

**Entwicklung und Anwendung immunchemischer Verfahren
zum Nachweis von saurem Gliafaserprotein und von
basischem Myelinprotein als Markersubstanzen für
Gewebe des zentralen Nervensystems in Lebensmitteln**

Yvonne Contzen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde,
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

**Entwicklung und Anwendung immunchemischer Verfahren zum
Nachweis von saurem Gliafaserprotein und von basischem Myelinprotein
als Markersubstanzen für Gewebe des zentralen Nervensystems
in Lebensmitteln**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Yvonne Nicole Contzen

Tierärztin aus Krefeld

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter/in:

Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber
PD Dr. habil. C. Herden

Tag der Disputation: 14.10.2009

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz im Rahmen des Projektes 01HS022 „Geno- und phänotypische Identifizierung von BSE-Risikomaterial in Lebensmitteln tierischen Ursprungs“

**Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit**

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	2
2.1	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE)	2
2.1.1	Prionen als Krankheitserreger	2
2.1.2	Pathogenese der TSE	4
2.1.3	Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind	4
2.1.4	TSE bei anderen Tieren	7
2.1.5	TSE beim Menschen	9
2.2	Epidemiologie der BSE	12
2.2.1	Situation in Deutschland	13
2.2.2	Situation in Europa	14
2.2.3	Situation in der restlichen Welt	14
2.3	Inaktivierung von pathogenen Prionenproteinen	15
2.4	Gesetzliche Vorschriften zum Schutz vor BSE (Verbraucherschutz)	16
2.4.1	Maßnahmen zum Verbraucherschutz	16
2.4.2	Von BSE betroffene Organe und Gewebe	18
2.4.3	Auswirkungen auf den Schlachtablauf	22
2.4.4	Auswirkungen auf Fleischerzeugnisse	23
2.5	Nachweisverfahren von BSE	25
2.6	Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen	27
2.6.1	Testkits	27
2.6.2	Studien zum Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen	28
2.6.3	Speziesspezifischer ZNS-Nachweis in Fleischerzeugnissen	30
2.7	Saures Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein, GFAP)	32
2.8	Basisches Myelinprotein (Myelin basic protein, MBP)	33
2.9	Angewendete immunchemische Verfahren	34
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	36
3.1	Materialien und Geräte	36
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	36
3.1.2	Markerproteine	37

3.1.3	Immunreagenzien	37
3.1.4	Lösungen und Puffer	37
3.1.5	Geräte und Sonstiges	39
3.1.6	Enzymimmuntest	40
3.1.7	Western Blot	40
3.1.8	Tiere	40
3.1.9	Gewebeproben und Referenzmaterialien	41
3.1.10	Handelsproben	42
3.2	Methodik	44
3.2.1	Herstellung der Immunreagenzien	44
3.2.1.1	Gewinnung spezifischer Antiseren	44
3.2.1.1.1	Auswahl und Synthese der Immunogene bGFAP-Peptid 1 und bGFAP-Peptid 2	44
3.2.1.1.2	Kopplung von bGFAP-Peptid 1 und 2 an Keyhole Limpet Hemocyanin	45
3.2.1.1.3	Aufreinigung von MBP mittels Ultrazentrifugation	46
3.2.1.1.4	Immunisierung und Gewinnung der Antiseren	46
3.2.1.1.5	Kontrolle des Immunisierungsverlaufs	48
3.2.1.2	Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten	50
3.2.1.2.1	Aufbereitung der Antiseren	50
3.2.1.2.2	Enzymmarkierung der IgG-Rohfraktion (Kopplung)	50
3.2.1.2.3	Gelchromatographische Reinigung der Kopplungsprodukte	51
3.2.1.2.4	Überprüfung der Konjugatfraktionen	52
3.2.2	Erstellung von Sandwich-Enzymimmuntests (S-EIA) für den Nachweis der ZNS-Markerproteine GFAP sowie MBP	52
3.2.2.1	Erstellung von Sandwich-Enzymimmuntests für bGFAP unter Verwendung von Antikörpern gegen bGFAP-Peptide als Fängerantikörper	54
3.2.2.2	Erstellung von Sandwich-Enzymimmuntests für bMBP unter Verwendung polyklonaler Kaninchenantikörper als Fängerantikörper	55
3.2.2.3	Erstellung eines Sandwich-Enzymimmuntests für bMBP unter Verwendung monoklonaler Fängerantikörper	56
3.2.2.4	Orientierende Versuche zur Tierartspezifität der Enzymimmuntests mittels boviner und porciner GFAP- bzw. MBP-Reinproteinstandardkurven	57
3.2.2.5	Probenvorbereitung (Standardextraktionsmethode)	58
3.2.2.6	Herstellung von Gehirnstandardextrakten	58

3.2.2.7	Überprüfung der Tierartspezifität durch Einsatz von bovinem und porcinem Gehirnextrakt	59
3.2.2.8	Ermittlung der optimalen Kombinationen der Immunreagenzien	60
3.2.3	Versuche zur Anwendbarkeit der entwickelten enzymimmunologischen Nachweisverfahren	61
3.2.3.1	Vergleich der ZNS-Materialien Gehirn und Rückenmark im Enzymimmuntest	61
3.2.3.2	Sensitivität und Spezifität der Testsysteme	61
3.2.3.2.1	Künstliche Kontaminierung	61
3.2.3.2.2	Untersuchung der künstlich kontaminierten, rohen Probenmaterialien	64
3.2.3.2.3	Untersuchung der künstlich kontaminierten, erhitzten Probenmaterialien	65
3.2.3.2.4	Überprüfung der Kreuzreaktivität der Testsysteme mit den Wiederkäuern Schaf und Ziege	66
3.2.3.2.5	Überprüfung der Kreuzreaktivität der Testsysteme mit den Spezies Pferd, Pute, Huhn und Kaninchen	67
3.2.3.2.6	Überprüfung der Gewebespezifität der Testsysteme	67
3.2.3.3	Untersuchung von Handelsproben in den Testsystemen	68
3.2.4	Ermittlung standardisierter Extraktionsverfahren	69
3.2.4.1	Einfluss verschiedener Extraktionsmittel	69
3.2.4.2	Reproduzierbarkeit der Standardextraktionsmethode	69
3.2.5	Überprüfung der Haltbarkeit der Reagenzien	70
3.2.6	Ermittlung des Gehaltes an GFAP bzw. MBP im Rindergehirn	70
3.2.7	Versuche zur Verkürzung der Testdauer des MBP-Enzymimmuntests (monoklonale Fängerantikörper)	71
3.2.8	Versuche zu einem indirekten MBP-Enzymimmuntest (HOLTBECKER, 2004)	72
3.2.9	Charakterisierung der Antikörperspezifität mittels Immunoblot	73
3.2.9.1	Probenvorbereitung	73
3.2.9.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Blotting	74
3.2.9.3	Immundetektion	75
3.2.9.4	Einsatz von bovinem und porcinem GFAP- bzw. MBP-Reinprotein und Gehirnextrakten im Western Blot	76
3.2.9.5	Sensitivität der durchgeführten Western Blot Methode	78

4	ERGEBNISSE	79
4.1	Ergebnisse für einen GFAP-Sandwich-Enzymimmuntest	79
4.1.1	Herstellung der Immunreagenzien	79
4.1.1.1	Gewinnung spezifischer Antiseren und Immunisierungsverlauf	79
4.1.1.1.1	Aufbereitung der Antiseren und Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten	81
4.1.2	Erstellung boviner und porciner GFAP-Reinproteinstandardkurven in den Testsystemen	84
4.1.3	Untersuchung von bovinem und porcinem Gehirnextrakt in den Testsystemen	88
4.1.4	Optimale Kombination der Immunreagenzien	92
4.1.5	Vergleich des GFAP-Gehaltes in Gehirn und Rückenmark	93
4.1.6	Untersuchung künstlich kontaminierter, roher Probenmaterialien	94
4.1.7	Untersuchung künstlich kontaminierter, erhitzter Probenmaterialien	97
4.1.8	Kreuzreaktivität mit den Spezies Schaf und Ziege	99
4.1.9	Kreuzreaktivität mit den Spezies Pferd, Pute, Huhn und Kaninchen	101
4.1.10	Gewebespezifität der Testsysteme	103
4.1.11	Untersuchung von Handelsproben	105
4.1.12	Festlegung eines Testsystems	106
4.1.13	Standardisiertes Extraktionsverfahren	107
4.1.13.1	Einfluss verschiedener Extraktionsmittel	107
4.1.13.2	Reproduzierbarkeit der Standardextraktionsmethode	107
4.1.14	Haltbarkeit der im Enzymimmuntest verwendeten Reagenzien	108
4.1.15	GFAP-Gehalt in Rindergehirn	110
4.1.16	Charakterisierung der Antikörperspezifität mittels Immunoblot	111
4.1.16.1	Western Blot des GFAP-Reinproteins und des Gehirnextraktes	111
4.1.16.2	Charakterisierung der Antiseren und Konjugate im Immunoblot unter Verwendung von GFAP-Reinprotein	112
4.1.16.3	Charakterisierung der Antiseren und Konjugate im Immunoblot unter Verwendung von Gehirnextrakten	114
4.2	Ergebnisse für einen MBP-Sandwich-Enzymimmuntest	117
4.2.1	Herstellung der Immunreagenzien	117
4.2.1.1	Gewinnung spezifischer Antiseren und Immunisierungsverlauf	117

4.2.1.2	Aufbereitung der Antiseren und Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten	118
4.2.2	Erstellung boviner und porciner MBP-Reinproteinstandardkurven in den Testsystemen	119
4.2.3	Untersuchung von bovinem und porcinem Gehirnextrakt in den Testsystemen	122
4.2.4	Optimale Kombination der Immunreagenzien	125
4.2.5	Vergleich des MBP-Gehaltes in Gehirn und Rückenmark	125
4.2.6	Untersuchung künstlich kontaminierter, roher Probenmaterialien	127
4.2.7	Untersuchung künstlich kontaminierter, erhitzter Probenmaterialien	129
4.2.8	Kreuzreaktivität mit den Spezies Schaf und Ziege	132
4.2.9	Kreuzreaktivität mit den Spezies Pferd, Pute, Huhn und Kaninchen	133
4.2.10	Gewebespezifität des Testsystems	135
4.2.11	Untersuchung von Handelsproben	137
4.2.12	Standardisiertes Extraktionsverfahren	138
4.2.12.1	Einfluss verschiedener Extraktionsmittel	138
4.2.12.2	Reproduzierbarkeit der Standardextraktionsmethode	139
4.2.13	Haltbarkeit der im Enzymimmuntest verwendeten Reagenzien	140
4.2.14	MBP-Gehalt in Rindergehirn	141
4.2.15	Verkürzung der Testdauer	142
4.2.16	Indirekter MBP-Enzymimmuntest nach HOLTBECKER (2004)	142
4.2.17	Charakterisierung der Antikörperspezifität mittels Immunoblot	146
4.2.17.1	Western Blot des MBP-Reinproteins und des Gehirnextraktes	146
4.2.17.2	Charakterisierung der Antiseren und Konjugate im Immunoblot unter Verwendung von MBP-Reinprotein	147
4.2.17.3	Charakterisierung der Antiseren und Konjugate im Immunoblot unter Verwendung von Gehirnextrakten	148
4.2.17.4	Sensitivität der angewendeten Western Blot Methode	151
5	DISKUSSION	153
5.1	Erstellung eines GFAP-Sandwich-Enzymimmuntests	153
5.2	Erstellung eines MBP-Sandwich-Enzymimmuntests	160
5.3	Praktische Anwendbarkeit der Testsysteme	162

6	ZUSAMMENFASSUNG	165
7	SUMMARY	166
8	LITERATURVERZEICHNIS	167

1 EINLEITUNG

Die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) wurde im Jahr 1986 erstmals in England beschrieben (WELLS et al., 1987). Die ersten diagnostizierten Fälle der Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) traten 1995 ebenfalls in England auf (BRITTON et al., 1995; BATEMAN et al., 1995; WILL et al., 1996). Derzeit wird davon ausgegangen, daß vCJD als humane Form der BSE anzusehen ist (HILL et al., 1997; BRUCE et al., 1997; ALMOND und PATTISON, 1997; PRUSINER, 1997) und die Übertragung auf den Menschen durch die Aufnahme von mit infektiösen Prionenproteinen aus bovinem ZNS-Material kontaminierten Lebensmitteln erfolgt (WILL, 1999; LASMEZAS et al., 2001). Aus Gründen des Verbraucherschutzes wurde daher 1997 die Verwendung von spezifiziertem Risikomaterial in Fleischerzeugnissen verboten (Entscheidung 97/534/EG). Die Überwachung der Einhaltung dieses Entscheides gestaltet sich bis heute problematisch, da die kommerziell erhältlichen Testsysteme nur eine geringe Tierartspezifität aufweisen (ANONYM, 2001a; HORLACHER et al., 2001; ANONYM, 2002; HOLTBECKER, 2004; LUX et al., 2005; NOWAK et al., 2005; HOSSNER et al., 2006).

Ziel dieser Arbeit war es, Sandwich-Enzymimmuntests auf der Basis von spezifischen Antikörpern gegen die bovinen neuronalen und glialen Markerproteine saures Gliafaserprotein (GFAP) und basisches Myelinprotein (MBP) zum tierart- und organspezifischen Nachweis zu entwickeln, um einen zuverlässigen Nachweis von Risikomaterialien in rohen sowie hitzebehandelten Fleischerzeugnissen zu ermöglichen. Die Tierartspezifität der Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein sollte zudem durch Verwendung zweier rinderspezifischer Peptidsequenzen als Zielantigene verbessert werden. Diese Tests sollten im Rahmen eines integrierten Nachweissystems auf der Stufe eines Screeningtests angesiedelt sein. Durch die Integration beider Parameter in einen Untersuchungsgang sollte die Aussagekraft und –sicherheit der Untersuchung erhöht werden. Dies erforderte gleichzeitig die Etablierung einer gemeinsamen, einfach und schnell durchzuführenden Probenvorbereitung. Die Validierung der Methoden sollte anhand von Referenzmaterialien und Handelsproben durchgeführt werden. Neben der eigentlichen Testentwicklung sollte eine Charakterisierung der verwendeten Antiseren im Western Blot erfolgen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE)

Bei Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE) handelt es sich um übertragbare, infektiöse, chronisch progressiv und letal verlaufende Degenerationskrankheiten des zentralen Nervensystems bei Menschen und Tieren (SCHICKER, 1998). Die Bezeichnung der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathie bezieht sich auf die Übertragbarkeit der Krankheit (BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998), während die synonym verwendete Bezeichnung Prionenkrankheit sich auf ihren vermuteten Erreger (PRUSINER, 1982) bezieht. Die verschiedenen TSE zeichnen sich durch viele Gemeinsamkeiten aus wie z.B. die langen Inkubationszeiten, ihr Vorkommen bei zahlreichen Spezies, fehlende Immunantwort und Entzündungsanzeichen, tödlicher Ausgang, eindeutige pathohistologische Veränderungen im Gehirn und die Tatsache, dass eine eindeutige Diagnose zur Zeit nur postmortal gestellt werden kann (HÖRNLIMANN, 2001). Kennzeichnend für alle Formen sind die histopathologisch typischen schwammartigen Gehirnveränderungen, die durch Vakuolisierung und Degeneration von Nervenzellen, reaktive Astroglie und Ansammlung von pathogenen Prionen (proteinaceous infectious particle) charakterisiert sind (EHRENSPERGER und VANDEVELDE, 1998). Das klinische Bild ist dementsprechend durch Verhaltensänderungen, Demenz sowie Sensibilitäts- und Bewegungsstörungen gekennzeichnet (SCHICKER, 1998). Derzeit stellt die Bovine Spongiforme Enzephalopathie die bedeutendste TSE dar.

2.1.1 Prionen als Krankheitserreger

Zur Erregernatur der TSE liegen verschiedene Hypothesen vor (GAREIS, 1995; RABENAU, 1997). Weitgehend akzeptiert ist die im Jahr 1982 von S. B. PRUSINER postulierte „**Protein-only-Hypothese**“ (PRUSINER, 1982), der zu Folge einem pathogenen Prionenprotein (PrP^{sc}) eine zentrale Bedeutung bei der Krankheitsentstehung beigemessen wird (HORN et al., 2001). Physiologische Prionen (PrP^c) sind Glycoproteine mit vorwiegend α -helikaler Struktur (PAN et al., 1993), die als reguläre Bestandteile auf nahezu allen Zellmembranen von Körperzellen, ausgenommen Pankreas- und Leberzellen,

vorkommen. Sie werden ribosomal synthetisiert, modifiziert und an der Zelloberfläche verankert (COHEN et al., 1994). Eine besonders hohe Expression zeigen Neuronen gefolgt von Lungenzellen, Muskelzellen, Herz-, Uterus-, Thymus- und Zungenzellen (MOUDJOU et al., 2001). Sie sind nach derzeitigem Kenntnisstand an der Steuerung von Ionenkanälen und an Prozessen der Signaltransduktion beteiligt (SPIELHAUPTER und SCHÄTZL, 2001). Weiterhin stellen sie vermutlich in Verbindung mit Kupfer Antioxidantien dar (BROWN, 2001) und erleichtern dessen Transport in die Zelle (KRAMER et al., 2001). PrPc und PrPsc unterscheiden sich voneinander durch ihre Konformation bei unveränderter Primärstruktur (BASLER et al., 1986): Pathogene Prionen PrPsc weisen vorwiegend eine β -Faltblattstruktur auf. Während PrPc weniger als 3% β -Faltblattstruktur aufweist, weist das PrPsc rund 50% auf (PAN et al., 1993). Diese Konformationsänderung wird für dessen besondere Hitze-, Säure-, Proteasen- (PRUSINER, 1995) und Strahlenstabilität (ALPER et al., 1967) verantwortlich gemacht. PrPsc wird durch Proteasen nur bis auf das PrP27-30-Fragment hydrolysiert, während das PrPc vollständig hydrolysiert wird (MEYER et al., 1986; PAN et al., 1993), was man sich bei den sogenannten Schnelltests an geschlachteten und gefallenen Tieren zu nutze macht. Stoffe mit proteolytischen Eigenschaften verringern jedoch die Infektiosität des Agens, woraus geschlossen wurde der TSE-Erreger sei ein Eiweißpartikel ohne Nukleinsäure (PRUSINER, 1995). Grundlegendes Ereignis einer Prioneninfektion ist die Konversion von α -helikaler Struktur der PrPc in β -Faltblattstruktur (PAN et al., 1993). Als Beweis wird die Krankheitsresistenz von knockout-Mäusen, die kein PrPc an der Zelloberfläche aufweisen, angeführt (BÜELER et al., 1993).

Für die von DIRINGER et al. (1994) postulierte „**Virushypothese**“ sowie die von CZUB et al. (1986) postulierte „**Virion-Hypothese**“, die von nukleinsäuretragenden Partikeln ausgehen, die von einer Hülle mit ungewöhnlichen Eigenschaften umgeben sind (ÖTZEL et al., 1994), gibt es keine Anhaltspunkte, da ein Nachweis von Nukleinsäuren bislang nicht möglich war (HORN et al., 2001).

2.1.2 Pathogenese der TSE

Die TSE-Infektion erfolgt oral. Die aufgenommenen pathogenen Prionen PrP^{Sc} verlassen über lymphatisches Gewebe den Darm und gelangen mittels neurogener Passage über das Ganglion coeliacum und über das Ganglion mesentericum craniale zu den Spinalganglien, dem Rückenmark und zum Gehirn. Andererseits gelangen PrP^{Sc} über den *Nervus vagus* direkt ins Gehirn (FRIES et al., 2003). Im ZNS lagern sie sich unter Dimerenbildung an PrP^C an, was zu einer Umfaltung von regulären Prionen zu PrP^{Sc} führt (GASSET et al., 1992; KOCISKO et al., 1994; NGUYEN et al., 1995). Diese reichern sich in den Lysosomen an und die proteaseresistenten Anteile von PrP^{Sc} (PrP²⁷⁻³⁰) polymerisieren zu Amyloidfibrillen, welche wiederum Plaques bilden (PRUSINER et al., 1983). Betroffene Zellen, in erster Linie Neuronen, dystrophieren unter Vakuolisierung aufgrund einer Homöostasestörung. Die PrP^{Sc} lösen sich ab und verändern weitere Zellen (JACKSON et al., 1999). Dieser Schneeballeffekt führt zum schwammartigen Aussehen des Neuropils (PRUSINER, 1995).

Bezüglich aktueller Übersichtsarbeiten zum Stand des Wissens zur Pathogenese von Prionenerkrankungen sei auf VAN KEULEN et al. (2008) bzw. auf GROSCHUP und BUSCHMANN (2008) verwiesen. Grundsätzlich sind hier immer noch eine Reihe von Fragen nicht abschließend geklärt, insbesondere bezüglich der Infektiosität verschiedener Gewebe.

2.1.3 Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind

BSE trat erstmalig 1985 bei zwei Kühen im Vereinigten Königreich auf und wurde 1986 erstmalig beschrieben (WELLS et al., 1987; Tabelle 2.1). Betroffen sind vor allem Rinder, aber auch Wildwiederkäuer. Nach derzeitigem Kenntnisstand können auch Ziegen und Schafe betroffen sein (FOSTER et al., 1993). Die Inkubationszeit beträgt 18 Monate bis mehrere Jahre (WILESMITH und RYAN, 1992). Es ist ein gehäuftes Auftreten bei Tieren im Alter von 5 bis 8 Jahren zu beobachten (BRAUN et al, 2001). Erkrankte Tiere zeigen eine Störung der Motorik mit Ataxie, Parese und Festliegen, der Sensorik mit typischer Hyperästhesie und des Verhaltens mit Aggressivität und Zähneknirschen. Die ersten

klinischen Symptome wie z.B. Gewichtsverlust, Milchleistungsrückgang, Verhaltens-, Sensibilitäts- und Bewegungsstörungen können sich ab einem Lebensalter von etwa 20 Monaten zeigen (DEFRA, 2002). Des Weiteren reagieren betroffene Tiere besonders empfindlich auf Berührungen, Geräusche und Lichtreize und sind darüber hinaus ängstlich und schreckhaft (BRAUN et al., 1997). Durch einen steifen Gang bis hin zum Festliegen wird das Krankheitsbild abgerundet. Ein progressiver Krankheitsverlauf führt nach zwei bis drei Monaten zum Verenden der Tiere (SCHICKER, 1998). In der postmortalen histologischen Untersuchung weist vor allem das Stammhirn charakteristische Veränderungen auf (WELLS et al., 1987; JEFFREY et al., 1995; EHRENSPERGER und VANDEVELDE, 1998).

Die Ätiologie der BSE ist trotz deutlicher Erkenntnisfortschritte nicht vollständig geklärt. Nach derzeitiger wissenschaftlicher Meinung wurde der Krankheitserreger durch mangelhaft erhitzte Fleisch- und Knochenmehle verbreitet (WILESMITH et al., 1988; VANDEVELDE et al., 1992; KIMBERLIN und WILESMITH, 1994; TAN et al., 1999). Das seit den 40er Jahren als proteinreiches Zusatzfutter in der Rinderhaltung verwendete Fleisch- und Knochenmehl (POHLENZ, 1996; COLLEE und BRADLEY, 1997a) wurde in Großbritannien bis zum Verfütterungsverbot 1988 legal an Wiederkäuer (BSE Order SI 1988/1039) und bis 1996 an andere landwirtschaftliche Nutztiere verfüttert (BSE Order SI 1996/962). In Europa erfolgte die Verfütterung von Fleisch- und Knochenmehl an Wiederkäuer bis 1994 (Entscheidung 94/381/EG) und an die übrigen landwirtschaftlichen Nutztiere bis 2001 (Entscheidung 2000/766/EG). Die hohe BSE-Inzidenz in Milchviehbetrieben von 62,9% im Gegensatz zu Mastbetrieben (27,3%) (DEFRA, 2002) erklärt sich dadurch, dass das Futter dieser Nutzungsrichtung zu 5% aus Fleisch- und Knochenmehl bestand (KIMBERLIN und WILESMITH, 1994). In englischen Tierkörperbeseitigungsanlagen erfolgte Ende der 70er Jahre eine Umstellung des Herstellungsprozesses von Fleisch- und Knochenmehl. Neben einer reduzierten Erhitzungsdauer sowie Temperatur (DAHMS, 1997) und einer verminderten Extraktion von Fett mit organischen Lösungsmitteln (WILESMITH et al., 1991; KIMBERLIN und WILESMITH, 1994) wurde das diskontinuierliche auf ein kontinuierliches Verfahren umgestellt (DENNY und HUESTON, 1997; CONRATHS et al., 2002). Durch die Verfahrensumstellung fehlten Inaktivierungsschritte durch Kohlenwasserstoff (MOULD et al., 1965) sowie durch feuchte Hitze (DICKINSON und TAYLOR, 1978), so dass

pathogene Prionen nicht ausreichend abgetötet wurden und über kontaminierte Fleisch- und Knochenmehle in die Nahrungskette der Tiere gelangten (WILESMITH et al., 1988). Durch verzögerte Maßnahmen in der Rinderpopulation konnte sich der Erreger anpassen und ausbreiten, wodurch es zur weiteren Anreicherung in Fleisch- und Knochenmehlen kam (VANDEVELDE et al., 1992; BRADLEY und WILESMITH, 1993). Vermutlich erfolgte die erste Exposition von Kälbern mit kontaminiertem Fleisch- und Knochenmehl in den Jahren 1981/1982 (BRADLEY und WILESMITH, 1993; KIMBERLIN und WILESMITH, 1994; DAHMS, 1997).

Auch bezüglich des Ursprungs der pathogenen Prionen besteht noch keine völlige Klarheit. Verschiedene Theorien besagen, dass es sich hierbei um an die Tierart Rind angepasste oder mit gesteigerter Virulenz versehene Scrapieprionen handelt (HORN et al., 2001; HÖRNLIMANN, 2001). In der Literatur wurde die Möglichkeit eines bovinen Ursprungs durch spontan an BSE erkrankte Rinder diskutiert (VANDEVELDE et al., 1992; EDDY, 1995; PHILLIPS et al., 2000; SMITH, 2003). Diese Hypothese erscheint derzeit jedoch eher spekulativ (HORN et al., 2001). Eine neuere Hypothese sieht die Ursache in der Entsorgung TSE-infizierter, menschlicher Überreste in indischen Tiermehl- und Düngemittelanlagen, woraufhin kontaminierte Produkte ins Vereinigte Königreich exportiert wurden (COLCHESTER und COLCHESTER, 2005). Die von PURDEY (1996) veröffentlichte Hypothese das im Rahmen der Dasselplage in den 80er Jahren verwendete Insektizid Phosmet sei mitverantwortlich für die Entstehung der BSE konnte von SHAW et al. (2002) nicht bestätigt werden.

Im Vereinigten Königreich, dem Ursprungsort der BSE, erreichte die Erkrankung 1992 ein Häufigkeitsmaximum mit 36.680 erkrankten Tieren. Nach dem Fütterungsverbot 1988 konnte ein erster Rückgang der Inzidenz beobachtet werden, jedoch traten aufgrund mangelnder Kontrolle weiterhin Fälle sogenannter „Born-after-ban“-Rinder auf (WILESMITH und RYAN, 1993). WILESMITH et al. (1997) vermuten die Ursache in vertikaler Krankheitsübertragung und DONELLY et al. (1997) schätzen hierbei das Ansteckungsrisiko für Kälber auf 10%. Die Ausbreitung der BSE in alle Welt wurde durch den Export lebender Rinder sowie von Fleisch- und Knochenmehl forciert (COLLEE und BRADLEY, 1997a).

2.1.4 TSE bei anderen Tieren

Die bedeutendste TSE neben der BSE ist die bereits 1732 erstmalig beschriebene Scrapie der Schafe, an der auch Ziegen erkranken können (Tabelle 2.1). Die Erkrankung ist auch unter den Bezeichnungen Traberkrankheit, Gnubber- oder Wetzkrankheit und la tremblante bekannt (MC GOWAN, 1922). 1936 und 1939 wurde die Übertragbarkeit der Scrapie auf Schafe und Ziege nachgewiesen (CUILLE und CHELLE, 1936 und 1939). Die Erkrankung ist weltweit endemisch ausgenommen Australien und Neuseeland, die Scrapie-frei sind. Im Vereinigten Königreich beispielsweise erkranken jährlich 0,5 - 1% aller Schafe an Scrapie (AGUZZI und WEISSMANN, 1997). Nach einer Inkubationszeit von 4 Monaten bis mehreren Jahren tritt bei erkrankten Tieren zunächst starker Juckreiz, der bis hin zum Verlust der Wolle führen kann, und Zähneknirschen auf. Die übererregten Tiere zeigen im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf Inkoordination und fortschreitende Schwäche mit Abmagerung (trotz Futteraufnahme) sowie Lähmungserscheinungen. Die Erkrankung führt innerhalb von wenigen Wochen bis Monaten zum Tod (CLARK, 1991; CLARK und MOAR, 1992; CLARK et al., 1994; SCHICKER, 1998). In der postmortalen, histopathologischen Untersuchung können Vakuolen (ZLOTNIK, 1958) und eine vermehrte Gliose im Gehirn nachgewiesen werden (GEORGSSON et al., 1993). Die Ausprägung des Krankheitsbildes hängt von einer genetischen Disposition des Tieres im Genom des PrP sowie vom infizierenden Stamm des Agens ab (SIMON, 1996), wobei zur Zeit über 20 verschiedene Stämme bekannt sind (DICKINSON et al., 1968; NUSSBAUM et al., 1975). Die Infektion erfolgt sowohl vertikal, wobei die Ansteckungsgefahr während der Geburt und kurz danach am höchsten ist (FOOTE et al., 1993), als auch horizontal über infizierte Plazenten und Fruchtwasser (STOCKMANN, 1913; PATTISON et al., 1972). Aufgrund der hohen Erregerstabilität bleiben kontaminierte Weiden drei Jahre lang infektiös. Ein mögliches Erregerreservoir stellen Grasmilben dar (WISNIEWSKI et al., 1996).

Die Tierarten Schaf und Ziege können jedoch nicht nur von der TSE-Erkrankung Scrapie sondern auch von der BSE betroffen sein. Eine erste experimentelle Übertragung von BSE auf Schafe durch intracerebrale sowie orale Inokulation von infektiösem Rinderhirnhomogenisat gelang 1993 (FOSTER et al., 1993). Infizierte Tiere zeigten Bewegungsstörungen und Zittern, jedoch keinen Juckreiz (FOSTER et al., 2001). Im

Januar 2005 wurde der erste natürlich vorkommende BSE-Fall bei einer Ziege in Frankreich bestätigt (Pressemitteilung des BMVEL vom 28.01.2005). Das natürliche Vorkommen BSE-infizierter Schafe kann nicht ausgeschlossen werden (KAO et al., 2001). Die Infektiosität erstreckt sich bei Schaf und Ziege zusätzlich auf Milz und andere periphere Gewebe (FOSTER et al., 1996). Eine vertikale und horizontale Übertragung ist zur Zeit noch ungewiss (ANONYM, 1994).

Von untergeordneter Bedeutung sind die Übertragbare Nerzenzephalopathie (Transmissible Mink Encephalopathy, TME) der Zuchtnerze, die Chronische Schwundkrankheit (Chronic Wasting Disease, CWD) bei nordamerikanischen Zerviden (WILLIAMS und YOUNG, 1980) und die Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) der Katzen und Großkatzen (WYATT et al., 1990; Tabelle 2.1), die wahrscheinlich über das Futter verbreitet wurden (PRUSINER, 1997). Bei Schweinen ist bislang keine natürliche TSE-Infektion bekannt. WELLS et al. (2003) konnten jedoch durch parenterale Inokulation Schweine mit BSE infizieren, was durch orale Verabreichung nicht möglich war. Grundsätzlich sind Schweine somit als potentiell TSE-gefährdet anzusehen. Ebenso sind Hühner als potentiell gefährdet anzusehen, weil MATTHEWS und COOKE (2003) bei Hühnern nach parenteraler und oraler Verabreichung BSE-ähnliche Symptome beschrieben. Auch einige Affenarten wie z.B. Makaken und Pinseläffchen erwiesen sich nach intracerebraler sowie oraler Inokulation empfänglich. Sie zeigten entsprechende Veränderungen (LASMEZAS et al., 1996). Experimentell gelang 1988 die intracerebrale BSE-Infektion von Mäusen (FRASER et al., 1988), während 1990 auch eine orale Infektion gelang (BARLOW und MIDDLETON, 1990). Bei der experimentellen Übertragbarkeit, die abhängig ist von Erregermenge, Applikationsweg, Höhe der Speziesbarriere und Häufigkeit des PrPc im Körper (BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998), ist die intracerebrale Inokulation grundsätzlich die effektivste Methode und zur oralen Infektion ist die 10^5 -fache Dosis nötig (KIMBERLIN und WALKER, 1979). Dies wurde von SIMON und PAULI (1998) bestätigt. Worauf die Speziesbarriere der BSE beruht ist derzeit noch unklar. Ihre Überwindung jedoch ist umso wahrscheinlicher, je ähnlicher die Primärstruktur des PrPc des Spenders der des Empfängers ist (SIMON, 1996; WEISSMANN, 1996). Rind und Mensch haben diesbezüglich eine 92-93%ige Übereinstimmung (PRUSINER, 1997), wodurch eine leichtere Überwindung der Speziesbarriere gegeben ist. Eine Erstinfektion durch speziesadaptierte Erreger in einer

weiteren Tierart ist wahrscheinlich zunächst mit einer verlängerten Inkubationszeit (PATTISON und JONES, 1968; PRUSINER, 1997) und einer höheren minimalen Infektionsdosis verbunden (SIMON, 1996).

2.1.5 TSE beim Menschen

Zu den TSE des Menschen werden verschiedene Krankheiten gezählt (Tabelle 2.1), die entweder sporadisch, iatrogen oder hereditär auftreten (SCHICKER, 1998). Alle Formen sind im Tiermodell übertragbar (BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998). Beim Menschen ist die wichtigste Prionenerkrankung die erstmalig von H.G. CREUTZFELDT (1920) und A. JAKOB (1921) beschriebene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), wobei vier Formen unterschieden werden: Die familiäre CJD (fCJD), die wie die weiteren hereditär vererbten Prionenerkrankungen Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSSS) und Fatale Familiäre Insomnie (FFI) auf Punktmutationen im Prionenprotein codierenden Gen zurückzuführen ist, wird autosomal dominant vererbt (OWEN et al., 1989; HSIAO et al., 1989; HSIAO et al., 1991; VANDEVELDE et al., 1992; MEDORI et al., 1992). 1968 gelang eine Übertragung auf Schimpansen (GIBBS et al., 1968). Die spontane CJD (sCJD) ist eine sporadisch auftretende TSE-Erkrankung des Menschen mit einer weltweiten Inzidenz von 0,5-1 Fall pro Million Einwohner und Jahr. Sowohl die durch Transplantation von Dura mater (NISBET, 1989) und Cornea (DUFFY et al., 1974), ungenügend sterilisierte neurochirurgische Instrumente (WILL und MATTHEWS, 1982) und Wachstumshormone aus menschlichen Hypophysen (BROWN, 1988) übertragene iatrogene CJD (iCJD) als auch die erstmalig in den letzten Jahren aufgetretene neue Variante der CJD (vCJD) stellen ähnlich der seit langem bekannten Kuru erworbene TSE-Formen dar.

Die klassische CJD weist eine durchschnittliche Inkubationszeit von 13 Jahren auf. Das Durchschnittsalter der Betroffenen ist 65 Jahre (BROWN et al., 1992). Das klinische Bild zeigt sich durch progressive Demenz, motorische Dysfunktion und Tod nach etwa vier Monaten sowie charakteristische EEG-Veränderungen (FEIDEN, 1998; SCHICKER, 1998). Zwar ist bei Erkrankten ein erhöhter 14-3-3-Proteingehalt im Liquor (ZERR et al., 1995) sowie meist eine Methionin- bzw. Valin-Homozygotie am Codon 129 nachweisbar

(PALMER et al., 1991), eine eindeutige Diagnostik ist jedoch nur durch den postmortalen Nachweis der schwammartigen Hirndegeneration und der PrPsc-Ablagerung möglich (KRETZSCHMAR et al., 1996).

Die ersten vCJD-Fälle traten 1995 im Vereinigten Königreich auf (BRITTON et al., 1995; BATEMAN et al., 1995; WILL et al., 1996). Seitdem wurden weltweit insgesamt 211 Fälle bestätigt (Stand: Januar 2009), wovon allein 167 im Vereinigten Königreich auftraten. In Frankreich traten bislang 23, in Spanien 5, in Irland 4, in USA und in den Niederlanden 3, in Portugal 2 und in Italien, Kanada, Saudi-Arabien und Japan je ein Fall auf (www.cjd.ed.ac.uk). In Deutschland wurden bislang (Stand: Januar 2009) keine Fälle beschrieben. Das Durchschnittsalter Betroffener liegt unter 40 Jahren. Die vCJD zeichnet sich demnach durch eine vergleichsweise kurze Inkubationszeit aus. Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch Verhaltensänderungen, Dysästhesie, Ataxie und später Demenz und Myoklonien (FEIDEN, 1998). Auffällig ist der schleichende Verlauf von durchschnittlich 14 Monaten (KRETZSCHMAR et al., 1996). Charakteristische EEG-Veränderungen fehlen. Histopathologisch können bei Betroffenen mit Vakuolen umgebene PrP-Plaques in der Großhirnrinde nachgewiesen werden (WILL und ZEIDLER, 1996). Immunhistologisch können pathogene Prionenproteine in Tonsillen (HILL et al., 1997) und Blinddarm nachgewiesen werden (HILTON et al., 1998). Aufgrund einiger Unterschiede im klinischen und pathologischen Bild wurde bereits früh vermutet, dass vCJD eine neue Variante der bekannten klassischen CJD sei. COLLINGE et al. (1996) bestätigten dies durch Western Blot Analyse des pathogenen Prionenproteins: Während bei den klassischen CJD-Formen die Glycosylierungsmustertypen 1-3 zu finden waren (PARCHI et al., 1996), ergab vCJD den Mustertyp 4, der jedoch mit dem BSE-Prionenprotein übereinstimmt (COLLINGE et al., 1996; HILL et al., 1999). Aufgrund dieser und weiterer Übereinstimmungen wird vCJD als humane Form der BSE angesehen (HILL et al., 1997; BRUCE et al., 1997; ALMOND und PATTISON, 1997; LASMEZAS et al., 2001). Es muss deshalb von einer BSE-Übertragung auf den Menschen ausgegangen werden (DORMONT, 1999). Eine genetische Prädisposition ist dabei möglich, weil bei allen Betroffenen eine Homozygotie am Codon 129 des Prionenproteingens mit Methionin festgestellt wurde (COLLINGE et al., 1996; ZEIDLER et al., 1997; DESLYS et al., 1997). Diese mögliche Prädisposition weisen etwa 40% der Europäer auf (SCHÄTZEL et al., 1997). Man geht derzeit davon aus, dass eine Infektion des Menschen über eine orale

Aufnahme von infektiösem BSE-Material via menschliche Nahrungskette erfolgt (WILL, 1999; HILDEBRANDT et al., 2001; LASMEZAS et al., 2001), wobei die höchsten Infektionstiter im ZNS von Rind, Schaf und Ziege zu finden sind (Scientific Steering Committee (SSC), 1999).

Weitere Prionenerkrankungen sind derzeit von untergeordneter Bedeutung: Kuru wurde 1957 erstmals von D. C. GAJDUSEK und V. ZIGAS (1957) beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine seit etwa 1920 im Fore-Stamm in Papua-Neuguinea auftretende Erkrankung des ZNS, von der vor allem Frauen und Kinder betroffen sind, die sich während des kannibalistischen Totenrituals oral mit infektiösem Gehirngewebe infizieren (ALPERS und GAJDUSEK, 1965). Nach einer Inkubationszeit von zwei Jahren bis Jahrzehnten äußert sich die Klinik in einem typischen Tremor mit progressiver zerebellärer Ataxie. Erst im Endstadium stellt sich Demenz (GAJDUSEK und ZIGAS, 1959) ein. Nach 3 bis 12 Monaten kommt es zum Tod (HÖRNLIMANN, 2001). Histologisch finden sich amyloide Plaques im Kleinhirn (BECK und DANIEL, 1979). 1986 wurde erstmals die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) beschrieben, die vermutlich auf einem genetischen Defekt beruht (LUGARESI et al., 1986). Das genetisch bedingte Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom wurde zwar 1928 von GERSTMANN (1928) erstmals beschrieben und 1936 nachgewiesen (GERSTMANN et al., 1936), jedoch auch in Gewebeproben aus dem 18. Jahrhundert bestätigt (HAINFELLNER et al., 1995).

Tabelle 2.1: Übersicht der (natürlich) vorkommenden Prionenkrankheiten.

Erkrankung (internationale Bezeichnung)	Abkürzung	betroffene Tierart	Jahr und Land der Erstbeschreibung
Bovine Spongiform Encephalopathy	BSE	Rind, Ziege, rinderartige Wiederkäuer	1986, Großbritannien
Scrapie	Scrapie	Schaf, Ziege	1732, Europa
Transmissible Mink Encephalopathy	TME	Nerz	1947, USA
Chronic Wasting Disease	CWD	Hirsch	1968, USA
Feline Spongiform Encephalopathy	FSE	Katze	1990, Großbritannien
Creutzfeldt-Jakob-Disease (sporadisch, iatrogen, familiär, neue Variante)	CJD (sCJD, iCJD, fCJD, vCJD)	Mensch	1920, Deutschland (vCJD: 1996, Großbritannien)
Kuru	Kuru	Mensch	1957, Papua Neuguinea
Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom	GSSS	Mensch	1928, Österreich
Fatal Familiar Insomnia	FFI	Mensch	1986, Italien

2.2 Epidemiologie der BSE

Obwohl in Großbritannien bereits im Juli 1988 das Tiermehlverfütterungsverbot an Wiederkäuer erfolgte (BSE Order SI 1988/1039), war der weltweite Höhepunkt der BSE-Epidemie im Jahr 1992 und 1993 (DAHMS, 2003). 1994 folgte der europäische Angleich an das Verfütterungsverbot (Entscheidung 94/381/EG). Danach wurde der Erfolg des sogenannten Feed-Bans durch einen Rückgang der Epidemie sichtbar. Eine konsequente Umsetzung des Tiermehlverfütterungsverbot an alle Nutztiere erfolgte erst 1996 (Großbritannien; BSE Order SI 1996/962) bzw. 2001 (EU; Entscheidung 2000/766/EG), wobei immer noch BSE-Fälle unklarer Genese auftreten (SMITH, 2003).

2.2.1 Situation in Deutschland

BSE wurde im November 2000 zum ersten Mal in Deutschland bei einem dort geborenen Tier nachgewiesen (Pressemitteilung des BMVEL vom 28.11.2000). Zuvor wurden lediglich sechs importierte BSE-Fälle in Deutschland nachgewiesen (WIEMER, 1997). Bis zum 28. Februar 2009 sind in Deutschland 411 bestätigte BSE-Fälle bei Rindern aufgetreten. In der Zeit vom 01.01.2001 bis zum 28.02.2009 wurden in Deutschland 18.289.088 Rinder auf BSE untersucht (www.bmelv.de). Derzeit ist die BSE-Epidemie in Deutschland weiter rückläufig (CONRATHS et al., 2002; Abbildung 2.1), im Jahr 2008 wurden gerade zwei Tiere positiv getestet. In Deutschland stellt die BSE-Epidemie wahrscheinlich ein durch den Import infizierter lebender Rinder und agenshaltiger Fleisch- und Knochenmehle aus England und anderen Ländern verursachtes Problem dar (SMITH, 2003). Auch ein nach dem ersten BSE-Fall im Vereinigten Königreich (UK) verhangener Importstopp für Rindfleischprodukte aus UK nach Deutschland konnte dies nicht verhindern. Im März 1994 wurde in Deutschland ein Verfütterungsverbot von proteinhaltigen Erzeugnissen aus Säugetiergewebe an Wiederkäuer erlassen (§24a Abs. 2 Viehverkehrsverordnung). Da bis zum Gesetz über das Verbot des Verfütterns, des innergemeinschaftlichen Verbringens und der Ausfuhr bestimmter Futtermittel (Verfütterungsverbotsgesetz, VerfVerbG) und die zugehörige Verordnung (Verfütterungsverbotsverordnung) von Dezember 2000 jedoch noch Fleisch- und Knochenmehl an andere Nutztiere verfüttert werden durfte, war bis zu dem Zeitpunkt noch eine Verschleppung durch Mischfuttermittel anderer Tiere möglich (CONRATHS et al., 2002). Bis Ende 2000 wurden weiterhin tierische Fette auch in der Fütterung von Wiederkäuern, vorwiegend zur Herstellung von Milchaustauschern verwendet (CONRATHS et al., 2002). Der BSE-Nachweis erfolgt durch Schnelltests, die auf immunologischen und biochemischen Verfahren beruhen, und histopathologische Bestätigung.

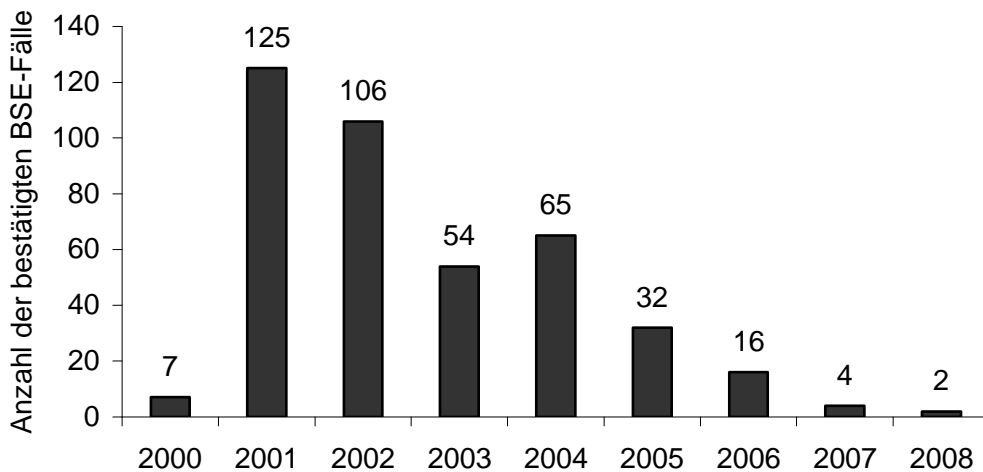


Abbildung 2.1: Anzahl der bestätigten BSE-Fälle bei Rindern in Deutschland in den Jahren 2000 bis 2008. Insgesamt traten in Deutschland bislang 411 bestätigte BSE-Fälle auf (Stand: 28. Februar 2009).

2.2.2 Situation in Europa

Die BSE hatte im Vereinigten Königreich Großbritannien und Nordirland die größten Auswirkungen. Dort trat sie erstmalig 1985 auf und bislang liegen 184.588 amtlich bestätigte BSE-Fälle bei Rindern vor (Stand: 31. Dezember 2008) (www.oie.int). Im Rahmen der Bekämpfung wurden dort seit 1996 annähernd 4,9 Millionen Rinder im Alter von über 30 Monaten getötet und unschädlich entsorgt. In den übrigen europäischen Ländern war das Ausmaß der BSE entsprechend denen in Deutschland (Tabelle 2.2). Derzeit ist auch im übrigen Europa die BSE-Epidemie rückläufig.

2.2.3 Situation in der restlichen Welt

BSE ist mittlerweile weltweit endemisch. In Japan beispielsweise trat 2001 der erste BSE-Fall auf. Bislang wurden dort 35 Fälle amtlich bestätigt (Stand: 31. Dezember 2008). Lange Zeit galt insbesondere USA als BSE-frei, jedoch auch dort trat 2005 der erste Fall auf (Tabelle 2.2) (www.oie.int).

Tabelle 2.2: Übersicht der bis zum 31. Dezember 2008 weltweit bestätigten BSE-Fälle und Zeitpunkt des ersten nicht-importierten BSE-Falles (www.oie.int).

Land	Anzahl BSE-Fälle	erster BSE-Fall	Land	Anzahl BSE-Fälle	erster BSE-Fall
Belgien	133	1997	Niederlande	85	1997
Dänemark	15	2000	Österreich	6	2001
Finnland	1	2001	Polen	63	2002
Frankreich	1001	1991	Portugal	1061	1994
Griechenland	1	2001	Schweden	1	2006
Irland	1637	1989	Schweiz	464	1990
Israel	1	2002	Slowakei	24	2001
Italien	142	2001	Slowenien	8	2001
Japan	35	2001	Spanien	742	2000
Kanada	17	2003	Tschechische Republik	28	2001
Lichtenstein	2	1998	UK	184.588	1986
Luxemburg	3	1997	USA	2	2005

UK: Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland

2.3 Inaktivierung von pathogenen Prionenproteinen

Derzeit wird davon ausgegangen, dass infektiöses Material über Fleisch- und Knochenmehl übertragen wurde (WILESMITH et al., 1988; HORN et al., 2001), was für die hohe Widerstandsfähigkeit des BSE-Agens gegen chemische und physikalische Einflüsse spricht (TAYLOR, 1993; TAYLOR et al., 1994; PRUSINER, 1995). Auch durch übliche Desinfektionsmittel und Sterilisationsverfahren konnte es nicht inaktiviert werden (DUFFY et al., 1974; SIMON, 1996). Zur chemischen Inaktivierung des Erregers eignet sich sowohl 2,5 bis 5%ige Natriumhypochlorit-Lösung mit dem Nachteil einer starken Korrosion und Gefahr für Mensch und Umwelt (SIMON, 1996) als auch Natronlauge mit zeit- und konzentrationsabhängiger Erregerreduktion (TAYLOR, 1993). Weitere geeignete chemische Verfahren sind Phenolderivate, 3 bis 6M Guanidiniumisothiocyanat und Kochung mit 3% SDS. Bei den physikalischen Verfahren spielen Temperatur, Druck, Behandlungsdauer und weitere Parameter eine wichtige Rolle. Die effektivste Methode ist

eine 20 minütige Behandlung bei einer Temperatur von 133 °C und einem Druck von 3 bar (TAYLOR et al., 1995a; TAYLOR et al., 1997), was in der Entscheidung 96/449/EG festgelegt ist.

2.4 Gesetzliche Vorschriften zum Schutz vor BSE (Verbraucherschutz)

2.4.1 Maßnahmen zum Verbraucherschutz

Im folgenden sind eine Reihe von Maßnahmen, die innerhalb der Europäischen Union zur Eindämmung der BSE und zum Schutz des Verbrauchers vor einer oralen Exposition mit dem Erreger getroffen wurden, nach „Maßnahmenbündel“ chronologisch aufgelistet.

1. BSE wurde 1988 in UK und 1990 in Europa zur meldepflichtigen Tierseuche erklärt (BSE Order SI 1988/1039; Entscheidung 90/134/EG). Die Umsetzung in nationales Recht in Deutschland erfolgte 1991 durch die Aufnahme der BSE in die Liste der anzeigepflichtigen Tierseuchen (VO über anzeigepflichtige Tierseuchen). 1999 erfolgte eine Ausweitung der anzeigepflichtigen Tierseuchen auf TSE (Änderung der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen).
2. Zudem wurde 1988 in Großbritannien die Verfütterung von aus Säugern gewonnenen Futtermitteln an Wiederkäuer verboten (BSE Order SI 1988/1039), da Fleisch- und Knochenmehl als Vektor für BSE identifiziert worden war (WILESMITH et al., 1988). Die EU übernahm diese Bestimmung im Juni 1994 (Entscheidung 94/381/EG), nachdem auch Deutschland das Verfütterungsverbot im März 1994 im Gesetz verankerte (§24a Abs. 2 Viehverkehrsverordnung). Das Verfütterungsverbot wurde 1996 in Großbritannien und 2000 in Europa auf alle Nutztiere ausgeweitet (BSE Order SI 1996/962; Entscheidung 2000/766/EG). Eine Umsetzung in deutsches Recht erfolgte im Dezember 2000 durch das Gesetz über das Verbot des Verfütterns, des innergemeinschaftlichen Verbringens und der Ausfuhr bestimmter Futtermittel (Verfütterungsverbotsgesetz) und die zugehörige Verordnung (Verfütterungsverbotsverordnung). Bis zu diesem Zeitpunkt war die Überwachung mangelhaft (BRADLEY und WILESMITH, 1993) und es bestand

- die Gefahr einer Kreuzkontamination bei der Futterherstellung (HOINVILLE et al., 1995; COLLEE und BRADLEY, 1997b).
3. Ebenfalls 1988 wurde mit der BSE Order SI 1988/2299 die Milch infizierter Rinder vom menschlichen und tierischen Konsum ausgeschlossen (TAYLOR et al., 1995b; WILESMITH und RYAN, 1997).
 4. Zusätzlich wurden 1989 in Großbritannien bestimmte Rinderinnereien von der menschlichen und tierischen Nahrungskette ausgeschlossen (SBO Ban SI 1989/2061 und SI 1990/1930; ersetzt durch SBM Order SI 1996/963). 1997 wurde erstmalig EU-weit potentiell infektiöses Material aus der Nahrungskette durch die Entscheidung 97/534/EG eliminiert, welche durch die VO (EG) 999/2001 ersetzt wurde. Entsprechend der Verteilung der Prionen im Körper werden seitdem bestimmte Organe und Tierkörper Teile als „Spezifiziertes Risikomaterial“ (SRM) eingestuft und müssen nach Einfärbung mit dem Farbstoff Brilliantblau FCF (E133) unschädlich beseitigt werden. Die Kriterien für dieses SRM wurden über Änderungsverordnungen zu VO (EG) 999/2001 mehrfach modifiziert bzw. geändert, beispielsweise durch VO (EG) 722/2007 und VO (EG) 357/2008. In Tabelle 2.3 sind die derzeit als SRM geltenden Gewebe aufgeführt.
 5. 1996 wurde in Großbritannien für alle Rinder ein Rinderpass zur Verfolgbarkeit der Herkunft vorgeschrieben (Cattle Passports Order SI 1996/1686). Die EU erließ zur Verfolgbarkeit der Herkunft von Rindern, Rindfleisch und Rindfleischerzeugnissen im April 1997 die Rindfleisch-Etikettierungsverordnung (VO (EG) 820/97).
 6. 1998 wurde EU-weit die epidemiologische TSE-Überwachung vorgeschrieben (Entscheidung 98/272/EG). Im Rahmen dessen wurde 2001 die Durchführung von BSE-Schnelltests bei allen über 30 Monate alten Rindern (Entscheidung 2000/764/EG; geändert durch Entscheidung 2008/908/EG) und stichprobenartig bei über 18 Monate alten Schafen und Ziegen vorgeschrieben (VO (EG) 1248/2001).
 7. Seit 2001 ist die Zerstörung von ZNS nach Betäuben durch Einführung eines konischen Stahlstabs in die Schädelhöhle unzulässig (VO (EG) 999/2001).

Tabelle 2.3: Spezifiziertes Risikomaterial gemäß VO (EG) 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien (zuletzt geändert durch VO (EG) 163/2009 und VO (EG) 220/2009).

Tierart und Alter	Spezifiziertes Risikomaterial, SRM
Rinder > 12 Monate	der Schädel ohne Unterkiefer, jedoch einschließlich Gehirn und Augen, und das Rückenmark
Rinder > 30 Monate	die Wirbelsäule ohne Schwanzwirbel, die Dorn- und Querfortsätze der Hals-, Brust- und Lendenwirbel und Crista sacralis mediana sowie Kreuzbeinflügel, aber einschließlich der Spinalganglien
Alle Rinder	die Tonsillen, die Eingeweide von Duodenum bis Rektum und das Gekröse
Sf., Zg.>12 Monaten	Schädel (inkl. Gehirn, Augen), Tonsillen, Rückenmark
alle Sf., Zg.	Milz und Ileum

Sf.: Schafe; *Zg.:* Ziegen

2.4.2 Von BSE betroffene Organe und Gewebe

Die Verwendung von Wiederkäuerknochen zur Herstellung von Separatorenfleisch ist untersagt (VO (EG) 1326/2001), da eine potentielle Gefährdung durch an Knochen anheftendes Nervengewebe ausgeschaltet werden soll und Knochenmark als potentiell gefährlich anzusehen ist, obwohl bisher bei BSE im Gegensatz zu Scrapie keine Infektiosität im Knochenmark nachgewiesen werden konnte (RUFFING und WINDEMANN, 2001). Aufgrund der Einschätzung des Bundesinstitut für Risikobewertung dürfen jedoch Wiederkäuerknochen (ausgenommen Schädel und Wirbelsäule) sowie -häute weiterhin zur Herstellung von Speisegelatine verwendet werden (Speisegelatineverordnung, 2002). Weil bei Kopffleisch das Risiko einer Kontamination mit Nervengewebe aus dem Bolzenschussloch und aus dem Foramen magnum besteht, unterliegt dessen Gewinnung bestimmten Auflagen wie z.B. einer stichprobenartigen Untersuchung auf Nervengewebe (VO (EG) 1139/2003). Da jedoch das Risiko einer Kontamination des Kopfes unvermeidlich ist, empfiehlt das Bundesinstitut für Risikobewertung, den Kopf nicht mehr für die Fleischgewinnung einzusetzen, sondern ihn unschädlich zu beseitigen (Stellungnahme des BgVV, 2001). Grundsätzlich ist im Rahmen

der Schlachtung bei der Betäubung mit einem Bolzenschussapparat, wie in Deutschland üblich, die Abschwemmung von Gehirnmateriale mit venösem Blut in den Körper in geringem Maß möglich (HAUCK et al., 1990; SCHMIDT et al., 1999a), wobei das Kontaminationsrisiko von der Art des verwendeten Schussapparates abhängt. ANIL et al. (2001) untersuchten Jugularvenenblut von Schafen nach Betäubung mit Schussapparaten mit Patronen und mit Luftinjektion sowie Elektrobetäubung. Nur bei den elektrobetäubten Tieren konnte bei keinem der Tiere weder in arteriellem noch in venösem Blut ZNS nachgewiesen werden. HORLACHER et al. (2002a) konnten nach Betäubung mit dem in Deutschland vorwiegend verwendeten Bolzenschussgerät nach Schermer in Einzelfällen in Lungenarterien ZNS nachweisen. In einer Folgestudie von LÜCKER et al. (2002c) konnten bei zwei von 726 untersuchten Rindern ZNS in der Lunge, jedoch bei keinem im Herz nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wiesen MOJE et al. (2001) bei 2% der von ihnen untersuchten Rinderherzen ZNS nach. Aus diesem Grund vertritt das Bundesinstitut für Risikobewertung (2001) die Meinung, dass bei Tieren, die mit dem penetrierenden Bolzenschuss betäubt wurden, der gesamte Kopf sowie Blut, Herz und Lunge zu SRM erklärt werden sollten. Sollen die genannten Organe trotzdem verwendet werden empfiehlt SCHÜTT-ABRAHAM (2002) Elektrobetäubung zu verwenden. Nach den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse (2001) ist Rindermilz von der Verwendung in Fleischerzeugnissen ausgeschlossen, da bei der Scrapie der Schafe die Milz Infektiosität aufweist. Bei BSE wurde jedoch bislang keine Infektiosität der Milz nachgewiesen. Nach der oralen Gabe infizierten Gehirnmateriale an Kälber konnten bereits sechs Monate nach Infektion BSE-Erreger in den Peyer'schen Platten des distalen Ileums nachgewiesen werden (WELLS et al., 1998), was zur Eliminierung des Darms von Duodenum bis Rektum aller Rinder führte. Rindfleisch wird als sicher beurteilt, da bei erkrankten Tieren in der Muskulatur keine pathogenen Prionenproteine nachgewiesen werden konnten. Da jedoch sowohl BOSQUE et al. (2002) in der Muskulatur künstlich scrapie-infizierter Mäuse als auch THOMZIG et al. (2003) in der Muskulatur oral scrapie-infizierter Hamster pathogene Prionen nachwiesen, besteht derzeit sicherlich noch Forschungsbedarf. Nach derzeitigem Wissenstand wird reines Fettgewebe aufgrund seiner Herstellung entweder mit gespanntem Dampf bei 133 °C für 20 Minuten oder mit 1 M NaOH bei 20 °C für eine Stunde als sicher bewertet (RUFFING und WINDEMANN, 2001; HÖRNLIMANN et al., 2001). Von der Fettherstellung sind jedoch Kessel- und Knochenfett, Kopffett sowie Mesenterialfett ausgenommen (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2001). Die

Bewertung der Infektiosität verschiedener Organe und Gewebe bei BSE-infizierten Rindern und Scrapie-infizierten Schafen gibt Tabelle 2.4 wieder.

Die höchsten BSE- und Scrapie-Infektionstiter sind in Gehirn und Rückenmark zu finden, wobei das BSE-Agens mit einer mittleren letalen Dosis von 10^4 - 10^5 PrPsc/g Gehirn (TAYLOR et al., 1996) eine zehnfach geringere Infektiosität als Scrapie aufweist (KIMBERLIN und WILESMITH, 1994; GROSCHUP und HAAS, 1995). 95% der Infektiosität basiert auf ZNS-Gewebe (SSC, 1999). Für den Menschen besteht neben dem oralen Infektionsweg noch die Möglichkeit einer parenteralen Infektion über Kosmetika oder Medikamente, die Rindergewebe enthalten, da dieser Weg eine geringere Infektionsdosis benötigt (VANDEVELDE et al., 1992).

Tabelle 2.4: Infektiosität der Gewebe von Schafen und Rindern mit Scrapie bzw. BSE (KIMBERLIN und WILESMITH, 1994; LÜCKER und BÜLTE, 1997a; COLLEE und BRADLEY, 1997a und 1997b; HORLACHER, 2002).

Organe bzw. Gewebe	Beurteilung der Infektiosität bei:	
	Rindern mit BSE	Schafen mit Scrapie
Gehirn	+++	+++
Rückenmark	+++	+++
Netzhaut	+++	+++
Dünndarm	++	++
Dickdarm	-	++
Lymphknoten	-	++
Milz	-	++
Tonsillen	-	++
Periphere Nerven	-	+
Thymus	-	+
Lunge	-	+
Leber	-	+
Pankreas	-	+
Knochenmark	-	+
Blut	-	-
Serum	-	-
Milchdrüse	-	-
Kolostrum	-	-
Milch	-	-
Skelett- und Herzmuskulatur	-	-
Hoden	-	-
Niere	-	-

Infektiosität: +++: hoch; ++: mittel; +: gering; -: keine nachweisbar

2.4.3 Auswirkungen auf den Schlachtablauf

Im Rahmen des Verbraucherschutzes vor BSE kam es zu zahlreichen Änderungen im Schlachtablauf, mit dem Ziel erkrankte Tiere zu identifizieren und eine Verbreitung von pathogenen Prionen zu verhindern:

1. Die Verwendung eines Rückenmarkszerstörers zur Ausschaltung spinaler Reflexe nach der Bolzenschussbetäubung ist seit dem 01.01.2001 verboten, weil bei seiner Verwendung umliegendes Fleisch kontaminiert wurde (Entscheidung 2000/418/EG).
2. Das Bundesinstitut für Risikobewertung empfiehlt nach dem Absetzen des Kopfes keine Kopfwäsche durchzuführen (Stellungnahme des BgVV, 2002), da so Prionen bzw. Risikomaterial verteilt werden können.
3. Die Probennahme aus der Obexregion für BSE-Schnelltests war bis zum 01.01.2009 bei allen über 30 Monate alten geschlachteten Rindern und bei über 24 Monate alten notgeschlachteten, getöteten oder verendeten Rindern vorgeschrieben (VO (EG) 999/2001). Seitdem ist in Deutschland und einigen weiteren EU-Mitgliedsstaaten die Altersgrenze für die obligatorische Untersuchung mit BSE-Schnelltests auf 48 Monate angehoben worden (VO (EG) 2008/908/EG). Bei Schafen und Ziegen, die älter als 18 Monate sind bzw. mindestens zwei bleibende Schneidezähne haben und bei verendeten oder getöteten Schafen und Ziegen ist eine stichprobenartige Beprobung festgelegt (VO (EG) 1248/2001).
4. In der Schlachtreihe werden alle auf ein positiv getestetes Tier folgenden Tiere bis zur Dekontamination aller Gerätschaften und Ausrüstungsgegenstände verworfen (BSE Untersuchungsverordnung, 2002). Rinder werden deshalb in der Regel in Kohorten geschlachtet und nach jeder Kohorte werden die Gerätschaften, die mit Nervengewebe in Kontakt gekommen sind, gegen gereinigte und desinfizierte ausgetauscht. Einerseits hat dies wirtschaftliche Vorteile, da so nach positivem Schnelltest nur die Kohorte unschädlich beseitigt werden muss, andererseits kann so eine mögliche Prionenverbreitung reduziert werden.

5. SRM muss mit dem Farbstoff Brilliantblau FCF (E133) eingefärbt werden und unschädlich beseitigt werden (Entscheidung 97/534/EG; Fleischhygieneverordnung, 1997).
6. Bei der Zerlegung der Schlachttierkörper kam es zu Modifikationen der Schnittführung, damit keine Spinalganglien angeschnitten werden (DLG, 2002).
7. Schädelknochen und Wirbelsäulen von Wiederkäuern dürfen nicht mehr zur Gewinnung von Separatorenfleisch verwendet werden (Entscheidung 2000/418/EG).

Durch diese Verfahren soll zwar die Kontamination reduziert werden, jedoch ist eine Kontamination auch derzeit nicht ausgeschlossen, da sowohl Reinigung und Desinfektion als auch Entfernung des Rückenmarks Sicherheitsmängel aufweisen. Es werden jedoch derzeit alternative Verfahren erarbeitet.

2.4.4 Auswirkungen auf Fleischerzeugnisse

Zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurde Gehirn, auch Bregen/Brägen genannt, vielseitig verwendet: Aufgrund seines niedrigen Kohlenhydratgehaltes bei hohem Fett- und Eiweißgehalt wurde es zur Ernährung bei Diabetes mellitus verzehrt und wurde zahlreichen Spezialitäten zugesetzt. Weiterhin wurde Gehirnextrakt zur Blutstillung eingesetzt (OSTERTAG, 1932). Gehirn wurde auch als Spezialität gebraten, gedünstet (HOFMANN, 1959), gratiniert (SCHNEIDER-SCHLÖTH, 1877) oder in Suppen (KRAMER, 1983) verzehrt. Gehirn ist somit einerseits ernährungsphysiologisch aufgrund seines hohen Proteinanteils interessant (SOUCI et al., 1994) als auch kostengünstig und steht in relativ großer Menge zur Verfügung. Die durchschnittliche Gehirnmasse eines adulten Rindes beträgt 450g zuzüglich durchschnittlich 240g Rückenmark. Dies ist etwa die vierfache Gehirn- bzw. Rückenmarksmasse eines Schweines bzw. Schafes (NICKEL et al., 1992; HORLACHER, 2002). Die Verwendung von Gehirn als Bindemittel in Fleischerzeugnissen war vorwiegend in der industriellen Produktion von Bedeutung. Bis 1989 soll es üblich gewesen sein, Beefburgern Rindergehirnhomogenisat zuzusetzen

(DEALLER und LACEY, 1990). Fleischerzeugnisse sind entsprechend den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches (LS, 1994) Erzeugnisse, die ausschließlich oder überwiegend aus Fleisch bestehen. In manchen sogenannten „speziellen Fleischerzeugnissen“ wurde traditionell Gehirn vom Rind und Schwein eingearbeitet. Darüber hinaus war es zulässig bis zu 5% Innereien (inkl. Gehirn) in andere Fleischerzeugnisse, insbesondere streichfähige, einzumischen. Hierbei diente Gehirn einerseits zur Beeinflussung der Konsistenz und andererseits durch seinen hohen Fettanteil als Geschmacksträger. Lediglich die Verwendung von Gehirn in rohen Fleischerzeugnissen war verboten (LS, 1994). Gegenwärtig werden Kochwürste wie z.B. Leberwürste entsprechend ihrem Lebergehalt in die Kategorien Spitzenqualität, mittlere Qualität und einfache Qualität eingeteilt. Spitzenqualität darf abgesehen von Leber keine weiteren Innereien enthalten; in den beiden übrigen Kategorien konnte bis zur Leitsatzänderung 2001 noch Gehirn eingesetzt werden (LS.-Nr. 1.5). Seit Oktober 2001 wird in den Leitsätzen Gehirn jeglicher Tierart als Tierkörperteil aufgeführt, das nicht in Fleischerzeugnissen verarbeitet werden darf (LS.-Nr. 1.61). Ebenso darf nach den modifizierten Leitsätzen weder Rückenmark, Bries, Milz (ausgenommen Schweinemilz), Schweinemicker noch Speiseröhre verwendet werden (LS, 2001). Auch die Verarbeitung von Herz und Lunge entspricht bis zur wissenschaftlichen Klärung der Infektiosität nicht der allg. Verkehrsauffassung (LS, 2001). Die Leitsätze sind zwar keine rechtsverbindliche Vorgabe, aber sie stellen die allgemeine Verkehrsauffassung dar, die von den Herstellern umgesetzt wird. Entsprechend diesem freiwilligem Verzicht auf Gehirn, sind auch die speziellen Fleischerzeugnisse, die Gehirn enthalten aus den Leitsätzen gestrichen worden: Bregenwurst (LS.-Nr. 2.212.2), Hirnwurst (LS.-Nr. 2.222.6) und Hannoversche Bregenwurst (LS.-Nr. 2.2313.6). Ebenfalls aus den Leitsätzen gestrichen wurden: Lungenwurst, Berliner Dampfwurst, Kümmelwurst (LS.-Nr. 2.221.10), Graupenwurst (LS.-Nr. 2.2313.12), Milzwurst und Brieswurst (LS.-Nr. 2.224.7). In welchem Ausmaß ZNS zu handelsüblichen Fleischerzeugnissen zugesetzt wurde, wurde von LÜCKER et al. (1999b) und HORLACHER et al. (2001) untersucht. 1999 konnte noch in 9,4% der untersuchten Leberwürste und in 14,5% der untersuchten Kochmettwürste ZNS nachgewiesen werden. Laut HORLACHER et al. (2001) wurde in keiner der untersuchten Kochwürste in den Jahren 2000 und 2001 ZNS gefunden. Auf eine bewusste Verwendung von Gehirn bei der Herstellung scheint ihnen zufolge verzichtet worden zu sein. Der Abschnitt „Spezielle Fleischteilstücke und spezielle Fleischgerichte“ der Leitsätze

beschäftigt sich mit dem inzwischen verbotenen T-Bone-Steak, das aus einer Scheibe der inneren und äußeren Lendenmuskulatur besteht und immer auch anhaftende Wirbelsäule incl. Ganglien enthält (Entscheidung 2001/233/EG). Auch die Verwendung von Separatorenfleisch, von grob ausgelösten Knochen maschinell abgetrenntes Fleisch, in Brühwürsten (WENTHE et al., 2001), Kochwürsten und einigen streichfähigen Rohwürsten (TROEGER und PRZYTULLA, 1996) wurde 2001 neu geregelt. In der industriellen Wurstherstellung wird es vor allem aus ökonomischen Gründen genutzt und ist vorwiegend in Fleischerzeugnissen von Einfachqualität von Bedeutung (COLLEE und BRADLEY, 1997b). Zur Gewinnung von Separatorenfleisch wurden in erster Linie Knochen der Wirbelsäule sowie Rippen verwendet, wobei anhaftende Skelettmuskulatur zusammen mit Fettgewebe in einem Separator unter Druck durch Abpressvorgang aus zerkleinertem Ausgangsmaterial herausgelöst und von Knochen und grobem Bindegewebe getrennt wurde. Seit 2000 dürfen zur Gewinnung keine Schädelknochen sowie Wirbelsäulen von Rindern, Schafen und Ziegen genutzt werden (Entscheidung 2000/418/EG). Es wurde weiterhin gefordert Fleischerzeugnisse mit Separatorenfleischzusatz kenntlich zu machen (HORN, 1997; NURMI und RING, 1999), was in der Richtlinie 2001/101/EG umgesetzt wurde.

2.5 Nachweisverfahren von BSE

Nach der Schlachtung müssen derzeit alle über 48 Monate alten Rinder und über 18 Monate alten Schafe und Ziegen mittels BSE-Schnelltest auf das Vorliegen pathogener Prionen als Indikator für eine BSE-Erkrankung untersucht werden. Als Probenmaterial für die zunächst durchgeführten BSE-Schnelltests dient die Obexregion des Gehirnstamms, dem Kerngebiet des *N. vagus*, da es hier zu einer Anreicherung der pathogenen PrPsc kommt (WELLS et al., 1989; PICCARDO et al., 1990; VAN KEULEN et al., 1995). Die verwendeten Schnelltests sind in der Regel immunologische Nachweismethoden, die nach Proteinase K-Verdauung der Proben proteaseresistente pathogene Prionenproteine nachweisen (MEYER et al., 1986; OESCH und MOSER, 1998). Die Schnelltests sprechen bereits drei bis sechs Monate vor dem Ausbruch der klinischen Symptomatik an (EBERLE, 2001; HOCHBERGER, 2001; GERBERMANN, 2001). Sie weisen jedoch nur eine begrenzte Sensitivität auf, so dass ein negatives Ergebnis nicht generell den Schluss

auf Erregerfreiheit zulässt. Die VO (EG) 999/2001 geändert durch VO (EG) 315/2008 gibt die anzuwendenden Testsysteme vor. In Europa ist z.B. der Western Blot „Prionics Check Western Test“ der Firma Prionics (HÖRNLIMANN et al., 2001) zugelassen. Ebenfalls zugelassen ist der Enzymimmuntest „Prionics-Check LIA-Test“ der Firma Prionics und der Sandwich-ELISA „Bio-Rad Platelia-Test“ der Firma Bio-Rad (MALCHOW, 2003). Dem zugelassenen Chemilumineszenz-Enzymimmuntest „Enfer-Test“ der Firma Enfer Technology Limited dient Rückenmarksgewebe als Probenmaterial. Der Enzymimmuntest „InPro CDI-5-Test“ der Firma InPro Biotechnology Inc. weist die Konformation von Prionenproteinen nach. Der histopathologische Nachweis charakteristischer Hirngewebläsionen dient den Schnelltests als Referenzverfahren (WELLS et al., 1987; JEFFREY et al., 1995; EHRENSPERGER und VANDEVELDE, 1998). Im Fall einer BSE-Erkrankung können spongiforme Veränderungen (LIBERSKI et al., 1992) neuronale Vakuolenbildung (FRANKHAUSER et al., 1972; LIBERSKI et al., 1992; JEFFREY et al., 1995), Degeneration (WELLS und WILESMITH, 1995) sowie astrozytäre Proliferation (ZLOTNIK, 1958; GEORGSSON et al., 1993) beobachtet werden.

Die Untersuchung des lebenden Tieres auf der Grundlage von Provokationsproben nach BRAUN (1998) und BRAUN et al. (2001) lässt nur eine Verdachtsdiagnose zu. Zur Absicherung muss eine Gehirnuntersuchung nach dem Tod bzw. der Tötung des Tieres durchgeführt werden. Weitere Diagnostika, die derzeit nicht dem Routinestandard entsprechen sind der elektronenmikroskopischer Nachweis der Scrapie-assoziierten Fibrillen (MERZ et al., 1984; HOPE et al., 1988), der immunhistochemische Nachweis des pathogenen Prionenproteins (GRABER et al., 1995; GERBERMANN, 2001) sowie der Mäuseinokulationstest, der dem Nachweis von Infektiosität in Geweben dient (FRASER et al., 1992; BUSCHMANN und GROSCHUP, 1998) und nicht für Routinediagnostik geeignet ist. Derzeit bestehen Bestrebungen eine Nachweismethode am lebenden Tier zu entwickeln, die spezifische Surrogatsubstanzen im Urin, Blut oder Liquor nachweist (HOCHBERGER, 2001).

2.6 Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen

Um den Verbraucher nach dem Auftreten der BSE vor dem Verzehr von SRM zu schützen und um notwendige Kontrollen im Rahmen der Lebensmittelüberwachung durchzuführen, wurden umfangreiche Forschungsarbeiten durchgeführt, die dessen Nachweis in Fleischerzeugnissen ermöglichen sollen. Die Testsysteme sollen eine Tierartendifferenzierung, eine Differenzierung zwischen zentralem und peripherem Nervensystem und eine Alterszuordnung gewährleisten. Die Detektion von ZNS-Markerproteinen in Fleischerzeugnissen wird dabei sowohl durch deren Hitzebehandlung, als auch durch deren starke Zerkleinerung und den Zusatz technologischer Hilfsstoffe wie z. B. Nitritpökelsalz, Ascorbinsäure, Kutterhilfsmittel auf Phosphatbasis erschwert. Auch der Zusatz von Gewürzen beeinträchtigt den ZNS-Nachweis (SCHMIDT et al., 2001). Auf dieser Grundlage wurden drei derzeit kommerziell erhältlichen Testkits entwickelt, die auf dem Nachweis des astrozytären Markerproteins saures Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) basieren. GFAP ist auch nach einer für Fleischerzeugnisse relevanten Hitzebehandlung noch nachweisbar (SCHMIDT et al., 2001; NAGEL und MIERSCH, 2002).

2.6.1 Testkits

Der Sandwich-Enzymimmuntest RIDASCREEN Risk Material 10/5 der Firma R-Biopharm (Darmstadt) weist GFAP in und auf rohen Fleisch- und Wurstwaren und auf kontaminierten Oberflächen mit einer Nachweisgrenze von 0,1% ZNS-Gewebe nach. Eine Differenzierung des nachgewiesenen Nervengewebes von Rind, Kalb, Schaf, Ziege, Pferd, Geflügel und Schwein ist jedoch nicht möglich (ANONYM, 2002). Der Sandwich-Enzymimmuntest RIDASCREEN Risk Material der Firma R-Biopharm (Darmstadt) weist GFAP in rohem und erhitztem Fleisch und Fleischerzeugnissen nach. Dieses System weist bis zu 0,2% ZNS-Gewebe nach, jedoch auch ohne die Möglichkeit einer Tierartendifferenzierung (ANONYM, 2001a). Mit beiden Testsystemen ist nur ein qualitativer Nachweis möglich, da sowohl die verwendete Positivkontrolle als auch die ermittelte Nachweisgrenze auf einer Kombination von Gehirn und Rückenmark basieren, wobei der GFAP-Gehalt im Rückenmark vier- bis fünffach höher ist als im Gehirn

(SCHMIDT et al., 1999b; KELLEY et al., 2000). Das Vorliegen von ZNS in Fleischerzeugnissen in genau dieser Kombination ist unwahrscheinlich, so dass Realproben über- bzw. unterschätzt werden. Für einen Zusatz von reinem Gehirn wäre die Nachweisgrenze demzufolge deutlich herabgesetzt. Der Sandwich-Enzymimmuntest ScheBo[®] Brainostic[™] Test der Firma ScheBo[®] Biotech AG (Gießen) weist GFAP laut Herstellerangaben mit einer Nachweisgrenze von 0,1% ZNS-Zusatz nach (ANONYM, 2001b). Bis 2001 basierte dieser Test, der in seiner Methode einen Western Blot darstellte, auf einem Nachweis der Neuronen spezifische Enolase (NSE). Die Nachweisgrenze war 0,25% ZNS-Zusatz. NSE weist jedoch weder Tierartsspezifität noch ZNS-Spezifität auf, da das Protein auch in neuroendokrinen Zellen und im peripheren Nervensystem (PNS) vorliegt (SCHMECHEL et al., 1978; TAPIA et al., 1981 ANONYM, 2001b). Seine Temperaturabhängigkeit ermöglicht bei höherer Erhitzungstemperatur keinen Nachweis mehr (LÜCKER et al., 2000a und 2000b; NAGEL et al., 2002) und Geflügel- und Schweinemuskelfleisch führt zu falsch-positiven Ergebnissen (HORLACHER et al., 2001). Aufgrund der Tatsache, dass sich NSE als ungeeigneter Marker erwies, wurde das System jedoch umgestellt.

2.6.2 Studien zum Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen

In ersten Untersuchungen zum Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen wurde Cholesterin als Marker verwendet und mit Hilfe eines enzymatischen Verfahrens entsprechend der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzes (LFGB, 2006) zur Bestimmung des Cholesteringehaltes in Eiern und Eiprodukten nachgewiesen (LÜCKER und BÜLTE, 1997b; LÜCKER et al., 1999a, 2000b und 2001; LÜCKER und SCHLOTTERMÜLLER, 2001; HORLACHER, 2002). Das Steroid Cholesterin ist ein Strukturlipid in der Zellmembran tierischer Gewebe (LEHNINGER et al., 1994) mit den höchsten Gehalten in Gehirn, Leber, Niere und Eigelb (MORITZ, 1995). Im Rahmen dieses Verfahrens führt somit der Zusatz von Eigelb und Leber in Fleischerzeugnissen zu falsch-positiven Ergebnissen (LÜCKER und BÜLTE, 1997b; LÜCKER et al., 2000a, 2000b und 2001). Da Cholesterin auch in Pflanzenöl vorliegt kommt es auch bei dessen Zusatz zu falsch-positiven Ergebnissen (BELITZ und GROSCH, 1992). Nachteilig bei der

Verwendung von Cholesterol als Marker ist weiterhin die Tatsache, dass der Gehalt innerhalb einzelner Gewebe sowie zwischen verschiedenen Tierarten variiert (SOUCI et al., 1994). RUNQUIST et al. (1995) wiesen nach, dass der Cholesterolgehalt im Rindergehirn abhängig von der Gehirnregion schwankt. NITSCH und WACHSMANN (2001) ermittelte eine Nachweisgrenze des Verfahrens von 5% Gehirnzusatz und 1% Rückenmarkzusatz. Das integrierte Nachweisverfahren (INV) nach LÜCKER et al. (1999a) basiert auf einer Kombination des Nachweises von Cholesterol und Neuronen Spezifische Enolase (NSE), indem zunächst Cholesterol im Rahmen eines Screeningverfahrens und anschließend NSE mittels immunhistologischer oder Western Blot Analyse nachgewiesen wird. Die Enolase ist ein Dimer mit α -, β - und γ -Untereinheit, die in bestimmten Geweben des Körpers vorkommt: $\alpha\alpha$ -Form in Leber- und Gliazellen, $\alpha\beta$ - und $\beta\beta$ -Form in Skelett- und Herzmuskulatur und $\gamma\gamma$ - sowie $\alpha\gamma$ -Form in Nervenzellen, neuroendokrine Zellen und Tumorzellen (SCHMECHEL et al., 1978; MARANGOS et al., 1979), wobei die $\gamma\gamma$ -Enolase als NSE oder als 14-3-2 Protein bezeichnet wird (MARANGOS et al., 1979). HORLACHER et al. (2002b) untersuchten im Rahmen des INV ergänzt durch einen enzymimmunologischen GFAP-Nachweis rohe und erhitzte Fleischerzeugnisse auf einen Zusatz von Nervengewebe. Im Rahmen eines histologischen Nervengewebenachweises in Fleischerzeugnissen konnte LINKE (1959) unter Verwendung der Calleja-Färbung 5% Gehirnzusatz in Brühwürsten nachweisen, was WENISCH et al. (2000) mit einer neurohistologischen Färbung wie z.B. der Nissl-Färbung kombinierte. WENISCH et al. (2000) etablierte ein immunhistochemisches Verfahren zum Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen auf der Basis monoklonaler Antikörper gegen GFAP und gegen Neuronen spezifische Enolase (NSE), wobei sich GFAP in diesem Verfahren aufgrund zahlreicher falsch-positiver Ergebnisse als ungeeignetes Markerprotein erwies. KELLEY et al. (2000) untersuchten Separatorenfleisch histologisch nach Hämatoxilin-Eosin-Färbung und immunhistochemisch auf den Zusatz von Rückenmark, wobei GFAP, das in Nervenzellenintermediärfilamenten vorkommende Neurofilament (NF) und Synaptophysin, das in präsynaptischen Vesikeln der grauen Substanz des ZNS jedoch nicht im PNS vorliegt, nachgewiesen werden sollten. Das histologische Verfahren eignete sich jedoch nicht zur Untersuchung stark zerkleinerten Fleisches. TERSTEEG et al. (2002) untersuchte immunhistochemisch mit Rinder- und Schweinegehirn kontaminierte Brühwürste und Brät, die mit jeweils unterschiedlich hoher Erhitzung hergestellt wurden

(70 °C und 115 °C für 60 Min). Er verwendete hierbei Antikörper gegen Neurofilament (NF), NSE, GFAP und basisches Myelinprotein (Myelin basic protein, MBP). NF und NSE erwiesen sich als hitzelabil und GFAP war als Markerprotein nur bedingt geeignet, da es nicht in Brühwürsten nachgewiesen werden konnte. MBP hingegen konnte stets nachgewiesen werden und eignete sich somit am besten als Marker in diesem Verfahren. AUPPERLE et al. (2002) untersuchten Fleischerzeugnisse immunhistochemisch auf NSE, GFAP, NF, MBP und Peripherin, ein Intermediärfilament der peripheren Nerven und enteralen Ganglien, in Kombination mit Western Blot Analysen auf NF, MBP und Peripherin. Die im Western Blot verwendeten Marker eigneten sich nicht zum Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen und insgesamt betrachtet wurde von AUPPERLE et al. (2002) NF als Marker bevorzugt. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Untersuchung festgestellt, dass MBP wiederkäuerspezifisch nachgewiesen wurde. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Untersuchungen von TERSTEEG et al. (2002) und AUPPERLE et al. (2002) ergeben sich durch differierende Probenherstellung, abweichende Untersuchungsverfahren und unterschiedliche Antikörper.

Nach SANDMEIER et al. (2003) eignet sich zum Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen der Nachweis von Lipophilin im Western Blot. Lipophilin ist ein Proteolipid des Myelins, das somit hochgradig spezifisch für Gehirn und Rückenmark ist und nur geringe Speziesunterschiede aufweist. LÜCKER et al. (2002b) stellten fest, dass der BSE-Schnelltest Bio-Rad Platelia-Test auch auf Fleischerzeugnisse angewendet werden kann. Pathogene Prionen (PrPsc) können auch in Fleischerzeugnissen nachgewiesen werden.

2.6.3 Speziesspezifischer ZNS-Nachweis in Fleischerzeugnissen

Im Rahmen des Nachweises von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen wurde die Problematik des tierartspezifischen Nachweises in verschiedenen Ansätzen gelöst. Das von NIEDERER und BOLLHALDER (2001) und LÜCKER et al. (2002a) etablierte Verfahren der Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS) basiert auf dem Nachweis von Fettsäuremethylestern (FAME). Ausgangspunkt dieser Methodik ist das Mengenverhältnis verschiedener Nervenzellmembranbestandteile, wodurch in Fleischerzeugnissen ein

Nervengewebenachweis unter Berücksichtigung von Tierart und Altersgruppe ermöglicht wird. Nach Extraktion der Gesamtlipide aus der Probe folgt die Aufreinigung bestimmter Fettsäuren, die nach Umesterung zu FAME mit GC-MS aufgetrennt, identifiziert und quantifiziert werden. Die Nachweisgrenze des Verfahrens beträgt 0,2% ZNS-Zusatz adulter Rinder (LÜCKER et al., 2002a). Nachteilig bei diesem Verfahren ist die heterogene FAME-Verteilung im ZNS, sowie die Tatsachen, dass FAME teilweise nicht ZNS-spezifisch sind und ZNS-Gemische verschiedener Tierarten und Altersgruppen vorhanden sein könnten, was in falsch-positiven Ergebnissen resultieren könnte. SEYBOLDT et al. (2003) führten eine Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion mit anschließender Untersuchung des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) des GFAP durch, wobei bovine GFAP-m-RNA nachgewiesen wird. SCHÖNENBRÜCHER et al. (2003a) wiesen GFAP-m-RNA mittels Real Time-PCR bis zu einer Nachweisgrenze von 0,01% ZNS-Zusatz in Fleischerzeugnissen nach. Des Weiteren wurde porcine GFAP-m-RNA mit einem Sybr-Green-Real Time-PCR-Verfahren detektiert (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2003b). LANGE et al. (2002) zeigten in ihren Versuchen, dass GFAP-m-RNA in Wiederkäuer-, Schweine- und Hühnergehirnen vorkommt und spezifisch für Nervengewebe ist. MBP-m-RNA hingegen konnte nur in Wiederkäuergehirnen nachgewiesen werden und ist auch spezifisch für Nervengewebe. HERDE et al. (2003) untersuchten bovines, ovines und porcines Rückenmark und mit Rindergehirn künstlich kontaminierte Fleischerzeugnisse mit Western Blot und Immunhistochemie, wobei monoklonale Antikörper gegen bovines GFAP, bovines MBP und bovines Oligodendrocyte Specific Protein (OSP) verwendet wurden. Die anti-GFAP- und anti-MBP-Antikörper reagierten dabei nicht mit porcinem ZNS. OSP konnte nicht nachgewiesen werden. SCHNEIDER et al. (2003) etablierten einen Sandwich-Enzymimmuntest zum GFAP-Nachweis, der spezifisch bovines GFAP detektieren soll. LUX et al. (2005) etablierten einen Sandwich-Enzymimmuntest zum GFAP-Nachweis mit in verschiedenen Tierarten produzierten polyklonalen Antikörpern, die spezifisch bovines GFAP detektieren sollen. Dieser Test wurde anhand von 30 Handelsproben validiert, die in negativen Ergebnissen resultierten und seine Eignung als Routineuntersuchungsverfahren von Fleischerzeugnissen bestätigten. HOLTBECKER (2004) etablierte einen indirekten Enzymimmuntest zum MBP-Nachweis mit monoklonalen Antikörpern. KAPLAN et al. (1990) stellte monoklonale Antikörper gegen Alpha-Internexin, ein Intermediärfilament in Neuronen, her.

2.7 Saures Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein, GFAP)

Erstmals wurde das saure Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) im Jahr 1970 von ENG et al. (1970) beschrieben. Als Intermediärfilament der Klasse III mit einem Durchmesser von etwa 10 nm und einer Länge von etwa 20 µm stellt GFAP den Hauptbestandteil der ZNS-spezifischen Astrozyten dar (ENG et al., 1971; BIGNAMI et al., 1972; BIGNAMI und DAHL, 1977; GOLDMAN et al., 1978; DAHL und BIGNAMI, 1983; ENG et al., 2000). GFAP konnte weiterhin in Gliazellen des enterischen Nervensystems (JESSEN und MIRSKY, 1980, 1983 und 1985), in *Nervi olfactorii* (BARBER und LINDSAY, 1982) sowie im *Nervus ischiadicus* (YEN und FIELDS, 1981) und in nicht-myelinisierten Schwann'schen Zellen des peripheren Nervensystems (YEN und FIELDS, 1981) nachgewiesen werden. Das GFAP der meisten peripheren Nervenzellen unterscheidet sich jedoch von denen des ZNS-Gewebes durch Fehlen einer antigenen Determinante (ALBRECHTSEN et al., 1984), so dass eine solche Kreuzreaktion durch Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen GFAP des ZNS weitgehend ausgeschlossen werden kann (JESSEN et al., 1984; JESSEN und MIRSKY, 1985). GFAP wird als Markerprotein im Rahmen der Gehirntumordiagnostik (ENG und BIGBEE, 1978), der pränatalen Diagnostik nervaler Schäden und zum Nachweis von Astrogliosen (ENG und BIGBEE, 1978; DAHL und BIGNAMI, 1983) sowie zum ZNS-Nachweis in Fleischerzeugnissen (LÜCKER et al., 1998; SCHMIDT et al., 1999b) verwendet. Die bisher beschriebenen anti-GFAP-Antikörper sind jedoch ausnahmslos nicht speziespezifisch, so dass es zu Kreuzreaktionen zwischen einzelnen Tierarten kommen kann (BIGNAMI et al., 1972; BIGNAMI und DAHL, 1974). Mittels SDS-PAGE weist man GFAP in frischem Gehirngewebe in Form einzelner Immunbanden mit einem Molekulargewicht von 50 bis 53 kDa nach (DAHL und BIGNAMI, 1983). Infolge postmortalen Zersetzungsprozesse kommt es zur Aufspaltung in bis zu acht Immunbanden im Bereich von 40 bis 50 kDa (DAHL und BIGNAMI, 1983; ENG und DE ARMOND, 1983). Im Gehirngewebe beträgt der GFAP-Gehalt 9.000 bis 55.000 ng GFAP/mg löslichem Protein und im Rückenmark 55.000 bis 220.000 ng/mg (ENG und DE ARMOND, 1983; SCHMIDT et al., 1999b). Im Darmplexus ist der GFAP-Gehalt um das achtfache und im *Nervus ischiadicus* um das zwanzigfache unterhalb des Gehirngehaltes (JESSEN et al., 1984). Der nachweisbare GFAP-Gehalt nimmt mit der Lagerungsdauer durch Polymerisation und Aggregation mit anderen Gewebeproteinen ab (ENG und De

ARMOND, 1983; SCHMIDT et al., 1999b). Beim Vergleich zweier ZNS-Proben verlor eine der Proben nach achttägiger Lagerung bei 4 °C die Hälfte der GFAP-Ausgangsaktivität (SCHMIDT et al., 1999b). In Fleischerzeugnissen mit 1% ZNS-Zusatz wurde ein entsprechender Verlust erst nach 12 Tagen festgestellt.

2.8 Basisches Myelinprotein (Myelin Basic Protein, MBP)

Das basische Myelinprotein (Myelin Basic Protein, MBP) ist im Rahmen der Multiple Sklerose (MS)-Forschung ein häufig verwendetes Autoantigen zur Induktion des entsprechenden Tiermodells, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) (EYLAR et al., 1970). Es ist somit sowohl für die Erforschung der MS als auch weiterer autoimmuner Erkrankungen von Interesse. MBP im Liquor dient außerdem als Marker für akute und chronische Myelinschäden. MBP findet darüber hinaus Verwendung als Markerprotein zum Nachweis von ZNS in Lebensmitteln (HOLTBECKER, 2004). MBP ist als Membranbestandteil des Myelins von zentralem und peripherem Nervensystem mitverantwortlich für die Gewebestabilisierung, indem es mit seinen positiven Ladungen gegenüberliegende Myelinmembranen verbindet (KURSULA, 2001). Im ZNS werden 30 bis 40% der Myelinproteine vom MBP gestellt (LEES und BROSTOFF, 1984). Im PNS hingegen stellt MBP nur einen Anteil von 5 bis 15% (KURSULA, 2001). MBP enthält einen hohen Anteil von 24% an basischen Aminosäuren und weist keine ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur auf, da die Struktur abhängig vom umgebenden Medium ist: in wässriger Umgebung weist es eine zufällige Konformation auf, wohingegen es in lipidhaltigem Milieu eine Tendenz zur Faltung zeigt (KURSULA, 2001). Es kommt jedoch weder zur alpha- noch zur beta-Helixausbildung (EYLAR et al., 1970). Die Tatsache, dass die Antigenität des Proteins nach einer Erhitzung auf 100 °C noch für eine Stunde erhalten ist, belegt seine Hitzestabilität (EYLAR et al., 1970; GROOME, 1980), wodurch sich MBP auch als Markerprotein für die Untersuchung erhitzter Fleischerzeugnisse eignet. Durch seine Unempfindlichkeit gegenüber einiger Chemikalien wie z.B. Harnstoff (EYLAR et al., 1970) und Mercaptoethanol (GROOME, 1980) eignet es sich auch für Produkte, die mit Nitritpökelsalz und Gewürzen versetzt sind.

Um einen speziesspezifischen Nachweis von Nervengewebe in Fleischerzeugnissen zu entwickeln, ist insbesondere der Vergleich der Aminosäuresequenzen von MBP des Rindes und des Schweines von Interesse. Während die Sequenz des Rindes 169 Aminosäuren lang ist, beträgt die Sequenz des Schweines 171 Aminosäuren. Die Sequenzen sind zu 93% identisch, wobei sich bovines MBP insbesondere in der Position 129-138 von porcinem MBP unterscheidet. Diese antigene Region wurde bereits in dem von HOLTBECKER (2004) entwickelten indirekten Enzymimmuntest zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen verwendet. In diesem Epitop befindet sich an der bovinen Position 131 und 135 jeweils die Aminosäure Serin anstelle des beim porcinen MBP vorkommenden aromatischen Prolinrings, der offensichtlich eine Antikörperbindung behindert (HOLTBECKER, 2004). Monoklonale Antikörper gegen dieses Epitop sind deshalb speziesspezifisch (HRUBY et al., 1984). MENDZ et al. (1985) wiesen nach, dass humanes und bovines Epitop 129-138 identisch sind. Antikörper werden an der Aminosäure Tyrosin (Position 133) der Polypeptidkette gebunden, welches dadurch ohne chemische Verschiebung immobilisiert wird. Eine Konformationsänderung geht nicht über das Epitop hinaus (MENDZ et al., 1985). Es handelt sich somit um ein kontinuierliches Epitop, woraus HOLTBECKER (2004) die Hitzestabilität des MBPs ableitet.

2.9 Angewendete immunchemische Verfahren

Bei immunchemischen Verfahren wird eine immunologische Bindungsreaktion zwischen einem Antigen und seinem korrespondierenden Antikörper nachgewiesen (ENGVALL und PERLMANN, 1971; EKINS, 1989). Der Sandwich-Enzymimmuntest (Enzymimmunoassay, EIA) ist ein heterogener, nicht kompetitiver Immuntest. Bei heterogenen Verfahren wird die Enzymaktivität des Konjugats (enzymmarkierter Antikörper) durch die Bindung des enzymmarkierten Antikörpers an das Antigen nicht beeinflusst, so dass eine Trennung (z.B. Waschschrift) von gebundenen und nicht-gebundenen enzymmarkierten Antikörpern erforderlich ist. Bei nicht-kompetitiven Verfahren fungieren die im Überschuss zugegebenen und an das Antigen gebundenen Antikörper als Messgröße (OELLERICH, 1984; ANGLER 2000). Mit Sandwich-EIAs können nur Moleküle mit einer gewissen Mindestgröße nachgewiesen werden, da die Antigene mindestens zwei Antikörperbindungsstellen (Epitope) aufweisen müssen

(ANGLER, 2000). Für den ersten immunchemischen Schritt benötigt man spezifische Antikörper, die kovalent oder adsorptiv an eine Festphase gebunden werden. Bei Zugabe der Probe mit dem korrespondierenden Antigen wird dieses vom Antikörper gebunden. Nach einer gewissen Inkubationszeit und einem Trennungsschritt folgt die Zugabe von enzymmarkierten Antikörpern (z.B. an Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase) im Überschuss. Je mehr Antigen in der untersuchten Probe vorhanden war, desto mehr enzymmarkierte Antikörper werden dabei an bereits gebundenes Antigen angelagert. Das nachzuweisende Antigen und die beiden Antikörper bilden einen sogenannten Sandwich-Komplex. Nach diesem Inkubationsschritt wird der nicht gebundene Anteil enzymmarkierter Antikörper entfernt und es erfolgt die Zugabe eines synthetischen, chromogenen Substrates, welches durch das an die Antikörper gekoppelte Enzym hydrolysiert wird, wobei farbige Reaktionsprodukte entstehen. Abschließend erfolgt die photometrische Messung der Enzymaktivität. Die Intensität der Enzym-Substrat-Reaktion ist dabei proportional zu der Menge des gebundenen Antigens (BECKER und MÄRTLBAUER, 1998). Das Prinzip des Western Blot bzw. Immunoblot ist analog einem Sandwich-Enzymimmuntest, wobei die abschließende Bewertung der Enzymaktivität visuell erfolgt.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN**3.1 Materialien und Geräte**

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aceton (reinst)	(Merck KGaA, 100013)
Ammoniumsulfat	(Riedel-de Haën GmbH, 31119)
Casein-Natriumsalz	(Sigma Aldrich GmbH, C 8654)
Citronensäure-1-Monohydrat	(Merck KGaA, 100244)
Essigsäure (100%)	(Merck KGaA, 100056)
Ethanol	(Merck KGaA, 100986)
Freund`sches Adjuvans, komplett	(Sigma Aldrich GmbH, F 5881)
Glutardialdehyd	(Sigma Aldrich GmbH, G 5882)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck KGaA, 104877)
Keyhole limpet hemocyanin (KLH)	(Calbiochem Corporation, 374805)
Meerrettichperoxidase (Horse radish peroxidase, HRP)	(Roche Diagnostics GmbH, 814407)
Methanol	(Merck KGaA, 106009)
Natriumacetat	(Merck KGaA, 106264)
Natriumborhydrid	(Sigma Aldrich GmbH, 21346-2)
Natriumcarbonat, wasserfrei	(Merck KGaA, 106392)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 106404)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck KGaA, 106329)
di-Natriumhydrogenphosphat	(Merck KGaA, 106586)
Natrium-meta-perjodat	(Sigma Aldrich GmbH, S 1878)
Salzsäure (37%)	(Riedel-de Haen GmbH, 30721)
Schwefelsäure (95-97%)	(Merck KGaA, 100731)
Serumalbumin, bovines	(Sigma Aldrich GmbH, A 9642)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	(Sigma Aldrich GmbH, L 4509)
3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin	(Sigma Aldrich GmbH, T 2885)
Thimerosal	(Sigma Aldrich GmbH, T 5125)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	(Bio-Rad Laboratories GmbH, 161-0716)
Triton X-100	(Sigma Aldrich GmbH, T 9284)
Tween 20	(Sigma Aldrich GmbH, P 1379)

Wasserstoffperoxid (Merck KGaA, 107209)

3.1.2 Markerproteine

Basisches Myelinprotein, bovin (bMBP) (Alexis Corporation, 202-076)
Basisches Myelinprotein, bovin (Upstate Group LLC., 13-104)
Basisches Myelinprotein, porcine (pMBP) (Alexis Corporation, 202-077)

Saures Gliafaserprotein, bovin (bGFAP) (Progen Biotechnik GmbH, 62007)
Saures Gliafaserprotein, porcine (pGFAP) (Chemicon Europe Ltd., AG 230)

Saures Gliafaserprotein-Peptid 287-298 (Biotrend Chemikalien GmbH, PepNo. 9654)
Saures Gliafaserprotein-Peptid 299-313 (Biotrend Chemikalien GmbH, PepNo. 9653)

3.1.3 Immunreagenzien

anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (DAKO Cytomation GmbH, P 0217)
anti-MBP 129-138 (aMBP129) (BioLogo, Dr. Schultheiß e.K., MBP 129)

anti-Maus-IgG (DAKO Cytomation GmbH, Z 0259)
anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (DAKO Cytomation GmbH, P 0161)
anti-Schaf-IgG-Peroxidase-Konjugat (DAKO Cytomation GmbH, P 0163)
anti-Schwein-IgG-Peroxidase-Konjugat (DAKO Cytomation GmbH, P 0164)

3.1.4 Lösungen und Puffer

Ammoniumsulfatlösung: 70% gesättigte wässrige Lösung
Bicarbonatpuffer (pH 9,6): 0,05 mol/l NaHCO₃

Casein/PBS-Lösung:	1% und 2%ige Lösung
Casein/TBS-Lösung:	1% und 2%ige Lösung
Citratpuffer (pH 3,9):	0,21 mol/l Citronensäure-Monohydrat 3,15 mmol/l Wasserstoffperoxid
Enzymsubstrat-/ Chromogenlösung:	20 Volumenanteile Citratpuffer 1 Volumenanteil TMB-Lösung
Essigsäure:	5%ige Lösung
Natriumacetatpuffer (pH 4,4):	1mmol/l
Natriumborhydridlösung:	4 mg/ml
Natriumcarbonatlösung (pH 12):	0,5 mol/l
Natrium-meta-perjodatlösung:	0,1 mol/l
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, „Phosphate Buffered Saline“ (PBS, pH 7,2):	0,01 mol/l Phosphatpuffer (Kalium- dihydrogenphosphat und di-Natrium- hydrogenphosphat) mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid
Salzsäure:	0,1 mol/l
Schwefelsäure:	1 mol/l
SDS-Lösung:	1% und 0,1%ige Lösung
SDS/PBS:	1% und 0,1%ige Lösung
Tetramethylbenzidin(TMB)-Lösung:	1 mmol/l 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin in: 9 Volumenanteile Methanol 1 Volumenanteil Aceton
Trisgepufferte Kochsalzlösung, „Tris Buffered Saline“ (TBS, pH 7,5):	0,1 mol/l Tris 0,15 mol/l Natriumchlorid mit Salzsäure auf pH 7,5
Triton X-100/PBS:	0,5% Triton X-100 in PBS
Waschlösung:	0,15 mol/l Natriumchlorid 0,025 % Tween 20

3.1.5 Geräte und Sonstiges

Chromatographiegerät Biologic	(Bio-Rad Laboratories GmbH, LP 731-8350)
Chromatographiesäule 16/60	(Amersham Bioscience UK Limited, 19-5001-01)
Dialyseschlauch 16mm	(Serva Electrophoresis GmbH, 44110)
Elektronische Analysenwaage Basic Plus	(Sartorius AG)
Elektronische Präzisionswaage Master Pro LA	(Sartorius AG)
Fraktionssammler	(Bio-Rad Laboratories GmbH, 2110)
Heizbad Typ 1002	(MAGV GmbH)
Heizrührer MR 3001	(Heidolph GmbH)
High Vacuum pump E2M5	(Edwards Lifescience Corporation, 23354)
Moulinette Speedy Pro	(Krupps GmbH)
Papierfaltenfilter	(Schleicher & Schuell GmbH, 5155506)
pH-Messgerät inolab Level 1 mit Sen Tox HW Elektrode	(WTW GmbH)
Präzisions-Küvetten 10mm	(Hellma GmbH & Co. KG, 108 002 QS)
Spektrophotometer UV-1601	(Shimadzu Deutschland GmbH)
Stomacher 400 Circulator	(Seward Ltd.)
Stomacherbeutel	(Transia GmbH, 85051)
Taumelgerät Polymax 1040	(Heidolph GmbH)
Variable Pipetten 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1.000µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)
Variable 12-Kanal- Pipette 30-300µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)
Vortex Genie 2	(Scientific Industries Inc.)
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	(Heraeus-Christ GmbH, 750 043 71)

3.1.6 Enzymimmuntest

ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise	(Tecan GmbH)
Mikrotiterplatten	(ImmunoPlate MaxiSorp Nunc GmbH, 439454)
Software: Ridawin Version 1.38	(R-Biopharm AG)

3.1.7 Western Blot

Mark 12 TM Unstained Standard	(Invitrogen GmbH; LC 5677)
Nitrocellulose Membrane & Filter Paper	(Invitrogen GmbH; LC 2000)
NuPage ^R Antioxidant	(Invitrogen GmbH; NP 0005)
NuPage TM 4-12% Bis-Tris-Gel	(Invitrogen GmbH; NP 0321)
NuPage ^R LDS Sample Buffer 4x	(Invitrogen GmbH; NP 0007)
NuPage ^R MES-SDS-Running Buffer 20x	(Invitrogen GmbH; NP 0002)
NuPage ^R Sample Reducing Agent 10x	(Invitrogen GmbH; NP 0004)
NuPage ^R Transfer Buffer 20x	(Invitrogen GmbH; NP 0006)
Ponceau S Solution	(Sigma Aldrich GmbH, P 7170)
Sponge Pad for X Cell II Blotting	(Invitrogen GmbH; EI 9052)
X Cell II TM Blot Module	(Invitrogen GmbH; EI 9051)
X Cell Sure Lock TM Mini- Cell	(Invitrogen GmbH; EI 0001)

3.1.8 Tiere

Die zur Antikörpergewinnung gegen bovines GFAP-Peptid 2 verwendeten Kaninchen weiblichen Geschlechtes der Rasse Chinchilla Bastard (n = 2) wurden von der Firma Charles River Wiga Deutschland GmbH (Kisslegg) bezogen. Die tierschutzrechtliche Genehmigung durch die zuständige Behörde lag vor (Az. V63-19c-20/15c GI18/5; Regierungspräsidium Gießen vom 19.02.2003).

3.1.9 Gewebeproben und Referenzmaterialien

Als Gewebeproben und Referenzmaterialien dienten sowohl Nativgewebe verschiedener Spezies (Tabelle 3.1) als auch künstlich mit ZNS-Material kontaminierte Gewebe nativen sowie hitzebehandelten Zustandes (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten Nativgewebe und deren Herkunft.

Nativgewebe (100%)	Tierart	Herkunft
Euter, Herz, Leber, Lunge, Niere, Pansen, Zunge	Rind	1
Gehirn	Rind	1, 2
	Schaf, Schwein, Ziege	2
Muskulatur	Rind, Schwein	1
Rückenmark	Rind, Schwein	2

Tabelle 3.2: Übersicht der verwendeten künstlich mit ZNS-Material kontaminierten Gewebe.

Probenmatrix	Zusatz von	Konzentration des Zusatzes
Hackfleisch nativ (Rind- und Schweinefleisch im Verhältnis 1:1 gemischt ³⁾)	Gehirn Rind	8%, 4%, 2%, 1%, 0,75%,
	Gehirn Schwein	0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,25%, 0,2%, 0,1%, 0%
	Gehirn Schaf	
	Gehirn Pferd ⁴⁾	
	Gehirn Kaninchen ⁵⁾	8%, 2%, 1%, 0,5%, 0%
	Gehirn Pute ⁶⁾	
Kesselkonserven ⁴⁾ (Wurstbrät; F-Wert: 0,48)	Gehirn Rind	
	Gehirn Schwein	8%, 2%, 1%, 0,1%, 0%
Dreiviertelkonserven ⁴⁾ (Wurstbrät; F-Wert: 0,84)	Gehirn Rind	8%, 2%, 1%, 0,1%, 0%
Vollkonserven ⁴⁾ (Wurstbrät; F-Wert: 5,4)	Gehirn Rind	8%, 2%, 1%, 0,1%, 0%

Materialien wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

- 1 Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 2 örtlicher Schlachthof
- 3 im örtlichen Einzelhandel käuflich erworben
- 4 Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 5 Zentrales Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 6 Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen

3.1.10 Handelsproben

Im Zeitraum von 2004 bis 2006 wurden in örtlichen Metzgereien und überregionalen Supermarktketten insgesamt 69 Handelsproben (Wurstwaren (n = 63), Fleischerzeugnisse (n = 1), Hautcreme (n = 3) und Weingummi (n = 2)) gekauft (Abbildung 3.1).

Die Proben wurden gemäß dem ADV¹-Kodierkatalog für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie Lebensmittelmonitoring (Katalog Nr. 3: Matrixkodes) gruppiert (Tabelle 3.3). Diese Codes sind in Fachkreisen als ZEBS²-Kodes bekannt. Im Folgenden wird daher die Bezeichnung ZEBS-Kode verwendet.

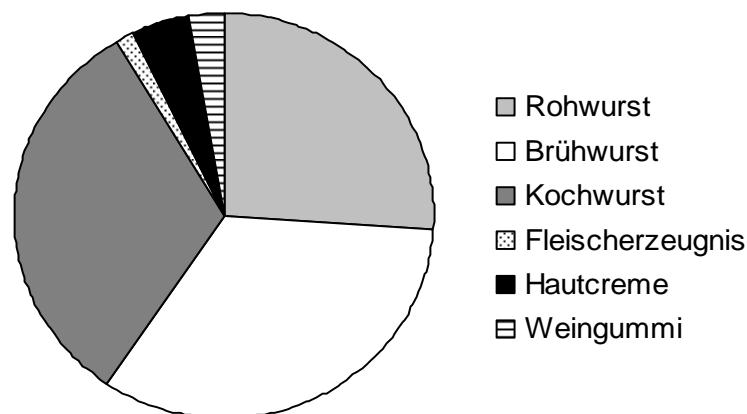


Abbildung 3.1: Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktgruppen an der Gesamtzahl der untersuchten Handelsproben

¹ADV = automatisierte Datenverarbeitung

²ZEBS = Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung von Umweltchemikalien

Tabelle 3.3: Produktgruppen und Anzahl (n) der Proben mit ZEBS-Kode.

Probenart	ZEBS-Kode	n
Hackfleischerzeugnisse gegart	0719..	1
Rohwürste schnittfest	0801..	8
Rohwürste schnittfest anderer Tierarten	0802..	1
Rohwürste streichfähig	0803..	8
Brühwürstchen umgerötet	0805..	2
Brühwürstchen umgerötet anderer Tierarten	0806..	1
Brühwürstchen nicht umgerötet	0807..	1
Brühwürste umgerötet feingekuttert	0809..	5
Brühwürste umgerötet feingekuttert anderer Tierarten	0810..	1
Brühwürste umgerötet grob	0811..	3
Brühwürste umgerötet mit Fleischeinlage	0813..	1
Brühwürste mit Einlage anderer Lebensmittel	0821..	5
Brühwurstpasteten	0823..	2
Leberwürste fein gekörnt	0826..	4
Leberwürste grob gekörnt	0827..	2
Rotwürste/Blutwürste	0829..	5
Sülzwürste	0831..	1
Sülzen und Aspikwaren	0832..	4
Kochwurstpasteten anderer Tierarten	0834..	3
Kochwurstpasteten	0835..	3
Brühwürstchen umgerötet in Lake (Konserven)	0836..	2
Rohwürste streichfähig fettreduziert	0871..	1
Gummibonbons	4305..	2
Mittel zur Hautpflege	8411..	3

3.2 Methodik

3.2.1 Herstellung der Immunreagenzien

Als Markerproteine für den Nachweis von bovinem ZNS wurden zwei Zielantigene ausgewählt. Zum einen wurde der Nachweis von bovinem saurem Gliafaserprotein (bovines Glial Fibrillary Acidic Protein, bGFAP) über den Nachweis von Antikörpern gegen Teilabschnitte dieses Proteins (bGFAP-Peptid) geprüft. Zum anderen wurde bovines basisches Myelinprotein (bovines Myelin Basic Protein, bMBP) als Vollprotein zur Antikörperherstellung verwendet.

3.2.1.3 Gewinnung spezifischer Antiseren

3.2.1.3.1 Auswahl und Synthese der Immunogene bGFAP-Peptid 1 und bGFAP-Peptid 2

Zur Herstellung der bGFAP-Immunogene wurden die Aminosäuresequenzen von bovinem und porcinem saurem Gliafaserprotein verglichen und zwei Aminosäuresequenzen ausgewählt und synthetisiert, die einem Abschnitt des GFAPs entsprechen, in dem sich bovines und porcines GFAP teilweise unterscheiden (Abbildung 3.2). Sequenzierung und Synthese wurden von der Firma Biotrend Chemikalien GmbH (Köln) durchgeführt.* Die Aminosäuresequenzen dieser als bGFAP-Peptid 1 (12 Aminosäuren) und bGFAP-Peptid 2 (15 Aminosäuren) bezeichneten Peptide sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

* Diese Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Herrn Prof. Dr. M. Bergmann und Frau Dr. K. Herde sei an dieser Stelle für die Überlassung der Antiseren gegen bGFAP-Peptid 2 herzlich gedankt.

bGFAP-Peptid 1: (Sequenz 287-298; 12 Aminosäuren; Molekulargewicht 1.278,4)

H -Ala-Leu-Thr-Cys-**Asp-Leu-Glu**-Ser-Leu-Arg-Gly-Thr- OH
 (pGFAP 84-86: -Cys-**Glu-Val-Asp**-Ser-)

bGFAP-Peptid 2: (Sequenz 299-313; 15 Aminosäuren; Molekulargewicht 2.046,2)

H -Asn-Glu-Ser-Leu-Glu-Arg-Gln-Met-Arg-Glu-Gln-Glu-**Asp-Ala-His**- OH
 (pGFAP 103-106: -Glu-**Glu-Arg**-His-)

Abbildung 3.2: Aminosäuresequenzen der zur Immunisierung verwendeten Peptide bGFAP-Peptid 1 und bGFAP-Peptid 2 und Vergleich mit dem entsprechend unterschiedlichen Aminosäuresequenzabschnitt des porcinen Proteins pGFAP (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.2.1.1.2 Kopplung von bGFAP-Peptid 1 und 2 an Keyhole Limpet Hemocyanin

Da die bGFAP-Peptide aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes per se nicht immunogen wirken (Haptene), wurden sie zuvor an ein Trägerprotein ausreichender Grösse gekoppelt. Für die Herstellung von bGFAP-Peptid 1- und bGFAP-Peptid 2-Konjugat wurde eine Methode verwendet, bei der die Kopplung des Haptens an das Trägerprotein Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) durch Glutardialdehyd als homobifunktionales Reagenz vermittelt wird (ERLANGER, 1980; PESTKA, 1989). Das Kopplungsprinzip besteht in einer Vernetzung freier Aminogruppen durch die Aldehydgruppen des Kopplungsreagenz Glutardialdehyd (AVRAMEAS, 1969; AVRAMEAS und TERNYNCK, 1969). Natürliche Proteine scheinen dabei für die Synthese guter Immunogene besser geeignet zu sein als künstlich synthetisierte Polypeptide (JAFFE et al., 1970; WALKER et al., 1973). In einer einstufigen Reaktion wurden das entsprechende Peptid sowie KLH in PBS und Glutardialdehyd in A.dest. gelöst, in einem molaren Verhältnis von 1.000: 1: 1.000. Nach dreistündigem Rühren bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde der Kopplungsansatz zur Abtrennung von nicht gebundenem Peptid sowie von überschüssigem Kopplungsreagenz dreimal gegen 6 l PBS dialysiert. Abschließend wurde die Peptidkonzentration spektrophotometrisch bestimmt. Die bGFAP-Peptid 1- und 2 Konjugate wurden in Portionen zu jeweils 0,5 ml bei -18 °C aufbewahrt.

3.2.1.1.3 Aufreinigung von MBP mittels Ultrazentrifugation

Da bovines basisches Myelinprotein als Standardlösung in einer komplexen Pufferlösung vorlag, die möglicherweise Einfluss auf den Immunisierungsverlauf haben könnte, wurde das Protein zunächst durch Ultrazentrifugation über Ultrafree-CL-Centrifugal Filter (Ausschlussgröße 5.000) gereinigt. Hierzu wurden 2,5 mg MBP (in 0,5 ml 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)-Puffer) mit 500 µl PBS gemischt und in einer Filtereinheit 30 min bei 1.800 x g zentrifugiert. Das Protein wurde mit 1 ml PBS aus dem Filter gelöst. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach der dritten Zentrifugation wurde das Protein mit 5 ml PBS gewonnen und die Proteinkonzentration spektrophotometrisch bestimmt.

3.2.1.1.4 Immunisierung und Gewinnung der Antiseren

Mit den in 3.2.1.1.2 beschriebenen bGFAP-Peptid-Konjugaten bzw. aufgereinigtem bMBP wurden Kaninchen (Chinchilla Bastard, weiblich, 2-3 kg Körpergewicht) immunisiert (Tabelle 3.4). Die Immunisierung der Tiere mit bMBP wurde bei Charles River Wiga Deutschland GmbH (Kisslegg) durchgeführt. Die Immunisierung bzw. Serumgewinnung gegen bGFAP-Peptid 2 wurde durch das Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bei Biotrend Chemikalien GmbH (Köln) in Auftrag gegeben. Die Immunisierung gegen bGFAP-Peptid 1 wurde an der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Die in PBS gelösten Immunogene wurden mit komplettem Freund`schem Adjuvans (1 + 3 Volumenanteile) emulgiert. Die Proteinkonzentration dieser Emulsionen betrug 125 µg MBP/ml bzw. 175 µg bGFAP-Peptid 1 bzw. 2/ml. Zur Grundimmunisierung wurden mit jedem Immunogen Kaninchen nach der Methode von NIESCHLAG et al. (1975) behandelt. Pro Tier wurden 2 ml Emulsion, auf ca. 20 Stellen verteilt, intrakutan am Rücken appliziert.

Tabelle 3.4: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten bzw. verwendeten (LUX, 2009) Antiseren.

Antiserum	interne Bezeichnung	zur Antikörperherstellung verwendetes Immunogen *			
		bMBP ¹	bGFAP- Peptid 1 ²	bGFAP- Peptid 2 ³	bGFAP ⁴
M1	Kan 1256#1	X			
M2	Kan 1256#2	X			
M3	Kan 1256#3	X			
P1	Kan 23		X		
P2	Kan 24		X		
P3	Kan 6664			X	
P4	Kan 6665			X	
G1	Kan 09				X
G2	Kan 10				X
G3	Kan 11				X
G4	Sw 01				X
G5	Sw 02				X
G6	Sf 01				X
G7	Sf 02				X

Kan: Kaninchen; *Sw:* Schwein; *Sf:* Schaf

* Die Durchführung der Antiserumgewinnung erfolgte:

- 1 im Auftrag der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen bei Charles River Wiga Deutschland GmbH (Kisslegg)
- 2 an der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 3 im Auftrag des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bei Biotrend Chemikalien GmbH (Köln)
- 4 an der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen im Rahmen der Anfertigung einer Dissertation (LUX, 2009)

Die Restimulierungen erfolgten durch intramuskuläre Injektion der gleichen Immunogenmenge und -zusammensetzung. Die Zeitpunkte der Restimulierungen wurden aufgrund der Ergebnisse der Bestimmung des Antikörpertiterverlaufs individuell festgelegt.

Ab der zweiten Woche nach Grundimmunisierung wurde den Kaninchen Blut aus der *Arteria auricularis rostralis* entnommen. Das Blutserum wurde durch zweimalige Zentrifugation (1.500 x g, 15 min, 4 °C) von den restlichen Blutbestandteilen abgetrennt und in Portionen zu jeweils 3,5 ml bei -18 °C aufbewahrt. Die Antiseren von drei mit bovinem sauren Gliafaserprotein (bGFAP) immunisierten Kaninchen, zwei Schweinen und zwei Schafen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Deren Immunisierung sowie Antiserumgewinnung werden in der Dissertation von LUX (2009) beschrieben.

3.2.1.1.5 Kontrolle des Immunisierungsverlaufs

In regelmäßigen Abständen (zwei bis drei Wochen) wurde der individuelle, spezifische Antikörpertiter mittels eines indirekten Enzymimmuntests bestimmt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden bovinen Markerprotein (bGFAP bzw. bMBP) in einer Konzentration von 1 µg/ml in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Platten wurden ausgeschlagen und freie Proteinbindungsstellen durch dreißigminütige Inkubation bei RT mit 2% Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) abgesättigt. Danach wurden die Platten dreimal mit Waschlösung gewaschen und erneut ausgeschlagen. Von den zu testenden Antiseren wurden geeignete Verdünnungsstufen (Bereich 1: 100 bis 1: 218.700) in PBS angelegt und jeweils 100 µl/Kavität im Doppelansatz einpipettiert. Die Platten wurden eine Stunde bei RT inkubiert, mit Waschlösung dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Nun wurde ein entsprechendes Antikörper-Enzym-Konjugat (anti-Kaninchen-IgG-HRP) in einer Verdünnung von 1: 1.000 (in 1% Casein/PBS-Lösung) zugegeben (100 µl/Kavität) und die Platten erneut 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut gewaschen und Restfeuchtigkeit entfernt. Nach Zugabe von Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität) wurden die Platten typischerweise 10-20 min bis zum Erreichen einer ausreichenden Farbentwicklung inkubiert. Schließlich wurde die

Farbreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (1 mol/l; 100 µl/Kavität) gestoppt und die Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Als relativer Antikörpertiter wurde die Serumverdünnung gewertet, die unter diesen Reaktionsbedingungen einen Extinktionswert von 0,3 Einheiten ergab. Zum Vergleich wurden die jeweiligen Präimmunsereen, sowie Antiseren früherer Immunisierungsstadien mit untersucht. Antiseren der verschiedenen Blutabnahmezeitpunkte, die vergleichbar hohe spezifische Seruntiter aufwiesen, wurden gepoolt, portioniert und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Zur simultanen Überprüfung der relativen Antikörpertiter gegen bovines Protein (Immunogen) und der Kreuzreaktivität mit analogem porcinem Protein in einem Ansatz wurden parallele Titerbestimmungen mit bovinem und porcinem GFAP bzw. MBP als Beschichtungsantigen in jeweils einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Hierzu wurde die Hälfte der Kavitäten mit bovinem, die andere Hälfte mit porcinem Protein beschichtet. Die Untersuchung einer Verdünnungsreihe zu testender Antiseren erfolgte dann parallel in beiden Plattenhälften (Abbildung 3.3).

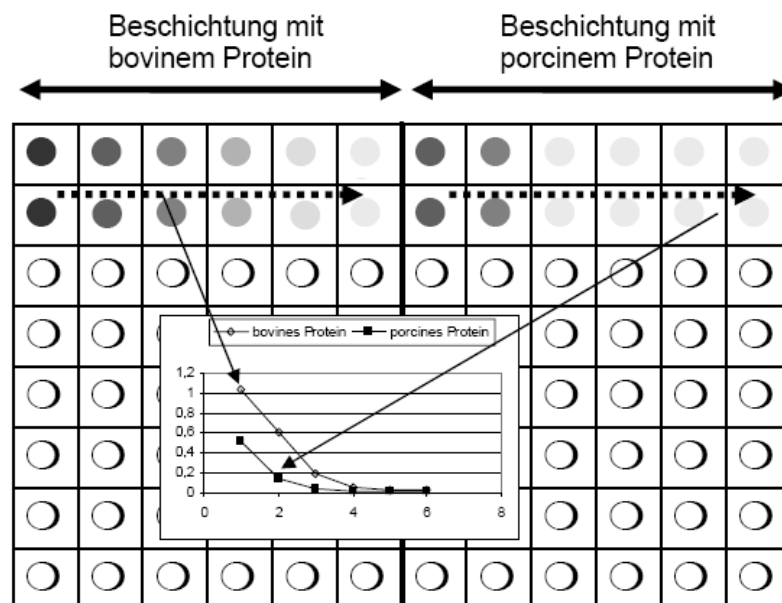


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der parallelen Titration von Antiseren gegen ZNS-Markerprotein (GFAP bzw. MBP) auf bovinem Protein und porcinem Protein zur Feststellung der relativen Reaktivität. In jeder Plattenhälfte wurden jeweils im Doppelansatz Verdünnungsreihen des zu testenden Antiserums angelegt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte über einen Sekundärantikörper (z.B. anti-Kaninchen-IgG-HRP). Nach Messung der Extinktion bei 450 nm kann die Titration graphisch dargestellt werden.

3.2.1.4 Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten

Um möglichst frühzeitig Aufschluss über die Eignung der Antiseren für den Nachweis von bovinem ZNS-Material zu gewinnen, wurde bereits während der laufenden Immunisierungsphase mit der Aufbereitung der Antiseren und der Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten begonnen. Anfangs wurden Antiseren aus einzelnen Blutentnahmen verwendet, für die ein relativ hoher Antikörpertiter nachgewiesen werden konnte. Nach Beendigung der Immunisierungsphase wurden aus den jeweiligen Antiserenpools (siehe 3.2.1.1.5) Antikörper-Enzym-Konjugate hergestellt.

3.2.1.2.1 Aufbereitung der Antiseren

Die ausgewählten Antiseren gegen bMBP, bGFAP, bGFAP-Peptid 1 und bGFAP-Peptid 2 wurden nach der Methode von HEBERT et al. (1973) mit Ammoniumsulfat gefällt und gegen PBS (2 x 5 l) dialysiert. Die Quantifizierung des Proteingehaltes der dadurch erhaltenen IgG-Rohfraktion erfolgte photometrisch durch Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm und Berechnung der Konzentration nach folgender Formel:

$$\text{Proteingehalt der IgG-Rohfraktion (mg/ml)} = \frac{\text{Extinktion (280 nm)} \times 10 \text{ mg/ml}}{13,7}$$

Die gefällten Antiseren wurden in Portionen zu 0,5 ml bei -18 °C aufbewahrt.

3.2.1.2.3 Enzymmarkierung der IgG-Rohfraktion (Kopplung)

Als Markerenzym zur Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten wurde Meerrettichperoxidase (Horse radish peroxidase, HRP) verwendet, die nach dem Verfahren von WILSON und NAKANE (1978) gekoppelt wurde. Bei dieser Methode erfolgt die Kopplung der Antikörper an die Meerrettichperoxidase über Aldehydgruppen, welche durch Perjodatoxidation im Kohlenhydratanteil der Peroxidase erzeugt werden (aktivierte Peroxidase) und anschließend mit Aminogruppen der Antikörper unter Ausbildung von Schiff'schen Basen reagieren. Die Stabilisierung dieser Verbindung wird durch Reduktion

mit Natriumborhydrid erreicht, indem die Schiff'schen Basen in sekundäre Amine überführt werden.

Die Durchführung der Kopplung erfolgt größtenteils nach der Methode von WÖRNER (1990). Zur Aktivierung der Peroxidase wurden 4 mg HRP in 1 ml Aqua bidest. gelöst und mit 0,2 ml frisch angesetzter 0,1 molarer Natrium-meta-perjodatlösung versetzt (Farbumschlag von rotbraun nach grün). Nach zwanzigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz über Nacht bei 4 °C gegen 1 mmol/l Natriumacetatpuffer (2 x 5 l) dialysiert. Ein ml der aufbereiteten Antikörperlösung (in PBS) wurde zur aktivierten Meerrettichperoxidaselösung gegeben. Der pH-Wert des Ansatzes wurde mit 20-30 µl Natriumcarbonatlösung (0,5 mol/l, pH 12) auf 9,5 eingestellt und der Kopplungsansatz zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,1 ml einer frisch angesetzten Natriumborhydridlösung (4 mg/ml) zugegeben und der Ansatz eine weitere Stunde bei 4 °C inkubiert.

3.2.1.2.3 Gelchromatographische Reinigung der Kopplungsprodukte

Zur Abtrennung nicht gekoppelter Bestandteile (ungebundene Peroxidase bzw. nicht gekoppelte Antikörper) aus dem Antikörper-Enzym-Konjugat wurde eine gelchromatographische Reinigung an einer mit Sephacryl S-200 befüllten Glassäule durchgeführt. Die Säulendimension betrug 60 cm x 1,6 cm bei einem Gelbettvolumen von 120 ml. Als Fließmittel wurde PBS eingesetzt. Der Kopplungsansatz wurde auf die Säule aufgetragen und bei einer Flussrate von 6 ml/h eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 2 ml aufgefangen.

Zur Bestimmung der sogenannten Reinheitszahl, die durch das Verhältnis des Peroxidasegehaltes (Extinktion bei 403 nm) zum Gesamtproteingehalt (Extinktion bei 280 nm) charakterisiert ist und bei IgG-HRP-Konjugaten zwischen 0,3 und 0,6 liegen sollte, wurden die einzelnen Fraktionen im Spektrophotometer bei den entsprechenden Wellenlängen gemessen.

$$\text{Reinheitszahl} = \frac{\text{Extinktion (403 nm)}}{\text{Extinktion (280 nm)}}$$

3.2.1.2.4 Überprüfung der Konjugatfraktionen

Diejenigen Konjugatfraktionen, die hohe absolute Proteingehalte (Extinktion bei 280 nm >0,3 Einheiten) und Reinheitszahlen zwischen 0,3 und 0,6 aufwiesen, wurden in einem Sandwich-Enzymimmuntest unter Verwendung des entsprechenden Markerproteins auf ihre Eignung überprüft. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen gefällten Antiserum in einer geeigneten Verdünnung von 1: 4.000 in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/Kavität) und freie Proteinbindungsstellen mit 2% Casein/PBS-Lösung abgesättigt (200 µl/Kavität; 30 min bei RT). Nach einem Waschschrift folgte eine einstündige Inkubation der einen Plattenhälfte mit antigenhaltiger PBS-Lösung in einer Konzentration von 1 µg bGFAP bzw. bMBP/ml, der anderen Plattenhälfte mit antigenfreier PBS-Lösung (100 µl/Kavität). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die jeweiligen Konjugatfraktionen (100 µl/Kavität) im Doppelansatz in vier Verdünnungen (1: 100 bis 1: 4.000 in 1% Casein/PBS-Lösung) auf beide Plattenhälften einpipettiert und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Zugabe der Substratlösung (100 µl/Kavität). Die Enzymreaktion wurde nach 10-20 min durch Schwefelsäure (1 mol/l; 100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm photometrisch bestimmt.

Geeignete Fraktionen, die zu hohen Extinktionswerten für den antigenhaltigen Ansatz und zu möglichst geringen Extinktionswerten für den antigenfreien Ansatz führten, wurden vor der weiteren Verwendung gepoolt und dieser Pool erneut überprüft. Die so hergestellten Antikörper-Enzym-Konjugatlösungen wurden mit Thimerosal versetzt (0,01% Endkonzentration) und portioniert bei -18 °C gelagert. Gebrauchslösungen der Konjugate wurden bis zu 4 Wochen im Kühlschrank bei 4-6 °C aufbewahrt.

3.2.4 Erstellung von Sandwich-Enzymimmuntests (S-EIA) für den Nachweis der ZNS-Markerproteine GFAP sowie MBP

Aus der Kombination der aufbereiteten anti-bMBP-Antiseren (3.2.1.2.1) mit den hergestellten anti-bMBP-Antikörper-Enzym-Konjugaten (3.2.1.2) ergaben sich für das Markerprotein MBP 9 Kombinationsmöglichkeiten (3 Antiseren x 3 Antikörper-Enzym-Konjugate). Für das Markerprotein GFAP ergaben sich rechnerisch 121

Kombinationsmöglichkeiten für den Aufbau eines Sandwich-Enzymimmuntests (11 Antiseren x 11 Antikörper-Enzym-Konjugate). Von Letzteren waren allerdings bereits 49 Kombinationen, nämlich die auf bGFAP-Vollprotein basierenden Möglichkeiten bereits geprüft worden (LUX, 2009). In dieser Arbeit wurden daher die sich aus den bGFAP-Peptid-Antiseren bei Verwendung als Fängerantikörper ergebenden zusätzlichen Kombinationen ($n = 28$) geprüft. Für jede Kombination wurde zunächst die optimale Konzentration der Immunreagenzien im Enzymimmuntest ermittelt. Hierbei wurden jeweils mehrere Antiserumverdünnungen (1: 100 bis 1: 16.000) gegen mehrere Antikörper-Enzym-Konjugatverdünnungen (1: 100 bis 1: 4.000) zusammen mit einer bGFAP- bzw. bMBP-Lösung (Konzentration: 1 $\mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu einer proteinfreien Kontrolllösung getestet (Abbildung 3.4). Hierbei sollten bei ausreichend hohen Extinktionswerten bei Anwesenheit von bovinem Protein möglichst niedrige Extinktionswerte für den entsprechenden proteinfreien Testansatz erzielt werden. Entsprechend der Ergebnisse dieser Screeninguntersuchungen wurden mit geeigneten Kombinationen der bisher beschriebenen Antiseren und Antikörper-Enzym-Konjugate anschließend Sandwich-Enzymimmuntests (S-EIA) im Mikrotiterplattensystem erstellt.

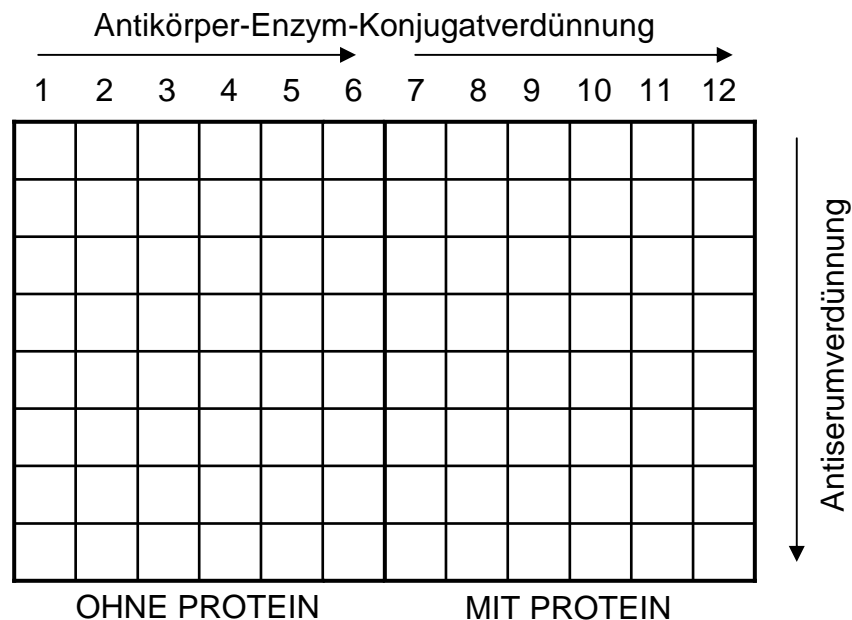


Abbildung 3.4: Plattenbelegung zur Ermittlung der optimalen Immunreagenzkonzentrationen durch doppelte Austitration aufbereiteten Antiserums gegen Antikörper-Enzym-Konjugat ohne (Spalte 1-6) bzw. mit einer konstanten Menge bGFAP bzw. bMBP (Spalte 7-12).

3.2.4.1 Erstellung von Sandwich-Enzymimmuntests für bGFAP unter Verwendung von Antikörpern gegen bGFAP-Peptide als Fängerantikörper

Die anti-bGFAP-Peptid-Antiseren wurden jeweils in einem Sandwich-Enzymimmuntest (Sandwich-Enzymimmunoassay, S-EIA) integriert, in dem diese Antikörper als Fängerantikörper mit enzymmarkierten Antikörpern gegen komplettes bGFAP (LUX, 2009) als Detektionsantikörper kombiniert wurden. Zur Testdurchführung wurden Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen gefällten Antiserum in einer geeigneten Verdünnung (in 0,05 mol/l Bicarbonatpuffer, pH 9,6; Tabelle 3.5) beschichtet (100 µl/Kavität). Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer wurden die Platten ausgeschlagen. Freie Proteinbindungsstellen der Kavitäten wurden mittels 2% Casein/PBS-Lösung (Phosphatpuffer mit NaCl-Zusatz) abgesättigt (200 µl/Kavität; 30 min bei RT). Nach dreimaligem Waschen und Ausschlagen der Platten folgte eine einstündige Inkubation der Proteinstandard- bzw. Extraktlösungen (in 0,5% Triton-X-100/PBS; 100 µl/Kavität). Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Antikörper-Enzym-Konjugat (verdünnt in 1% Casein/PBS; 100 µl/Kavität; Tabelle 3.5) zupipettiert und die Mikrotiterplatten erneut eine Stunde bei RT inkubiert. Nach Waschen der Platten erfolgte die Zugabe von Enzymsubstrat-/Chromogenlösung (100 µl/Kavität). Die Reaktion wurde nach Erreichen einer ausreichenden Farbentwicklung (10-20 min) durch Zugabe von 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm photometrisch bestimmt. Die Erstellung von Standardkurven und die Berechnung des Antigengehalts von Probenextrakten erfolgte unter Verwendung einer kommerziellen Software für Enzymimmuntests (Ridawin Version 1.38, R-Biopharm AG).

Tabelle 3.5: Übersicht der verwendeten Immunreagenzien zur Erstellung von GFAP-Sandwich-Enzymimmuntests unter Verwendung von bGFAP-Peptid-Antikörpern.

anti-bGFAP- bzw. anti-bGFAP-Peptid- Antiserum	Verdünnung als Fängerantikörper in Bicarbonatpuffer	Verdünnung des Antikörper-Enzym- Konjugates als Detektionsantikörper in 1% Casein/PBS
P1	1: 1.000	n.g.
P2	1: 1.000	n.g.
P3	1: 4.000	n.g.
P4	1: 4.000	n.g.
G1	1: 4.000	1: 500
G2	1: 4.000	1: 500
G3	1: 500	1: 500
G4	1: 500	1: 500
G5	1: 1.000	1: 1.000
G6	1: 1.000	1: 500
G7	1: 1.000	1: 500

n.g.: nicht geeignet, da kein spezifisches Messsignal erzielbar

3.2.4.2 Erstellung von Sandwich-Enzymimmuntests für bMBP unter Verwendung polyklonaler Kaninchenantikörper als Fängerantikörper

Die anti-bMBP-Antiseren der Tiere M1, M2 und M3 wurden jeweils in einem S-EIA integriert, in dem die entsprechenden durch Ammoniumsulfatpräzipitation gereinigten IgG-Fractionen als Fängerantikörper zusammen mit einem Antikörper-Enzym-Konjugat (Kaninchen M2, M2-HRP) als Detektionsantikörper verwendet wurden. Zur Testdurchführung wurden Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen gefällten Antiserum in einer Verdünnung von 1: 8.000 (in 0,05 mol/l Bicarbonatpuffer, pH 9,6; Tabelle 3.6) beschichtet (100 µl/Kavität). Nach Inkubation über Nacht bei RT in einer feuchten Kammer wurden die Platten ausgeschlagen. Freie Proteinbindungsstellen der Kavitäten wurden mittels 2% Casein/PBS-Lösung abgesättigt (200 µl/Kavität; 30 min bei RT). Nach dreimaligem Waschen und Ausschlagen der Platten folgte eine einstündige Inkubation der Proteinstandard- bzw. Extraktlösungen (in 0,5% Triton-X-100/PBS; 100 µl/Kavität). Nach

einem weiteren Waschschrift wurde das Antikörper-Enzym-Konjugat M2-HRP in einer Verdünnung von 1: 400 (verdünnt in 1% Casein/PBS; 100 µl/Kavität; Tabelle 3.6) zupipettiert. Nach einer Stunde bei RT wurden die Mikrotiterplatten erneut gewaschen und sowohl Farbreaktion als auch Auswertung erfolgten analog zur Beschreibung 3.2.2.1. Alle Testansätze wurden jeweils im Vierfachansatz pipettiert.

3.2.4.3 Erstellung eines Sandwich-Enzymimmuntests für bMBP unter Verwendung monoklonaler Fängerantikörper

In einem modifizierten MBP-S-EIA wurde ein kommerziell verfügbarer monoklonaler Antikörper (anti-humanes MBP 129-138, BioLogo, M129) als Fängerantikörper mit dem polyklonalen, enzymmarkierten Kaninchenantikörper M2-HRP als Detektionsantikörper kombiniert. Der Aminosäuresequenzabschnitt 129 bis 138 des humanen MBPs entspricht dem des bovinen MBPs und unterscheidet sich in zwei Aminosäuren vom entsprechenden Abschnitt des porcinen Proteins (Abbildung 3.5).

bMBP 129-138:	H	-Arg-Ala- Ser -Asp-Tyr-Lys- Ser -Ala-His-Lys-	OH
pMBP 129-138:	H	-Arg-Ala- Pro -Asp-Tyr-Lys- Pro -Ala-His-Lys-	OH

Abbildung 3.5: Aminosäuresequenz des zur Gewinnung der kommerziellen, monoklonalen Antikörper verwendeten humanen bzw. bovinen MBP 129-138 und Vergleich mit dem entsprechend unterschiedlichen Aminosäuresequenzabschnitt des porcinen Proteins pMBP.

Die Testdurchführung erfolgte analog zur Beschreibung in 3.2.2.2, allerdings in einer Modifikation unter Verwendung von mit anti-Maus-IgG beschichteten Mikrotiterplatten. Hierzu wurden zunächst Mikrotiterplatten mit anti-Maus-IgG in einer Konzentration von 10 µg/ml in 0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6) beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Beschichtete Platten wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4-6 °C gelagert. Zur Testdurchführung wurden die Mikrotiterplatten zunächst mit 2% Casein/PBS abgesättigt (200 µl/Kavität; 30 min bei RT), gewaschen und Restflüssigkeit entfernt. Daraufhin wurde der monoklonale Antikörper M129 in einer Verdünnung von 1: 250 in 1% Casein/PBS zupipettiert (100 µl/Kavität; Tabelle 3.6) und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift

wurde Proteinstandard- bzw. Extraktlösung (100 µl/Kavität) eine Stunde bei RT inkubiert. Die Platten wurden daraufhin gewaschen und Antikörper-Enzym-Konjugat M2-HRP 1: 400 in 1% Casein/PBS verdünnt zugegeben (100 µl/Kavität; Tabelle 3.6). Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurden die Platten erneut gewaschen und die Farbreaktion und die Auswertung entsprechend 3.2.2.1 durchgeführt.

Tabelle 3.6: Übersicht der verwendeten Immunreagenzien zur Erstellung von Sandwich-Enzymimmuntests zum Nachweis von bMBP.

verwendetes Immunogen	Antiserum	Verdünnung als Fängerantikörper in Bicarbonatpuffer	Verdünnung als Detektionsantikörper in 1% Casein/PBS
bMBP	M1	1: 8.000	n.g.
	M2	1: 8.000	1: 400
	M3	1: 8.000	n.g.
hMBP 129-138 (BioLogo)	M129	1: 250	n.u.

n.g.: nicht geeignet; *n.u.*: nicht untersucht; *hMBP*: humanes MBP

3.2.2.4 Orientierende Versuche zur Tierartspezifität der Enzymimmuntests mittels boviner und porciner GFAP- bzw. MBP-Reinproteinstandardkurven

Mit den GFAP-S-EIAs wurden anschließend Reinproteinstandardkurven für bovines und porcines GFAP in einem Konzentrationsbereich von 1,4 ng/ml bis 3.000 ng/ml parallel auf einer Mikrotiterplatte erstellt. Die Durchführung der S-EIAs erfolgte entsprechend der in 3.2.2.1 beschriebenen Methode. Analog wurden in den MBP-S-EIAs Reinproteinstandardkurven für bovines und porcines MBP in einem Konzentrationsbereich von 0,457 ng/ml bis 1.000 ng/ml parallel auf einer Mikrotiterplatte erstellt. Die Durchführung erfolgte entsprechend den in 3.2.2.2 und 3.2.2.3 beschriebenen Methoden. Um eine Beurteilung der Spezifität der S-EIAs für bGFAP bzw. bMBP zu ermöglichen, wurde bei jeweils zwei GFAP- und MBP-Konzentrationsstufen der Spezifitätsunterschied zwischen bovinem und porcinem Protein berechnet, indem der Quotient aus den entsprechenden Messwerten (Extinktion bei 450 nm) gebildet wurde

(Spezifitätskennzahl 1; LUX et al., 2005). Die Berechnung bei zwei verschiedenen Konzentrationen wurde wegen des nicht parallelen Kurvenverlaufes der Reinproteinstandardkurven für bovines und porcines Protein durchgeführt, um eine bessere Beurteilung der Spezifität im Messbereich zu ermöglichen. Die Nachweisgrenze stellt ein Maß für die Sensitivität eines Testsystems dar. Als Nachweisgrenze wurde die geringste bovine Antigenkonzentration definiert, die noch in einem Messwert $\geq 0,1$ Extinktionseinheiten resultierte. Dieser „cut-off“ Wert entsprach dem mindestens dreifachen Messwert (300%) des antigenfreien Kontrollansatzes (0,5% Triton-X-100).

$$\text{Spezifitätskennzahl } 1 = \frac{\text{Messwert für bovines Protein bei Konzentration } C}{\text{Messwert für porcines Protein bei Konzentration } C}$$

3.2.2.5 Probenvorbereitung (Standardextraktionsmethode)

Das Probenmaterial (Gewebe des Zentralen Nervensystems (ZNS), künstlich kontaminierte, rohe und erhitzte Probenmaterialien und Handelsproben) wurde zunächst in einer Moulinette homogenisiert. Die Extraktion von GFAP bzw. MBP erfolgte unter Verwendung einer Modifikation der Arbeitsvorschrift eines kommerziellen Testkits („Ridascreen Risk Material“, R-Biopharm). Hierzu wurden 5 g Probenhomogenisat zu 50 ml 1%iger wässriger SDS-Lösung in einen Plastikbeutel gegeben und in einem Stomacher bei einer Drehzahl von 260 min^{-1} über einen Zeitraum von 3 min homogenisiert. Die Mischung wurde in ein Becherglas überführt und 5 min bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Wasserbad inkubiert. Die erhitzte Mischung wurde in Zentrifugengläser überführt und 10 min zentrifugiert ($3.500 \times g$, $10 \text{ }^\circ\text{C}$). Anschließend wurde mit einer Pasteurpipette die obere Fettschicht abgenommen. Dieser Extrakt wurde entweder direkt im Enzymimmuntest untersucht oder bei $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Untersuchung gelagert.

3.2.2.6 Herstellung von Gehirnstandardextrakten

Zur Standardisierung des Nachweises von nativen Markerproteinen aus ZNS-Material wurden für die Vergleichsuntersuchungen sowie für die Quantifizierung in den Enzymimmuntests Gehirnstandards für Rind und Schwein aus jeweils mehreren Gehirnen

hergestellt. Zur Herstellung eines Rindergehirnstandardextraktes wurden drei Großhirne adulter Rinder mittels einer Moulinette homogenisiert und zu gleichen Anteilen vermischt. Jeweils 5 g dieses Mischhomogenisats wurden entsprechend der in 3.2.2.5 beschriebenen Standardextraktionsmethode mit 50 ml 1% SDS/A.dest. extrahiert. Dieser konzentrierte Extrakt entsprach somit einem Gehalt von 100 mg „Gehirnäquivalent“ pro ml Extrakt. Der Rohextrakt wurde bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. In analoger Weise wurde ein Schweinegehirnstandardextrakt unter Verwendung von sechs Großhirnen hergestellt.

3.2.2.7 Überprüfung der Tierartspezifität durch Einsatz von bovinem und porcinem Gehirnextrakt

Mit den S-EIAs wurden Gehirnextraktstandardkurven für bovines und porcines Gehirn parallel auf einer Mikrotiterplatte erstellt. Zur Herstellung definierter Standardextraktkonzentrationen im Enzymimmuntest wurden aus dem konzentrierten Rinder- und Schweinegehirnstandardrohextrakt (3.2.2.6) durch Verdünnung in 0,5% Triton-X-100/PBS Standardextraktlösungen im jeweils relevanten Konzentrationsbereich hergestellt. Für die in 3.2.2.1 beschriebenen GFAP-S-EIAs wurden Gehirnextraktstandardkurven im Konzentrationsbereich von $0,914\text{ }\mu\text{g}$ Gehirnäquivalent/ml Standardextraktlösung bis $2.000\text{ }\mu\text{g/ml}$ erstellt. Für die in 3.2.2.2 beschriebenen MBP-S-EIAs mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern als Fängerantikörper wurden Gehirnextraktstandardkurven im Konzentrationsbereich von $0,46\text{ }\mu\text{g/ml}$ bis $1.000\text{ }\mu\text{g/ml}$ erstellt. Für den in 3.2.2.3 beschriebenen MBP-S-EIA mit monoklonalen Antikörpern als Fängerantikörper befindet sich der relevante Konzentrationsbereich von $0,046\text{ }\mu\text{g/ml}$ bis $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ (Tabelle 3.7). Analog zur Berechnung der Spezifitätskennzahl 1 unter 3.2.2.4 wurde zur Beurteilung der jeweiligen Spezifität für Rindergehirnstandardextrakt der Quotient der Messwerte (Extinktion bei 450 nm) bei zwei ausgewählten Gehirnextraktkonzentrationen gebildet (*Spezifitätskennzahl 2*; LUX et al., 2005). Als Nachweisgrenze wurde die geringste bovine Antigenkonzentration definiert, die noch in einem Messwert $\geq 0,1$ Extinktionseinheiten resultierte, was mindestens dem dreifachen Messwert des antigenfreien Kontrollansatzes (0,5% Triton-X-100) entsprach.

$$\text{Spezifität skennzahl } 2 = \frac{\text{Messwert für bovinen Gehirnextrakt bei Konzentration } C}{\text{Messwert für porcinen Gehirnextrakt bei Konzentration } C}$$

Tabelle 3.7: Übersicht der verwendeten Standardextraktlösungen in den verschiedenen Sandwich-Enzymimmuntests zur Erstellung der Gehirnextraktstandardkurven.

Fängerantikörper im S-EIA	Methode	Gehirnäquivalent ($\mu\text{g/ml}$)		Verdünnung Rohextrakte
		von	bis	
P1, P2, P3, P4 (polyklonal)	3.2.2.1	0,914	2.000	1: 50
M1, M2, M3 (polyklonal)	3.2.2.2	0,46	1.000	1: 100
M129 (monoklonal)	3.2.2.3	0,046	100	1: 1.000

3.2.2.8 Ermittlung der optimalen Kombinationen der Immunreagenzien

Aus den erstellten S-EIAs wurden jeweils die geeignetsten Kombinationen der Immunreagenzien zur weiteren Arbeit ausgewählt. Zur Bewertung wurden hierbei folgende Kriterien herangezogen:

1. hohe Maximal-Extinktionswerte (>1 Einheit für 450 nm) für bovines Protein
2. hoher Messsignalunterschied zwischen bovinem und porcinem Protein, wobei als Maß die Spezifitätskennzahlen 1 und 2 herangezogen wurden
3. niedriger Messwert für den antigenfreien Kontrollansatz
4. hohe Testsensitivität (niedrige Nachweisgrenze)

Weiterhin war zu berücksichtigen, dass von den ausgewählten Immunreagenzien eine ausreichende Menge gleicher Qualität zur Verfügung stand.

3.2.3 Versuche zur Anwendbarkeit der entwickelten enzymimmunologischen Nachweisverfahren

3.2.3.1 Vergleich der ZNS-Materialien Gehirn und Rückenmark im Enzymimmuntest

Zum Vergleich der Reaktivität der ZNS-Materialien Gehirn und Rückenmark wurden Extraktkurven für bovines und porcines Gehirn sowie für bovines und porcines Rückenmark in ausgewählten S-EIAs (3.2.2.8) parallel in jeweils einer Mikrotiterplatte erstellt. In vier GFAP-Testsysteme wurde hierzu der jeweilige Extrakt in einem Konzentrationsbereich von 0,914 µg/ml bis 2.000 µg/ml eingesetzt. In das MBP-Testsystem mit monoklonalen Antikörpern als Fängerantikörper wurde der jeweilige Extrakt in einem Konzentrationsbereich von 0,046 µg/ml bis 100 µg/ml eingesetzt.

3.2.3.2 Sensitivität und Spezifität der Testsysteme

Die Überprüfung der Testsensitivität und der Testspezifität erfolgte unter Verwendung von Gehirnmaterial verschiedener Spezies sowie unter Verwendung von künstlich mit ZNS-Materialien kontaminierten Fleischwaren. Die Probenvorbereitung erfolgte nach der in 3.2.2.5 beschriebenen Standardextraktionsmethode.

3.2.3.2.1 Künstliche Kontaminierung

Zur künstlichen Kontaminierung mit Rinder- bzw. Schweinegehirn wurde das jeweilige Gehirnstandardhomogenisat (3.2.2.6) verwendet. Für die Herstellung der verschiedenen Konzentrationsstufen wurde im Verhältnis 1: 1 gemischtes Rinder- und Schweinehackfleisch und ZNS-Material abgewogen und mittels Moulinette homogenisiert. Es wurde zunächst jeweils die Kontaminationsstufe mit dem höchsten ZNS-Gehalt hergestellt. Die Herstellung der niedrigeren ZNS-Gehalte erfolgte durch weiteres Mischen dieses Konzentrates mit nicht kontaminiertem Hackfleisch und jeweils anschließendem Homogenisieren. Mit Gehirnmaterial der Spezies Pferd, Pute, Huhn, Kaninchen und Schaf wurde analog verfahren.

Mit Rinder- und Schweinegehirn künstlich kontaminierte, erhitzte Probenmaterialien wurden freundlicherweise vom Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um nach den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse hergestellte Brühwürste in Form von Kesselkonserven (F-Wert: 0,48), Dreiviertelkonserven (F-Wert: 0,84) und Vollkonserven (F-Wert: 5,4).

Die Extraktion erfolgte gemäß der Standardextraktion (3.2.2.5). Sowohl Homogenisate als auch Extrakte wurden bei -18 °C gelagert.

Tabelle 3.8 gibt eine Übersicht über die hergestellten künstlich mit Gehirn kontaminierten Probenmaterialien.

3.2.3.2.2 Untersuchung der künstlich kontaminierten, rohen Probenmaterialien

Zur Überprüfung der Testsensitivität, der Testspezifität und der Quantifizierbarkeit der Gehirngehalte wurden die Extrakte der künstlich mit Rinder- und Schweinegehirn kontaminierten Fleischwaren in ausgewählten Enzymimmuntests untersucht.

In die ausgewählten GFAP-EIAs wurden die Extrakte der mit 8%, 4%, 2%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,25%, 0,2%, 0,1% und 0% Rinder- und Schweinegehirn kontaminierten Fleischwaren (Tabelle 3.8) 1: 50 verdünnt in 0,5% Triton-X-100/PBS eingesetzt, wobei die Konzentrationstufe 0% als ZNS-Negativkontrollansatz diente. Zur Quantifizierung wurde in jeder Untersuchung eine Rindergehirnstandardextraktkurve definierter Konzentration mitgeführt. Hierzu wurde der in 0,5% Triton-X-100/PBS verdünnte Extrakt in den Konzentrationen 1.000 µg/ml, 200 µg/ml, 40 µg/ml und 8 µg/ml eingesetzt. Es wurde weiterhin der Verdünnungspuffer 0,5% Triton-X-100/PBS zur Ermittlung des Leerwertes verwendet.

In den MBP-EIA mit monoklonalen Fängerantikörpern wurden die Extrakte der künstlich kontaminierten Fleischwaren der unterschiedlichen Konzentrationsstufen 1: 100 verdünnt in 0,5% Triton-X-100/PBS eingesetzt. Die Rindergehirnstandardextraktkurve wurde aus den Konzentrationen 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml und 0,8 µg/ml erstellt. Zur Ermittlung des Leerwertes wurde 0,5% Triton-X-100/PBS eingesetzt.

Als qualitativ positiv wurden Proben gewertet, die zu einem Messsignal gleich oder größer einem „cut-off“ Wert von 0,1 Extinktionseinheiten führten. Dies entsprach im GFAP-EIA mindestens dem zweifachen Messwert des ZNS-Negativkontrollansatzes, im MBP-EIA mindestens dem dreifachen Messwert des ZNS-Negativkontrollansatzes. Jedes Probenmaterial jeder Konzentrationsstufe wurde mindestens zweimal hergestellt. Hiervon wurden jeweils drei unabhängige Extraktionen durchgeführt und im Enzymimmuntest untersucht. Die Messwerte der Probenextrakte verschiedener Ansätze wurden sowohl qualitativ (positiv oder negativ) beurteilt als auch anhand der Rindergehirnstandardextraktkurve quantifiziert (Rindergehirnäquivalente). Dadurch konnte für alle positiven Proben ein quantitativer Messwert (µg Rindergehirnäquivalent/ml), entsprechend einer relativen Wiederfindungsrate des darin enthaltenen Gehirnmaterials,

ermittelt werden. Die Nachweisgrenze stellt ein Maß für die Sensitivität eines Testsystems dar. Als Nachweisgrenze der jeweiligen Testsysteme wurde die niedrigste Konzentrationsstufe gewertet, die einen noch positiven Nachweis (Messsignal $\geq 0,1$ Extinktionseinheiten) von mit Rindergehirn künstlich kontaminierten Fleischwaren erbrachte. Zur Beurteilung der jeweiligen Spezifität der ausgewählten untersuchten Testsysteme für bovines Rindergehirnmaterial wurde der Quotient der entsprechenden Messwerte (Extinktion bei 450 nm) bei zwei ausgewählten Konzentrationsstufen gebildet (*Spezifitätskennzahl 3*), analog der Spezifitätskennzahlen 1 und 2.

$$\text{Spezifitätskennzahl 3} = \frac{\text{Messwert für mit Rindergehirn kontaminierte Probe der Konzentrationsstufe C}}{\text{Messwert für mit Schweinegehirn kontaminierte Probe der Konzentrationsstufe C}}$$

3.2.3.2.3 Untersuchung der künstlich kontaminierten, erhitzten Probenmaterialien

Zusätzlich zur Überprüfung der Testsensitivität, der Testspezifität und der Quantifizierbarkeit der Gehirnzusätze konnte durch die Untersuchung von künstlich mit Gehirn kontaminierten Konserven in ausgewählten Enzymimmuntests ein möglicher Einfluss einer Hitzebehandlung von Fleischwaren auf die Nachweisbarkeit der Markerproteine untersucht werden. Die Untersuchung der künstlich mit Rinder- bzw. Schweinegehirn kontaminierten Kessel-, Dreiviertel- und Vollkonserven (Tabelle 3.8) erfolgte entsprechend der Untersuchung der künstlich kontaminierten rohen Fleischwaren (3.2.3.2.2). In den ausgewählten GFAP-EIAs wurde zusätzlich zu den Extrakten der mit 8%, 2%, 1%, 0,1% und 0% Rinder- bzw. Schweinegehirn kontaminierten Konserven und der Rindergehirnstandardextraktkurve eine mit 2% Rindergehirn künstlich kontaminierte rohe Probe als ZNS-Positivkontrollansatz mitgeführt. In den MBP-EIA mit monoklonalen Fängerantikörpern wurde als ZNS-Positivkontrollansatz eine mit 1% Rindergehirn künstlich kontaminierte rohe Probe eingesetzt. Die Auswertung erfolgte wie in 3.2.3.2.2 beschrieben, wobei jede Probe jeder Konzentrationsstufe nur einmal hergestellt wurde, aber entsprechend der rohen Proben mindestens dreimal extrahiert und im Enzymimmuntest untersucht wurde.

3.2.3.2.4 Überprüfung der Kreuzreaktivität der Testsysteme mit den Wiederkäuern Schaf und Ziege

Zur Überprüfung der Testsysteme hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivität mit weiteren Wiederkäuern wurde Gehirnextraktlösung der Spezies Schaf und Ziege untersucht. In die ausgewählten GFAP-EIAs wurde Schaf- und Ziegengehirnextrakt in den Konzentrationen 1.000 µg/ml, 200 µg/ml und 40 µg/ml eingesetzt. Außerdem wurde in jedem Ansatz eine Rindergehirnstandardextraktkurve in den Konzentrationen 1.000 µg/ml, 200 µg/ml, 40 µg/ml und 8 µg/ml, ein 1: 50 verdünnter ZNS-Negativkontrollansatz sowie ein 1: 50 verdünnter ZNS-Positivkontrollansatz in Form einer mit 2% Rindergehirn künstlich kontaminierten rohen Probe mitgeführt. In den MBP-EIA mit monoklonalen Fängerantikörpern wurde Schaf- und Ziegengehirnextrakt in den Konzentrationen 100 µg/ml, 10 µg/ml und 1 µg/ml eingesetzt. Auch hierbei wurde in jedem Ansatz eine Rindergehirnstandardextraktkurve in den Konzentrationen 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml und 0,8 µg/ml, ein 1: 100 verdünnter ZNS-Negativkontrollansatz sowie eine mit 1% Rindergehirn künstlich kontaminierte rohe Probe 1: 100 verdünnt als ZNS-Positivkontrollansatz mitgeführt. Alle Verdünnungen wurden in 0,5% Triton-X-100/PBS angelegt. Die Messwerte der Probenextrakte wurden anhand der Rindergehirnstandardextraktkurve quantifiziert. Dadurch konnte für alle auswertbaren Proben (Messsignal $\geq 0,1$ Einheiten) ein quantitativer Messwert (µg Rindergehirnäquivalent/ml) ermittelt werden. Der Quotient aus dem ermittelten quantitativen Messwert und der tatsächlichen Konzentration des Schaf- bzw. Ziegengehirnextraktes (tatsächlicher quantitativer Wert; µg Schaf- bzw. Ziegengehirnäquivalent/ml) entspricht mit 100 multipliziert der Kreuzreaktivität (%) des entsprechenden enthaltenen Gehirnmaterials im jeweiligen Testsystem mit Rindergehirnmaterial. Bei Kreuzreaktionen über 100 % wird das ZNS-Material der entsprechenden Spezies im Testsystem besser, bei unter 100 % schlechter erkannt als ZNS-Material des Rindes.

$$\text{Kreuzreaktivität (\%)} = \frac{\text{ermittelter quantitativer Messwert (}\mu\text{g Rindergehirnäquivalent/ml)} \times 100}{\text{tatsächlicher quantitativer Wert (}\mu\text{g Ziegen - bzw. Schafgehirnäquivalent/ml)}}$$

Durch Quantifizierung des ZNS-Positivkontrollansatzes an der Rindergehirnstandardextraktkurve konnte für jeden Ansatz eine Wiederfindungsrate (3.2.3.2.2) ermittelt werden.

3.2.3.2.5 Überprüfung der Kreuzreaktivität der Testsysteme mit den Spezies Pferd, Pute, Huhn und Kaninchen

Zur Überprüfung der Testsysteme hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivität mit ZNS-Material weiterer Tierarten wurden in den Enzymimmuntests mit Gehirnmaterialien der Spezies Pferd, Pute, Huhn und Kaninchen künstlich kontaminierte Proben untersucht (Tabelle 3.8). In die ausgewählten GFAP-EIAs wurden die Extrakte der mit 8%, 2%, 1%, 0,5% und 0% Pferde-, Puten-, Hühner-, Kaninchen- und Rindergehirn künstlich kontaminierten (rohen) Proben 1: 50 in 0,5% Triton-X-100/PBS verdünnt eingesetzt; im MBP-EIA mit monoklonalen Fängerantikörpern wurden die entsprechenden Extrakte 1: 100 verdünnt eingesetzt. Zusätzlich wurde in jedem Ansatz eine Rindergehirnstandardextraktkurve in den Konzentrationen 1.000 µg/ml, 200 µg/ml, 40 µg/ml und 8 µg/ml (GFAP-EIA) bzw. in den Konzentrationen 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml und 0,8 µg/ml (MBP-EIA) mitgeführt, mit der die Messwerte der Probenextrakte quantifiziert werden konnten. Die weitere Auswertung der Kreuzreaktivität wurde analog der für die Kreuzreaktivität mit Schaf- und Ziegen-ZNS-Material (3.2.3.2.4) beschriebenen Methode durchgeführt.

3.2.3.2.6 Überprüfung der Gewebespezifität der Testsysteme

Zur Überprüfung der Gewebespezifität wurden Extrakte der Lendenmuskulatur von Rind und Schwein sowie zahlreicher Rinderorgane in ausgewählten Testsystemen untersucht. Die Extrakte der Rinderorgane Herz, Leber, Lunge, Niere, Euter, Pansen und Zunge sowie der Muskulatur von Rind und Schwein wurden 1: 50, 1: 150 und 1: 450 verdünnt in den GFAP-EIAs und 1: 100, 1: 300 und 1: 900 verdünnt in den MBP-EIA eingesetzt. In jedem GFAP-EIA wurde außerdem eine Rindergehirnstandardextraktkurve in den Konzentrationen 1.000 µg/ml, 200 µg/ml, 40 µg/ml und 8 µg/ml, eine mit 2% Rindergehirn künstlich kontaminierte Probe 1: 50 verdünnt als ZNS-Positivkontrollansatz und ein 1: 50 verdünnter ZNS-Negativkontrollansatz (0% Gehirn, reines Hackfleisch) mitgeführt. In jedem Ansatz des MBP-EIAs mit monoklonalen Fängerantikörpern wurde eine Rindergehirnstandardextraktkurve in den Konzentrationen 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml und 0,8 µg/ml, eine 1: 100 verdünnte mit 1% Rindergehirn künstlich kontaminierte Probe als ZNS-Positivkontrollansatz und ein 1: 100 verdünnter ZNS-

Negativkontrollansatz mitgeführt. Alle Verdünnungen wurden in 0,5% Triton-X-100/PBS angelegt. Die Messwerte der Probenextrakte verschiedener Ansätze wurden sowohl qualitativ (positiv oder negativ) beurteilt als auch anhand der Rindergehirnstandardextraktkurve quantifiziert. Als qualitativ positiv wurden Proben gewertet, die zu einem Messsignal gleich oder größer einem „cut-off“ Wert von 0,1 Extinktionseinheiten führten. Durch Quantifizierung des ZNS-Positivkontrollansatzes an der Rindergehirnstandardextraktkurve konnte für jeden Ansatz eine Wiederfindungsrate (3.2.3.2.2) ermittelt werden.

3.2.3.3 Untersuchung von Handelsproben in den Testsystemen

Zur Überprüfung des Einflusses gebräuchlicher Zutaten bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen, wurden unterschiedliche Lebensmittelproben (Roh-, Brüh- und Kochwürste; Fleisch verschiedener Tierarten) bei Lebensmittelhändlern in Gießen und Umgebung gekauft und in den Enzymimmuntests untersucht. Außerdem wurden zur weiteren Überprüfung der Anwendbarkeit Gelatineprodukte und Hautpflegeprodukte stichprobenweise eingesetzt. Die Probenextrakte wurden hierbei für den GFAP-EIA 1: 50, 1: 150 und 1: 450, für den MBP-EIA 1: 100, 1: 300 und 1: 900 in 0,5% Triton-X-100/PBS verdünnt. Als ZNS-Positivkontrollansatz diente im MBP-EIA eine mit 1%, im GFAP-EIA eine mit 2% Rindergehirn künstlich kontaminierte Probe. Eine Rindergehirnstandardextraktkurve in den Konzentrationen 1.000 µg/ml, 200 µg/ml, 40 µg/ml und 8 µg/ml (GFAP) bzw. in den Konzentrationen 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml, 0,8 µg/ml (MBP) sowie eine ZNS-Negativkontrolle wurden in jedem Ansatz mitgeführt. Die Messwerte der Probenextrakte verschiedener Ansätze wurden sowohl qualitativ (positiv oder negativ) beurteilt als auch anhand der Rindergehirnstandardextraktkurve quantifiziert. Als qualitativ positiv wurden Proben gewertet, die zu einem Messsignal gleich oder größer einem „cut-off“ Wert von 0,1 Extinktionseinheiten führten. Durch Quantifizierung des ZNS-Positivkontrollansatzes an der Rindergehirnstandardextraktkurve konnte für jeden Ansatz eine Wiederfindungsrate (3.2.3.2.2) ermittelt werden, über die der für entsprechende positive Realproben zu erwartende Gehirngehalt berechnet werden konnte.

3.2.4 **Ermittlung standardisierter Extraktionsverfahren**

3.2.4.1 Einfluss verschiedener Extraktionsmittel

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Extraktionsmittel auf die Messergebnisse der entwickelten Enzymimmuntests wurde die Eignung von A.dest., PBS, TBS, 1% SDS/A.dest., 0,1% SDS/A.dest., 1% SDS/PBS, 0,1% SDS/PBS, 1% Tween/A.dest., 0,1% Tween/A.dest., 1% Tween/PBS, 0,1% Tween/PBS zur Extraktion von GFAP und MBP überprüft.

5 g Rindergehirnstandardhomogenisat wurden mit 50 ml der unterschiedlichen Extraktionsmittel in einen Plastikbeutel gegeben und in einem Stomacher homogenisiert (3 min, Drehzahl: 260 ^{-1}). Die Mischung wurde in ein Becherglas überführt und 5 min bei $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Mischung in Zentrifugengläser überführt, 10 min zentrifugiert ($3.500 \times g$, $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$) und anschließend die obere Fettschicht mit einer Pasteurpipette abgenommen. Dieser Extrakt wurde entweder direkt untersucht oder bei $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Untersuchung gelagert. Der Extrakt wurde 1: 50 verdünnt in 0,5% Triton-X-100/PBS im GFAP-EIA und 1: 1.000 verdünnt im MBP-EIA eingesetzt. Die Messwerte (Extinktion bei 450 nm) der verschiedenen Extraktionsmittel wurden zur Bewertung verglichen.

3.2.4.2 Reproduzierbarkeit der Standardextraktionsmethode

Um Aussagen über die Reproduzierbarkeit der gewählten Standardextraktionsmethode treffen zu können, wurde Rinder- und Schweinehirnstandardhomogenisat mehrfach extrahiert und im Enzymimmuntest analysiert. Die Extraktionen (3.2.2.5) wurden an zwei verschiedenen Tagen insgesamt fünf Mal durchgeführt. Die Extrakte wurden 1: 50 verdünnt in 0,5% Triton-X-100 im GFAP-EIA und 1: 1.000 verdünnt im MBP-EIA untersucht. Zur Auswertung wurden die Messwerte (Extinktion bei 450 nm) der einzelnen Extrakte verglichen.

3.2.5 Überprüfung der Haltbarkeit der Reagenzien

Zur Überprüfung der Haltbarkeit der Reagenzien wurde für jedes Markerprotein ein Testsystem über fünf Wochen in regelmäßigen Abständen mit denselben Reagenzien wiederholt. Am Tag 0 wurden für den GFAP-EIA und den MBP-EIA mit monoklonalen Fängerantikörpern je sechs Mikrotiterplatten beschichtet. Am Tag 2, 7, 14, 21, 28 und 35 wurden in den Testsystemen Rinder- und Schweinehirnstandardextrakte wie in 3.2.2.7 beschrieben untersucht. Die verwendeten Extrakte, monoklonale Fängerantikörper M129, Antikörper-Enzym-Konjugate, Substrat und Verdünnungspuffer 0,5% Triton-X-100/PBS waren bei jeder Durchführung dieselben. Bei der Auswertung wurde der Erhalt der Sensitivität und der Spezifität der untersuchten Testsysteme bewertet.

3.2.6 Ermittlung des Gehaltes an GFAP bzw. MBP im Rindergehirn

In die ausgewählten GFAP-S-EIAs (3.2.2.8) wurde Rindergehirnextrakt in einem Konzentrationsbereich von 0,914 µg Gehirnäquivalent/ml Extraktlösung bis 2.000 µg/ml sowie bGFAP-Reinprotein in einem Konzentrationsbereich von 1,4 ng/ml bis 3.000 ng/ml parallel in einer Mikrotiterplatte eingesetzt (3.2.2.1). In den ausgewählten MBP-S-EIA wurde analog Rindergehirnextrakt in einem Konzentrationsbereich von 0,046 µg/ml bis 100 µg/ml sowie bMBP-Reinprotein in einem Konzentrationsbereich von 0,457 ng/ml bis 1.000 ng/ml eingesetzt (3.2.2.3). Die Verdünnungen wurden in 0,5% Triton-X-100/PBS durchgeführt. Die Erstellung von Reinproteinstandardkurven und die Berechnung des Antigengehaltes der als Proben definierten Gehirnextraktlösungen erfolgte unter Verwendung einer kommerziellen Software für Enzymimmuntests (Ridawin Version 1.38, R-Biopharm AG). Über den Gehalt an Gehirnäquivalent in der jeweiligen Extraktlösung kann der bGFAP- bzw. bMBP-Gehalt des eingesetzten Gehirnhomogenisats berechnet werden. Aus den Ergebnissen dieser Berechnung wurde für der Extrakt das arithmetische Mittel berechnet. Bei der Berechnung wurden nur diejenigen Verdünnungsstufen der Extraktlösung berücksichtigt, die einen Messwert (Extinktion bei 450 nm) $\geq 0,1$ Einheiten erbrachten.

$$\text{Proteingehalt im Gehirn (mg/g)} = \frac{\text{berechneter Proteingehalt der Gehirnextraktlösung (ng/ml)}}{\text{in Gehirnextraktlösung enthaltene s Gehirnäquivalent (µg/ml)}}$$

3.2.7 Versuche zur Verkürzung der Testdauer des MBP-Enzymimmuntests (monoklonale Fängerantikörper)

Da der MBP-S-EIA eine Stunde zusätzliche Inkubationszeit der monoklonalen Antikörper in Anspruch nimmt, wurde versucht die Testdauer zu reduzieren. Hierzu wurden zwei Ansätze verfolgt:

1. Verkürzung der Inkubationszeiten
2. gemeinsame Inkubation der monoklonalen Antikörper und des Gehirnextraktes

Zur Reduzierung der Testdauer über die Inkubationszeiten wurde der MBP-S-EIA mit monoklonalen Antikörpern als Fängerantikörper analog der Beschreibung 3.2.2.3 bzw. 3.2.3.3 durchgeführt. Hierbei wurde jedoch als Modifikation die Inkubationszeit der Extrakte von einer Stunde auf 30 min reduziert, was eine Anhebung des Konzentrationsbereiches der Rindergehirnstandardextraktkurve auf 1 µg/ml bis 1.000 µg/ml nötig werden ließ. Die Inkubationszeit des Antikörper-Enzym-Konjugates M2-HRP wurde bei unveränderter Konzentration ebenfalls von einer Stunde auf 30 min reduziert.

Zur Reduzierung der Testdauer über eine gemeinsame Inkubation von Fängerantikörper und Antigen wurden Mikrotiterplatten mit anti-Maus-IgG in einer Konzentration von 10 µg/ml in 0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6) beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Testdurchführung wurden die Mikrotiterplatten mit 2% Casein/PBS abgesättigt (200 µl/Kavität, 30 min bei RT), gewaschen und Restflüssigkeit entfernt. Der monoklonale Antikörper M129 wurde zunächst in einer Verdünnung von 1: 125 in 1% Casein/PBS zupipettiert (50 µl/Kavität) und anschließend wurde gemäß 3.2.3.3 Extraktlösung (in 0,5% Triton-X-100 verdünnt; 50 µl/Kavität) zupipettiert, wobei die Rindergehirnstandardextraktkurve im Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 1.000 µg/ml gewählt wurde. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurden die Platten daraufhin gewaschen und Antikörper-Enzym-Konjugat M2-HRP 1: 400 in 1% Casein/PBS verdünnt zugegeben (100 µl/Kavität). Nach einer Inkubation von einer Stunde wurden die Platten erneut gewaschen und die Farbreaktion und die Auswertung wie in 3.2.2.1. durchgeführt. Desweiteren wurde Sensitivität und Wiederfindungsrate der modifizierten Testsysteme beurteilt (3.2.3.3).

3.2.8 Versuche zu einem indirekten MBP-Enzymimmuntest (HOLTBECKER, 2004)

Orientierend wurde der Testaufbau eines indirekten Enzymimmuntests unter alleiniger Verwendung des monoklonalen Antikörpers M129 zur Untersuchung von MBP-Reinproteinlösung sowie von Gehirnmateriale und künstlich kontaminiertem Hackfleisch unter Verwendung des von HOLTBECKER (2004) beschriebenen Systems geprüft.

Die untersuchten Gehirnstandards und künstlich mit Gehirn kontaminierten Proben wurden sowohl nach der Standardextraktionsmethode (3.2.2.5) als auch nach der von HOLTBECKER (2004) beschriebenen Salzsäureextraktion extrahiert. Hierbei wurde jeweils 1 g der Probenhomogenisate in 10 ml 0,1 molare Salzsäure gegeben und im Stomacher 3 min bei einer Drehzahl von 260^{-1} homogenisiert. Anschließend wurden die Extrakte mit Hilfe von Papierfaltnfiltern aufgereinigt. Die Extrakte wurden direkt im Enzymimmuntest untersucht. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden Antigen in Bicarbonatpuffer beschichtet (Tabelle 3.9). Nach Inkubation über Nacht bei RT in einer feuchten Kammer wurden freie Proteinbindungsstellen der Kavitäten mittels 2% Casein/PBS-Lösung abgesättigt (200 µl/Kavität; 30 min bei RT). Nach dreimaligem Waschen und Ausschlagen der Platten folgte eine einstündige Inkubation mit monoklonalen Antikörpern M129 1: 250 verdünnt in 1% Casein/PBS-Lösung (100 µl/Kavität). Nach einem weiteren Waschschrift wurde anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat 1: 450 verdünnt in 1% Casein/PBS-Lösung zugegeben (100 µl/Kavität) und erneut eine Stunde bei RT inkubiert. Nach Waschen der Platten erfolgte die Zugabe von Enzymsubstrat-/Chromogenlösung (100 µl/Kavität). Die Reaktion wurde nach Erreichen einer ausreichenden Farbentwicklung (10-20 min) durch Zugabe von 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm photometrisch bestimmt. Die Erstellung von Standardkurven und die Berechnung des Antigengehaltes von Probenextrakten erfolgte unter Verwendung einer kommerziellen Software für Enzymimmuntests. Im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse wurden Spezifitätskennzahl, Wiederfindungsrate und Nachweisgrenze des Testsystems bestimmt (3.2.3.2.2).

Tabelle 3.9: Übersicht der im indirekten Enzymimmuntest zur Beschichtung der Mikrotiterplatten verwendeten Antigene und ihrer Verdünnungen bzw. Konzentrationen.

zur Beschichtung verwendetes Antigen	Konzentrationen und Verdünnungen (in 0,05 mol/l Bicarbonatpuffer)
bovines und porcines MBP-Reinprotein	0,457 ng/ml – 1.000 ng/ml
boviner und porciner Gehirnstandard- extrakt	46 ng/ml – 100.000 ng/ml
künstlich mit 8%, 4%, 2%, 1%, 0,5% und 0% Rinder- bzw. Schweinegehirn kontaminierte Proben	1: 100

3.2.9 Charakterisierung der Antikörperspezifität mittels Immunoblot

Zur Charakterisierung der im GFAP- und MBP-EIA verwendeten Antikörper erfolgte der Nachweis der entsprechenden Markerproteine nach Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Blotting mit Hilfe der Immundetektion. Die Markerproteine wurden in Form von bovinen und porcinen Reinproteinen und Gehirnextrakten eingesetzt.

3.2.9.1 Probenvorbereitung

Zunächst wurden aus dem bovinen und porcinen Gehirnstandardhomogenisat die ZNS-Markerproteine GFAP und MBP mit der Standardextraktionsmethode (3.2.2.5) extrahiert. Zur Herstellung des Probenpuffers wurde Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Sample Buffer mit Sample Reducing Agent (Invitrogen GmbH) und A.dest. im Verhältnis 5: 2: 3 gemischt. Sowohl Bovine Serumalbumin(BSA)lösung als auch bovine und porcine GFAP- bzw. MBP-Reinproteinlösung in einer Konzentration von 500 µg/ml wurden im Verhältnis 1: 2 mit Probenpuffer gemischt (Vortexer). Die bovinen und porcinen Gehirnextrakte wurden zunächst 1: 10 in A.dest. verdünnt und anschließend im Verhältnis 1: 2 mit Probenpuffer gemischt. Die Proben wurden fünf Minuten im Wasserbad bei 70 °C inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.9.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Blotting

Die elektrophoretische Proteinauftrennung erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer nach dem Prinzip der SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Zur Auftrennung der Reinprotein- und Gehirnextraktlösungen wurden NuPAGE™ 4-12%ige Bis-Tris-Gradientengele (pH 6,4; Invitrogen GmbH) mit je zehn Geltaschen und einer Geldicke von 1 mm verwendet. Es wurden in der Regel zwei Gele in die Elektrophoresekammer eingebaut. Anschließend wurde die Kammer mit dem 1: 20 in A.dest. verdünnten „Laufpuffer“ 2-(N-Morpholino-)Ethansulfonsäure(MES)-SDS-Running Buffer (pH 7,3) versetzt mit Antioxidant (Invitrogen GmbH) aufgefüllt bis die Geltaschen vollständig überschichtet waren. Nach Entfernung des Gelkammes wurden die aufzutrennenden Proben mit der Pipette kurz durchmischt und je 10 µl in die Geltaschen einpipettiert. Zur Interpretation der Ergebnisse wurde in eine Tasche jedes Gels 5 µl einer Proteinmarkerlösung aufgetragen, die zwölf Banden definierten Molekulargewichts (2-200kDa) ergab. Die Elektrophorese wurde nach Anschluss an das Netzgerät für 30 bis 35 min bei einer konstanten Spannung von 200 V und bei einer Stromstärke von 0,25 A durchgeführt. Am Ende des Laufes sollte die blau gefärbte Laufmittelfront am unteren Ende des Geles zu erkennen sein.

Anschließend wurden die getrennten Proteinbanden nach dem Prinzip des Westernblottings auf die Oberfläche einer Nitrocellulosemembran transferiert (TOWBIN et al., 1979). Hierzu wurden die Membranen und die Gele im Sandwichverfahren zwischen zwei horizontal angeordnete Elektroden gelegt. Der Blot-Sandwich bestand aus zwei Schwammunterlagen, einem Filterpapier, einer Nitrocellulosemembran, einem Polyacrylamidgel, einem zweiten Filterpapier, einer Schwammunterlage, einem weiteren Filterpapier, einer zweiten Membran, einem zweiten Polyacrylamidgel, einem vierten Filterpapier, und abschließend zwei Schwammunterlagen. Nach Schließen der Blotkammer wurde sie mit NuPAGE™ Transfer Buffer 1: 20 verdünnt in A.dest. mit Methanolzusatz aufgefüllt. Die äußere Kammer wurde zur Kühlung während des Blottings mit A.dest. aufgefüllt. Das Blotting wurde nach Anschluß an das Netzgerät für eine Stunde bei einer Spannung von 30 V und bei einer konstanten Stromstärke von 0,34 A durchgeführt. Danach wurden die Membranen aus dem Sandwich-Blot entfernt und für 5-10 min in der Färbelösung Ponceau Rot inkubiert. Zur Entfärbung des Membranhintergrundes wurden

die Membranen für weitere 5 min in 5%iger Essigsäure inkubiert. Die angefärbten, aufgetrennten Proteinbanden wurden visuell ausgewertet und das entsprechende Molekulargewicht mit Hilfe des Proteinmarkers abgeschätzt.

3.2.9.3 Immundetektion

Zunächst wurden die Bandenkonturen mit Bleistift markiert, um eine spätere Identifizierung zu erleichtern. Die Nitrocellulosemembranen wurden entsprechend der eingesetzten Proben bei der Überprüfung mit Reinproteinen gedrittelt bzw. bei der Überprüfung mit Gehirnextrakten halbiert. Mit den jeweiligen Membrananteilen wurde weiterhin getrennt verfahren. Durch eine zehnminütigen Inkubation der Membranen in A.dest. wurden die Banden zunächst entfärbt. Die unbesetzten Bindungsstellen der Nitrocellulosemembranen wurden in einer Petrischale unter Schwenken für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit 1% Casein/Tris Buffered Saline (TBS) abgesättigt. Zur Charakterisierung der im EIA verwendeten Fängerantikörper wurden die Membranen nach Abspülen mit A.dest. eine Stunde bei RT unter Schwenken in einer Petrischale in dem zu überprüfenden Antiserum inkubiert, das typischerweise 1: 500 in TBS verdünnt wurde (Tabelle 3.10). Anschließend wurden die Membranen mit A.dest. abgespült und zweimal 20 min unter Schwenken in Waschlösung gewaschen. Daraufhin wurden sie eine Stunde bei RT unter Schwenken in einer Petrischale mit entsprechenden sekundären, enzymmarkierten Antikörpern anti-Kaninchen/Schwein/Schaf/Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat 1: 1.000 verdünnt in 1% Casein/TBS (Tabelle 3.10) inkubiert. Nach Wiederholung des Waschvorgangs erfolgte die Anfärbung der GFAP- bzw. MBP-Banden durch Überschichten der Membranen mit Tetramethylbenzidine(TMB)lösung für Membranen (Sigma Aldrich GmbH) unter Sichtkontrolle bis die Banden blau angefärbt sichtbar wurden (5-10 min). Das Abstoppen der Farbentwicklung erfolgte durch Abspülen des Substrates mit A.dest..

Zur Charakterisierung der im EIA verwendeten Detektionsantikörper wurden die Membranen nach der Absättigung eine Stunde bei RT unter Schwenken in einer Petrischale in der zu überprüfenden Antikörper-Enzym-Konjugatlösung inkubiert, die typischerweise 1: 500 in 1% Casein/TBS verdünnt wurde (Tabelle 3.10). Nach einem sich

anschließenden Waschvorgang erfolgte die Anfärbung der Banden entsprechend der für Antikörperlösungen beschriebenen Methode. Die Auswertung der Banden erfolgte visuell anhand der getrockneten Membran.

Bei der Charakterisierung der im GFAP- bzw. MBP-EIA verwendeten Antikörper wurde zunächst beurteilt, ob die Bande des entsprechenden bovinen Markerproteins angefärbt wurde. Den Banden wurden anhand der Farbintensität und der Größe qualitativ fünf Intensitätsabstufungen zugeordnet: keine sichtbare Bande (-), schwach ((+)), gut sichtbar (+), stark (++) und sehr stark (+++). Weiterhin wurde berücksichtigt, ob durch die untersuchten Antikörper weitere Banden angefärbt wurden. Außerdem wurde die Reaktion der Antikörper mit bovinem und porcinem Markerprotein verglichen. War einzig die Bande des bovinen Markerproteins angefärbt, wurde der untersuchte Antikörper als rinderspezifisch (+) eingestuft. War die Färbung der bovinen Bande intensiver als die Färbung der porcinen Bande, wurde der untersuchte Antikörper als bedingt spezifisch ((+)) eingestuft. War die Färbung der porcinen Bande intensiver oder entsprechend der Färbung der bovinen Bande, wurde der untersuchte Antikörper als rinderunspezifisch (-) beurteilt.

3.2.9.4 Einsatz von bovinem und porcinem GFAP- bzw. MBP-Reinprotein und Gehirnextrakten im Western Blot

Zur Charakterisierung der im GFAP- bzw. im MBP-EIA verwendeten Antikörper erfolgte der Markerproteinnachweis in Reinproteinlösungen. Hierzu wurde die Probenvorbereitung wie in 3.2.9.1 beschrieben durchgeführt. In den Polyacrylamidgelen wurden jeweils 2,5 µg der Reinproteine bovines und porcines GFAP bzw. MBP sowie BSA pro Geltasche aufgetrennt. Zusätzlich wurde eine Molekulargewichtsmarkerproteinlösung pro Gel aufgetragen. Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteinbanden konnten zur Immundetektion aus jeder Nitrocellulosemembran Drittel mit den Banden des bovinen und des porcinen GFAPs bzw. MBPs sowie des BSAs gewonnen werden. BSA diente bei der Immundetektion als ZNS-Negativkontrollansatz. Zur Charakterisierung der Antikörper erfolgte der Markerproteinnachweis außerdem in Gehirnextrakten. Auch hierzu wurde die Probenvorbereitung wie in 3.2.9.1 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 3.10: Übersicht der eingesetzten Verdünnungen zur Charakterisierung der als Fängerantikörper im EIA verwendeten Antiseren und der Detektionsantikörper mittels Western Blot.

untersuchter Antikörper	Charakterisierung als Fängerantikörper		Charakterisierung als Detektionsantikörper (in 1% Casein/TBS)
	Vedünnung Fängerantikörper (in TBS)	entsprechender Detektionsantikörper (in 1% Casein/TBS)	
G1/G2	1: 500	anti-Schwein-IgG- Peroxidase-Konjugat 1: 500	1: 250
G3/G4	1: 500	anti-Schaf-IgG- Peroxidase-Konjugat 1: 500	1: 250
G5	1: 1.000		1: 1.000
G6/G7	1: 500		1: 500
P1/P2	1: 250	anti-Kaninchen-IgG-	1: 250
P3/P4	1: 250	Peroxidase-Konjugat	1: 250
M1	1: 250	1: 1.000	1: 250
M2	1: 350		1: 350
M3	1: 250		1: 250
MBP129	1: 250	anti-Maus-IgG- Peroxidase-Konjugat 1: 500	n.u.

n.u.: nicht untersucht

In den Polyacrylamidgelen wurden jeweils 50 µg des bovinen und porcinen Gehirnäquivalentes (enthalten in 10 µl des 1: 20 verdünnten Gehirnextraktes) pro Geltasche aufgetrennt. Zusätzlich wurden 2,5 µg des bovinen MBP-Reinproteins und 2,5 µg des bovinen GFAP-Reinproteins aufgetrennt. Auf jedem Gel wurde außerdem eine Molekulargewichtsmarkerproteinlösung und 2,5 µg BSA aufgetragen. Zur Immundetektion konnten aus jeder erhaltenen Membran zwei Hälften gewonnen werden. Auf einer Hälfte diente BSA als ZNS-Negativkontrollansatz, auf der anderen die BSA-Bande der Molekulargewichtsmarkerproteinlösung. Jeder Antikörper wurde mindestens dreimal mit

Reinprotein und mindestens zweimal mit Gehirnextrakt untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte entsprechend der in 3.2.9.3 beschriebenen Methode.

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Extraktionsmittel auf den Western Blot wurde Rindergehirnstandardhomogenisat analog 3.2.4.1 mit A.dest, PBS, TBS, 1% SDS/A.dest., 0,1% SDS/A.dest., 1% SDS/PBS, 1% Tween/A.dest., 0,1% Tween/A.dest. und 1% Tween/PBS aufbereitet. Zum Vergleich wurde Schweinegehirnstandardhomogenisat mit 1% SDS/A.dest. extrahiert. Der Extrakt wurde im Immunoblot mit Antiserum M2 bzw. P3 1: 2 in A.dest. verdünnt eingesetzt. Extraktionsmittel, die in sichtbaren Markerproteinbanden resultierten, wurden als grundsätzlich geeignet (+) beurteilt. Extraktionsmittel, die keine Markerproteinbanden lieferten, wurden als ungeeignet (-) beurteilt.

3.2.9.5 Sensitivität der durchgeführten Western Blot Methode

Zur Überprüfung der Sensitivität der durchgeführten Western Blot Methode der Invitrogen GmbH wurde in einem Polyacrylamidgel BSA in Konzentrationen von 0,023 µg/Geltasche bis 3 µg/Geltasche elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und angefärbt. Die Nachweisgrenze wurde als die Konzentration der letzten noch schwach sichtbaren Bande festgelegt.

Zur weiteren Überprüfung der Sensitivität wurde in einem Polyacrylamidgel bovines MBP in Konzentrationen von 0,039 µg/Geltasche bis 5 µg/Geltasche aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit Antiserum M2 und entsprechendem Detektionsantikörper immundetektiert. Nach abgeschlossener Farbreaktion wurde die Nachweisgrenze als die Konzentration der letzten noch schwach sichtbaren Bande bestimmt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse für einen GFAP-Sandwich-Enzymimmuntest

4.1.1 Herstellung der Immunreagenzien

4.1.1.1 Gewinnung spezifischer Antiseren und Immunisierungsverlauf

In den Seren der mit bGFAP-Peptid 1 immunisierten Tiere konnten ab der 3. Immunisierungswoche spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die erste Restimulierung in der 11. Immunisierungswoche führte bei Kaninchen P1 zu einem kurzzeitigen Titeranstieg. Weitere Restimulierungen hingegen beeinflussten den Serumtiter nicht. Bei Kaninchen P2 führte nur die dritte Restimulierung in der 31. Immunisierungswoche zu einem Titeranstieg. Insgesamt betrachtet war die im Immunisierungsverlauf erreichte Serumtiterhöhe beider Kaninchen als sehr gering einzustufen (Abbildung 4.1). In den Seren der mit bGFAP-Peptid 2 immunisierten Tiere konnten ab der 2. Immunisierungswoche spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die erste und zweite Restimulierung (1. bzw. 2. Immunisierungswoche) beeinflusste den Serumtiter von Kaninchen P3 nur geringfügig. Die dritte Restimulierung (3. Immunisierungswoche) hingegen führte zu einem kurzzeitigen Titeranstieg. Bei Kaninchen P4 führte die erste und dritte Restimulierung zu einem deutlichen Titeranstieg. Die relativen Titer der Antiseren der Tiere P3 und P4 lagen deutlich über denjenigen der Immunisierung gegen bGFAP-Peptid 1 (Abbildung 4.2). Bei vergleichender Titration unter Verwendung von bovinem und porcinem GFAP als Festphasenantigen zeigte sich, dass für alle Tiere eine ausgeprägte Reaktivität mit pGFAP vorlag. Die anti-bGFAP-Peptid 1-Antiseren der Tiere P1 und P2 reagierten stärker mit bGFAP. Bei den anti-bGFAP-Peptid 2-Antiseren der Tiere P3 und P4 waren die erreichten Messwerte für pGFAP bei einer Proteinbeschichtung von jeweils 1 µg/ml mit bGFAP vergleichbar (Abbildung 4.3).

Die UV-Spektren der zur Immunisierung der Kaninchen eingesetzten Peptid-KLH-Konjugate konnten nicht von der Absorption des Trägerproteins im Bereich von 190-240 nm mit Maxima bei ca. 205 nm bestimmt werden, da die Peptide zwar ein übereinstimmendes Absorptionsmaximum jedoch kein additives Absorptionsverhalten aufwiesen. Eine exakte Quantifizierung des gebundenen Peptids war somit nicht möglich. Wird von einer vollständigen Kopplung ausgegangen, ergeben sich Kopplungsraten (Molekül Peptid pro Molekül Trägerprotein) von ca. 1.000: 1.

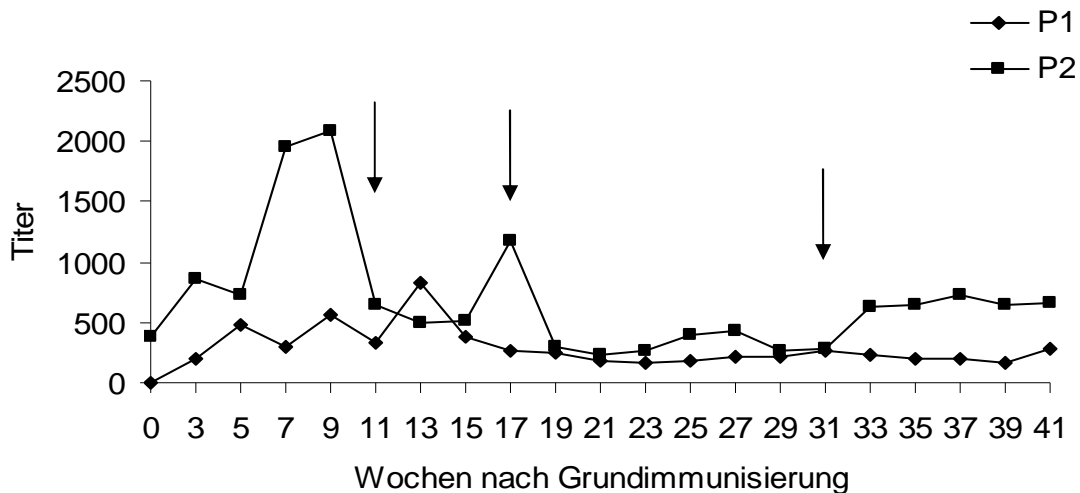


Abbildung 4.1: Antiserumtiter der mit bGFAP-Peptid 1 immunisierten Kaninchen P1 und P2. Die Titerbestimmung erfolgte unter Verwendung von bGFAP-Komplettprotein als Festphasenantigen ($1 \mu\text{g/ml}$). Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Restimulierungen.

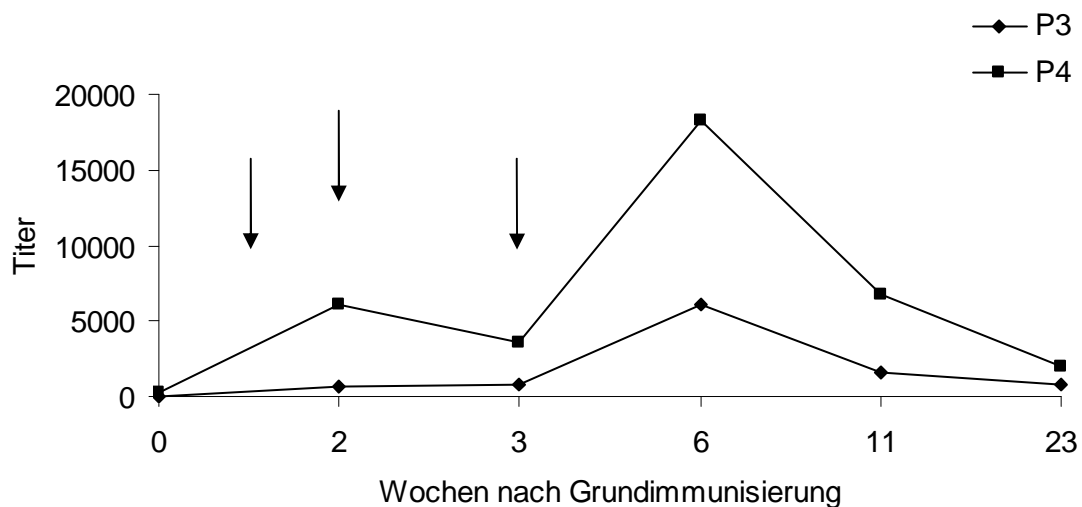


Abbildung 4.2: Antiserumtiter der mit bGFAP-Peptid 2 immunisierten Kaninchen P3 und P4. Die Titerbestimmung erfolgte unter Verwendung von bGFAP-Komplettprotein als Festphasenantigen ($1 \mu\text{g/ml}$). Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Restimulierungen.

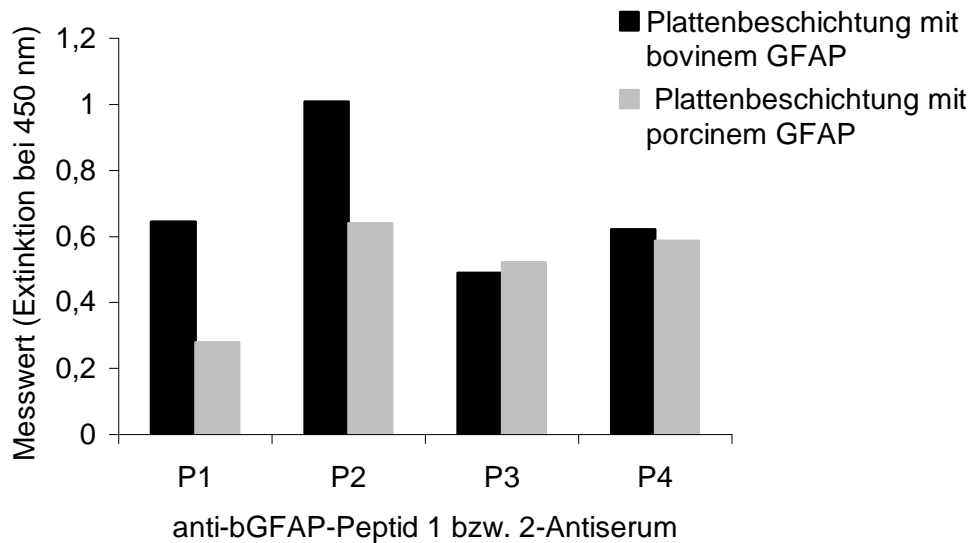


Abbildung 4.3: Vergleich der Messwerte in der Titerbestimmung der mit bGFAP-Peptid 1 (P1, P2) bzw. bGFAP-Peptid 2 (P3, P4) immunisierten Kaninchen (eingesetzte Verdünnung der Antiseren jeweils 1: 100) bei Verwendung von bGFAP bzw. pGFAP als Festphasenantigen im indirekten Enzymimmuntest. Die Seren aller Tiere zeigten Reaktivität mit bovinem und porcinem Protein.

4.1.1.2 Aufbereitung der Antiseren und Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten

Zunächst wurden Antiseren solcher Wochen gefällt, in denen ein relativ hoher Antikörpertiter nachgewiesen werden konnte. Im Rahmen dessen wurden von Kaninchen P1 und P2 die Antiseren der 9. Immunisierungswoche und von Kaninchen P3 und P4 die Antiseren der 11. Immunisierungswoche gefällt. Nach Beendigung der Immunisierungsphase wurden Antiseren der verschiedenen Abnahmen, die vergleichbar hohe spezifische Serumtiter aufwiesen gepoolt und anschließend gefällt. Für Kaninchen P1 und P2 wurde jeweils ein Antiserumpool aus den Antiseren der 5. bis 17. Woche und ein Antiserumpool aus den Antiseren der 5. bis 41. Woche gebildet. Für Kaninchen P3 und P4 wurde ein Antiserumpool aus den Antiseren der 2. bis 23. Woche gebildet. Für Kaninchen P4 wurde ein zusätzlicher Antiserumpool aus den Antiseren der 2. bis 11. Woche gebildet. Tabelle 4.1 zeigt beispielhaft einige Ergebnisse der spektrophotometrisch bestimmten IgG-Rohfraktionengehalte.

Die Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten aus diesen Antiseren ergab relativ unbefriedigende Ergebnisse hinsichtlich der spezifischen Aktivität. Die zur Verfügung gestellten Antikörper-Enzym-Konjugate aus anti-GFAP-Komplettprotein-Antiseren (LUX, 2009) hingegen ergaben im modifizierten Sandwich-Enzymimmuntest hohe Extinktionen nach Verwendung antigenhaltiger Proben sowie niedrige Extinktionen ($<0,04$ Extinktionseinheiten) nach Einsatz antigenfreier Proben. Tabelle 4.1 zeigt eine Aufstellung aller hergestellten Konjugate.

Tabelle 4.1: Übersicht der hergestellten Antikörper-Enzym-Konjugate für den Einsatz im Sandwich-Enzymimmuntest zum Nachweis von bGFAP.

gefällte Antiseren	Woche nach Grund-immunisierung	IgG-Gehalt (mg/ml)	Konjugat	verwendete Fraktionen nach Gelchromatographie	durchschnittliche Reinheitszahl
G1	5.	4,7			
	9.	7,7	X	25 + 26	0,38
G2	5.	7,3			
	9.	9,3	X	25 + 26	0,35
G3	11.	12	X	25 - 27	0,28
G4	11.	10,6	X	25 - 27	0,37
G5	40.	8,5			
	20.-50.	8,2	X	22 - 25	0,42
G6	20.	7,5	X	25 - 28	0,54
G7	40.	6,7	X	26 - 29	0,41
P1	9.	5,22			
		6,4	X	22 - 24	0,45
	5.-17.	5,1			
	5.-41.	7,7			
P2	9.	6,27	X	25 + 26	0,36
		10,52	X	23 - 26	0,33
	5.-17.	8,32			
	5.-41.	12,86			
P3	11.	5,6	X	24 - 27	0,44
		5,4			
	2.-23.	5,8			
P4	11.	7,06	X	23 + 24	0,65
			X	25 + 26	0,44
			X	25 + 26	0,4
		4,2	X	23	0,63
	2.-11.	6,0			
	2.-23.	4,0			

X : Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugat aus entsprechendem Antiserum

4.1.2 Erstellung boviner und porciner GFAP-Reinproteinstandardkurven in den Testsystemen

Die anti-bGFAP-Peptid-Antiseren der Tiere P1-4 wurden als Fängerantikörper zusammen mit enzymmarkierten anti-bGFAP-Vollprotein-Antiseren der Tiere G1-7 in einem Sandwich-Enzymimmuntest integriert. Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse hinsichtlich der spezifischen Aktivität der Antikörper-Enzym-Konjugate aus anti-bGFAP-Peptid-Antiseren wurden Testsysteme mit enzymmarkierten anti-bGFAP-Peptid-Antiseren als Detektionsantikörper nicht weiter verfolgt. Zunächst wurde für jede der übrigen 28 möglichen Kombinationen eine geeignete Konzentration der Reagenzien ermittelt (Tabelle 4.2). Änderungen im Konzentrationsbereich der jeweiligen Immunreagenzien beeinflussten die Testsysteme erheblich. Die Variation der Konjugatkonzentration wies einen höheren Einfluss als die Variation der Beschichtungskonzentration auf. Optimale Konzentrationsbedingungen wurden in den Testsystemen bei einer Beschichtungskonzentration von 1: 1.000 (P1, P2) bzw. 1: 4.000 (P3, P4) und einer Konjugatkonzentration von 1: 500 bzw. 1: 1.000 (G5-HRP) erreicht.

Durch den Einsatz von boviner und porciner GFAP-Reinproteinlösung in die Testsysteme konnten vergleichende Reinproteinstandardkurven erstellt werden. Besonders geeignet erwies sich hierbei das Antikörper-Enzym-Konjugat aus Kaninchenantiserum G5 (G5-HRP). Für GFAP-Reinprotein wurde in Enzymimmuntests unter Verwendung der Antiseren sowohl gegen bGFAP-Peptid 1 (Kaninchen P1: Abbildung 4.4, Kaninchen P2: Abbildung 4.5) als auch gegen bGFAP-Peptid 2 (Kaninchen P3: Abbildung 4.6, Kaninchen P4: Abbildung 4.7) in Kombination mit Detektionsantikörper G5-HRP nur eine minimale Kreuzreaktivität mit porcinem GFAP-Reinproteinstandard festgestellt. Im Vergleich zur Reaktivität von bovinem GFAP ergab porcines GFAP erst in 30fach bis 100fach höheren Konzentrationen ein entsprechend hohes Messsignal. Das bedeutet, dass in Bezug auf porcines GFAP als Proteinstandard keine relevante Kreuzreaktivität mehr gegeben war. Bei der Verwendung der unterschiedlichen Fängerantikörper mit Detektionsantikörper G5-HRP ergaben sich nur geringe Unterschiede hinsichtlich der Testspezifität und der Farbentwicklung des Negativkontrollansatzes (Hintergrundfärbung). Hinsichtlich der Testsensitivität ergaben sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Testsystemen. Zur Beurteilung der Spezifität der einzelnen Testsysteme wurde die Spezifitätskennzahl 1 herangezogen (Tabelle 4.3). Ergaben sich Spezifitätskennzahlen >1 bedeutet dies, dass

bGFAP mit einem höheren Messsignal als pGFAP erkannt wurde. Spezifitätskennzahlen ≤ 1 bedeuten, dass pGFAP in einem gleich hohen oder höheren Messsignal wie bGFAP resultierte. Bei einer GFAP-Konzentration von 1.000 ng/ml erwies sich vor allem die Beschichtung mit Fängerantikörper P3 als geeignet, was sich in einer Spezifitätskennzahl 1 von 6,5 ausdrückt, wohingegen bei einer GFAP-Konzentration von 111,1 ng/ml sich vor allem P4 als Fängerantikörper eignete, was sich in einer Spezifitätskennzahl 1 von 4,4 ausdrückt. Bei Verwendung von P2 als Fängerantikörper konnte eine durchschnittliche Hintergrundfärbung von ca. 0,05 Extinktionseinheiten beobachtet werden, während für die übrigen Fängerantikörper die Hintergrundfärbung deutlich geringer ausfiel (0,02-0,03 Extinktionseinheiten). In allen Testsystemen mit Detektionsantikörper G5-HRP lag die Nachweisgrenze bei einem bGFAP-Gehalt von 37 ng/ml. Testsysteme mit weiteren Antikörper-Enzym-Konjugaten erwiesen sich im Vergleich zu Detektionsantikörper G5-HRP hinsichtlich ihrer Testspezifität und Testsensitivität als unterlegen.

Tabelle 4.2: Übersicht der ermittelten optimalen Konzentrationen der Immunreagenzien im Sandwich-Enzymimmuntest zum Nachweis von bGFAP.

Verwendung als	Antiserum	ermittelte optimale Verdünnung
Fängerantikörper	P1	1: 1.000
	P2	1: 1.000
	P3	1: 4.000
	P4	1: 4.000
Detektionsantikörper	G1	1: 500
	G2	1: 500
	G3	1: 500
	G4	1: 500
	G5	1: 1.000
	G6	1: 500
	G7	1: 500

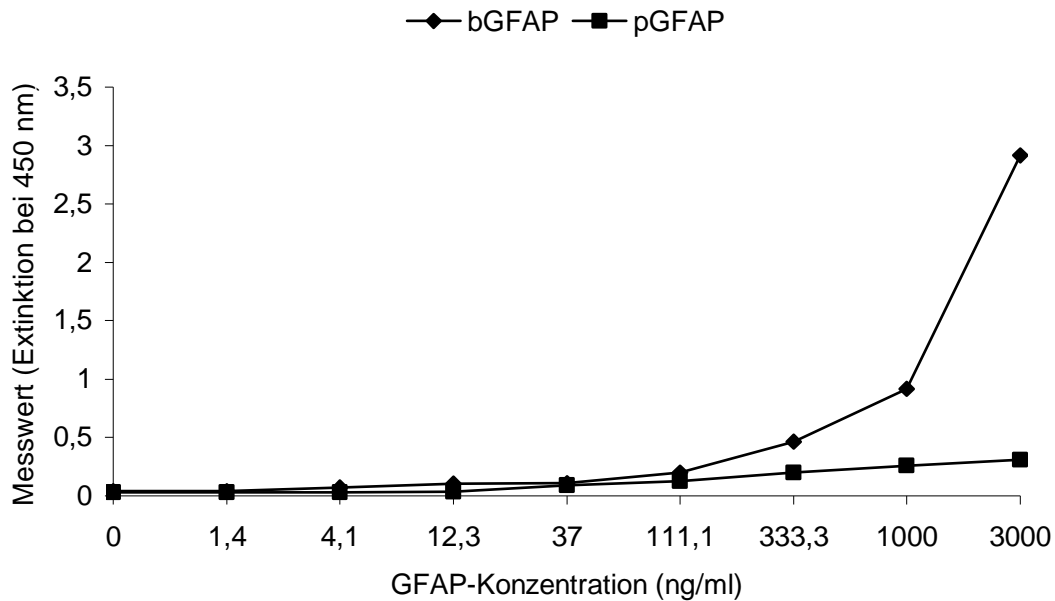


Abbildung 4.4: Standardkurven für bGFAP- und pGFAP-Reinproteinlösung im Sandwich-Enzymimmuntest unter Verwendung von Antiserum P1 (anti-bGFAP-Peptid 1) als Fängerantikörper und Antikörper-Enzym-Konjugat G5-HRP (anti-bGFAP) als Detektionsantikörper. Im Vergleich zur Reaktivität von bGFAP ergab pGFAP erst in 30fach höheren Konzentrationen ein entsprechend hohes Messsignal.

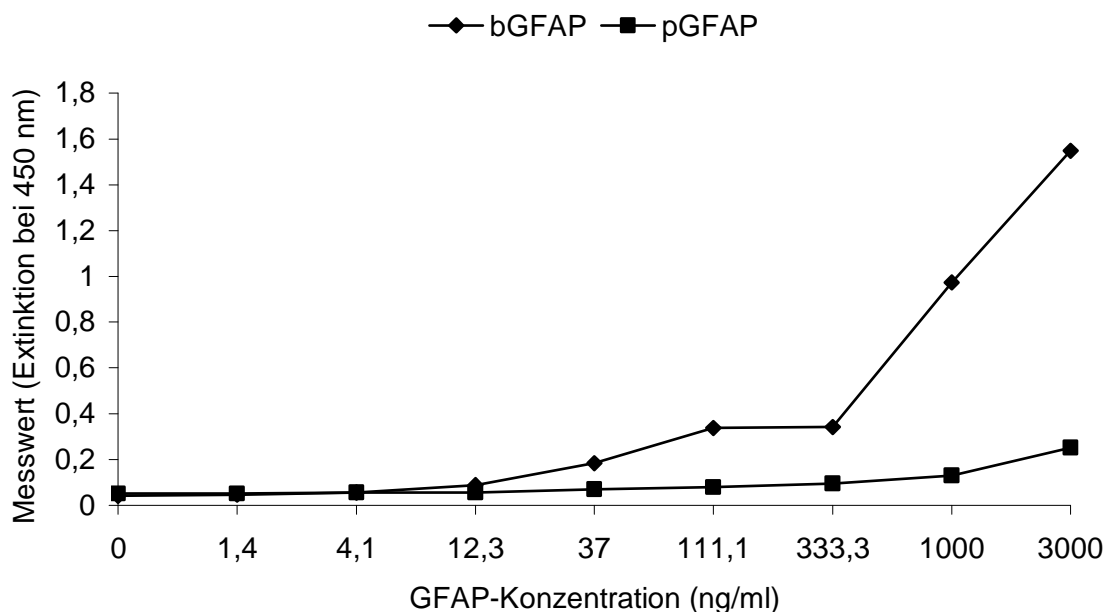


Abbildung 4.5: Standardkurven für bGFAP- und pGFAP-Reinproteinlösung im Sandwich-Enzymimmuntest unter Verwendung von Antiserum P2 (anti-bGFAP-Peptid 1) als Fängerantikörper und Antikörper-Enzym-Konjugat G5-HRP (anti-bGFAP) als Detektionsantikörper. Im Vergleich zur Reaktivität von bGFAP ergab pGFAP erst in 100fach höheren Konzentrationen ein entsprechend hohes Messsignal.

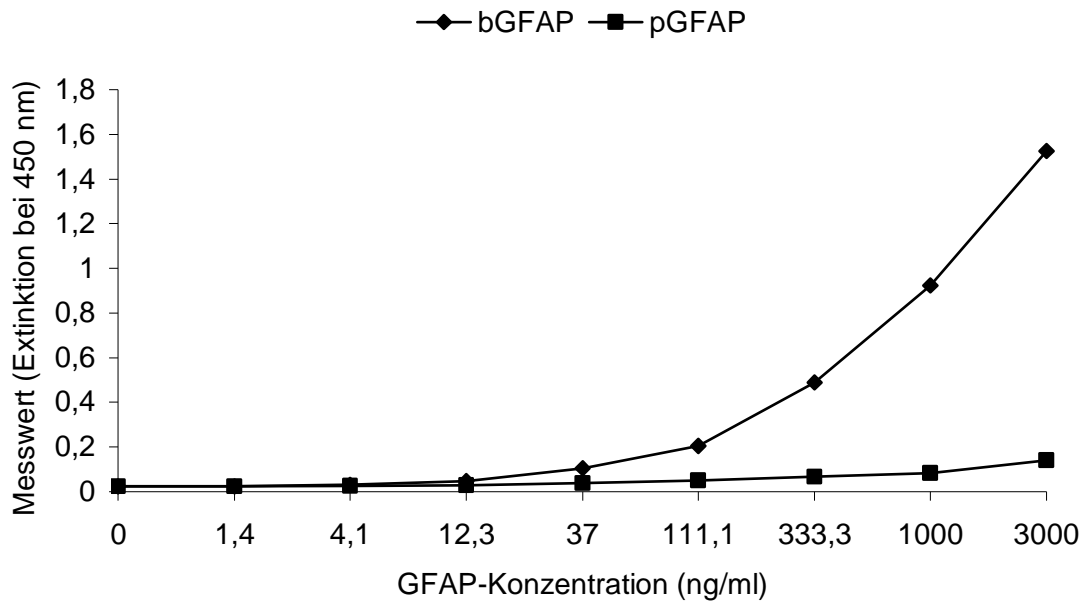


Abbildung 4.6: Standardkurven für bGFAP- und pGFAP-Reinproteinlösung im Sandwich-Enzymimmunttest unter Verwendung von Antiserum P3 (anti-bGFAP-Peptid 2) als Fängerantikörper und Antikörper-Enzym-Konjugat G5-HRP (anti-bGFAP) als Detektionsantikörper. Im Vergleich zur Reaktivität von bGFAP ergab pGFAP erst in 100fach höheren Konzentrationen ein entsprechend hohes Messsignal.

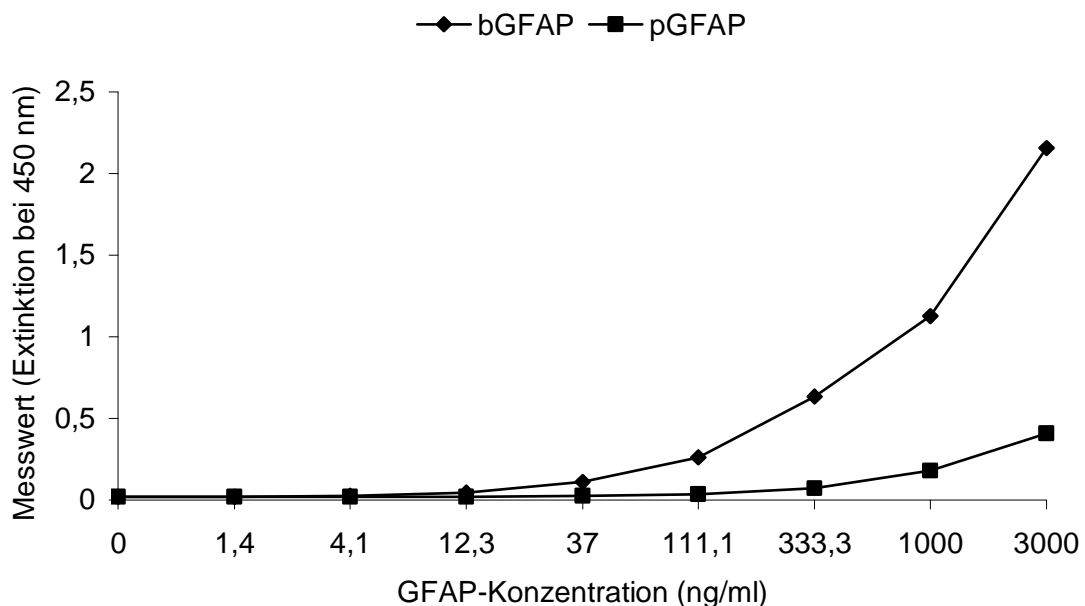


Abbildung 4.7: Standardkurven für bGFAP- und pGFAP-Reinproteinlösung im Sandwich-Enzymimmunttest unter Verwendung von Antiserum P4 (anti-bGFAP-Peptid 2) als Fängerantikörper und Antikörper-Enzym-Konjugat G5-HRP (anti-bGFAP) als Detektionsantikörper. Im Vergleich zur Reaktivität von bGFAP ergab pGFAP erst in 30fach höheren Konzentrationen ein entsprechend hohes Messsignal.

Tabelle 4.3: Spezifitätskennzahl 1* für den Nachweis von bGFAP im Verhältnis zu pGFAP, ermittelt bei einer Konzentration von 111,1 und 1.000 ng/ml. Die höchsten Spezifitätskennzahlen für die jeweiligen Fängerantikörper im Fettdruck.

Beschichtung mit Fängerantikörper	GFAP- Konzentration (ng/ml)	Spezifitätskennzahl 1 unter Verwendung von Detektionsantikörper aus Antiserum						
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
P1	1.000	2,1	1,7	1,7	2,1	6,4	3,6	3,3
	111,1	0,7	0,8	1,1	1,2	3,6	1,1	1,5
P2	1.000	1,6	1,3	1	1,9	4,9	1,4	3,1
	111,1	1	1	1	1,1	2,8	1,1	2
P3	1.000	2,6	0,3	1,3	2,1	6,5	6,2	3,5
	111,1	1,3	0,8	1,1	0,9	2,4	1,1	1,1
P4	1.000	2,7	1,2	1,3	2,6	5,8	3	3
	111,1	0,9	0,8	1	1	4,4	1,1	1,6

*Spezifitätskennzahl 1 = Verhältnis der Extinktionen (bei 450 nm) von bGFAP zu pGFAP

4.1.3 Untersuchung von bovinem und porcinem Gehirnextrakt in den Testsystemen

Durch den Einsatz von bovinem und porcinem Gehirnextrakt in die Testsysteme konnten vergleichende Gehirnstandardextraktkurven erstellt werden. Auch hierbei erwies sich das HRP-Konjugat des Kaninchenantiseraums G5 als besonders geeignet. Die Untersuchung von Gehirnextrakten von Rind und Schwein zeigte für alle Enzymimmuntests unter Verwendung der Antiseren sowohl gegen bGFAP-Peptid 1 (Kaninchen P1: Abbildung 4.8, Kaninchen P2: Abbildung 4.9) als auch gegen bGFAP-Peptid 2 (Kaninchen P3: Abbildung 4.10, Kaninchen P4: Abbildung 4.11) in Kombination mit Detektionsantikörper G5-HRP eine deutlich geringere Reaktivität mit porcinem Gehirn. Im Testsystem mit Fängerantikörper P3 lag zum Beispiel der maximal gemessene Extinktionswert für konzentrierten porcinen Gehirnextrakt bei nur 0,5 Einheiten, gegenüber 2,1 Einheiten für bovinen Gehirnextrakt. Gehirnextrakte vom Schwein führten erst in hohen Konzentrationen (100 µg Gehirnäquivalent/ml Extrakt) zu einem positiven Ergebnis. Die

erforderliche Schweinegehirnkonzentration im Extrakt zum Erreichen entsprechend hoher Messwerte lag rund 30fach höher als für Rindergehirn. Dies geben auch die zur Beurteilung der Spezifität herangezogenen Spezifitätskennzahlen 2 wieder (Tabelle 4.4). Bei der Verwendung der unterschiedlichen bGFAP-Peptid-Fängerantikörper in Kombination mit Detektionsantikörper G5-HRP ergaben sich geringe Unterschiede hinsichtlich der Testspezifität. Besonders geeignet erwies sich in dieser Hinsicht eine Beschichtung mit Fängerantikörper P3. Diese Tatsache drückt sich unter anderem in einer Spezifitätskennzahl 2 von 4,0 (Gehirnextraktkonzentration von 2.000 µg/ml) bzw. 3,1 (Gehirnextraktkonzentration von 222,2 µg/ml) aus. Hinsichtlich der Testsensitivität und der Farbentwicklung des Negativkontrollansatzes ergaben sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Testsystemen unter Verwendung von Detektionsantikörper G5-HRP. Die Extinktionen der Negativkontrollansätze lagen insgesamt betrachtet sehr niedrig (typischerweise <0,02 Extinktionseinheiten), wobei zudem sehr geringe Standardabweichungen vorlagen. Für porcines Gehirn ergab sich eine Nachweisgrenze von ca. 100 µg/ml, gegenüber 25 µg/ml für Rindergehirnextrakt. Somit waren die Unterschiede zwischen den Antiseren gegen bGFAP-Peptide hinsichtlich ihrer Eigenschaften im Sandwich-Enzymimmuntest generell nur recht gering.

Auch bei der Untersuchung der Gehirnextrakte in Testsystemen mit weiteren Antikörper-Enzym-Konjugaten erwiesen sich diese im Vergleich zu Detektionsantikörper G5-HRP hinsichtlich ihrer Testspezifität und Testsensitivität als unterlegen. Zwar wiesen die beiden Testsysteme mit Antiserum P3 und P4 als Fängerantikörper mit Detektionsantikörper G1-HRP eine verbesserte Spezifität auf, jedoch war deren Eignung aufgrund einer deutlich herabgesetzten Testsensitivität (Nachweisgrenze von ca. 1.000 µg/ml für Rindergehirnextrakt) und einer erhöhten Hintergrundfärbung (ca. 0,07 Extinktionseinheiten) unzureichend.

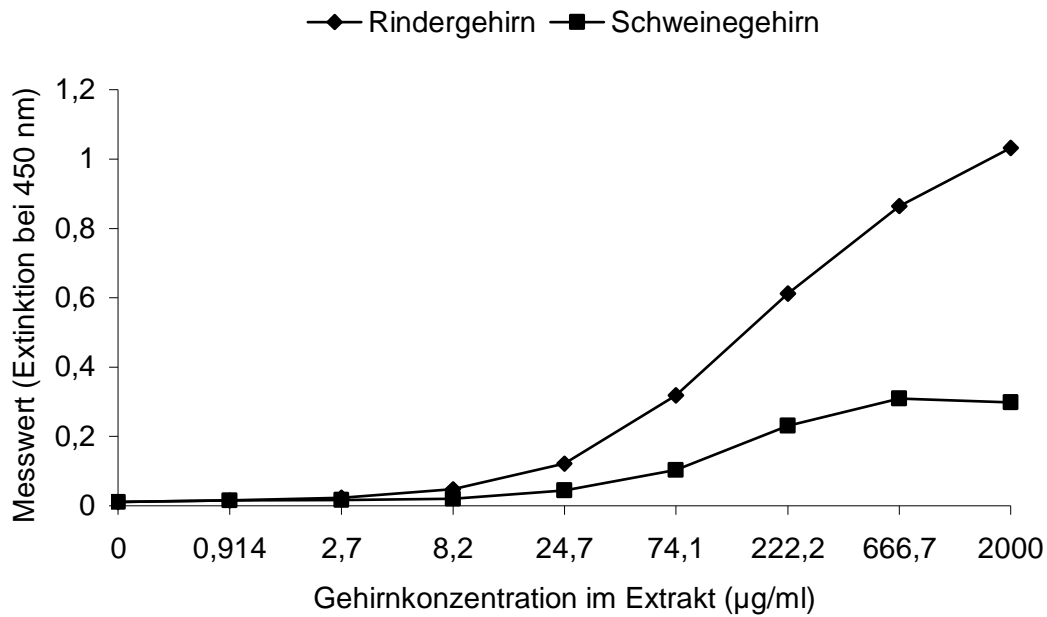


Abbildung 4.8: Rinder- und Schweinegehirnstandardextraktkurve im Sandwich-Enzymimmunttest unter Verwendung von Antiserum P1 (anti-bGFAP-Peptid 1) als Fängerantikörper und G5-HRP (anti-bGFAP) als Detektionsantikörper. Die x-Achse zeigt den Gehalt an „Gehirnäquivalent“ je ml Extrakt. Der Standard mit der höchsten Konzentration (2.000 µg Gehirnäquivalent/ml) entspricht einem 1: 50 verdünnten Gehirnextrakt (Gesamtprobenfaktor: 500).

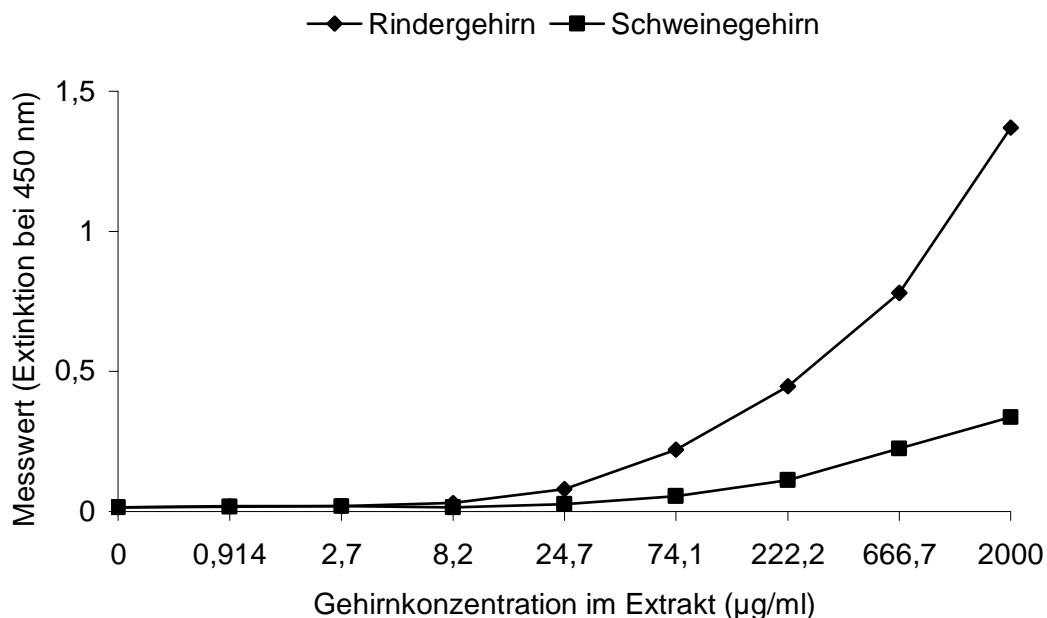


Abbildung 4.9: Rinder- und Schweinegehirnstandardextraktkurve im Sandwich-Enzymimmunttest unter Verwendung von Antiserum P2 (anti-bGFAP-Peptid 1) als Fängerantikörper und G5-HRP (anti-bGFAP) als Detektionsantikörper.

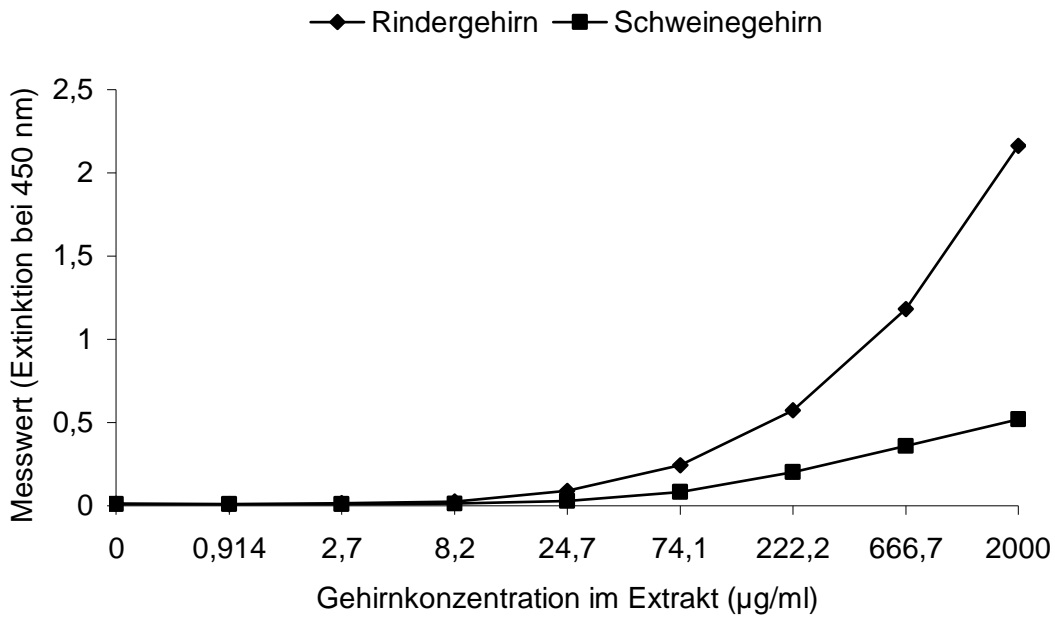


Abbildung 4.10: Rinder- und Schweinegehirnstandardextraktkurve im Sandwich-Enzymimmuntest unter Verwendung von Antiserum P3 (anti-bGFAP-Peptid 2) als Fängerantikörper und G5-HRP (anti-bGFAP) als Detektionsantikörper.

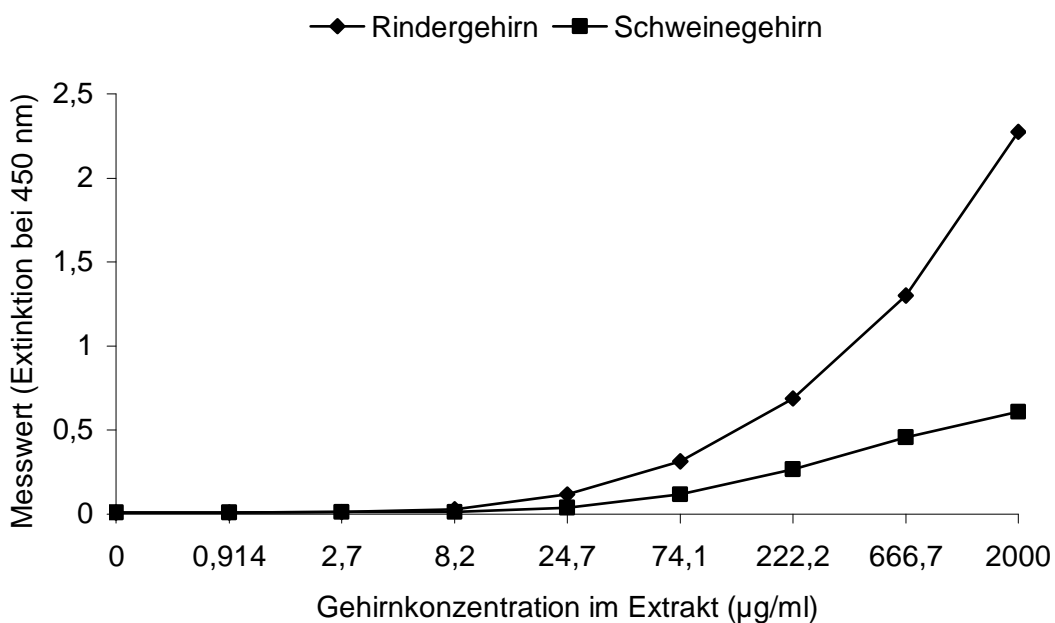


Abbildung 4.11: Rinder- und Schweinegehirnstandardextraktkurve im Sandwich-Enzymimmuntest unter Verwendung von Antiserum P4 (anti-bGFAP-Peptid 2) als Fängerantikörper und G5-HRP (anti-bGFAP) als Detektionsantikörper.

Tabelle 4.4: Spezifitätskennzahl 2* für den Nachweis von GFAP in Rindergehirnextrakt im Verhältnis zu Schweinegehirnextrakt, ermittelt bei einer Gehirnextraktkonzentration von 222,2 und 2.000 µg Gehirnäquivalent/ml Extrakt. Die höchsten Spezifitätskennzahlen für die jeweiligen Fängerantikörper im Fettdruck.

Beschichtung mit Fängerantikörper	Gehirnextrakt- konzentration (µg/ml)	Spezifitätskennzahl 2 unter Verwendung von Detektionsantikörper aus Antiserum						
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
P1	2.000	2	1,2	1,2	1,1	3,8	2,3	2,4
	222,2	1,5	1,2	1,1	1,1	2,8	1,8	1,4
P2	2.000	1,9	1,2	1,2	1,3	3,7	2,2	2,3
	222,2	1,4	1	1,1	1,1	2,6	1,8	1,4
P3	2.000	6,2	2	1,5	1,7	4	3	3,1
	222,2	2,6	1,5	1,1	1,8	3,1	2	1,8
P4	2.000	4	2	1,5	1,7	3,2	2,4	3
	222,2	1,7	1,7	1,2	1,2	2,5	1,7	1,8

*Spezifitätskennzahl 2 = Verhältnis der Extinktionen (bei 450 nm) von bovinem zu porcinem Gehirnextrakt

4.1.4 Optimale Kombination der Immunreagenzien

In einer Kombination der Antiseren gegen bGFAP-Peptide als Fängerantikörper mit enzymmarkierten Antiseren gegen bGFAP-Vollprotein als Detektionsantikörper im Sandwich-Enzymimmuntest konnte eine enorme Spezifitätssteigerung im Vergleich zu Testsystemen, die auf der alleinigen Verwendung von anti-bGFAP-Vollprotein-Antiseren und -Konjugaten beruhen (LUX, 2009), erreicht werden. Besonders geeignet erwies sich hierbei eine Kombination mit dem HRP-Konjugat des Kaninchenantisera G5. Testsysteme mit den übrigen Detektionsantikörpern wurden aufgrund ihrer limitierten Testspezifität und Testsensitivität für bovines GFAP in Reinproteinlösungen und in Extrakten von Rindergehirn nicht weiter verfolgt. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen anti-bGFAP-Peptid-Antiseren hinsichtlich ihrer Eigenschaften im Sandwich-Enzymimmuntest waren generell nur recht gering.

4.1.5 Vergleich des GFAP-Gehaltes in Gehirn und Rückenmark

Hinsichtlich der GFAP-Konzentrationsunterschiede in Gehirn und Rückenmark ergaben sich im Vergleich zum Testsystem G1/G5-HRP (LUX, 2009) wesentlich geringere Messsignalunterschiede für Rinder-ZNS (% Reaktivität gleicher Gehalte Rückenmark in Relation zu Gehirn), wobei auch Unterschiede für die Testsysteme unter Verwendung der Antiseren P1 (148%), P2 (170%), P3 (116%) und P4 (106%) festgestellt wurden (Abbildung 4.12; Abbildung 4.13). Für Gehirn und Rückenmark vom Schwein waren diese Gewebeunterschiede jedoch wesentlich deutlicher. Während reines Gehirn vom Schwein zu Messsignalstärken von 21-27% äquivalenter Konzentrationen bovinen Gehirns führte, ergaben Extrakte von reinem Schweinerückenmark Messsignale zwischen 94% und 107% relativ zu Rindergehirn. Somit würde eine alleinige Kontamination eines Probenmaterials mit reinem Rückenmark vom Schwein zu falsch-positiven Ergebnissen im Sinne des Nachweises von bovinem ZNS führen. Aufgrund der generell höheren GFAP-Konzentration im Rückenmark im Vergleich zum Gehirn war eine Quantifizierung des ZNS-Gehaltes mit Hilfe des Markerproteins GFAP prinzipiell nur sehr eingeschränkt möglich.

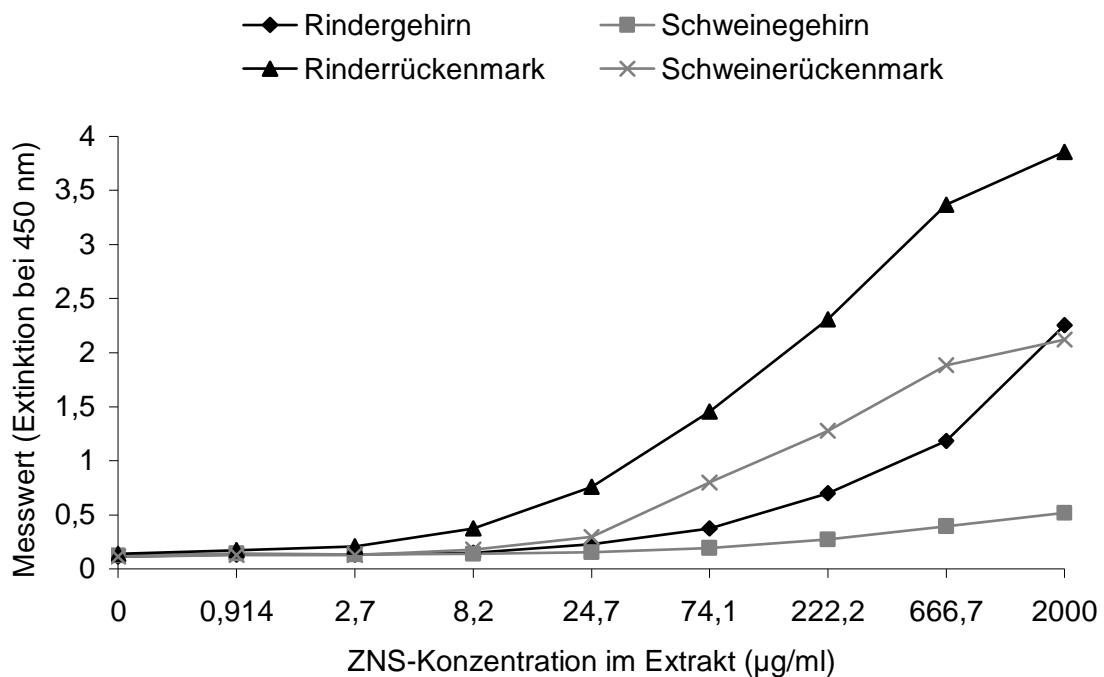


Abbildung 4.12: Vergleich der Reaktivität von verdünnten Gehirn- und Rückenmarksextrakten von Rind und Schwein im Sandwich-Enzymimmunttest P2/G5-HRP.

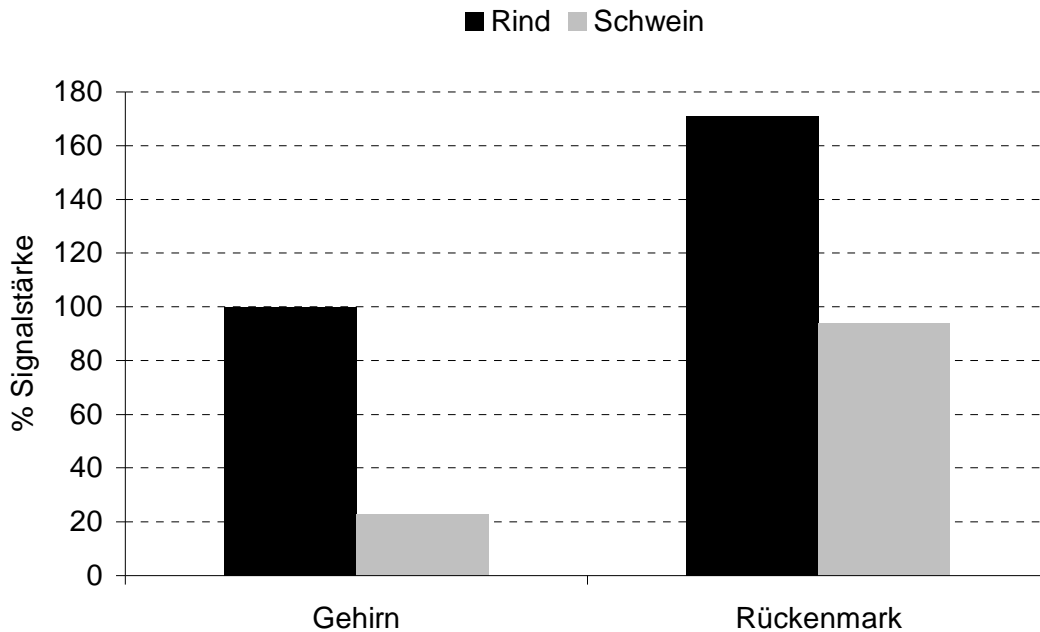


Abbildung 4.13: Vergleich der relativen Signalstärken (Gehirn Rind = 100%) für Extrakte von Gehirn und Rückenmark der Tierarten Rind bzw. Schwein (Konzentration jeweils 2.000 μg ZNS-Material/ml Extrakt) im Testsystem unter Verwendung des Antiserums von Kaninchen P2 (anti-bGFAP-Peptid 1) in Kombination mit Detektionsantikörper G5-HRP (anti-bGFAP).

4.1.6 Untersuchung künstlich kontaminierter, roher Probenmaterialien

In den Testsystemen auf der Basis von anti-bGFAP-Peptid-Antiseren ergaben sich für ZNS-freies Hackfleisch generell sehr niedrige Extinktionswerte um 0,03 Extinktionseinheiten. Aufgrund der hohen Testempfindlichkeit war es möglich, zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse eine Sicherheitsspanne einzubauen. Daher wurde ein Extinktionswert von 0,1 Extinktionseinheiten als „cut-off“ Wert und damit als Nachweisgrenze festgelegt. Hieraus ergab sich eine Nachweisgrenze für Zusätze von Rindergehirn von 0,5%. Für Zusätze von Schweinehirn wurde der „cut-off“ Wert erst bei 4-8fach höheren Konzentrationen (2-4%) überschritten (Abbildung 4.14). Zur Überprüfung der Nachweisgrenze wurde für jede Testdurchführung des jeweiligen Testsystems ein Quotient aus den Messwerten von 0,5% Rindergehirnzusatz und ZNS-Negativkontrollansatz gebildet (Abbildung 4.15). Ein Zusatz von 0,5% Rindergehirn resultierte dabei durchschnittlich im 2,5fachen Messwert des ZNS-Negativkontrollansatzes. Verglichen mit dem Testsystem für GFAP unter Verwendung von Antikörpern gegen das Vollprotein (G1/G5-HRP) und insbesondere verglichen mit einem

kommerziellen Enzymimmuntest (Ridascreen Risk Material) wurde eine wesentliche Spezifitätserhöhung erreicht. Beispielsweise ergab ein Schweinegehirnzusatz von 2% ein Messsignal entsprechend 0,3-0,4% Rindergehirn, selbst ein achtprozentiger Schweinegehirnzusatz ergab nur ein relatives Messsignal kleiner 1% Rindergehirn. Allerdings resultierten höhere Gehalte an porcinem ZNS-Material immer noch in einem schwach positiven Ergebnis. Hinsichtlich der ermittelten Spezifitätskennzahl 3 eignete sich vor allem das Testsystem P3/G5-HRP, das bei einem achtprozentigen Rindergehirnzusatz eine Spezifitätskennzahl von 3,6 ergab (Tabelle 4.5). Bei einem einprozentigen Rindergehirnzusatz war die Spezifität der einzelnen Testsysteme gleichwertig. Die Wiederfindungsraten bei den mit Rindergehirn künstlich kontaminierten Probenmaterialien variierten in Abhängigkeit der Kontaminationsstufen (Tabelle 4.5). Die höchsten Wiederfindungsraten traten bei Untersuchung der niedrigsten Kontaminationsstufe auf. Für die mit Rindergehirn kontaminierten Proben ergab sich unter diesen Bedingungen z.B. im Testsystem P3/G5-HRP eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 117% für achtprozentigen Rindergehirnzusatz, wobei die minimale Wiederfindungsrate 66% und die maximale Wiederfindungsrate 175% betrug.

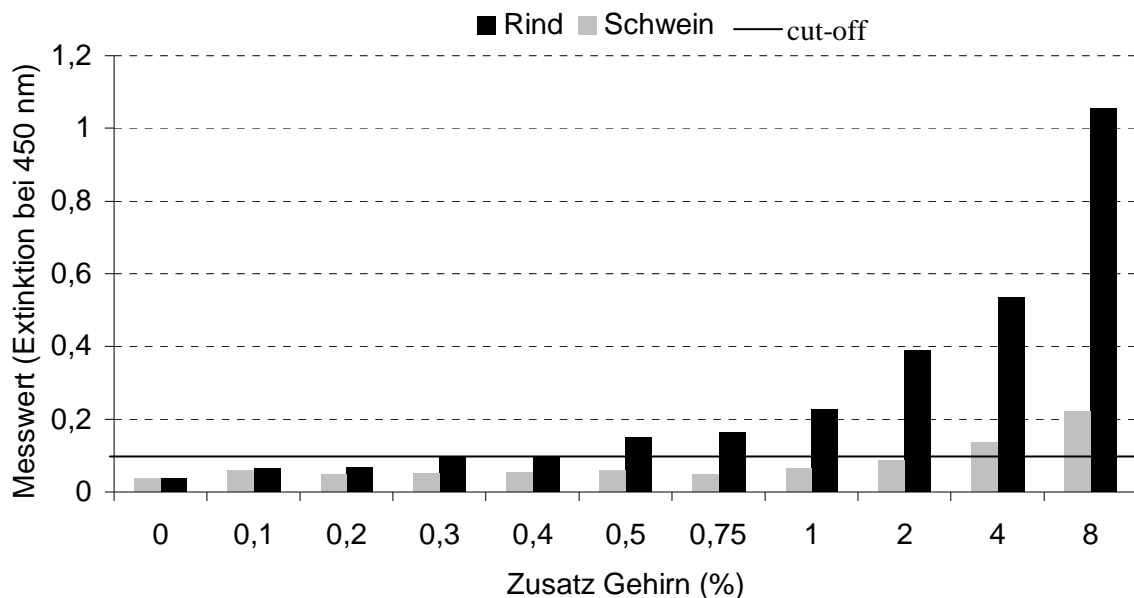


Abbildung 4.14: Beispiel für die Nachweisbarkeit von Zusätzen bovines bzw. porcines Gehirns in Hackfleisch (Schweine-/Rinderhackfleisch 1: 1 gemischt) im Testsystem unter Verwendung von Antikörpern gegen bGFAP-Peptid 2 (P3/G5-HRP). Die Extrakte wurden 1: 50 verdünnt eingesetzt (Gesamtprobenfaktor 500). Die Nachweisgrenzen („cut-off“ Wert 0,1 Extinktionseinheiten) für Zusätze von bovinem Gehirn bzw. porcinem Gehirn lagen bei 0,5% bzw. bei 2-4%.

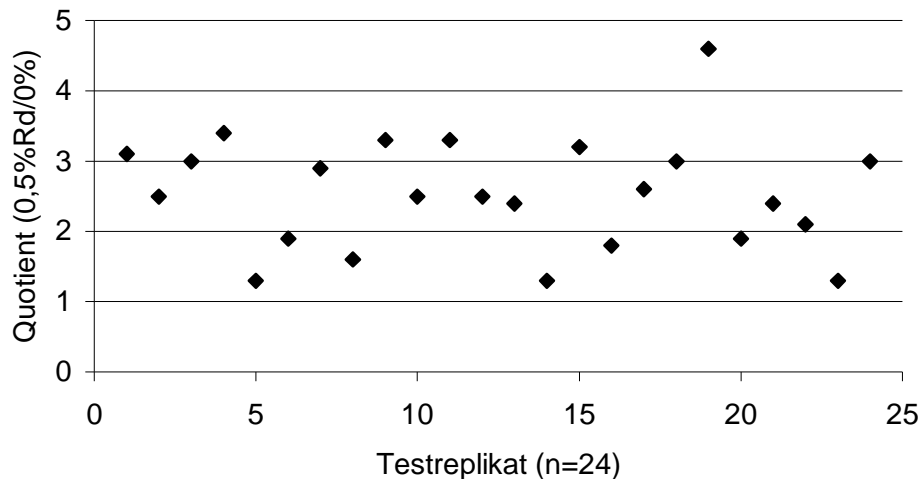


Abbildung 4.15: Zur Überprüfung der Nachweisgrenze wurde für die jeweiligen Testsysteme der Quotient aus dem Messwert (Extinktion bei 450 nm) von 0,5% Rindergehirnzusatz und dem Messwert des ZNS-Negativkontrollansatzes gebildet. 0,5% Rindergehirnzusatz resultierte im hier beispielhaft dargestellten Testsystem P4/G5-HRP im durchschnittlich 2,5fachen Messwert des ZNS-Negativkontrollansatzes.

Tabelle 4.5: Spezifitätskennzahl 3* und Wiederfindungsraten der kontaminierten rohen Probenmaterialien in den GFAP-Sandwich-Enzymimmuntests in Abhängigkeit von den Kontaminationsstufen 1% und 8% Rindergehirn.

Fänger- antikörper	Anteil Rinder- gehirn	Ermittlung unter Verwendung von Detektionsantikörper G5-HRP					Nachweis- grenze
		Spezifitäts- kennzahl 3 (n = 24)	Wiederfindungsrate (%) (n = 19)				
			MW	± SD	min.	max.	
P1	8%	2,7	125	50	62	255	0,5% Rindergehirn
	1%	1,5	327	180	93	722	
P2	8%	2,8	150	73	67	317	
	1%	1,5	346	217	97	754	
P3	8%	3,6	117	40	66	175	
	1%	1,5	364	259	75	807	
P4	8%	2,5	115	42	64	189	
	1%	1,5	231	122	103	480	

min.: minimale; *max.:* maximale; *MW:* Mittelwert; *SD:* Standardabweichung

*Spezifitätskennzahl 3 = Verhältnis der Extinktionen (bei 450 nm) von mit bovinem Gehirn kontaminiertem Probenmaterial zu mit porcinem Gehirn kontaminiertem Probenmaterial

4.1.7 Untersuchung künstlich kontaminierter, erhitzter Probenmaterialien

Für künstlich mit Gehirn kontaminierte Konserven wurde relativ zu nicht erhitztem Gehirn ein schwächeres Messsignal erhalten, wobei das Messsignal mit zunehmendem Erhitzungsgrad schwächer wurde (Abbildung 4.16a). Ausgenommen bei Verwendung des Fängerantikörpers P1 ergaben mit 1% Rindergehirn kontaminierte Kessel- und Dreiviertelkonserven ein deutlich positives Signal über dem „cut-off“ Wert von 0,1 Extinktionseinheiten. Aufgrund der Messsignalunterschiede zwischen den Konzentrationsstufen 0,1% und 1% wurde die Nachweisgrenze für diese Probenmaterialien auf ca. 0,5% Gehirnzusatz abgeschätzt (Abbildung 4.16b). Kesselkonserven mit Zusätzen von Schweinegehirn ergaben dagegen erst ab Zusätzen von ca. 4% ein schwach positives Signal. Damit wurde entsprechend der Untersuchung der künstlich kontaminierten rohen Probenmaterialien für Zusätze von Schweinegehirn der „cut-off“ Wert erst bei rund 8fach höheren Konzentrationen überschritten. Die Nachweisgrenze für mit Rindergehirn kontaminierte Vollkonserven lag im Konzentrationsbereich von 1-1,5%. Unter Verwendung von Antiserum P1 als Fängerantikörper lag für alle mit Rindergehirn kontaminierten Konserven die Nachweisgrenze bei 2% Rindergehirnzusatz. Die Wiederfindungsraten bei den mit Rindergehirn künstlich kontaminierten Probenmaterialien variierten in Abhängigkeit der Kontaminationsstufen (Tabelle 4.6). Die höchsten Wiederfindungsraten traten bei Untersuchung der niedrigsten Kontaminationsstufe auf. Im Testsystem P3/G5-HRP ergab sich für einen achtprozentigen Rindergehirnzusatz in Kesselkonserven eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 72%, in Dreiviertelkonserven von 68% und in Vollkonserven von 43%, während sich für einen einprozentigen Rindergehirnzusatz eine durchschnittliche Wiederfindungsrate in Kesselkonserven von 148%, in Dreiviertelkonserven von 120% und in Vollkonserven von 100% ergab. Für Kesselkonserven betrug die minimale Wiederfindungsrate 49% und die maximale Wiederfindungsrate 175%. Für Dreiviertelkonserven betrug die minimale 49% und die maximale Wiederfindungsrate 155%. Für Vollkonserven betrug die minimale Wiederfindungsrate 33%, während die maximale Wiederfindungsrate 105% betrug. Für die in jedem Testsystem mitgeführte Positivkontrolle (2% Rindergehirn in Hackfleisch) ergab sich in Abhängigkeit vom verwendeten Fängerantikörper eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 136% (P1/G5-HRP), 126% (P2/G5-HRP), 150% (P3/G5-HRP) bzw. 91% (P4/G5-HRP). Die minimale Wiederfindungsrate betrug 78% (P4/G5-HRP), während die maximale Wiederfindungsrate 191% (P3/G5-HRP) betrug.

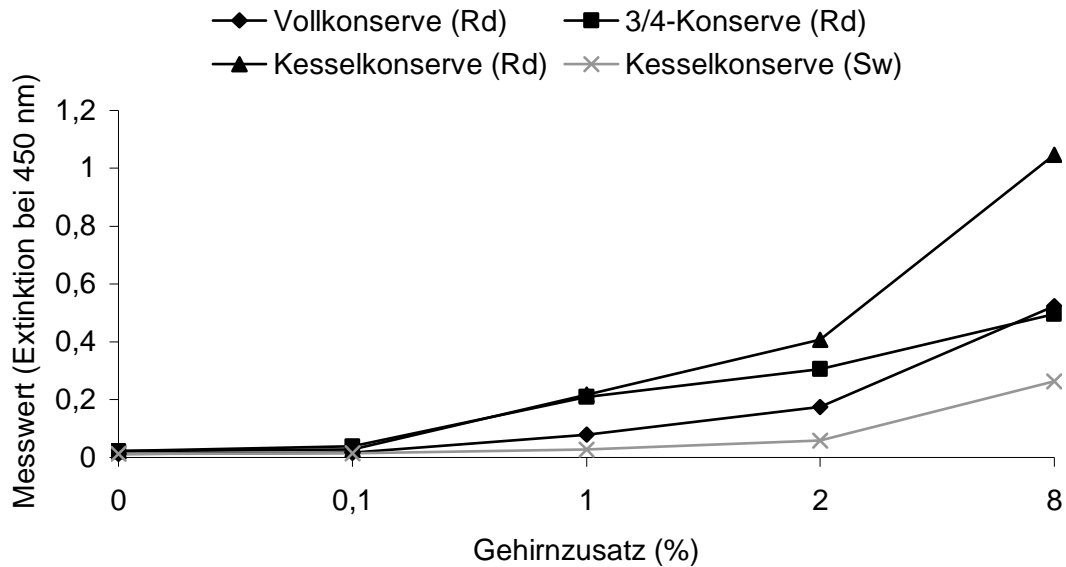


Abbildung 4.16a: Beispiel für die Nachweisbarkeit von GFAP in Konserven unter Verwendung des Enzymimmuntests für GFAP bei Einsatz von anti-bGFAP-Peptid 2-Antiserum P3 als Fängerantikörper mit Detektionsantikörper G5-HRP.

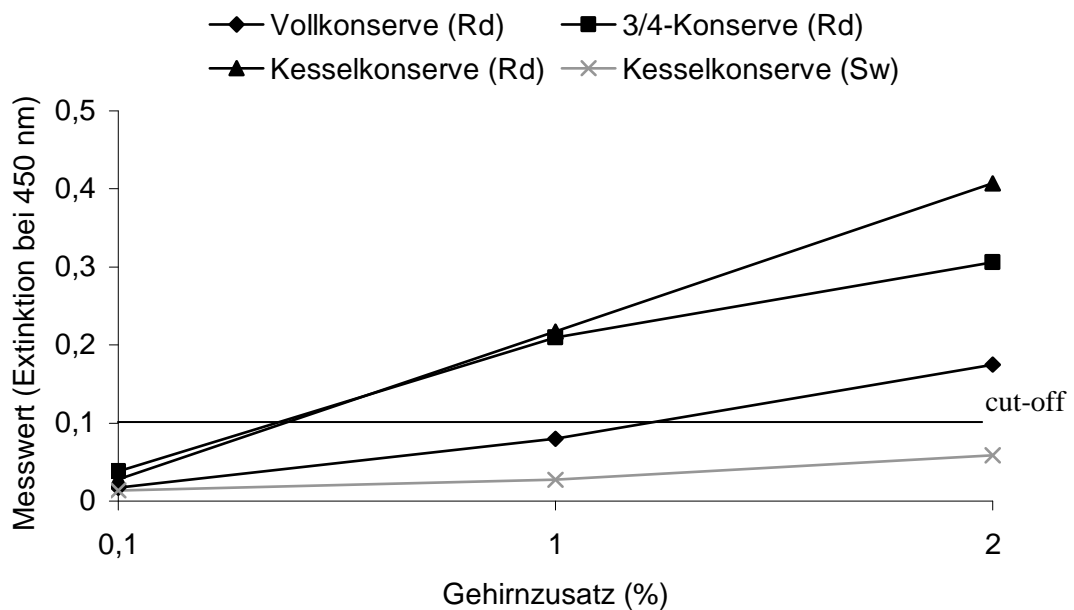


Abbildung 4.16b: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 1.16a zur Verdeutlichung der Nachweisgrenze für GFAP in Konserven. Während ein Zusatz von Rindergehirn in Kessel- und Dreiviertelkonserven in der Regel bereits ab Gehalten von ca. 0,5% nachweisbar war, ergab ein Zusatz von Schweinegehirn in Kesselkonserven erst ab Gehalten von ca. 4% ein positives Ergebnis.

Tabelle 4.6: Wiederfindungsraten der kontaminierten erhitzten Probenmaterialien in den GFAP-Sandwich-Enzymimmuntests in Abhängigkeit von den Kontaminationsstufen 1% und 8% Rindergehirn.

Fänger- antikörper	Anteil Rindergehirn	Mittelwert der Wiederfindungsrate (%) (n = 3)		
		Vollkonserve	$\frac{3}{4}$ -Konserve	Kesselkonserve
P1	8%	37	65	69
	1%	n.a.	n.a.	n.a.
P2	8%	33	56	65
	1%	90	116	150
P3	8%	43	68	72
	1%	100	120	148
P4	8%	37	46	51
	1%	77	66	92

n.a.: nicht auswertbar, da Meßwert unterhalb der Nachweisgrenze

4.1.8 Kreuzreaktivität mit den Spezies Schaf und Ziege

Im Hinblick auf die Spezifität gegenüber Gehirnzusätzen anderer Wiederkäuerspezies zeigte sich, dass auch Gehirn von Schaf und Ziege zu positiven Messergebnissen führen würde (Abbildung 4.17). Je nach verwendetem Antiserum konnte für ZNS-Material der Tierart Schaf eine Kreuzreaktivität von 103-190% und für ZNS-Material der Tierart Ziege eine Kreuzreaktivität von 47-53% berechnet werden. Eine Übersicht der ermittelten Kreuzreaktivitäten unter Verwendung der bGFAP-Peptid-Antiseren als Fängerantikörper gibt Tabelle 4.7. Für die mitgeführte Positivkontrolle (2% Rindergehirn in Hackfleisch) ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 181% (93-296%).

Tabelle 4.7: Kreuzreaktivität für ZNS-Material der Tierarten Schaf und Ziege unter Verwendung der bGFAP-Peptid-Antiseren als Fängerantikörper in Kombination mit Detektionsantikörper G5-HRP.

Fängerantikörper	Kreuzreaktivität (%)	
	Schaf	Ziege
P1	154	47
P2	185	53
P3	190	50
P4	103	52

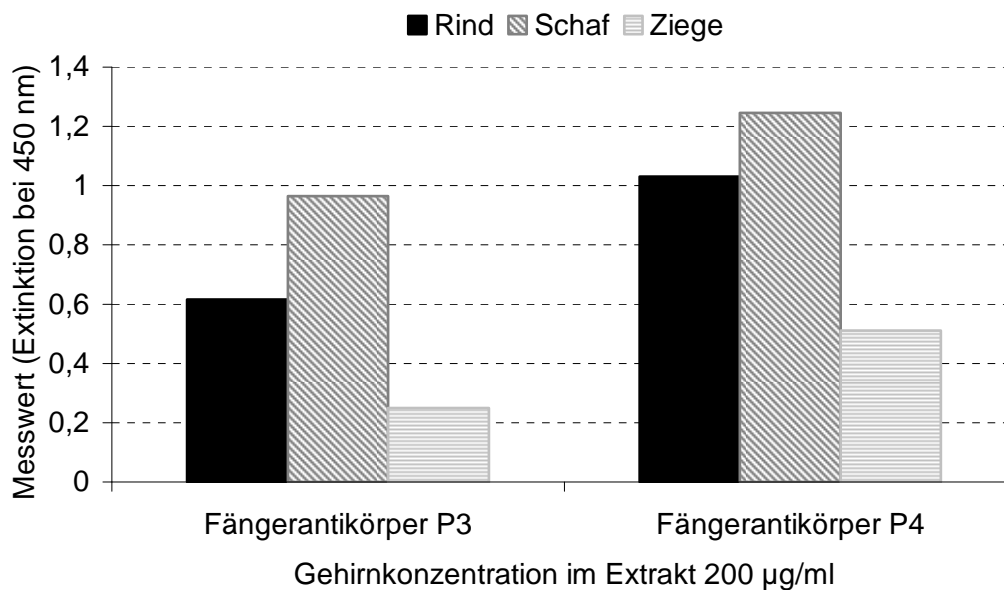


Abbildung 4.17: Beispiel für die Reaktivität (Extinktion bei 450 nm) von Gehirnextrakt (Konzentration jeweils 200 µg Gehirnäquivalent/ml Extrakt) verschiedener Wiederkäuerspezies im Sandwich-Enzymimmuntest für GFAP unter Verwendung des Fängerantikörpers P3 bzw. P4 und des Detektionsantikörpers G5-HRP. Mit Fängerantikörper P3 (P4) konnte für ZNS-Material der Spezies Schaf eine Kreuzreaktivität von 190% (103%) und für ZNS-Material der Tierart Ziege eine Kreuzreaktivität von 50% (52%) berechnet werden.

4.1.9 Kreuzreaktivität mit den Spezies Pferd, Pute, Huhn und Kaninchen

Im Hinblick auf die Spezifität gegenüber Gehirnzusätzen anderer Spezies außer Schwein, zeigte sich, dass auch Gehirn von Pferd und Kaninchen zu positiven Messergebnissen führen würde, während Gehirn von Pute und Huhn stets negativ waren (Tabelle 4.8, Abbildung 4.18, Abbildung 4.19). Die über Rindergehirnstandardextraktkurven berechneten Kreuzreaktivitäten für ZNS-Material der Spezies Pferd und Kaninchen unter Verwendung der bGFAP-Peptid-Antiseren als Fängerantikörper in Kombination mit Detektionsantikörper G5-HRP sind in Tabelle 4.9 dargestellt. Je nach verwendetem Fängerantikörper ergaben sich dabei für ZNS-Material der Spezies Pferd Kreuzreaktivitäten von 63-68% und für ZNS-Material der Spezies Kaninchen Kreuzreaktivitäten von 46-59%. Für die Positivkontrolle (2% Rindergehirnzusatz in Hackfleisch) ergaben sich durchschnittliche Wiederfindungsraten von 272% (P1), von 317% (P2), von 214% (P3) bzw. von 153% (P4). Die minimale Wiederfindungsrate betrug 70% (P4). Die maximale Wiederfindungsrate betrug 535% (P2).

Tabelle 4.8: Beurteilung der Reaktivität der Sandwich-Enzymimmuntests auf der Basis von Antikörpern gegen bGFAP-Peptide mit Gehirnmateriale verschiedener Spezies.

Fängerantikörper	Beurteilung der Reaktivität mit Gehirn der Tierart											
	Pferd			Kaninchen			Pute			Huhn		
	8%	2%	1%	8%	2%	1%	8%	2%	1%	8%	2%	1%
P1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
P3	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
P4	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+: Reaktivität vorhanden (Extinktion bei 450 nm $\geq 0,1$ Einheiten); -: keine Reaktivität

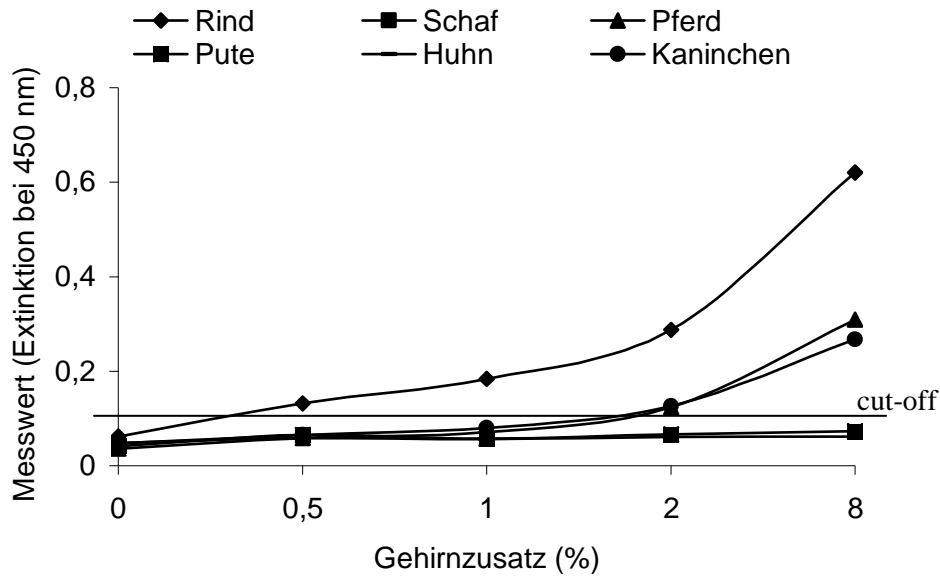


Abbildung 4.18: Beispiel für die Reaktivität (Extinktion 450 nm) von Gehirnmateriale verschiedener Spezies im Sandwich-Enzymimmuntest für GFAP auf der Basis von Antikörpern gegen bGFAP-Peptid 2 (Antiserum P3) als Fängerantikörper und G5-HRP als Detektionsantikörper.

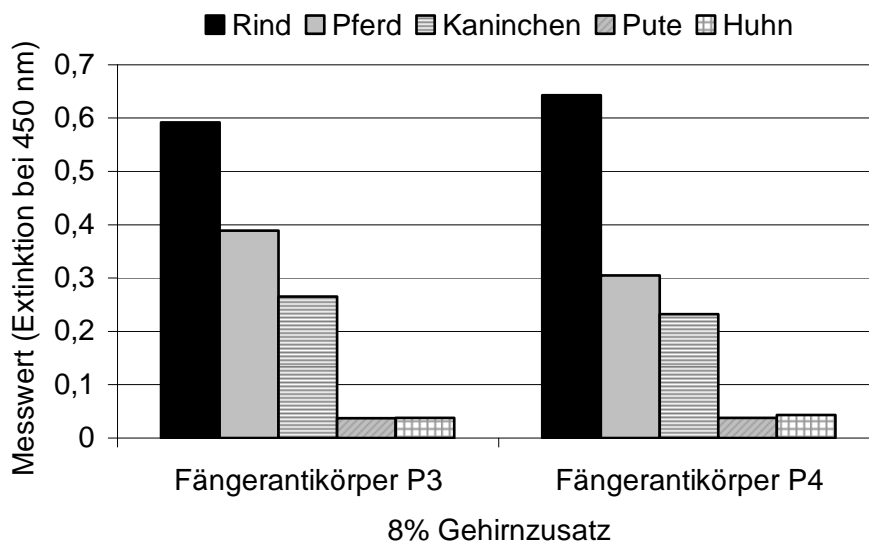


Abbildung 4.19: Beispiel für die Reaktivität (Extinktion 450 nm) eines achtprozentigen Gehirnzusatzes verschiedener Spezies im Sandwich-Enzymimmuntest für GFAP auf der Basis von Antikörpern gegen bGFAP-Peptid 2 als Fängerantikörper und G5-HRP als Detektionsantikörper. Mit Antiserum P3 (P4) konnte für Gehirnmateriale der Spezies Pferd eine Kreuzreaktivität von 63% (65%) und für Gehirnmateriale der Spezies Kaninchen eine Kreuzreaktivität von 50% (46%) berechnet werden.

Tabelle 4.9: Kreuzreaktivität für ZNS-Material der Spezies Pferd und Kaninchen unter Verwendung der bGFAP-Peptid-Antiseren als Fängerantikörper in Kombination mit Detektionsantikörper G5-HRP.

Fängerantikörper	Kreuzreaktivität (%)	
	Pferd	Kaninchen
P1	68	59
P2	66	48
P3	63	50
P4	65	46

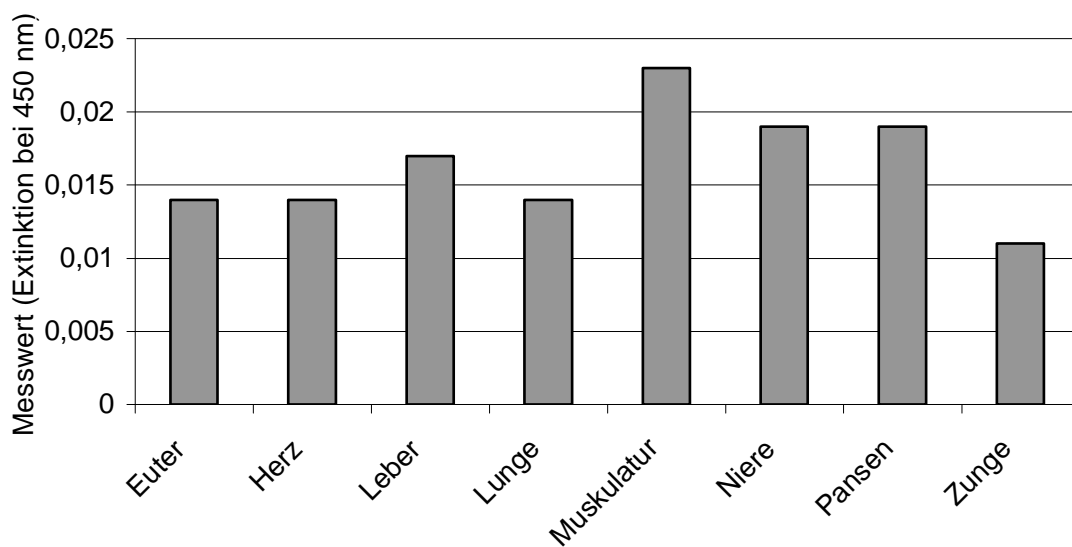
4.1.10 Gewebespezifität der Testsysteme

Eine weitergehende Prüfung der Testspezifität unter Verwendung weiterer Gewebearten zeigte, dass die Testsysteme mit anti-bGFAP-Peptid-Fängerantikörpern und Detektionsantikörper G5-HRP deutlich ZNS-spezifisch sind. Selbst in hohen Konzentrationen ergaben weder Muskulatur von Schwein und Rind (beispielhaft aus der Lendenregion entnommen) noch zahlreiche Organe adulter Rinder positive Ergebnisse oberhalb des „cut-off“ Wertes von 0,1 Einheiten (Tabelle 4.10). Die Messwerte der eingesetzten Proben entsprachen den niedrigen Werten für den ZNS-Negativkontrollansatz, der durchschnittlich 0,03 Extinktionseinheiten betrug (Abbildung 4.20). Eine Quantifizierung der Proben anhand der Rindergehirnstandardextraktkurve war aus diesem Grund überflüssig. Im Rahmen von 24 Testdurchführungen ergab sich für den ZNS-Positivkontrollansatz (2% Rindergehirnzusatz) eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 156%. Die minimale Wiederfindungsrate betrug 93%, während die maximale Wiederfindungsrate 271% betrug.

Tabelle 4.10: Beurteilung der Reaktivität der Sandwich-Enzymimmuntests auf der Basis von Antikörpern gegen bGFAP-Peptide mit weiteren Gewebearten. Die Bewertungsgrundlage stellten sechs Testdurchführungen je Fängerantikörper dar.

untersuchtes Gewebe	Beurteilung der Reaktivität unter Verwendung von Detektionsantikörper G5-HRP und Fängerantikörper			
	P1	P2	P3	P4
Euter	-	-	-	-
Herz	-	-	-	-
Leber	-	-	-	-
Lunge	-	-	-	-
Muskulatur	-	-	-	-
Niere	-	-	-	-
Pansen	-	-	-	-
Zunge	-	-	-	-

-. keine Reaktivität vorhanden (Extinktion <0,1 Extinktionseinheiten)



untersuchtes Gewebe in einer Extraktkonzentration von 2 mg/ml

Abbildung 4.20: Beispiel für die Reaktivität (Extinktion bei 450 nm) von verschiedenen Geweben in einer Extraktkonzentration von 2 mg/ml im Sandwich-Enzymimmuntest für GFAP auf der Basis von Antikörpern gegen bGFAP-Peptid 2 (Antiserum P3) als Fängerantikörper und G5-HRP als Detektionsantikörper. Die Proben ergaben mit der Negativkontrolle vergleichbare Messwerte.

4.1.11 Untersuchung von Handelsproben

Eine Untersuchung von Handelsproben zeigte, dass bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen gebräuchliche Zutaten keinen Einfluss auf Testsysteme mit anti-bGFAP-Peptid-Fängerantikörpern und Detektionsantikörper G5-HRP haben. Selbst in hohen Konzentrationen ergaben die Proben negative Ergebnisse unterhalb des „cut-off“ Wertes von 0,1 Extinktionseinheiten (Tabelle 4.11). Eine Quantifizierung der Proben anhand der Rindergehirnstandardextraktkurve erübrigte sich. Die Messwerte der eingesetzten Proben entsprachen den niedrigen Werten für den ZNS-Negativkontrollansatz, der durchschnittlich 0,031 Extinktionseinheiten betrug (Abbildung 4.21). Während der ZNS-Negativkontrollansatz (reines Hackfleisch) Messwerte im Bereich von 0,019 bis 0,044 Extinktionseinheiten ergab, resultierte reiner Verdünnungspuffer (0,5% Triton-X-100/PBS) in vergleichbaren Messwerten im Bereich von 0,01 bis 0,031 Extinktionseinheiten. Je nach verwendetem anti-bGFAP-Peptid-Antiserum ergab sich für den ZNS-Positivkontrollansatz (2% Rindergehirnzusatz entsprechend 40 µg Gehirnäquivalent/ml Extrakt) eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 111-137% (Tabelle 4.11). Die minimale Wiederfindungsrate betrug 50%, während die maximale Wiederfindungsrate 293% betrug. Die Testsysteme eigneten sich grundsätzlich auch für die Untersuchung von Hautcreme- und Fruchtgummiprüfungen, die ebenfalls negative Ergebnisse lieferten. Demnach konnte in keiner der 69 Einzelhandelsproben bovines ZNS-Material nachgewiesen werden.

Tabelle 4.11: Qualitative Ergebnisse der Untersuchung von Einzelhandelsproben in Sandwich-Enzymimmuntests auf der Basis von Antikörpern gegen bGFAP-Peptid.

	Ergebnisse der Probenuntersuchung unter Verwendung von Detektionsantikörper G5-HRP und Fängerantikörper			
	P1 (n = 6)	P2 (n = 6)	P3 (n = 7)	P4 (n = 22)
Probe 1 bis	-	-	-	-
Probe 69	-	-	-	-
Wiederfindungsrate (MW; %)	155 ± 74	122 ± 54	108 ± 39	125 ± 35
± SD (min.; max.)	(81-293)	(86-229)	(50-167)	(66-178)

–: kein bovines ZNS-Material nachweisbar (Extinktion <0,1 Extinktionseinheiten); MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; min.: minimal; max.: maximal.

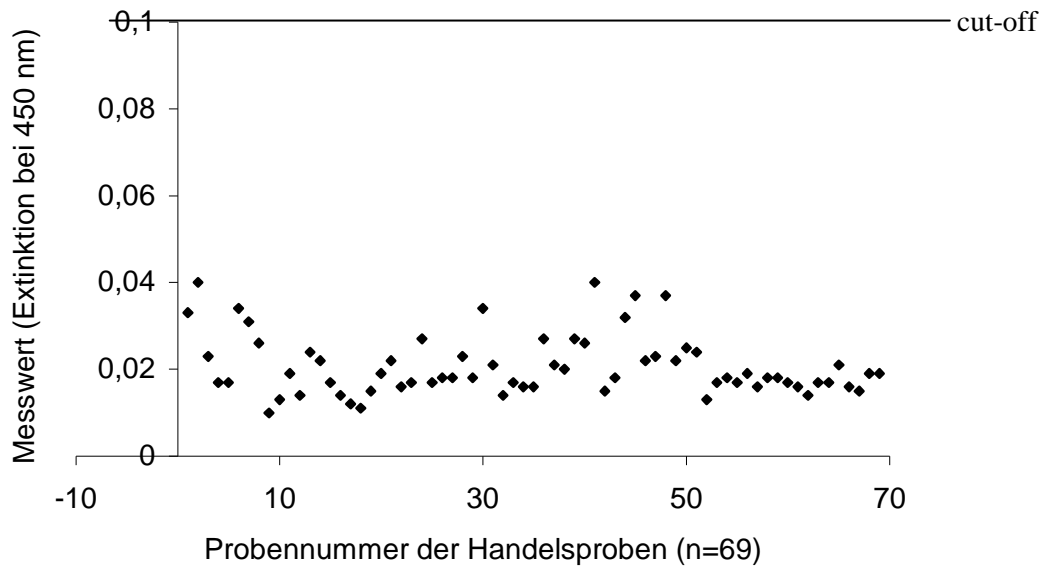


Abbildung 4.21: Beispiel für die Reaktivität (Extinktion bei 450 nm) der Handelsproben in einer Extraktkonzentration von 2 mg/ml im Sandwich-Enzymimmuntest für GFAP auf der Basis von Antikörpern gegen bGFAP-Peptid 2 (Antiserum P3) als Fängerantikörper und G5-HRP als Detektionsantikörper. Die Proben ergaben mit der Negativkontrolle vergleichbare Messwerte.

4.1.12 Festlegung eines Testsystems

Zusammenfassend stellen die beschriebenen Testsysteme für GFAP auf der Basis von Antikörpern gegen GFAP-Proteinabschnitte in Kombination mit Detektionsantikörper G5-HRP eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Spezifität gegenüber bisherigen Verfahren dar, bei vergleichbar hoher Testsensitivität. Allerdings war auch hier kein vollständige Tierartspezifität gegeben. Geflügel-ZNS war stets negativ, Säugetier-ZNS ergab in unterschiedlichem Ausmaß positive Ergebnisse. Insgesamt waren zwischen den immunologischen Eigenschaften aller vier immunisierten Kaninchen nur geringe Unterschiede feststellbar. Als Standardsystem für GFAP wurde aufgrund der etwas besseren Steigung der Standardkurve und der höheren Spezifität bei der Untersuchung von Gehirnextrakt und Extrakt von künstlich kontaminierten Proben das Testsystem P3/G5-HRP festgelegt.

4.1.13 Standardisiertes Extraktionsverfahren

4.1.13.1 Einfluss verschiedener Extraktionsmittel

Die Überprüfung des Einflusses verschiedener Extraktionsmittel auf den Sandwich-Enzymimmuntest für GFAP (P3/G5-HRP) zeigte, dass sich von den untersuchten Extraktionsmitteln einzig 1% SDS/A.dest. und 1% Tween/PBS zur Extraktion von GFAP aus Rindergehirn eignen (Abbildung 4.22). Da sich unter Verwendung des Extraktionsmittels 1% SDS/A.dest. die höchsten Messwerte ergaben, wurde es als Standardextraktionsmittel definiert. Ein wesentlicher Vorteil lag zudem in der Tatsache, dass die gleiche Extraktion auch für den Nachweis von MBP geeignet war.

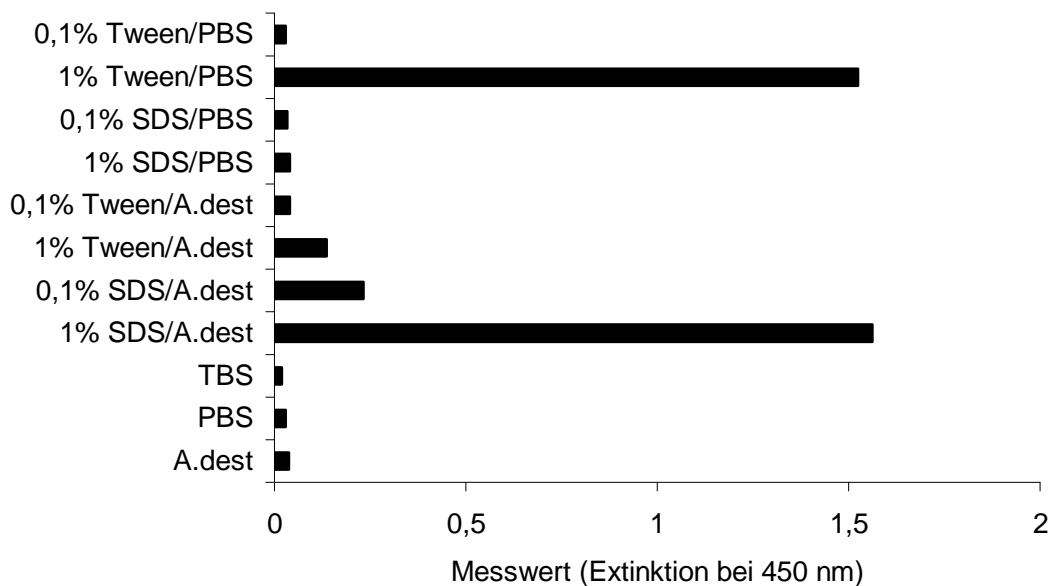


Abbildung 4.22: Beispiel für die Reaktivität (Extinktion bei 450 nm) von Rindergehirn (2 mg Gehirnäquivalent/ml Extrakt), welches mit verschiedenen Extraktionsmitteln extrahiert wurde, im Sandwich-Enzymimmuntest für GFAP auf der Basis von Antikörpern gegen bGFAP-Peptid 2 (Antiserum P3) als Fängerantikörper und G5-HRP als Detektionsantikörper. Von den untersuchten Extraktionsmitteln eignete sich einzig 1% SDS/A.dest. und 1% Tween/PBS.

4.1.13.2 Reproduzierbarkeit der Standardextraktionsmethode

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Extraktion von GFAP aus Rinder- bzw. Schweinegehirn mittels 1%iger SDS-Lösung bei 95 °C wurde Gehirnstandardmaterial beider Spezies fünfmal an zwei verschiedenen Tagen extrahiert und diese Extrakte

gleichzeitig im Testsystem P3/G5-HRP eingesetzt (Abbildung 4.23). Es zeigte sich, dass die Messwerte für GFAP jeweils nur sehr gering schwankten, so dass hier eine extraktionsbedingte oder durch inhomogenes Material verursachte Über- bzw. Unterschätzung des ZNS-Gehaltes nicht zu erwarten ist.

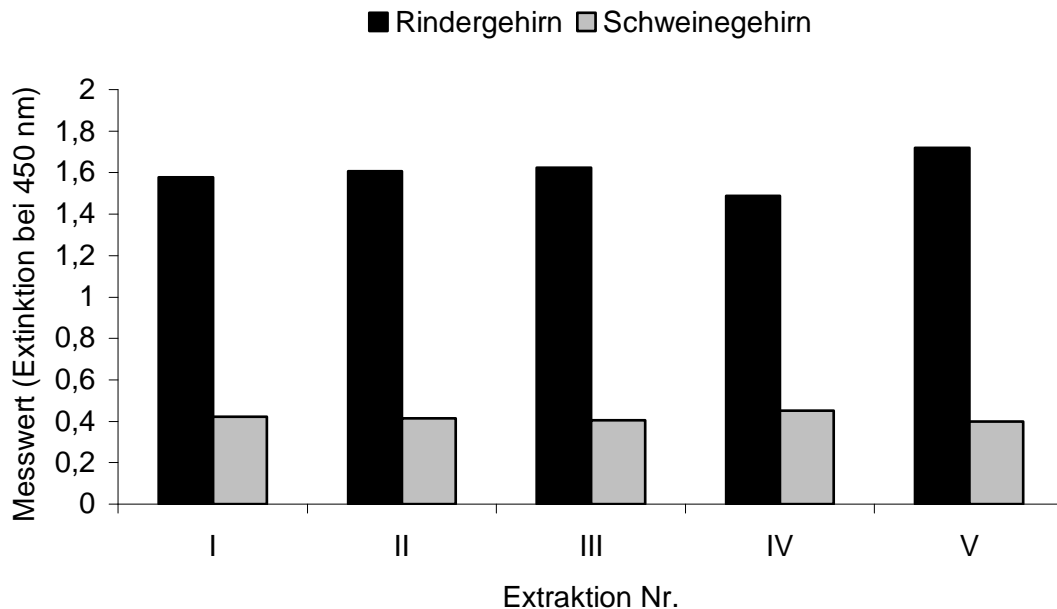


Abbildung 4.23: Beispiel für die Reproduzierbarkeit der Extraktion von GFAP aus Rinder- und Schweinegehirnhomogenisat. Rindergehirn- bzw. Schweinegehirnhomogenisat wurde fünfmal an zwei verschiedenen Tagen (Tag 1: Extraktion I-III; Tag 2: Extraktion IV-V) extrahiert. Die Extrakte wurden jeweils 1: 50 verdünnt (Gesamtprobenfaktor 500) und gleichzeitig im Enzymimmuntest (P3/G5-HRP) eingesetzt. Die Variationskoeffizienten der Messwerte für bovines bzw. porcines Gehirn lagen bei 5,2% bzw. 4,9%.

4.1.14 Haltbarkeit der im Enzymimmuntest verwendeten Reagenzien

Die Haltbarkeit der zur Durchführung des Sandwich-Enzymimmuntests P3/G5-HRP für GFAP benötigten Reagenzien erwies sich über einen Zeitraum von zwei Wochen stabil. Nach Tag 14 war ein deutlicher Einbruch hinsichtlich der Messwerthöhe des Rindergehirnextraktes zu verzeichnen (Abbildung 4.24). Ab der dritten Woche nach Beschichtung der Mikrotiterplatten nahm die Spezifität des Testsystems ab, was sich auch in der Spezifitätskennzahl niederschlägt (Abbildung 4.25). Abbildung 4.26 zeigt den Rinder- bzw. Schweinegehirnextraktkurvenverlauf in Testsystemen, die eine bzw. fünf

Wochen gelagert wurden, wobei sich Spezifitäts- und Sensitivitätsverlust deutlich abzeichnen.

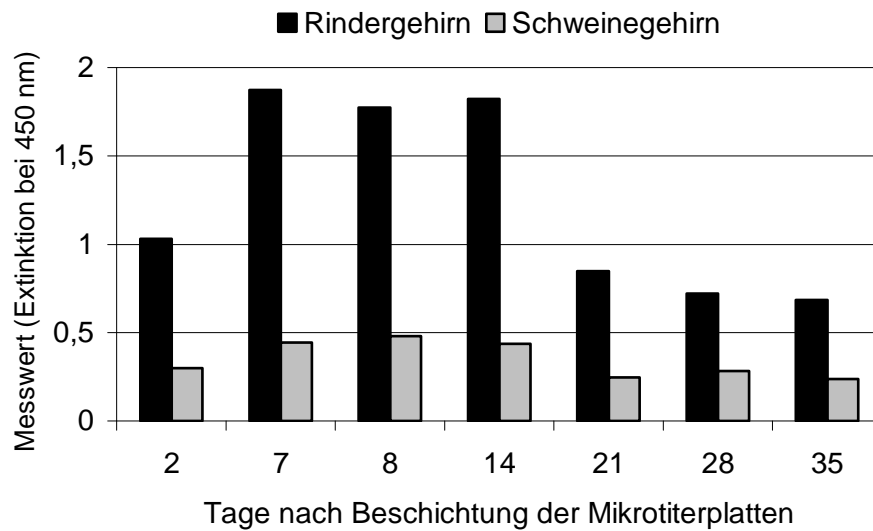


Abbildung 4.24: Vergleich der Messwerte (Extinktion bei 450 nm) für Rinder- und Schweinegehirnextrakt (Extraktkonzentration 2 mg/ml) im Sandwich-Enzymimmuntest P3/G5-HRP über einen Aufbewahrungszeitraum von 35 Tagen.

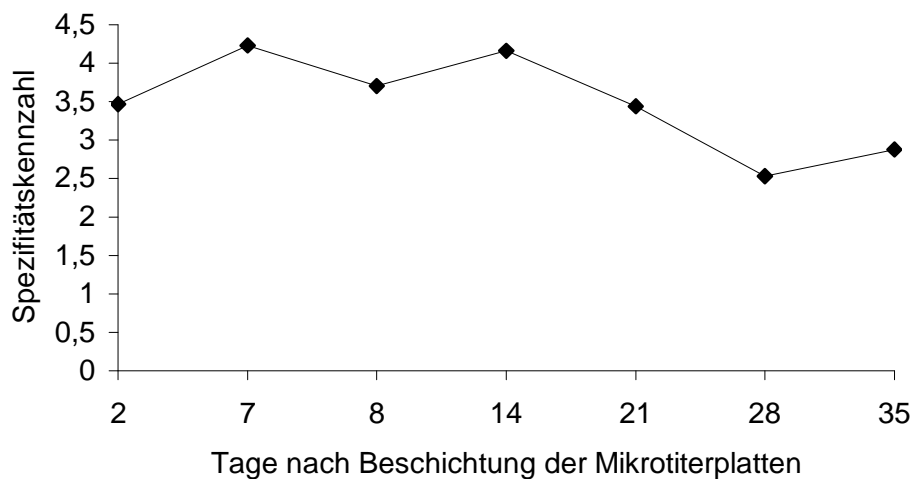


Abbildung 4.25: Vergleich der Spezifitätskennzahlen im Sandwich-Enzymimmuntest P3/G5-HRP über einen Aufbewahrungszeitraum von 35 Tagen. Grundlage für die Berechnung der Spezifitätskennzahlen war eine Extraktkonzentration von 2 mg/ml.

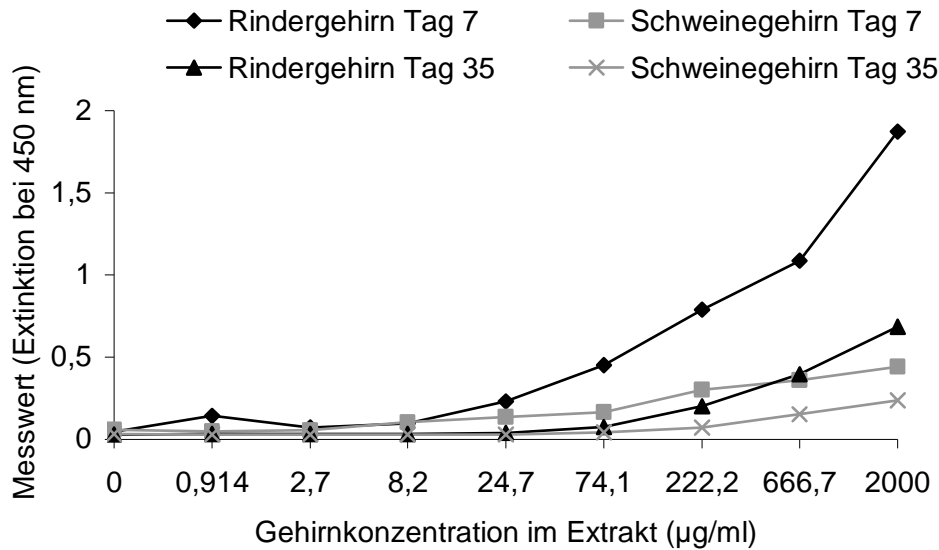


Abbildung 4.26: Kurvenverlauf des Rinder- und Schweinegehirnextraktes im Testsystem P3/G5-HRP, das eine bzw. fünf Wochen gelagert wurde.

4.1.15 GFAP-Gehalt in Rindergehirn

Durch parallele Erstellung von bGFAP-Reinproteinstandardkurven und Rindergehirnextraktstandardkurven auf einer Mikrotiterplatte konnte der Antigengehalt der als Proben definierten Gehirnextraktlösungen mit Hilfe einer kommerziellen Software berechnet werden. Der daraus ermittelte bGFAP-Gehalt in Rindergehirn, der unter Verwendung von Gehirnextraktkonzentrationen von 24,7 bis 2.000 µg/ml berechnet wurde, lag im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 4,5 mg bGFAP/g Rindergehirn (Tabelle 4.12). Der bGFAP-Gehalt betrug im Mittel 0,85 mg/g. Mit anti-bGFAP-Peptid 1-Antiseren P1 und P2 wurde ein Gehalt von 0,3 mg/g bzw. 0,25 mg/g ermittelt. Mit anti-bGFAP-Peptid 2-Antiseren P3 und P4 wurde ein Gehalt von 0,99 mg/g bzw. 1,88 mg/g berechnet.

Tabelle 4.12: Übersicht der berechneten bGFAP-Gehalte in Rindergehirn unter Verwendung der Gehirnextraktkonzentrationen, die in einem Messwert $\geq 0,1$ Extinktionseinheiten resultierten, bei den verschiedenen anti-bGFAP-Peptid-Antiseren als Fängerantikörper und G5-HRP als Detektionsantikörper.

Beschichtung	berechneter bGFAP-Gehalt in Rindergehirn (mg/g) unter Verwendung einer Gehirnextraktkonzentration von					MW
	2.000 $\mu\text{g/ml}$	666,7 $\mu\text{g/ml}$	222,2 $\mu\text{g/ml}$	74,1 $\mu\text{g/ml}$	24,7 $\mu\text{g/ml}$	
P1	0,17	0,27	0,41	0,48	0,15	0,3
P2	0,13	0,21	0,35	0,43	0,11	0,25
P3	0,23	0,36	2,68	1,56	0,1	0,99
P4	0,32	0,53	4,5	2,67	1,39	1,88

MW: Mittelwert

4.1.16 Charakterisierung der Antikörperspezifität mittels Immunoblot

4.1.16.1 Western Blot des GFAP-Reinproteins und des Gehirnextraktes

Während die elektrophoretisch aufgetrennte bovine GFAP-Reinproteinlösung eine Bande bei einem geschätzten Molekulargewicht von 50 kDa aufwies, ergab die porcine GFAP-Reinproteinlösung drei Banden bei einem Molekulargewicht von 48 kDa, 50 kDa und 52 kDa. Abbildung 4.27 zeigt das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung. Rindergehirnextrakt und Schweinegehirnextrakt resultierten in zahlreichen Banden im Bereich von 16 bis 66 kDa.

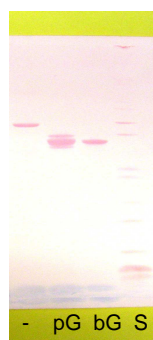
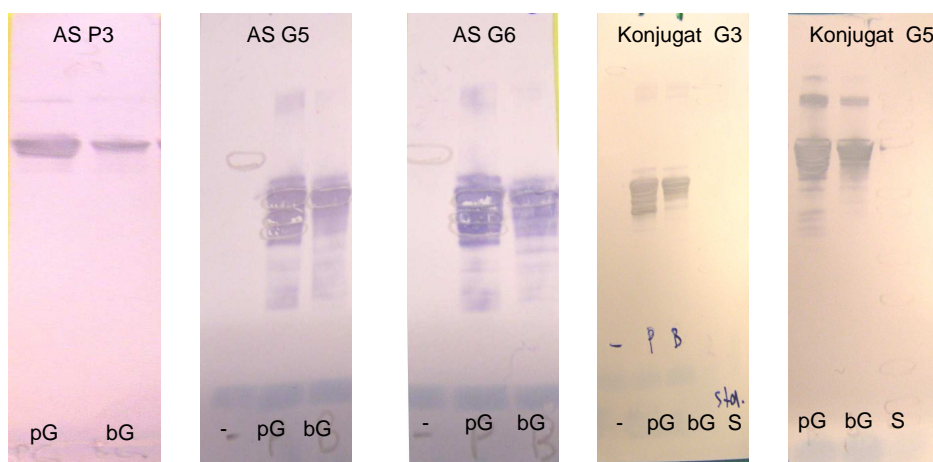


Abbildung 4.27: Elektrophoretisch aufgetrenntes bovines GFAP (*bG*), porcines GFAP (*pG*), bovines Serumalbumin (-) und Molekulargewichtsmarkerprotein (*S*).

4.1.16.2 Charakterisierung der Antiseren und Konjugate im Immunoblot unter Verwendung von GFAP-Reinprotein

Bei der Charakterisierung der anti-bGFAP- und anti-bGFAP-Peptid-Antiseren mit GFAP-Reinprotein zeigte sich unter Verwendung der Antiseren G5 und G6 die intensivste Bandenfärbung. Antiserum G5, P1 und P2 erwiesen sich als bedingt rinderspezifisch. Unter Verwendung dieser Antiseren färbten sich zwar auch die porcinen GFAP-Banden an, jedoch wiesen die bovinen GFAP-Banden eine geringgradig intensivere Färbung auf. Die übrigen Antiseren färbten bovines und porcines Reinprotein vergleichbar an und erwiesen sich somit als rinderunspezifisch (Tabelle 4.13). Keines der untersuchten Antiseren färbte weitere, unspezifische Banden an. Das als ZNS-Negativkontrolle eingesetzte BSA war in allen Fällen ohne sichtbare Bande (Abbildung 4.28).

Bei der Charakterisierung der anti-bGFAP- und anti-bGFAP-Peptid-Konjugate mit GFAP-Reinprotein zeigte sich unter Verwendung des Konjugats G5-HRP die intensivste Bandenfärbung. Alle untersuchten Konjugate färbten bovines und porcines Protein gleichermaßen an und erwiesen sich als rinderunspezifisch (Tabelle 4.14). Die Konjugate färbten weder die ZNS-Negativkontrolle BSA noch weitere, unspezifische Banden an (Abbildung 4.28).



S: Molekulargewichtsmarkerprotein; AS: Antiserum

Abbildung 4.28: Charakterisierung der anti-bGFAP- und anti-bGFAP-Peptid-Antiseren und –Konjugate im Immunoblot mit bovinem GFAP (*bG*) und porcinem GFAP (*pG*). Als ZNS-Negativkontrolle (-) wurde BSA verwendet.

Tabelle 4.13: Charakterisierung der Antiseren im Immunoblot mit GFAP-Reinprotein. Bedingt rinderspezifische Antiseren, die bovines GFAP geringgradig intensiver färbten als porcines GFAP, sind im Fettdruck dargestellt.

Antiserum	Bandenintensität des bGFAPs ¹	Reaktivität mit b/pGFAP ²
G1	++	-
G2	++	-
G3	++	-
G4	++	-
G5	+++	(+)
G6	+++	-
G7	++	-
P1	++	(+)
P2	++	(+)
P3	+	-
P4	+	-

Beurteilung: 1: – keine sichtbare Bande, (+) schwach sichtbare, + gut sichtbare, ++ stark sichtbare, +++ sehr stark sichtbare Bande; 2: – rinderunspezifisch, (+) bedingt rinderspezifisch, + rinderspezifisch

Tabelle 4.14: Charakterisierung der Konjugate im Immunoblot mit GFAP-Reinprotein.

Konjugat	Bandenintensität des bGFAPs ¹	Reaktivität mit b/pGFAP ²
G1-HRP	++	-
G2-HRP	++	-
G3-HRP	++	-
G4-HRP	++	-
G5-HRP	+++	-
G6-HRP	++	-
G7-HRP	++	-
P1-HRP	(+)	-
P2-HRP	(+)	-
P3-HRP	+	-
P4-HRP	+	-

Beurteilung: 1: – keine sichtbare Bande, (+) schwach sichtbare, + gut sichtbare, ++ stark sichtbare, +++ sehr stark sichtbare Bande; 2: – rinderunspezifisch, (+) bedingt rinderspezifisch, + rinderspezifisch

4.1.16.3 Charakterisierung der Antiseren und Konjugate im Immunoblot unter Verwendung von Gehirnextrakten

Bei der Charakterisierung der anti-bGFAP- und anti-bGFAP-Peptid-Antiseren mit Rinder- und Schweinegehirnextrakten zeigte sich unter Verwendung der Antiseren G2, G5 und G6 die intensivste Bandenfärbung. Antiserum P2 und P3 erwiesen sich als bedingt rinderspezifisch. Unter Verwendung dieser Antiseren färbten sich zwar auch im Schweinegehirnextrakt die GFAP-Banden an, jedoch wiesen die Banden im Rindergehirnextrakt eine geringgradig intensivere Färbung auf. Die übrigen Antiseren färbten Banden im Rinder- und Schweinegehirnextrakt vergleichbar an und erwiesen sich somit als rinderunspezifisch (Tabelle 4.15). Keines der untersuchten Antiseren färbte weitere, unspezifische Banden an. Das als ZNS-Negativkontrolle eingesetzte BSA war in allen Fällen ohne sichtbare Bande (Abbildung 4.29).

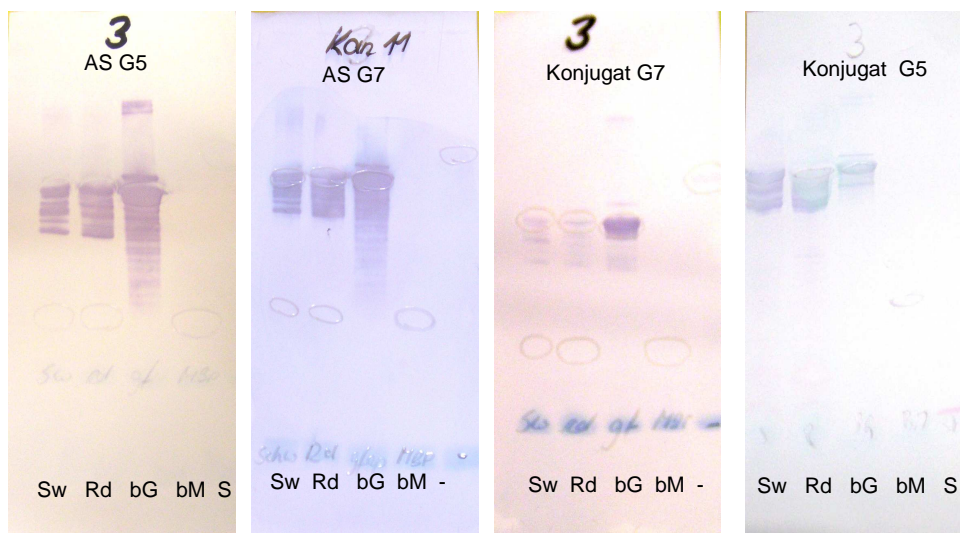
Bei der Charakterisierung der anti-bGFAP- und anti-bGFAP-Peptid-Konjugate mit Rinder- und Schweinegehirnextrakt zeigte sich unter Verwendung des Konjugats G5-HRP die intensivste Bandenfärbung. Zudem erwies sich Konjugat G5-HRP als bedingt rinderspezifisch, indem es die GFAP-Bande in Rindergehirnextrakt geringgradig intensiver anfärbte als in Schweinegehirnextrakt. Die übrigen untersuchten Konjugate färbten bovines und porcines Protein gleichermaßen an und erwiesen sich als rinderunspezifisch (Tabelle 4.16). Alle Konjugate färbten weder die ZNS-Negativkontrolle BSA noch weitere, unspezifische Banden an (Abbildung 4.29).

Beim Vergleich verschiedener Extraktionsmittel im Immunoblot mit Antiserum P3 und anti-Kaninchen-Detektionsantikörpern konnte mit 1% SDS/A.dest., 0,1% SDS/A.dest. und 1% Tween/PBS extrahiertes bovines GFAP nachgewiesen werden. Nach Extraktion mit den übrigen Extraktionsmitteln wurden keine GFAP-Banden sichtbar. Das mit 1% SDS/A.dest. extrahierte porcine GFAP resultierte in vergleichbarer Bandenstärke wie ebenso extrahiertes bovines GFAP (Tabelle 4.17).

Tabelle 4.15: Charakterisierung der Antiseren im Immunoblot mit Gehirnextrakt. Bedingt rinderspezifische Antiseren, die bovines GFAP geringgradig intensiver färbten als porcines GFAP, sind im Fettdruck dargestellt.

Antiserum	Bandenintensität des bGFAPs ¹	Reaktivität mit Rinder- und Schweinegehirn ²
G1	++	-
G2	+++	-
G3	++	-
G4	+	-
G5	+++	-
G6	+++	-
G7	++	-
P1	+	-
P2	++	(+)
P3	+	(+)
P4	+	-

Beurteilung: 1: – keine sichtbare Bande, (+) schwach sichtbare, + gut sichtbare, ++ stark sichtbare, +++ sehr stark sichtbare Bande; 2: – rinderunspezifisch, (+) bedingt rinderspezifisch, + rinderspezifisch



AS: Antiserum; bM: bovines MBP

Abbildung 4.29: Charakterisierung der anti-bGFAP- und anti-bGFAP-Peptid-Antiseren und –Konjugate im Immunoblot mit Rindergehirnextrakt (Rd), Schweinegehirnextrakt (Sw) und bovinem GFAP (bG). Als ZNS-Negativkontrolle wurde BSA (-) bzw. Molekulargewichtsmarkerprotein (S) verwendet.

Tabelle 4.16: Charakterisierung der Konjugate im Immunoblot mit Gehirnextrakt. Bedingt rinderspezifische Antiseren, die bovines GFAP geringgradig intensiver färbten als porcines GFAP, sind im Fettdruck dargestellt.

Konjugat	Bandenintensität des bGFAPs ¹	Reaktivität mit Rinder- und Schweinegehirn ²
G1-HRP	++	-
G2-HRP	++	-
G3-HRP	++	-
G4-HRP	++	-
G5-HRP	+++	(+)
G6-HRP	++	-
G7-HRP	++	-
P1-HRP	(+)	-
P2-HRP	(+)	-
P3-HRP	(+)	-
P4-HRP	(+)	-

Beurteilung: 1: – keine sichtbare Bande, (+) schwach sichtbare, + gut sichtbare, ++ stark sichtbare, +++ sehr stark sichtbare Bande; 2: – rinderunspezifisch, (+) bedingt rinderspezifisch, + rinderspezifisch

Tabelle 4.17: Vergleich verschiedener Extraktionsmittel im Immunoblot mit Antiserum P3 und anti-Kaninchen-Detektionsantikörper.

Gehirn von Tierart	Extraktionsmittel	GFAP-Nachweis
	A.dest.	-
	PBS	-
	TBS	-
	1% SDS/A.dest.	+
Rind	0,1% SDS/A.dest.	+
	1% Tween/A.dest.	-
	0,1% Tween/A.dest.	-
	1% SDS/PBS	-
	1% Tween/PBS	+
Schwein	1% SDS/A.dest.	+

Beurteilung: + GFAP-Bande sichtbar; - keine GFAP-Bande sichtbar

4.2 Ergebnisse für einen MBP-Sandwich-Enzymimmuntest

4.2.1 Herstellung der Immunreagenzien

4.2.1.1 Gewinnung spezifischer Antiseren und Immunisierungsverlauf

Bei der spektrophotometrischen Bestimmung der bMBP-Konzentration in der aufgereinigten Immunogenlösung wies das Protein bei einem Absorptionsmaximum von ca. 276 nm eine mit der eingesetzten Konzentration vergleichbare Absorption auf. Deshalb wurde bei der Festlegung einer Impfdosis von 250 µg bMBP/Tier davon ausgegangen, dass die Immunogenlösung nach der Ultrazentrifugation die eingesetzte MBP-Menge enthielt. In den Antiseren aller mit bMBP immunisierten Tiere konnten ab der 5. Woche spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Allerdings waren hier deutliche Unterschiede hinsichtlich der Antiserentiterhöhe zu beobachten. Das Tier M2 wies mit Abstand die höchsten Antiserentiter auf. Die erste Restimulierung in der 4. Immunisierungswoche führte bei Kaninchen M1 und M2 zu einem deutlichen Antiserentiteranstieg, der jedoch nur bei Kaninchen M2 von Dauer war. Bei Kaninchen M3 beeinflusste sowohl die erste als auch die zweite Restimulierung den Antiserumtiter nur geringfügig (Abbildung 4.30). Bei vergleichender Titration unter Verwendung von bovinem und porcinem MBP als Festphasenantigen zeigte sich, dass auch hier für die Antiseren aller Tiere eine ausgeprägte Reaktivität mit porcinem MBP vorlag, die bezüglich der erreichten Messwerte bei einer Proteinbeschichtung von jeweils 1 µg/ml für porcines MBP sogar über derjenigen von bovinem MBP lag (Abbildung 4.31).

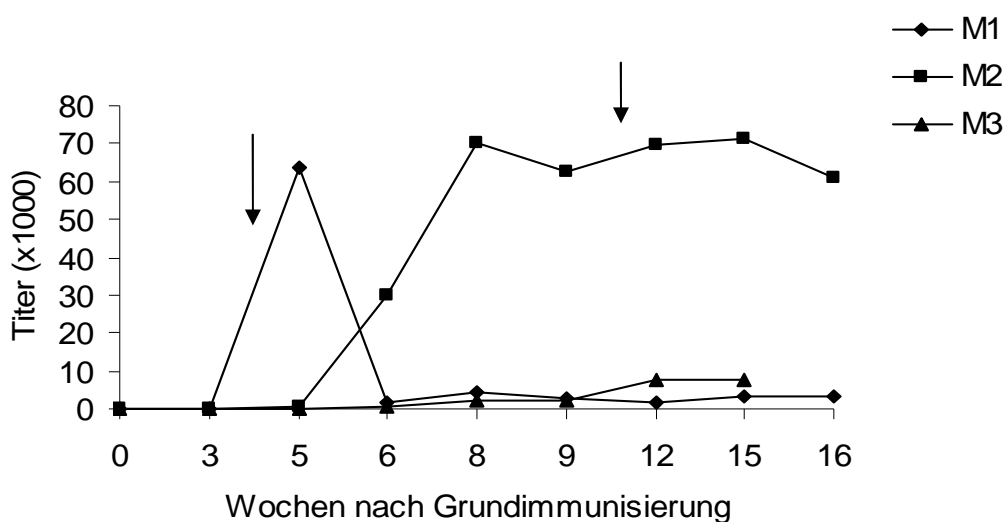


Abbildung 4.30: Vergleich der Antiserentiter von drei mit bMBP immunisierten Kaninchen. Die Titerbestimmung erfolgte unter Verwendung von bMBP als Festphasenantigen. Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Restimulierungen.

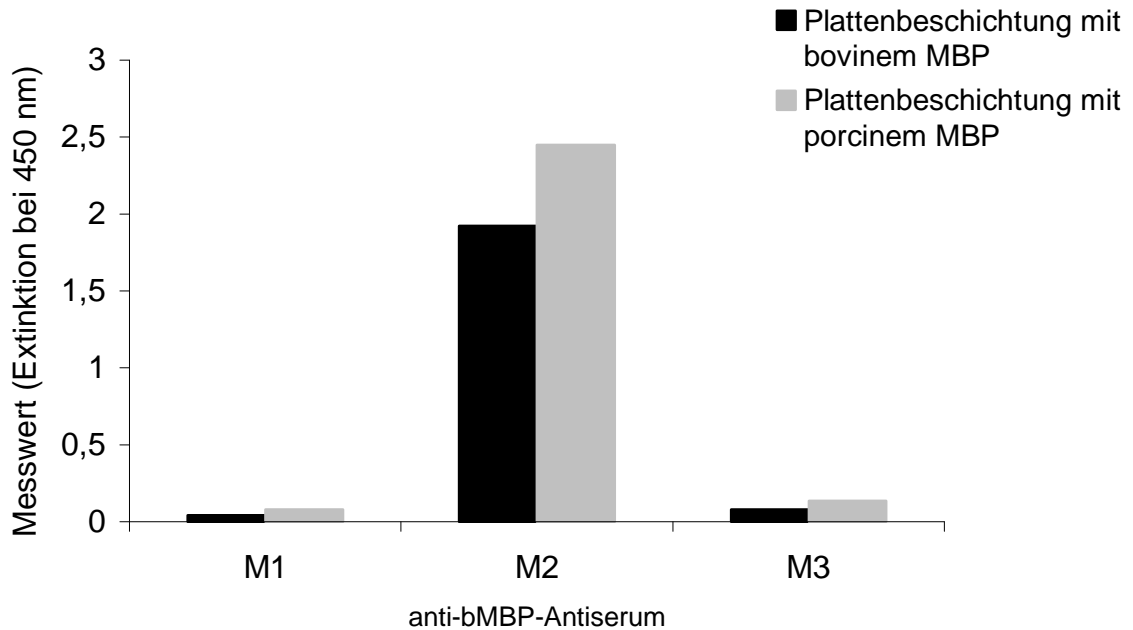


Abbildung 4.31: Vergleich der Messwerte in der Titerbestimmung der mit bMBP immunisierten Kaninchen (eingesetzte Verdünnung der Antiseren jeweils 1: 2.700) bei Verwendung von bMBP bzw. pMBP als Festphasenantigen im indirekten Enzymimmuntest. Die Antiseren aller Tiere zeigten deutlich stärkere Reaktivität mit porcinem Protein als mit dem zur Immunisierung verwendeten bovinen Protein.

4.2.1.2 Aufbereitung der Antiseren und Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten

Zunächst wurden Antiseren solcher Wochen gefällt, in denen ein relativ hoher Antikörpertiter nachgewiesen werden konnte. Im Rahmen dessen wurden von allen Kaninchen die Antiseren der 6., 8. und 15. Immunisierungswoche gefällt. Nach Beendigung der Immunisierungsphase wurden Antiseren der verschiedenen Abnahmen, die vergleichbar hohe spezifische Antiserumtiter aufwiesen gepoolt und anschließend gefällt. Für Kaninchen M1 wurde ein Antiserumpool aus den Antiseren der 5. bis 16. Woche gebildet. Für Kaninchen M2 wurde ein Antiserumpool aus den Antiseren der 6. bis 16. Woche und für Kaninchen M3 aus den Antiseren der 8. bis 15. Woche gebildet. Tabelle 4.18 zeigt beispielhaft einige Ergebnisse der spektrophotometrisch bestimmten IgG-Rohfraktionengehalte.

Für die Herstellung eines enzymmarkierten Antiserums mit ausreichender spezifischer Aktivität erwies sich einzig das gefällte Antiserum des Tieres M2 als geeignet. Mit der unter 3.2.1.2 beschriebenen Kopplungsmethode konnte bereits unter Verwendung eines Antiserums der 6. Immunisierungswoche ein Antikörper-Enzym-Konjugat (M2-HRP) hergestellt werden, das sich in der Überprüfung mittels modifiziertem Sandwich-Enzymimmuntest (3.2.1.2.4) als grundsätzlich geeignet für den MBP Nachweis erwies. Besonders aber mit dem Antiserenpool hergestellte Konjugate ergaben im modifizierten Sandwich-Enzymimmuntest hohe Extinktionen nach Verwendung antigenhaltiger Proben sowie niedrige Extinktionen (<0,03 Extinktionseinheiten) nach Einsatz antigenfreier Proben. Tabelle 4.18 zeigt eine Aufstellung aller hergestellten Konjugate.

Tabelle 4.18: Übersicht der hergestellten Antikörper-Enzym-Konjugate für den Einsatz im Sandwich-Enzymimmuntest zum Nachweis von bMBP.

gefällte Antiseren	Woche nach Grund-immunisierung	IgG-Gehalt (mg/ml)	Konjugat	verwendete Fraktionen nach Gelchromatographie	durchschnittliche Reinheitszahl
M1	8.	6,0			
	15.	5,63	X	22 + 23	0,52
	5.-16.	6,7			
M2	6.	4,9	X	25 - 27	0,58
	15.	5,7	X	22 - 26	0,48
			X	22 - 24	0,52
	6.-16.	7,7	X	24 - 28	0,47
M3	8.	5,9			
	15.	7,8	X	22 - 25	0,45
	8.-15.	6,2			

X: Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugat aus entsprechendem Antiserum

4.2.2 Erstellung boviner und porciner MBP-Reinproteinstandardkurven in den Testsystemen

Die polyklonalen anti-MBP-Antikörper der Tiere M1, M2 und M3 sowie die monoklonalen anti-MBP129-138-Antikörper MBP129 wurden als Fängerantikörper

zusammen mit einem Antikörper-Enzym-Konjugat von Kaninchen M2 (M2-HRP) als Detektionsantikörper in einem S-EIA integriert. Zunächst wurde für jede der vier möglichen Kombinationen eine geeignete Konzentration der Reagenzien ermittelt (3.2.2). Änderungen im Konzentrationsbereich der jeweiligen Immunreagenzien beeinflussten die Testsysteme erheblich. Die Variation der Konjugatkonzentration wies einen höheren Einfluss als die Variation der Beschichtungskonzentration auf. Für den Enzymimmuntest mit polyklonalen Fängerantikörpern wurden jeweils optimale Konzentrationsbedingungen bei einer Beschichtungskonzentration von 1: 8.000 und einer Konjugatkonzentration von 1: 400 erreicht. Für den Enzymimmuntest mit monoklonalen Fängerantikörpern wurden die Mikrotiterplatten mit anti-Maus-IgG (10 µg/ml) vorbeschichtet, um den Verbrauch des monoklonalen Antikörpers möglichst gering zu halten. Optimale Konzentrationsbedingungen wurden in diesem Testsystem bei einer MBP129-Konzentration von 1: 250 und einer Konjugatkonzentration von 1: 400 erreicht.

Durch den Einsatz von boviner und porciner MBP-Reinproteinlösung in die Testsysteme, konnten vergleichende Reinproteinstandardkurven erstellt werden. Bei Verwendung der polyklonalen Fängerantikörper ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Testspezifität, der Testsensitivität und der Farbentwicklung des Negativkontrollansatzes (Hintergrundfärbung) zwischen den einzelnen Testsystemen. In diesen Testsystemen resultierte bovines und porcines Protein in vergleichbaren Messwerten. Dies geben auch die zur Beurteilung der Spezifität der einzelnen Testsysteme herangezogenen Spezifitätskennzahlen 1 wieder. Ergaben sich Spezifitätskennzahlen > 1 bedeutet dies, dass bMBP mit einem höheren Messsignal als pMBP erkannt wurde. Spezifitätskennzahlen ≤ 1 bedeuten, dass pMBP in einem gleich hohen oder höheren Messsignal wie bMBP resultierte. Abbildung 4.32 zeigt exemplarisch einen Standardkurvenvergleich mit diesem Ergebnis. Die Spezifitätskennzahlen, gemessen bei einer MBP-Konzentration von 111,1 und 1.000 ng/ml, sind in Tabelle 4.19 dargestellt. Die Nachweisgrenze für die Testsysteme lag in einem bMBP-Konzentrationsbereich von 111,1 bis 333,3 ng/ml. Bei Verwendung des monoklonalen Fängerantikörpers ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede zu den drei übrigen Testsystemen hinsichtlich der Testspezifität bei geringgradig verbesserter Testsensitivität und vergleichbarer Hintergrundfärbung. In diesem Testsystem reagierte bMBP deutlich stärker als pMBP, was auch eine Spezifitätskennzahl 1 von 2,1 bzw. 3,1 wiedergibt (Abbildung 4.33; Tabelle 4.19). Die Nachweisgrenze für bMBP lag in diesem Testsystem bei einer Konzentration von 37 ng/ml.

Tabelle 4.19: Spezifitätskennzahl 1* für den Nachweis von bMBP im Verhältnis zu pMBP, ermittelt bei MBP-Konzentrationen von 111,1 und 1.000 ng/ml.

Beschichtung mit Fängerantikörper	MBP-Konzentration (ng/ml)	Spezifitätskennzahl 1 unter Verwendung von Detektionsantikörper M2-HRP
M1	1.000	1,1
	111,1	1
M2	1.000	1
	111,1	1
M3	1.000	0,9
	111,1	1,1
MBP129	1.000	2,1
	111,1	3,1

* Spezifitätskennzahl 1 = Verhältnis der Extinktionen (bei 450 nm) von bMBP zu pMBP

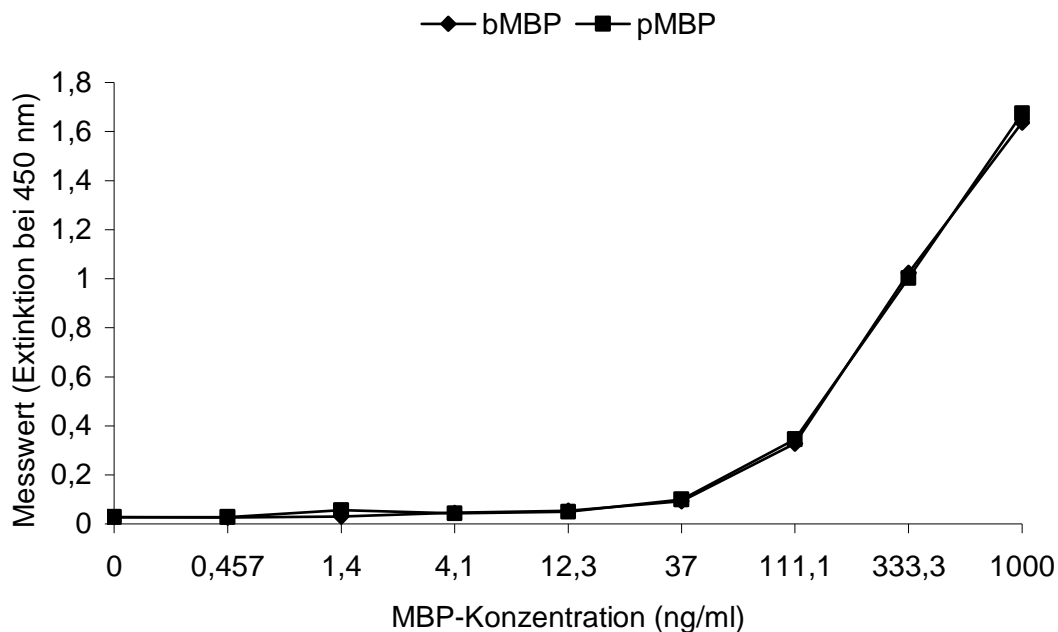


Abbildung 4.32: bMBP- und pMBP-Reinproteinstandardkurven im Sandwich-Enzymimmunttest unter Verwendung von Antiserum M1 als Fängerantikörper und M2-HRP als Detektionsantikörper.

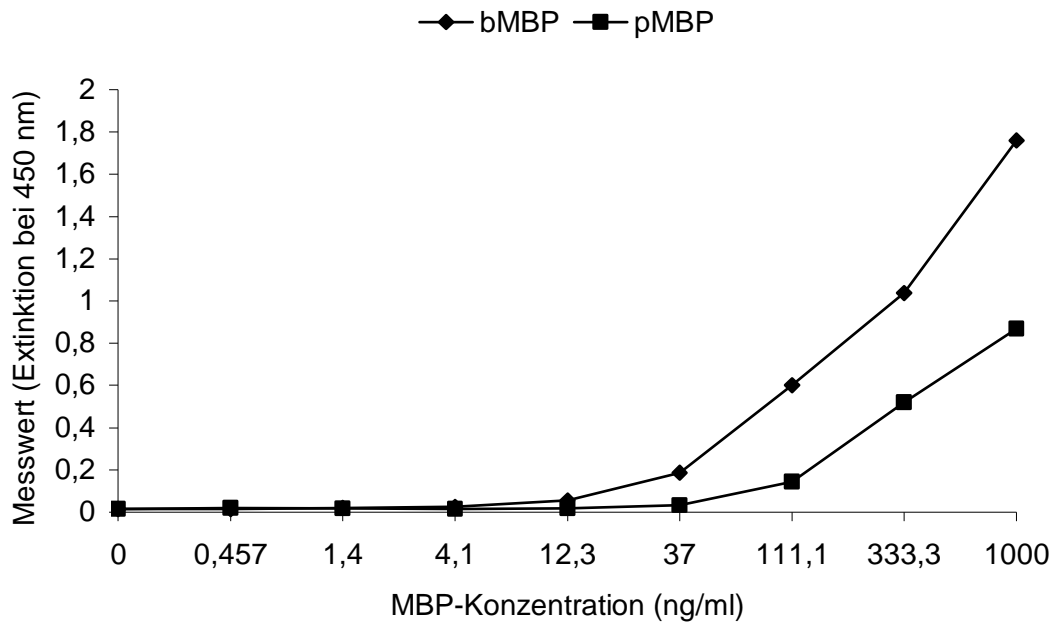


Abbildung 4.33: bMBP- und pMBP-Reinproteinstandardkurven im Sandwich-Enzymimmuntest unter Verwendung des monoklonalen Fängerantikörpers MBP129 und des Detektionsantikörpers M2-HRP. Die erforderliche pMBP-Konzentration zum Erreichen gleicher Messwerte lag mehr als dreifach höher als für bMBP.

4.2.3 Untersuchung von bovinem und porcinem Gehirnextrakt in den Testsystemen

Durch den Einsatz von bovinem und porcinem Gehirnextrakt in die Testsysteme mit monoklonalen bzw. polyklonalen Fängerantikörpern und Detektionsantikörper M2-HRP konnten vergleichende Gehirnstandardextraktkurven erstellt werden. Im Sandwich-Enzymimmuntest mit polyklonalen Fängerantikörpern M1, M2 und M3 konnte keine Spezifitätssteigerung erzielt werden, d.h. bovines MBP reagierte in vergleichbarer Stärke wie porcines MBP. Beispielhaft ist dies in Abbildung 4.34 für Extrakte von bovinem und porcinem Gehirn wiedergegeben. Dies geben auch die zur Beurteilung der Spezifität herangezogenen Spezifitätskennzahlen 2 wieder (Tabelle 4.20). Eine wesentliche Verbesserung der Spezifität des Nachweises von bovinem MBP konnte durch Kombination des Detektionsantikörpers M2-HRP mit dem monoklonalen Antikörper MBP129 als Fängerantikörper erreicht werden. Dieser Sandwich-Enzymimmuntest erwies sich bei der Untersuchung von ZNS-Material als weitgehend spezifisch für bovines MBP. Standardkurven dieses Testsystems für Extrakte von Gehirnhomogenisat vom Rind bzw.

Schwein sind in Abbildung 4.35 wiedergegeben. Gehirnextrakte vom Schwein führten erst in sehr hohen Konzentrationen (100 µg Gehirnäquivalent/ml) zu einem positiven Ergebnis. Die erforderliche Schweinegehirnkonzentration im Extrakt zum Erreichen gleicher Messwerte lag rund hundertfach höher als für Rindergehirn. Dieses Ergebnis gibt auch die entsprechende Spezifitätskennzahl 2 wieder. Sie beträgt für diese Testkombination 35,6 für eine Gehirnextraktkonzentration von 12,3 µg/ml bzw. 6,5 für eine Gehirnextraktkonzentration von 1,4 µg/ml (Tabelle 4.20). Nicht nur Testspezifität sondern auch Testsensitivität des Testsystems mit monoklonalen Fängerantikörpern war im Vergleich zu den drei übrigen Testsystemen deutlich verbessert. Der Rindergehirnextrakt wies in diesem Testsystem im Vergleich zu jenen mit Fängerantikörper M1, M2 und M3 eine rund zehnfach höhere Reaktivität auf (Abbildung 4.34 und 4.35). Die Nachweisgrenze für Rindergehirnextrakt lag im Testsystem mit monoklonalen Fängerantikörpern bei einer Konzentration von 1,4 µg/ml, wohingegen die Nachweisgrenze in Testsystemen mit polyklonalen Fängerantikörpern in einem Konzentrationsbereich von 12,3 bis 37 µg/ml lag.

Tabelle 4.20: Spezifitätskennzahl 2* für den Nachweis von MBP in Rindergehirnextrakt im Verhältnis zu Schweinegehirnextrakt, ermittelt bei einer Gehirnextraktkonzentration von 12,3 und 1,4 µg/ml.

Beschichtung mit Fängerantikörper	Gehirnextrakt-Konzentration (µg/ml)	Spezifitätskennzahl 2 unter Verwendung von Detektionsantikörper M2-HRP
M1	12,3	1,1
	1,4	1
M2	12,3	1
	1,4	1
M3	12,3	1,3
	1,4	1,1
MBP129	12,3	35,6
	1,4	6,5

* Spezifitätskennzahl 2 = Verhältnis der Extinktionen (bei 450 nm) von bovinem zu porcinem Gehirnextrakt

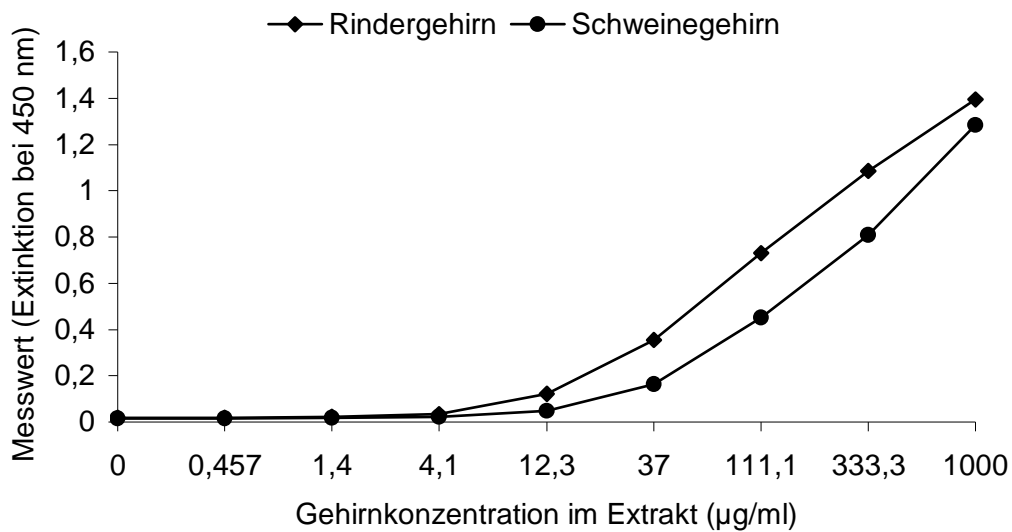


Abbildung 4.34: Rinder- und Schweinehirnstandardextraktkurve im Sandwich-Enzymimmunttest unter Verwendung von Antiserum M1 als Fängerantikörper und M2-HRP als Detektionsantikörper.

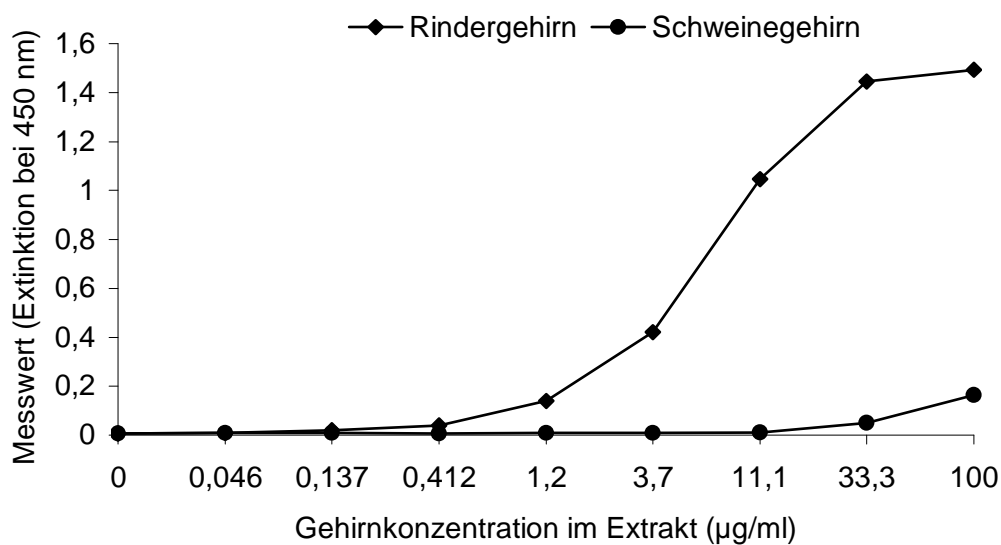


Abbildung 4.35: Rinder- und Schweinehirnstandardextraktkurve im Sandwich-Enzymimmunttest unter Verwendung des monoklonalen Fängerantikörpers MBP129 und des Detektionsantikörpers M2-HRP. Die Messwerte für den gehirnfreien Kontrollansatz lagen bei 0,02 Einheiten. Extrakte von Schweinehirn ergaben erst ab Konzentrationen von 100 µg/ml ein schwach positives Messsignal. Die erforderliche Schweinehirnkonzentration im Extrakt zum Erreichen gleicher Messwerte lag rund hundertfach höher als für Rindergehirn.

4.2.4 Optimale Kombination der Immunreagenzien

Bei Verwendung der polyklonalen Fängerantikörper M1, M2 und M3 ergaben sich weder beim Einsatz von MBP-Reinproteinlösung noch beim Einsatz von Extrakt aus Gehirn Unterschiede hinsichtlich der Testspezifität, der Testsensitivität und der Farbentwicklung des Negativkontrollansatzes zwischen den einzelnen Testsystemen. Aufgrund der limitierten Spezifität dieser Testsysteme für bovines MBP in Reinproteinlösungen und in Extrakten von Rindegehirn wurden diese Testkombinationen nicht weiter verfolgt. Durch Kombination des Detektionsantikörpers M2-HRP mit dem monoklonalen Antikörper MBP129 stand für weitere Untersuchungen ein Testsystem mit deutlich verbesserter Testspezifität und Testsensitivität zur Verfügung.

4.2.5 Vergleich des MBP-Gehaltes in Gehirn und Rückenmark

Vergleichende Untersuchungen von Extrakten aus Gehirn und Rückenmark von Rind bzw. Schwein zeigten, dass im Gegensatz zum ZNS-Markerprotein GFAP kein nennenswerter Unterschied der relativen Messwerte für diese Gewebe existierte. Damit ist im Testsystem für MBP bei Verwendung eines Gehirnhomogenisats als „Standard“ zur Quantifizierung des ZNS-Zusatzes eine Überschätzung durch Rückenmark nicht gegeben. Der ZNS-Gehalt eines Probenmaterials ist somit mit Hilfe des Markerproteins MBP quantifizierbar. In Abbildung 4.36 sind typische Kurvenverläufe dargestellt. Abbildung 4.37 zeigt einen Vergleich der relativen Signalstärken bei dem Gehirnmateriale vom Rind 100% entspricht.

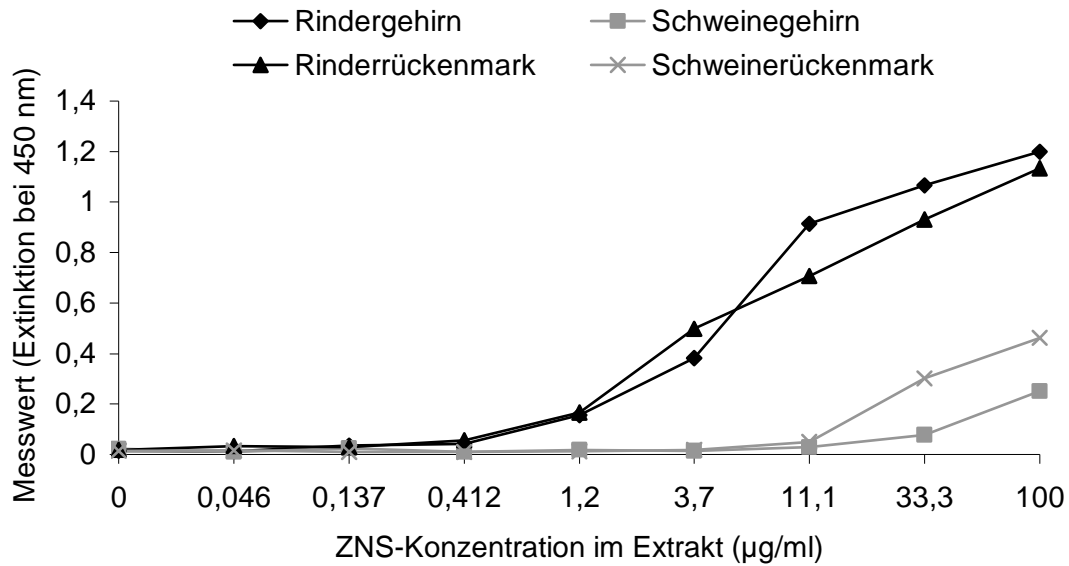


Abbildung 4.36: Vergleich der Reaktivität von verdünnten Gehirn- und Rückenmarksextrakten von Rind und Schwein im MBP-Sandwich-Enzymimmuntest MBP129/M2-HRP.

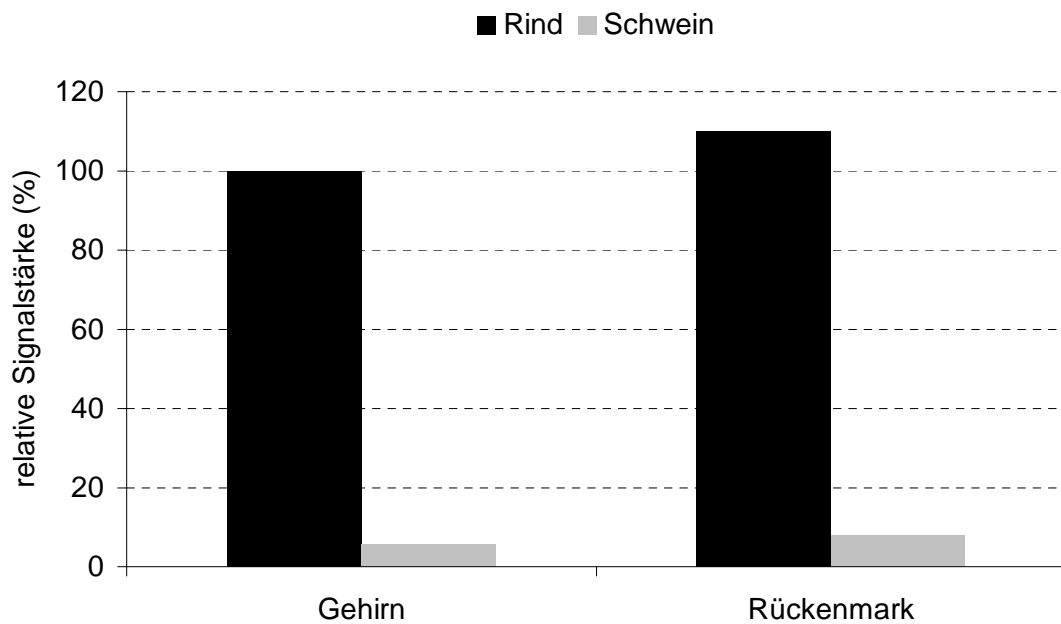


Abbildung 4.37: Vergleich der relativen Messsignalstärken (Gehirn Rind = 100%) für Extrakte von Gehirn und Rückenmark vom Rind bzw. Schwein (Konzentration jeweils 11 µg ZNS-Material/ml Extrakt) im Sandwich-Enzymimmuntest für MBP (MBP129/M2-HRP). Die Messwerte für Gehirn- und Rückenmarkmaterial beider Spezies waren jeweils weitgehend identisch.

4.2.6 Untersuchung künstlich kontaminierter, roher Probenmaterialien

Die Untersuchung künstlich mit Rindergehirn bzw. Schweinegehirn kontaminierter Hackfleischproben im MBP-Sandwich-Enzymimmuntest (MBP129/M2-HRP) ergab eine hohe Testsensitivität und Testspezifität für bovines ZNS-Material. Es ergab sich eine Nachweisgrenze für Zusätze von Rindergehirn von 0,1% bei einem „cut-off“ Wert von 0,1 Extinktionseinheiten, während Zusätze von Schweinegehirn auch in Konzentrationen von 8% nur zu schwachen Extinktionswerten unterhalb des „cut-off“ Wertes führten (Abbildung 4.38; Tabelle 4.21). Zur Überprüfung der Nachweisgrenze wurde für jede Testdurchführung ein Quotient aus den Messwerten von 0,1% Rindergehirnzusatz und ZNS-Negativkontrollansatz gebildet (Abbildung 4.39). Ein Zusatz von 0,1% Rindergehirn resultierte dabei durchschnittlich im 3,5fachen Messwert des ZNS-Negativkontrollansatzes, der generell sehr niedrige Extinktionswerte um 0,02 Extinktionseinheiten ergab. Die ermittelte Spezifitätskennzahl 3 betrug 10,6 bei einem achtprozentigen Rindergehirnzusatz, während sie für einen einprozentigen Zusatz 9,5 betrug (Tabelle 4.22). Die Wiederfindungsraten bei den mit Rindergehirn künstlich kontaminierten Probenmaterialien variierten in Abhängigkeit der Kontaminationsstufe. Die höchsten Wiederfindungsraten traten bei Untersuchung der niedrigsten Kontaminationsstufe auf. Für einen achtprozentigen Rindergehirnzusatz ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 81%, während die minimale Wiederfindungsrate 38% und die maximale Wiederfindungsrate 112% betrug. Für einen einprozentigen Rindergehirnzusatz ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 93%, eine minimale Wiederfindungsrate von 47% und eine maximale Wiederfindungsrate von 148%.

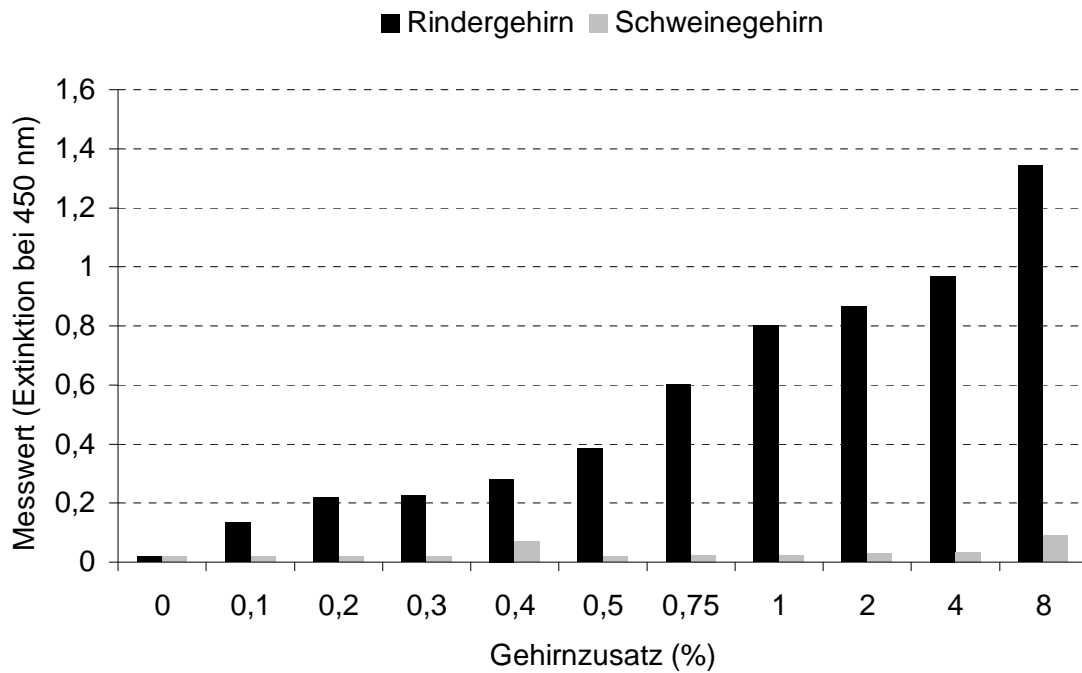


Abbildung 4.38: Messwerte (Mittelwerte aus Dreifachansätzen) für Extrakte von künstlich mit Rindergehirn bzw. Schweinegehirn kontaminiertem Hackfleisch (Rinderhackfleisch/Schweinehackfleisch 1/1) im Sandwich-Enzymimmuntest unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers MBP129 als Fängerantikörper und M2-HRP als Detektionsantikörper. Hackfleischproben ohne Gehirnzusatz ergaben Messwerte von 0,02 Einheiten. Bei einem „cut-off“ Wert von 0,1 Extinktionseinheiten ergab bovines Gehirn in Zusätzen von 0,1% ein positives Ergebnis. Der maximale Messwert für Zusätze von Schweinegehirn (8%) lag bei < 0,1 Einheiten.

Tabelle 4.21: Beispielhaft aufgeführte Messwerte (Mittelwerte der Extinktionen bei 450 nm aus Dreifachansätzen) für Extrakte von künstlich mit Rindergehirn bzw. Schweinegehirn kontaminiertem Hackfleisch im MBP-Sandwich-Enzymimmuntest (MBP129/M2-HRP).

Gehirn von Tierart	Messwert (Extinktion bei 450 nm) unter Verwendung von prozentualem Anteil Gehirn an der Fleischmasse							BLK
	8%	4%	2%	1%	0,5%	0,1%	0%	
Rind	1,344	0,97	0,865	0,802	0,602	0,134		
Schwein	0,09	0,034	0,028	0,021	0,024	0,018	0,018	0,012

BLK: Leerwert (0,5% Triton-X-100/PBS)

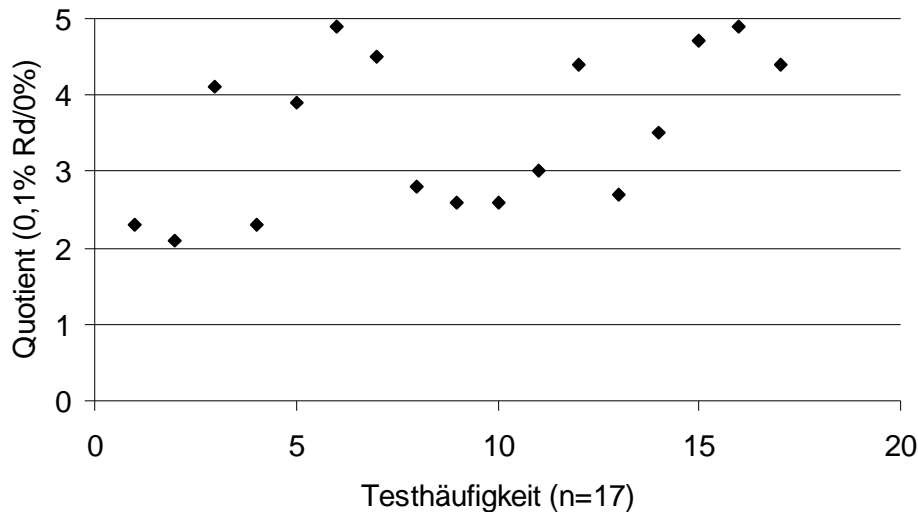


Abbildung 4.39: Zur Überprüfung der Nachweisgrenze wurde für das MBP-Testsystem der Quotient aus dem Messwert (Extinktion bei 450 nm) von 0,1% Rindergehirnzusatz und dem Messwert des ZNS-Negativkontrollansatzes gebildet. 0,1% Rindergehirnzusatz resultierte im durchschnittlich 3,5fachen Messwert des ZNS-Negativkontrollansatzes.

Tabelle 4.22: Spezifitätskennzahl 3* und Wiederfindungsraten der kontaminierten rohen Probenmaterialien im MBP-Sandwich-Enzymimmuntest (MBP129/M2-HRP) in Abhängigkeit von den Kontaminationsstufen 1% und 8% Rindergehirn.

Fänger- antikörper	Anteil Rinder- gehirn	Ermittlung unter Verwendung von Detektionsantikörper M2-HRP					Nachweisgrenze
		Spezifitäts- kennzahl 3 (n = 17)	Wiederfindungsrate (%) (n = 12)				
			MW	SD	min.	max.	
MBP129	8%	10,6	81	± 24	38	112	0,1%
	1%	9,5	93	± 38	47	148	Rindergehirn

min.: minimale; *max.:* maximale; *MW:* Mittelwert; *SD:* Standardabweichung

Spezifitätskennzahl 3* = Verhältnis der Extinktionen bei 450 nm von mit bovinem Gehirn kontaminiertem Probenmaterial zu mit porcinem Gehirn kontaminiertem Probenmaterial.

4.2.7 Untersuchung künstlich kontaminierter, erhitzter Probenmaterialien

Der Nachweis eines ZNS-Zusatzes gelang auch in künstlich wärmebehandelten Fleischerzeugnissen, wobei das Messsignal mit zunehmendem Erhitzungsgrad schwächer wurde (Abbildung 4.40a). Zwar lagen die Messwerte im Vergleich zu einer nicht erhitzten

Positivkontrolle (Hackfleisch mit 1% Rindergehirnzusatz) ca. 30% niedriger, aber ein Zusatz von 1% Rindergehirn zum Konservenmaterial war in allen Erhitzungstypen sicher nachweisbar. Bei einem „cut-off“ Wert von 0,1 Extinktionseinheiten war ein Zusatz von 0,1% Rindergehirn nicht mehr nachweisbar. Aufgrund der Ergebnisse für erhitzte, künstlich kontaminierte Probenmaterialien kann von einer in Vollkonserven erreichbaren Nachweisgrenze von ca. 0,3% Rindergehirnzusatz ausgegangen werden, für andere Erzeugnisse dürften Nachweisgrenzen von 0,2% erreichbar sein (Abbildung 4.40b). Zusätze von Schweinegehirn in Kesselkonserven ergaben in Konzentrationen bis 8% keine Extinktionswerte über dem „cut-off“. Die Wiederfindungsraten bei den mit Rindergehirn künstlich kontaminierten Probenmaterialien variierten in Abhängigkeit der Kontaminationsstufen (Tabelle 4.23). Die höchsten Wiederfindungsraten traten bei Untersuchung der niedrigsten Kontaminationsstufe auf. Im Testsystem ergab sich für einen achtprozentigen Rindergehirnzusatz in Konserven eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 103%. Die minimale Wiederfindungsrate betrug 64%, während die maximale Wiederfindungsrate 135% betrug. Für die in jedem Testsystem mitgeführte Positivkontrolle ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 127% bei einer Standardabweichung von ± 18 . Die minimale Wiederfindungsrate betrug 107% und die maximale Wiederfindungsrate betrug 151%.

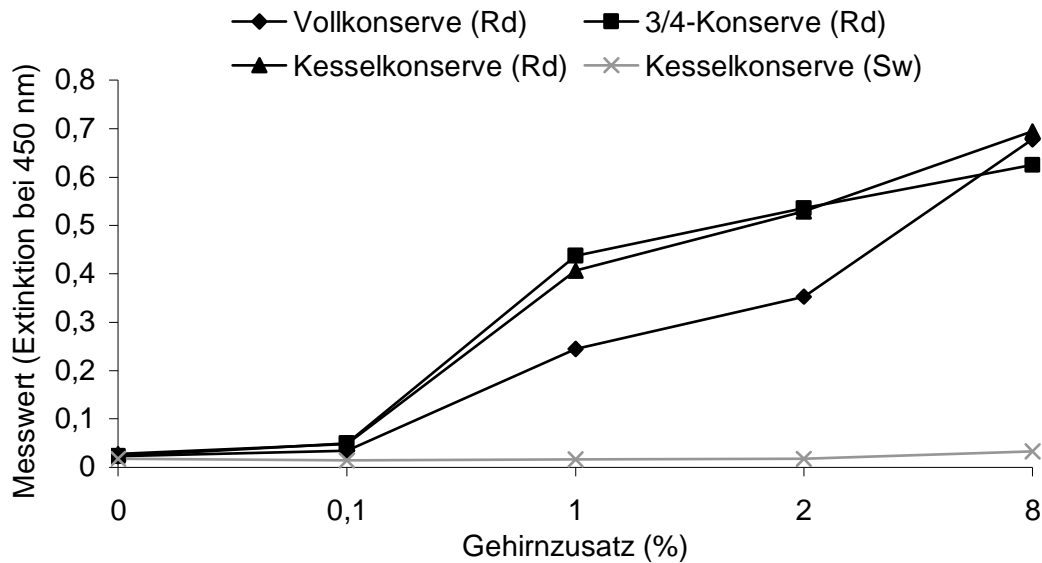


Abbildung 4.40a: Nachweis von Gehirnzusätzen in künstlich kontaminiertem, wärmebehandeltem Probenmaterial unter Verwendung des Sandwich-Enzymimmuntests für MBP (MBP129/M2-HRP). Bei einem „cut-off“ Wert von 0,1 Einheiten war ein Zusatz von 1% Rindergehirn sicher nachweisbar, führte allerdings zu niedrigeren Messwerten im Vergleich zum nicht wärmebehandelten Kontrollstandard (1% Rindergehirn). Der Negativkontrollstandard (0%) ergab Extinktionswerte von unter 0,03 Einheiten. Zusätze von Rindergehirn in einer Konzentration von 0,1% waren negativ. Zusätze von Schweinegehirn in Kesselkonserven ergaben bis zu Konzentrationen von 8% keine ZNS-positiven Messwerte.

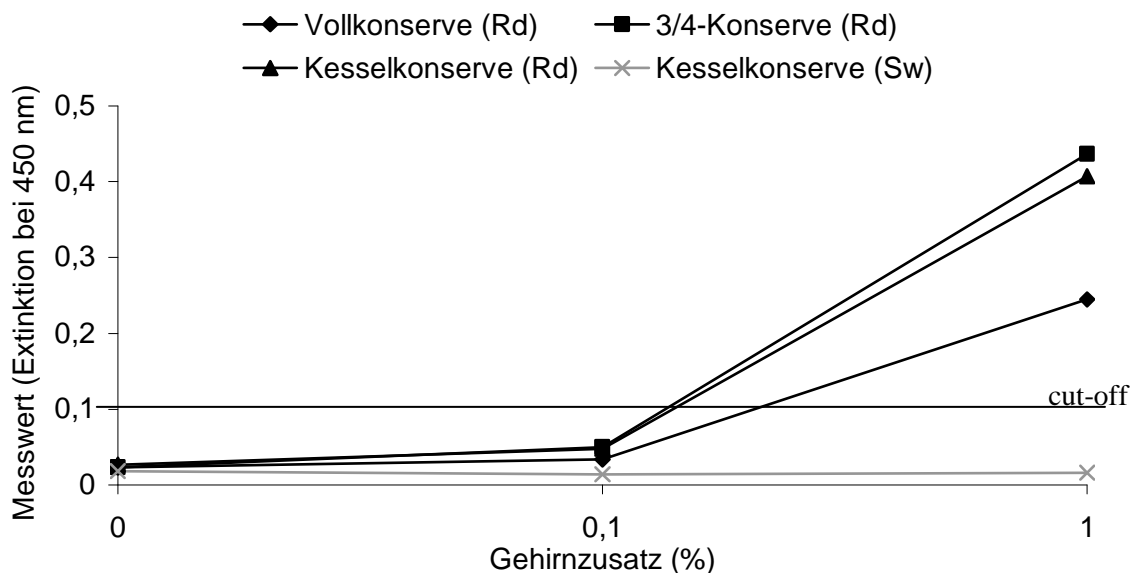


Abbildung 4.40b: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 4.40a zur Verdeutlichung der Nachweisgrenze für MBP in Konserven. Während ein Zusatz von Rindergehirn in Vollkonserven ab Gehalten von ca. 0,3% nachweisbar war, konnten in den übrigen Erzeugnissen bereits Gehalte von 0,2% nachgewiesen werden.

Tabelle 4.23: Wiederfindungsrate der kontaminierten erhitzten Probenmaterialien im MBP-Sandwich-Enzymimmunttest (MBP129/M2-HRP) in Abhängigkeit von den Kontaminationsstufen 1% und 8% Rindergehirn.

untersuchte Konserven	Anteil Rindergehirn	Wiederfindungsrate (%) (n = 4)			Nachweisgrenze (% Rindergehirn)
		MW	min.	max.	
Vollkonserve	8%	96	64	125	0,3
	1%	88	73	113	
¾-Konserve	8%	99	64	117	0,2
	1%	200	76	377	
Kesselkonserve	8%	115	79	135	0,2
	1%	154	123	199	

min.: minimale; *max.:* maximale; *MW:* Mittelwert

4.2.8 Kreuzreaktivität mit den Spezies Schaf und Ziege

Eine weitergehende Prüfung der Testspezifität unter Verwendung von Gehirnmaterial anderer Wiederkäuerspezies (Schaf und Ziege) zeigte, dass das Testsystem begrenzt rinderspezifisch ist und in geringerem Umfang auch andere Wiederkäuer-ZNS-Materialien erkannt werden (Abbildung 4.41). Es konnte für ZNS-Material der Tierart Schaf eine Kreuzreaktivität von 60% und für ZNS-Material der Tierart Ziege eine Kreuzreaktivität von 64% im MBP-Testsystem berechnet werden. Für die mitgeführte Positivkontrolle ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 117% (60-248%).

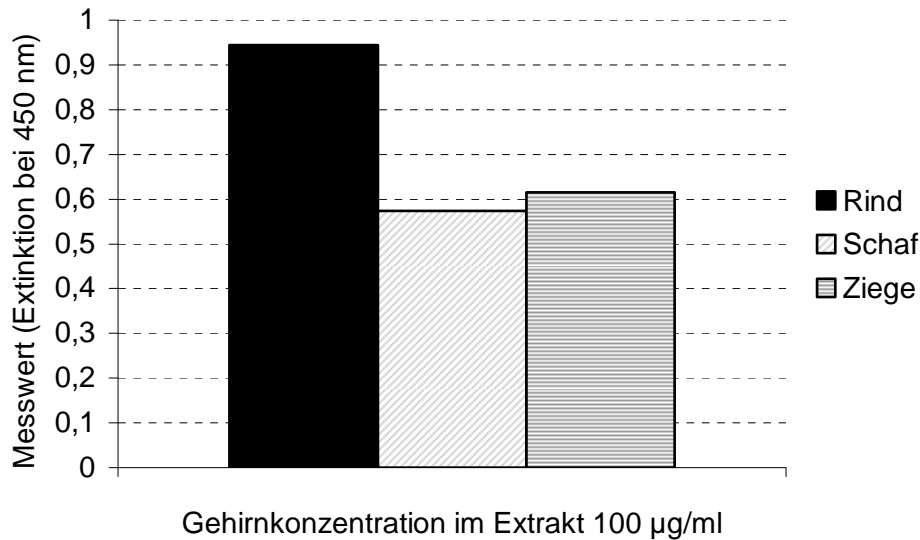


Abbildung 4.41: Beispiel für die Reaktivität (Extinktion bei 450 nm) von Gehirnextrakt (Konzentration jeweils 100 µg Gehirnäquivalent/ml Extrakt) verschiedener Wiederkäuerspezies im Sandwich-Enzymimmuntest für MBP (MBP129/M2-HRP). Die Messwerte für ZNS-Material der Spezies Schaf und Ziege waren jeweils weitgehend identisch. Es konnte eine Kreuzreaktivität von 60% (Schaf) bzw. 64% (Ziege) ermittelt werden.

4.2.9 Kreuzreaktivität mit den Spezies Pferd, Pute, Huhn und Kaninchen

Eine weitergehende Prüfung der Testspezifität unter Verwendung von Hackfleisch, dem Gehirn verschiedener anderer Spezies beigemischt worden war, zeigte, dass das Testsystem deutlich rinderspezifisch bzw. wiederkäuerspezifisch ist. Pferdegehirn in Konzentrationen von 8% führte zu schwachen Extinktionswerten im Bereich des „cut-off“ Wertes von 0,1 Extinktionseinheiten (Tabelle 4.24; Abbildung 4.42). Es konnte für ZNS-Material der Tierart Pferd eine Kreuzreaktivität im MBP-Testsystem von 14% berechnet werden. Gehirn von Kaninchen, Pute und Huhn war in allen Konzentrationen negativ. Für die Positivkontrolle (1% Rindergehirnzusatz) ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 103%.

Tabelle 4.24: Beispiel für die Reaktivität des Sandwich-Enzymimmuntests für MBP (MBP129/M2-HRP) mit Gehirnmateriale verschiedener Spezies. MBP-positive Messwerte im Fettdruck.

prozentualer Zusatz zu Hackfleisch	Messwerte (Extinktion bei 450 nm) für Zusatz von Gehirn vom				
	Rind	Pferd	Pute	Huhn	Kaninchen
8%	0,857	0,113	0,039	0,033	0,062
2%	0,666	0,044	0,025	0,022	0,037
1%	0,422	0,024	0,018	0,022	0,03
0,5%	0,299	0,018	0,017	0,021	0,01
0%	0,026	0,017	0,019	0,02	0,019

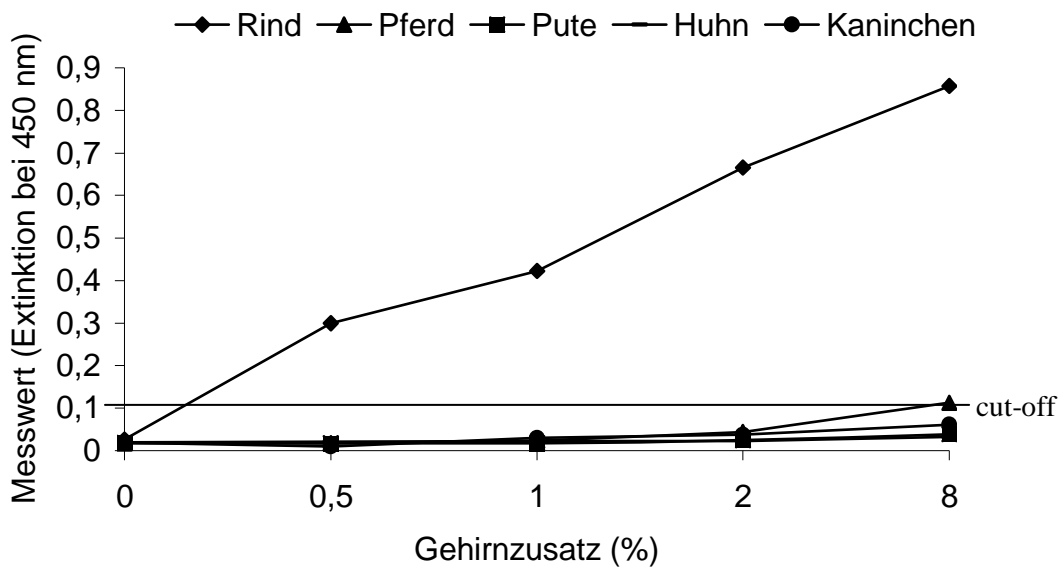


Abbildung 4.42a: Beispiel (vergleiche Tabelle 4.25) für die Reaktivität (Extinktion bei 450 nm) von Gehirnmateriale verschiedener Spezies im Sandwich-Enzymimmuntest für MBP (MBP129/M2-HRP). Für Gehirnmateriale der Spezies Pferd konnte eine Kreuzreaktivität von 14% berechnet werden.

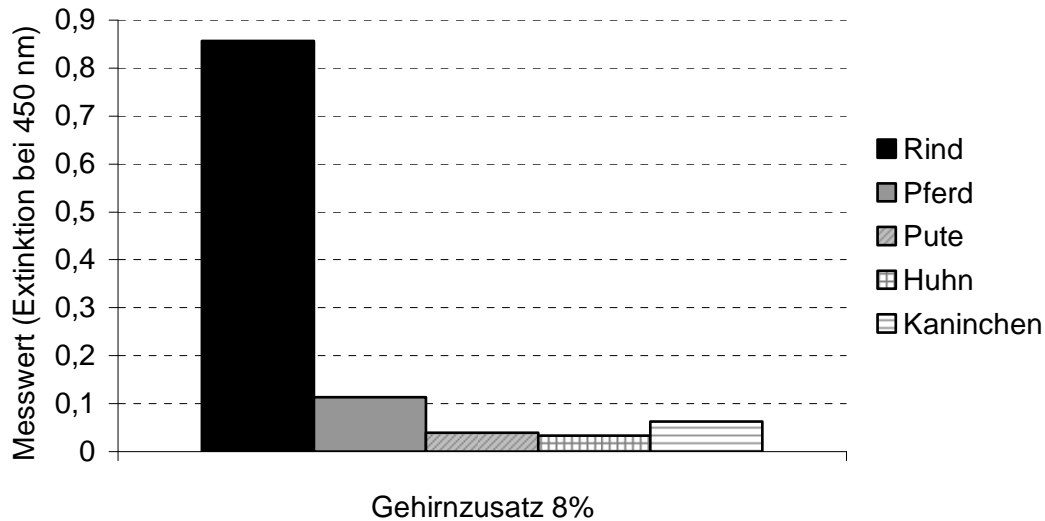


Abbildung 4.42b: Beispiel (vergleiche Tabelle 4.25) für die Reaktivität (Extinktion bei 450 nm) eines achtprozentigen Gehirnzusatzes verschiedener Spezies zu Hackfleisch im Sandwich-Enzymimmuntest für MBP (MBP129/M2-HRP).

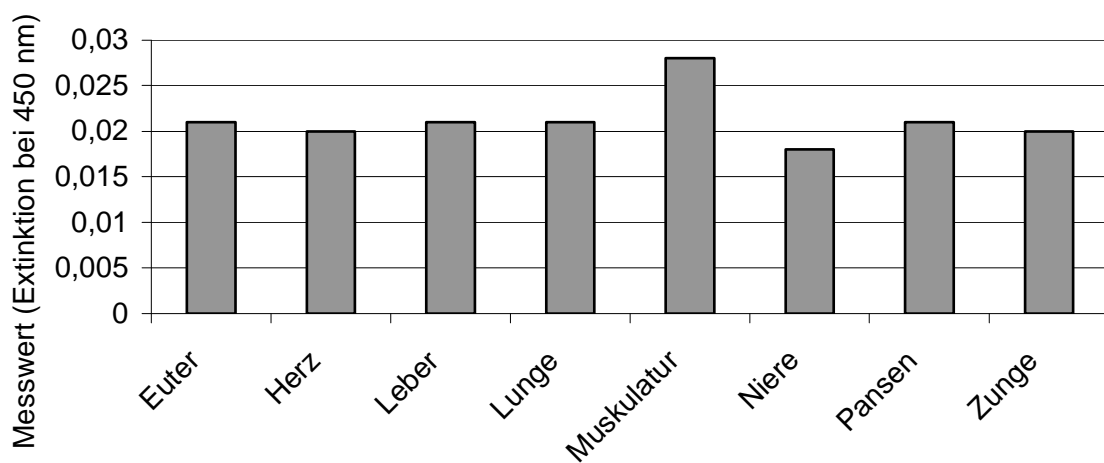
4.2.10 Gewebespezifität des Testsystems

Bei einer Überprüfung der Gewebespezifität des MBP-Sandwich-Enzymimmuntests (MBP129/M2-HRP) zeigte sich, dass das Testsystem deutlich ZNS-spezifisch ist. Selbst in hohen Konzentrationen ergaben weder Muskulatur von Rind und Schwein noch zahlreiche Organe adulter Rinder positive Ergebnisse oberhalb des „cut-off“ Wertes von 0,1 Extinktionseinheiten (Tabelle 4.25). Die Messwerte der eingesetzten Proben entsprachen den niedrigen Messwerten für den ZNS-Negativkontrollansatz, der durchschnittlich 0,028 Extinktionseinheiten betrug (Abbildung 4.43). Eine Quantifizierung der Proben anhand der Rindergehirnstandardextraktkurve war somit nicht möglich. Für den in jeder Testdurchführung mitgeführten ZNS-Positivkontrollansatz (1% Rindergehirnzusatz) ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 111%. Während die minimale Wiederfindungsrate 85% betrug, ergab sich eine maximale Wiederfindungsrate von 140%.

Tabelle 4.25: Beurteilung der Reaktivität des MBP-Sandwich-Enzymimmuntests MBP129/M2-HRP mit weiteren Gewebearten. Die Bewertungsgrundlage stellten sieben Testdurchführungen dar.

untersuchtes Gewebe	Beurteilung der Reaktivität
Euter	-
Herz	-
Leber	-
Lunge	-
Muskulatur	-
Niere	-
Pansen	-
Zunge	-

-: keine Reaktivität vorhanden (Extinktion <0,1 Extinktionseinheiten)



untersuchtes Gewebe in einer Extraktkonzentration von 1 mg/ml

Abbildung 4.43: Beispiel für die Reaktivität (Extinktion bei 450 nm) von verschiedenen Geweben in einer Extraktkonzentration von 1 mg/ml im MBP-Sandwich-Enzymimmuntest MBP129/M2-HRP. Die Proben ergaben mit der Negativkontrolle vergleichbare Messwerte.

4.2.11 Untersuchung von Handelsproben

Zur Überprüfung des möglichen Einflusses von Zutaten (Gewürzen, Kräutern, Gemüse, etc.) zu Fleischwaren wurden auch mit dem Testsystem für MBP verschiedene Probenmaterialien (Roh-, Brüh-, Kochwürste und Fleischerzeugnisse auf der Basis von Fleisch der Tierarten Schwein, Rind (auch Kalb), Pute, Huhn, Truthahn, Kaninchen und Wildschwein) aus dem Handel untersucht. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des Testsystems auf weitere Probenmatrices wurden auch Handelsproben Hautcreme und Fruchtgummi untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass alle 69 Proben ausnahmslos negativ waren (Abbildung 4.44). Die Bewertungsgrundlage stellte hierbei eine vier- bis neunmalige Untersuchung jeder Probe dar. Der ZNS-Negativkontrollansatz (reines Hackfleisch) ergab Messwerte im Bereich von 0,007 bis 0,033 Extinktionseinheiten. Der Einsatz von reinem Verdünnungspuffer (0,5% Triton-X-100/PBS) ergab vergleichbare Messwerte im Bereich von 0,004 bis 0,039 Extinktionseinheiten. Der ZNS-Positivkontrollansatz (1% Rindergehirnzusatz, entsprechend 10 µg Gehirnäquivalent/ml Extrakt), der typischerweise in einem Messwert von ca. 0,5 Extinktionseinheiten resultierte, ergab eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 96% bei einer Standardabweichung von ± 38 . Die minimale Wiederfindungsrate betrug 34%, die maximale Wiederfindungsrate betrug 159%. Dies bestätigte die Anwendbarkeit des Enzymimmuntests für die Untersuchung von Praxisproben. Dieselben Probenmaterialien waren ebenfalls im GFAP-Testsystem untersucht worden und auch hier als ZNS-negativ erkannt worden.

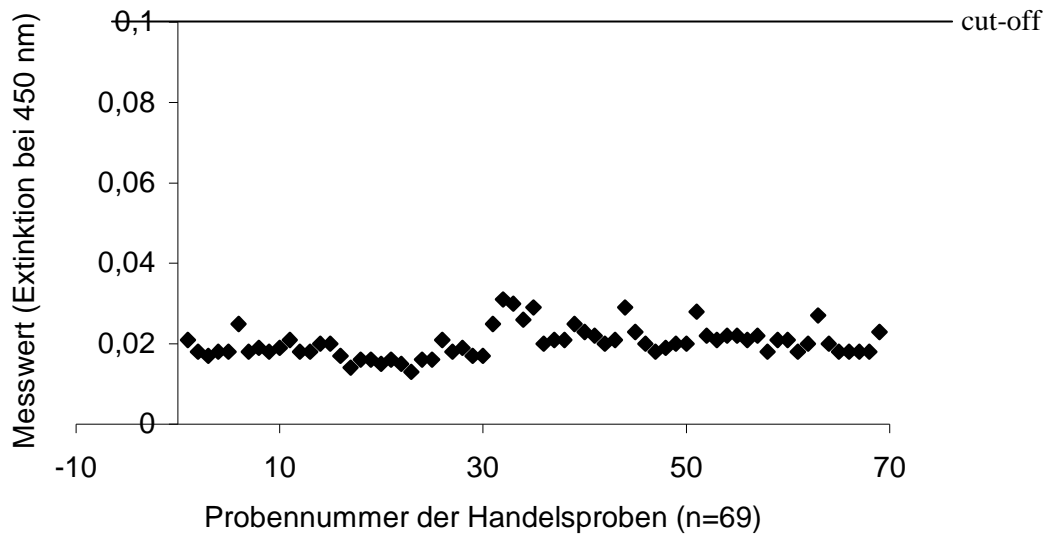


Abbildung 4.44: Beispiel für die Reaktivität (Extinktion bei 450 nm) der untersuchten Handelsproben in einer Extraktkonzentration von 1 mg/ml im Sandwich-Enzymimmuntest für MBP auf der Basis von Fängerantikörper MBP129 und Detektionsantikörper M2-HRP. Die Proben ergaben mit der Negativkontrolle vergleichbare Messwerte.

4.2.12 Standardisiertes Extraktionsverfahren

4.2.12.1 Einfluss verschiedener Extraktionsmittel

Die Überprüfung des Einflusses verschiedener Extraktionsmittel auf den Sandwich-Enzymimmuntest für MBP (MBP129/M2-HRP) zeigte, dass sich grundsätzlich alle untersuchten Extraktionsmittel zur Extraktion von MBP aus Rindergehirn eignen (Abbildung 4.45). Da aber Extrakte, die mit 1% SDS/A.dest. gewonnen wurden, in den höchsten Messwerten (Extinktion bei 450 nm) resultierten, wurde es unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Sandwich-Enzymimmuntest für GFAP als Standardextraktionsmittel gewählt.

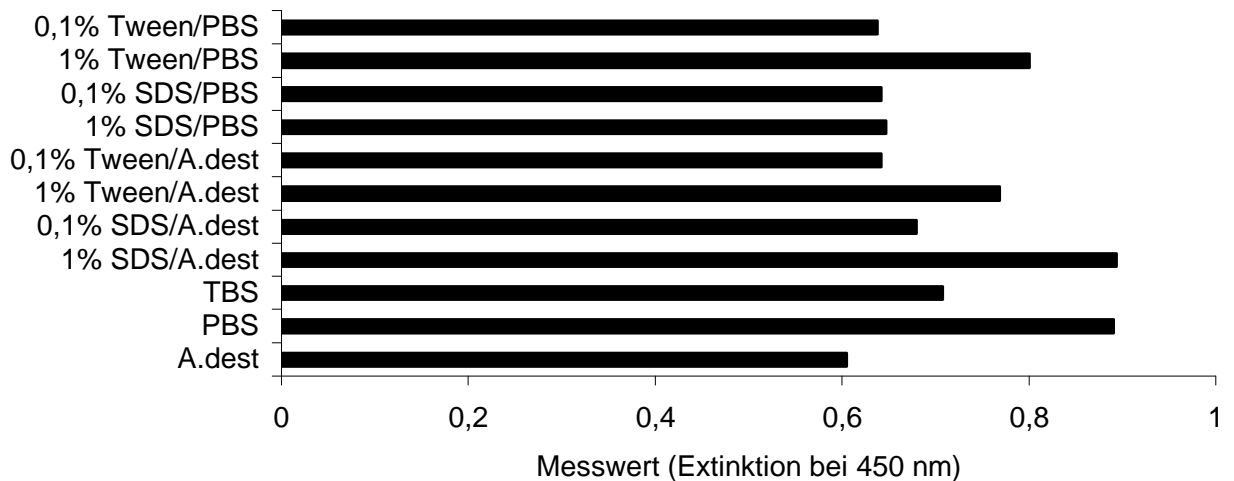


Abbildung 4.45: Beispiel für die Reaktivität (Extinktion bei 450 nm) von Rindergehirn (100 µg Gehirnäquivalent/ml Extrakt), welches mit verschiedenen Extraktionsmitteln extrahiert wurde, im Sandwich-Enzymimmuntest für MBP (MBP129/M2-HRP). Grundsätzlich eigneten sich alle untersuchten Extraktionsmittel.

4.2.12.2 Reproduzierbarkeit der Standardextraktionsmethode

Die Reproduzierbarkeit der Extraktion von MBP aus Gehirnmaterial wurde durch wiederholte Extraktion ($n = 5$, zwei verschiedene Tage) von Rindergehirn und Schweinehirn und Bestimmung der Messwerte im Sandwich-Enzymimmuntest überprüft (Abbildung 4.46). Es zeigte sich, dass mit Variationskoeffizienten von rund 8% für Rindergehirn bei Extraktion des MBPs mit 1% SDS/A.dest. bei 95 °C eine sehr gute Reproduzierbarkeit gegeben war. Die Variationskoeffizienten für Schweinehirn schwankten stärker, da hier stets nur sehr niedrige Messwerte deutlich unterhalb des „cut-off“ Wertes erzielt wurden. Ein wesentlicher Vorteil lag zudem in der Tatsache, dass die Reproduzierbarkeit der Extraktion auch für den Nachweis von GFAP gegeben war.

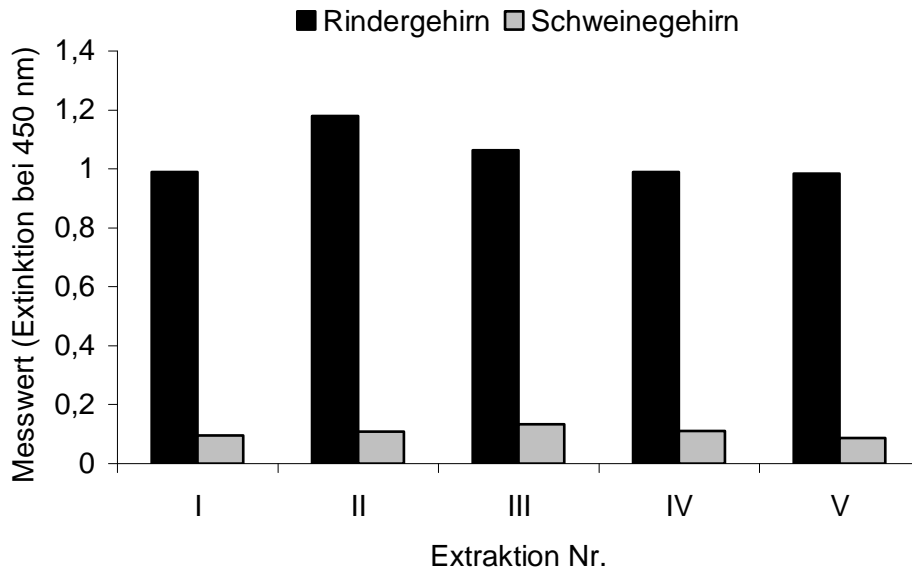


Abbildung 4.46: Messwerte im Sandwich-Enzymimmunttest für MBP nach mehrfacher Extraktion von Rinder- bzw. Schweinehirn. Extraktionen I–III erfolgten an Tag 1, Extraktionen IV und V an Tag 2. Die Extrakte wurden zum Erreichen des Messbereiches des Testsystems jeweils 1: 1.000 in 0,5% Triton-X-100/PBS verdünnt. Die Variationskoeffizienten lagen bei 8,1% (Rindergehirn) bzw. bei 17% (Schweinehirn).

4.2.13 Haltbarkeit der im Enzymimmunttest verwendeten Reagenzien

Die Haltbarkeit der zur Durchführung des Sandwich-Enzymimmunttests MBP129/M2-HRP für MBP benötigten Reagenzien erwies sich über einen Zeitraum von fünf Wochen stabil (Abbildung 4.47). Spezifität und Sensitivität des Testsystems waren auch nach fünf Wochen unverändert. Abbildung 4.48 zeigt den Kurvenverlauf von Rinder- und Schweinehirnextrakt im Testsystem nach einer Aufbewahrung von einer bzw. fünf Wochen.

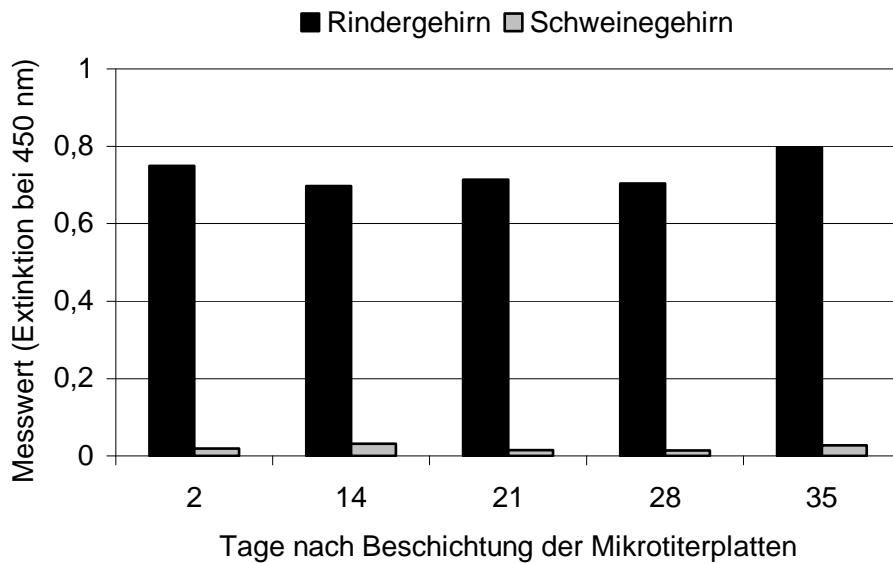


Abbildung 4.47: Vergleich der Messwerte (Extinktion bei 450 nm) für Rinder- und Schweinegehirnextrakt (Extraktkonzentration 11,1 $\mu\text{g/ml}$) im Sandwich-Enzymimmuntest MBP129/M2-HRP über einen Aufbewahrungszeitraum von 35 Tagen.

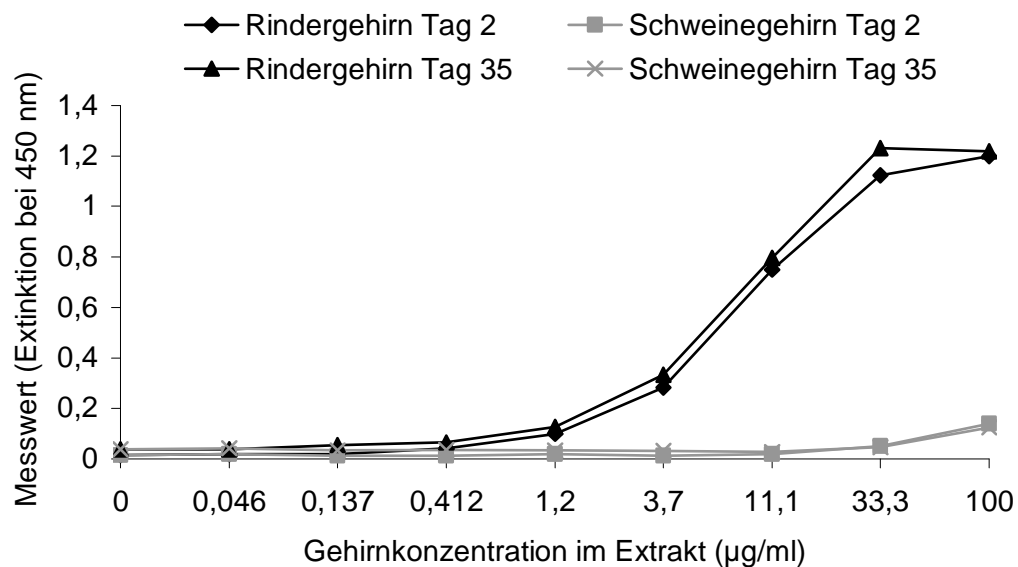


Abbildung 4.48: Kurvenverlauf des Rinder- und Schweinegehirnextraktes im Testsystem MBP129/M2-HRP, das eine bzw. fünf Wochen gelagert wurde.

4.2.14 MBP-Gehalt in Rindergehirn

Durch parallele Erstellung von bMBP-Reinproteinstandardkurven und Rindergehirnextraktstandardkurven auf einer Mikrotiterplatte des Testsystems

MBP129/M2-HRP konnte der Antigengehalt der Gehirnextraktlösung berechnet werden. Der daraus ermittelte bMBP-Gehalt in Rindergehirn, der unter Verwendung der Gehirnextraktkonzentrationen von 3,7 µg/ml bis 100 µg/ml berechnet wurde, lag im Konzentrationsbereich von 17,27 bis 40,2 mg/g. Der bMBP-Gehalt betrug durchschnittlich rund 30 mg/g.

4.2.15 Verkürzung der Testdauer

Eine Verkürzung der Testdauer über eine Reduzierung der Inkubationszeiten hatte eine Verminderung der Sensitivität des Testsystems zur Folge. In der Rindergehirnstandardkurve sank die Nachweisgrenze um das zehnfache. Eine Konzentration von 10 µg Gehirnäquivalent/ml Extrakt resultierte in einem Messwert im Bereich des „cut-off“ Wertes von 0,1 Extinktionseinheiten. Die untersuchten Proben sowie die Negativkontrolle resultierten in vergleichbaren Messwerten, während die Positivkontrolle niedrigere Messwerte ergab. Die berechnete Wiederfindungsrate erhöhte sich auf ca. 150%. Auf eine zusätzliche Erhöhung des Gehaltes an monoklonalen Antikörpern im Testsystem wurde verzichtet, da ein solches Testsystem aufgrund des enormen Kostenaufwandes für die Routinediagnostik uninteressant war. Eine Verkürzung der Testdauer über eine gemeinsame Reaktion von monoklonalem Fängerantikörper und Antigen führte ebenfalls zu einer Verminderung der Sensitivität des Testsystems. In der Rindergehirnstandardkurve sank die Nachweisgrenze um das zehnfache, so dass eine Rindergehirnkonzentration von 10 µg/ml im Extrakt in einem Messwert im Bereich „cut-off“ Wertes resultierte. Die untersuchten Proben sowie die Negativkontrolle resultierten in vergleichbaren Messwerten, während die Positivkontrolle niedrigere Messwerte ergab, die nur geringfügig oberhalb des „cut-off“ Wertes lagen. Die berechnete Wiederfindungsrate erhöhte sich auf 126%. Aufgrund des Sensitivitätsverlustes wurden beide Ansätze nicht weiter verfolgt.

4.2.16 Indirekter MBP-Enzymimmuntest nach HOLTBECKER (2004)

Auf der alleinigen Basis des Antikörpers MBP129 war von HOLTBECKER (2004) ein indirekter Enzymimmuntest für spezifiziertes Risikomaterial beschrieben worden, bei dem Mikrotiterplatten mit Probenextrakt beschichtet werden (16 h) und anschließend

gebundenes Proben-MBP mittels MBP129 detektiert wurde (Farbreaktion unter Verwendung von anti-Maus-IgG-HRP), ähnlich dem zur Antiserumtiterbestimmung in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfahren.

Orientierend durchgeführte eigene Experimente unter Verwendung des von Holtbecker (2004) beschriebenen Testprotokolls hatten gezeigt, dass MBP129 beim Einsatz von Reinproteinstandardlösung (Abbildung 4.49) bzw. bei reinen Gehirnextrakten (Abbildung 4.50) tatsächlich nur minimale Reaktivität mit porcinem MBP aufwies. Für künstlich mit Gehirn vom Rind bzw. vom Schwein kontaminiertes Hackfleisch (Schweine- und Rinderhackfleisch, 1/1) wurden jedoch erhebliche Probenmatrixeinflüsse festgestellt, die zu schlecht reproduzierbaren Messwerten (Variationskoeffizienten der Messwerte von Vierfachbestimmungen eines Extraktes bis meist >50%, teilweise >100%), zu relativ hohen Messwerten für mit Schweinegehirn kontaminiertem Probenmaterial sowie für die Negativkontrolle führten (bis >0,3 Extinktionseinheiten; Abbildung 4.51). Ein „cut-off“ Wert, der rund der dreifachen Extinktion des ZNS-Negativkontrollansatzes entspricht, läge bei 0,6 Extinktionseinheiten. Hieraus resultierte eine Nachweisgrenze für Zusätze von bovinem Gehirn von lediglich ca. 8%, wobei allerdings die Variabilität der Messwerte (Variationskoeffizienten) deutlich unter den üblichen Anforderungen an Enzymimmuntests lag. Eine in vorliegender Arbeit beschriebene Standardextraktion mit 1% SDS/A.dest. anstelle der von HOLTBECKER (2004) beschriebenen Extraktionsmethode resultierte zwar sowohl in höheren Messwerten als auch in höheren Spezifitätskennzahlen, jedoch konnte weder die Nachweisgrenze noch die Variabilität der Messwerte verbessert werden (Abbildung 4.52; Tabelle 4.26). Zudem dauerte der Untersuchungsgang zwei Tage. Im Hinblick auf die Zielsetzung der eigenen Arbeit wurde dieses System als nicht ausreichend angesehen.

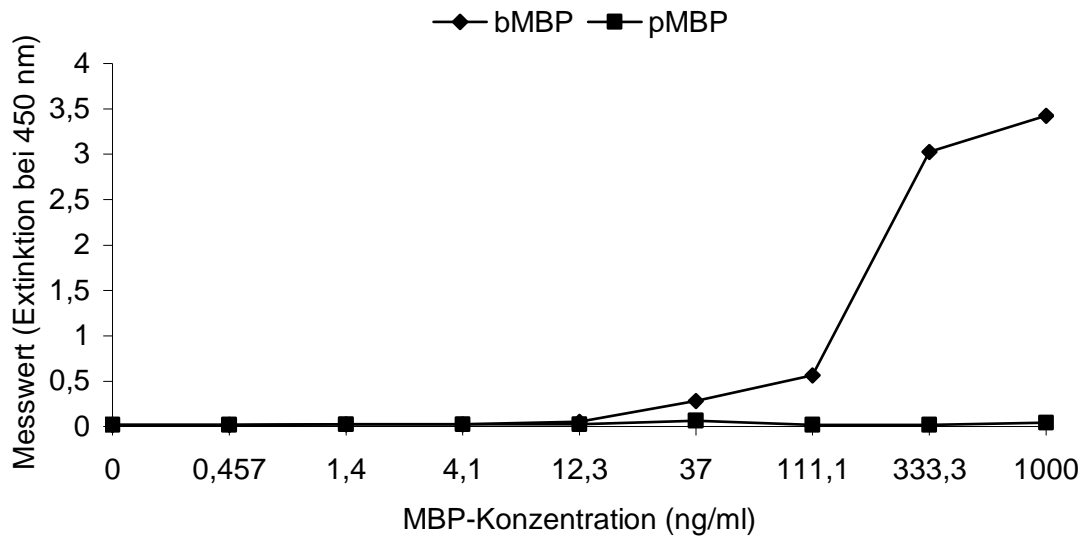


Abbildung 4.49: Spezifität des monoklonalen Antikörpers MBP129 für Reinproteinlösungen unter Verwendung des Testprotokolls von HOLTBECKER (2004). Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Verdünnungsreihen von bovinem bzw. porcinem MBP. Die maximalen Extinktionswerte für porcines MBP lagen bei 0,042 Einheiten.

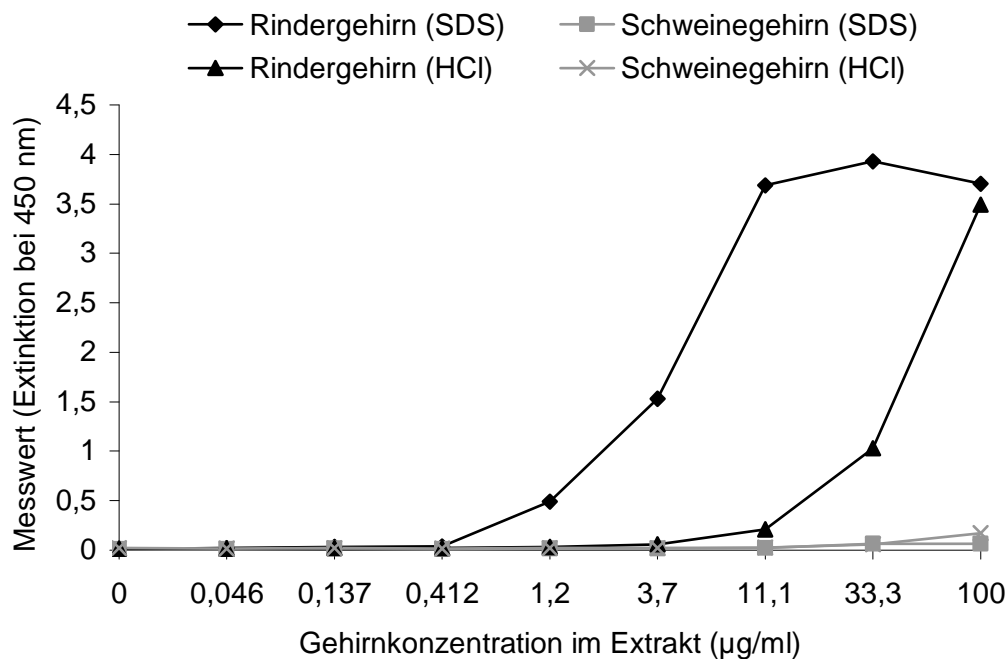


Abbildung 4.50: Spezifität des monoklonalen Antikörpers MBP129 für Gehirnextrakte unter Verwendung des Testprotokolls von HOLTBECKER (2004). Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Verdünnungsreihen von bovinem bzw. porcinem Gehirnextrakt (vergleichend eingesetzte Extraktionsmittel 1% SDS/A.dest. und 0,1 molare Salzsäure). Die maximalen Extinktionswerte für porcines Gehirnextrakt lagen bei 0,173 Einheiten.

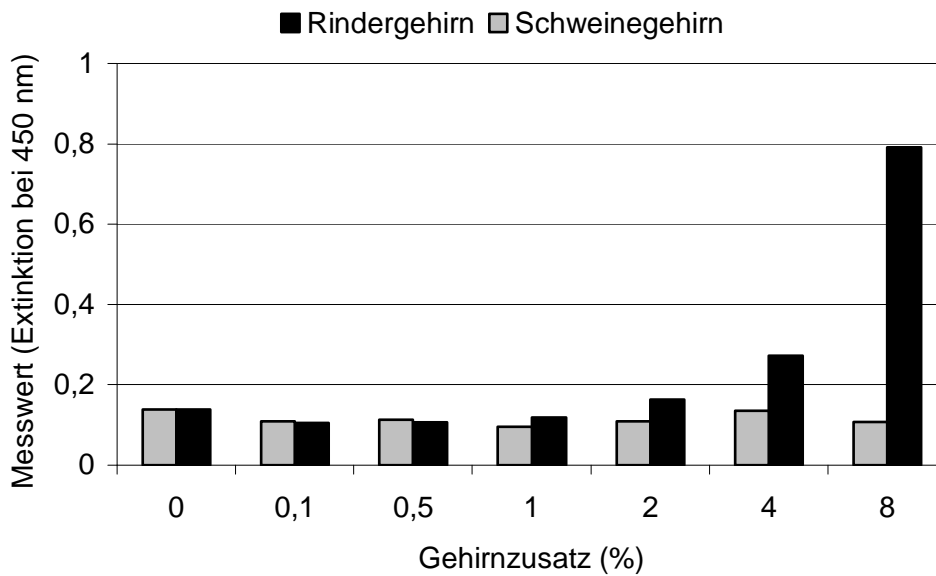


Abbildung 4.51: Messwerte (Mittelwerte mit Standardabweichung aus Vierfachansätzen) für Extrakte von künstlich mit Rindergehirn bzw. Schweinegehirn kontaminiertem Hackfleisch im Enzymimmuntest unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers MBP129. Beschichtung der Mikrotiterplatten mit verdünntem Extrakt von künstlich kontaminiertem Hackfleisch nach Extraktion mit 0,1 molarer Salzsäure.

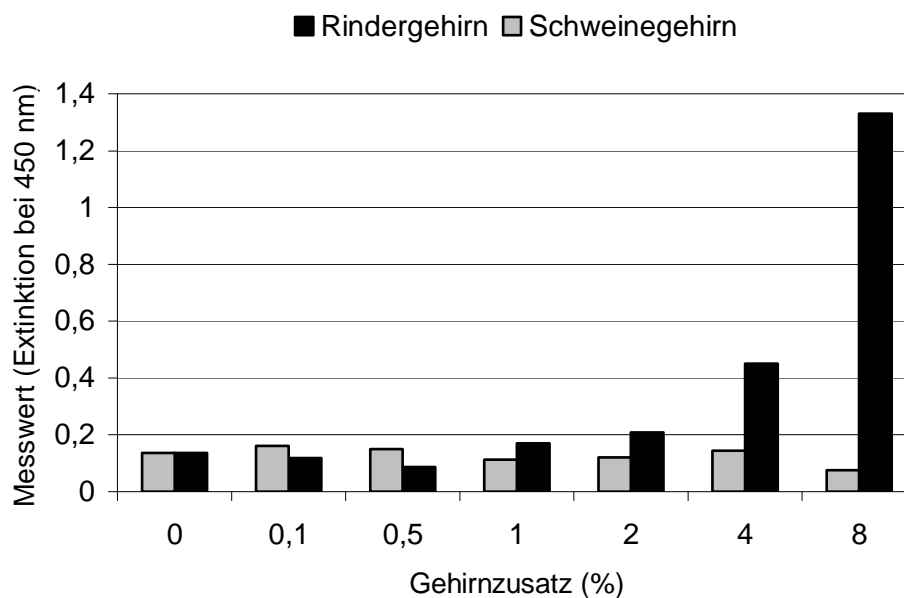


Abbildung 4.52: Messwerte (Mittelwerte mit Standardabweichung aus Vierfachansätzen) für Extrakte von künstlich mit Rindergehirn bzw. Schweinegehirn kontaminiertem Hackfleisch im Enzymimmuntest unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers MBP129. Beschichtung der Mikrotiterplatten mit verdünntem Extrakt von künstlich kontaminiertem Hackfleisch nach Extraktion mit 1% SDS/A.dest..

Tabelle 4.26: Vergleich der Merkmale der beschriebenen Testsysteme für MBP.

Merkmale der Testsysteme	Anteil Rinder-Gehirn	MBP-EIA (diese Arbeit)	MBP-EIA (HOLTBECKER, 2004)	
			HCl-Extrakte	SDS-Extrakte
Spezifitätskennzahl	8%	10,6	7,3	17,5
	1%	9,5	1,2	1,5
Wiederfindungsrate	8%	80,7 (38-112)	21,1 (5,6-40,7)	n.u.
(%; MW)	1%	93 (47-148)	56 (12-103)	
„cut-off“ Wert (dreifache Extinktion des Negativkontrollansatz)		0,1	0,6	0,6
Nachweisgrenze (% Rindergehirn)		0,1	8	8

n.u.: nicht untersucht; *MW*: Mittelwert

4.2.17 Charakterisierung der Antikörperspezifität mittels Immunoblot

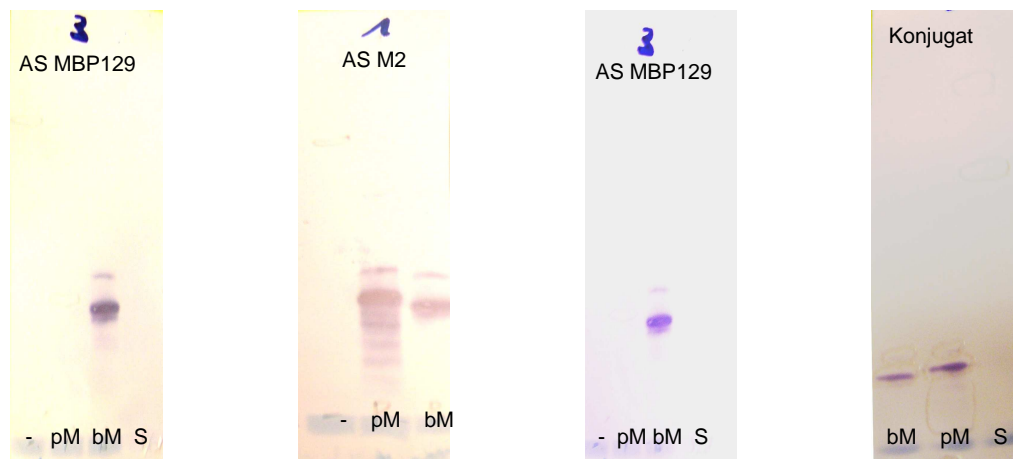
4.2.17.1 Western Blot des MBP-Reinproteins und des Gehirnextraktes

Während die elektrophoretisch aufgetrennte bovine MBP-Reinproteinlösung eine stark ausgeprägte Bande bei einem geschätzten Molekulargewicht von 17 kDa und zwei schwächere Banden bei 16 kDa und 18 kDa aufwies, ergab die porcine MBP-Reinproteinlösung eine stark ausgeprägte Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa und fünf schwächere Banden bei 8, 10, 12, 14 und 15 kDa. Rindergehirnextrakt und Schweinehirnextrakt resultierten in zahlreichen Banden. In beiden Extrakten waren vier stark ausgeprägte Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 19, 46, 60 und 66 kDa und zwei schwach ausgeprägte Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 28 und 34 kDa nachweisbar.

4.2.17.2 Charakterisierung der Antisera und Konjugate im Immunoblot unter Verwendung von MBP-Reinprotein

Bei der Charakterisierung der anti-bMBP-Antisera mit MBP-Reinprotein zeigte sich unter Verwendung der Antisera M2 und MBP129 die intensivste Bandenfärbung. Die polyklonalen Antikörper färbten bovines und porcines Protein gleichermaßen an und erwiesen sich als rinderunspezifisch. Die monoklonalen Antikörper MBP129 färbten nur die Banden des bovinen Proteins an und erwiesen sich somit als rinderspezifisch (Tabelle 4.27). Keines der untersuchten Antisera färbte weitere, unspezifische Banden an. Das als ZNS-Negativkontrolle eingesetzte BSA war in allen Fällen ohne sichtbare Bande (Abbildung 4.53).

Bei der Charakterisierung der anti-bMBP-Konjugate mit MBP-Reinprotein zeigte sich unter Verwendung des Konjugats M2-HRP die intensivste Bandenfärbung. Alle untersuchten Konjugate färbten bovines und porcines Protein gleichermaßen an und erwiesen sich als rinderunspezifisch (Tabelle 4.28). Die Konjugate färbten weder die ZNS-Negativkontrolle BSA noch weitere, unspezifische Banden an (Abbildung 4.53).



AS: Antiserum; S: Molekulargewichtsmarkerprotein

Abbildung 4.53: Charakterisierung der anti-bMBP-Antisera und –Konjugate im Immunoblot mit bovinem MBP (*bM*) und porcinem MBP (*pM*). Als ZNS-Negativkontrolle (-) wurde BSA verwendet.

Tabelle 4.27: Charakterisierung der anti-bMBP-Antisera im Immunoblot mit MBP-Reinprotein. Rinderspezifische Antisera, die nur bovines MBP anfärbten, sind im Fettdruck dargestellt.

Antiserum	Bandenintensität des bMBPs ¹	Reaktivität mit b/pMBP ²
M1	+	-
M2	+++	-
M3	+	-
MBP129	+++	+

Beurteilung: 1: – keine sichtbare Bande, (+) schwach sichtbare, + gut sichtbare, ++ stark sichtbare, +++ sehr stark sichtbare Bande; 2: – rinderunspezifisch, (+) bedingt rinderspezifisch, + rinderspezifisch

Tabelle 4.28: Charakterisierung der anti-bMBP-Konjugate im Immunoblot mit MBP-Reinprotein.

Konjugat	Bandenintensität des bMBPs ¹	Reaktivität mit b/pMBP ²
M1-HRP	(+)	-
M2-HRP	++	-
M3-HRP	(+)	-

Beurteilung: 1: – keine sichtbare Bande, (+) schwach sichtbare, + gut sichtbare, ++ stark sichtbare, +++ sehr stark sichtbare Bande; 2: – rinderunspezifisch, (+) bedingt rinderspezifisch, + rinderspezifisch

4.2.17.3 Charakterisierung der Antisera und Konjugate im Immunoblot unter Verwendung von Gehirnextrakten

Bei der Charakterisierung der anti-bMBP-Antisera mit Rinder- und Schweinegehirnextrakten zeigte sich unter Verwendung der Antisera M2 und MBP129 die intensivste Bandenfärbung. Antiserum M2 erwies sich als bedingt rinderspezifisch. Unter Verwendung dieses Antisera färbten sich zwar auch im Schweinegehirnextrakt die MBP-Banden an, jedoch wiesen die Banden im Rindergehirnextrakt eine geringgradig intensivere Färbung auf. Die monoklonalen Antikörper MBP129 färbten nur die MBP-Banden im Rindergehirnextrakt an und erwies sich somit als rinderspezifisch. Die übrigen Antisera färbten Banden im Rinder- und Schweinegehirnextrakt vergleichbar an und erwies sich somit als rinderunspezifisch (Tabelle 4.29). Keines der untersuchten Antisera färbte weitere, unspezifische Banden an. Das als ZNS-Negativkontrolle

eingesetzte BSA war in allen Fällen ohne sichtbare Bande (Abbildung 4.54). Bei der Charakterisierung der anti-bMBP-Konjugate mit Rinder- und Schweinegehirnextrakt zeigte sich unter Verwendung des Konjugats M2-HRP die intensivste Bandenfärbung. Alle untersuchten Konjugate färbten bovines und porcines Protein gleichermaßen an und erwiesen sich als rinderunspezifisch (Tabelle 4.30). Alle Konjugate färbten weder die ZNS-Negativkontrolle BSA noch weitere, unspezifische Banden an (Abbildung 4.54). Beim Vergleich verschiedener Extraktionsmittel im Immunoblot mit Antiserum M2 und anti-Kaninchen-Detektionsantikörpern konnte mit allen untersuchten Extraktionsmitteln bovines MBP extrahiert und nachgewiesen werden (Tabelle 4.31).

Tabelle 4.29: Charakterisierung der anti-bMBP-Antiseren im Immunoblot mit Gehirnextrakten von Rind und Schwein. Rinderspezifische Antiseren, die nur bovines MBP anfärbten, sind im Fettdruck dargestellt.

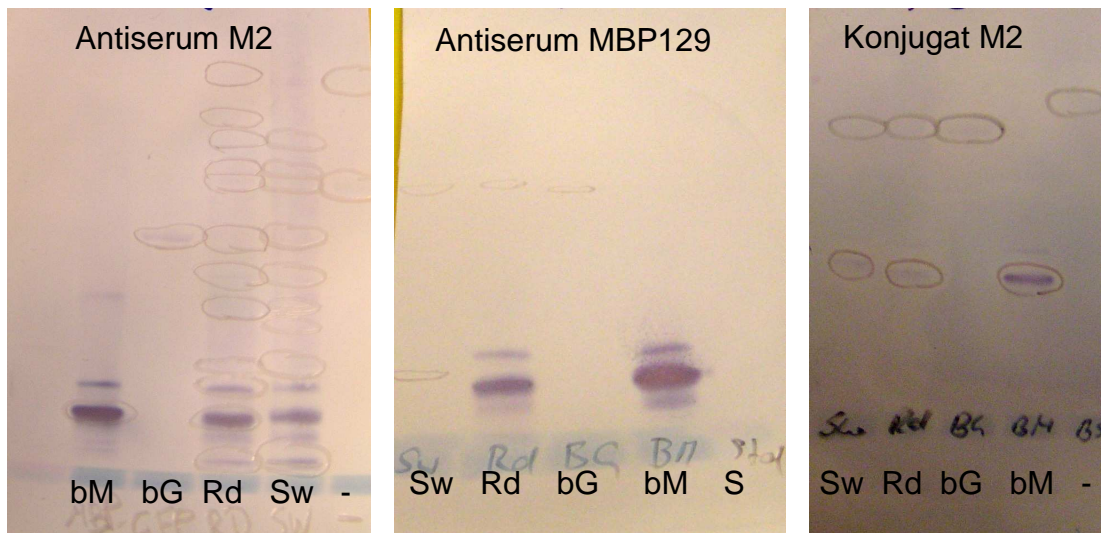
Antiserum	Bandenintensität des bMBPs ¹	Reaktivität mit Rinder- und Schweinegehirn ²
M1	++	-
M2	+++	(+)
M3	(+)	-
MBP129	+++	+

Beurteilung: 1: – keine sichtbare Bande, (+) schwach sichtbare, + gut sichtbare, ++ stark sichtbare, +++ sehr stark sichtbare Bande; 2: – rinderunspezifisch, (+) bedingt rinderspezifisch, + rinderspezifisch

Tabelle 4.30: Charakterisierung der anti-bMBP-Konjugate im Immunoblot mit Gehirnextrakten von Rind und Schwein.

Konjugat	Bandenintensität des bMBPs ¹	Reaktivität mit Rinder- und Schweinegehirn ²
M1-HRP	-	-
M2-HRP	++	-
M3-HRP	(+)	-

Beurteilung: 1: – keine sichtbare Bande, (+) schwach sichtbare, + gut sichtbare, ++ stark sichtbare, +++ sehr stark sichtbare Bande; 2: – rinderunspezifisch, (+) bedingt rinderspezifisch, + rinderspezifisch



bG: bovines GFAP

Abbildung 4.54: Charakterisierung der anti-bMBP-Antiseren und –Konjugate im Immunoblot mit Rindergehirnextrakt (*Rd*), Schweinehirnextrakt (*Sw*) und bovinem MBP (*bM*). Als ZNS-Negativkontrolle wurde BSA (-) bzw. Molekulargewichtsmarkerprotein (*S*) verwendet.

Tabelle 4.31: Vergleich verschiedener Extraktionsmittel im Immunoblot mit Antiserum M2 und anti-Kaninchen-Detektionsantikörper.

Gehirn von Tierart	Extraktionsmittel	MBP-Nachweis
	A.dest.	++
	PBS	(+)
	TBS	(+)
	1% SDS/A.dest.	++
Rind	0,1% SDS/A.dest.	++
	1% Tween/A.dest.	+
	0,1% Tween/A.dest.	(+)
	1% SDS/PBS	++
	1% Tween/PBS	++
Schwein	1% SDS/A.dest.	+

Beurteilung: + MBP-Bande sichtbar; - keine MBP-Bande sichtbar

4.2.17.4 Sensitivität der angewendeten Western Blot Methode

Zur Überprüfung der Sensitivität der angewendeten Western Blot Methode nach Elektrophorese und Blotting wurde Bovines Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0,023 µg/Geltasche bis 3 µg/Geltasche aufgetrennt. BSA wies eine stark ausgeprägte Bande bei ca. 66 kDa und zwei schwach ausgeprägte Banden bei ca. 48 kDa und 90 kDa auf. Die Nachweisgrenze lag bei einer Proteinkonzentration von 0,047 µg/Geltasche (10 µl), was einer Proteinkonzentration von 9,4 µg/ml in der Probenlösung entspricht. Eine Proteinkonzentration von ca. 0,5 µg/Geltasche (entsprechend 100 µg/ml Probenlösung) ergab eine optimale Bandenintensität (Abbildung 4.55).

Zur Überprüfung der Sensitivität der angewendeten Western Blot Methode nach Immundetektion wurde bovines MBP in einer Konzentration von 0,039 µg/Geltasche bis 5 µg/Geltasche aufgetragen und mit Antiserum M2 und entsprechendem anti-Kaninchen-HRP-Konjugat immundetektiert. Die Nachweisgrenze lag bei 0,039 µg/Geltasche (10 µl), was einer Proteinkonzentration von 7,8 µg/ml Probenlösung entspricht. Eine Proteinkonzentration von 0,313 µg/Geltasche bzw. von 62,6 µg/ml Probenlösung ergab eine optimale Bandenintensität (Abbildung 4.56).

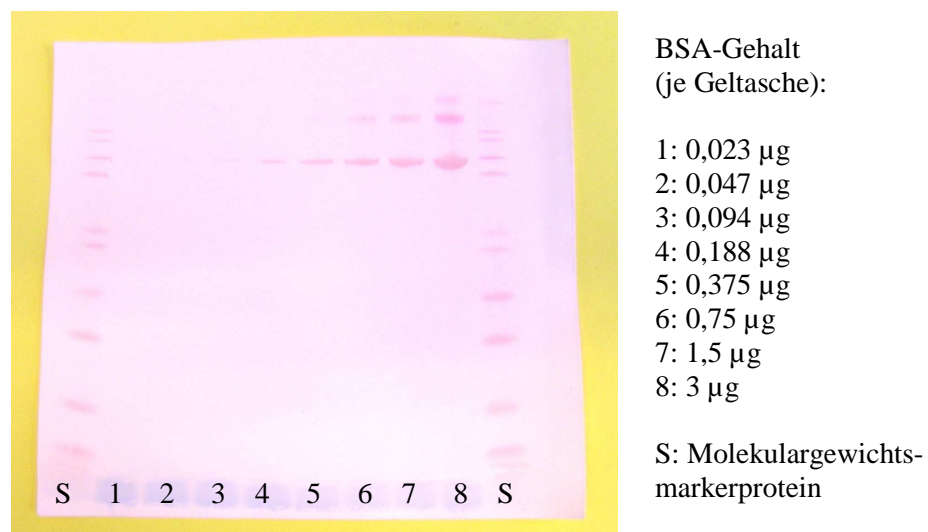


Abbildung 4.55: Ergebnis der Auftrennung von BSA in einer Konzentration von 0,023 µg/Geltasche bis 3 µg/Geltasche nach Elektrophorese und Blotting. Eine Proteinkonzentration von 0,047 µg/Geltasche konnte noch nachgewiesen werden.

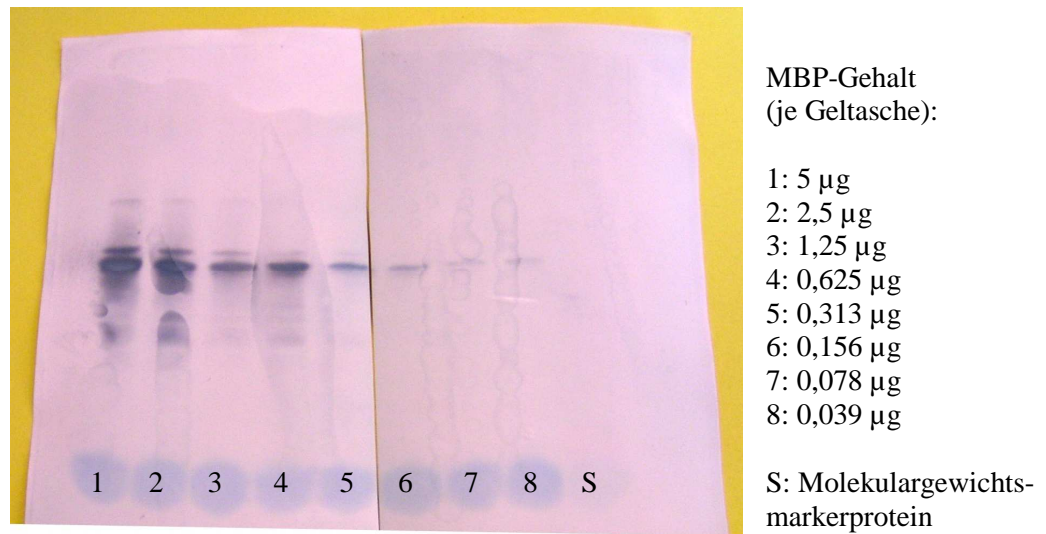


Abbildung 4.56: Ergebnis der Immundetektion von bovinem MBP in einer Konzentration von 0,039 $\mu\text{g}/\text{Geltasche}$ bis 5 $\mu\text{g}/\text{Geltasche}$ unter Verwendung des Antiserums M2. Eine Proteinkonzentration von 0,039 $\mu\text{g}/\text{Geltasche}$ konnte noch nachgewiesen werden.

5 DISKUSSION

Es bestehen kaum noch Zweifel daran, dass die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit die humane Form der BSE ist (HILL et al., 1997; BRUCE et al., 1997; ALMOND und PATTISON, 1997; PRUSINER, 1997; LASMEZAS et al., 2001). Somit liegt eine potentielle Gefährdung des Menschen vor durch kontaminierte Lebensmittel zu erkranken. Die Zahlen der positiv auf BSE getesteten Tiere sind zwar in den letzten Jahren deutlich rückläufig, aber es treten immer noch gelegentlich BSE-Fälle in Deutschland auf. Die sich daraus ergebende Notwendigkeit einer regelmäßigen Kontrolle besonders gefährdeter Lebensmittel auf eine mögliche Kontamination mit SRM erfordert die Entwicklung eines speziesspezifischen, empfindlichen, schnell und einfach durchzuführenden Nachweisverfahrens. Molekularbiologische und physikalisch-chemische Verfahren zum Nachweis von SRM erfordern neben einem großen technischen Aufwand besonders qualifiziertes Personal und sind daher nur in beschränktem Umfang für eine breit angelegte Routinediagnostik anwendbar. Eine Alternative stellen enzymimmunologische Nachweisverfahren dar, die sich durch hohe Spezifität, Empfindlichkeit und einfache Durchführbarkeit auszeichnen und einen hohen Probendurchsatz ermöglichen (CHU, 1986). Die Entwicklung praktikabler enzymimmunologischer Nachweisverfahren für SRM ist trotz vieler Bemühungen bisher aufgrund der unzureichenden Tierartspezifität unbefriedigend (HORLACHER et al., 2001).

5.1 Erstellung eines GFAP-Sandwich-Enzymimmuntests

Bei den derzeit kommerziell erhältlichen Testsystemen Ridascreen® Risk Material 10/5 und ScheBo® Brainostic™ Test handelt es sich um Sandwich-Enzymimmuntests, die auf einem Nachweis des Markerproteins GFAP basieren. Ursächlich für die Verwendung von GFAP als Markerprotein ist einerseits dessen ZNS-Spezifität und andererseits dessen Hitzestabilität. Zudem liegen aus der humanmedizinischen Forschung zahlreiche Informationen über dieses Protein vor. Nachteilig ist jedoch bei der Verwendung von GFAP als ZNS-Markerprotein, dass es nur eine sehr geringe Tierartspezifität aufweist und der GFAP-Gehalt im Rückenmark vier- bis fünfmal höher ist als im Gehirn (SCHMIDT et al., 1999b) mit der Konsequenz, dass Testsysteme die auf diesem Protein beruhen nicht für

eine Quantifizierung des ZNS-Gehaltes geeignet sind. Die kommerziellen Sandwich-Enzymimmuntests haben beispielsweise zwar nach Herstellerangaben eine Nachweisgrenze von 0,1% ZNS-Zusatz, aber detektieren neben bovinem sowie ovinem und caprinem ZNS-Material auch porcines, equines und aviäres ZNS-Material (ANONYM, 2001a; ANONYM, 2002).

Ein von RENCOVA (2005) entwickelter indirekter, kompetitiver Enzymimmuntest, der auf einem GFAP-Nachweis basiert, weist zudem noch eine geringe Testempfindlichkeit auf. Bei Verwendung monoklonaler anti-bGFAP-Antikörper konnte in diesem Testsystem nur eine Nachweisgrenze von 10% ZNS-Zusatz erreicht werden. Deshalb ist dieses Testsystem für die immunchemische Detektion von GFAP ungeeignet (RENCOVA, 2005). In der vorliegenden Arbeit sollte ein enzymimmunologisches Verfahren auf der Basis von GFAP mit verbesserter Tierartspezifität entwickelt werden. Zum Nachweis von bovinem GFAP in Fleischerzeugnissen wurde ein Testsystem im Format eines Sandwich-Enzymimmuntests gewählt. Durch Verwendung von Immunreagenzien im Überschuss zeichnet sich dieses Verfahren gegenüber kompetitiven Verfahren durch eine höhere Testsensitivität aus. Zudem wird die Kinetik der Antikörper-Antigen-Reaktion durch in der Probenmatrix enthaltene Substanzen weniger beeinflusst (EKINS, 1985; EKINS 1989; ANGLER, 2000). Beim Sandwich-Enzymimmuntest ist die Antigenkonzentration in Proben direkt proportional der Farbentwicklung. Für eine optimale Testdurchführung ist es wichtig, unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden. Aufgrund dessen ist für eine hohe Aussagekraft des Testverfahrens eine exakte Durchführung des Tests ebenso wichtig wie die Qualität der verwendeten Immunreagenzien (ANGLER, 2000).

Das entwickelte Testsystem P3/G5-HRP weist eine deutlich verbesserte Tierartspezifität auf. Die Reaktivität mit ZNS-Material der Tierart Schwein konnte auf ein Minimum reduziert werden. Es wurde jedoch auch Reaktivität mit ZNS-Material von Pferd und Kaninchen festgestellt, was in der Praxis von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. Beides ist ein seltenes Schlachtnebenprodukt, das in der Regel nur in speziellen Schlachtbetrieben anfällt. Die Kreuzreaktivität muss bei der Auswertung der Ergebnisse jedoch berücksichtigt werden. Entgegen der von HORLACHER et al. (2001) im Rahmen des Nachweises von GFAP beobachteten Kreuzreaktivität mit Geflügelfleisch konnte im entwickelten GFAP-Sandwich-Enzymimmuntest weder mit Geflügelfleisch noch mit ZNS-Material von Huhn und Pute Reaktivität festgestellt werden. Grundsätzlich weist das

Testsystem eine ausgeprägte ZNS-Spezifität auf, denn es konnte weder mit anderen Geweben noch mit ausgewählten Organen eine Reaktion festgestellt werden. Die Testsensitivität ist mit einer Nachweisgrenze von 0,5% Rindergehirn in künstlich, kontaminiertem Hackfleisch geringer als bei den kommerziellen Testsystemen, für die eine Nachweisgrenze von 0,1% Rinder-ZNS angegeben wird. Diese Nachweisgrenze konnte jedoch weder von AGAZZI et al. (2002) noch von HOSSNER et al. (2006) bestätigt werden und ist als fraglich anzusehen. Bei der Untersuchung von Handelsproben waren entgegen der Feststellung von SCHMIDT et al. (2001) keine Einflüsse durch Zutaten, Gewürze oder Sonstiges zu beobachten. Nachteilig war jedoch bei der Probenuntersuchung die Tatsache, dass das Testsystem sich nicht zur Quantifizierung eignete. Ein „cut-off“ Wert von 0,1 Extinktionseinheiten wurde festgelegt und entspricht im entwickelten Testsystem etwa der dreifachen Extinktion des ZNS-Negativkontrollansatzes. Dadurch sollte eine ausreichende Testsicherheit hinsichtlich einer korrekten Ergebnisauswertung gewährleistet werden. Es konnte außerdem eine gemeinsame Probenvorbereitung für das GFAP- und das MBP-Testsystem etabliert werden, so dass ein Extrakt in beiden Systemen ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand für die Extraktion untersucht werden kann.

Zur Gewinnung spezifischer Antiseren wurde als Immunogen eine Region der Aminosäuresequenz des bovinen GFAP ausgewählt, in der sich Rind und Schwein unterschieden. Um die Wahrscheinlichkeit rinderspezifische Antikörper zu erhalten zu erhöhen, wurde dieser Bereich in zwei Peptide geteilt und synthetisiert: bGFAP-Peptid 1 im Bereich der Aminosäuren 287 bis 298 und bGFAP-Peptid 2 im Bereich der Aminosäuren 299 bis 313. Die Immunisierung von vier Kaninchen mit den Peptiden resultierte in unbefriedigend niedrigen Antikörpertiterhöhen der Antiseren, wobei mit bGFAP-Peptid 2 grundsätzlich etwas höhere Antiserentiter erreicht werden konnten. Ursächlich für eine geringe Immunogenität der Peptide könnte sowohl die Aminosäurezusammensetzung als auch die unzureichende Größe sein, wobei bGFAP-Peptid 2 mit den höheren Titern drei Aminosäuren länger war. Die Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten aus diesen Antiseren erwies sich daher als ausgesprochen schwierig. Grund dafür war wahrscheinlich die geringe Titerhöhe, weil im Rahmen der Konjugation die per se niedrigen Antikörpergehalte durch Fällung, Kopplung und gelchromatographische Aufreinigung weiter reduziert wurden. Dies resultierte in relativ konzentrierten Arbeitskonzentrationen und letztlich in erhöhten unspezifischen Hintergrundreaktionen. Daher wurden die anti-bGFAP-Peptid-Antiseren als

Fängerantikörper mit bGFAP-Vollprotein-Detektionsantikörpern kombiniert. Antiseren für letztere wurden im Rahmen der Dissertation von LUX (2009) an der Professur für Milchwissenschaften gewonnen, wobei Kaninchen, Schweine und Schafe mit bovinem GFAP-Vollprotein immunisiert wurden, was in relativ hohen Antikörpertitern resultierte. Die so erstellten Testsysteme ergaben in allen Kombinationen verwertbare Resultate, wobei sich hinsichtlich der Tierartspezifität die Ergebnisse der Untersuchung von Reinprotein tendenziell mit den Ergebnissen der Untersuchung von Rohextrakten deckten. Die für bovines GFAP-Reinprotein ermittelte Spezifität der Testsysteme lag jedoch über jener für Rindergehirnextrakt. Eine Erklärung dafür ist in der Tatsache zu suchen, dass zur Gewinnung der Antiseren als Immunogen bGFAP-Reinprotein verwendet wurde, welches industriell aufgereinigt und chemisch konserviert wurde, was in einer Strukturveränderung resultiert haben könnte. Für eine Strukturveränderung im Reinprotein spricht auch die Tatsache, dass das Reinprotein eine ausgesprochene Lagerinstabilität im Gegensatz zu Rohextrakten aufwies, in denen auch nach einer einjährigen Lagerung bei -18 °C noch die selbe Menge GFAP detektiert werden konnte. Ähnlich stabil war GFAP auch in Probenmaterialien; nach einem Jahr Lagerung war GFAP noch in gleicher Konzentration extrahierbar. Dies widerspricht den Erfahrungen von SCHMIDT et al. (1999b), dass nach einer achttägigen Lagerung nur noch eine rund 50%ige GFAP-Aktivität nachweisbar sei. In diesen Versuchen wurden die Proben jedoch bei 4 °C gelagert, was die unterschiedlichen Beobachtungen erklären könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte die Problematik der Lagerstabilität des Reinproteins durch Lagerung bei -80 °C und Lagerung in kleinsten Mengen, so dass nur ein einmaliges Auftauen stattfand, minimiert werden. Zudem unterscheiden sich die selbst hergestellten Antikörper wahrscheinlich bezüglich der Bindungsstellen von denjenigen, mit denen SCHMIDT et al. (1999b) arbeiteten.

Zur Untersuchung von Rohextrakten wurde die Probenextraktion nach R-Biopharm modifiziert und so zur Extraktion von GFAP und MBP optimiert. GFAP erwies sich als schwierig zu extrahieren, da es im Gegensatz zu MBP, welches grundsätzlich allein mit A.dest. extrahiert werden kann, nur mit SDS-A.dest.-Lösung und Tween-PBS-Lösung extrahierbar war. Mögliche Ursache hierfür ist die Notwendigkeit der Herauslösung von GFAP aus der Zellstruktur, wofür anscheinend nur Detergentien geeignet sind. Die gewählte Probenvorbereitung wies reproduzierbare Ergebnisse auf, so dass Schwankungen des nachweisbaren GFAP-Gehaltes durch die Extraktion ausgeschlossen werden konnten. Die verschiedenen anti-bGFAP-Peptid-Antiseren wiesen sowohl bei der Untersuchung von

Reinprotein als auch von Rohextrakten vergleichbare Ergebnisse auf. Die Eignung beider Peptide zur Gewinnung spezifischer Antisera konnte nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen erwies sich das Konjugat G5-HRP als optimal geeignet im Hinblick auf Tierartspezifität und Sensitivität der Testsysteme. Hierbei ist erstaunlich, dass dieses Konjugat auf Kaninchenantiserum basiert. Bei der Immunisierung mit bGFAP wurden auch Schweine immunisiert, wobei man sich die Tatsache zu nutze machen wollte, dass in der Regel keine Antikörper gegen spezieeigene Strukturproteine gebildet werden. Eine mögliche Erklärung für die Kreuzreaktivität von Schweineantisera und daraus hergestellten Konjugaten mit porcinem GFAP ist, dass GFAP im ZNS isoliert vom Immunsystem vorliegt und aus diesem Grund auch als körpereigenes Protein als fremd erkannt wird. Bei einem Vergleich der GFAP-Konzentrationen in Gehirn und Rückenmark bestätigte sich die Tatsache, dass aufgrund der generell höheren GFAP-Konzentration im Rückenmark im Vergleich zum Gehirn eine Quantifizierung des ZNS-Gehaltes prinzipiell nur sehr eingeschränkt möglich war. Während der Unterschied beim Rind vergleichsweise gering ausfiel, konnte im Rückenmark vom Schwein jedoch mehr als der vierfache GFAP-Gehalt des Gehirns nachgewiesen werden, so dass ein positives Ergebnis im Rahmen der Probenuntersuchung sowohl auf Rinder-ZNS als auch auf Schweinerückenmark zurückgeführt werden könnte. Die Untersuchung künstlich kontaminierter, erhitzter Proben resultierte in schwächeren Messsignalen als die Untersuchung vergleichbarer künstlich kontaminierter, roher Proben. Die Nachweisbarkeit nahm mit zunehmender Hitzebehandlung ab, wobei selbst in Vollkonserven noch GFAP nachgewiesen werden konnte. Dies bestätigte einerseits die grundsätzliche Hitzestabilität von GFAP, die bereits SEYBOLDT et al. (2003) beobachtete, und andererseits die Feststellung von LÜCKER et al. (2000a) und SCHMIDT et al. (2001), dass die GFAP-Aktivität (bzw. Antikörperbindung) mit steigender Hitzebehandlung abnimmt. Die Feststellung von WENISCH et al. (2000) und AUPPERLE et al. (2002), dass GFAP als Markerprotein zur Diagnostik erhitzter Fleischerzeugnisse ungeeignet sei, konnte jedoch nicht bestätigt werden, was in der unterschiedlichen Sensitivität von Enzymimmuntests und Immunhistologie begründet sein könnte. Hinsichtlich der Reaktivität des Testsystems mit ZNS-Material weiterer Spezies erscheint es von Vorteil, dass auch eine deutlich ausgeprägte Reaktivität mit ZNS-Material der Tierarten Schaf und Ziege festgestellt wurde, weil auch dieses Gewebe als SRM einzustufen ist (VO (EG) 999/2001). Die Reaktivität mit ZNS-Material von Schwein, Pferd und Kaninchen konnte auch in diesem Testsystem nicht gänzlich ausgeschaltet werden, was die grundsätzliche alleinige

Verwendung von GFAP als Markerprotein in Frage stellt. Eine alleinige Verwendung dieses Testsystems ist jedenfalls im Hinblick auf eine eindeutige Identifizierung als nicht ausreichend zu beurteilen. Aus Gründen des Verbraucherschutzes wäre es entgegen der derzeitigen Gesetzeslage ohnehin sinnvoll eine Verarbeitung von ZNS-Material unabhängig von der Tierart entsprechend den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches (2001) zu unterbinden. Zwar konnten einige Tierarten wie z.B. Schweine bisher nicht auf natürlichem Weg mit BSE infiziert werden, dennoch ist eine Manifestation nicht auszuschließen. Solche latent infizierten Tiere würden eine potentielle Infektionsquelle darstellen. Das entwickelte Testsystem zeichnet sich durch eine ausgesprochene ZNS-Spezifität aus. Die untersuchten Gewebe und Organe erbrachten negative Resultate. YEN und FIELDS (1981), SCHMIDT et al. (1999b; 2001), KELLEY et al. (2000) und AUPPERLE et al. (2002) wiesen GFAP in peripheren Nerven nach. Sollte es sich bei dem nachgewiesenen Protein tatsächlich um GFAP handeln, scheinen periphere Nerven beim Nachweis des Markerproteins keine praktische Bedeutung zu haben, da mit dem entwickelten Testsystem weder in der stark innervierten Zunge sowie in der Lendenmuskulatur noch in einer der untersuchten Handelsproben Reaktivität festgestellt wurde. Eine weitere mögliche Erklärung ist die These von BIGNAMI und DAHL (1977) und PRUSS et al. (1981), dass es sich bei dem nachgewiesenen Protein im peripheren Nervensystem nicht um GFAP handelt, sondern um andere Intermediärfilamentproteine, die mit GFAP identische Epitope besitzen. In diesem Fall ist es wahrscheinlich, dass diese Epitope vom entwickelten Testsystem nicht detektiert werden, weil die verwendeten Fängerantikörper nur gegen das speziellen bGFAP-Peptid gerichtet sind. Die Anwendbarkeit des Testsystems bestätigte sich bei der Untersuchung von Handelsproben. Es zeichnete sich sowohl durch geringe Variationskoeffizienten als auch durch geringe Extinktionswerte für die untersuchten Proben und für die ZNS-Negativkontrolle aus. Die mit Rindergehirn künstlich kontaminierte ZNS-Positivkontrolle wies angemessene Wiederfindungsraten an der Gehirnstandardextraktkurve auf. Die Tatsache, dass alle 64 untersuchten Fleischerzeugnisse negativ waren, lässt vermuten, dass eine Verarbeitung von ZNS-Material heutzutage nicht mehr üblich ist. Um jedoch eine umfassende Aussage über die derzeitige Situation in Deutschland treffen zu können, wären umfangreichere Untersuchungen notwendig. Zudem hat die zweiwöchige konstante Spezifität und Sensitivität des Testsystems den Vorteil, dass beschichtete Platten stets auf Vorrat bei 4 °C gelagert werden können und bei Probeneingang eine sofortige Untersuchung erlauben. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit der von SCHMIDT et al. (2001) ermittelte

GFAP-Gehalt im Gehirn tendenziell bestätigt werden. Der mit dem Testsystem P3/G5-HRP ermittelte GFAP-Gehalt von durchschnittlich 1.000 ng/mg im Gehirn ist mit dem von SCHMIDT et al. (2001) ermittelten Wert von 574 ng/mg bzw. 710 ng/mg vergleichbar. Die Ergebnisse der Charakterisierung der Antikörperspezifität mittels Immunoblot unterscheiden sich von jenen im Enzymimmuntest. Bei der Methodik des Immunoblots ist zu berücksichtigen, dass die Detektion nur über eine Proteinbindungsstelle stattfindet, wodurch die Anzahl unspezifischer Bindungen erhöht und die Sensitivität herabgesetzt wird. Eine weitere Ursache für verschiedene Ergebnisse ist in der Tatsache zu suchen, dass bei der Elektrophorese des GFAP nicht das Protein als solches mit seiner ursprünglichen Tertiärstruktur auf der Membran vorliegt, sondern es zuvor im Rahmen der Probenvorbereitung denaturiert und reduziert wurde. Dadurch weist es von vorneherein eine andere Reaktivität auf als das im Sandwich-Enzymimmuntest verwendete „native“ Protein. Problematisch bei der Durchführung des Immunoblots ist außerdem die Auftrennung exakt definierter Proteingehalte, da beim Blotting kein gleichmäßiger und vollständiger Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran gesichert werden kann. Bei ungleichmäßigem Druck können Proteine im Gel verbleiben oder in die Pufferlösung übergehen. Als problematisch erwies sich auch der Probenauftrag von Rohextrakten, weil das verwendete Extraktionsmittel SDS auf den Vorgang der Elektrophorese störend wirkte. Eine Verdünnung der Extrakte in A. dest. konnte dieses Problem minimieren. Auch ein sorgfältiges Entfetten der Rohextrakte war unbedingt notwendig, um Störeinflüsse und Blockaden in der Elektrophorese zu verhindern. Multiple GFAP-Banden nach der Elektrophorese erklären sich als Folge eines Zerfalls von GFAP in Untereinheiten geringerer Größe. Dies wurde auch von DAHL und BIGNAMI (1975), GOLDMAN et al. (1978) und ALBRECHTSEN et al. (1984) in humanem GFAP beschrieben, die diese Beobachtung durch die Neigung von GFAP zu postmortaler Dialyse erklärten. Die Reaktivität der Antikörper konnte in der vorliegenden Arbeit nur qualitativ abgeschätzt werden, weil die Auswertung der Membranen nach dem Immunoblot visuell erfolgte. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse des Immunoblots keine Aussagen über die Eignung bzw. die Spezifität der Antikörper im Enzymimmuntest zu.

5.2 Erstellung eines MBP-Sandwich-Enzymimmuntests

Bei der Suche nach einem weiteren geeigneten Markerprotein zum Nachweis von SRM in Lebensmitteln erschien MBP aussichtsreich zu sein. Von Vorteil ist bei Verwendung von MBP dessen Tierartspezifität und Hitzestabilität, so dass in rohen und in erhitzten Lebensmitteln wiederkäuerspezifisch Nervengewebe nachgewiesen werden kann. Ein weiterer Vorteil von MBP im Vergleich zu GFAP ist, dass mit dessen Hilfe der ZNS-Gehalt in untersuchten Proben aufgrund einer gleichmäßigen Verteilung im ZNS quantifiziert werden kann. Zudem lagen im Hinblick auf die Eignung von MBP als Markerprotein positive Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung von HERDE et al. (2005) vor. Nachteilig erschien die Tatsache, dass MBP nicht nur im ZNS, sondern auch im peripheren Nervensystem vorliegt. Außerdem lagen wenige Erfahrungen über den ZNS-Nachweis mittels MBP vor. Einzig ein von HOLTBECKER (2004) entwickelter indirekter Enzymimmuntest basiert auf dem Nachweis von MBP. Dieser hat einerseits den Nachteil einer langen Testdauer, da vor der eigentlichen Untersuchung eine Inkubation der Mikrotiterplatten mit dem Probenextrakt stattfinden muss, und andererseits eine geringe Empfindlichkeit. Außerdem werden bei einem Antigennachweis über nur eine Bindungsstelle wie im indirekten Enzymimmuntest auch unspezifische Bindungen detektiert, was neben der unspezifischen Hintergrundreaktion zu einem hohen Anteil falsch-positiver Ergebnisse führt. In der vorliegenden Arbeit sollte ein Sandwich-Enzymimmuntest zum Nachweis von MBP in Fleischerzeugnissen entwickelt werden. Der entwickelte MBP-Sandwich-Enzymimmuntest hat gegenüber den kommerziell erhältlichen Testsystemen den Vorteil wiederkäuerspezifisch zu sein, da er keinerlei Reaktivität mit anderen Tierarten aufweist, bei gleicher Sensitivität. Das Testsystem detektiert 0,1% Rinder-ZNS in rohen, künstlich kontaminierten Proben. Außerdem eignet es sich zur Quantifizierung des ZNS-Gehaltes, weil sich bestätigte, dass der MBP-Gehalt im Gehirn mit jenem in Rückenmark vergleichbar war. Ein weiterer Vorteil ist die unproblematische Extrahierung von MBP im Vergleich zu GFAP. Der Nachteil des Tests gegenüber anderen Testsystemen, die auf einem GFAP-Nachweis beruhen, dass MBP nicht ZNS-spezifisch ist, erwies sich als unbedeutend. Es konnte keine Reaktivität mit Zunge, Muskulatur oder untersuchten Handelsproben festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass MBP in peripheren Nerven eine andere Löslichkeit aufweist als im ZNS. Ein Vorteil im Vergleich zu dem von HOLTBECKER (2004) entwickelten Testsystem ist die Tatsache, dass eine sofortige Untersuchung durchgeführt werden kann.

Mit dem entwickelten MBP-Sandwich-Enzymimmuntest konnte die von EYLAR et al. (1970) und GROOME et al. (1980) beschriebene Hitzestabilität und Widerstandsfähigkeit gegenüber Chemikalien von MBP grundsätzlich bestätigt werden. Das Testsystem eignete sich zur Untersuchung von erhitztem, künstlich kontaminiertem Hackfleisch, wobei jedoch mit zunehmendem Erhitzungsgrad ein geringgradiger Sensitivitätsverlust zu beobachten war. Entgegen der These von AUPPERLE et al. (2002), dass MBP sich nicht als Markerprotein zur Untersuchung erhitzter Fleischerzeugnisse eignet, konnte hier festgestellt werden, dass sich MBP auch zum ZNS-Nachweis in erhitzten Proben eignet. Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse in Immunhistologie und Immunchemie könnten methodischen Ursprungs sein. Bei der Untersuchung von Einzelhandelsproben waren keine Einflüsse durch Gewürze, Zutaten oder Sonstiges zu beobachten. Zur Auswertung der Untersuchung von Handelsproben wurde ein „cut-off“ Wert von 0,1 Extinktionseinheiten festgelegt, der der drei- bis fünffachen Extinktion des ZNS-Negativkontrollansatzes entspricht. Dadurch sollte eine ausreichende Testsicherheit hinsichtlich einer korrekten Ergebnisauswertung gewährleistet werden. Mit dem MBP-Sandwich-Enzymimmuntest konnte ein Testsystem für die Routineuntersuchung von Fleischerzeugnissen im Hinblick auf eine mögliche Kontamination mit Wiederkäuer-ZNS etabliert werden.

Bei der Erstellung des Sandwich-Enzymimmuntests erwies sich die Gewinnung spezifischer Antiseren als problematisch. Es bestand die Gefahr durch MBP-Applikation im Rahmen der Immunisierung in den Kaninchen eine mit der humanen Multiple Sklerose vergleichbare experimentelle allergische Enzephalomyelitis zu induzieren (RIVERS und SCHWENTKER, 1935). Im Tiermodell der Multiple Sklerose wird eine Impfdosis von 500 µg pro Tier verwendet (NAJEME et al., 1997). In eigenen Versuchen wurde eine Impfdosis von 250 µg pro Tier eingesetzt, wobei keines der drei Tiere im Immunisierungsverlauf Krankheitsanzeichen zeigte. Die anti-MBP-Antiseren zweier Tiere eigneten sich nicht zur Verwendung in Antikörper-Enzym-Konjugaten, da unspezifische Reaktionen zwischen Antikörper-Enzym-Konjugat und MBP im Testsystem festgestellt wurden. Ursächlich erscheint hierbei der niedrige Antikörpergehalt dieser beiden Antiseren, der durch Konjugation und gelchromatographische Aufreinigung reduziert wurde. Hohe Konjugatverdünnungen konnten in diesem Fall nicht unerwünschte Bindungsreaktionen eliminieren. Das Antikörper-Enzym-Konjugat des dritten Tieres, bei dem die Immunisierung in hohen Antiserentitern resultierte, erzielte praktisch in jeder

Testanordnung brauchbare Resultate. Bei der Untersuchung von MBP-Reinprotein, Gehirnextrakten und Extrakten aus künstlich kontaminiertem Hackfleisch war zu beobachten, dass das Testsystem unter Verwendung von bovinem und porcinem Reinprotein eine geringere Tierartspezifität aufwies. Eine mögliche Erklärung ist in der Tatsache zu suchen, dass die industriell aufgereinigten und chemisch konservierten Reinproteine eine geänderte Reaktivität zeigen. Die Unterschiede zwischen bovinem und porcinem Protein könnten dadurch reduziert worden sein. Für eine Strukturveränderung des Reinproteins spricht bei MBP die bereits bei GFAP beobachtete geringe Lagerstabilität. Während im Rohextrakt nach einjähriger Lagerung bei -18 °C der ursprüngliche MBP-Gehalt nachgewiesen wurde, konnte in der Reinproteinlösung nach wenigen Wochen bereits nur noch ein reduzierter MBP-Gehalt nachgewiesen werden. Durch Lagerung kleinster Mengen bei -80 °C konnte dieses Problem jedoch behoben werden. Unterstützt wird die These einer unterschiedlichen Struktur des MBPs in Reinproteinlösung und Rohextrakt durch KURSULA (2001), der beschreibt, dass MBP in wässriger Lösung relativ ungefaltet vorliegt, während es in Gegenwart von Lipiden eine Tendenz zu Faltstruktur aufweist. Hinsichtlich der Reaktivität des Testsystems mit ZNS-Material anderer Spezies konnte neben Rind, nur noch Reaktivität mit ZNS-Material von Schaf und Ziege festgestellt werden. Dies erscheint von Vorteil, da auch dieses als SRM einzustufen ist (VO (EG) 999/2001). Trotz zahlreicher methodischer Unterschiede zum Sandwich-Enzymimmuntest lassen die Ergebnisse der Charakterisierung der Antikörperspezifität mittels Immunoblot vermuten, dass die Tierartspezifität des Sandwich-Enzymimmuntests vorwiegend auf der Spezifität des verwendeten monoklonalen Antikörpers beruht. Während die polyklonalen Antikörper grundsätzlich bovines und porcines Protein detektierten, zeigte der monoklonale Antikörper keinerlei Reaktivität mit porcinem MBP.

5.3 Praktische Anwendbarkeit der Testsysteme

Sowohl das Testsystem zum Nachweis von bGFAP als auch das Testsystem zum Nachweis von bMBP eignen sich für die Untersuchung von Fleischerzeugnissen. Weiterhin konnten mit den Testsystemen Hautcremes und Fruchtgummizubereitungen untersucht werden. Zwar werden etwa 80% der essbaren Gelatine in Europa aus Schweinehaut gewonnen, aber rund 15% sind bovinen Ursprungs, wodurch auch bei Fruchtgummizubereitungen eine

Untersuchung auf eine potentielle Kontamination mit SRM erforderlich zu sein scheint (TASARA et al., 2005). Insgesamt betrachtet lieferten alle untersuchten Proben negative Ergebnisse. Es konnten keine Einflüsse von Gewürzen oder Zutaten auf die Testsysteme beobachtet werden. Auch die Fleischspezies spielte keine Rolle. Die Reaktivität von MBP-Testsystemen mit peripherem Nervengewebe ist im vorliegenden MBP-Sandwich-Enzymimmuntest unbedeutend. Alle untersuchten Proben waren eindeutig negativ. Dies wurde auch beim Einsatz von stark innervierter Lendenmuskulatur bestätigt, da auch hier das Ergebnis stets negativ war. Eine mögliche Erklärung könnte in der Tatsache zu suchen sein, dass der Gehalt an peripherem Nerv in Fleischerzeugnissen per se unterhalb der Nachweisgrenze des MBP-Testsystems von 0,1% Rinder-ZNS liegt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Löslichkeit des Markerproteins MBP in peripherem Nerv sich von der im ZNS unterscheidet. Ursächlich könnte eine andere Tertiärstruktur des MBPs oder ein räumlich getrenntes Vorkommen der verschiedenen Isoformen des MBPs sein. Dies würde auch erklären warum die von HOLTBECKER (2004) beschriebene Reaktion mit stark innerviertem Zungengewebe ausblieb. In dem MBP-Sandwich-Enzymimmuntest war die Untersuchung von Rinderzunge stets negativ. Mit dem MBP-Sandwich-Enzymimmuntest steht ein wiederkäuerspezifisches und sensitives Testsystem zur Verfügung, mit dem zusätzlich noch der ZNS-Gehalt quantifiziert werden könnte. Aufgrund dieser Testeigenschaften eignet sich das Testsystem zur alleinigen Untersuchung von Handelsproben auf einen Zusatz von SRM. Im Falle eines positiven Ergebnisses könnte ein anschließend durchgeführter ZNS-spezifischer GFAP-Sandwich-Enzymimmuntest das Ergebnis bestätigen und aufgrund der unterschiedlichen Kreuzreaktivität aufklären, ob es sich um ZNS von Rind, Schaf oder Ziege handelt. Beide Testsysteme sind schnell und einfach -ohne großen technischen Aufwand und ohne besonders geschultes Personal- durchzuführen und eignen sich für die Routinediagnostik. Nach dem Probeneingang können die Proben umgehend extrahiert und untersucht werden. Eine Untersuchung von 30 Proben im MBP-Sandwich-Enzymimmuntest nimmt insgesamt (inklusive Probenvorbereitung) etwa fünf Stunden in Anspruch. Indirekte enzymimmunologische Testsysteme wie zum Beispiel von HOLTBECKER (2004) beschrieben, bei denen die Mikrotiterplatten mit dem Probenextrakt beschichtet werden, haben den Nachteil einer langen Testdauer von ca. 24 Stunden. Zusätzlich erscheint es problematisch, dass die Markerproteine nur über einseitige Detektion nachgewiesen werden. Eine zweiseitige Detektion wie im Sandwich-Enzymimmuntestsystem ist in der Regel das sensitivere und spezifischere Verfahren. Die kommerziell erhältlichen Testsysteme stehen zwar im Typ

eines Sandwich-Enzymimmuntests, aber beruhen derzeit auf einem GFAP-Nachweis und weisen eine unzureichende Tierartspezifität auf. Der MBP-Sandwich-Enzymimmuntest zeichnet sich durch eine sehr hohe Tierartspezifität bei vergleichbarer Nachweisgrenze von 0,1% Rinder-ZNS aus. Aber auch der auf bGFAP-Peptid-Fängerantikörpern beruhende GFAP-Sandwich-Enzymimmuntest stellt eine deutliche Verbesserung der kommerziellen Testsysteme dar, weil er wesentlich spezifischer ist. Somit steht mit dem MBP-Sandwich-Enzymimmuntest, aber auch mit dem GFAP-Sandwich-Enzymimmuntest, ein deutlich verbessertes Testsystem zur Routineuntersuchung von Fleischerzeugnissen zur Verfügung.

Schlussfolgernd ergab sich:

1. Aufgrund ihrer Eigenschaften sind sowohl das basische Myelinprotein als auch das Saure Gliafaserprotein geeignete Marker für den Nachweis von Spezifiziertem Risikomaterial in Fleischerzeugnissen.
2. Der MBP-Sandwich-Enzymimmuntest ermöglicht einen sensitiven und spezifischen Nachweis von bovinem Nervengewebe und ermöglicht dessen Quantifizierung.
3. Der GFAP-Sandwich-Enzymimmuntest ermöglicht einen spezifischen Nachweis von bovinem ZNS-Material.
4. Eine Anwendung ist bei rohen und erhitzten Fleischerzeugnissen, Fruchtgummis und Hautcremes möglich.
5. Im Gegensatz zu anderen Ansätzen zur Entwicklung eines speziesspezifischen Nachweisverfahrens von bovinem ZNS-Material in Fleischerzeugnissen handelt es sich um ein praxistaugliches und unaufwendiges Nachweisverfahren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden neuartige Immuntests im Format des Sandwich-Enzymimmuntests für saures Gliafaserprotein (GFAP) und basisches Myelinprotein (MBP) entwickelt. Nach einheitlicher, einfach durchzuführender Extraktion des Probenmaterials mit 1% SDS/A.dest.-Lösung war ein sicherer Nachweis von bovinem ZNS im Konzentrationsbereich von 0,1% im MBP-Testsystem und von 0,5% im GFAP-Testsystem möglich. Das Testsystem für GFAP weist im Hinblick auf bestehende Testsysteme, insbesondere im Vergleich zu kommerziellen GFAP-Nachweissystemen, eine generell deutlich verbesserte Tierart- und Gewebespezifität bei vergleichbarer Nachweisempfindlichkeit auf. Mit diesem Testsystem ist ein allgemeiner Nachweis von Säugetier-ZNS im Probenmaterial möglich. Das Testsystem für MBP eignet sich hingegen zum spezifischen Nachweis von Wiederkäuer-ZNS und stellt das erste praktikable Testsystem im Standard-Format eines Sandwich-Enzymimmuntests für MBP dar. ZNS-Materialien verschiedener Lokalisation (Gehirn, Rückenmark) ergeben in diesem Testsystem quantitativ gleiche Ergebnisse, so daß eine Quantifizierung des ZNS-Gehaltes von untersuchten Proben möglich ist. Die Anwendbarkeit der Testsysteme wurde anhand künstlich kontaminierter Proben und anhand von Praxisproben geprüft. Beide Systeme eignen sich zum Nachweis von ZNS-Material in nicht erhitzten, in erhitzten (Vollkonserve) sowie in komplex verarbeiteten Lebensmitteln. Somit eignen sich die entwickelten Testsysteme grundsätzlich für eine breite Anwendung. Der Einsatz dieser Testsysteme, insbesondere in Kombination, ermöglicht eine Verbesserung der Nachweissicherheit in der Routineuntersuchung von Lebensmitteln auf Zusätze von ZNS-Material sowie eine vorläufige Differenzierung hinsichtlich der Herkunft des ZNS-Materials. Aufgrund der einfachen Anwendbarkeit der Testsysteme und der Testdauer (ca. 5 h, einschließlich Probenvorbereitung von bis zu 30 Proben) wird ein Einsatz dieser Verfahren vor allem als Screeningtest vorgeschlagen.

7 SUMMARY

The present study describes the development of novel immunoassays on the basis of sandwich-enzymimmunoassays (S-EIA) for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and myelin basic protein (MBP). Employing a standardized, simple extraction procedure for sample material with 1% aqueous SDS solution, bovine central nervous system (CNS) tissue could be detected in minced meat at a concentration as low as 0,1% in the MBP assay, and at a concentration of 0,5 % in the GFAP assay. With regard to already existing assays, especially compared with commercial GFAP detection test kits, the assay for GFAP had a similar test sensitivity but considerably improved characteristics in aspects of species-specificity and tissue-specificity. This assay provided a generic detection method for mammalian CNS tissue in sample material. In contrast, the assay for MBP is applicable for the specific detection of ruminant CNS tissue, and represents the first practicable assay in the standard format of a sandwich-enzymimmunoassay for MBP. CNS tissues of different localizations (brain, spinal cord) gave quantitatively similar results in this assay, so that a quantification of the CNS content in food samples is possible. The applicability of these assays was examined using artificially contaminated meat sample material and by commercial samples. Both systems are suitable for the detection of CNS tissue in non-heated, heated and complexly manufactured foodstuffs. Therefore, the developed assays are inherently suitable for an extensive application. Particularly in combination, these assays provide an improved means for routine control, to ensure the absence of bovine CNS contamination of foodstuffs. They also enable a preliminary differentiation with regard to the species origin of the CNS tissue. The tests developed in this study can be used as screening tests for CNS because of the simple test procedure and the relatively fast test time (about 5 hours, including sample preparation of up to 30 samples).

8 Literaturverzeichnis

AGAZZI, M. E., J. BARRERO-MORENO, E. LÜCKER, E. VON HOLST und E. ANKLAM (2002):

Performance comparison of two analytical methods for the detection of tissues of the central nervous system in sausages: results of an interlaboratory study.

Eur. Food Res. Technol. **215**, 334-339

AGUZZI, A. und C. WEISSMANN (1997):

Prion research: the next frontiers.

Nature **389**, 795-798

ALBRECHTSEN, M., A. C. VON GERSTENBERG und E. BOCK (1984):

Mouse monoclonal antibodies reacting with human brain glial fibrillary acidic protein.

J. Neurochem. **42**, 86-93

ALMOND, J. und J. PATTISON (1997):

Human BSE.

Nature **389**, 437-438

ALPER, T., W. CRAMP, D. HAIG und M. CLARKE (1967):

Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?

Nature **214**, 764-766

ALPERS, M. und D. GAJDUSEK (1965):

Changing patterns of Kuru: epidemiological changes in the period of increasing contact of the fore people with western civilization.

Am. J. Trop. Med. Hyg. **14** (5), 852-879

ANGLER, R. (2000):

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von β -Galactosidase aus *Escherichia coli*.

Diss. med. vet., München

ANIL, M. H., S. LOVE, C. R. HELPS, J. L. MC KINSTRY, S. N. BROWN, A. PHILIPS,
S. WILLIAMS, A. SHAND, T. BAKIREL und D. HARBOUR (2001):

Jugular venous emboli of brain tissue induced in sheep by the use of captive bolt guns.
Vet. Rec. **148**, 619-620

ANONYM (1994):

Prions and public health.
Nature **370**, 2

ANONYM (2001a):

RIDASCREEN[®] Risk Material.
Gebrauchsanweisung

ANONYM (2001b):

ScheBo[®] Brainostic[™] Test.
Gebrauchsanweisung

ANONYM (2002):

RIDASCREEN[®] Risk Material 10/5.
Gebrauchsanweisung

AUPPERLE, H., E. LÜCKER, M. OVERHOFF und H.-A. SCHOON (2002):

Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die BSE unerwünschten Zutaten in
Fleischerzeugnissen- 6. Immunhistologischer Nachweis von zentralem und peripherem
Nervengewebe in Fleischerzeugnissen.
Fleischwirtschaft **82** (3), 100-104

AVRAMES, S. (1969):

Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde.
Immunochemistry **6**, 43-52

AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK (1969):

The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents.

Immunochemistry **6**, 53-66

BARBER, P. und R. LINDSAY (1982):

Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes.

Neuroscience **7**, 3077-3099

BARLOW, R. und D. MIDDLETON (1990):

Dietary transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice.

Vet. Rec. **126**, 111-112

BASLER, K., B. OESCH, M. SCOTT, D. WESTAWAY, M. WÄLKI, D. GROTH, M. MC KINLEY, S. PRUSINER und C. WEISSMANN (1986):

Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene.

Cell **46**, 417-428

BATEMAN, D., D. HILTON, S. LOVE, M. ZEIDLER, J. BECK und J. COLLINGE (1995):

Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 18-year-old in the UK.

Lancet **346**, 1155-1156

BECK, E. und P. DANIEL (1979):

Kuru und Creutzfeldt-Jakob disease: Neuropathological lesions and their significance.

In: PRUSINER, S. und W. HADLOW: Slow transmissible diseases of the nervous system, Vol. 1, 253-270

Academic Press, New York

BECKER, H. und E. MÄRTLBAUER (1998):

Immunologischer Nachweis von Mikroorganismen und Toxinen.

In: BAUMGART, J.: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, 1-29

Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg

BELITZ, H. und W. GROSCH (1992):

Lehrbuch der Lebensmittelchemie.

4. Auflage; Springer Verlag, Berlin

BIGNAMI, A., L. ENG, D. DAHL und C. UYEDA (1972):

Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence.

Brain Res. **43**, 429-435

BIGNAMI, A. und D. DAHL (1974):

Astrocyte-specific protein and neuroglial-differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the GFAP.

J. Comp. Neur. **153**, 27-38

BIGNAMI, A. und D. DAHL (1977):

Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia.

J. Histochem. Cytochem. **25**, 466-469

BOSQUE, P. J., C. RYOU, G. TELLING, D. PERETZ, G. LEGNAME, S. J. De ARMOND und S. B. PRUSINER (2002):

Prions in skeletal muscle.

PNAS **99**, 3812-3817

BRADLEY, R. und J. WILESMITH (1993):

Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE).

Br. Med. Bull. **49** (4), 932-959

BRAUN, U., U. KIHM, N. PUSTERLA und M. SCHÖNMANN (1997):

Klinischer Untersuchungsgang bei Verdacht auf bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE).

Schweiz. Arch. Tierheilk. **139**, 35-41

BRAUN U. (1998):

Klinische Symptome und Diagnose von BSE.

In: BRAUN, U.: BSE und andere spongiforme Enzephalopathien

Parey Buchverlag, Berlin, Hamburg

BRAUN, U., E. SCHICKER und B. HÖRNLIMANN (1998):

Diagnostic reliability of clinical signs in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy.

Vet. Rec. **143**, 101-105

BRAUN, U., U. KIHM, N. PUSTERLA und M. SCHÖNMANN (2001):

Klinischer Untersuchungsgang bei Verdacht auf bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE).

Deutsches Tierärzteblatt **2**, 124-129

BRITTON, T., S. AL-SARRAJ, C. SHAW, T. CAMPBELL und J. COLLINGE (1995):

Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 16-year-old in the UK.

Lancet **346**, 1155

BROWN, D. R. (2001):

Copper and prion disease.

Brain Res. Bulletin **55**, 165-173

BROWN, P. (1988):

The decline and fall of Creutzfeldt-Jakob disease associated with human growth hormone therapy.

Neurology **38**, 1135-1137

BROWN, P., M. PREECE und R. WILL (1992):

“Friendly fire in medicine”: hormones, homografts and Creutzfeldt-Jakob disease.

Lancet **340**, 24-27

BRUCE, M. E., R. G. WILL, J. W. IRONSIDE, I. MC CONELL, D. DRUMMOND, A. SUTTIE, L. MC CARDLE, A. CHREE, J. HOPE, C. BIRKETT, S. COUSENS, H. FRASER und C. BOSTOCK (1997):

Transmissions to mice indicate that new variant CJD is caused by the BSE agent.

Nature **389**, 498-501

BÜELER, H., A. AGUZZI, A. SAILER, R. GREINER, P. AUTENRIED, M. AGUET und C. WEISSMANN (1993):

Mice devoid of PrP are resistant to scrapie.

Cell **73**, 1339-1347

BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN (BGVV, 2000):

BSE: Keine absolute Sicherheit für den Verbraucher (Pressemitteilung 26/2000 vom 28.11.2000).

<http://www.bfr.bund.de>

BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN (2001):

Fleischhygienerechtliche Maßregelungen von Tierkörpern bei positivem BSE-Befund (Stellungnahme vom 10.01.2001).

<http://www.bfr.bund.de>

BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN (2002):

Liste von kritischen Hygienepunkten bei der Gewinnung von Köpfen und von Rinderbackenfleisch (Stellungnahme vom 25.04.2002).

<http://www.bfr.bund.de>

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BFR) UND FRIEDRICH-LÖFFLER-INSTITUT (2005):

Erster BSE-Fall bei einer Ziege bestätigt (Pressemitteilung 04/2005 vom 28.01.2005).

<http://www.bfr.bund.de>

BUSCHMANN, A. und M. GROSCHUP (1998):

Übertragung der spongiformen Enzephalopathien unter natürlichen und experimentellen Bedingungen.

In: BRAUN, U.: BSE und andere spongiforme Enzephalopathien

Parey Buchverlag, Berlin, Hamburg

CHU, F. S. (1986):

Immunoassays for mycotoxins.

In: COLE, R. J.: Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxines, 207-239

Academic Press, Orlando

CLARK, A. (1991):

Diagnosis of scrapie.

Vet. Rec. **128**, 214

CLARK, A. und J. MOAR (1992):

Scrapie: a clinical assessment.

Vet. Rec. **130**, 377-378

CLARK, A., J. MOAR und J. NICHOLSON (1994):

Diagnosis of scrapie.

Vet. Rec. **135**, 560

COHEN, F., K. PAN, Z. HUANG, M. BALDWIN, R. FLETTERICK und S. PRUSINER (1994):

Structural clues to prion replication.

Science **264**, 530-531

COLCHESTER, A. und N. COLCHESTER (2005):

The origin of bovine spongiform encephalopathy: the human prion disease hypothesis.

Lancet **366**, 856-861

COLLEE, J. und R. BRADLEY (1997a):

BSE: a decade on – part 1.

Lancet **349**, 636-641

COLLEE, J. und R. BRADLEY (1997b):

BSE: a decade on – part 2.

Lancet **349**, 715-721

COLLINGE, J., K. SIDLE, J. MEADS, J. IRONSIDE und A. HILL (1996):

Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of new variant CJD.

Nature **383**, 685-690

CONRATHS, F. J., T. SELHORST und M. H. GROSCHUP (2002):

Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei in Deutschland geborenen Rindern.

Bundesgesundheitsblatt **45**, 527-533

CREUTZFELDT, H. (1920):

Über eine einzigartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems.

Z. Ges. Neurol. Psychiat. **57**, 1-20

CUILLE, J. und P. CHELLE (1936):

La maladie dite tremblante du mouton, est-elle inoculable?

CR Acad. Sci. **203**, 1552-1554

CUILLE, J. und P. CHELLE (1939):

Transmission experimentale de la tremblante chez la chevre.

CR Acad. Sci. **208**, 1058-1060

CZUB, M., H. BRAIG und H. DIRINGER (1986):

Pathogenesis of scrapie: study of the temporal development of clinical symptoms, of infectivity titres and scrapie-associated fibrils in brains of hamsters infected intraperitoneally.

J. Gen. Virol. **67**, 2005-2009

DAHL, D. und A. BIGNAMI (1975):

Glial fibrillary acidic protein from normal and gliosed human brain- demonstration of multiple related polypeptides.

Biochim. Biophys. Acta **386**, 41-51

DAHL, D. und A. BIGNAMI (1983):

The glial fibrillary acidic protein and astrocytic 10-nanometer filaments.

In: LAJTHA, A.: Handbook of neurochemistry, Vol. 5, 127-151

Plenum Press, New York

DAHMS, S. (1997):

Epidemiologische Studien zur Übertragung der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE)- Anmerkungen aus biometrischer Sicht.

BMTW **110**, 161-165

DAHMS, S. (2003):

BSE: Inzidenzen- regional, zeitlich, Prognosemodelle.

Fleischwirtschaft **83** (7), 111-114

DEALLER, S. F. und R. W. LACEY (1990):

Transmissible spongiform encephalopathies: the threat of BSE to man.

Food Microbiol. **7**, 253-279

DENNY, G. und W. HUESTON (1997):

Epidemiology of bovine spongiform encephalopathy in Northern Ireland 1988 to 1995.

Vet. Rec. **140**, 302-306

DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS (DEFRA)

(2002):

BSE-Information.

<http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/index.html>

DESLYS, J., C. LASMEZAS, N. STREICHENBERGER, A. HILL, J. COLLINGE, D. DORMONT und N. KOPP (1997):

New variant Creutzfeldt-Jakob disease in France.

Lancet **349**, 30-31

DICKINSON, A., J. STAMP, C. RENWICK und J. RENNIE (1968):

Some factors controlling the incidence of scrapie in cheviot sheep injected with a cheviot-passaged scrapie agent.

J. Comp. Pathol. **78**, 313-321

DICKINSON, A. und D. TAYLOR (1978):

Resistance of scrapie agent to decontamination.

N. Engl. J. Med. **299**, 1413-1414

DIRINGER, H., M. BEEKES und U. OBERDIECK (1994):

The nature of scrapie agent: the virus theory.

Ann. NY. Acad. Sci. **724**, 246-258

DLG (2002):

Periphere Nervenzellen als Risikomaterial. DLG Empfehlung zur Entfernung von extracerebrospinalen Neuronen.

Deutsche Landwirtschaftliche Gesellschaft e.V., Frankfurt am Main

DONNELLY, C., A. GHANI, N. FERGUSON und R. ANDERSON (1997):

Recent trends in the BSE epidemic.

Nature **389**, 903

DORMONT, D. (1999):

Bovine spongiform encephalopathy and the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease.

In: HARRIS, D.: Prions- molecular and cellular biology

Horizon Scientific Press, Norfolk

DUFFY, P., J. WOLF, G. COLLINS, A. DE VOE, B. STREETEN und D. COWEN (1974):

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

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

EBERLE, W. (2001):

BSE-Tests schnell und zuverlässig- Testprozedur und Validierung geben hohe Sicherheit.

Fresenius Symposium „BSE-Lebensmittelsicherheit auf dem Prüfstand“, 27.-28.06.2001, Darmstadt

EDDY, R. (1995):

Origin of BSE.

Vet. Rec. **137**, 648

EHRENSPERGER, F. und M. VANDEVELDE (1998):

Neuropathologie der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien bei Tieren.

In: BRAUN, U.: BSE und andere spongiforme Enzephalopathien

Parey Buchverlag, Berlin, Hamburg

EKINS, R. P. (1985):

Current concepts and future developments.

In: COLLINS, W. P.: Alternative immunoassays, 219-237

John Wiley & Sons Ltd., Chichester

EKINS, R. P. (1989):

A shadow over immunoassay.

Nature **340**, 256-258

ENG, L. F., B. GERSTL und J. J. VANDERHAEGHEN (1970):

A study of proteins in old multiple sclerosis plaques.

Trans. Am. Soc. Neurochem. **1**, 42

ENG, L. F., J. J. VANDER HAEGHEN, A. BIGNAMI und B. GERSTL (1971):

An acidic protein isolated from fibrous astrocytes.

Brain Res. **28**, 351-354

ENG, L. F. und J. BIGBEE (1978):

Immunohistochemistry of nervous system-specific antigens.

In: AGRANOFF, B. und M. APRISON: Advances in neurochemistry, Vol. 3, 43-98

Plenum Press, New York

ENG, L. F. und S. DE ARMOND (1983):

Immunochemistry of glial fibrillary acidic protein.

In: ZIMMERMAN, H.: Progress in neuropathology, Vol. 5, 19-39

Raven Press, New York

ENG, L. F., R. S. GHIRNIKAR und Y. L. LEE (2000):

Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000).

Neurochem. Res. **25**, 1439-1451

ENGVALL, E. und PERLMANN (1971):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G

Immunochem. **8**, 871-874

ERLANGER, B. F. (1980):

The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey.

Meth. Enzymol. **70**, 85-103

EYLAR, E.H., J. CACCAM und J. J. JACKSON (1970):

Experimental allergic encephalomyelitis.

Science **168**, 1220-1223

FEIDEN, W. (1998):

Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD): sporadische und neue variante Form (vCJD). Ist der Mensch durch BSE gefährdet?

In: BRAUN, U.: BSE und andere spongiforme Enzephalopathien

Parey Buchverlag, Berlin, Hamburg

FOOTE, W., W. CLARK, A. MACIULIS, J. CALL, J. HOURRIGAN, E. EVANS, M. MARSHALL und M. DE CAMP (1993):

Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer.

Am. J. Vet. Res. **54**, 1863-1868

FOSTER, J., J. HOPE und H. FRASER (1993):

Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats.

Vet. Rec. **133**, 339-341

FOSTER, J., M. BRUCE, I. MC CONNELL, A. CHREE und H. FRASER (1996):

Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep.

Vet. Rec. **138**, 546-548

FOSTER, J., D. PARNHAM, A. CHONG, W. GOLDMANN und N. HUNTER (2001):

Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats.

Vet. Rec. **148**, 165-171

FRANKHAUSER, R., R. FATZER und E. FRAUCHINGER (1972):

Bemerkungen zur spastischen Parese des Rindes.

Schweiz. Arch. Tierheilkd. **114**, 24-32

FRASER, H., I. MC CONNELL, G. WELLS und M. DAWSON (1988):

Transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice.

Vet. Rec. **123**, 472

FRASER, H., M. BRUCE, A. CHREE, I. MC CONNELL und G. WELLS (1992):

Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice.

J. Gen. Virol. **73** (8), 1891-1897

FRIES, R., T. EGGERS, G. HILDEBRANDT, K. RAUSCHER, S. BUDA und K.-D. BUDRAS (2003):

Autonomous nervous system with respect to dressing of cattle carcasses and its probable role in transfer of PrP^{res}.

J. Food Protect. **66** (5), 890-895

GAJDUSEK, D. und V. ZIGAS (1957):

Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea- The endemic occurrence of Kuru in the native population.

N. Engl. J. Med. **257**, 974-978

GAJDUSEK, D. und V. ZIGAS (1959):

Kuru: clinical, pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the centralnervous system among natives of the Eastern Highlands of New Guinea.

Am. J. Med. **26**, 442-469

GAREIS, M. (1995):

Rinderwahnsinn- Eine Gefahr für den Menschen.

Kulmbacher Reihe Band 14, 135-151

GASSET, M., M. A. BALDWIN, D. H. LLOYD, J.-M. GABRIEL, D. M. HOLTZMAN, F. COHEN, R. FLETTERICK und S. B. PRUSINER (1992):

Predicted α -helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid.

PNAS USA **89**, 10940-10944

GEORGSSON, G., E. GISLADOTTIR und S. ARNADOTTIR (1993):

Quantitative assessment of the astrocytic response in natural scrapie of sheep.

J. Comp. Pathol. **108**, 229-240

GERBERMANN, H. (2001):

Probennahme und Zuverlässigkeit von BSE-Tests.

BgVV-Seminar, 7.-8.11.2001, Berlin

GERSTMANN, J. (1928):

Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellären Systems.

Wien. Med. Wochenschr. **78**, 906-908

GERSTMANN, J. (1936):

Über eine eigenartige hereditäre-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns.

Z. Ges. Neurol. Psychiat. **154**, 736-762

GIBBS, C. J., D. GAJDUSEK, D. ASHER, M. ALPERS, E. BECK, P. DANIEL und W. MATTHEWS (1968):

Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee.

Science **161**, 388-389

GOLDMAN, J. E., H. H. SCHAUMBURG und W. T. NORTON (1978):

Isolation and characterization of glial filaments from human brain.

J. Cell Biol. **78**, 426-440

GRABER, H., R. MEYER, R. FATZER, M. VANDEVELDE und A. ZURBRIGGEN (1995):

In situ hybridization and immunohistochemistry for prion protein (PrP) in bovine spongiform encephalopathy (BSE).

J. Vet. Med. A. **42**, 453-459

GROOME, N.P. (1980):

Enzyme-linked immunosorbent assay for myelin basic protein and antibodies to myelin basic protein.

J. Neurochem. **35**, 1409-1417

GROSCHUP, M. und B. HAAS (1995):

BSE- eine Gesundheitsgefährdung für den Menschen?

Fleischwirtschaft **75** (9), 1087-1091

GROSCHUP, M. und A. BUSCHMANN (2008)

Rodent models for prion diseases.

Vet. Res. **39**, 32

HAINFELLNER, J. A., S. BRANTNER-INTHALER, L. CERVENAKOVA, P. BROWN, T. KITAMOTO und J. TATEISHI (1995):

The original Gerstmann-Sträussler-Scheinker family of Austria: divergent clinicopathological phenotypes but constant PrP genotype.

Brain Pathol. **5**, 201-211

HAUCK, A., J. BAMBARA und W. EDWARDS (1990):

Embolism of brain tissue to the lung in a neonate.

Arch. Pathol. Lab. Med. **114**, 217-218

HEBERT, G. A., P. L. PELHAM und B. PITTMAN (1973):

Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera.

Appl. Microbiol. **25**, 26-36

HERDE, K., M. BERGMANN, M. BÜLTE, R. LEISER und S. WENISCH (2003):

Glial proteins as species-specific markers for the detection of central nervous system tissue in heat-treated meat products.

Tagung "Prion diseases: from basic research to intervention concepts", 08.-10.10.2003, München

HERDE, K., M. BERGMANN, C. LANG, R. LEISER und S. WENISCH (2005):

Glial fibrillary acidic protein and myelin basic protein as markers for the immunochemical detection of bovine central nervous tissue in heat-treated meat products.

J. Food Protect. **68** (4), 823-827

HILDEBRANDT, G., E. LÜCKER und K. RAUSCHER (2001):

BSE-Risiko der Lebensmittel Fleisch und Milch.

Bundesgesundheitsblatt **44**, 437-449

HILL, A. F., M. DESBRUSLAIS, S. JOINER, K. C. L. SIDLE, I. GOWLAND, J. COLLINGE, L. J. DOEY und P. LANTOS (1997):

The same prion strain causes vCJD and BSE.

Nature **389**, 448-450

HILL, A. F., R. BUTTERWORTH, S. JOINER, G. JACKSON, M. ROSSOR, D. THOMAS, A. FROSH, N. TOLLEY, J. BELL, M. SPENCER, A. KING, S. AL-SARRAJ, J. IRONSIDE, P. LANTOS und J. COLLINGE (1999):

Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples.

Lancet **353**, 183-189

HILTON, D., E. FATHERS, P. EDWARDS, J. IRONSIDE und J. ZAJICEK (1998):

Prion immunoreactivity in appendix before clinical of variant Creutzfeldt-Jakob disease.

Lancet **352**, 703-704

HOCHBERGER, A. (2001):

Massenscreening mit BSE-Schnelltests als Maßnahme des Verbraucherschutzes: aktueller Stand, Möglichkeiten und Zukunftsperspektiven.

Fresenius Symposium „BSE- Lebensmittelsicherheit auf dem Prüfstand“, 27.-28.6.2001, Darmstadt

HÖRNLIMANN, B. (2001):

Portrait der BSE beim Rind.

In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER und H. KRETZSCHMAR: Prionen und Prionkrankheiten, 173-180

De Gruyter, Berlin, New York

HÖRNLIMANN, B., M. G. DOHERR und M. GROSCHUP (2001):

Die Überwachung der Prionkrankheiten des Tieres.

In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER und H. KRETZSCHMAR: Prionen und Prionkrankheiten, 272-276

De Gruyter, Berlin, New York

HOFMANN, M. (1959):

Bayerisches Kochbuch.

28. Auflage; Birken Verlag GmbH, München

HOINVILLE, L., J. WILESMITH und M. RICHARDS (1995):

An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy born after the introduction of the feed ban.

Vet. Rec. **134**, 274-275

HOLTBECKER, J. (2004):

Detektion von bovinem Nervengewebe als Spezifiziertes Risikomaterial in Fleischerzeugnissen durch Etablierung eines speziesspezifischen ELISA für die Routinediagnostik unter Verwendung des Myelin Basic Protein.

Diss. med. vet., München

HOPE, J., L. REEKIE, N. HUNTER, G. MULTHAUPT, K. BEYREUTHER, K. WHITE, A. SCOTT, J. STACK, M. DAWSON und G. WELLS (1988):

Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein.

Nature **336**,390-392

HORLACHER, S., P. SIMON und M. BÜLTE (2001):

Bestimmung des ZNS-Gehaltes und der Tierart in Fleischerzeugnissen.

Fleischwirtschaft **81** (12), 107-108

HORLACHER, S. (2002):

Nachweis von zentralnervösem Gewebe in Lebensmitteln im Hinblick auf die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE).

Diss. med. vet., Gießen

HORLACHER, S., E. LÜCKER, E. EIGENBRODT und S. WENISCH (2002a):

ZNS-Emboli in der Rinderlunge.

BMTW **115**, 1-5

HORLACHER, S., P. SIMON und M. BÜLTE (2002b):

Vergleich zweier ZNS-Nachweisverfahren in Lebensmitteln.

Fleischwirtschaft **82** (1), 91-93

HORN, G. (1997):

Kennzeichnung von Separatorenfleisch in der Zutatenliste.

50. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), Berlin, Tagungsbericht, 41-42

HORN, G., M. BOBROW, M. BRUCE, M. GOEDERT, A. MC LEAN und J. WEBSTER (2001):

Review of the origin of BSE.

<http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/index.html>

HOSSNER, K., R. YEMM, S. SONNENSHEIN, G. MASON, B. CUMMINGS, M. REDDY, J. SOFOS, J. SCANGA, J. TATUM, G. SMITH und K. BELK (2006):

Comparison of immunochemical (enzyme-linked immunosorbent assay) and immunohistochemical methods for the detection of central nervous system tissue in meat products.

J. Food Protect. **69** (3), 644-650

HRUBY, S., E. C. ALVORD, R. E. MARTENSON, G. E. DEIBLER, W. F. HICKEY und N. K. GONATAS (1984):

Epitopes in myelin basic protein reactive with monoclonal antibodies.

Prog. Clin. Biol. Res. **146**, 271-276

HSIAO, K., H. F. BAKER, T. J. CROW, M. POULTER, F. OWEN, J. D. TERWILLIGER, D. WESTAWAY, J. OTT und S. B. PRUSINER (1989):

Linkage of a prion protein missense variant of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome.

Nature **338**, 342-345

HSIAO, K., Z. MEINER, E. KAHANA, D. AVRAHAMI, G. SCARLATO, O. ABRAMSKY, S. PRUSINER und R. GABIZON (1991):

Mutation of the prion protein in Libyan jews with Creutzfeldt-Jakob disease.

N. Engl. J. Med. **324** (16), 1091-1097

JACKSON, G., L. HOSSZU, A. POWER, A. HILL, J. KENNEY, H. SAIBIL, C. CRAVEN, J. WALTHO, A. CLARKE und J. COLLINGE (1999):

Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrilogenic conformations.

Science **283**, 1935-1937

JAFFE, B. M., W. T. NEWTON und J.E. MC GUIGAN (1970):

The effect of carriers on the production of antibodies to the gastrin tetrapeptide.

Immunochem. **7**, 715-725

JAKOB, A. (1921):

Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden.

Z. Ges. Neurol. Psychiatr. **64**, 147-228

JEFFREY, M., I. GOODBRAND und C. GOODSIR (1995):

Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure.

Micron **26**, 277-298

JESSEN, K. und R. MIRSKY (1980):

Glia cells in the enteric nervous system contain GFAP.

Nature **286**, 736-737

JESSEN, K. und R. MIRSKY (1983):

Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: An immunohistochemical study of enteric glia.

Neuroscience **3**, 2206-2118

JESSEN, K. und R. MIRSKY (1985):

Glial fibrillary acidic protein polypeptides in peripheral glia: Molecular weight, heterogeneity and distribution.

J. Neuroimmunol. **8**, 377-393

JESSEN, K., R. THORPE und R. MIRSKY (1984):

Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: An immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes.

J. Neurocytol. **13**, 187-200

KAO, R., M. GRAVENOR, M. BAYLIS, C. BOSTOCK, C. CHIHOTA, J. EVANS, W. GOLDMANN, A. SMITH und A. MC LEAN (2001):

The potential size and duration of an epidemic of bovine spongiform encephalopathy in british sheep.

Science online, 22.11.2001

KAPLAN, M. P., S. S. M. CHIN, K. H. FLIEGNER und R. K. H. LIEM (1990):

α -Internexin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain.

Neuroscience **10**, 2735-2748

KELLEY, L. D., S. HAFNER, P. C. MC CASKEY, M. T. SUTTON und K. A. LANGHEINRICH (2000):

An evaluation of methods for the detection of spinal cord in product derived from advanced meat recovery systems.

J. Food Protect. **63** (8), 1107-1112

KIMBERLIN, R. und C. WALKER (1979):

Pathogenesis of mouse scrapie: Dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes.

J. Comp. Pathol. **89**, 551-562

KIMBERLIN, R. und J. WILESMITH (1994):

Bovine spongiform encephalopathy. Epidemiology, low dose exposure and risks.

Ann. NY Acad. Sci. **724**, 210-220

KOCISKO, D. A., J. H. COME, S. A. PRIOLA, B. CHESEBRO, G. J. RAYMOND, P. T. LANSBURY und B. CAUGHEY (1994):

Cell-free formation of protease-resistant prion protein.

Nature **370**, 471-474

KRAMER, R. (1983):

Fleisch in der internationalen Küche.

BLV Buchverlag GmbH & Co. KG, München

KRAMER, M. L., H. D. KRATZIN, B. SCHMIDT, A. RÖMER, O. WINDL, S. LIEMANN, S. HORNEMANN und H. KRETZSCHMAR (2001):

Prion protein binds copper within the physiological concentration range.

J. Biological Chem. **276**, 16711-16719

KRETZSCHMAR, H., J. IRONSIDE, S. DE ARMOND und J. TATEISHI (1996):

Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.

Arch. Neurol. **53** (9), 913-920

KURSULA, P. (2001):

The current status of structural studies on proteins of the myelin sheath.

Int. J. Molec. Med. **8**, 475-479

LAEMMLI, U. K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**, 680-685

LANGE, B., T. ALTER, M. OVERHOFF und E. LÜCKER (2002):

Molekularbiologische Untersuchungen zur gewebe- und tierartspezifischen Erfassung von spezifizierten Risikomaterialien (SRM) in Fleisch und Fleischerzeugnissen.

43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), 24.-27.09.2002, Garmisch-Partenkirchen

LASMEZAS, C., J. DESLYS, R. DEMAIMAY, K. ADJOU, F. LAMOURY und D. DORMONT (1996):

BSE transmission to macaques.

Nature **381**, 743-744

LASMEZAS, C., J. FOURNIER, V. NOUVEL, H. BOE, D. MARCE, F. LAMOURY, N. KOPP, J. HAUW, J. IRONSIDE, M. BRUCE, D. DORMONT und J. DESLYS (2001):

Adaption of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: Implications for human health.

PNAS **98** (7), 4142-4147

LEES, M. und S. BROSTOFF (1984):

Proteins of myelin.

In: MORELL, P.: Myelin, 197-217

Plenum Press, New York

LEHNINGER, A., D. NELSON und M. COX (1994):

Prinzipien der Biochemie.

2. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

LIBERSKI, P., R. YANAGIHARA, G. WELLS, C. GIBBS und D. GAJDUSEK (1992):

Ultrastructural pathology of axons and myelin in experimental scrapie in hamsters and bovine spongiform encephalopathy in cattle and a comparison with the panencephalopathic type of Creutzfeldt-Jakob disease.

J. Comp. Pathol. **106** (4), 383-398

LINKE, H. (1959):

Histologischer Nachweis von Gehirn in Brühwürsten.

Fleischwirtschaft **12**, 999-1002

LÜCKER, E. und M. BÜLTE (1997a):

Bovine spongiforme Enzephalopathie- Risiko des Verbrauchers und Strategien der Schadensbegrenzung.

38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), 29.09.-02.10.1997, Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 340-347

LÜCKER, E. und M. BÜLTE (1997b):

Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen- 1. Enzymatische Cholesterinbestimmung als Schnellverfahren zur Erfassung von Hirngewebe.

Fleischwirtschaft **77** (9), 836-840

LÜCKER, E., E. EIGENBRODT und M. BÜLTE (1998):

Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen- 2. Referenzverfahren für den Nachweis von zentralem Nervengewebe.

Fleischwirtschaft **78** (8), 896-898

LÜCKER, E., E. EIGENBRODT, S. WENISCH, K. FAILING, R. LEISER und M. BÜLTE (1999a):

Development of an integrated procedure for the detection of central nervous tissue in meat products using cholesterol and neuron-specific enolase as markers.

J. Food Protect. **62** (3), 268-276

LÜCKER, E., S. HORLACHER, E. EIGENBRODT und M. BÜLTE (1999b):

Neue Ergebnisse zum Nachweis von zentralem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen.

40. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), 07.-10.10.1999, Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 125-130

LÜCKER, E., E. EIGENBRODT, S. WENISCH, R. LEISER und M. BÜLTE (2000a):

Identification of central nervous system tissue in retail meat products.

J. Food Protect. **63** (2), 258-263

LÜCKER, E., S. HORLACHER, E. EIGENBRODT und M. BÜLTE (2000b):

Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf BSE unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen- 3. Nachweis von zentralem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen.

Fleischwirtschaft **80** (5), 74-77

LÜCKER, E. und B. SCHLOTTERMÜLLER (2001):

Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die BSE unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen- 5. Erfassung von zentralem Nervengewebe in erhitzten Fleischerzeugnissen.

Fleischwirtschaft **81** (11), 102-107

LÜCKER, E., S. HORLACHER und E. EIGENBRODT (2001):

Brain in human nutrition and variant Creutzfeldt-Jakob disease risk (vCJD): Detection of brain in retail liver sausages using cholesterol and neuron specific enolase (NSE) as markers.

BJN **86**, Suppl. 1, 115-119

LÜCKER, E., W. BIEDERMANN, S. LACHHAB und A. HENSEL (2002a):

Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die BSE unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen- 7. Nachweis von Hirngewebe mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie.

Fleischwirtschaft **82** (10), 123-128

LÜCKER, E., M. HARDT und M. GROSCHUP (2002b):

Detection of CNS and PrP^{sc} in meat products.

BMTW **115**, 111-117

LÜCKER, E., B. SCHLOTTERMÜLLER und A. MARTIN (2002c):

Studies on contamination of beef with tissues of the central nervous system (CNS) as pertaining to slaughtering technology and human BSE-exposure risk.

BMTW **115**, 118-122

LUGARESI, E., R. MEDORI, P. MONTAGNA, P. BARUZZI, P. CORTELLI, A.

LUGARESI, P. TINUPER, M. ZUCCONI und P. GAMBETTI (1986):

Fatal familiar insomnia and dysautonomia, with selective degeneration of thalamic nuclei.

N. Engl. J. Med. **315**, 997-1003

LUX, D. (2009):

Entwicklung und Validierung eines Sandwich-Enzymimmuntests zum Nachweis von bovinem ZNS in Fleisch und Fleischerzeugnissen.

Diss. med. vet., Gießen

LUX, D., Y. CONTZEN, B. KERP, E. SCHNEIDER, K. HERDE, M. BERGMANN und E. USLEBER (2005):

Entwicklung und Charakterisierung immunchemischer Testsysteme für ZNS-Gewebe auf der Basis von Antikörpern gegen Saures Gliafaserprotein.

46. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), 27.-30.09.2005, Garmisch-Partenkirchen

MALCHOW, M. (2003):

Die nächste Generation in der BSE-Analytik: Mikromethode und Automatisierungsmodelle.

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

MARANGOS, P., D. SCHMECHEL, A. PARMA, R. CLARK und F. GOODWIN (1979):

Measurement of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) isoenzymes of enolase in rat, monkey and human nervous tissue.

J. Neurochem. **33**, 319-329

MATTHEWS, D. und B. C. COOKE (2003):

The potential for transmissible spongiform encephalopathies in non-ruminant livestock and fish.

Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. **22**, 283-296

MC GOWAN, J. (1922):

Scrapie in sheep.

Scott. J. Agri. **5**, 365-375

MEDORI, R., H. TRITSCHLER, A. LE BLANC, F. VILLARE, V. MANETTO, H. CHEN, R. XUE, S. LEAL, P. MONTAGNA, P. CORTELLI, P. TINUPER, P. AVONI, M. MOCHI, A. BARUZZI, J. HAUW, J. OTT, E. LUGARESI, L. AUTILIO-GAMBETTI und P. GAMBETTI (1992):

Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene.

N. Engl. J. Med. **326**, 444-449

MENDZ, G. L., W. J. MOORE, S. EASTERBROOK-SMITH und D. S. LINTHICUM (1985):

Proton-n.m.r. study of interaction of myelin basic protein with a monoclonal antibody.

Biochem. J. **228**, 61-68

MEYER, R., M. MC KINLEY, K. BOWMAN, M. BRAUNFELD, R. BARRY und S. PRUSINER (1986):

Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins.

PNAS USA **83**, 2310-2314

MOJE, M., A. HOFFMANN, K. TROEGER, H. JANKOWITSCH und R. KOLB (2001):

Nachweis von Gewebe des Zentralen Nervensystems auf enthäuteten Rinderköpfen und in der rechten Herzkammer nach Bolzenschussbetäubung.

Jahresbericht 2001 der Bundesanstalt für Fleischforschung (BAFF), Kulmbach, 34-35

MORITZ, A. (1995):

Cholesterin- und Puringehalte von Wildfleisch.

Fleischwirtschaft **75** (6), 814-818

MOUDJOU, M., Y. FROBERT, J. GRASSI, C. LA BONNARDIERE (2001):

Cellular prion protein status in sheep: tissue specific biochemical signatures.

J. Gen. Virol. **82**, 2017-2024

MOULD, D., A. DAWSON, W. SMITH (1965):

Scrapie in mice. The stability of the agent to various suspending media, pH and solvent extraction.

Res. Vet. Sci. **6**, 151

NAGEL, E. und T. MIERSCH (2002):

Nachweis von ZNS-Material in hochoverhitzten Lebensmitteln.

43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), 24.-27.09.2002, Garmisch-Partenkirchen

NAJEME, F., J. JULIEN, S. HERBLOT, V. DOUSSET, B. BROCHET und J. BONNET (1997):

Enzyme immunoassay for myelin basic protein in cerebrospinal fluid.

Brain Res. Protocols **1**,133-138

NGUYEN, J., M. A. BALDWIN, F. E. COHEN und S. B. PRUSINER (1995):

Prion protein peptides induce α -helix to β -sheet conformational transitions.

Biochem. **34**, 4186-4192

NICKEL, R., A. SCHUMMER und E. SEIFERLE (1992):

Lehrbuch der Anatomie (Band IV).

3. Auflage; Parey Buchverlag, Berlin, Hamburg

NIEDERER, M. und R. BOLLHALDER (2001):

Identification of species specific central nervous tissue by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)- a possible method for supervision of meat products and cosmetics. Mitt. Lebensm. Hyg. **92**, 133-144

NIESCHLAG, E., H. K. KLEY und K.-H. USADEL (1975):

Production of steroid antisera in rabbits.

In: CAMERON, E., S. HILLIER, K. GRIFFITHS: Steroid immunoassay, 5th Tenovus Workshop Proc., 87-96

Alpha Omega Publ., Cardiff, Wales

NISBET, T. (1989):

Creutzfeldt-Jakob disease in a second patient who received a cadaveric dura mater graft.

J. Am. Med. Ass. **261** (8), 1118

NITSCH, P. und G. WACHSMANN (2001):

Nachweis von Hirngewebs- und Rückenmarksanteilen in Fleischgemengen.

Fleischwirtschaft **81** (3), 76-78

NOWAK, B., T. VON MUEFFLING, A. KUEFEN, K. GANSEFORTH und C. SEYBOLDT (2005):

Detection of bovine central nervous system tissue in liver sausages using a Reverse Transcriptase PCR technique and a commercial enzyme-linked immunosorbent assay.

J. Food Protect. **68** (10), 2178-2183

NURMI, E. und C. RING (1999):

Gewinnung von hygienisch vertretbarem Separatorenfleisch.

Fleischwirtschaft **79** (4), 28-31

NUSSBAUM, R., W. HENDERSON, I. PATTISON, N. ELCOCK und D. DAVIES (1975):

The establishment of sheep flocks on predictable susceptibility to experimental scrapie.

Res. Vet. Sci. **18**, 49-58

OELLERICH, M. (1984):

Enzym-immunoassay: a review.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **22**, 895-904

OESCH, B. und M. MOSER (1998):

Stand der In vitro-Diagnostik.

In: BRAUN, U.: BSE und andere transmissible spongiforme Enzephalopathien

Parey Buchverlag, Berlin, Hamburg

ÖTZEL, M., Y. XI, E. BALDAUF, H. DIRINGER und M. POCCHIARI (1994):

Small virus-like structure in brains from cases of sporadic and familial Creutzfeldt-Jakob disease.

Lancet **344**, 923-924

OSTERTAG, R. (1932):

Lehrbuch der Schlachtvieh- und Fleischbeschau.

Enke Verlag, Stuttgart

OWEN, F., M. POULTER, R. LOFTHOUSE, J. COLLINGE, T. CROW, D. RISBY, H.

BAKER, R. RIDLEY, K. HSIAO und S. PRUSINER (1989):

Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease.

Lancet **1**, 51-52

PALMER, M., A. DRYDEN, J. HUGHES und J. COLLINGE (1991):

Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.

Nature **352**, 340-342

PAN, K.-M., M. BALDWIN, J. NGUYEN, M. GASSET, A. SERBAN, D. GROTH, I.

MEHLHORN, Z. HUANG, R. J. FLETTERICK, F. E. COHEN und S. B. PRUSINER

(1993):

Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.

PNAS **90**, 10962-10966

PARCHI, P., R. CASTELLANI, S. CAPELLARI, B. GHETTI, K. YOUNG, S. CHEN, M. FARLOW, D. DICKSON, A. SIMA, J. TROJANOWSKI, R. PETERSEN und P. GAMBETTI (1996):

Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.

Ann. Neurol. **39** (6), 767-778

PATTISON, I. und K. JONES (1968):

Modification of a strain of mouse-adapted scrapie by passage through rats.

Res. Vet. Sci. **9**, 408-410

PATTISON, I., M. HOARE, J. JEBBET und W. WATSON (1972):

Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep.

Vet. Rec. **90**, 465-467

PESTKA, J. J. (1989):

Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71**, 1075-1081

PHILLIPS, N., J. BRIDGEMAN und M. FERGUSON-SMITH (2000):

BSE Inquiry.

<http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/index.html>

PICCARDO, P., J. SAFAR, M. CERONI, D. GAJDUSEK und C. GIBBS (1990):

Immunohistochemical localization of prion protein in spongiform encephalopathies and normal brain tissue.

Neurology **40**, 518-522

POHLENZ, J. (1996):

Zur Situation der BSE als neue Erkrankung.

In: HIEPE, T.: Spongiforme Enzephalopathien bei Tieren unter besonderer Berücksichtigung der BSE; Nova Acta Leopoldina **298** (75), 13-14

PRUSINER, S. B. (1982):

Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.

Science **216**, 136-144

PRUSINER, S. B. (1995):

Prionen Erkrankungen.

Spektrum der Wissenschaft **3**, 44-52

PRUSINER, S. B. (1997):

Prion diseases and the BSE crisis.

Science **278**, 245-251

PRUSINER, S. B., M. P. MC KINLEY, K. A. BOWMAN, D. C. BOLTON, P. E. BENDHEIM, D. F. GROTH und G. G. GLENNER (1983):

Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods.

Cell **35**, 349-358

PRUSS, R., R. MIRSKY, M. RAFF, R. THORPE, A. DOWDING und B. ANDERTON (1981):

All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody.

Cell **27**, 419-428

PURDEY, M. (1996):

The UK epidemic of BSE: Slow virus or chronic pesticide-initiated modification of the prion protein? Part I: Mechanisms for a chemically induced pathogenesis/transmissibility.

Med Hypotheses **46** (5), 429-443

RABENAU, H. (1997):

Viren oder infektiöse Proteine? Die Erreger der subakuten spongiformen Enzephalopathien.

Mikrobiologie **7**, 165-169

RENCOVA, E. (2005):

Comparison of commercially available antibodies for the detection of central nervous system tissue in meat products by enzyme-linked immunosorbent assay.

J. Food Protect. **68** (3), 630-632

RIVERS, T. M. und F. F. SCHWENTKER (1935):

Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys.

J. Exp. Med. **61**, 689-702

RUFFING, M. und H. WINDEMANN (2001):

Die Prävention von Prionenkrankheiten in der Arzneimittel- und Kosmetikproduktion.

In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER und H. KRETZSCHMAR: Prionen und Prionkrankheiten, 401-414

De Gruyter, Berlin, New York

RUNQUIST, M., I. PARMRYD, A. THELIN, T. CHOJNACKI und G. DALLNER (1995):

Distribution of branch point prenyltransferases in regions of bovine brain.

J. Neurochem. **65** (5), 2299-2306

SANDMEIER, B., C. M. BECKER, R. ROTHENEDER, M. GAREIS und M. PISCHETSRIEDER (2003):

Nachweis von ZNS-Kontaminationen in Fleisch.

54. Arbeitstagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, 24.03.2003, Garching

SCHÄTZEL, H., F. WOPFNER, S. GILCH, A. VON BRUNN und G. JÄGER (1997):

Is codon 129 of prion protein polymorphic in human beings but not in animals?

Lancet **349**, 1603-1604

SCHICKER, E. (1998):

Spongiforme Enzephalopathien bei Mensch und Tier.

In: BRAUN, U.: BSE und andere spongiforme Enzephalopathien

Parey Buchverlag, Berlin, Hamburg

SCHMECHEL, D., P. J. MARANGOS und M. BRIGHTMAN (1978):

Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells.

Nature **276**, 834-836

SCHMIDT, G. R., K. L. HOSSNER, R. S. YEMM und D. H. GOULD (1999a):

Potential for disruption of central nervous system tissue in beef cattle by different types of captive bolt stunners.

J. Food Protect. **62** (4), 390-393

SCHMIDT, G. R., K. L. HOSSNER, R. S. YEMM, D. H. GOULD und J. P. O`CALLAGHAN (1999b):

An enzyme-linked immunosorbent assay for glial fibrillary acidic protein as an indicator of the presence of brain or spinal cord in meat.

J. Food Protect. **62** (4), 394-397

SCHMIDT, G. R., R. S. YEMM, K. D. CHILDS, J. P. O`CALLAGHAN und K. L. HOSSNER (2001):

The detection of central nervous system tissue on beef carcasses and in comminuted beef.

J. Food Protect. **64** (12), 2047-2052

SCHNEIDER-SCHLÖTH, A. (1877):

Basler Kochschule. Eine leichtfassliche Anleitung zur bürgerlichen und feineren Kochkunst.

Verlag Felix Schneider, Basel

SCHNEIDER, E., B. KERP, V. CURTUI und E. USLEBER (2003):

Towards species-specific immunoassays against bovine central nervous tissue marker proteins.

Tagung "Prion diseases: from basic research to intervention concepts", 08.-10.10.2003, München

SCHÖNENBRÜCHER, H., A. ABDULMAWJOOD und M. BÜLTE (2003a):

Real time RT-PCR for detection of bovine-specific central nervous system tissues as BSE risk material in meat and meat products.

Tagung "Prion diseases: from basic research to intervention concepts", 08.-10.10.2003, München

SCHÖNENBRÜCHER, H., A. ABDULMAWJOOD und M. BÜLTE (2003b):

Spezifischer Nachweis des sauren Gliafaserproteins der Tierart Schwein in prozessierten Lebensmitteln mit einem Sybr[®] Green Real Time-Assay.

44. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), 29.09.-02.10.2003, Garmisch-Partenkirchen

SCHÜTT-ABRAHAM, I. (2002):

BSE-Präventivmaßnahmen bei der Schlachtung von Rindern.

BMTW **115**, 125-130

SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE (SSC, 1999):

Opinion of the Scientific Steering Committee on the human exposure risk (HER) via food with respect to BSE- adopted on 10.12.1999.

http://europa.eu.int/comm./food/fs/sc/ssc/out67_en.pdf

SEYBOLDT, C., A. J. T. VON MUEFFLING, B. NOWAK und S. WENZEL (2003):

Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for species-specific detection of bovine central nervous system tissue in meat and meat products.

J. Food Protect. **66** (4), 644-651

SHAW, I., C. BERRY, E. LANE, P. FITZMAURICE, D. CLARKE und A. HOLDEN (2002):

Studies on the putative interactions between the organophosphorus insecticide phosmet and recombinant mouse PrP and its implication in the BSE epidemic.

Vet. Res. Comm. **26** (4), 263-271

SIMON, D. (1996):

Zusammenhänge zwischen menschlichen und tierischen übertragbaren spongiformen Enzephalopathien.

Infektionsepidemiologische Forschung (InfFO) I/97, 1-6

SIMON, D. und G. PAULI (1998):

Krankenversorgung und Instrumentensterilisation bei CJK-Patienten und CJK-Verdachtsfällen.

Bundesgesundheitsblatt **7**, 279-284

SMITH, P. G. (2003):

The epidemics of bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: current status and future prospects.

Bulletin of the WHO **81**, 123-130

SOUCI, S., W. FACHMANN und H. KRAUT (1994):

Die Zusammensetzung der Lebensmittel- die Nährwert-Tabellen.

5. Auflage; Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart

SPIELHAUPTER, C. und H. M. SCHÄTZL (2001):

PrP^c directly interacts with proteins involved in signaling pathways.

J. Biol. Chem. **276**, 44604-44612

STOCKMANN, S. (1913):

Scrapie: an obscure disease of sheep.

J. Comp. Pathol. **26**, 317-327

TAN, L., M. WILLIAMS, M. KHAN, H. CHAMPION und N. NIELSEN (1999):

Risk of transmission of bovine spongiform encephalopathy to humans in the United States- Report of the Council on Scientific Affairs.

J. Am. Med. Ass. **281** (41), 2330-2339

TAPIA, F. J., J. M. POLAK, A. J. BARBOSA, S. BLOOM, P. MARANGOS, C. DERMODY und A. PEARSE (1981):

Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumors.

Lancet **1**, 808-811

TASARA, T., S. SCHUMACHER und R. STEPHAN (2005):

Conventional and Real-Time PCR-based approaches for molecular detection and quantitation of bovine species material in edible gelatin.

J. Food Protect. **68** (11), 2420-2426

TAYLOR, D. (1993):

Inactivation of SE agents.

Br. Med. Bull. **49** (4), 810-821

TAYLOR, D., H. FRASER, I. MC CONNELL, D. BROWN, K. BROWN, K. LAMZA und G. SMITH (1994):

Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie.

Arch. Virol. **139**, 313-326

TAYLOR, D., S. WOODGATE und M. ATKINSON (1995a):

Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures.

Vet. Rec. **137**, 605-610

TAYLOR, D., C. FERGUSON, C. BOSTOCK und M. DAWSON (1995b):

Absence of disease in mice receiving milk from cows with bovine spongiform encephalopathy.

Vet. Rec. **136**, 592

TAYLOR, D., C. FERGUSON und A. CHREE (1996):

Absence of detectable infectivity in trachea of BSE-infected cattle.

Vet. Rec. **138**, 160-161

TAYLOR, D., S. WOODGATE, A. FLEETWOOD und R. CAWTHORNE (1997):

Effect of rendering procedures on the scrapie agent.

Vet. Rec. **141**, 643-649

TERSTEEG, M. H. G., P. A. KOOLMEES und F. VAN KNAPEN (2002):

Immunohistochemical detection of brain tissue in heated meat products.

Meat Science **61**, 67-72

THOMZIG, A., C. KRATZEL, G. LENZ, D. KRÜGER und M. BEEKES (2003):

Widespread PrPsc accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie.

EMBO reports **4** (5), 530-533

TOWBIN, H., T. STAEBELIN und J. GORDON (1979):

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

PNAS USA **76**, 4350-4354

TROEGER, K. und J. PRZYTULLA (1996):

Technologische Verwertung von Rinderorganen und Geweben.

37. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), 26.-29.09.1996, Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 385-391

VANDEVELDE, M., A. ZURBRIGGEN und R. FATZER (1992):

Die spongiformen Enzephalopathien mit besonderer Berücksichtigung der bovinen spongiformen Enzephalopathie.

Schweiz. Med. Wochenschr. **122** (23), 887-892

VAN KEULEN, L., B. SCHREUDER, R. MELOEN, M. POELEN-VAN DEN BERG, G. MOOIJ-HARKES, M. VROMANS und J. LANGEVELD (1995):

Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie.

Vet. Pathol. **32**, 299-308

VAN KEULEN, L., A. BOSSERS und F. VAN ZIJDERVELD (2008):

TSE pathogenesis in cattle and sheep.

Vet. Res. **39**, 24

WALKER, C. S., S. J. CLARK und H. H. WOTITZ (1973):

Factors involved in the production of specific antibodies to estriol and estradiol.

Steroids **21**, 259-283

WEISSMANN, C. (1996):

Prionen- neuartige Krankheitserreger.

Naturwiss. Rundsch. **49**, 211-214

WELLS, G. und J. WILESMITH (1995):

The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy.

Brain Pathol. **5** (1), 91-103

WELLS, G., A. SCOTT, C. JOHNSON, R. GUNNING, R. HANCOCK, M. JEFFREY, M. DAWSON und R. BRADLEY (1987):

A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle.

Vet. Rec. **121**, 419-420

WELLS, G., R. HANCOCK, W. COOLEY, M. RICHARDS, R. HIGGINS und G. DAVID (1989):

Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata.

Vet. Rec. **125**, 521-524

WELLS, G., S. HAWKINS, R. GREEN, A. AUSTIN, I. DEXTER, Y. SPENCER, M. CHAPLIN, M. STACK und M. DAWSON (1998):

Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update.

Vet. Rec. **142**, 103-106

WELLS, G., S. HAWKINS, A. AUSTIN, S. RYDER, S. DONE, R. GREEN, I. DEXTER, M. DAWSON und R. KIMBERLIN (2003):

Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs.
J. Gen. Virol. **84**, 1021-1031

WENISCH, S., E. LÜCKER, E. EIGENBRODT, M. BÜLTE und R. LEISER (2000):

Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf BSE unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen- 4. Histologischer und immunhistologischer Nachweis von zentralem Nervengewebe.

Fleischwirtschaft **80** (7), 69-72

WENTHE, S., W. ZENS, S. HORLACHER, A. ABDULMAJWOOD und M. BÜLTE (2001):

Problematik der Verarbeitung von Hartseparatorenfleisch.

Fleischwirtschaft **81** (6), 93-95

WIEMER, U. (1997):

BSE- Aktuelle Situation und Maßnahmen.

DVG-Tagung der Fachgruppe Tierseuchen und Virologie, Gießen, Tagungsbericht, 78-85

WILESMITH, J. und J. RYAN (1992):

Bovine spongiform encephalopathy recent observations on the age-specific incidences.

Vet. Rec. **130**, 491-492

WILESMITH, J. und J. RYAN (1993):

Bovine spongiform encephalopathy: observations on the incidence during 1992.

Vet. Rec. **132**, 300-301

WILESMITH, J. und J. RYAN (1997):

Absence of BSE in the offspring of pedigree suckler cows affected by BSE in Great Britain.

Vet. Rec. **141**, 250-251

WILESMITH, J., G. WELLS, M. CRANWELL und J. RYAN (1988):

Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies.

Vet. Rec. **123**, 638-644

WILESMITH, J., J. RYAN und M. ATKINSON (1991):

Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin.

Vet. Rec. **128**, 199-203

WILESMITH, J., G. WELLS, J. RYAN, D. GAVIER-WIDEN und M. SIMMONS (1997):

A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy.

Vet. Rec. **141**, 239-243

WILL, R. (1999):

The transmission of prions to humans.

Acta paediatr. **88** (433), 28-32

WILL, R. und W. MATTHEWS (1982):

Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease.

J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry **45**, 235-238

WILL, R. und M. ZEIDLER (1996):

Diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease.

BMJ **313**, 833-834

WILL, R. G., J. W. IRONSIDE, M. ZEIDLER, S. N. COUSENS, K. ESTIBEIRO, A.

ALPEROVITCH, S. POSER, M. POCCHIARI, A. HOFMAN und P. G. SMITH (1996):

A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK.

Lancet **347**, 921-925

WILLIAMS, E. und S. YOUNG (1980):

Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy.

J. Wildl. Dis. **16**, 89-98

WILSON, M. B. und P. K. NAKANE (1978):

Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies.

In: KNAPP, W., K. HOLUBAR und G. WICK: Immunofluorescence and related staining techniques, 215-224

Elsevier, Amsterdam

WISNIEWSKI, H., S. SIGURDARSON, R. RUBENSTEIN, R. KASCAK und R. CARP (1996):

Mites as vectors for scrapie.

Lancet **347**, 1114

WÖRNER, W. (1990):

Kopplung von Peroxidase.

In: PETERS, J.H. und H. BAUMGARTEN: Monoklonale Antikörper, 294-296

Springer Verlag, Berlin

WYATT, J., G. PEARSON, T. SMERDON, T. GRUFFYDD-JONES und G. WELLS (1990):

Spongiform encephalopathy in a cat.

Vet. Rec. **126**, 513

YEN, S.-H. und K. L. FIELDS (1981):

Antibodies to neurofilament, glial filament and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system.

J. Cell Biol. **88**, 115-126

ZEIDLER, M., G. STEWART, S. COUSENS, K. ESTIBEIRO und R. WILL (1997):

Codon 129 genotype and new variant CJD.

Lancet **350**, 668

ZERR, I., M. BODEMER, S. RÄCKER, S. GROSCHE, S. POSER, H. KRETZSCHMAR
und T. WEBER (1995):

Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-
Jakob disease.

Lancet **345**, 1609-1610

ZLOTNIK, I. (1958):

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

J. Comp. Pathol. **68**, 148-166

Zitierte Rechtsvorschriften:

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT
(2005): ADV-Kodierkataloge für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen
Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie dem Lebensmittelmonitoring.
<http://www.bvl.bund.de>

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT
(2005): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASU) nach § 64 LFGB, L
05.00-17: Bestimmung des Cholesteringehaltes in Eiern und Eiprodukten (Enzymatisches
Verfahren).
Beuth Verlag, Berlin

BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN
(1982 und 1994): Verordnung zum Schutz gegen die Verschleppung von Tierseuchen im
Viehverkehr (Viehverkehrsverordnung, ViehVerkV) vom 23.04.1982 (BGBl. I Nr. 15 vom
30.04.1982, 503-512), geändert durch die zweite Verordnung zur Änderung der
Viehverkehrsverordnung vom 18.03.1994 (BAnz. Nr. 55, 2890).
<http://www.bgbl.de>

BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN
(1991 und 1999): Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnz) in der
Fassung der Bekanntmachung vom 23.05.1991 (BGBl. I Nr. 32 vom 29.05.1991, 1178),
geändert durch die Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige
Tierseuchen vom 05.05.1999 (BGBl. I Nr. 22 vom 07.05.1999, 844).
<http://www.bgbl.de>

BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN
(2000): Verordnung über die Erstreckung der Verbote des Gesetzes über das Verbot des
Verfüttens, des innergemeinschaftlichen Verbringens und der Ausfuhr bestimmter
Futtermittel sowie ergänzende Maßnahmen (Verfüttungsverbots-Verordnung,
VerfVerbVO) vom 27.12.2000 (BAnz. Nr. 245 vom 30.12.2000, 24069).
http://www.vention.de/gesetze/Gesetzestexte_pdf/VerfVerbVO.pdf

BUNDESMINISTERIUM FÜR GESUNDHEIT (1997): Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch (Fleischhygiene-Verordnung, FIHV) in der Bekanntmachung der Neufassung vom 21.05.1997 (BGBl. I Nr. 32 vom 30.05.1997, 1138-1222).

<http://www.bgbl.de>

BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (2002): BSE-Untersuchungsverordnung in der Fassung der Bekanntmachung der Neufassung der BSE-Untersuchungsverordnung vom 18.09.2002 (BGBl. I Nr. 69 vom 30.09.2002, 3730-3732).

<http://www.bgbl.de>

BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (2002): Verordnung zur Festlegung lebensmittelhygienerechtlicher Anforderungen an die Herstellung, Behandlung und an das Inverkehrbringen von Speisegelatine und an deren Ausgangserzeugnisse (Speisegelatine-Verordnung, GelV) vom 13.12.2002 (BGBl. I Nr. 85 vom 19.12.2002, 4538-4542).

<http://www.bgbl.de>

BUNDESTAG MIT ZUSTIMMUNG DES BUNDESRATES (2000): Gesetz über das Verbot des Verfütterns, des innergemeinschaftlichen Verbringens und der Ausfuhr bestimmter Futtermittel vom 01.12.2000 (BGBl. I Nr. 52 vom 01.12.2000, 1635-1636).

<http://www.bgbl.de>

BUNDESTAG MIT ZUSTIMMUNG DES BUNDESRATES (2005 und 2006): Gesetz zur Neuordnung des Lebensmittel- und des Futtermittelrechts vom 01.09.2005 (BGBl. I Nr. 55 vom 06.09.2005, 2618-2669) in der Fassung der Bekanntmachung der Neufassung des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch, Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch, LFGB) vom 26.04.2006 (BGBl. I Nr. 20 vom 27.04.2006, 945).

<http://www.bgbl.de>

DEUTSCHE LEBENSMITTELBUCHKOMMISSION (1974, 1994 und 2001): Leitsätze des Deutschen Lebensmittelbuches für Fleisch und Fleischerzeugnisse in der Fassung vom 27./28.11.1974 (Beilage zum BAnz. Nr. 134 vom 25.07.1975, GMBI. Nr. 23 vom 25.7.1975, 489), geändert am 27./28.11.1994 (GMBI. vom 25.07.1995, 489), geändert am 02.10.2001 (BAnz. Nr. 199 vom 24.10.2001, GMBI. Nr. 38 vom 30.10.2001, 754 ff).

<http://www.bmelv.de>

EU (1990) 90/134/EG: Entscheidung der Kommission vom 06.03.1990 zur zweiten Änderung der Richtlinie 82/894/EWG des Rates über die Mitteilung von Viehseuchen in der Gemeinschaft und zur zeitweiligen Änderung der Häufigkeit der Meldepflicht bei Auftreten der spongiformen Rinderenzephalopathie (ABl. Nr. L 076 vom 22.03.1990, 23).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (1994) 94/381/EG: Entscheidung der Kommission vom 27.06.1994 über Schutzmaßnahmen in Bezug auf die spongiforme Rinderenzephalopathie und die Verfütterung von aus Säugetieren gewonnenen Futtermitteln (ABl. Nr. L 172 vom 07.07.1994, 23-24).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (1996) 96/449/EG: Entscheidung der Kommission vom 18.07.1996 über die Zulassung alternativer Verfahren zur Hitzebehandlung von tierischen Abfällen im Hinblick auf die Inaktivierung der Erreger der spongiformen Enzephalopathie (ABl. Nr. L 184 vom 24.07.1996, 43-46).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (1997) 97/534/EG: Entscheidung der Kommission vom 30.07.1997 über das Verbot der Verwendung von Material angesichts der Möglichkeit der Übertragung transmissibler spongiformer Enzephalopathien (ABl. Nr. L 216 vom 08.08.1997, 95-98).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (1998) 98/272/EG: Entscheidung der Kommission vom 23.04.1998 über die epidemiologische Überwachung der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien und zur Änderung der Entscheidung 94/474/EG (ABl. Nr. L 122 vom 24.04.1998, 59-63).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2000) 2000/418/EG: Entscheidung der Kommission vom 29.06.2000 zur Regelung der Verwendung von bestimmtem Tiermaterial angesichts des Risikos der Übertragung von TSE-Erregern und zur Änderung der Entscheidung 94/474/EG (ABl. Nr. L 157 vom 30.06.2000, 76-82).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2000) 2000/764/EG: Entscheidung der Kommission vom 29.11.2000 über die Untersuchung von Rindern auf bovine spongiforme Enzephalopathie und zur Änderung der Entscheidung 98/272/EG über die epidemiologische Überwachung der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (ABl. Nr. L 305 vom 06.12.2000, 35-38).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2000) 2000/766/EG: Entscheidung des Rates vom 04.12.2000 über Schutzmaßnahmen in Bezug auf die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien und die Verfütterung von tierischem Protein (ABl. Nr. L 603 vom 07.12.2000, 32-33).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2001) 2001/233/EG: Entscheidung der Kommission vom 14.03.2001 zur Änderung der Entscheidung 2000/418/EG im Hinblick auf Separatorenfleisch und Rinderwirbelsäule (ABl. Nr. L 084 vom 23.03.2001, 59-61).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2008) 2008/908/EG: Entscheidung der Kommission vom 28.11.2008 zur Ermächtigung bestimmter Mitgliedsstaaten, ihr jährliches BSE-Überwachungsprogramm zu überarbeiten (ABl. Nr. L 327 vom 05.12.2008, 24-26).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (1997): Verordnung (EG) Nr. 820/97 des Rates vom 21.04.1997 zur Einführung eines Systems zur Kennzeichnung und Registrierung von Rindern und über die Etikettierung von Rindfleisch und Rindfleischerzeugnissen (ABl. Nr. L 117 vom 07.05.1997, 1-8).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2001): Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22.05.2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien (ABl. Nr. L 147 vom 31.05.2001, 1-40).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2001): Verordnung (EG) Nr. 1248/2001 der Kommission vom 22.06.2001 zur Änderung der Anhänge III, X und XI der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates im Hinblick auf die epidemiologische Überwachung transmissibler spongiformer Enzephalopathien und die entsprechenden Nachweistests (ABl. Nr. L 173 vom 27.06.2001, 12-22).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2001): Verordnung (EG) Nr. 1326/2001 der Kommission vom 29.06.2001 mit Übergangsmaßnahmen zur Erleichterung des Übergangs zur Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Bekämpfung und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien (TSE) sowie zur Änderung der Anhänge VII und XI dieser Verordnung (ABl. Nr. L 177 vom 30.06.2001, 60-67).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2003): Verordnung (EG) Nr. 1139/2003 der Kommission vom 27.06.2003 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates in Bezug auf Überwachungsprogramme und spezifiziertes Risikomaterial (ABl. Nr. L 160 vom 28.06.2003, 22-32).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2006): Verordnung (EG) Nr. 1923/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18.12.2006 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien (ABl. Nr. L 404 vom 30.12.2006, 1-8).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2007): Verordnung (EG) Nr. 722/2007 der Kommission vom 25.06.2007 zur Änderung der Anhänge II, V, VI, VIII, IX und XI der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien (ABl. Nr. L 164 vom 26.06.2007, 7-23).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2008): Verordnung (EG) Nr. 315/2008 der Kommission vom 04.04.2008 zur Änderung des Anhangs X der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Liste der Schnelltests (ABl. Nr. L 94 vom 05.04.2008, 3-5).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2008): Verordnung (EG) Nr. 357/2008 der Kommission vom 22.04.2008 zur Änderung von Anhang V der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien (ABl. Nr. L 111 vom 23.04.2008, 3-4).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2009): Verordnung (EG) Nr. 163/2009 der Kommission vom 26.02.2009 zur Änderung des Anhangs IV der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien (ABl. Nr. L 55 vom 27.02.2009, 17-18).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2009): Verordnung (EG) Nr. 220/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11.03.2009 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien betreffend die der Kommission übertragenen Durchführungsbefugnisse (ABl. Nr. L 87 vom 31.03.2009, 155-156).

<http://eur-lex.europa.eu>

EU (2001) 2001/101/EG: Richtlinie der Kommission von 26.11.2001 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür (ABl. Nr. L 310 vom 28.11.2001, 19-21).

<http://eur-lex.europa.eu>

THE MINISTER OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, THE SECRETARY OF STATE FOR SCOTLAND AND THE SECRETARY OF STATE FOR WALES (1988): The Bovine Spongiform Encephalopathy order 1988. Statutory Instrument 1988 No. 1039 (21.06.1988).

http://www.opsi.gov.uk/si/si1988/Uksi_19881039_en_1.htm

THE MINISTER OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, THE SECRETARY OF STATE FOR SCOTLAND AND THE SECRETARY OF STATE FOR WALES (1988): The Bovine Spongiform Encephalopathy (No. 2) order 1988. Statutory Instrument 1988 No. 2299 (27.12.1988).

http://www.opsi.gov.uk/si/si1988/Uksi_19882299_en_1.htm

THE MINISTER OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, THE SECRETARY OF STATE FOR HEALTH AND THE SECRETARY OF STATE FOR WALES (1989): The Bovine Offal (Prohibition) Regulations 1989. Statutory Instrument 1989 No. 2061 (08.11.1989).

http://www.opsi.gov.uk/si/si1989/Uksi_19892061_en_1.htm

THE MINISTER OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, THE SECRETARY OF STATE FOR SCOTLAND AND THE SECRETARY OF STATE FOR WALES (1990): The Bovine Spongiform Encephalopathy (No. 2) Amendment Order 1990. Statutory Instrument 1990 No. 1930 (24.09.1990).

http://www.opsi.gov.uk/si/si1990/Uksi_19901930_en_1.htm

THE MINISTER OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, THE SECRETARY OF STATE FOR SCOTLAND AND THE SECRETARY OF STATE FOR WALES (1996): The Bovine Spongiform Encephalopathy (Amendment) Order 1996. Statutory Instrument 1996 No. 962 (28.03.1996).

http://www.opsi.gov.uk/si/si1996/Uksi_19960962_en_1.htm

THE MINISTER OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, THE SECRETARY OF STATE FOR SCOTLAND AND THE SECRETARY OF STATE FOR WALES (1996): The Specified Bovine Material Order 1996. Statutory Instrument 1996 No. 963 (28.03.1996).

http://www.opsi.gov.uk/si/si1996/Uksi_19960963_en_1.htm

THE MINISTER OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, THE SECRETARY OF STATE FOR SCOTLAND AND THE SECRETARY OF STATE FOR WALES (1996): The Cattle Passports Order 1996. Statutory Instrument 1996 No. 1686 (28.06.1996).

http://www.opsi.gov.uk/si/si1996/Uksi_19961686_en_1.htm

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ABl.	Amtsblatt der Europäischen Union
A. dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
BGBI.	Bundesgesetzblatt
bGFAP	bovine Glial fibrillary acidic protein, bovines saures Gliafaserprotein
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BLK	Blank, Leerwert
bMBP	bovine Myelin basic protein, bovines basisches Myelinprotein
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BMVEL	Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CJD	Creutzfeldt-Jakob Disease, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
cm	Zentimeter
CWD	Chronic wasting disease, chronische Schwundkrankheit der Zerviden
DEFRA	Department for Environment, Food and Rural Affairs
DLG	Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft e.V.
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EEG	Elektroenzephalogramm
EG	Europäische Gemeinschaft
EIA	Enzymimmunoassay, Enzymimmuntest
EU	Europäische Union
FAME	Fatty acid methyl ester, Fettsäuremethylester
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
g	Erd(schwere)beschleunigung (Gravitas, Einheit: m/s ²)
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
GFAP	Glial fibrillary acidic protein, saures Gliafaserprotein
GSSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom

h	Stunde(n)
hMBP	humanes Myelin basic protein, humanes basisches Myelinprotein
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
l	Liter
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LS	Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des deutschen Lebensmittelbuches
M	molar
max.	maximal
MBP	Myelin basic protein, basisches Myelinprotein
mg	Milligramm
min	Minuten
min.	minimal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert (arithmetisches Mittel)
µg	Mikrogramm
n	Anzahl
NF	Neurofilament
ng	Nanogramm
n.g.	nicht geeignet
nm	Nanometer
NSE	Neuronenspezifische Enolase
n.u.	nicht untersucht
OIE	Office international des epizooties, World Organisation for Animal Health
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion

pGFAP	porcine Glial fibrillary acidic protein, porcines saures Gliafaserprotein
pMBP	porcine Myelin basic protein, porcines basisches Myelinprotein
Prion	proteinaceous infectious particle
PrPc	zelluläres Prionenprotein (physiologisch)
PrPsc	scrapie-assoziiertes Prionenprotein (pathogen)
Rd	Rindergehirnextrakt
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Molekulargewichtsmarkerprotein
SBM	Specified bovine materials
SBO	Specified bovine offals
S-EIA	Sandwich-Enzymimmunoassay, Sandwich-Enzymimmuntest
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SI	Statutory Instrument
SRM	Spezifiziertes Risikomaterial
SSC	Scientific Steering Committee
Sw	Schweinegehirnextrakt
TBS	Tris buffered saline, Tris gepufferte Kochsalzlösung
TMB	Tetramethylbenzidin
TME	Transmissible Mink Encephalopathy, Übertragbare Nerzenzephalopathie
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
UK	United Kingdom, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
vCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
VO	Verordnung
ZNS	Zentrales Nervensystem

EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. E. Usleber für die Überlassung des Themas und für die ausgezeichnete Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. B. Meier und Frau Dr. E. Schneider danke ich für die zahlreichen Anregungen und jederzeit gewährte Hilfe.

Frau Dr. D. Lux danke ich für die hervorragende Vorarbeit im Rahmen Ihrer Dissertation „Entwicklung und Validierung eines Sandwich-Enzymimmuntests zum Nachweis von bovinem ZNS in Fleisch und Fleischerzeugnissen“.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie und den Mitarbeitern der Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Forschungsprojektes „Geno- und phänotypische Identifizierung von BSE-Risikomaterial in Lebensmitteln tierischen Ursprungs“ bedanken.

Ich möchte mich auch bei allen Kollegen des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei Frau R. Stumpf für ihre tatkräftige Unterstützung, herzlich bedanken.

Die Zeit in der „Milch“ wird mir allzeit in schöner Erinnerung bleiben.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Familie und meinem Lebensgefährten für ihre Geduld und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5563-2

Tel: 0641-5699888 Fax: -5699890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 17838351955639