

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

Dr. Anne Buschmann

Dr. Ute Ziegler

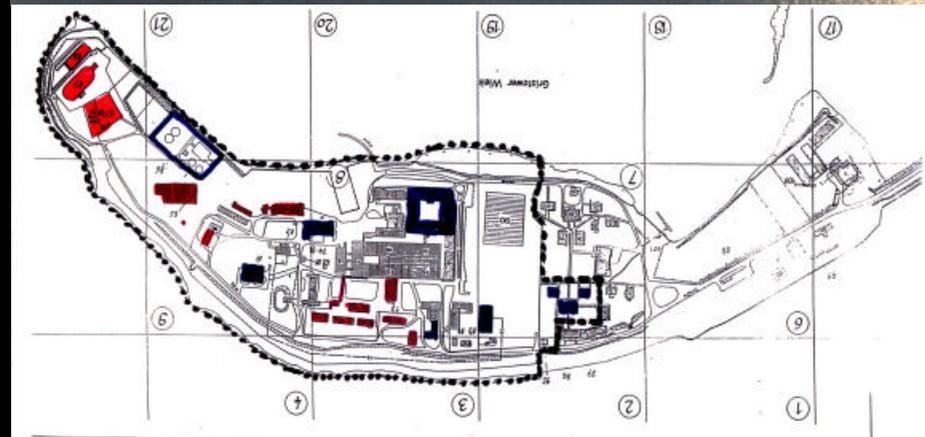
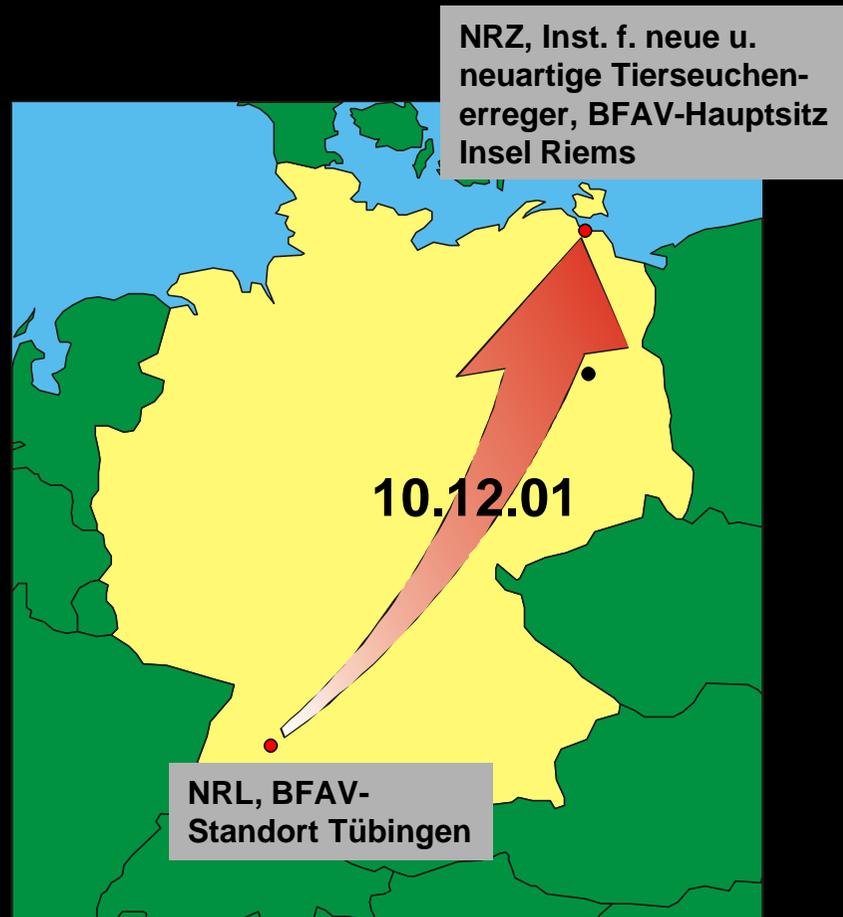
PD Dr. Martin H. Groschup



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



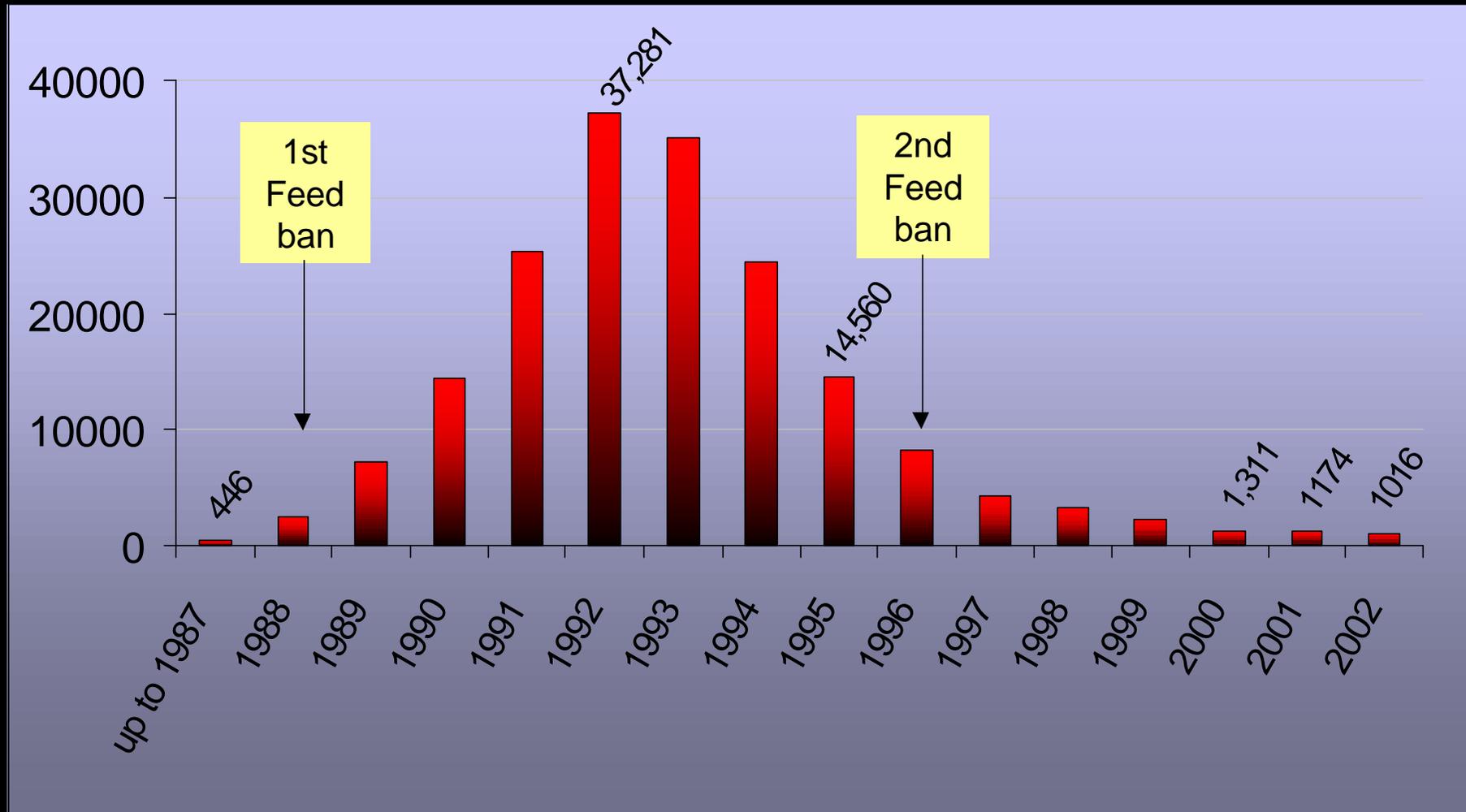
Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere

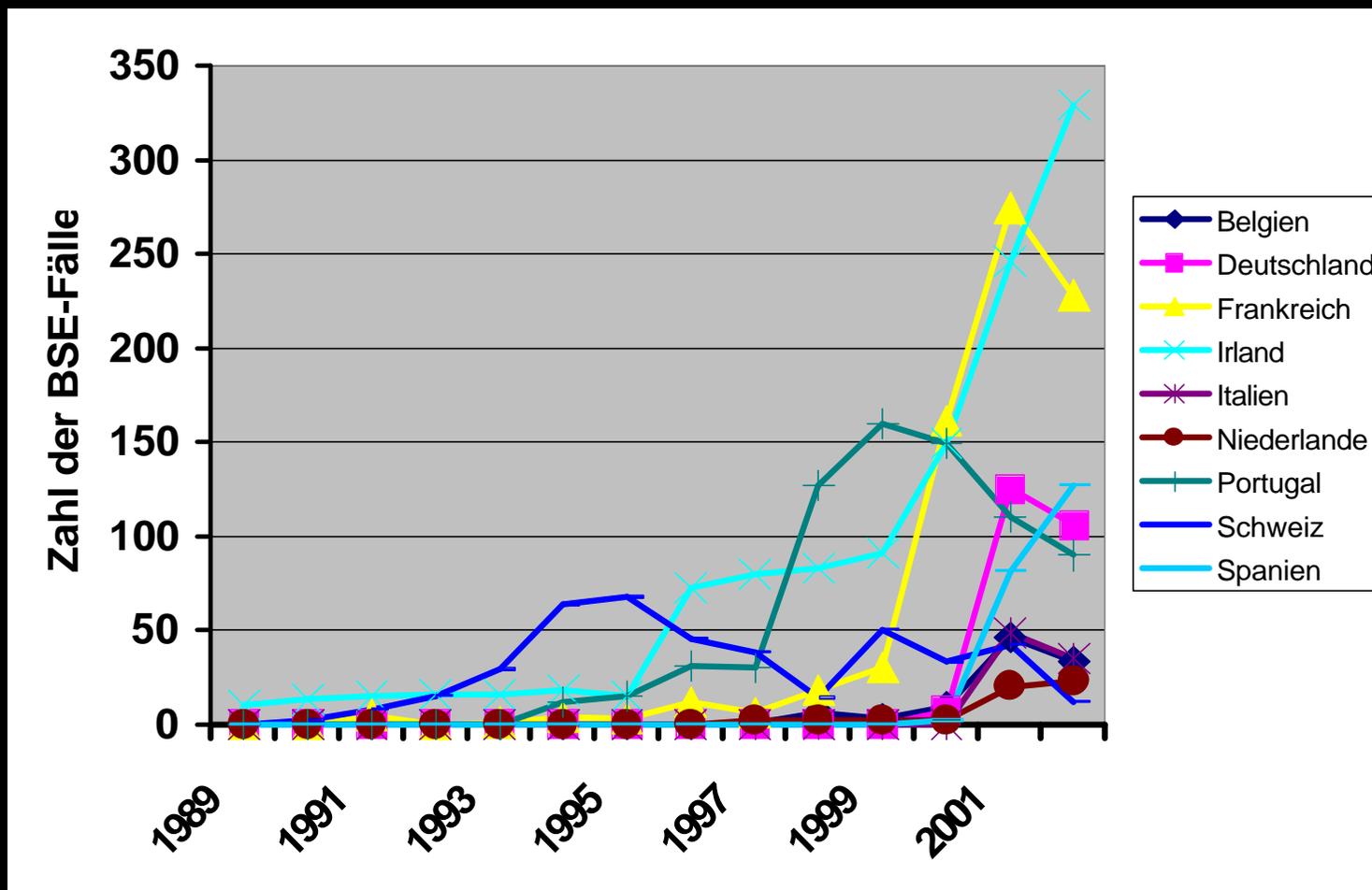


Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSEs) bei Mensch und Tier

| 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 |
| Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) | infektiös | Rind | 1986 |
| Feline Spongiforme E. | infektiös | Katzen | 1991 |
| Variante CJK (vCJK) | infektiös | Mensch | 1996 |

BSE-Fälle im VK





BSE in Deutschland



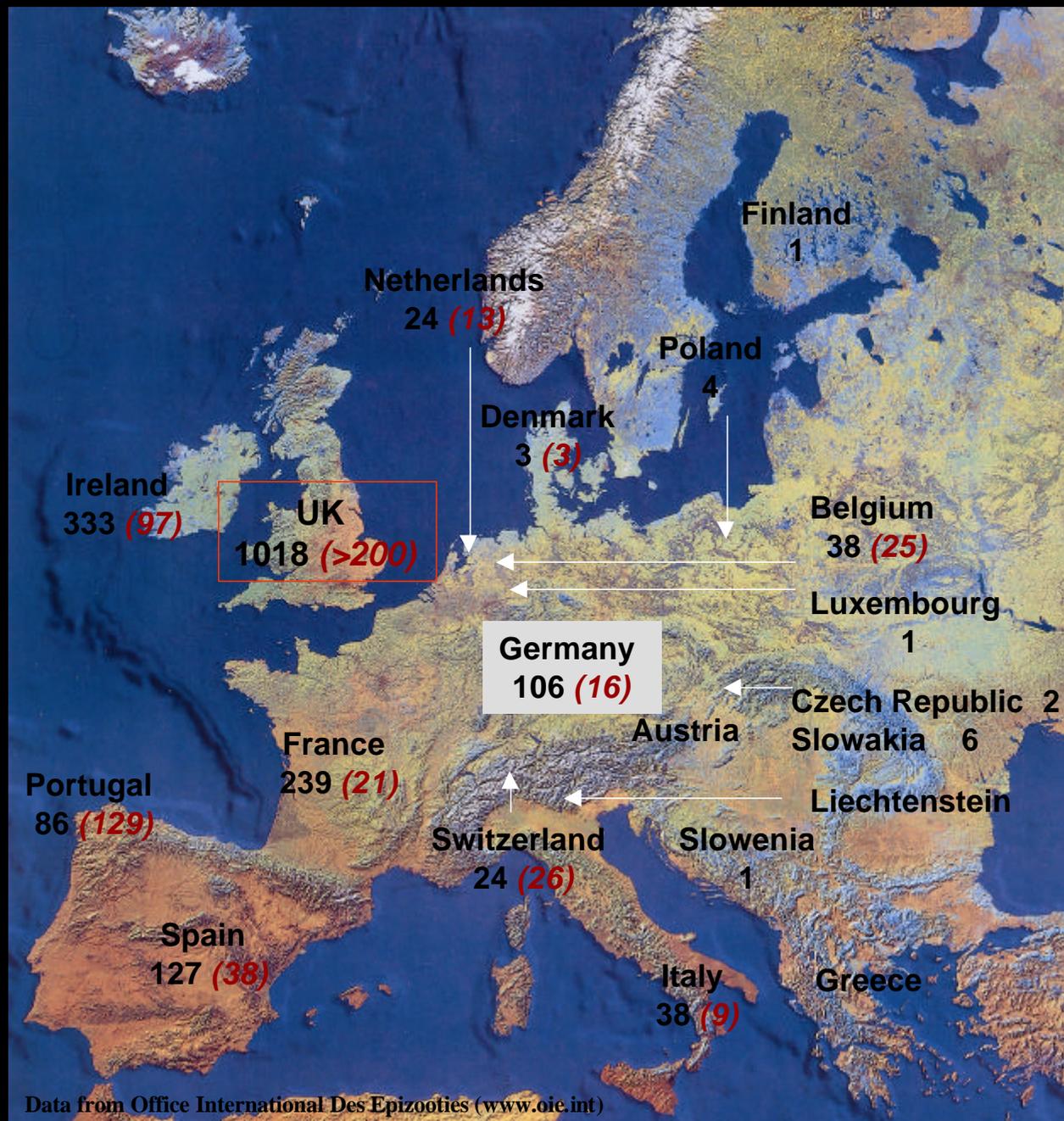
2000: 7 BSE-Fälle

2001: 125 BSE-Fälle

2002: 106 BSE-Fälle

2003: 5 BSE-Fälle bis 26.3.

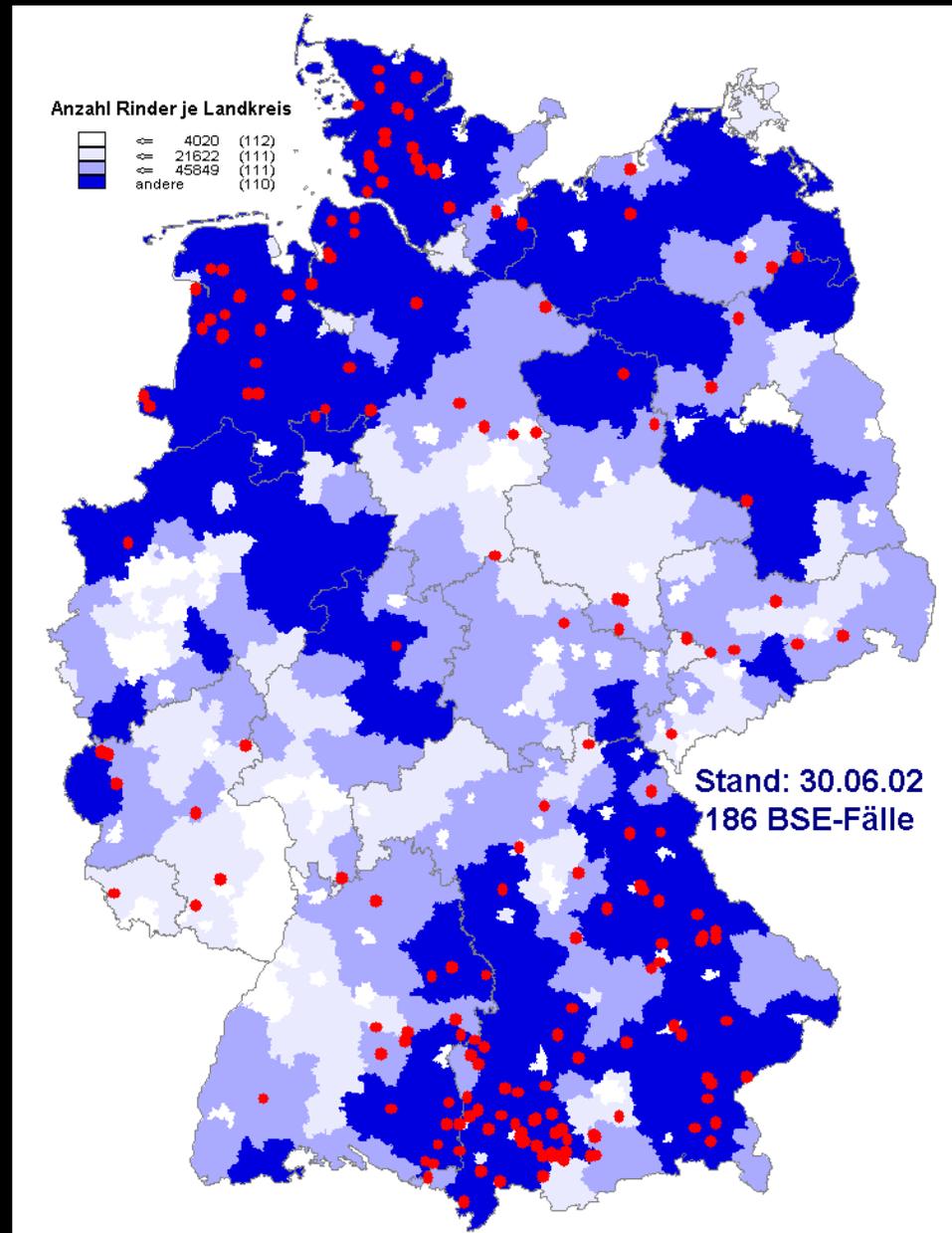
BSE-Fälle im Jahr 2002



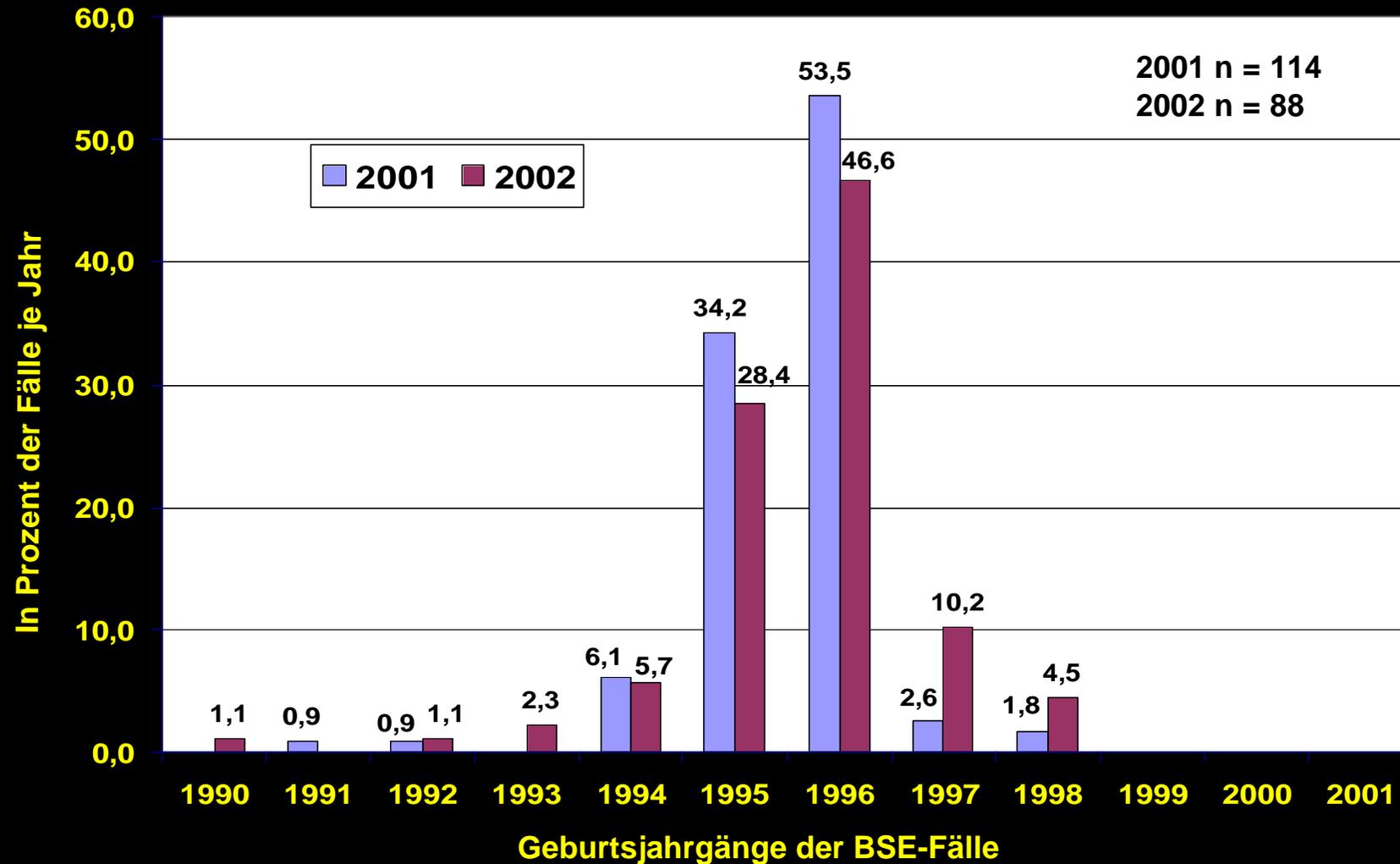
Data from Office International Des Epizooties (www.oie.int)

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

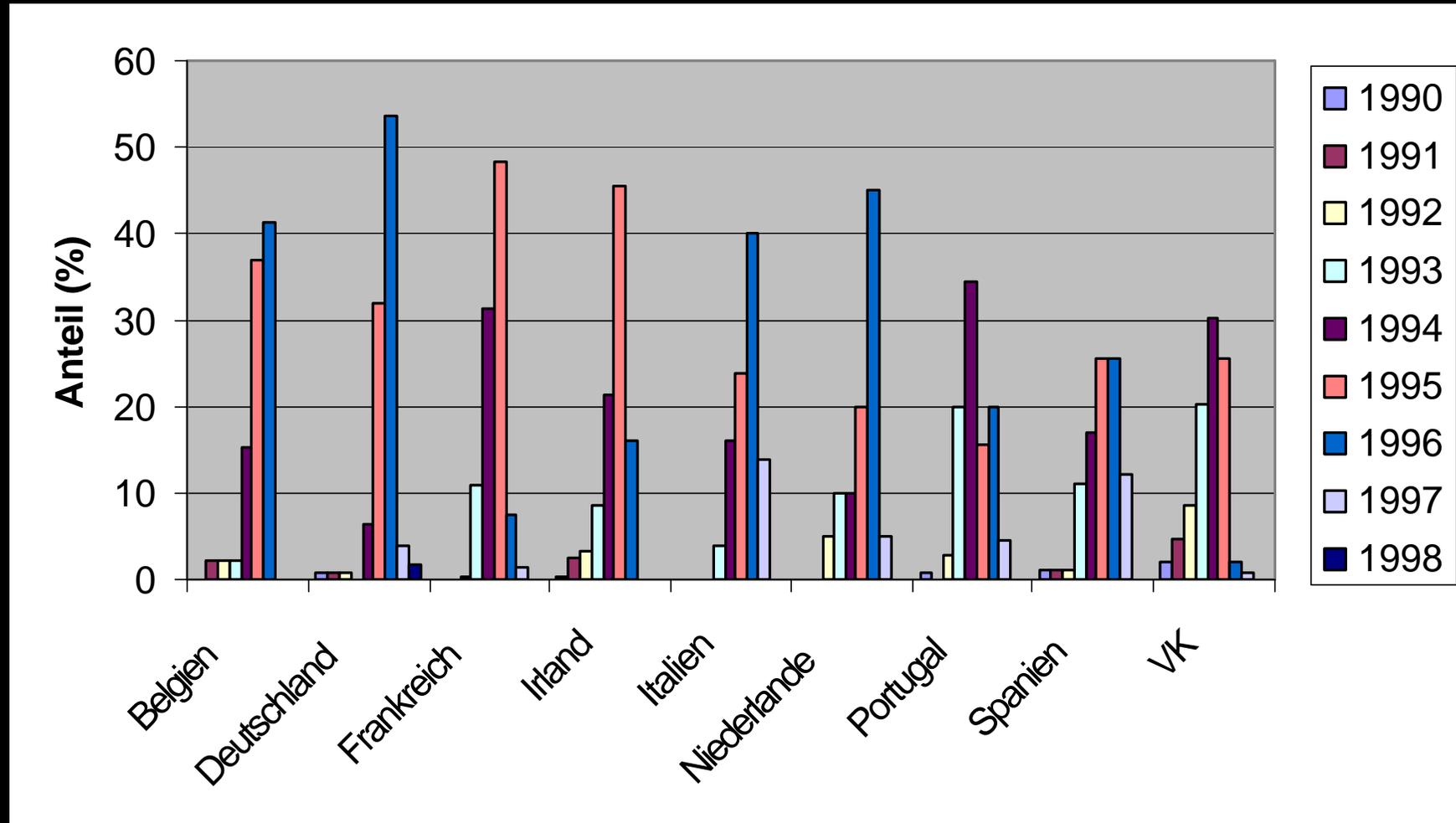
Regionale Verteilung der BSE-Fälle in Deutschland



Geburtsjahrgänge der BSE-Rinder 2001 und 2002

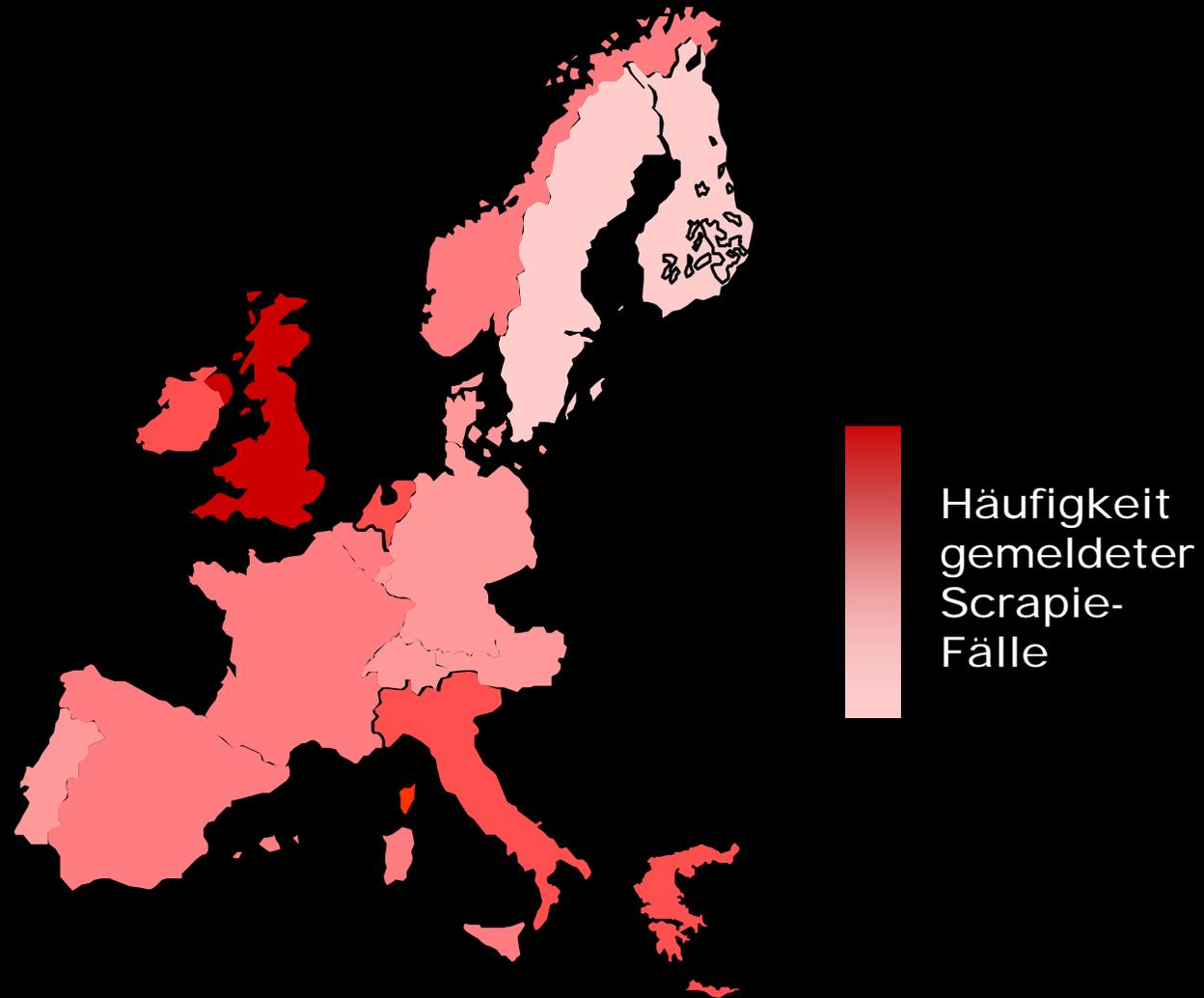


Geburtsjahrgänge der BSE-Rinder in Europa 2001

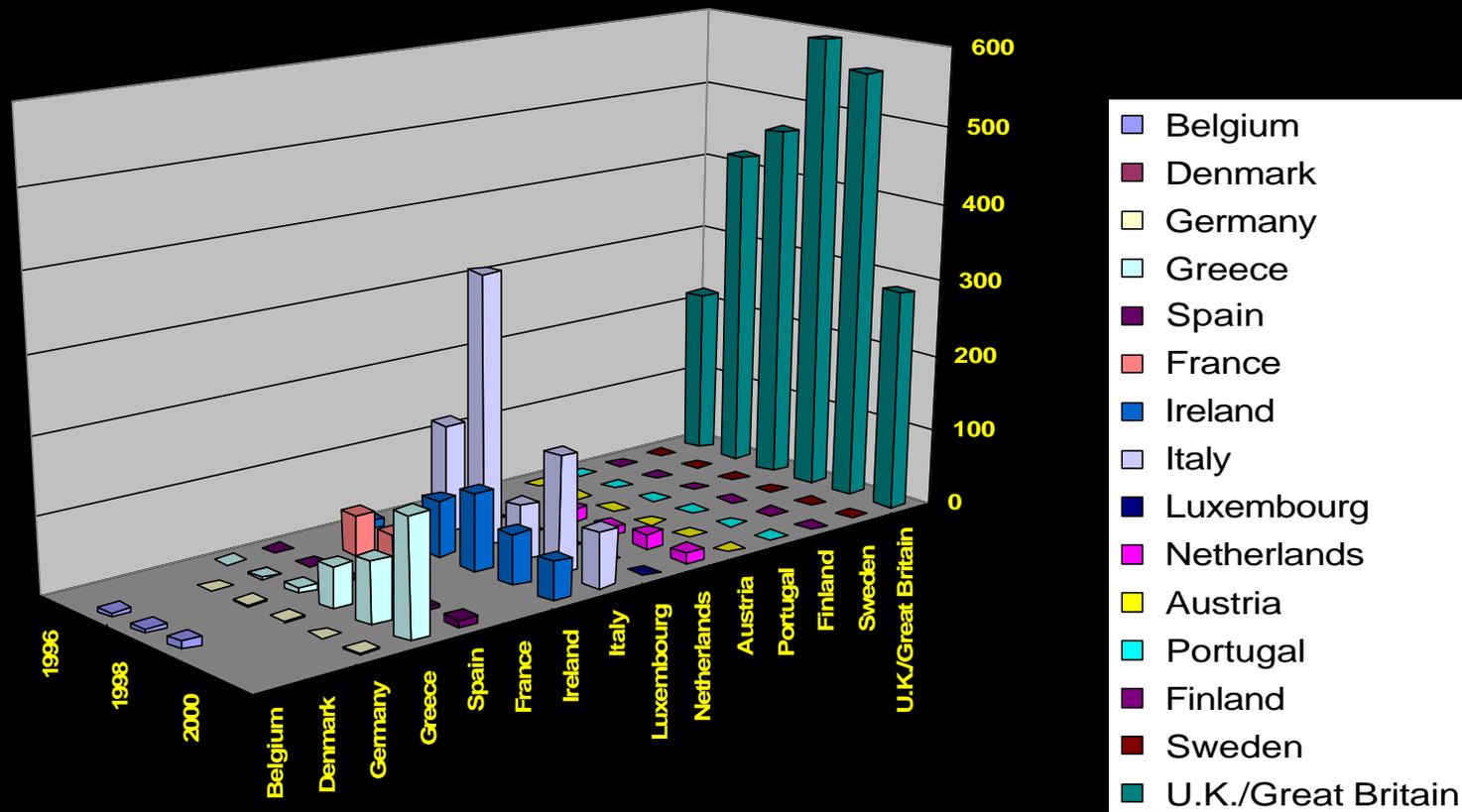


Daten: Europäische Kommission, Report on the Monitoring and Testing of Bovine Animals for the Presence of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), Juni 2002

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

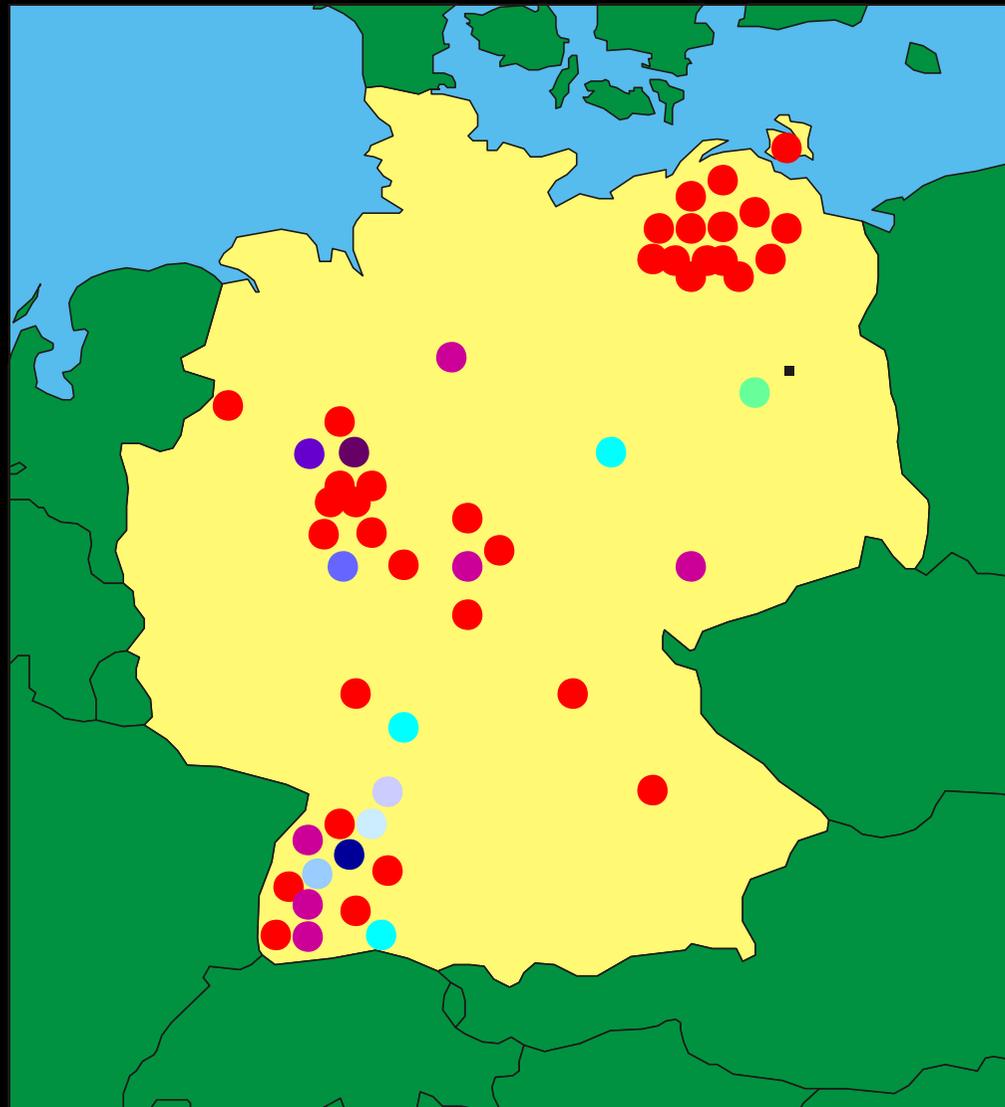
Untersuchung von Schlachttieren

| 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 |

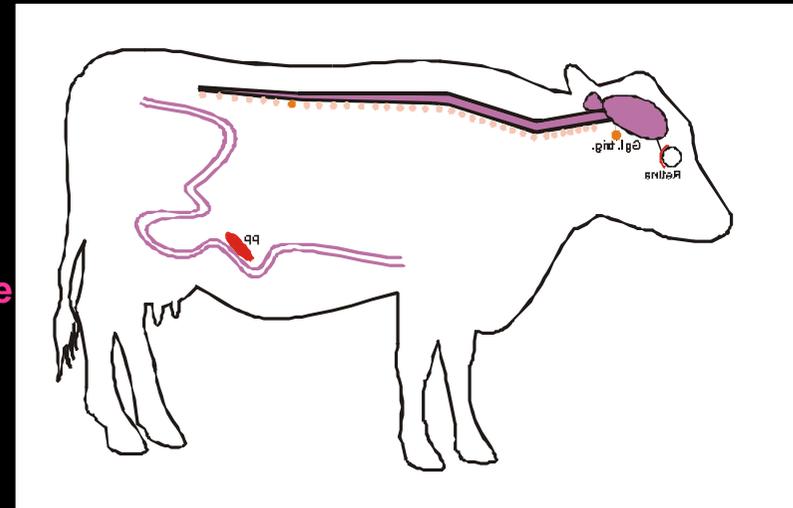
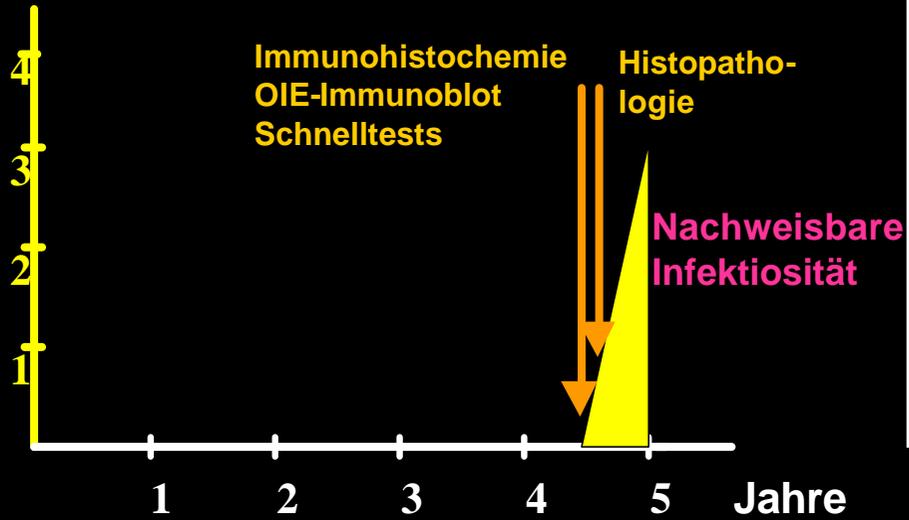
Scrapie-Fälle in Deutschland seit 1985



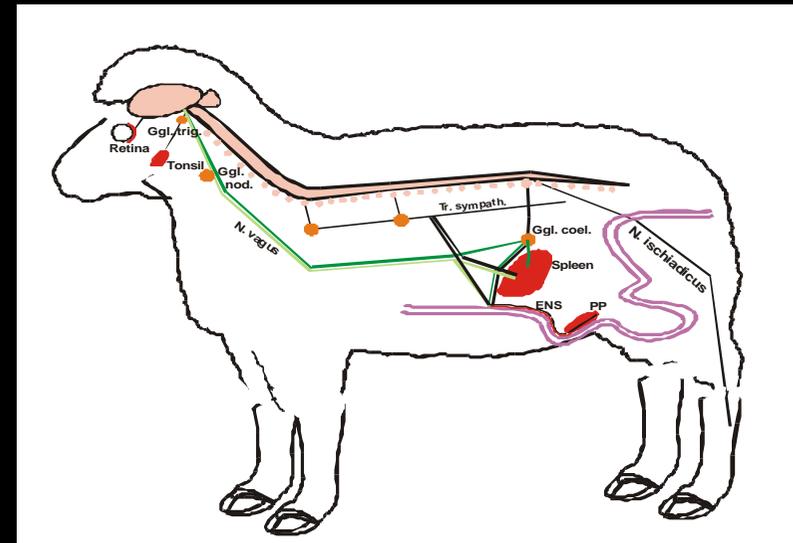
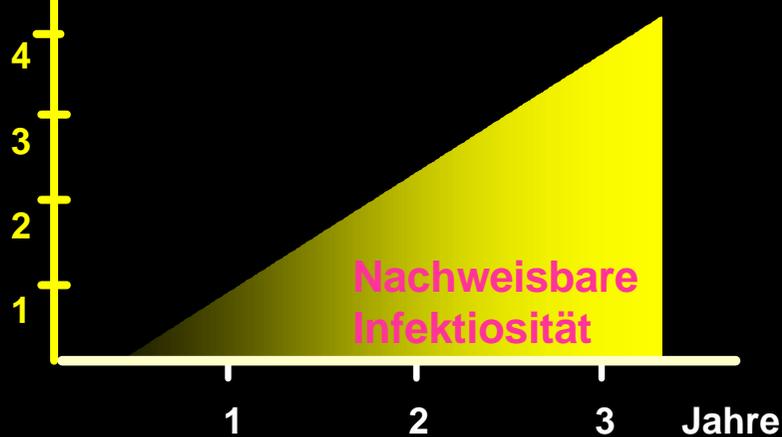
- 1985
- 1990
- 1991
- 1995
- 1996
- 1997
- 1998
- 1999
- 2001
- 2002
- 2003

TSE-Pathogenese bei Rind und Schaf

log 10 (LD₅₀)
Maus bioassay



log 10 (LD₅₀)
Maus bioassay



BSE and Scrapie Strain Typing

Inoculation of sheep scrapie
brain sample in 90 mice



RIII



C57BI

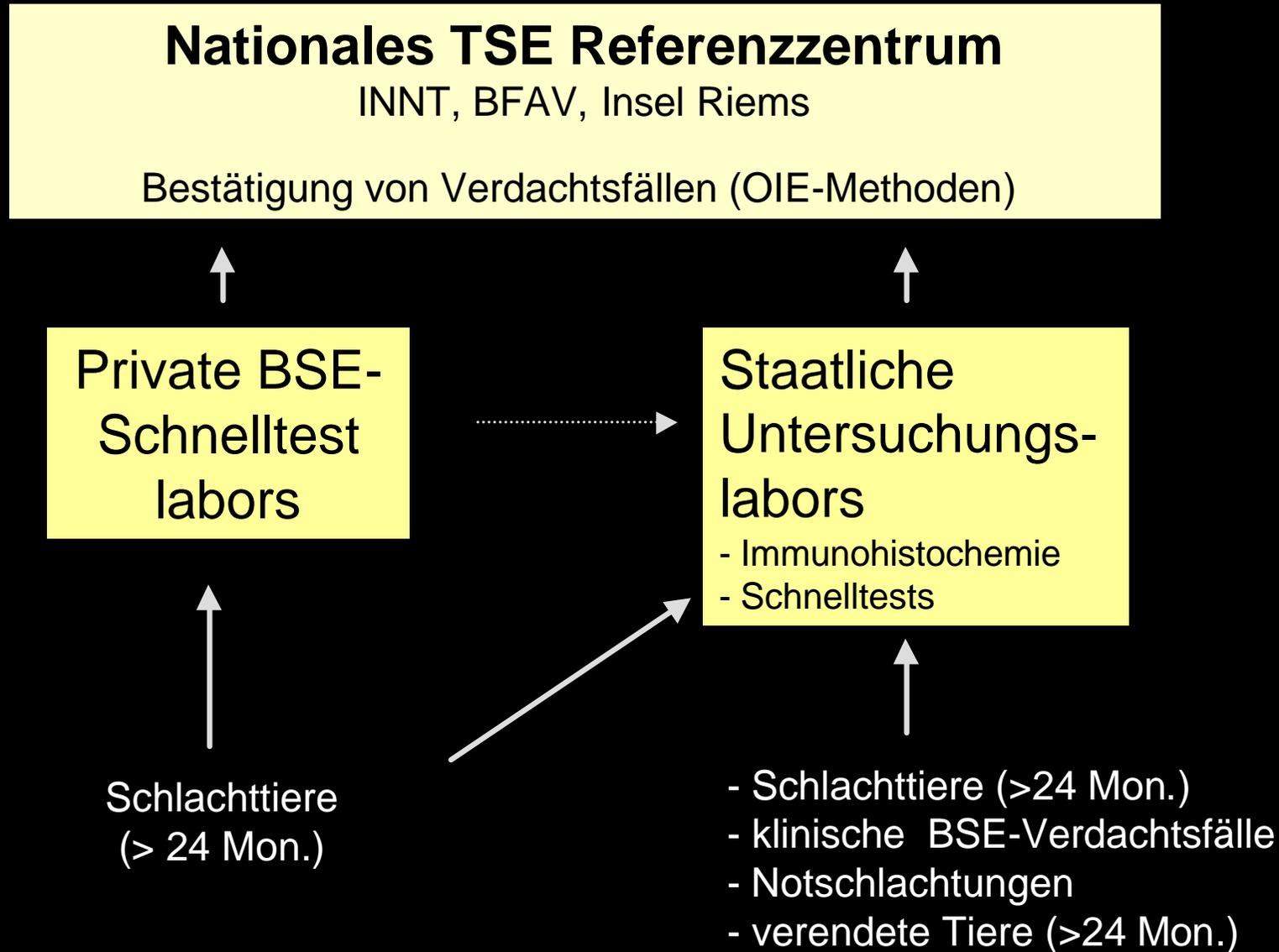


VM95

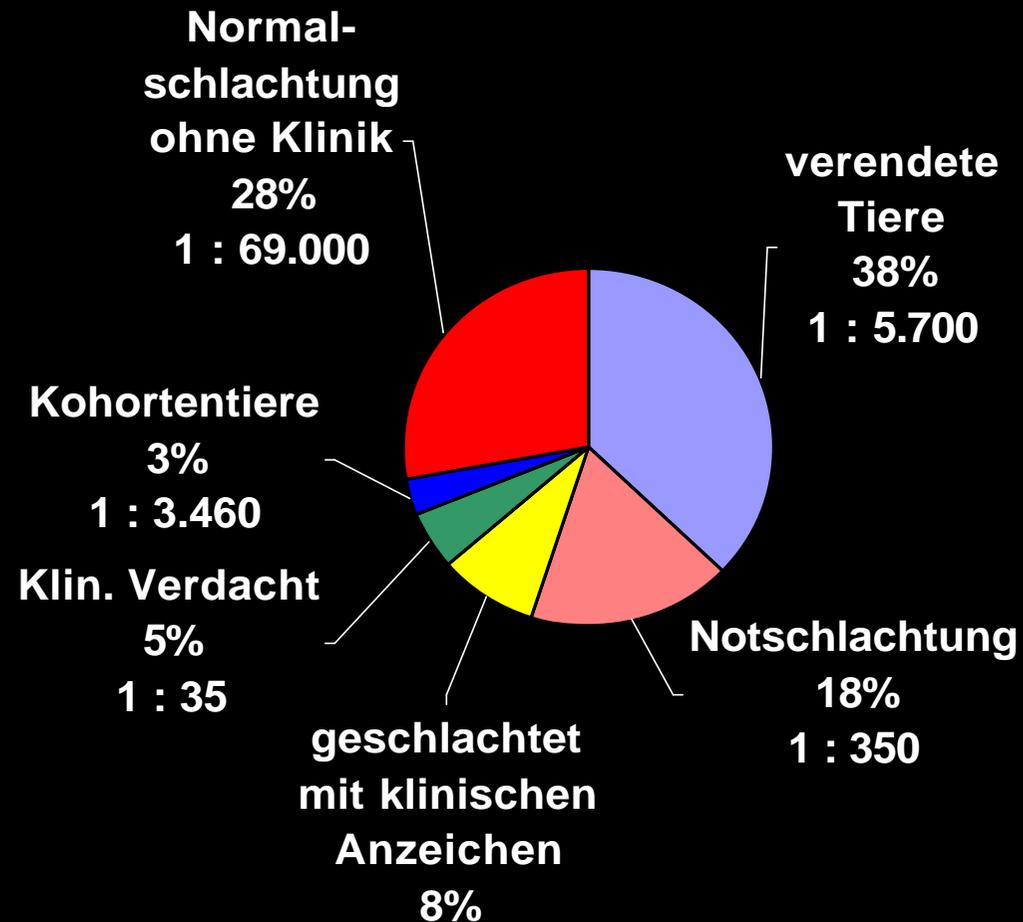
- * Incubation time
- * brain lesion profile

- * 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

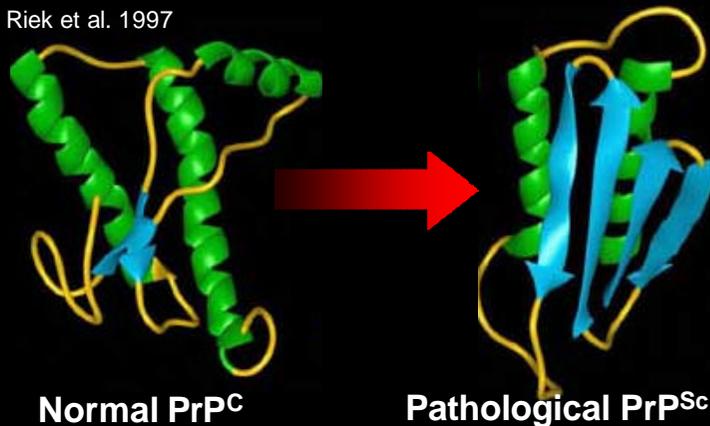
Nachweis des Prion
Proteins

BSE-Schnelltests

OIE immunoblot

Immunohistochemie

Riek et al. 1997



Properties of PrP^{Sc}

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

BSE Lebendtests

Surrogatmarker

PrP-Überexpression auf peripheren Leukozyten

(Boehringer Ingelheim)

U-PrP (Gabizon et al., 2001)

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

EDRF im Blut (Hunter et al. 2001)

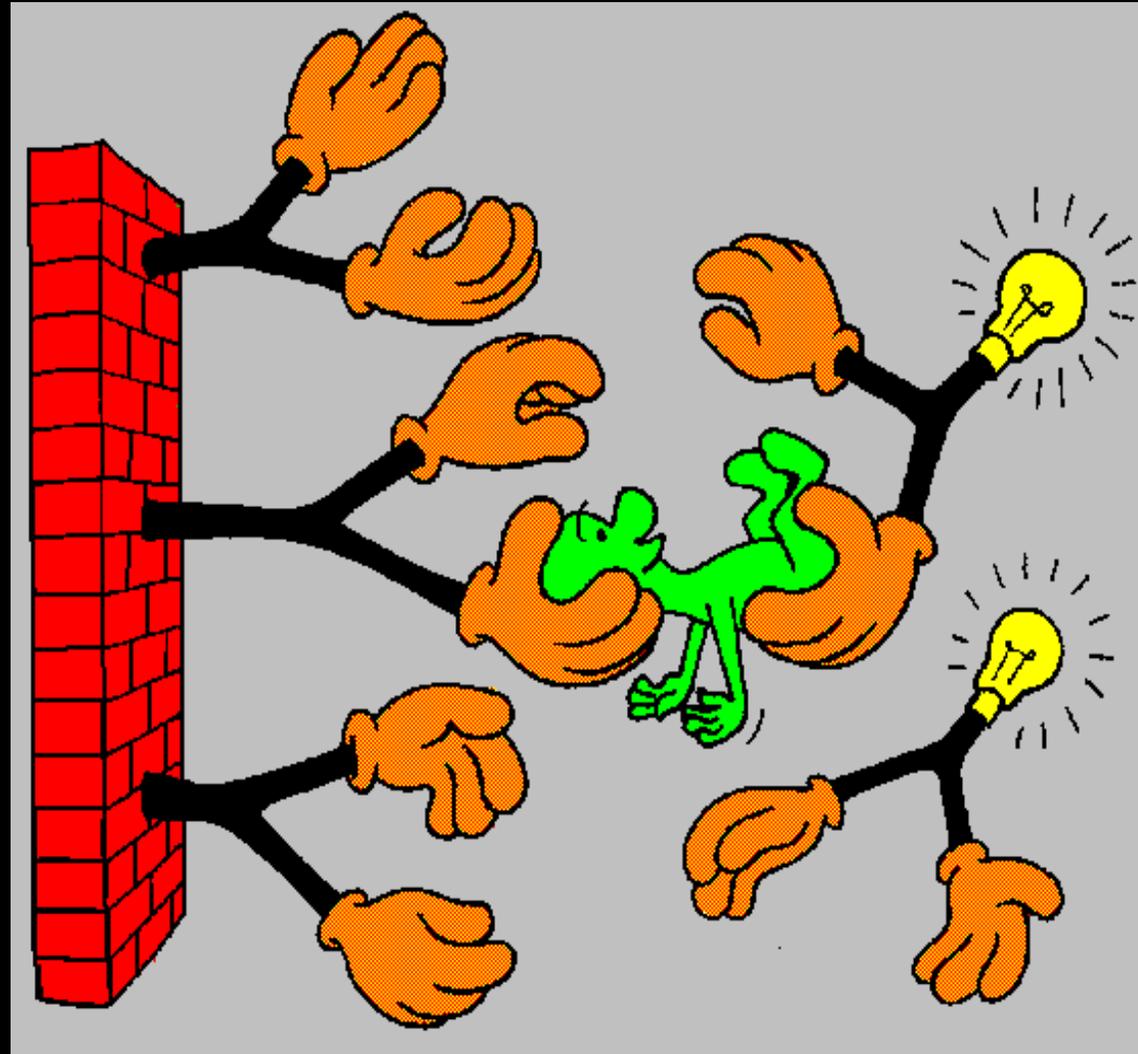
spez. RNA im Blut (Göttinger Lebendtests)

Verhaltenstest

(U. Braun)



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

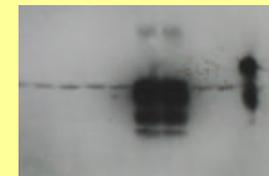
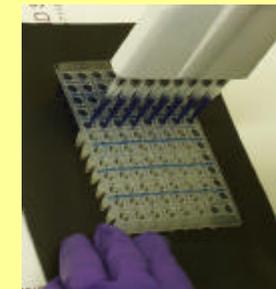


Test steps of Prionics[®]-Check

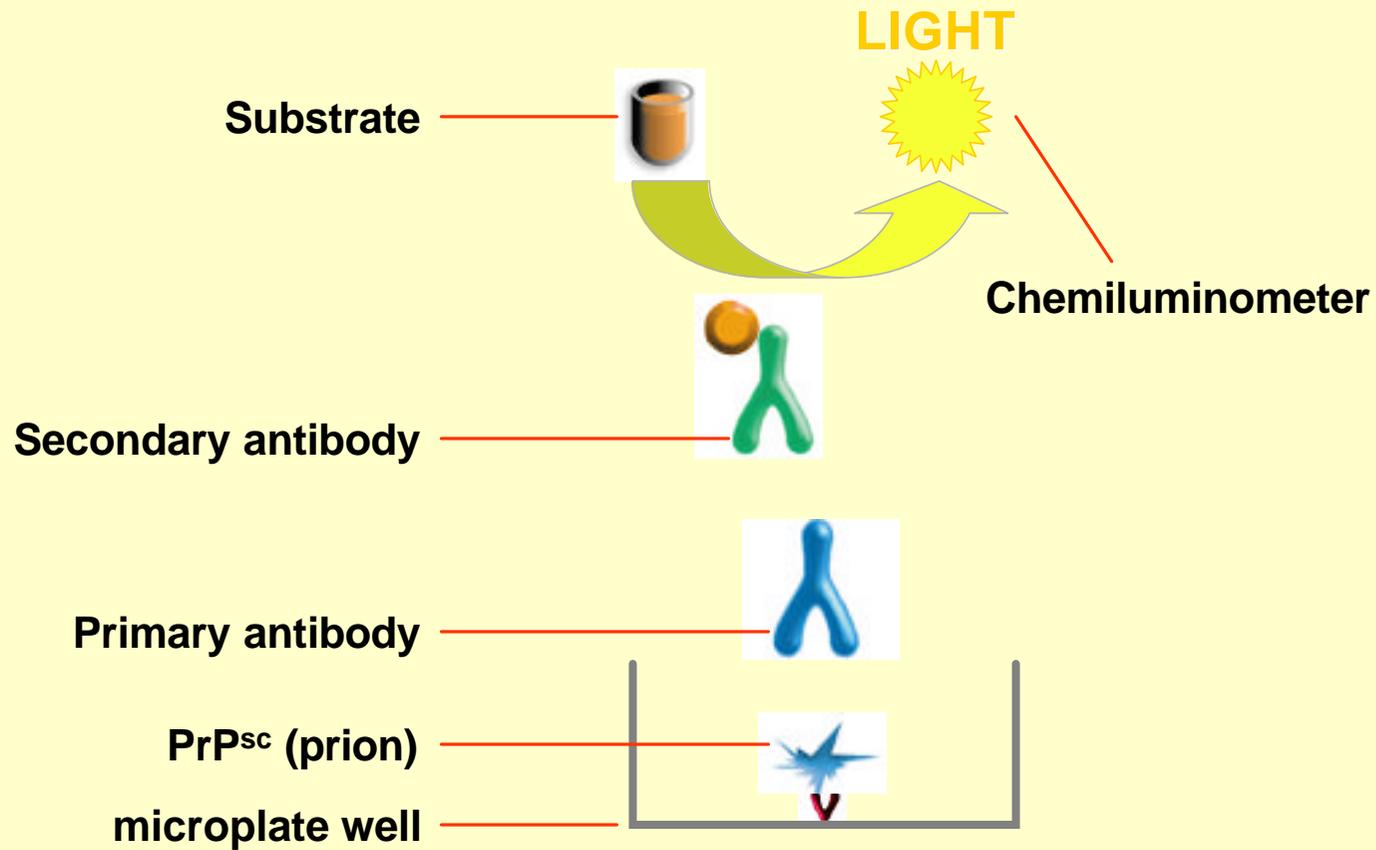


Diagnosics

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

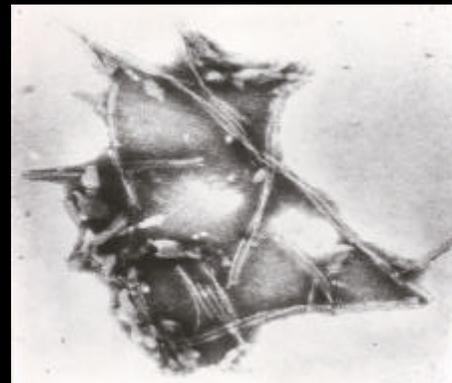
↓
Ultrazentrifugation

↓
Proteinase K Verdau

↓
Ultrazentrifugation

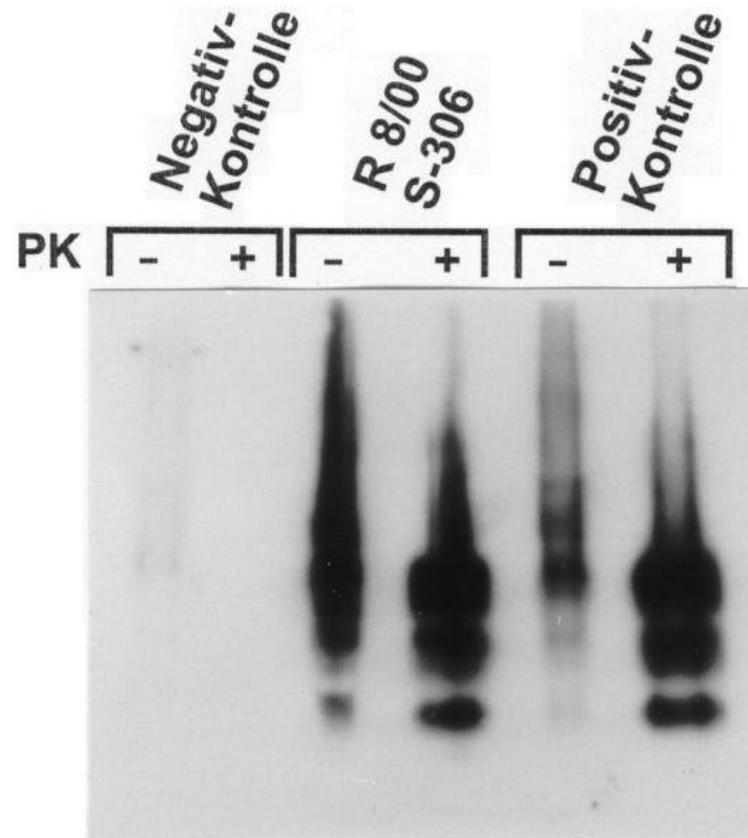
↓
1500 mg

↓
SDS-PAGE
Immunoblot



OIE-Immuno blot

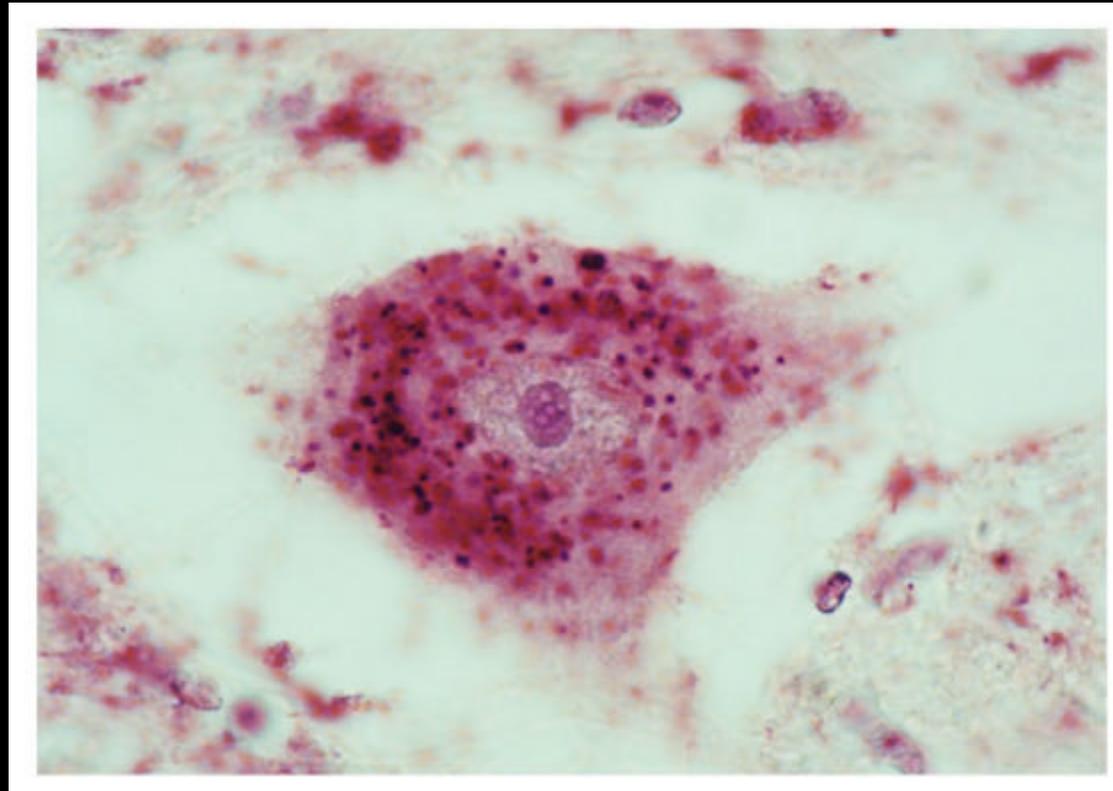
BSE-Verdachtsfall R 8/00 , Labor-Nr. 306/00



O.I.E.
Immunoblot
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)

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

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

| | |
|--|------------------------|
| Prionics Check[®] Immunoblot | zugelassen |
| BioRad Platelia[®] | zugelassen |
| Enfer (Abbott) | zugelassen |
| Repairgenics (14-3-3 in CSF) | Verfahren läuft |
| Prionics LIA | Verfahren läuft |

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^{res}-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 |
| Total | 56 | 18 |

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



'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