

Abschlussbericht zum Forschungsauftrag 05HS037

Untersuchungen zu TSE und Prionprotein- Genotypisierung bei Mufflons in Deutschland

Laufzeit: 01.08.2006 – 31.12.2008

Berichtszeitraum: 01.08.2006 – 31.12.2008

PD Dr. Volker Stefanski & Anke Wiethölter
Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW)
im Forschungsverbund Berlin e.V.
Alfred-Kowalke-Straße 17
10315 Berlin

Inhaltsverzeichnis

1	ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG DES PROJEKTS	3
1.1	Planung und Ablauf des Projekts	3
1.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	6
2	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Material des Populationscreening	9
2.2	Methoden des Populationscreening.....	12
2.2.1	TSE-Schnelltest.....	12
2.2.2	Weiterführende Tests	12
2.2.3	Ermittlung der Nachweisgrenzen	12
2.2.4	Beurteilung von weiteren Schnelltests	13
2.3	Material der Genotypisierung.....	13
2.4	Methoden der Genotypisierung	13
2.4.1	DNA-Isolierung.....	13
2.4.2	PCR	14
2.4.3	Gelelektrophorese.....	14
2.4.4	Aufreinigung	14
2.4.5	Sequenzierung	14
2.4.6	Auswertung der Sequenzen.....	15
3	ERGEBNISSE.....	15
3.1	Zusammensetzung der Proben des Populationscreenings	15
3.2	Ergebnisse Schnelltest.....	16
3.3	Ergebnisse weiterführende Tests	16
3.4	Ermittelte Nachweisgrenzen.....	16
3.5	Probenzusammensetzung der Genotypisierung	17
3.6	Ergebnisse der DNA-Isolierung und -Amplifizierung	18
3.7	Ergebnisse Sequenzierung	19
3.8	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	21
3.8.1	Wirtschaftliche Verwertbarkeit und wissenschaftliche Anschlussfähigkeit	21
3.8.2	Wissenschaftliche Verwertbarkeit.....	22
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	23
5	GEGENÜBERSTELLUNG DER URSPRÜNGLICH GEPLANTEN ZU DEN TATSÄCHLICH EREICHTEN ZIELEN; GGF. MIT HINWEISEN AUF WEITERFÜHRENDE FRAGESTELLUNGEN.....	25
5.1	Screening für TSE Erkrankungen bei Mufflons in Deutschland	25
5.2	Testverfahren im Populationscreening.....	25
5.3	Vergleich verschiedener Schnelltests.....	26
5.4	Genotypisierung des Prionproteins	26
5.5	Hinweise auf weitergehende Fragestellungen.....	26
6	LITERATURVERZEICHNIS	27

1 ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG DES PROJEKTS

Ziel der Studie war die Risikoabschätzung zum Vorkommen von Transmissibler Spongiformer Enzephalopathie (TSE) – insbesondere von Scrapie – bei Mufflons (*Ovis gmelini musimon*) in Deutschland. Hierzu wurden 823 Mufflons aus definierten Risikogebieten mittels eines schafspezifischen Schnelltests (*HerdChek BSE – Scrapie Antigen Test Kit EIA*, IDEXX) auf TSE getestet. Zudem wurden von 246 Tieren aus 40 Muffelwildregionen die Prionprotein-Genotypen bestimmt, um die potentielle Empfänglichkeit von Mufflons gegenüber Scrapie zu beurteilen.

1.1 Planung und Ablauf des Projekts

Die Aufgabenstellung des Projektes „Untersuchungen zu TSE bei Mufflons in Deutschland“ umfasste die Untersuchung von Mufflons aus ausgewählten Risikogebieten in Deutschland auf Prionenerkrankungen. Die Aufgaben des Projekts wurden um die Genotypisierung des Prionproteins (PrP) zur Risikoabschätzung ergänzt (Erweiterungsantrag vom 21.06.07; Änderungsbescheid vom 25.09.2007). Daneben sollten kommerzielle BSE/Scrapie-Schnelltests bei Mufflons validiert werden; dies setzte allerdings das Vorhandensein von Postivmaterial voraus. Für das ursprüngliche Populationsscreening war ein Zeitraum von zwei Jahren vorgesehen. Aufgrund der Erweiterungen im Bereich Genotypisierung sowie unvorhersehbarer Verzögerungen bei der Datenübermittlung (Übermittlung der Abschlusszahlen durch die zuständigen Behörden) wurde die Projektlaufzeit um insgesamt vier Monate kostenneutral verlängert. Kurz nach Beginn des Projekts hat einer der beiden Antragsteller (PD Dr. Dr. Frölich) das IZW verlassen und ist aus dem Projekt ausgeschieden; die Aufgaben wurden von PD Dr. Volker Stefanski übernommen.

Die Durchführung des Projekts erfolgte in den wesentlichen Punkten wie geplant.

Mit dem **Populationsscreening** für TSE-Erkrankungen bei Mufflons wurde unmittelbar nach Förderungszusage durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung begonnen. Insgesamt konnten in den zwei aufeinander folgenden Jagdsaisons 2006/07 sowie 2007/08 insgesamt 823 Tiere untersucht werden, dabei entfielen 324 Tiere auf die erste und 496 auf die zweite Saison (zusätzlich wurden weitere drei klinisch auffällige Mufflons untersucht). Wenngleich die ursprünglich angestrebte Anzahl von ca. 1300 Mufflons aus den definierten Risikogebieten nicht erreicht werden konnte, sind die erzielten Zahlen vor dem Hintergrund

der sich während des Vorhabens ergebenen unerwarteten Schwierigkeiten (s. unten), dennoch als großer Erfolg zu bezeichnen. Das Erreichen dieser Probenzahl war nur durch einem immensen Einsatz der Mitarbeiter zu realisieren.

Die spezifischen Gründe für das sehr geringere Probenaufkommen in der Jagdsaison 2006/07 lagen – wie bereits Zwischenbericht vom 28.08.2007 ausführlich dargelegt – in der späten Bewilligungszusage, die erst unmittelbar vor Beginn der Jagdsaison (01. August 2006) erfolgte. Die flächendeckende Information aller Jagdausübungsberechtigten dauerte bis Anfang Dezember, so dass oftmals schon viele Tiere erlegt worden waren, bevor die Kooperationspartner in Jagd und Forstwirtschaft Kenntnis von unserer Studie hatten. Eine optimale Ausnutzung der Jagdperiode war daher nicht möglich. Ein besonderes Hindernis stellte in diesem Zusammenhang die schleppende Genehmigung durch einige Landesministerien dar. In den Bundesländern Nordrhein-Westfalen und Sachsen konnten so erst Ende Oktober bzw. Anfang November die ersten Proben gesammelt werden. Ein nicht vorhersehbarer Aspekt, der sich in diesem Jahr zudem negativ auf die Probennahme auswirkte, war der sehr milde Winter. Die schnee- und frostarme Witterung 2006/07 führte zu einem stark veränderten Fress- und Wanderungsverhalten der Tiere, so dass viele Drück- und Ansitzjagden im Vergleich zu den Vorjahren erfolglos verliefen.

Aufgrund der optimalen Vorbereitungen wurde in der Jagdsaison 2007/2008 das Probenaufkommen erheblich gesteigert. Gleichwohl ließen sich die ursprünglich aversierten Zahlen nicht ganz erreichen¹. Die hat primär folgenden Grund: In einigen Gebieten führte eine sehr geringe Kooperationsbereitschaft der Jagdausübenden – trotz intensiver und zeitlich sehr aufwändiger Überzeugungsversuche – zu einem stark unterdurchschnittlichen Probenaufkommen. Wenngleich wir wissen, dass der intensive Kontakt und die Motivation der Jagdausübenden durch die Projektbetreuer entscheidend für den generellen Erfolg des Projekts waren, konnte einer Verweigerungshaltung einzelner damit nicht begegnet werden. Hier müssten verwaltungstechnische Maßnahmen (wie z.B. Verordnungen) flankiert wirken. Ein weiterer genereller Aspekt ist, dass die Jäger dem direkten Kurierversand von Widderhäuptern oftmals ablehnend gegenüberstanden (Trophäen haben bei ältern Widdern einen erheblichen materiellen Wert). Der vor diesem Hintergrund dennoch erfreulich hohe Anteil von Widderproben (33%) ist auf den hohen Einsatz der Projektmitarbeiter zurückzuführen, die die einzelnen Jagden alle direkt anfahren mussten, um Proben vor Ort ohne Beschädigung der Trophäe zu entnehmen.

¹ Hierbei ist zu betonen, dass es in diesem Projekt nicht um die Erzielung einer generell hohen Gesamtzahl von Mufflons ging (was sehr einfach zu realisieren gewesen wäre), sondern um eine Mindestanzahl von Tieren aus jedem der spezifizierten Untersuchungsgebiete.

Die routinemäßigen TSE-Untersuchungen erfolgen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT) des Berliner Betriebs für zentrale Gesundheitliche Aufgaben im Labor des Zentrums für Infektionsdiagnostik (ZID). Durch diese ortsnahe Kooperation konnte auch der von einigen Bundesländern geforderten Wildbretzurückhaltung bis zur Vorlage des Untersuchungsergebnisses Rechnung getragen werden, da die Schnelltests innerhalb von 24 Stunden nach Probeneinlieferung abgeschlossen sein und ein schriftlicher Befund vorliegen musste. Die Probenzurückhaltung ist allerdings ein Hindernis, das über die gesetzlichen Vorschriften hinaus, die Probenlogistik stark verzögert und die Motivation der Jagdausübenden zur Teilnahme senkt.

Im Anschluss an die Jagdsaison 2006/07 konnte eine **Kooperation** mit dem Institut für Epidemiologie am Standort Wusterhausen des Friedrich-Loeffler-Instituts aufgebaut werden, das den Server der nationalen Tierseuchendatenbank beherbergt. Dadurch und durch eigene Datenrecherche bei Statistischen Landesämtern und Jagdbehörden konnte die Risikogebietseinteilung für alle Landkreise Deutschlands überprüft und aktualisiert werden.

Mit der **Genotypisierung** des Prionproteins wurde im Herbst 2007 das Projekt um eine wichtige Komponente zur Risikoabschätzung ergänzt. Von insgesamt 246 Tieren aus 40 Muffelwildregionen wurden hierbei die PrP-Genotypen bestimmt. Die Arbeiten zu diesem Bereich im Frühjahr/Sommer 2008 verliefen zügig und plangemäß. Durch die Kombination der Ergebnisse von Genotypisierung und Populationscreening ist eine gegenüber dem ursprünglichen Ansatz weitaus bessere Risikoabschätzung möglich, die in unseren Augen die Aussagekraft der Studie erheblich verbessert.

Im Rahmen des Projekts sind auch Gehirn- und Lymphknotenproben von Mufflons in verschiedenen **Schnelltests** für kleine Wiederkäuer am IZW untersucht worden. Dieser Teilbereich hat jedoch aufgrund des Fehlens von Positivmaterial naturgemäß keine Akzentuierung erfahren können.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das Mufflon ist eine in vielen Europäischen Ländern verbreitete Wildschafart, wobei Deutschland (nach Tschechien) den weitweit zweitgrößten Bestand mit ca. 20.600 Individuen besitzt (Piegert & Uloth, 2005). Ob Mufflons in Deutschland frei von TSE-Erkrankungen der kleinen Wiederkäuer sind, ist bislang unbekannt.

a) Wissenschaftlicher Stand zu Beginn der Studie

- in Deutschland gibt es ungefähr 120 verschiedene Mufflonpopulationen, die vor allem im 19. und 20. Jahrhundert aus Korsika und Sardinien sowie aus Zoos (u.a. Frankfurt, Leipzig, Köln, Dresden, Halle) eingebürgert wurden. Es ist davon auszugehen, dass vereinzelt auch eine Einkreuzung von Hausschafen in den Muffelwildbestand stattgefunden hat (Piegert und Uloth, 2005).
- Histologische Untersuchungen deuten stark darauf hin, dass Mufflons für Scrapie (Wood et al., 1992) empfänglich sind. Scrapie ist eine seit Jahrhunderten bekannte, neurodegenerative Erkrankung von Schafen und Ziegen, die mit dem Auftreten von spongiformen Veränderungen im Zentralnervensystem einhergeht. Ursache der Erkrankung sind nach übereinstimmender Auffassung so genannte *Prionen* (infektiöse Proteine).
- Das Prionprotein bei Schafen weist Polymorphismen auf, die mit unterschiedlich hoher Empfänglichkeit für die klassische Scrapie-Erkrankung einhergehen (Goldmann et al., 1994).² Bei einem Vergleich der Sequenzen des Prionproteingens von Schafen mit zwei Mufflons wurden große Homologien deutlich (99,7 und 100%) (Seo et al., 2001). Der Genotyp (ARQ/ARQ) dieser Tiere deutet auf eine hohe Empfänglichkeit

² Die essentiellen Codons liegen an folgenden Positionen: Valin (V) oder Alanin (A) auf Codon 136, Arginin (R) oder Histidin (H) auf Codon 154 und Arginin (R), Glutamin (Q) oder Histidin (H) auf Codon 171; nachfolgend ist die Risikorangfolge (niedrig → hoch): ARR → AHQ / ARH / ARQ → VRQ. Nach dem englischen National Scrapie Plan werden Schafe aufsteigend nach Risiko fünf Gruppen zugeordnet: Der Genotyp ARQ/ARQ wird der Risikogruppe 3 zugeordnet („*Sheep that genetically have little resistance to scrapie*“).

für Scrapie hin. Unbekannt ist bisher, ob und in welcher Häufigkeit Mufflons in Deutschland einen Genotyp aufweisen, der sie für TSE besonders empfänglich macht.

- Die identische Aminosäuresequenz des Prionproteins (ARQ/ARQ) von Hausschafen mit zwei bisher untersuchten Mufflons lässt den Schluss zu, dass hinsichtlich einer Scrapie-Infektion keine „Barriere“ zu überwinden ist (Seo et al., 2001).
- In Deutschland wurden zwischen 1990 und 2005 laut Bundesministerium insgesamt 124 Scrapie-Fälle bei Hausschafen diagnostiziert. Seit Einführung des EU-weiten Scrapie-Überwachungsprogramms im Jahr 2002, ist die Zahl der nachgewiesenen Scrapiefälle in ganz Europa deutlich angestiegen (Buschmann et al., 2004a). Zwischen Januar 2002 und September 2003 wurden in der EU rund 675.000 kleine Wiederkäuer auf TSE getestet (EFSA, 2003 literatur fehlt). Davon waren 2727 positiv.
- Scrapie ist horizontal zwischen Schafen übertragbar (Ryder et al., 2004). Obwohl demnach auch die Möglichkeit einer wechselseitigen Übertragbarkeit von Scrapie zwischen Hausschafen und Mufflons theoretisch gegeben ist (Wood et al., 1992; Seo et al., 2001), gibt es hierzu weder bei frei lebenden noch in menschlicher Obhut gehaltenen Mufflons systematische Untersuchungen. Zurzeit werden lediglich einzelne verendete bzw. klinisch auffällige Mufflons in Veterinäruntersuchungsämtern auf TSE untersucht.

b) Technischer Stand zu Beginn der Studie

- Die Antragsteller verfügten über langjährige Erfahrungen auf dem Gebiet der Epidemiologie, Immunologie und der Arbeit mit Infektionserregern. Verschiedene, für die Umsetzung des Projektes erforderliche genetische, histopathologische, immun-histochemische, immunologische und molekularbiologische Untersuchungstechniken waren am IZW etabliert. Im Rahmen einer vom IZW durchgeführten und vom BMBF geförderten „Studie über TSE bei Cerviden in Deutschland“ wurden zwischen 2002 und 2005 über 7000 frei lebende Cerviden (Rehe, *Capreolus capreolus*; Rothirsche, *Cervus elaphus elaphus*; Damhirsche, *Dama dama*) auf TSE getestet (mittlerweile publiziert: Schettler et al., 2006). Entsprechend waren umfangreiche Erfahrungen z.B. im Bereich der Probenlogistik und intensive Kontakte zu Ministerien und

Genehmigungsbehörden sowie den Kooperationspartnern aus Forst und Jagd vorhanden.

- Mit dem ILAT stand dem Projekt ein zuverlässiger Kooperationspartner (akkreditiertes TSE-Labor) für die routinemäßige Untersuchung der Gewebeproben zur Verfügung. Mit dem nationalen Referenzlabor für die BSE- und Scrapie-Diagnostik (Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems) sind vor Projektbeginn darüber Vereinbarungen über eine Untersuchung von möglichen Verdachtsfällen getroffen worden.

Vorbemerkung: Die nachfolgende Darstellung der Methoden und Ergebnisse der Studie sind zum Großteil der Dissertationsschrift von Anke Wiethölder entlehnt, die dem Projektgeber unmittelbar nach Fertigstellung zur Verfügung gestellt wird.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material des Populationsscreenings

Untersucht wurden frei lebende Mufflons aus 31 Landkreisen verteilt über 10 Bundesländer (Abbildung 1), sowohl erlegtes Wild wie auch Fallwild. Das Populationsscreening war nicht flächendeckend deutschlandweit angelegt, sondern konzentrierte sich auf Gebiete, in denen die Wahrscheinlichkeit TSE bei Mufflons zu entdecken als höher eingeschätzt wurde. Die Einteilung erfolgte auf Kreisebene unter Berücksichtigung folgender Kriterien:

- (1) Vorkommen von Scrapie-Neuausbrüchen bei Hausschafen
- (2) Muffelwildstrecke pro km² als Indikator für die Größe des Muffelwildbestandes
- (3) Hausschafbestände pro km² zur Abschätzung der Schafdichte

Je nach Auftreten von Scrapie, der Muffelwildstrecke pro km² und der Schafdichte wurde versucht alle Landkreise, kreisfreien Städte und Stadtstaaten in die Risikoklassen I-IV einzuordnen (Tabelle 1), wobei Klasse IV das höchste und Klasse I das niedrigste Risiko für ein Vorkommen von TSE bei Mufflons darstellt. Bei 39 Landkreisen bzw. kreisfreien Städten war eine Zuordnung aufgrund fehlender Daten nicht möglich.

Alle Gebiete der Risikoklassen II und III wurden untersucht. Die Risikogebietseinteilung wurde laufend aktualisiert. Der Zeitraum der Probensammlung erstreckte sich über die Jagdjahre 2006 / 07 und 2007 / 08. Der Hauptteil der Proben fiel in der Jagdsaison (August bis Januar) an. Schafshäupter wurden meist per Kurierdienst an das Institut gesandt, bei Widdern und auf großen Jagden erfolgte eine Beprobung vor Ort. Das Alter aller Tiere wurde anhand des Zahnalters geschätzt. Nur Tiere bei denen bereits die ersten bleibenden Schneidezähne (I1) durchgebrochen waren, und die somit älter als 18 Monate waren, wurden in das Screening miteinbezogen. Um sowohl atypische als auch typische Scrapie zu entdecken wurden i. d. R. von jedem Tier die Medulla oblongata, das Cerebellum und die Lymphonodi retropharyngeales mediales entnommen und mit Hilfe eines TSE-Schnelltests untersucht.

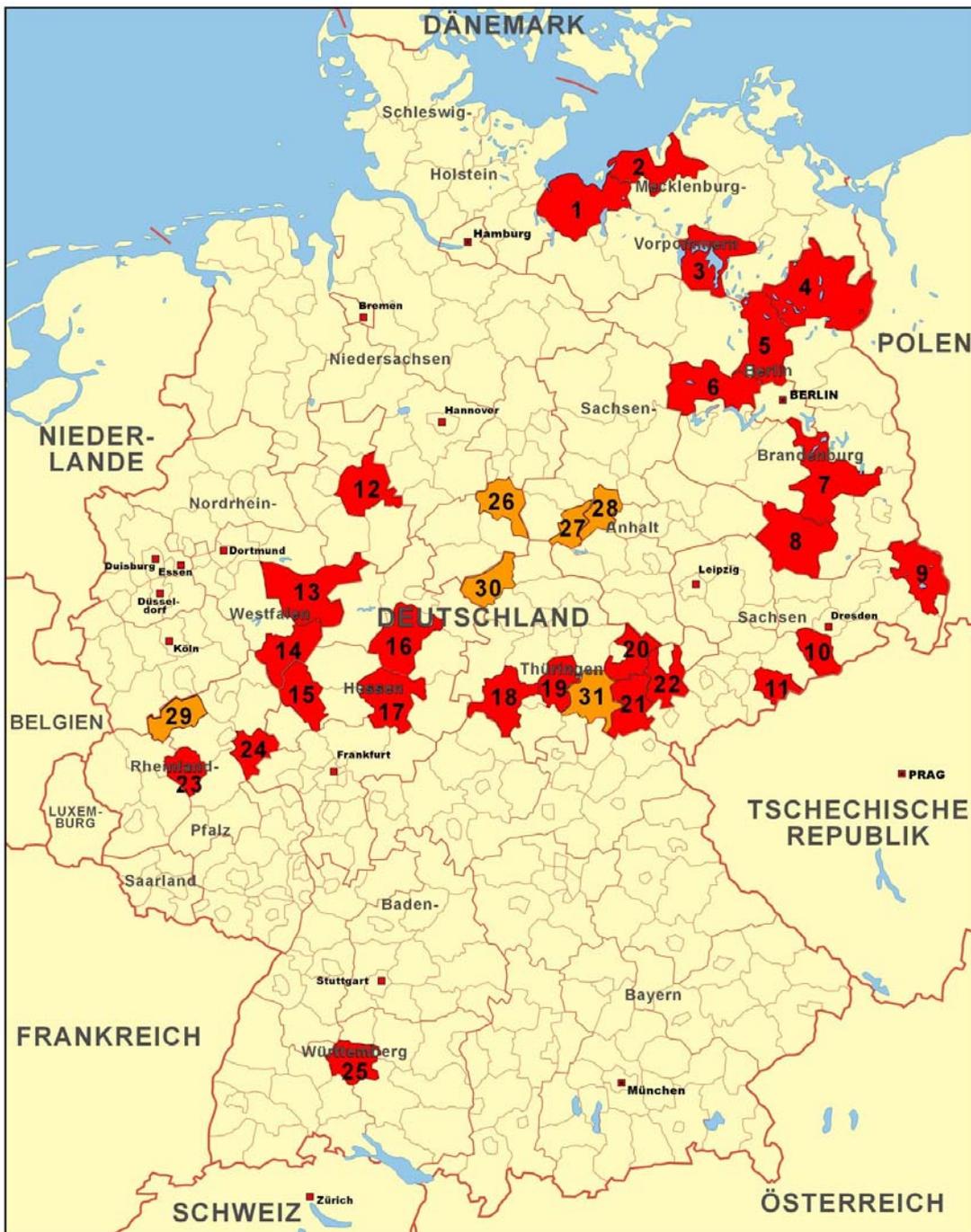


Abbildung 1: Kartographische Übersicht der Untersuchungsgebiete (rot: RIII, orange: RII).

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

Tabelle 1: Einteilung aller Landkreise, kreisfreien Städte und Stadtstaaten in die Risikoklassen I-IV.

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

k. A.: keine Angaben; H: hoch, M: mittel, N: niedrig.

2.2 Methoden des Populationsscreenings

2.2.1 TSE-Schnelltest

Der TSE-Schnelltest wurde im Rahmen einer Kooperation von dem akkreditierten Labor des Berliner Institutes für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT) durchgeführt. Es wurde der IDEXX HerdChek BSE – Scrapie Antigen Test Kit EIA® (Firma IDEXX, USA), zugelassen nach Anhang X Kapitel C Nr. 4 der Verordnung 999/2001 (VO (EG) 999/2001), verwendet. Bei diesem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest bindet ein Polymer selektiv an PrP^{Sc}, welches dann durch monoklonale Antikörper, gerichtet auf konservierte Bereiche des Prionproteins, detektiert wird. Die Durchführung erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers. Alle drei Gewebeproben eines Tieres wurden separat getestet. Alle Proben mit positiven Schnelltestergebnissen wurden zunächst im Doppelansatz wiederholt und anschließend mit Hilfe von weiterführenden Tests im Nationalen Referenzlabor untersucht.

2.2.2 Weiterführende Tests

Alle weiterführenden Tests zur Bestätigung der reaktiven Schnelltests wurden vom Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger des Friedrich-Loeffler-Institutes in seiner Eigenschaft als Nationales Referenzlabor (NRL) für TSE durchgeführt. Es wurden zwei Tests angewandt, zum einen der SAF Immunoblot und zum anderen die immunhistochemische Untersuchung (Buschmann et al., 2004b; Gretzschel et al., 2005).

2.2.3 Ermittlung der Nachweisgrenzen

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze des durchgeführten Surveys wurde nach Cannon und Roe (1982) mit einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95 % ($\beta = 0,05$) die Anzahl der erkrankten Tiere, die in der Population enthalten sein könnten (d), geschätzt. Im Anschluss konnte mit Hilfe von d dann die Prävalenz in % bestimmt werden, bei der mit 95 % Wahrscheinlichkeit mindestens ein untersuchtes Mufflon aus der Stichprobe hätte positiv sein müssen (Minimumprävalenzlevel – MPL). Zunächst wurde die Studienpopulation der Auswahlpopulation, d. h. allen während des Untersuchungszeitraumes in den Untersuchungsgebieten erlegten oder tot aufgefundenen Mufflons, die über 18 Monate alt waren, gegenübergestellt. Anschließend wurde die Population von adulten Mufflons in den Risikogebieten während des Untersuchungszeitraumes (Zielpopulation) geschätzt und das Minimumprävalenzlevel für diese Zielpopulation ermittelt.

2.2.4 Beurteilung von weiteren Schnelltests

Verschiedene Schnelltests zur Untersuchung von Gehirn- und Lymphknotenproben bei Mufflons wurden eingesetzt (TeSeE sheep/goat Western Blot der Firma Bio-Rad, Prionics-Check Western der Firma Prionics, Prion Screen der Firma Roche). Da bis zum Ende der Studie kein positives Testmaterial von Mufflons zur Verfügung stand, konnten keine Erkenntnisse hinsichtlich der Spezifität und Sensivität gewonnen werden. Daher wurden lediglich Schritte im Zusammenhang mit der Probenaufarbeitung überprüft. Alle Tests sind prinzipiell geeignet zur Durchführung der TSE Untersuchungen bei Mufflons. Wir konnten jedoch feststellen, dass verschiedene Modifikationen im Protokoll zu einer besseren Applikation der Schnelltests führen. In erster Linie zeigte sich, dass die Standardhomogenisierungsprotokolle für Mufflongewebe insbesondere bei Lymphknoten, aber auch bei der Obexregion nicht ausreichend sind, d.h. es müssen Zentrifugenschritte ausgedehnt werden und auf eine gute Zerkleinerung und ausreichende Durchmischung vor Zugabe von weiteren Chemikalien zur Testdurchführung ist zu achten.

2.3 Material der Genotypisierung

Alle Tiere aus dem Screening wurden nach ihrem Erlegungsort geographisch geordnet. Aus jedem Gebiet wurden Mufflons zufällig ausgewählt. Die Anzahl richtete sich dabei nach der Größe und räumlichen Ausdehnung der einzelnen Muffelwildgebiete (kleine isolierte Subpopulationen 3-5, große Subpopulationen 10-20 Tiere). Als Ausgangsmaterial diente ursprünglich für die TSE-Untersuchung entnommenes Gehirngewebe in der Größenordnung von 20-25 mg.

2.4 Methoden der Genotypisierung

2.4.1 DNA-Isolierung

Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des Kits DNeasy® Blood & Tissue (Firma Qiagen) nach Herstellerangaben. Vorhandene Zellen werden dabei lysiert und die enthaltenen DNA an eine Siliziumdioxid-Membran gebunden. Proteine, Kationen und andere verunreinigende Substanzen werden durch Wasch- und Zentrifugationsschritte entfernt. Anschließend wird die aufgereinigte DNA in Wasser oder Puffer gelöst.

2.4.2 PCR

Unter der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) versteht man die selektive Amplifizierung von ausgewählten DNA-Fragmenten mittels thermostabiler DNA-Polymerasen und Primeroligonukleotiden. Die hier verwendeten Primer (Seo et al. 2001) amplifizieren ein 862 Basenpaar (bp) langes DNA-Fragment des Exons 3, das vollständig den ORF des Prionprotein-Gens (PRNP) beinhaltet. Die Amplifizierung der Targetsequenz erfolgte im Thermocycler TGradient® (Firma Biometra) mit einem Standard-PCR-Ansatz von 50 µl. Es wurden je 2 µl Probenmaterial als Template eingesetzt sowie jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt.

2.4.3 Gelelektrophorese

Die Überprüfung der Amplifizierung erfolgte anschließend durch Elektrophorese in einem 3-prozentigen Agarosegel mit Ethidiumbromidzusatz als Nukleinsäurefarbstoff. Tris-Acetat-EDTA (TAE) diente dabei als Laufpuffer. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators.

2.4.4 Aufreinigung

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

2.4.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung des PCR-Produktes wurde nach der Kettenabbruchmethode mit dem BigDye® Terminator™ v3.1 Cycle Sequencing Kit (Firma Applied Biosystems) durchgeführt. Bei dieser der PCR sehr ähnlichen Methode wird ein Teil der dNTP's ersetzt durch fluoreszierende Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP's). Wenn diese von der Polymerase eingebaut werden, findet ein Kettenabbruch statt. Das Ergebnis sind unterschiedlich lange DNA-Fragmente deren letzte Base jeweils fluoreszenzmarkiert ist. Durch anschließende Elektrophorese werden die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Die unterschiedlichen Fluoreszenzen werden detektiert und so kann sukzessiv die Basenreihenfolge bestimmt werden.

2.4.6 Auswertung der Sequenzen

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

3 ERGEBNISSE

3.1 Zusammensetzung der Proben des Populationscreenings

Insgesamt wurden 823 Mufflons aus 38 Landkreisen und einem Stadtstaat untersucht. Davon waren 66 % (n = 549) der Tiere weiblich und 33 % (n = 274) männlich. Abbildung 2 zeigt die Geschlechts- und Altersverteilung innerhalb der Stichprobe.

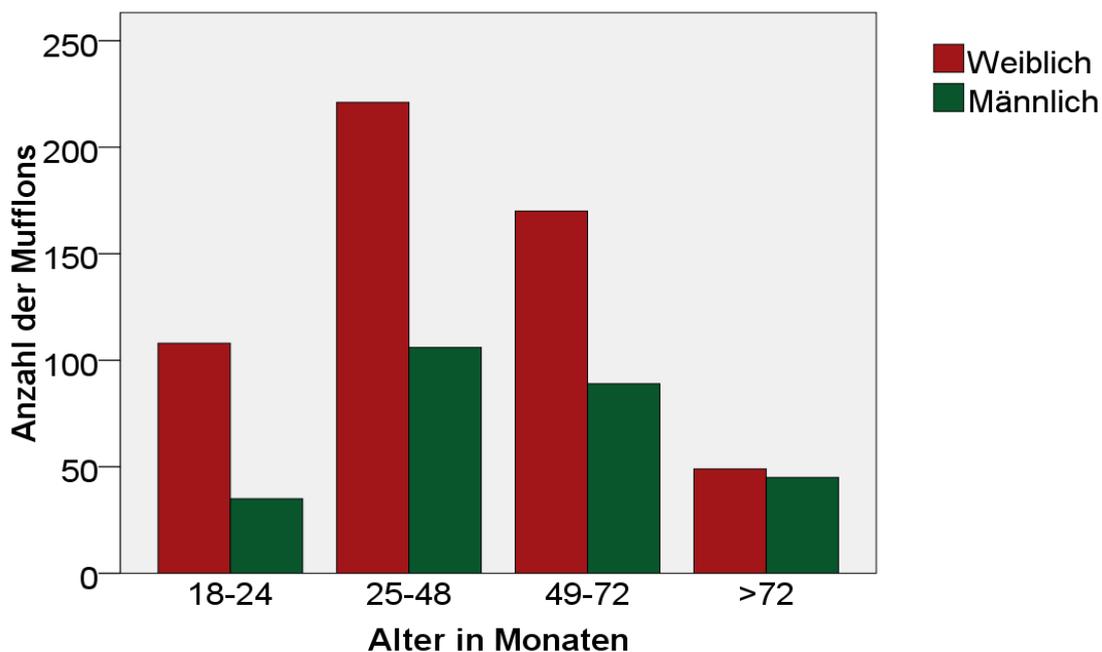


Abbildung 2: Balkendiagramm des Geschlechterverhältnisses in den einzelnen Alterklassen.

Von den 823 untersuchten Mufflons konnten 2.453 Gewebeproben genommen werden. Es gelangten insgesamt 822 Obex-, 820 Cerebellum- und 811 Lymphknotenproben zur Einsendung an das ILAT und wurden mittels Schnelltest untersucht.

3.2 Ergebnisse Schnelltest

Zwei der 2453 untersuchten Gewebeproben waren reaktiv, d. h. ihr Absorptionswert lag knapp über dem Cutoff-Wert. Daher wurden beide Tiere zunächst als Scrapie-Verdachtsfälle eingestuft. Bei den restlichen 2.451 Gewebeproben lag der Absorptionswert deutlich unter dem Cutoff-Wert, so dass alle übrigen 821 Mufflons als TSE-negativ eingestuft wurden.

3.3 Ergebnisse weiterführende Tests

Alle weiterführenden Tests waren bei allen Gewebeproben der beiden Verdachts-Tiere negativ. Die Ergebnisse des Schnelltestes konnten nicht bestätigt werden. Alle 823 untersuchten Mufflons waren demnach PrP^{Sc}-negativ.

3.4 Ermittelte Nachweisgrenzen

Zuerst wurde die Studienpopulation betrachtet und dann der Auswahl- und Zielpopulation gegenübergestellt. Alle zwischen August 2006 und Oktober 2008 auf TSE untersuchten Mufflons ($n = 823$) waren negativ, die Prävalenz in der Studienpopulation (P_S) betrug somit null ($P_S = 0$).

Um Rückschlüsse auf die Auswahlpopulation ziehen zu können, wurden die untersuchten Mufflons den einzelnen Risikoklassen zugeordnet. Aus Risikoklasse III stammten 510 Tiere (62 %) und aus Gebieten der Klasse II 238 Tiere (29 %). Durch falsche Zuordnung des Erlegungsortes und Verwechslungen wurden aus der Risikoklasse I 71 Mufflons (9 %) untersucht, obwohl Tiere dieser Risikoklasse dem Studiendesign nach eigentlich nicht beprobt werden sollten. Von der Aufteilung mussten vier Tiere ausgenommen werden, drei dieser Tiere wurden außerhalb des Untersuchungszeitraumes erlegt. Ein Mufflon stammte aus einer zoologischen Einrichtung. Die Probenanzahl wurde der Auswahlpopulation (adulte Jagdstrecken inklusive Fallwild) und anschließend der Zielpopulation (geschätzte adulte Population) gegenüber gestellt.

Tabelle 2 enthält die Schätzungen für die Anzahl der kranken Tiere (d) in der Studien-, Auswahl- und Zielpopulation sowie die zugehörigen Minimumprävalenzlevel.

Tabelle 2: Übersicht über die Prävalenzen in den Risikoklassen bezogen auf die unterschiedlichen Populationen

Population		n	N	d	Prävalenz in %
Studienpopulation		823	823	0	0
	RIII	510	2.245	11,66	< 0,519
Auswahlpopulation	RII	238	963	10,56	< 1,097
	RI	71	4.238	173,65	< 4,097
	RIII	510	6.718	39,58	< 0,564
Zielpopulation	RII	238	2.773	33,47	< 1,198
	RI	71	16.347	673,94	< 4,122

n: Stichprobenanzahl; N: Größe der Population

Dabei ist davon auszugehen, dass die wahren TSE-Prävalenzen in den einzelnen Populationen geringer als die ermittelten Minimumprävalenzlevel sind, da ansonsten mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit mindestens ein Mufflon im Screening positiv gewesen wäre. Aus den Schätzungen lässt sich ablesen, dass in den Risikogebieten der Klasse III die TSE-Prävalenz für adulte Mufflons im Untersuchungszeitraum mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit unter 0,56 % lag. In Gebieten der Klasse II lag die Prävalenz mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % unter 1,2 %. Für Gebiete der Risikoklasse I kann von einer Prävalenz von unter 4,12 % ausgegangen werden.

3.5 Probenzusammensetzung der Genotypisierung

Insgesamt wurden von 246 Tieren aus 40 Muffelwildregionen die PrP-Genotypen bestimmt. Abbildung 3 stellt das Geschlechterverhältnis und die Altersstruktur der genotypisierten Mufflons dar. 165 Tiere waren weiblich, 81 männlich. Aus der Alterklasse 18-24 Monate stammten 47 Tiere, aus der Alterklasse 25-48 Monate 96 und aus der Alterklasse 49-72 Monate 72. 31 (13 %) Mufflons waren über 72 Monate alt.

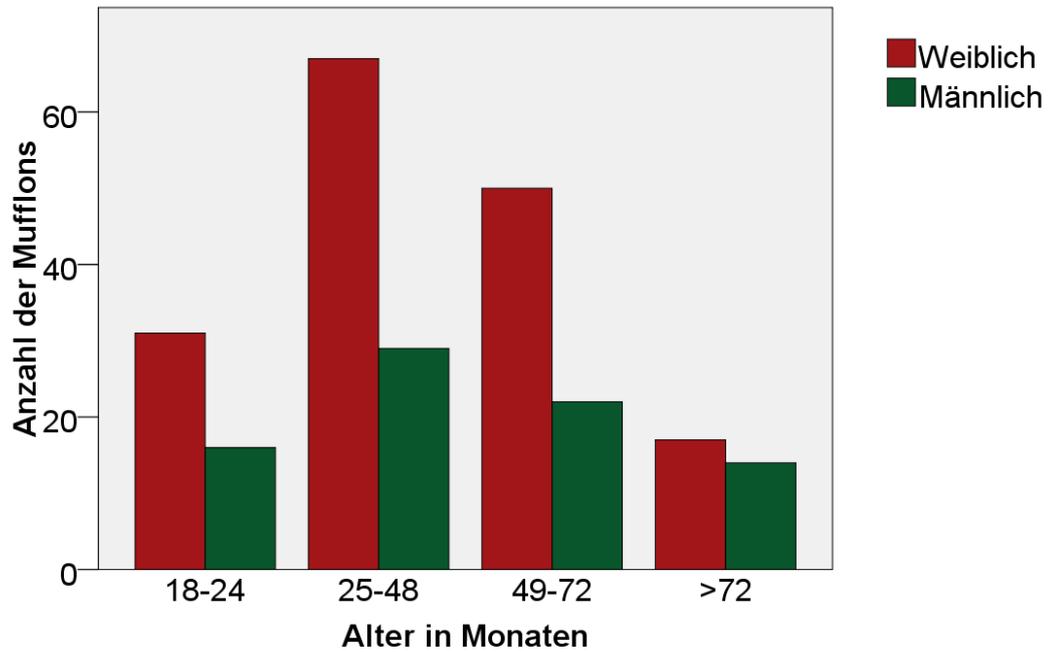


Abbildung 3: Altersstruktur und Geschlechterverhältnis der genotypisierten Mufflons (n=246).

3.6 Ergebnisse der DNA-Isolierung und -Amplifizierung

Von 246 Mufflons konnte die genomische DNA isoliert werden und anschließend ein ca. 900 bp langes DNA-Stück amplifiziert werden. Abbildung 4 zeigt exemplarisch die Agargelelektrophorese der PCR-Produkte.

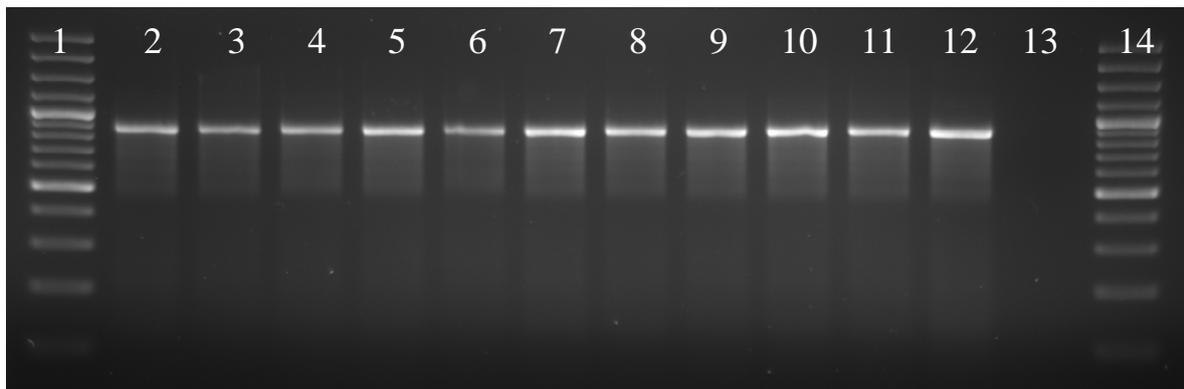


Abbildung 4: Gelelektrophorese der PCR-Produkte (1 + 14: 100 Basenpaarmarker, 2-12: Proben, 13: Negativkontrolle).

3.7 Ergebnisse Sequenzierung

Von 213 Tieren waren sowohl Hin- als auch Rückstrang eindeutig lesbar, bei 33 Tieren konnte nur jeweils ein Strang ausgewertet werden. Das Augenmerk lag dabei auf dem 771 bp umfassenden ORF des PRNP. Alle erhaltenen Sequenzen wurden mit den Genbankeinträgen U67922 (Schaf), AB060288 und AB 060289 (beides Mufflon) verglichen und in ihre entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt.

Besonderes Interesse galt den Codons 136, 154, und 171, da vor allem diese mit der Varianz der Scrapie-Empfänglichkeit assoziiert werden. Tabelle 3 stellt die Basentriplets und Aminosäuresubstitutionen dieser Codons dar, die bei allen 246 untersuchten Mufflons identisch waren. Das Basentriplett Guanin, Cytosin und Cytosin des Codons 136 codiert die Aminosäure Alanin. Cytosin, Guanin und Thymin ergeben die Aminosäure Arginin an Stelle 154 und Cytosin, Adenin und Guanin stehen für die Aminosäure Glutamin an Position 171. Damit weisen alle Tiere – unabhängig von Ihrem Herkunftsort – den gleichen Prionprotein-Genotyp ARQ/ARQ auf (siehe Tabelle 4). Durch das Codon Cytosin, Thymin und Thymin wird an Stelle 141 Leucin codiert. Auch dieses war bei allen Tieren identisch.

Schlussfolgerungen: Da alle 246 genotypisierten Tiere trotz unterschiedlicher geographischer Herkunft den gleichen ARQ/ARQ-Genotyp aufwiesen, ist es wahrscheinlich, dass dies der einzig vorhandene Genotyp im gesamten Bestand ist. Aufgrund des Genotyps (ARQ/ARQ) ist eine vergleichsweise geringe Resistenz gegenüber klassischer Scrapie gegeben. Es liegt eine einheitliche Empfänglichkeit vor.

Tabelle 3: Codons des PRNP der untersuchten Mufflons.

Codon	Triplett	AS	Frequenz der Haplotypen in %
136	gcc	Alanin (A)	100
154	cgt	Arginin (R)	100
171	cag	Glutamin (Q)	100

Tabelle 4: Probenanzahl und PrP Haplotypfrequenzen je Muffelwildvorkommen

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

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

3.8 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Untersuchung ist so angelegt worden, dass bei negativem Untersuchungsergebnis aller untersuchten Proben, nur wenige Einzeltiere in den untersuchten Risikogebieten unentdeckt erkrankt gewesen sein können. Ein epidemisches Vorkommen von TSE bei Mufflons kann daher gegenwärtig in Deutschland ausgeschlossen werden, nicht jedoch das Auftreten einzelner TSE-Fälle. Der statistisch-epidemiologische Ansatz lässt aufgrund unserer Stichprobe Rückschlüsse auf das verbleibende potentielle Risiko zu: Mit 95 %iger Sicherheit liegt das Minimumprävalenzlevel in den Risikogebieten der Klasse III im Bereich von unter 0.56%. Oder anders ausgedrückt: Von den ca. 6700 adulten Mufflons im Risikogebiet III (Scrapie bei Hausschafen, mittlere bis hohe Mufflondichte, vgl. Tab. 2) könnten sich maximal 40 erkrankte Tiere befinden. Ein Vorkommen in solcher Größenordnung kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Unsere Befunde zeigen weiterhin, dass Mufflons den Prionprotein-Genotyp ARQ/ARQ aufweisen, der zumindest bei Hausschafen mit einer geringen Resistenz gegenüber klassischer Scrapie behaftet ist. Eine Übertragung von klassischer Scrapie von Hausschafen auf Mufflons ist nach gegenwärtigem Ermessen möglich und in Zukunft sogar als durchaus wahrscheinlich anzusehen (siehe dazu auch die Ausführungen in der Anlage „Darstellung, Wertung sowie mögliche Umsetzung oder Anwendung der Ergebnisse“).

3.8.1 Wirtschaftliche Verwertbarkeit und wissenschaftliche Anschlussfähigkeit

TSE-Erkrankungen haben in der Vergangenheit einen nicht unerheblichen wirtschaftlichen Einfluss in Deutschland ausgeübt. Diese Studie ermöglicht nun eine evidenzbasierte Risikoabschätzung hinsichtlich des Vorkommens von TSE bei Mufflons und einer möglichen wechselseitigen Übertragung von Scrapie zwischen Hausschafen und Mufflons. Da Mufflons – wenn überhaupt – eine sehr geringe TSE-Prävalenz aufweisen, ist eine Übertragung auf Nutztiere als extrem unwahrscheinlich anzusehen. Allerdings besteht das Risiko, dass Scrapie von Hausschafen auf Mufflons übertragen wird. Über die genaue Habitatnutzung von Wild- und Hausschafen im gemeinsamen Lebensraum ist allerdings sehr wenig bekannt (Wildtier-/Nutztier-Interaktionen); hier besteht ein dringender Forschungsbedarf um das konkrete Risiko einer Übertragung besser beurteilen zu können. Zudem ist eine akkurate epidemiologische Untersuchung von klassischer Scrapie bei Hausschafen notwendig, um „Kontaktstellen“ zwischen Hausschafen und Mufflons identifizieren zu können. Solche

„Hotspot“-Gebiete zeichnen sich insbesondere durch das Vorkommen von klassischer Scrapie bei Hausschafen sowie einer geographischen Überschneidung von Schafsweiden mit den Einstandsgebieten von Mufflons aus.

Unserer Auffassung nach könnte das Auftreten von klassischer Scrapie bei Mufflons weitreichenden Folgen haben, da sich Prionen in der Mufflonpopulation etablieren und aufgrund ihrer hohen Tenazität lange in der Umwelt infektiös bleiben könnten. Hiermit wäre ein Reservoir sowohl für Mufflons wie Hausschafe gebildet. Mufflons haben große Streifgebiete, die mit dem Lebensraum vieler Wild- und Nutztiere überlappen. Eine horizontale und vertikale Ausbreitung wäre vor diesem Hintergrund möglich und sicherlich nicht leicht einzudämmen. Ein Überspringen von Scrapie von Hausschafen auf Mufflons könnte daher auch von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung sein.

3.8.2 Wissenschaftliche Verwertbarkeit

Verschiedene Zwischenergebnisse dieser Studie sind in der Vergangenheit auf verschiedenen nationalen und internationalen Tagungen in Form von Vorträgen und Postern präsentiert worden (s. unten). Die Ergebnisse des Projekts werden gegenwärtig in einer Dissertation von Frau Anke Wiethölter in wissenschaftlich vertiefter Form aufgearbeitet. Die Publikation der Ergebnisse in referierten Zeitschriften ist unmittelbar nach Abschluss der Dissertation vorgesehen. Da hochrangige Zeitschriften die Publikation bereits veröffentlichter Daten ablehnen, bitten wir die Daten **nur zur internen Kommunikation zu verwenden und bis zur Akzeptierung der Publikationen vertraulich** zu behandeln.

Präsentationen von Zwischenergebnissen der Studie auf nationalen und internationalen Konferenzen und Tagungen

- EAZWV, Edinburg (2007): Survey on transmissible spongiform encephalopathy in European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) in Germany – a preliminary report. (Poster).
- Prion2007, Edinburg (2007): First results from a study on prion diseases in European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) in Germany. (Poster).
- Deutsche Zoologische Gesellschaft (100. Jahrestagung), Köln (2007): Is there a risk for prion disease in the European mouflon? (Vortrag).

- 7th Congress of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, Leipzig (2008): First results from a survey on prion diseases in European mouflon (*Ovis gmelini musimon*). (Poster).
- Prion2008, Madrid (2008): Risk assessment of transmissible spongiform encephalopathies in European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) from Germany. (Poster).
- 8th Conference of the European Wildlife Disease Association (Rovinj 2008): Survey on transmissible spongiform encephalopathies in European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) in Germany. (Poster)
- Neuroprion, Bratislava (2008): Study on prion diseases and prion protein genotypes in European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) in Germany (Vortrag).

4 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel / Aufgabenstellung: In dieser weltweit größten Studie sollte das Risiko des Auftretens von Transmissibler Spongiformer Enzephalopathie (bei Mufflons in Deutschland beurteilt werden. Das Projekt umfasste ein Populationsscreening sowie die Genotypisierung des Prionproteingens.

Methode: Unter Verwendung eines statistisch-epidemiologischen Ansatz wurden alle Verwaltungsgebiete in Deutschland in vier Risikoklassen eingeteilt. Die Risikoklassen waren durch das Auftreten von Scrapie bei Hausschafen, die Anzahl erlegter Mufflons pro Jahr (als Maß für die Populationsdichte), sowie die Häufigkeit von Hausschafen im jeweiligen Gebiet definiert. Der Beprobungsschwerpunkt lag der Risikoklasse III (*Auftreten von Scrapie bei Hausschafen und Vorkommen von Mufflons und Hausschafen in mindestens mittlerer Dichte*) und Risikoklasse II (*hohes Muffelwildvorkommen, jedoch kein Scrapiefall bei Hausschafen*). Proben wurden von Tieren genommen, die älter als 18 Monate waren und in den Jagdsaisons 2006/2007 und 2007/2008 erlegt worden sind. Für die Risikoklassen wurde das Minimum-Prävalenzniveau für TSE (95% Sicherheitswahrscheinlichkeit) bestimmt. Um typische und atypische Scrapie zu detektieren, wurde Gewebe sowohl des Gehirnstamms und des Kleinhirns als auch der retropharyngealen Lymphknoten entnommen. Die Gewebeproben wurden routinemäßig mit einem hochsensitiven Enzym-Immun-Assay (IDEXX HerdChek BSE-Scrapie) in einem akkreditieren Labor (ILAT) untersucht. Zur Genotypisierung des PRNP wurden Gewebeproben von 246 Individuen entsprechend der Untersuchungsgebiete

repräsentativ ausgewählt: die DNA wurde extrahiert und mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Aufgrund fehlenden Positivmaterials war naturgemäß keine detaillierte Evaluierung von Schnelltests möglich.

Ergebnisse: Insgesamt wurden 2453 Gewebeproben von insgesamt 823 Mufflons auf TSE untersucht: in keiner Probe konnten Prionen nachgewiesen werden. In den Risikogebieten der Klasse III lag die TSE-Prävalenz für adulte Mufflons im Untersuchungszeitraum unter 0,56 %, in der Risikoklasse II unter 1,2 %. Die Ergebnisse der Genotypisierung des PRNP ergaben, dass alle untersuchten Tiere den Genotyp ARQ/ARQ aufwiesen.

Schlussfolgerungen: Ein epidemisches Vorkommen von TSE bei Mufflons kann gegenwärtig in Deutschland ausgeschlossen werden. Allerdings ist es möglich, dass TSE unter Berücksichtigung der Nachweisgrenzen dennoch in Einzelfällen vorkommt. Alle genotypisierten Tiere wiesen den gleichen ARQ/ARQ-Genotyp auf, daher ist es wahrscheinlich, dass dies der einzig vorhandene Genotyp im gesamten Bestand ist. Aufgrund des Genotyps ist eine vergleichsweise geringe Resistenz gegenüber klassischer Scrapie gegeben. Die Ergebnisse stellen eine fundierte Basis für die Beurteilung des Risikos des Auftretens von TSE bei Mufflons dar.

5 GEGENÜBERSTELLUNG DER URSPRÜNGLICH GEPLANTEN ZU DEN TATSÄCHLICH EREICHTEN ZIELEN; GGF. MIT HINWEISEN AUF WEITERFÜHRENDE FRAGESTELLUNGEN

Das Hauptziel des Projekts war es, ein Screening auf TSE-Erkrankungen bei Mufflons in Deutschland durchzuführen. Diese Untersuchungen sind plangemäß durchgeführt worden. Keines der untersuchten Tiere wurde positiv getestet, aufgrund des statistisch-epidemiologischen Ansatzes kann zudem der Schluss gezogen werden, dass - wenn überhaupt - nur sehr wenige Mufflons an TSE erkrankt sein dürften. Da bislang unbekannt war, ob Mufflons einem empfänglichen Genotyp angehören, wurden zudem Genotypisierungen des Prionproteins durchgeführt: Sie zeigen, dass Mufflons in Deutschland nur wenig resistent gegenüber klassischer Scrapie sind. Die einzigartige Kombination von Populationscreening und Genotypisierung erlaubt nun eine konkrete Risikoabschätzung.

5.1 Screening für TSE Erkrankungen bei Mufflons in Deutschland

Das Screening auf TSE-Erkrankungen wurde plangemäß durchgeführt. Das Probenaufkommen lag aufgrund der bereits zuvor erörterten Gründe unter den ursprünglich geplanten Zahlen. Gleichwohl ist es gelungen aus allen Zielgebieten Proben zu erhalten. Daher sind entsprechend der ursprünglichen Planung generalisierende Aussagen über die Prävalenzen in den Risikogebieten möglich.

5.2 Testverfahren im Populationscreening

Die routinemäßigen TSE-Untersuchungen im Rahmen des Populationscreening in Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT) verliefen insgesamt reibungslos und sehr zufrieden stellend. In Abweichung zum ursprünglich vorgesehenen TeSeE sheep/goat der Firma Bio-Rad wurden die Tests mit dem IDEXX HerdChek EIA durchgeführt. Der Wechsel des Testverfahrens erfolgte zum einen, weil dieser Test zur Detektion von TSE bei kleinen Wiederkäuern sehr gut geeignet ist. Laut Herstellerangaben beträgt sowohl die Sensitivität wie auch die Spezifität für ovines Gehirnmaterial 100%; bei ovinen Lymphknotenmaterial beträgt die Sensitivität 94,2%, die Spezifität 99,1% (Leathers et al., 2005). Zum anderen ist der IDEXX HerdChek auch zur Detektion von atypischen Scrapie-Fällen geeignet.

5.3 Vergleich verschiedener Schnelltests

Dem Projekt lag bis zum Ende der Studie kein positives Mufflonmaterial zur Validierung der verschiedenen Schnelltests zur Verfügung. Die Untersuchungen zu möglichen Sensitivitätsunterschieden konnten daher nicht durchgeführt werden. Im TSE Archiv der Veterinary Laboratory Agency (VLA) in Weybridge befindet sich nach unseren Informationen Gehirnmaterial von 1-2 Mufflons aus England (Wood et al., 1992), bei dem der dringende Verdacht auf TSE-Erkrankungen bestand. Das mit Formalin fixierte und in Paraffin gegossene Material ist jedoch für TSE-Schnelltests nicht einsetzbar. Somit fehlte Positivmaterial für die Validierung. Unsere Untersuchungen zeigten ferner, dass bei manchen Tests spezifische Adaptationen im Aufarbeitungsprotokoll bei Mufflongewebe erforderlich sind, bevor die Proben in den Schnelltests optimal eingesetzt werden können.

5.4 Genotypisierung des Prionproteins

Um die Abschätzung der potentiellen Empfänglichkeit von Mufflons für TSE in Deutschland zu ermöglichen, ist die ursprüngliche Zielsetzung des Projekts um die Genotypisierung des Prionproteingens erweitert worden. Die Untersuchung zur Genotypisierung verlief plangemäß.

5.5 Hinweise auf weitergehende Fragestellungen

Es sollte untersucht werden, welche direkten Kontakte zwischen Hausschafen und Mufflons tatsächlich bestehen. Hierzu sollten Gebiete untersucht werden, die sich durch eine geographische Überschneidung von Schafsweiden mit den Einstandsgebieten von Mufflons auszeichnen. Diese Erkenntnisse wären auch für die Identifizierung von „Hot spot“-Gebieten sehr sinnvoll, die sich zusätzlich durch das Vorkommen von klassischer Scrapie bei Hausschafen auszeichnen. Eine Voraussetzung zur Identifizierung derartiger „hot-spots“ sind auch akkurate epidemiologische Untersuchungen von klassischer Scrapie bei Hausschafen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Buschmann A, Biacabe AG, Ziegler U, Bencsik A, Madec JY, Erhardt G, Lühken G, Baron T & Groschup MH (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, Ziegler U, Groschup MH (2004b). Standardization of BSE rapid test performances and experiences gathered during the implementation of large-scale testing. *Accreditation and Quality Assurance* **9**, 191-197.

Cannon RM und Roe RT (1982). *Livestock disease surveys – a field manual for veterinarians*. 1. Auflage. Canberra.

EFSA, European Food Safety Authority, Scientific Panel on biological hazards. Statement on the assessment of safety with respect to the consumption of goat meat and goat meat products in relation to BSE/TSE. 28.01.2005. www.efsa.eu.int

Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J & Hope J (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**, 989-95.

Gretzschel A, Buschmann A, Eiden M, Ziegler U, Lühken G, Erhardt G, Groschup MH (2005). Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *Journal of Veterinary Medicine B* **52**, 55-63.

NCBI (2008). Entrez Nucleotide Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>. 03.11.2008.

Piegert H und Uloth W (2005). *Der europäische Mufflon*. 2.Auflage, Hamburg.

Ryder S, Dexter G, Bellworthy S & Tongue S (2004). Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy. *Res Vet Sci* **76**, 211-7.

Schettler E, Steinbach F, Eschenbacher-Kaps I, Gerst K, Meussdoerffer F, Risch K, Streich WJ & Frölich K (2006). Surveillance for prion disease in cervids, Germany. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 319-322.

Seo SW, Hara K, Kubosaki A, Nasu Y, Nishimura T, Saeki K, Matsumoto Y, Endo H, Onodera T (2001). Comparative analysis of the prion protein open reading frame nucleotide sequences of two wild ruminants, the moufflon and golden takin. *Intervirology* **44**, 359-363.

VO (EG) 999/2001. Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter spongiformer Enzephalopathien vom 22.05.2001.

Wood JL, Lund L J & Done S H (1992). The natural occurrence of scrapie in moufflon. *Vet Rec* **130**, 25-7.