgang

## Lösungswege

- Gewebe-Verdünnungen: BSE-Stammhirn in negativem Stammhirn
- Suboptimale Proben: Autolytisches Material  
Großhirn, Zerebellum

## Probleme

- Diluens zur Gewebepool-Herstellung kann Test beeinflussen
- Gleichmäßigkeit der Homogenisation
- Art der Homogenisation
- Lagerung des homogenisierten Gewebepools (plus Verdünnungen)  
(Diluens, -20°C, -70°C, Lyophilisierung)

# **Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere**

---

## **Hoheitliche Aufgaben des Nationalen Referenzzentrums für BSE/Scrapie**

- **Bestätigung von TSE-Verdachtsfällen (OIE-Methoden)**
- **Schnelltests: Evaluierung**
  - **Zulassung nach Tierimpfstoffverordnung**
  - **Chargenprüfung und -freigabe**
- **Beratung und Überwachung der BSE-Schnelltestlabors (Ringversuche)**
- **Bereitstellung von positivem Referenzmaterial an Forschungseinrichtungen und Entwickler neuer Nachweisverfahren**

# Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere

---

## Beiträge des INNT zur nationalen TSE-Forschungsplattform

- **Nationale BSE-Probenbank**

Systematische Sammlung von Proben von

**BSE-Fälle:** 215 Gehirnstammproben,  
davon 17 komplette Hirne

**klin. BSE-Fälle:** Proben von 8 seziierten BSE-Tieren (5 Fälle LMU München, 3 Fälle  
TMI Göttingen, 1 Fall BFAV)

**Kohortentiere:** 30 vollständige Kohorten und 30 Teilkohorten, ca. 4000 Tiere  
(Hirnstämme / Blut / Ohrstück mit Ohrmarke)

**Neg. Kontrolltiere:** 200 Gehirnstämme und zugehörige Serumproben

Zurverfügungstellung von Probenmaterial

- **Herstellung und Zurverfügungstellung von TSE-Probenstandards**

## Proben von

- BSE-Fällen - Schlachttiere
- gefallene, notgeschlachtete Tiere
- sezierte Tiere

Geburts- und Fütterungskohorten

Derzeitiger Probenbestand umfaßt mehr als 16.000 Einzelproben von ca. 4.000 Tieren





# **BSE-Pathogenesestudie**

---

**Etwa die Hälfte der Anfragen an die BSE-Probenbank bezieht sich auf Proben, die erst im Rahmen der BSE-Pathogenesestudie gewonnen werden können**

**Kaum Zugang zu Proben von klinischen Verdachtstieren**

# BSE-Pathogenesestudie: Design



## Orale Infektion von 4 Monate alten Kälbern

**Infektionsdosis:** 100g Hirnstamm pro Tier

**Infektionsroute:** orale Eingabe eines Homogenates

**Versuchsaufbau:** 2 Gruppen von 28 Kälbern werden nacheinander:  
- im Infektionsstall infiziert  
- für 4 Wochen im Infektionsstall gehalten (Abfälle werden verbrannt)  
- anschließend Haltung in Freilaufstall (Abwässer werden autoklaviert)

## Probenahme während des Versuchs:

- Blut (EDTA, Serum, ‚Buffy coat‘) alle 6 Wochen
- Liquor cerebrospinalis (unter Sedation) alle 4 Monate
- Urin alle 2 Monate

**Tötung und Sektion der Tiere zu festgelegten Zeitpunkten nach Versuchsplan**

# BSE-Pathogenese Studie : Design



## Tötung und Sektion

Zeit nach Versuchsbeginn (Monate)	Infizierte Tiere	Kontrolltiere
0	-	5
1	2	1
4	3	1
8	4	1
12	5	1
16	5	1
20	5	1
24	5	1
28	5	1
32	5	1
36	5	1
40	4	1
44	4	1
48	4	1
<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>18</b>

# BSE-Pathogenese Studie : Probenahme bei Sektion



**~80 Proben: Formalin-fixiert, gefroren und teilweise in flüss. Stickstoff gefroren**

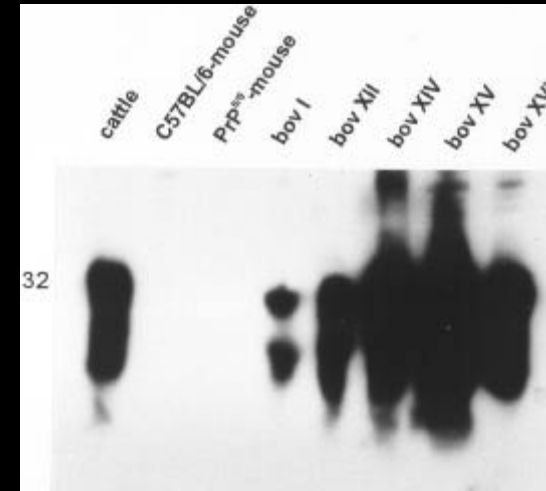
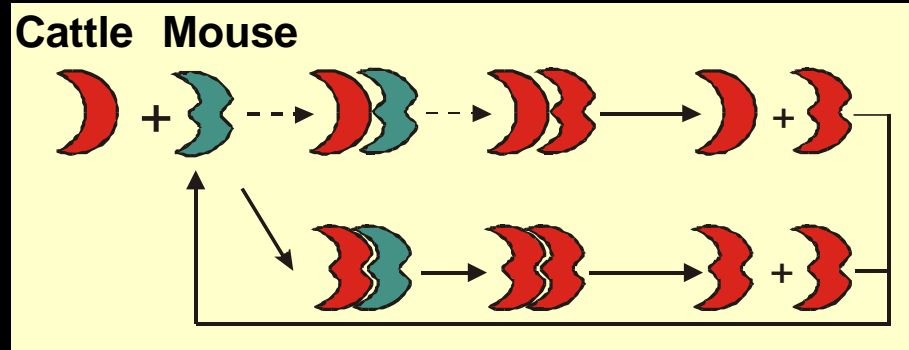
Submandibular Salivary gland  
Submandibular lymph nodes  
Sternocephalicus muscle  
Cranial Oesophagus  
Cervical thymus  
Brain (all regions)  
Caudal Medulla  
Parotid salivary gland  
Facial nerve  
Massette muscle  
Tonsil  
Pharynx  
Tongue  
Oral mucosa  
Retro-pharyngeal lymph nodes  
Nictitating membranes  
Dura mater  
Trieminal ganglia  
Pituitary gland  
Retina  
Conjunctiva  
Respiratory epithelium  
Nodose ganglia  
Skin  
Popliteal lymph node  
Semitendinosus muscle  
Sciatic nerve

Achilles tendon  
Longissimus dorsi  
Prescapular lymph node  
Triceps muscle  
Radial nerve  
Spleen  
Liver  
Pancreas  
Adipose tissue  
Kidney  
Adrenal gland  
Hepatic lymph nodes  
Mesenteric lymph node  
Duodenum  
Distal ileum  
Ileal Peyers patch  
Jejunum  
Spiral colon  
Rumen  
Abomasum  
Omasum  
Rectum  
Faeces  
Aorta  
Psoas major  
Diaphragm  
Phrenic nerve

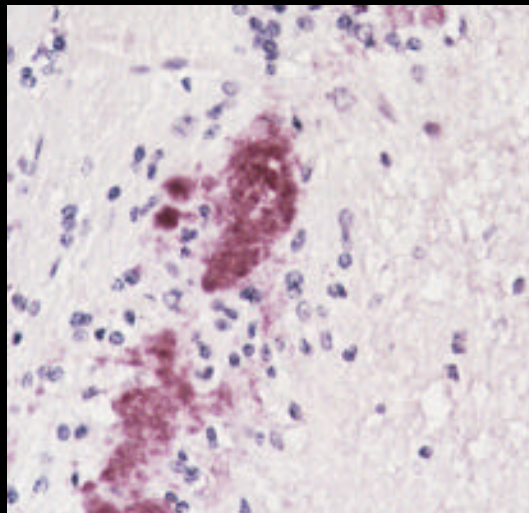
Pericardium  
Lung Left Caudal  
Heart (LV)  
Heart valve  
Broncho-mediastinal lymph node  
Trachea  
Intecostal muscle  
Stellate ganglion  
Bone marrow  
Bone from femur  
C2-  
T10-11  
L3-4  
DRG Ce3-6  
DRG Th5-8  
Cauda equina  
Optic nerve  
Pre-femoral lymph node  
Jejunum Peyer's patch  
Distal ileum without Peyer's Patch  
C1-2  
T9-10  
L2-3  
Blood (EDTA, Serum)  
Buffy Coat  
Liquor  
Urine



# Generation of transgenic mice overexpressing bovine PrP<sup>C</sup> (PrP<sup>0/0</sup>-background)



PrP<sup>Sc</sup>-plaques in Tgbov-mice  
after BSE-infection (IHC)



# 'Contributions'

E. Liebler-Tenorio  
A. Weber  
U. Ziegler

E. Diehl  
F. Junghans

M. Groschup

E. Hillmert  
J. Kaufersch  
Kollegen an der BFAV

## Technical assistance

D. Balkema  
G. Kreplin  
D. Kaufmann  
B. Kalb  
Fr. Ogonowski  
R. Ott  
A. Plotz

A. Braun  
R. Fischer  
S. Schädler

T.C. Mettenleiter

Animal technicians