

**Justus-Liebig-Universität Giessen
Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
AG Prof. Dr. G. Erhardt**

Forschungsauftrag **514-06.01-280 7HS033**

**Thema: „Folgeuntersuchungen zur Identifizierung von genetischen
Markern zur Selektion von Schafen gegenüber TSE-Empfänglichkeit
unter besonderer Berücksichtigung atypischer Fälle“**

**Laufzeit: 01.05.2008 – 30.04.2009 / Projektlaufzeit kostenneutral verlängert
bis 30.06.2009 (Schreiben BLE vom 28.04.2009)**

Berichtszeitraum: 01.05.2008 – 30.04.2009

Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

- AG Prof. Dr. M. Groschup
Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für
Tiergesundheit, 17493 Greifswald - Insel Riems
- TSE Community Reference Laboratory, Veterinary Laboratories
Agency (VLA) Weybridge, Addlestone, Surrey, KT15 3NB, UK
- Oberste Veterinärbehörden der Bundesländer
- Amtstierärzte/Innen in Veterinärämtern
- Schafhalter

Forschungsauftrag (541-06.01-280) 07HS033

„Folgeuntersuchungen zur Identifizierung von genetischen Markern zur Selektion von Schafen gegen TSE-Empfänglichkeit unter besonderer Berücksichtigung atypischer Fälle“

Schlussbericht

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Im Rahmen des Vorgängerprojekts 04HS059 wurden genetische und epidemiologische Unterschiede zwischen der atypischen und der klassischen Scrapie gefunden, die Auswirkungen auf den Erfolg der aktuellen Bekämpfungsstrategie vor allem bezüglich der atypischen Scrapie haben. Daher sollten im Forschungsauftrag 07HS033 die genetischen und epidemiologischen Zusammenhänge bei TSE-Erkrankungen des Schafes und ggf. der Ziege weiter aufgeklärt werden. Hierzu sollte bei als TSE-positiv identifizierten Schafen und ggf. Ziegen sowie bei jeweils einem Kontrolltier die codierende Region des Prionprotein (PrP)-Gens sequenziert werden. Weiterhin sollten bei 24 Kontrolltieren aus jeder neu von TSE betroffenen Herde die Polymorphismen an den PrP-Codons 136, 141, 154 und 171 genotypisiert werden. Außerdem war die Erhebung epidemiologischer Daten zu den einzelnen TSE-Fällen geplant. Die gewonnenen molekulargenetischen und epidemiologischen Daten zu den TSE-Fällen sollten in die seit 2002 bestehende Datenbank eingehen, die weiter gepflegt und optimiert und Grundlage zur wissenschaftlichen Auswertung der Ergebnisse sein sollte. Die Untersuchungsergebnisse sollten dazu dienen, insbesondere hinsichtlich der atypischen Scrapie die Effizienz und den Erfolg der zu treffenden tierseuchenrechtlichen und züchterischen Maßnahmen einschätzen und entsprechende Handlungsempfehlungen geben zu können. Weiterhin sollten die Genotypisierungsergebnisse TSE-positiver Tiere für die notwendige Berichterstattung an die Europäische Kommission zur Verfügung stehen.

1.1 Planung und Ablauf des Projekts

Für die molekulargenetischen Analysen wurde von jedem zu untersuchenden Tier genomische DNA benötigt. Daher sollten von mindestens 25 Kontrolltieren aus jeder im Projektzeitraum neu von TSE betroffenen Herde zur DNA-Isolierung geeignete Blutproben oder Gewebeproben genommen werden. Im Rahmen der Probennahmen sollte auch die epidemiologische Datenerhebung zu den einzelnen TSE-Fällen stattfinden. Von TSE-positiven Schafen (und ggf. Ziegen) sollten DNA-Proben durch die AG Groschup des Instituts für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger (INNT) des Friedrich-Löffler-Instituts (FLI), Insel Riems, im Anschluss an die dort durchgeführte TSE-Diagnostik zur Verfügung gestellt werden.

Bei den TSE-positiven Schafen und jeweils einem Kontrolltier sollte die gesamte codierende Region des PrP sequenziert werden. Hierzu waren eine vorausgehende Polymerasekettenreaktion (PCR)-Amplifizierung dieses Genbereiches und zwei nachfolgende Sequenzierungsreaktionen mit anschließender Gelelektrophorese notwendig. Die Auswertung und Erfassung der Sequenzierdaten sollte mit Hilfe verschiedener Computerprogramme erfolgen.

Bei je 24 Scrapie-unverdächtigen Schafen aus jeder im Projektzeitraum neu von TSE betroffenen Herde sollten die PrP-Codons 136, 141, 154 und 171 genotypisiert werden. Dazu sollten PCR-Amplifizierungen des diese Codons enthaltenen Genbereichs durchgeführt und die Nukleotidpolymorphismen an den genannten Positionen durch PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analysen oder vergleichbare Genotypisierungsmethoden determiniert werden.

Zur Überprüfung und Standardisierung der durchgeführten molekulargenetischen Analysen sollte die Teilnahme am internationalen Vergleichstest zur PrP-Genotypisierung, die vom Gemeinschaftsreferenzlabor in Weybridge, UK, organisiert wird, dienen.

Die seit dem Jahr 2002 geführte Datenbank sollte weiter gepflegt und um die neu generierten Daten ergänzt werden.

Die gewonnenen Daten sollten auch unter Einbeziehung der Ergebnisse aus dem Vorläuferprojekt und entsprechender statistischer Verfahren im Hinblick auf die Zielstellung in einem Abschlußbericht ausgewertet werden.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Bei atypischen Scrapiefällen in Deutschland zeigten von den untersuchten Genen und Markern Allele, Haplotypen und Genotypen der PrP-Codons 136, 141, 154 und 171 höchst signifikante Zusammenhänge mit der Scrapie-Empfänglichkeit (Lühken *et al.* 2007 bzw. Ergebnisse Vorläuferprojekt 04HS059). Als am höchsten empfänglich für atypische Scrapie waren Schafe mit dem PrP-Haplotyp AHQ und/oder dem F-Allel an Codon 141 bzw. mit Genotypen, die den AHQ-Haplotyp und/oder das F-Allel beinhalten. Dies bestätigt im Fall des AHQ-Haplotyps die schon im Projekt 02HS024 gemachten Beobachtungen und deckt sich im Fall des F-Allels an Codon 141 mit Untersuchungsergebnissen aus anderen EU-Ländern (Directorate-General 2005; Efsa 2006). Das F-Allel tritt nur in Verbindung mit dem ARQ-Haplotyp auf.

Die im Projekt 04HS059 untersuchten Polymorphismen in der Promotor-Region des PrP sowie in verschiedenen weiteren Kandidatengen und Markern zeigten im Gegensatz zu den Codons 136, 141, 154 und 171 des PrP keine oder nur schwach signifikante Assoziationen mit der Empfänglichkeit für atypische Scrapie.

Da durch die derzeit in der EU praktizierte (Herdbuch)-Zucht und die bis vor kurzem sowohl bei klassischen als auch bei atypischen Scrapiefällen in betroffenen Schafherden durchgeführte Selektion auf den Haplotyp ARR indirekt gegen den AHQ-Haplotyp und gegen das F-Allel selektiert wird, ist eine gezielte Eliminierung dieser Genvarianten nicht notwendig. Da auch Schafe mit anderen PrP-Allelen, Haplotypen und Genotypen, insbesondere auch solche mit dem ARR-Haplotyp, von atypischer Scrapie betroffen sind, ist jedoch über die Selektion auf diese Varianten der codierenden Region des PrP nach dem jetzigen Kenntnisstand keine vollständige Eliminierung der atypischen Scrapie zu erreichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Berichtszeitraum des Projektes (1. Mai 2008 bis 30. April 2009) wurden 9 Scrapie-positive Schafe identifiziert. Um die nach Ende des Vorläuferprojekts vom 1. Juni 2007 bis 30. April 2008 als Scrapie-positiv aufgetretenen Scrapiefälle mit auswerten zu können, wurden diese mit in die Untersuchungen einbezogen. Daher beziehen sich die nachfolgenden Ausführungen auf den Zeitraum vom 1. Juni 2007 bis 30. April 2009.

Von Anfang Juni 2007 bis Ende 2009 wurden insgesamt 31 Schafe (wie schon in den vergangenen Jahren keine Ziege) durch die AG Groschup, INNT, FLI Insel Riems als Scrapie-positiv identifiziert (Tab. 1). Im genannten Zeitraum wurden in 17 Schafherden **neue** Ausbrüche von Scrapie festgestellt. In diesen Herden wurde jeweils ein Scrapie-positives Schaf identifiziert. In 15 der 17 neu betroffenen Herden wurden insgesamt 555 Proben von Scrapie-negativen bzw. –unverdächtigen Herdenmitgliedern gesammelt. Einem Scrapie-positiven Schaf konnte keine Herkunftsherde zugeordnet werden und in einer weiteren Schafherde war aus technischen Gründen keine Probennahme bei Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern möglich.

Vierzehn weitere Scrapie-positive Schafe (sog. „Kohortenschafe“) stammten aus 4 Schafherden, in denen bereits in der Vergangenheit Scrapie-positive Schafe identifiziert worden waren und die daher schon in den beiden vorausgegangenen Forschungsprojekten untersucht worden waren. (Der Begriff „Kohortenschaf“ bezieht sich hier auf die Zugehörigkeit Scrapie-positiver Schafe zu einer bereits von atypischer oder klassischer Scrapie betroffenen Schafherde, nicht etwa auf die Zugehörigkeit zu einer Altersgruppe o. ä.)

2.2 Methoden

Probennahme

Die Entnahme von Blutproben bei Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern Scrapie-positiver Schafe erfolgte durch Punktion der *Vena cava cranialis* und mit Hilfe von EDTA-Monovetten.

Von den Scrapie-positiven Schafen wurden DNA-Proben durch die AG Groschup, INNT, FLI Insel Riems zur Verfügung gestellt.

DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus Blutproben erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen DNA-Extraktionskits (Invisorb Blood Mini HTS 96/c sheep, Invitex, Berlin) nach den Vorgaben des Herstellers.

Nachweis von Polymorphismen in der codierenden Region des PrP

Die Sequenzanalyse der codierenden Region des PrP wurde wie bei Lühken et al. (2007) beschrieben durchgeführt und deckte die gesamte codierende Region und etwa 50 Basenpaare der flankierenden Bereiche des Gens ab. Proben aller 31 Scrapie-positiven Schafe sowie jeweils eines Scrapie-unverdächtigen Herdenmitglieds aus den neu von Scrapie betroffenen Schafherden wurden durch Sequenzanalyse untersucht.

Tab. 1: Identifizierung Scrapie-positiver Schafe in Schafherden (Juni 2007 bis April 2009)

lfd. Nr. ¹	Ausbruch-Nr. / Jahr ²	Befund des ersten Scrapie-positiven Schafes einer Herde ³	Bundesland	Landkreis	Scrapie-positive Schafe (n)	Stichprobe aus Herde (n)
I	(Kohorten-schaf)	24.02.2003	He	Fulda	1	(Vorläufer-projekt)
II	(Kohorten-schaf)	12/2003	BW	Freudenstadt	1	(Vorläufer-projekt)
III	(Kohorten-schafe)	23.01.2006	BW	Tuttlingen	10	(Vorläufer-projekt)
IV	(Kohorten-schafe)	12.01.2007	HE	Odenwaldkreis	2	(Vorläufer-projekt)
1	11 / 2007	28.08.2007	HE	Schwalm-Eder	1	50
2	12 / 2007	15.09.2007	BY	Altötting	1	16 ⁴
3	13 / 2007	06.10.2007	BW	Sigmaringen	1	12 ⁴
4	15 / 2007	27.11.2007	BW	Hohenlohe	1	38 ⁴
5	1 / 2008	07.01.2008	BW	Schwäbisch-Hall	1	42 ⁴
6	2 / 2008	20.02.2008	HE	Main-Kinzig-Kreis	1	50
7	3 / 2008	23.02.2008	BB	Ostprignitz-Ruppin	1	50
8	4 / 2008	02.04.2008	BW	Reutlingen	1	50
9	5 / 2008	16.05.2008	BY	Dillingen	1	50
10	6 / 2008	01.07.2008	SL	Sankt Wendel	1	10 ³
11	k. A.	28.10.2008	BW	Reutlingen	1	-
12	7 / 2008	05.11.2008	BW	Bodenseekreis	1	60
13	1 / 2009	28.01.2009	HE	Main-Kinzig-Kreis	1	7 ⁴
14	2 / 2009	25.02.2009	NRW	Siegen-Wittgenstein	1	44
15	3 / 2009	02.04.2009	BW	Reutlingen	1	-
16	4 / 2009	27.04.2009	BW	Breisgau-Hochschw.	1	26 ⁴
17	5 / 2009	04/25009	SH	Steinburg	1	50

¹⁾ römische Ziffern = Kohortenfälle, arabische Ziffern = neue Scrapieausbrüche; ²⁾ Angabe des BMELV;

³⁾ Information des INNT, FLI Riems; ⁴⁾ Stichprobe = Herdengröße + 1 (z. T. ohne Lämmer)

Zur Bestimmung des aus den Codons 136, 154 und 171 bestehenden PrP-Haplotyps wurde eine komplexe PCR-RFLP-Methode verwendet. Die Genotypisierung der PrP-Codons 141 (F/L) erfolgte ebenfalls mit Hilfe einer hierfür etablierten PCR-RFLP-Methode (LÜHKEN *et al.* 2007). Mit den genannten Methoden wurden die Proben Scrapie-unverdächtiger Herdenmitglieder (n = 555) genotypisiert.

Die Validität der Verfahren wurde durch die erfolgreiche jährliche Teilnahme am PrP Blood Genotyping Comparison Test des VLA Weybridge bestätigt.

Nomenklatur der PrP-Polymorphismen

Die Allele an den drei Codons 136, 154 und 171 werden als Haplotyp dargestellt, z. B. die Kombination von A₁₃₆, R₁₅₄ und Q₁₇₁ als Haplotyp „ARQ“. Phenylalanin (F) an Codon 141 tritt nur in Kopplung mit dem Haplotyp ARQ auf, so dass die Anwesenheit von F an Position 141 als Haplotyp „AFRQ“ dargestellt wird. Die Anwesenheit von Leucin (L) an Position 141 wird hingegen nicht extra dargestellt, so dass bei allen dreistellig angegebenen Haplotypen an Position 141 für L codiert wird.

Statistische Methoden

Zur Analyse der Assoziationen zwischen Haplotypen bzw. Genotypen mit dem Scrapie-Status wurden der Chi-Quadrat-Test und der Fisher's Exact Text angewendet.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit ($P \geq 0,05$) wurden Unterschiede in den Haplotyp- bzw. Genotypfrequenzen zwischen den verglichenen Gruppen als nicht signifikant (n.s.) angesehen, während bei $P < 0,05$ signifikante (*), bei $P < 0,01$ hoch signifikante (**) und bei $P < 0,001$ höchst signifikante (***) Unterschiede festgestellt wurden.

Datenbank

Die im Vorläuferprojekt 04HS059 angelegte Excel-Datenbank über die TSE-positiven Tiere bzgl. Betrieb, Herdengröße, Rasse, Geschlecht, Alter und ggf. Pedigree-Informationen wurde gepflegt und weitergeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1.1 *Epidemiologie atypischer und klassischer Scrapiefälle*

Die durch die AG Groschup durchgeführte Differenzierung des Scrapie-Typs ergab für den Zeitraum Juni 2007 bis April 2009 die Feststellung von atypischer Scrapie bei 17 Schafen aus 17 neu von Scrapie betroffenen Herden. In diesem Zeitraum wurde kein Neuausbruch von klassischer Scrapie diagnostiziert.

Von den im selben Zeitraum identifizierten 14 Kohortenschafen waren 4 atypisch Scrapie-positiv und stammten aus drei verschiedenen bereits von atypischer Scrapie betroffenen Schafherden, während die anderen 10 Kohortenschafe klassisch Scrapie-positiv waren und alle aus einer bereits von klassischer Scrapie betroffenen Schafherde stammten.

Unter Einbeziehung der Scrapie-Fälle aus dem Zeitraum der beiden vorausgehenden Projekte wurden insgesamt von Januar 2002 bis April 2009 in Deutschland 289 Schafe aus 151 Herden als Scrapie-positiv identifiziert. Von diesen wurden 147 Schafe aus 128 Herden als atypisch Scrapie-positiv diagnostiziert (durchschnittlich 1,1 Schafe pro Herde) und 135 Schafe aus 19 Herden als klassisch Scrapie-positiv (durchschnittlich 7,1 Schafe pro Herde).

Das Alter der zwischen Juni 2007 und April 2009 als atypisch Scrapie-positiv diagnostizierten Schafe lag, soweit bekannt, bei 3 bis 15 Jahren, wobei die Hälfte der Tiere über 6 Jahre alt war; für die Kohortentiere lagen keine Altersangaben vor.

Die neu von Scrapie-betroffenen Herden wiesen Bestandsgrößen von 7 bis zu etwas mehr als 1600 Schafen auf. Im vorausgegangenen Projekt war aufgefallen, dass alle Schafherden, in denen mehr als ein atypisch Scrapie-positives Schaf identifiziert wurde, aus mindestens 500 Schafen bestanden. Drei der vier zwischen Juni 2007 und April 2009 identifizierten atypischen Kohortenschafe stammten wiederum aus solch großen Herden. Das vierte atypisch Scrapie-positive Schaf stammte allerdings aus einer kleineren, 182-köpfigen Herde, in der bereits zuvor atypische Scrapie diagnostiziert wurde.

Wie auch schon in den beiden vorausgegangenen Projekten konnten in einigen wenigen Fällen lebende Verwandte Scrapie-positiver Schafe identifiziert werden. In der Regel waren dies Nachkommen, meistens Lämmer des aktuellen Zuchtjahres. In keinem Fall wurde bei diesen bisher Scrapie nachgewiesen.

3.1.1.2 Polymorphismen an PrP-Codons 136, 141, 154, 171

Die Häufigkeiten (%) der PrP-Genotypen (Codons 136, 141, 154 und 171) bei den im Zeitraum Juni 2007 bis April 2009 als atypisch (n = 21) und klassisch (n = 10) Scrapie-positiv identifizierten Schafe sind in Abb. 1 dargestellt. Alle klassisch Scrapie-positiven Schafe hatten den PrP-Genotyp ARQ/ARQ, während dieser Genotyp bei keinem der atypisch Scrapie-positiven Schafe nachgewiesen wurde. Knapp 30 % der atypisch Scrapie-positiven Schafe trugen den Genotyp AHQ/ARQ, am zweithäufigsten trat der Genotyp ARR/AHQ auf (19 %).

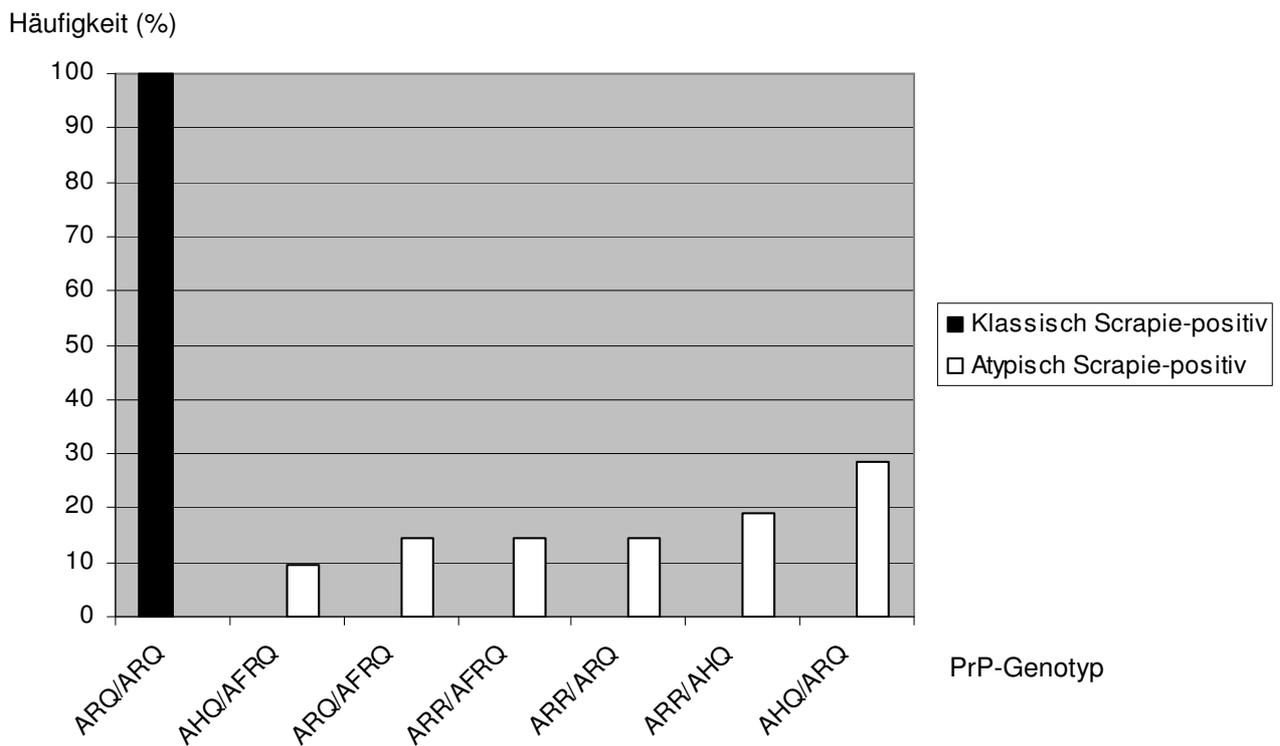


Abb. 1: Häufigkeiten (%) der PrP-Genotypen (Codons 136, 141, 154 und 171) bei klassisch (schwarzer Balken) und atypisch (weiße Balken) Scrapie-positiven Schafen (Juni 2007 bis April 2009).

Im Folgenden werden die Haplotyp- und Genotypfrequenzen bezüglich der PrP-Codons 136, 141, 154 und 171 der atypisch Scrapie-positiven Schafe und der Stichproben ihrer Herdenmitglieder aus den vom Juni 2007 bis April 2009 neu von Scrapie-betroffenen Herden miteinander verglichen (Tab. 2)

Tab. 2: Haplotyp- und Genotypfrequenzen der PrP-Codons 136, 141, 154 und 171 bei atypisch und klassisch Scrapie-positiven Schafen und ihren Herdenmitgliedern

PrP-Codons 136, 141, 154, 171	atypisch Scrapie- positive Schafe (%) n = 17	scrapie- unverdächtige Herdenmitglieder (%); n = 555	Odds Ratio (OR)
Haplotyp			
AHQ	29,4	7,6	3,9
ARQ	26,5	47,8	0,6
ARR	23,5	37,4	0,6
AFRQ	20,6	3,6	5,7
VRQ	0,0	2,4	0,0
ARH	0,0	1,1	0,0
Signifikanz (P)	< 0,0001***		
Genotyp			
AHQ/ARQ	23,5	7,1	3,3
ARR/AHQ	23,5	5,2	4,6
ARQ/AFRQ	17,6	4,2	4,2
AHQ/AFRQ	11,8	0,8	15,4
ARR/AFRQ	11,8	0,8	15,4
ARR/ARQ	11,8	33,0	0,4
ARQ/ARQ	0,0	24,0	0,0
ARR/ARR	0,0	16,6	0,0
ARQ/VRQ	0,0	2,1	0,0
ARR/VRQ	0,0	2,1	0,0
ARQ/ARH	0,0	1,1	0,0
AHQ/AHQ	0,0	1,0	0,0
AFRQ/AFRQ	0,0	0,8	0,0
ARR/ARH	0,0	0,6	0,0
AHQ/ARH	0,0	0,2	0,0
AHQ/VRQ	0,0	0,2	0,0
ARH/ARH	0,0	0,2	0,0
VRQ/VRQ	0,0	0,2	0,0
Signifikanz (P)	< 0,0001***		

*** = Haplotyp- bzw. Genotypfrequenzen sind höchst signifikant unterschiedlich

Bei den atypisch Scrapie-positiven Schafen trat der Haplotyp AHQ am häufigsten auf (29,4 %), jedoch wurden auch die Haplotypen ARQ, ARR und AFRQ mit Frequenzen zwischen 26,5 bis 20,6 % recht häufig identifiziert. Weitere PrP-Haplotypen traten bei den atypisch Scrapie-positiven Schafen nicht auf. Dagegen war ARQ (47,8 %) der häufigste und ARR (37,4 %) der zweithäufigste PrP-Haplotyp bei den Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern aus den von

atypischer Scrapie betroffenen Schafherden. Insgesamt waren die PrP-Haplotypfrequenzen höchst signifikant unterschiedlich zwischen den atypisch Scrapie-positiven Schafen und den Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern. Der Quotient aus der PrP-Haplotypfrequenz der atypisch Scrapie-positiven Schafe und ihrer Herdenmitglieder (Odds Ratio, OR) ergibt für ARQ und ARR Werte unter 1 (jeweils 0,6) (Tab. 2). Die Haplotypen AHQ und AFRQ wurden bei den Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern seltener nachgewiesen (7,6 und 3,6 %), so dass durch das häufigere Auftreten dieser Haplotypen bei den atypisch Scrapie-positiven Schafen OR-Werte deutlich über 1 berechnet wurden (3,9 und 5,7) (Tab. 2).

Die beiden am häufigsten betroffenen PrP-Genotypen waren bei atypisch Scrapie-positiven Schafen AHQ/ARQ und ARR/AHQ (jeweils 23,5 %) (Tab. 2). Vier weitere Genotypen traten bei den Scrapie-positiven Schafen mit Häufigkeiten zwischen 17,6 und 11,8 % auf, davon waren drei Kombinationen von ARQ, AHQ und ARR mit dem Haplotypen AFRQ. Die PrP-Genotypfrequenzen waren höchst signifikant unterschiedlich zwischen den atypisch Scrapie-positiven Schafen und den Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern. Die drei häufigsten Genotypen bei den Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern, ARR/ARQ (33,0 %), ARQ/ARQ (24,0 %) und ARR/ARR (16,6 %), wurden bei den atypisch Scrapie-positiven Schafen gar nicht (ARQ/ARQ und ARR/ARR) bzw. weniger häufig (ARR/ARQ) identifiziert, daher ergaben sich dafür OR-Werte von 0 bzw. 0,4 (Tab. 2). Dahingegen waren die Frequenzen der häufig bei den atypisch Scrapie-positiven Schafen vorkommenden PrP-Genotypen bei den Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern niedrig (7,1 bis 4,2 % bei AHQ/ARQ, ARR/AHQ und ARQ/AFRQ) bis sehr niedrig (0,8 % bei AHQ/AFRQ und ARR/AFRQ), so dass sich hierfür OR-Werte deutlich über 1 (3,3 bis 4,6 für AHQ/ARQ, ARR/AHQ und ARQ/AFRQ und sogar 15,4 für AHQ/AFRQ und ARR/AFRQ) ergaben (Tab. 2). Hervorzuheben ist das Fehlen des Genotyps ARQ/ARQ bei atypisch Scrapie-positiven Schafen, obwohl dies mit 24 % der zweithäufigste Genotyp bei den Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern war (Tab. 2). Dies wurde im Vorgängerprojekt so nicht beobachtet, da dort noch eine getrennte Analyse der PrP-Codons 136, 154 und 171 und des Codons 141 erfolgte.

Die errechneten OR-Werte für die PrP-Haplotypen und –Genotypen sind auch in Abb. 2 dargestellt.

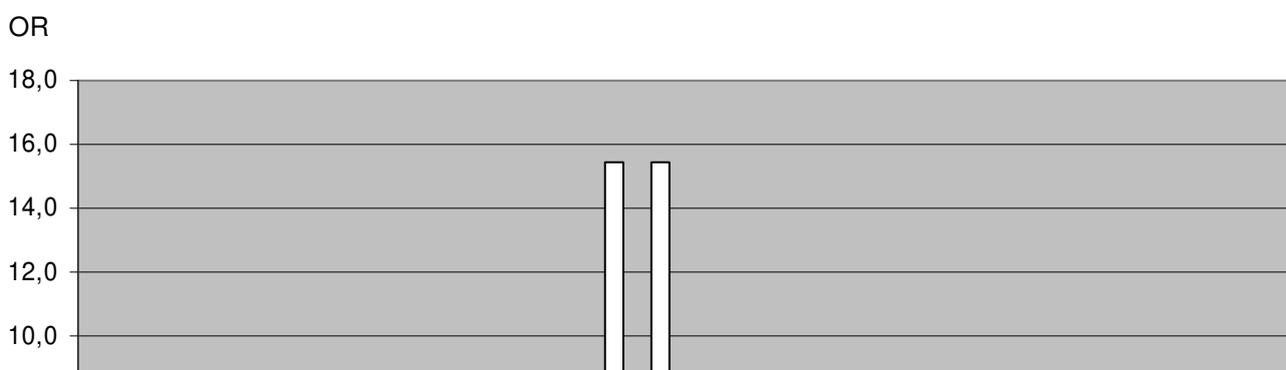


Abb. 2: OR-Werte der PrP-Haplotypen und -Genotypen (Codons 136, 141, 154 und 171) für atypische Scrapie.

Das Risiko, als atypisch Scrapie-positiv diagnostiziert zu werden, war für Schafe mit den PrP-Haplotypen AHQ und AFRQ bzw. den Genotypen ARR/AFRQ, AHQ/AFRQ, ARQ/AFRQ, ARR/AHQ und AHQ/ARQ erhöht. Träger der PrP-Haplotypen ARR und ARQ bzw. des PrP-Genotyps ARR/ARQ waren zwar nicht besonders empfänglich für atypische Scrapie (OR kleiner als 1), aber diese Haplo- bzw. Genotypen vermittelten auch keine Resistenz.

Die hier beobachtete Empfänglichkeit von Schafen mit dem PrP-Genotyp ARQ/ARQ für klassische Scrapie (Genotypfrequenz = 100%) und dagegen von Schafen mit PrP-Genotypen mit AFRQ oder AHQ in Kombination mit ARR oder ARQ für atypische Scrapie deckt sich mit den Ergebnissen des vorausgegangenen Projektes. Höchstwahrscheinlich bedingt durch die weitaus höheren Probenzahlen aus dem längeren Projektzeitraum, ergab sich dort eine höhere Anzahl an identifizierten PrP-Haplotypen und -Genotypen, sowohl bei den Scrapie-positiven Schafen als auch bei den Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern. Von diesen im vorangegangenen Projekt zusätzlich beobachteten Haplo- und Genotypen lag der OR-Wert für atypische Scrapie nur bei AHQ/AHQ (OR = 5,3) in einem Bereich, der auf ein erhöhtes Scrapie-Risiko hinwies und war im Rahmen der vorausgegangenen Untersuchung sogar einer der höchsten OR-Werte für atypische Scrapie. Anhand der AHQ/AHQ-Genotypfrequenz (ca. 9 %) der atypisch Scrapie-

positiven Schafe der Vorläuferprojekte hätte man im vorliegenden Projekt mit nur 1-2 atypisch Scrapie-positiven Schafen rechnen können, so dass das Fehlen dieses Genotyps sehr wahrscheinlich zufällig ist. Das Gleiche gilt für den PrP-Genotyp ARR/ARR, den etwa 10 % der atypisch Scrapie-positiven Schafe, die im vorausgegangenen Projekt genotypisiert wurden, trugen. Dort war der Anteil der Scrapie-negativen Herdenmitglieder mit diesem Genotyp sogar rund 4,5 % niedriger als in der vorliegenden Studie. Allerdings wies der OR-Wert damals mit 0,8 auf keine besonders hohe Empfänglichkeit von Schafen dieses Genotyps hin. Dabei wurde allerdings betont, dass die prinzipielle Empfänglichkeit von Schafen dieses PrP-Genotyps für atypische Scrapie die aktuelle Strategie der Scrapie-Bekämpfung durch Selektion auf diesen Genotyp zuwiderläuft.

Im aktuellen Projekt bestätigen sich die Ergebnisse aus dem vorausgegangenen Projekt, dass Schafe mit dem PrP-Wildtyp, d. h. dem Genotyp ARQ/ARQ ohne eine Kombination mit Aminosäureaustauschen an anderen PrP-Codons, hoch empfänglich für klassische Scrapie sind. Dieser Genotyp scheint weniger empfänglich für atypische Scrapie zu sein. Bei atypischer Scrapie vermitteln die PrP-Haplotypen AFRQ und AHQ eine gesteigerte Empfänglichkeit, wobei aber auch Kombinationen mit anderen oder anderer PrP-Haplotypen, vor allem mit ARR und ARQ, betroffen sind.

3.1.1.3 Polymorphismen an weiteren PrP-Codons

Zu jedem atypisch Scrapie-positiven Schaf wurde die Probe eines Scrapie-unverdächtigen Herdenmitglieds („Kontrolltiere“) mit dem gleichen PrP-Genotyp bezogen auf die Codons 136, 154 und 171 und nach Möglichkeit im gleichen Alter und von der gleichen Rassezugehörigkeit zur Sequenzierung der gesamten codierenden PrP-Region ausgewählt.

In Tab. 3 sind die PrP-Codons aufgeführt, an denen neben den Codons 136, 141, 154 und 171 Polymorphismen auftraten sowie die Häufigkeiten der entsprechenden Genotypen bei den atypisch Scrapie-positiven Schafen und den Kontrolltieren.

An den Codons 112 und 241 wurde nur jeweils bei einem Scrapie-unverdächtigen Kontrolltier ein heterozygoter Genotyp (Codon 112 MT und Codon 241 PS) identifiziert. Alle anderen Kontrolltiere und alle atypisch Scrapie-positiven Schafe waren homozygot.

Für die stillen Mutationen an den Codons 231 und 237, die meistens gekoppelt auftreten, wurden bei den atypisch Scrapie-positiven Schafen alle drei Genotypen und bei den Kontrolltieren ein homozygoter und der heterozygote Genotyp nachgewiesen.

Für keinen dieser identifizierten Polymorphismen wurden signifikante Unterschiede der Genotypfrequenzen zwischen den atypisch Scrapie-positiven Schafen und den Kontrolltieren festgestellt.

Tab. 3: Frequenzen der Genotypen an weiteren PrP-Codons (außer Codons 136, 141, 154 und 171) bei atypisch Scrapie-positiven Schafen und Kontrolltieren

PrP-Codon	Genotyp	atypisch Scrapie- positive Schafe (%); n = 17	Kontroll- proben (%); n = 15	Signifikanz (P)
M112T	MM	100	93,3	n. s.
	MT	0	7,1	
	TT	0	0	
R231R[§]	aa	58,8	66,7	n. s.
	ac	29,4	33,3	
	cc	11,8	0,0	
L237L[§]	cc	58,8	66,7	n. s.
	cg	29,4	33,3	
	gg	11,8	0,0	
P241S	PP	100	93,3	n. s.
	PS	0	7,1	
	SS	0	0	

[§] = kein Aminosäure-Austausch; n. s. = Genotypfrequenzen nicht signifikant unterschiedlich

4 Zusammenfassung

Im Rahmen des Projekts sollten die im Vorgängerprojekt 04HS059 gefundenen genetischen und epidemiologischen Zusammenhänge bei der atypischen Scrapie weiter aufgeklärt werden. Dazu wurde bei 17 neuen atypischen Scrapie-Ausbrüchen die epidemiologischen Daten erfasst und die gesamte codierende Region des Prion-Protein (PrP)-Gens der Scrapie-positiven Schafe (n = 17) und von jeweils einem Scrapie-unverdächtigen Herdenmitglied durch Polymerasekettenreaktion (PCR) und anschließende Sequenzierung analysiert. 14 im Projektzeitraum identifizierte Scrapie-positive Schafe aus 4 bereits von Scrapie betroffenen Schafherden (sogenannte Kohortenschafe, 4 atypisch und 10 klassisch Scrapie-positive) wurden ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen. Weiterhin wurden bei 555 Scrapie-unverdächtigen Schafen aus den neu von Scrapie betroffenen Herden die PrP-Codons 136, 141, 154 und 171 mittels PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse genotypisiert.

Die sich bereits im vorausgegangenen Projekt abzeichnenden epidemiologischen Besonderheiten atypischer Scrapiefälle im Vergleich zu klassischen Scrapiefällen konnten auch im vorliegenden Projekt beobachtet werden: Wieder zeigte es sich, dass in von atypischer Scrapie betroffenen Schafherden in der Regel nur jeweils 1 positives Schaf identifiziert wird. Das Alter atypisch Scrapie-positiver Schafe schwankte wie auch schon im Vorgängerprojekt stark (3-15 Jahre), wobei die betroffenen Tiere mehrheitlich mehr als 6 Jahre alt waren.

Die molekulargenetischen Analysen bestätigten die hohe Empfänglichkeit für atypische Scrapie von Schafen mit den PrP-Haplotypen AFRQ und AHQ und den sie enthaltenen Genotypen, auch in Kombination mit ARR oder ARQ. Schafe mit dem Genotyp ARQ/ARQ waren nicht von atypischer Scrapie betroffen, während alle klassisch Scrapie-positiven Schafe diesen Genotyp trugen. Auch wenn – wahrscheinlich bedingt durch die insgesamt niedrigere Fallzahl - im vorliegenden Projekt anders als im Vorgängerprojekt kein Scrapie-positives Schaf mit dem PrP-Genotyp ARR/ARR identifiziert wurde, muss weiterhin damit gerechnet werden, dass durch die Selektion auf diesen Genotyp nur Erfolge bei der Bekämpfung der klassischen Scrapie erreicht werden können. Für weitere im Tiermaterial polymorphe PrP-Codons (Codons 112, 231, 237 und 241) konnten keine Assoziationen mit der Empfänglichkeit für atypische Scrapie nachgewiesen werden. Dies sowie die Gegensätzlichkeit der genetisch bedingten Empfänglichkeit für klassische und atypische Scrapie im Bezug auf die PrP-Haplotypen ARR und ARQ lassen den Schluss zu, dass genetische Faktoren für eine Bekämpfung der atypischen

Scrapie – wenn überhaupt – nur außerhalb der codierenden PrP-Region, möglicherweise sogar außerhalb des PrP-Locus auf dem ovinen Chromosom 13 gefunden werden können.

5 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Das Ziel, die im Forschungsauftrag 07HS033 gefundenen genetischen und epidemiologischen Zusammenhänge bei TSE-Erkrankungen des Schafes weiter aufzuklären, wurde durch die epidemiologische und molekulargenetische Analyse weiterer Neuausbrüche von atypischer Scrapie und weiterer positiver Schafe aus bereits von atypischer oder klassischer Scrapie betroffenen Schafherden erreicht. Gegebenenfalls sollten auch TSE-Fälle bei Ziegen mit einbezogen werden, allerdings wurde wie auch schon im Vorgängerprojekt keine TSE(Scrapie)-positive Ziege durch die AG Groschup, INNT, FLI, Insel Riems identifiziert.

Für den Projektraum wurde mit 21 neu von Scrapie betroffenen Schafherden und 24 Scrapie-positiven Schafen gerechnet. Diese Zahlen wurden mit 17 neu von Scrapie betroffenen Schafherden und ebenso vielen Scrapie-positiven Schafen nicht ganz erreicht, allerdings erhöhte sich die Zahl Scrapie-positiver Schafe durch 14 ebenfalls zu untersuchende Kohortenschafe auf 31. Mit der Beprobung von 555 Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern aus den betroffenen Schafherden wurde die angestrebte Stichprobengröße von 545 erreicht. Statt 25 wurden durchschnittlich 37 Scrapie-unverdächtige Schafe pro Herde beprobt und genotypisiert. Bei allen Scrapie-positiven Schafe sowie 15 Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern aus den neu von Scrapie betroffenen Schafherden konnte die gesamte codierende Region des PrP sequenziert werden, während die vorgesehene Genotypisierung der PrP-Codons 136, 141, 154 und 171 bei den 555 Scrapie-unverdächtigen Herdenmitgliedern durch PCR-RFLP-Analyse durchgeführt wurde.

Wie geplant wurden die Genotypisierungsergebnisse TSE-positiver Schafe für die notwendige Berichterstattung an die Europäische Kommission der AG Groschup, INNT, FLI, Insel Riems zur Verfügung gestellt.

Durch die jährliche Teilnahme am internationalen Vergleichstest zur PrP-Genotypisierung, die vom Gemeinschaftsreferenzlabor in Weybridge, UK, organisiert wird, konnten die verwendeten molekulargenetischen Genotypisierungsverfahren erfolgreich evaluiert werden.

Die seit dem Jahr 2002 geführte Datenbank wurde weiter gepflegt und um die neu generierten epidemiologischen Daten (bzgl. Betrieb, Herdengröße, Rasse, Geschlecht, Alter) und PrP-

Genotypen ergänzt. Diese kann dem Nationalen Referenzlabor für BSE/Scrapie und/oder dem BMELV zur dauerhaften Pflege und Aktualisierung zur Verfügung gestellt werden.

6 Literatur

EFSA (2006) *Opinion on the breeding programme for TSE resistance in sheep, question N° EFSA-Q-2005-291, adopted at 19 July 2006*, Vol. 382.

European Commission (2005) *Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in the EU in 2004*, Brussels.

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

