

**Entwicklung und Validierung eines Sandwich-Enzymimmuntests
zum Nachweis von bovinem ZNS in Fleisch und
Fleischerzeugnissen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dorina Lux

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

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

**Entwicklung und Validierung eines Enzymimmuntests zum
Nachweis von bovinem ZNS in Fleisch und
Fleischerzeugnissen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Dorina Lux

Tierärztin aus Siegen

Gießen 2009

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

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

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

Prof. Dr. G. Scheiner-Bobis

Tag der Disputation: 08.07.2009

Für Rainer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE)	3
2.1.1	Prionen	4
2.1.2	Diagnose der TSE	6
2.1.3	Scrapie	7
2.1.4	Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	8
2.1.5	Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD)	11
2.2	Rechtliche Regelungen zu den TSE	14
2.2.1	Bekämpfung	15
2.2.2	Überwachung	15
2.2.3	Prävention	16
2.3	Nachweisverfahren für Spezifiziertes Risikomaterial (SRM)	18
2.3.1	Immunologische Nachweisverfahren	19
2.3.1.1	Antikörper gegen ZNS-Markerproteine	19
2.3.1.2	Testsysteme	20
2.3.1.2.1	Immunhistologische Nachweisverfahren	20
2.3.1.2.2	Enzymimmuntests (EIA)	25
2.3.1.2.3	Western Blot	27
2.3.2	Chemische und chemisch-physikalische Nachweisverfahren	28
2.3.2.1	Cholesterinbestimmung	28
2.3.2.2	Gaschromatographische Fettsäurenanalyse	30
2.3.3	Molekularbiologische Nachweisverfahren	31
2.4	Saures Gliafaserprotein (GFAP)	32
2.4.1	Chemisch-Physikalische Eigenschaften	32
2.4.2	Lokalisation und Funktion	33
2.4.3	Bedeutung als Markersubstanz	35

3	Eigene Untersuchungen	37
3.1	Materialien und Geräte	37
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	37
3.1.2	Lösungen und Puffer	38
3.1.3	Untersuchungsmaterial	39
3.1.4	Geräte und Sonstiges	40
3.2	Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen bovines GFAP	41
3.2.1	Immunisierung von Kaninchen, Schafen und Schweinen	41
3.2.2	Serumgewinnung und Kontrolle des Immunisierungsverlaufes	42
3.2.3	Ergebnisse	43
3.3	Herstellung von Immunreagenzien	43
3.3.1	Reinigung der Antikörper (Serumpräzipitation)	45
3.3.2	Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten	46
3.3.2.1	Enzymmarkierung der IgG-Rohfraktion (Kopplung)	46
3.3.2.2	Gelchromatographische Reinigung der Kopplungsprodukte	46
3.3.2.3	Überprüfung und Bewertung der Konjugatfraktionen	47
3.3.3	Ergebnisse	48
3.4	Erstellung von Sandwich-Enzymimmuntests, Überprüfung derer Tierartspezifität und Selektion der geeignetsten Testkombination	48
3.4.1	Erstellung von Sandwich-Enzymimmuntests	48
3.4.2	Überprüfung der Tierartspezifität	49
3.4.3	Ergebnisse	50
3.4.4	Selektion der geeignetsten Immunreagenzien-Kombination für den Sandwich-Enzymimmuntest	55
3.5	Optimierung der Sensitivität und Überprüfung der Probenaufbereitung	55
3.5.1	Optimierung der Sensitivität	55
3.5.2	Ergebnisse der Sensitivitätsoptimierung	56
3.5.3	Überprüfung der Probenaufbereitung	58
3.5.4	Ergebnisse der Überprüfung der Probenaufbereitung	58

3.6	Standardisierung des Testsystems zum Nachweis von Gehirnäquivalenten	62
3.6.1	Durchführung der Standardisierung	62
3.6.2	Ergebnisse der Standardisierung	62
3.7	Überprüfung der Testsensitivität in Fleischerzeugnissen	62
3.7.1	Herstellung mit ZNS vom Rind kontaminierter Fleischerzeugnisse	63
3.7.2	Extraktion und Untersuchung der Proben im Enzymimmuntest	64
3.7.3	Sensitivität in künstlich kontaminierten Fleischerzeugnissen	66
3.8	Überprüfung der Testspezifität in Fleischerzeugnissen	70
3.8.1	Herstellung künstlich kontaminierter Proben	71
3.8.2	Extraktion und Untersuchung der Proben im Sandwich-Enzymimmuntest	72
3.8.3	Testspezifität in künstlich kontaminierten Fleischerzeugnissen	72
3.9	Vergleich des Testsystems mit einem kommerziell erhältlichen Enzymimmuntest zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen	74
3.9.1	Durchführung des kommerziell erhältlichen Enzymimmuntests	74
3.9.2	Ergebnisse	75
3.10	Überprüfung der Anwendbarkeit des Testsystems zur Untersuchung von Fleischerzeugnissen aus dem Handel auf ZNS-Kontamination	76
3.10.1	Durchführung der Probenuntersuchung	76
3.10.2	Ergebnisse der Untersuchung kommerziell erhältlicher Fleischerzeugnisse	77
3.11	Orientierende Untersuchungen zur Speziesspezifitätssteigerung durch immunaffinitätschromatographische Aufreinigung der Antiseren	77
3.11.1	Kopplung von bovinem bzw. porcinem GFAP an CnBr-aktivierte Sepharose 4B	77

3.11.2	Immunaффinitätschromatographische Aufreinigung der Anti-GFAP-Antiseren an boviner bzw. porciner GFAP-Sepharose-Säule	78
3.11.3	Enzymimmunochemische Überprüfung und Bewertung der gereinigten Antiserumfraktionen im indirekten Enzymimmuntest	78
3.11.4	Überprüfung im Sandwich-Enzymimmuntest	79
3.11.5	Ergebnisse der immunaффinitätschromatographischen Reinigung der Antiseren	80
4	Diskussion	81
4.1	Bedeutung der Nachweisverfahren für ZNS	81
4.2	Antikörper gegen GFAP	82
4.3	Validierung des Testsystems	85
4.4	Vergleich des Testsystems mit anderen Nachweisverfahren für ZNS	87
5	Zusammenfassung	90
6	Summary	92
7	Literaturverzeichnis	94
8	Anhang	132
9	Danksagung	134
10	Eidesstattliche Erklärung	135

Abkürzungen

Abl.	Amtsblatt
BGBI.	Bundesgesetzblatt
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bovGFAP	bovines GFAP
cDNA	cellular Desoxyribonucleid Acid (zelluläre Desoxyribonukleinsäure)
CJD	Creutzfeld-Jakob-Disease (Creutzfeld-Jakob-Krankheit)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleid Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EG	Europäische Gemeinschaft
EIA	Enzymimmunoassay (Enzymimmuntest)
FAME	Fatty Acid Methyl Esters (Fettsäurenmethylester)
fCJD	autosomal-dominant vererbte CJD
GÄq	Rindergehirn-Äquivalent
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (Sauges Gliafaserprotein)
HRP	Horseradish-Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
iCJD	iatrogen übertragene Creutzfeld-Jakob-Disease
IgG	Immunglobulin G
ICH	Immunhistologie
K	Kaninchen
MBP	Myelin Basic Protein (basisches Myelinprotein)
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Boten-Ribonukleinsäure)
n	Probenzahl
NF	Neurofilament
NSE	Neuronen Spezifische Enolase
nvCJD	neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Disease
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
porcGFAP	porcines GFAP
<i>Prnp</i>	Gen des PrP
PrP	Prion-Protein

PrP ^c	zelluläres Prionprotein (physiologische Form)
PrP ^{sc}	pathologische Form des Prionproteins
PrP 27-30	proteaseresistenter Teil des Prionproteins
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
sCJD	sporadische/idiopathische Creutzfeld-Jakob-Disease
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
Sf	Schaf
SRM	Spezifiziertes Risikomaterial
Sw	Schwein
TAU	Tau-Protein
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
TYR	Tyrosin-Hydroxylase
VO	Verordnung
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Für die Gesundheit des Menschen ist der Schutz vor Zoonosen eine der wichtigsten Voraussetzungen. Auf Grund der hohen Wahrscheinlichkeit, dass die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) durch den gleichen Erreger wie die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) verursacht wird (BRUCE et al., 1997; COLLINGE et al., 1996; HILL et al., 1997a; LASMÉZAS et al., 1996 und SCOTT et al., 1999), sind Maßnahmen zum Schutz des Verbrauchers erforderlich, insbesondere durch die Vermeidung des Eintrags von Erregern in Lebensmittel.

Zu diesem Zweck wurden auf nationaler und europäischer Ebene verschiedene gesetzliche Vorschriften erlassen. Kernstück dieser Regelungen ist die „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“ (TSE-Verordnung, zuletzt geändert am 11.03.2009). Diese Verordnung stellt eine Zusammenfassung der bis zu diesem Zeitpunkt geltenden verschiedenen Rechtsvorschriften dar und bildet die Grundlage zur ganzheitlichen Bekämpfung von BSE und Scrapie bzw. ihrer möglichen Übertragung auf den Menschen. Unter anderem werden nach dieser Verordnung Gewebe, die bei präklinisch infizierten und klinisch erkrankten Tieren die höchsten Erregermengen enthalten, als spezifiziertes Risikomaterial (SRM) klassifiziert. Spezifiziertes Risikomaterial darf nicht in den Verkehr gelangen, sondern muss im Schlachthof oder Zerlegebetrieb entfernt, farbig markiert und anschließend unschädlich beseitigt werden. In den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union sind die Eingeweide von Duodenum bis Rectum, das Gekröse und die Tonsillen aller Rinder, der Schädel, ohne Unterkiefer, jedoch mit Gehirn und Augen sowie das Rückenmark aller Rinder über 12 Monate, die Wirbelsäule ohne Schwanzwirbel, Dorn- und Querfortsätze, jedoch mit Spinalganglien aller Rinder über 30 Monate, die Milz und das Ileum aller Schafe und Ziegen, der Schädel mit Gehirn, Tonsillen und Augen sowie das Rückenmark aller Schafe und Ziegen über 12 Monate als SRM klassifiziert.

Die Einhaltung dieser Vorschriften muss, neben betrieblichen Kontrollen, durch die repräsentative Untersuchung von Lebensmitteln auf SRM überprüft werden. Für die Überprüfung der Lebensmittel müssen somit alters-, gewebe- und speziesspezifische Testsysteme zur Verfügung stehen, die einfach, schnell und kostengünstig durchführbar sind.

Die bisher verfügbaren Testsysteme sind jedoch nur teilweise geeignet diese Anforderungen zu erfüllen. Methoden, die eine hohe Alters-, Gewebe- und Speziespezifität gewährleisten, sind kosten- und arbeitsintensiv (molekularbiologischer Nachweis der mRNA des Sauren Gliafaserproteins und gaschromatographisch-massenspektrometrischer Nachweis von Fettsäurederivaten), während einfache und kostengünstige Methoden zumeist nur geringe Gewebe- und Speziespezifität aufweisen (Cholesterinbestimmung und immunchemischer Nachweis des Sauren Gliafaserproteins, des basischen Myelinproteins, der Neuronenspezifischen-Enolase und von Syntaxin 1B).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Anzahl polyklonaler Antikörper gegen bovines Saures Gliafaserprotein in verschiedenen Spezies zu gewinnen und zu charakterisieren, um ein enzymimmunchemisches Testsystem mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich Gewebe- und Tierartspezifität für ZNS vom Rind in Fleisch, Hackfleisch und Fleischerzeugnissen zu entwickeln und zu validieren. Darüber hinaus sollten die immunologischen Eigenschaften von bovinem GFAP in verschiedenen Spezies untersucht werden.

2 Schrifttum

2.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE)

Unter „Transmissibler Spongiformer Enzephalopathie“ (TSE) versteht man eine langsam fortschreitende, letal endende Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS), die mit einer charakteristischen vakuolären Degeneration einhergeht, nach derzeitigem Erkenntnisstand von Prionen verursacht wird und natürlich und/oder experimentell übertragbar ist. Die Zahl der Spezies, bei denen die Existenz einer (spezifischen) TSE nachgewiesen wurde, nahm in den letzten Jahren deutlich zu. In Tabelle 1 ist eine Übersicht über die derzeit bekannten Formen der TSE beim Menschen bzw. beim Tier dargestellt.

Tabelle 1: Transmissible Spongiforme Enzephalopathien der verschiedenen Spezies und ihre Ursachen (modifiziert nach HÖRNLIMANN et al., 2001)

Betroffene Spezies	Krankheitsform	Ursache
Mensch	Kuru	infektiös
	Fatal Familiar Insomnia (FFI)	hereditär
	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)	hereditär
	Creutzfeldt-Jakob-Disease (CJD)	idiopathisch, hereditär, infektiös
Schaf und Ziege	Scrapie (Traberkrankheit)	infektiös
Rind und rinderartige Wiederkäuer	Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)	infektiös
Nerz	Transmissible Mink Encephalopathy (TME)	infektiös
Hirsch	Chronic Wasting Disease (CWD)	vermutlich infektiös
Katze	Feline Spongiform Encephalopathy (FSE)	infektiös

2.1.1 Prionen

Unter Prionen (abgeleitet von proteinaceus infectious particles = proteinartige infektiöse Agenzien) versteht man Krankheitserreger, die nur aus Protein bestehen (PRUSINER, 1982). Über zwei Jahrzehnte war nur belegt, dass das sogenannte Prion-Protein (PrP) eine zentrale Rolle bei der Entstehung Transmissibler Spongiformer Enzephalopathien spielt: transgene, PrP-lose Mäuse konnten nicht mit Scrapie infiziert werden (BÜELER et al., 1993; SAILER et al., 1994 und SAKAGUCHI et al., 1995), es sei denn, man führte das PrP-codierende Gen wieder ein (FISCHER et al., 1996 und FLECHSIG et al., 2000) und weitere Bestandteile des Krankheitserregers, insbesondere Nucleinsäuren, konnten weder nachgewiesen (ALPER et al., 1978; BELLINGER KAWAHARA et al., 1987 und GERMAN et al., 1985), noch eindeutig ausgeschlossen werden (KELLINGS et al., 1992; MEYER et al., 1991 und MURDOCH et al., 1990). Schließlich gelang es LEGNAME et al. (2004) und WEBER et al. (2007) mit reinem PrP Infektiösität zu erzeugen, so dass auf Grund dieses derzeitigen Kenntnisstandes der „Erreger“ der TSE nur aus Protein besteht.

PrP ist ein weit verbreitetes wasserlösliches Protein, welches in vielen Geweben auf der Zellmembran zu finden ist und gehäuft auf der präsynaptischen Zellmembran (HERMS, et al., 1999 und STAHL et al., 1987) und in Zellen des Immunsystems (DODELET und CASHMAN, 1998) auftritt. Seine physiologische Form wird als PrP^c (cellular PrP = zelluläres PrP) bezeichnet und durch ein chromosomales Gen (*Prnp*) codiert (OESCH et al., 1985). Es hat eine relative Molekularmasse von 33 000 – 35 000 Da und besteht aus einem, sich selbst faltenden, globulären Anteil und einem hochbeweglichen, ungefalteten Abschnitt. Der globuläre Teil setzt sich aus drei α -Helices, einem antiparallelen β -Faltblatt, einem helixähnlichem Abschnitt und dazwischen liegenden ungeordneten Bereichen zusammen (RIEK et al, 1996 und 1997).

Die physiologische Funktion des Proteins konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Unter anderem hat PrP^c kupferbindende Funktion (BROWN et al., 1997a und STÖCKEL et al., 1998) und beeinflusst dadurch sowohl kupferabhängige Enzyme (BROWN et al., 1997b und TOBLER et al., 1996 und 1997) als auch die neuronale Leitfähigkeit (COLLING et al., 1996; COLLINGE et al., 1994).

In Gehirnen an TSE erkrankter Individuen lässt sich eine pathologische Form des Proteins, PrP^{sc} (abgeleitet von Scrapie), in hohen Konzentrationen nachweisen (BOLTON et al., 1982). Diese Form des Proteins hat einen höheren Anteil an β -Faltblatt-Strukturen, ist nicht wasserlöslich sowie, mit Ausnahme eines Teils des nicht globulären Abschnitts, proteaseresistent (MERZ et al., 1981 und PRUSINER et al., 1978). Der proteaseresistente Teil des Proteins wird auf Grund seiner relativen Molekularmasse (27 000 – 30 000 Da) auch als PrP 27-30 bezeichnet und lagert sich zu Aggregaten zusammen (CAUGHLEY und RAYMOND, 1991). Die Aggregate des PrP 27-30 sind als „Prion-Rods“ oder „Scrapie-assoziierte Fibrillen“ (SAF) elektronenmikroskopisch nach Aufarbeitung des Gehirnmaterials nachweisbar (MCKINLEY et al., 1991). Durch die Proteaseresistenz kommt es zur Akkumulation des PrP 27-30 in den Zellen. Dies führt zu Funktionsstörungen der Zellen, deren Vakuolisierung und schließlich zum Zelltod. Die Aminosäuresequenz und die Lipidanker von PrP^c und PrP^{sc} sind jedoch identisch (BASLER et al., 1986). In posttranslationalen Prozessen kommt es, auf einem bisher nur hypothetisch zu erklärendem Weg (EIGEN, 1996 und PRUSINER, 1991), zur autokatalysierten Umwandlung des physiologischen PrP^c zu PrP^{sc}. (BORCHELT et al., 1990 und CAUGHLEY und RAYMOND, 1991). Die autokatalysierte Umwandlung wird durch Infektion mit PrP^{sc}, spontane Umwandlung eines PrP^c oder Mutationen des *Prnp*, die eine spontane Umfaltung begünstigen, verursacht.

Nach klinischer Symptomatik, Inkubationszeit, Übertragbarkeit, histopathologischen Läsionsprofilen, Inaktivierungsverhalten, Resistenz des PrP^{sc} gegen Proteinase K und PrP-Glycosylierung unterscheidet man verschiedene TSE-Varianten. Da in einem Tier gleichzeitig mehrere dieser Varianten auftreten können, sind diese Eigenschaften erreger- und nicht wirtsspezifisch (FRASER, 1983).

Prionen sind sehr resistent gegenüber Inaktivierungs- bzw. Dekontaminationsmaßnahmen. Das sicherste Verfahren zur Erregerinaktivierung ist nach derzeitigem Wissensstand die Sterilisation mit gesättigtem Wasserdampf bei 133 °C für 20 Minuten (TAYLOR et al., 1995 und 1997). Zur Flächendesinfektion können bei einstündiger Inkubationszeit 2 mol/l Natronlauge (BROWN et al., 1986 und TAYLOR et al., 1994) oder 5 %ige Natriumhypochloritlösung (BROWN et al., 1982) verwendet werden. Für chirurgische Instrumente ist auch eine Sterilisation in dampfförmigem Wasserstoffperoxid möglich (FICHET et al., 2004).

2.1.2 Diagnose der TSE

Den verschiedenen TSE-Formen gemeinsam ist die lange, teilweise bis zu mehreren Jahrzehnten dauernde Inkubationszeit sowie der stets progressive und letale Erkrankungsverlauf, welcher vor allem durch neuronale Ausfallserscheinungen gekennzeichnet ist. Zu den neuronalen Ausfallserscheinungen zählen Parästhesien (z.B. Juckreiz), Bewegungsstörungen (z.B. Ophistotonus, Ataxie, Tremor), Überempfindlichkeit gegen visuelle, akustische und taktile Reize sowie Verhaltensänderungen (z.B. Nervosität, Ängstlichkeit, Aggressivität, Stereotypien). Die genaue Art und Ausprägung der neuronalen Ausfallserscheinungen ist abhängig von der betroffenen Spezies und der jeweiligen TSE-Form (BOSSERS et al, 1996; BRAUN et al., 1998; PARRY, 1983; WILESMITH et al., 1991, ZEIDLER et al., 1997a und 1997b).

Trotz der im fortgeschrittenen Stadium meist sehr charakteristischen Symptomatik kann die eindeutige Diagnose nur *post mortem* gestellt werden. Bei der pathologischen Untersuchung an TSE erkrankter Individuen sind makroskopisch meist keine Veränderungen zu sehen, fokale oder generelle Atrophien des ZNS sind jedoch möglich. Histologisch ist eine charakteristische perineurale und intraneurale vakuoläre Degeneration feststellbar, die im fortgeschrittenen Stadium schwammartig aussieht und als *Status spongiosus* bezeichnet wird. Das Verteilungsmuster der schwammartigen Veränderungen ist ebenfalls abhängig von der erkrankten Spezies und der jeweiligen TSE-Form. Zusätzlich zeigen sich auch Pyknose, Chromatolyse und Astrozytose. Die letztgenannten Veränderungen sind jedoch nicht spezifisch für TSE sondern treten auch bei vielen anderen Erkrankungen des ZNS auf (WELLS, 1996; WELLS et al., 1987; WILL et al., 1996 und 2000).

Die histologische Diagnose kann durch immunhistologischen Nachweis des PrP^{Sc} im ZNS bestätigt werden (KITAMOTO et al., 1988; WELLS et al., 1998). Daneben ist auch der immunchemische Nachweis des Proteinase K-resistenten Teils des PrP^{Sc} (PrP 27-30) im ZNS mittels Western Blot oder Enzymimmuntest möglich (MOYNAGH und SCHIMMEL, 1999). Nicht routinemäßig durchgeführt wird der Nachweis der Scrapie-assoziierten Fibrillen mittels Elektronenmikroskopie oder Western Blot (BEEKES et al., 1995 und RUBINSTEIN, 1987).

2.1.3 Scrapie

Als Scrapie bezeichnet man die TSE der Schafe und Ziegen. Das Krankheitsbild der Scrapie wurde erstmals 1732 in England beschrieben (MCGOWAN, 1922, zitiert nach HÖRNLIMANN et al., 2001), weitere Beschreibungen aus Großbritannien und Deutschland folgten (PARRY, 1983). Von Europa ausgehend hat sich Scrapie in Folge des internationalen Schafhandels weltweit verbreitet und in vielen Beständen zu erheblichen Verlusten geführt. Derzeit tritt Scrapie in allen Erdteilen außer Australien und Neuseeland auf (MACDIARMID, 1996). In betroffenen Herden liegt die jährliche Scrapie-Mortalität zwischen 3 % und 20 %. Neben Schafen und Ziegen sind auch Moufflons und europäische Wildschafe empfänglich (WOOD et al., 1992). Scrapie ist natürlich und experimentell auf eine Vielzahl von Säugetieren übertragbar (COLLINGE, 2001). Man unterscheidet 20 verschiedene Scrapie-Varianten (BRUCE et al., 1991). In einigen natürlich infizierten Schafen konnten mehrere dieser Scrapie-Varianten gleichzeitig isoliert werden (FRASER, 1983).

Scrapie ist eine übertragbare Krankheit mit ausgeprägter genetischer Komponente. Insbesondere die Codons 136, 154 und 171 des *Prnp* haben einen Einfluss auf die Empfänglichkeit und die Inkubationszeit für Scrapie (BELT et al., 1995 und HUNTER et al., 1996). Nach bisherigem Erkenntnisstand sind Schafe, die Träger des Allels Valin₁₃₆Arginin₁₅₄Glutamin₁₇₁ (VRQ) oder Alanin₁₃₆Arginin₁₅₄Glutamin₁₇₁ (ARQ) sind, am empfänglichsten für Scrapie, wobei homozygote Träger empfänglicher sind als heterozygote Träger, während Schafe die das Allel Alanin₁₃₆Arginin₁₅₄Arginin₁₇₁ (ARR) homozygot tragen am wenigsten empfänglich sind (HUNTER et al., 1997a und 1997b; LÜHKEN et al., 2004; SABUNCU et al., 2003).

Natürlicher Hauptübertragungsweg für Scrapie ist die prä-, peri- und postnatale Infektion der Lämmer über Amnion, Amnionflüssigkeit und Plazenta bzw. Nachgeburt ihrer Mütter (PATTISON et al. 1972). Daneben können sich auch andere Schafe und Ziegen der Herde direkt oder indirekt über diese Infektionsquellen mit Scrapie infizieren (BROTHERSTON et al., 1968; DICKINSON et al., 1974 und PATTISON et al., 1972). Die Erregeraufnahme kann über den Digestionstrakt (HADLOW et al., 1982, PATTISON et al., 1972), die Konjunktiven (HARALAMBIEV, 1973) oder über Hautläsionen (TAYLOR et al., 1996) erfolgen. Nach der Infektion wird der Erreger, ohne erkennbare klinische Symptome, vorwiegend in den lymphoretikulären Geweben repliziert und ist dort während der Inkubationszeit nachweisbar.

Schließlich kommt es zu einer ascendierenden Infektion von Gehirn und Rückenmark (HADLOW et al., 1982). Nach Beginn der klinischen Phase breitet sich der Erreger auch in peripheres Nervengewebe, Knochenmark, Pankreas, Schilddrüse, Leber, Plazenta, Amnion und Amnionflüssigkeit aus (PATTISON et al., 1972). Die Inkubationszeit beträgt 2-5 Jahre, männliche und weibliche Schafe sind gleichermaßen betroffen (PARRY, 1983 und WINELAND et al., 1998). Durch die Schädigung des zentralen Nervensystems kommt es zu den unter 2.1.2 beschriebenen neuronalen Ausfallserscheinungen. Trotz guter Futteraufnahme magern die betroffenen Tiere ab. Die Erkrankung verläuft immer progressiv und endet zwei Wochen bis sechs Monate nach Auftreten der klinischen Symptome mit dem Tod (BOSSERS et al., 1996 und PARRY, 1983).

Die Diagnose kann bei erkrankten Schafen durch den Nachweis des PrP^{sc} in den Lymphfollikeln des Tonsillengewebes (SCHREUDER et al., 1996 und 1998; VAN KEULEN et al., 1996) und des dritten Augenlides (O'ROURKE et al., 1998 und 2000) erfolgen. Diese Untersuchung wird jedoch nicht routinemäßig durchgeführt. Im Regelfall erfolgt die Diagnose *post mortem* über die in 2.1.2 beschriebene histologische und immunhistologische Untersuchung des ZNS. Die schwammartigen Veränderungen des ZNS bleiben in vielen Fällen auf die graue Substanz von Stammhirn, Zwischenhirn, Thalamus, Medulla oblongata und Pons beschränkt, können jedoch im gesamten Gehirn und im Rückenmark auftreten (HADLOW, 1961 und ZLOTNIK, 1962).

2.1.4 Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)

Die TSE der Rinder wurde erstmals 1986 von Gerald Wells bei der histologischen Untersuchung eines Rindergehirns im britischen Veterinärlabor Weybridge festgestellt (WELLS et al., 1987). Gemäß retrospektiven Angaben praktizierender Tierärzte wurden jedoch bereits im Mai 1985 Rinder mit den klinischen Symptomen einer BSE beobachtet (ANDERSON et al., 1996; ANONYM, 1998). Da außer einem spekulativen Scrapie-ähnlichen Fall 1883 in Frankreich (SARRADET, 1883, zitiert nach HÖRNLIMANN et al., 2001) keine historischen Hinweise auf eine TSE-Erkrankung bei Rindern zu finden sind, wird BSE als eine neue Krankheit betrachtet (TAYLOR, 1991). Nach derzeitigem Wissensstand existiert beim Rind nur eine BSE-Form. Neben Rindern können auch exotische Wiederkäuer in zoologischen Gärten an BSE erkranken, experimentell ist BSE auf eine Vielzahl von

Säugetieren übertragbar (COLLINGE, 2001). Das BSE-Agens ist nicht identisch mit einer der bisher identifizierten Scrapie-Formen oder einer anderen, bis zum Zeitpunkt des ersten Auftretens von BSE bekannten, TSE-Form (BRUCE, 1996). Aus diesem Grund ist unklar, ob BSE ursprünglich der Erreger einer anderen TSE-Form, insbesondere Scrapie wird hier in Betracht gezogen, war, der sich vor oder nach dem Übergang auf das Rind verändert hat, oder ob der Erreger symptomlos in der Rinderpopulation zirkuliert hat.

Die Infektion der Tiere erfolgt durch orale Aufnahme erregerhaltigen Materials (ANDERSON et al., 1996; BRADLEY, 1996; WELLS, 1994 und 1996), wobei die Verfütterung ungenügend verarbeiteter und erhitzter Tiermehle in Großbritannien zur endemischen Ausbreitung der BSE geführt hat (DAHMS, 1997; FORD, 1996; TAYLOR, 1991; WILESMITH et al., 1988 und 1991). Im Jahr 1988 wurde in Großbritannien bei 2514 Rindern BSE diagnostiziert. Daraufhin wurde ein Verfütterungsverbot von Tiermehlen an Wiederkäuer erlassen (Feed-Ban SI 1988/1039 vom 18.07.1988). Dennoch wurde, wegen der langen Inkubationszeit, der Höhepunkt der Epidemie in Großbritannien erst 1992, also vier Jahre nach dem Erlass des Tiermehlverfütterungsverbot, erreicht: es wurde bei 37 280 Rindern BSE diagnostiziert. Danach sank die Inzidenz und die Epidemie konnte fast zum verschwinden gebracht werden: 2008 wurde nur noch bei 37 Rindern BSE diagnostiziert (Angaben Office International des Épizooties, www.oie.int). In Deutschland ist der erste BSE-Fall bei einem einheimischen Rind im Jahr 2000 festgestellt worden, die jährliche Inzidenz schwankt bisher zwischen 1 und 20 Fällen pro Million Rinder über 24 Monate. Der späte Inzidenzanstieg in Deutschland und anderen Ländern ist vermutlich auf Einschleppung des Erregers mit kontaminiertem Tiermehl oder infizierten Jungtieren und interner Rezyklierung zu erklären, da in diesen Ländern das Tiermehlverbot erst später effektiv umgesetzt wurde (HÖRNLIMANN et al., 1994; OBERTHÜR, 2004). Die Abbildungen 1 und 2 zeigen eine Übersicht über die Zahl der BSE-Fälle in der EU, Großbritannien und Deutschland.

Zu einem geringen Prozentsatz erfolgt die Übertragung von BSE auch maternal (DONNELLY et al., 1997). Bisher sind keine statistisch ausreichenden Hinweise auf eine genetisch bedingte erhöhte oder verminderte BSE-Empfänglichkeit bekannt (DONNELLY et al., 1997 und WIJERATNE und CURNOW, 1990).

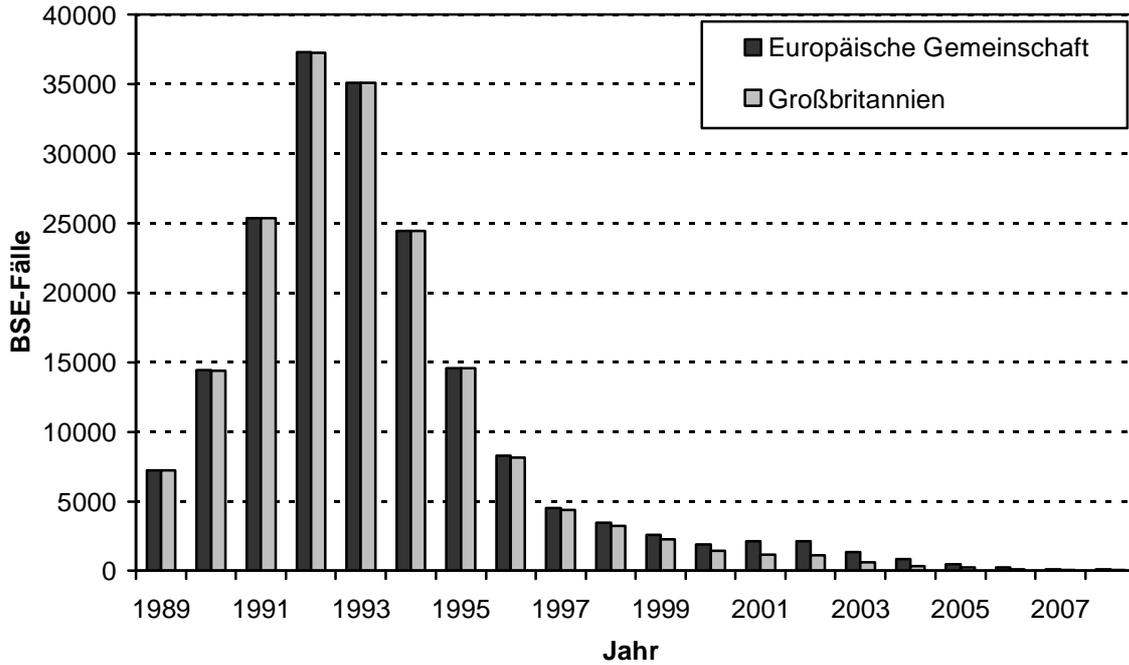


Abbildung 1: Bestätigte BSE-Fälle in der Europäischen Union insgesamt und im Vereinigten Königreich Großbritannien (Datenquelle: Office International des Épizooties: Stand 05.05.2009, www.oie.int)

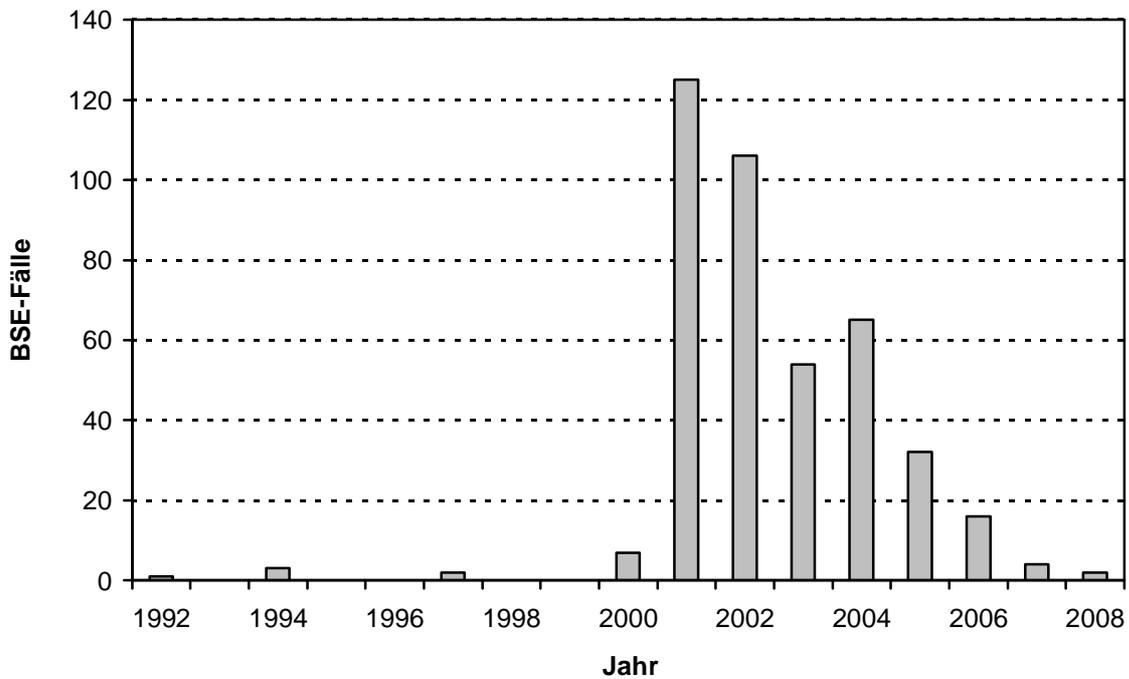


Abbildung 2: Bestätigte BSE-Fälle in Deutschland (Datenquelle: Office International des Épizooties: Stand 05.05.2009, www.oie.int)

Die Inkubationszeit beträgt bei experimentell infizierten Tieren nach oraler Erregeraufnahme 34-38 Monate (ANDERSON et al., 1996; BRADLEY, 1996 und WELLS, 1996). Nach Auswertung der bisherigen natürlichen BSE-Fälle, mittels verschiedener statistischer Modelle, kann die Inkubationszeit jedoch 2-10 Jahre betragen (DONNELLY et al., 1997).

Ebenso wie Scrapie verläuft auch BSE über mehrere Wochen bis Monate progressiv und endet immer letal. Zu den klinischen Symptomen gehören die unter 2.1.2 beschriebenen neuronalen Ausfallserscheinungen, reduzierte Milchleistung und Abmagerung trotz guter Futteraufnahme (BRAUN et al., 1998; SCHICKER, 1997; WELLS et al., 1987 und WILESMITH und RYAN, 1992). Labordiagnostisch sind weder Blut noch Liquor verändert (JOHNSON und WHITAKER, 1988; LEE und HARRINGTON (1997); ROBEY et al., 1998; SCHICKER, 1997 und SCOTT et al., 1990).

Für BSE existiert bisher noch kein anerkanntes und ausreichend evaluiertes Testverfahren zur Diagnose am lebenden Tier, so dass die Diagnose nur *post mortem* gestellt werden kann (s. 2.1.2). Im Gegensatz zu Scrapie ist das Lokalisationsmuster der vakuolären Degeneration im ZNS BSE-erkrankter Tiere konstant. Die Läsionen sind immer im Hirnstamm, der *Medulla oblongata* (bes. *Nucleus solitarius* und *Nucleus spinalis*) und den Dorsalhörnern des Rückenmarks der oberen Zervikalsegmente zu finden (WELLS, 1996 und WELLS et al., 1987).

2.1.5 Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD)

Unter der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD = new variant Creutzfeldt-Jakob-Disease) versteht man eine der vier CJD-Formen, die zu den TSE des Menschen gehören. Die CJD allgemein wurde bereits 1920/21 von CREUTZFELDT, 1920, und JAKOB, 1921, unter dem Namen „Spastische Pseudosklerose“ beschrieben, während die nvCJD erstmals 1996 von WILL et al. beschrieben wurde. Letztere unterscheidet sich durch das klinische Erscheinungsbild, die Erkrankungsdauer, die diagnostischen Möglichkeiten und die pathologischen Befunde von der sporadisch oder idiopathisch auftretenden CJD (sCJD), der familiären CJD (fCJD) und der iatrogen erworbenen CJD (iCJD). Als sCJD bezeichnet man spontan auftretende CJD-Fälle, bei denen sich keine Infektionsquelle identifizieren lässt. Dies trifft auf 80-90 % aller CJD-Fälle zu und die jährliche Inzidenz liegt weltweit annähernd

gleich bei 0,3-1,3 Fällen pro 1 Million Menschen (DELASNERIE-LAUPETRE et al., 1995). Mit fCJD wird die autosomal-dominant vererbte Form der CJD bezeichnet. In den betroffenen Familien sind verschiedene Punkt- und Insertionsmutationen des *Prnp* als Ursache identifiziert worden (HÖRNLIMANN et al., 2001). Unter iCJD versteht man die unabsichtlich durch medizinische Eingriffe übertragenen Infektionen mit CJD. Bisher sind mehrere hundert Fälle der iCJD publiziert worden (BELAY und SCHÖNBERGER, 2005; BUDKA, 1998). Die häufigste Verbreitungsart war die parenterale Verabreichung von kontaminiertem Wachstumshormon, welches aus Leichenhypophysen extrahiert worden war (BROWN, 1988).

Die nvCJD ist in Großbritannien, einschließlich der Verdachtsfälle, bisher bei 168 Patienten diagnostiziert worden, 115 der Fälle sind auch durch pathologische Untersuchung bestätigt worden, 4 Patienten leben noch (Datenquelle: CJD Surveillance Unit, Edinburgh: Stand 04.05.2009, www.cjd.ed.ac.uk/figures.htm). Vereinzelt sind auch Fälle in anderen europäischen Ländern (Irland, Italien, Niederlande, Frankreich, Spanien, Portugal), Amerika (USA, Kanada) und Asien (Japan) beschrieben worden (BELAY und SCHÖNBERGER, 2005 und Nationales Referenzzentrum für die Surveillance transmissibler spongiformer Enzephalopathien am ZNP München: Stand 03.05.2009, www.nrz-creutzfeld-jakob.de). Auf Grund der geringen Fallzahlen können viele Daten bisher nur geschätzt werden. So geht man derzeit davon aus, dass die durchschnittliche Inkubationszeit mindestens 10 Jahre beträgt. Das Durchschnittsalter der an nvCJD erkrankten Patienten liegt mit 29 Jahren unter dem der sCJD-Patienten mit 66 Jahren. Bisher sind nur Personen betroffen, die an Codon 129 homozygot den Genotyp Methionin tragen (ZEIDLER et al., 1997c), es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass Patienten anderer Genotypen nach einer längeren Inkubationszeit auch an nvCJD erkranken könnten (BEGHI et al., 2004 und LAPREVOTTE und HENAUT, 2003).

Das regionale und zeitliche Auftreten dieser Erkrankung weist auf einen kausalen Zusammenhang zwischen BSE und nvCJD hin. Experimentell konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden, da mit BSE infizierte Makaken eine der nvCJD des Menschen sehr ähnliche Spongiforme Enzephalopathie entwickeln (LASMÉZAS et al., 1996), elektrophoretische Analysen von PrP^{Sc} aus nvCJD-Patienten und BSE-infizierten Rindern identische Muster zeigen (COLLINGE et al., 1996) und sowohl Inkubationszeit als auch pathologische Läsionsprofile in BSE- und nvCJD-infizierten Mäusen identisch sind (BRUCE et al., 1997; HILL et al., 1997a und SCOTT et al., 1999). Epidemiologisch ist ein Zusammenhang bisher

nicht eindeutig. Zwar stieg die Gesamtinzidenz der CJD in Ländern, die Überwachungsprogramme einführen (z. B. Großbritannien, Frankreich, Deutschland) leicht an (COUSENS et al., 1997 und LAPREVOTTE und HENAUT, 2003), doch ist diese, trotz unterschiedlicher Verläufe der BSE-Epidemie in diesen Ländern, identisch und vermutlich auf die erhöhte Wachsamkeit und Sensibilität zurückzuführen (WILL et al., 1998). Trotzdem geht man derzeit davon aus, dass die nvCJD durch orale Aufnahme hochgradig BSE-kontaminierter Lebensmittel verursacht wird. Eine Mutation des *Prnp* konnte bisher nicht festgestellt werden, so dass eine hereditäre Ursache weitestgehend ausgeschlossen werden kann (WILL et al., 2000).

Eine natürliche Übertragung der nvCJD auf andere Individuen oder Spezies ist nicht bekannt. Experimentell ist die nvCJD auf Mäuse (BRUCE et al., 1997) und Makaken (LASMÉZAS et al., 1996) übertragbar. Auch die anderen Formen der CJD sind experimentell übertragbar (BROWN et al., 1994 und GIBBS et al., 1968).

Bei allen vier Formen der CJD zeigen klinisch erkrankte Patienten neben den unter 2.1.2 beschriebenen neurologischen Ausfallserscheinungen eine schnell fortschreitende Demenz (ZEIDLER et al., 1997a und 1997b). Das klinische Krankheitsbild der nvCJD wird jedoch nicht von den oben beschriebenen neurologischen Symptomen, sondern von psychiatrischen Symptomen in Form von Apathie, Depression, Paranoia und Angstzuständen sowie sensorischer Schmerzsymptomatik in Form von Par- und Dysästhesie dominiert. (WILL et al., 1996 und 2000; ZEIDLER et al., 1997a und 1997b). Zudem ist der Krankheitsverlauf der nvCJD gegenüber den anderen Varianten verlängert, die mittlere Überlebenszeit ab dem ersten Auftreten von klinischen Symptomen beträgt hier 14 Monate, während sie bei den anderen Varianten nur 4 Monate beträgt.

Bezüglich der Diagnose finden sich bei der Mehrheit der an nvCJD erkrankten Patienten hinweisende Veränderungen im Liquor (HSICH et al., 1996; VAN EVERBROECK et al., 2003; ZEIDLER et al., 1997a und ZERR et al., 1998 und 2000), bei der Magnetresonanztomographie des ZNS (HAIK et al., 2002; SCHWANINGER et al., 1997 und ZEIDLER et al., 2000) oder im Elektroenzephalogramm (ZERR et al., 2000). Keine dieser Veränderungen ist jedoch durchgängig nachweisbar oder diagnostisch eindeutig (HSICH et al., 1996; LEMSTRA et al., 2000; ZERR et al., 1998). Die nvCJD kann auch durch die immunhistologische und -chemische Untersuchung von Biopsiematerial aus den

Tonsillen und des Appendix diagnostiziert werden, das Verfahren ist jedoch noch nicht ausreichend evaluiert (HILL et al., 1997b und HILTON et al., 1998). Eine gesicherte Diagnose kann nur *post mortem* durch die histologische und immunhistologische Untersuchung des ZNS gestellt werden (s. 2.1.2). Diese Untersuchung kann auch an Hirnbiopsien durchgeführt werden, jedoch ist hier nur ein positiver Befund aussagekräftig und die Operation mit Risiken für den Patienten und das durchführende Personal verbunden. Bei der nvCJD treten neben den beschriebenen neuropathologischen Befunden auch Ablagerungen von floriden Plaques auf (WILL et al., 1996 und 2000).

2.2 Rechtliche Regelungen zu den TSE

Die Rechtlichen Regelungen bezüglich der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien betreffen drei Themenkreise: die Bekämpfung, die Überwachung und die Prävention. Die meisten Regelungen diesbezüglich befinden sich in der „Verordnung 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22.05.2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien“ (VO (EG) 999/2001, „TSE-Verordnung“), zuletzt geändert durch die Verordnungen (EG) 163/2009 (vom 26.02.2009) und 220/2009 (vom 11.03.2009). Unter anderem werden in dieser Verordnung Regelungen für die Einstufung von Mitgliedsstaaten und Drittländern in drei BSE-Status-Klassen vorgeschrieben: vernachlässigbares BSE-Risiko, kontrolliertes BSE-Risiko, unbestimmtes BSE-Risiko (Artikel 5 und Anhang II). Die Festlegung des Status erfolgt nach einer Risikoanalyse des jeweiligen Landes und der durch dieses Land getroffenen Überwachungs- und Bekämpfungsmaßnahmen. In Abhängigkeit vom jeweiligen Status gelten unterschiedliche Vorschriften bezüglich Prävention, Bekämpfung und Überwachung. Der Status der bisher klassifizierten Länder ist durch die „Entscheidung der Kommission (2007/453/EG) zur Festlegung des BSE-Status von Mitgliedsstaaten, Drittländern oder Gebieten davon nach ihrem BSE-Risiko“ vom 29.06.2007, zuletzt geändert am 29.09.2008, bekannt gegeben worden. Deutschland hat den Status „kontrolliertes BSE-Risiko“.

Insbesondere die Verordnung (EG) 999/2001 ist mehrfach geändert worden, entsprechend dem wissenschaftlichen Erkenntnisstand und der sich wandelnden Risikobewertung. Weitere Änderungen sind zu erwarten, so dass an dieser Stelle auf die jeweils aktuelle Version der EG-Gesetzgebung unter der Adresse www.eur-lex-europa.eu/de/index.html verwiesen sei.

2.2.1 Bekämpfung

Zur Bekämpfung der TSE gehört die Anzeigepflicht aller TSE-Fälle und -Verdachtsfälle (VO (EG) 999/2001, Artikel 11; Verordnung über Anzeigepflichtige Tierseuchen) sowie die Tötung aller amtlich als TSE-verdächtig eingestuften Tiere bzw. aller Tiere, die auf Grund eines amtlich bestätigten TSE-Falles auch an einer TSE erkrankt sein könnten (VO (EG) 999/2001, Artikel 12, 13 und Anhang VII). In der Regel handelt es sich hierbei um die Keulung der Geburts- und Fütterungskohorte. Alle zur TSE-Tilgung getöteten Tiere und die daraus hergestellten Produkte müssen durch Verbrennen unschädlich beseitigt werden (ebenda und VO (EG) 1774/2002, Art. 4). Die Diagnose eines amtlichen TSE-Verdachtsfalles darf nur durch histopathologische Untersuchung oder, falls dies auf Grund einer Autolyse des Materials nicht möglich ist, durch Immunzytochemie, Immunblotting oder Elektronenmikroskopie und nur in dafür zugelassenen Labors durchgeführt werden (VO (EG) 999/2001, Artikel 19, 20 und Anhang X).

2.2.2 Überwachung

Die Überwachung der TSE erfolgt sowohl passiv, durch Untersuchung aller klinischen Verdachtsfälle (s. oben), als auch aktiv, durch teils flächendeckende, teils repräsentative Untersuchung aller geschlachteten und getöteten Rinder, Schafe und Ziegen (VO (EG) 999/2001 Artikel 6 und Anhang III). Nach dieser Verordnung müssen alle Rinder mit einem Alter über 30 Monaten, die für den menschlichen Verzehr oder im Rahmen eines Seucheneradikationsprogrammes ohne klinischen Symptome geschlachtet werden, und alle Rinder über 24 Monaten, die verenden, not- oder nicht für den menschlichen Verzehr geschlachtet werden, auf BSE untersucht werden. In der Bundesrepublik Deutschland gilt darüber hinaus die „Verordnung zur fleischhygienerechtlichen Untersuchung von geschlachteten Rindern auf BSE“ vom 18.09.2002, zuletzt geändert am 11.12.2008, die die Untersuchung aller geschlachteten Rinder, Büffel und Bisons, die nur im Inland gelebt haben, erst ab einem Alter von 48 Monaten vorsieht. Für Schafe und Ziegen gelten bezüglich der Untersuchung geschlachteter Tiere Regelungen über repräsentative Stichproben zur Untersuchung auf Scrapie (VO (EG) 999/2001, Artikel 6 und Anhang III). Außerdem ist für alle amtlich bestätigten, mit Scrapie infizierten Schafe die Genotypisierung vorgeschrieben (ebenda).

Die Untersuchungen zur Überwachung der TSE dürfen nur nach vorgeschriebener Probenentnahme, mit zugelassenen Schnelltests und in dafür zugelassenen Labors erfolgen (VO (EG) 999/2001 Artikel 20 und Anhang X). Als Schnelltest sind verschiedene immunchemische Testsysteme zum Nachweis des proteaseresistenten PrP zugelassen (ebenda). Bei positivem oder zweifelhaftem Ergebnis gilt der TSE-Verdacht und das weitere Vorgehen erfolgt wie unter den Bekämpfungsstrategien beschrieben.

2.2.3 Prävention

Zur Prävention eines Eintrags TSE-kontaminierten Materials in die Nahrungskette wurden zahlreiche Maßnahmen ergriffen. Hierzu zählen das Verbot der Verfütterung bestimmter tierischer Proteine an Nutztiere, Zuchtprogramme, das Verbot des Inverkehrbringens bestimmter tierischer Gewebe und Vorschriften für deren unschädliche Beseitigung. Darüber hinaus wurden Regelungen zur Herstellung bestimmter tierischer Produkte, zur Betäubung und Tötung von Schlachttieren sowie für den Handel von Tieren und Futtermitteln tierischen Ursprungs im innergemeinschaftlichen Verkehr der EU und mit Drittländern festgelegt (VO (EG) 999/2001; VO (EG) 1774/2002; Entscheidung des Rates 1999/534/EG).

An Nutztiere dürfen mit Ausnahme von Milch, Milcherzeugnissen, Eiern, Eierzeugnissen sowie aus Nicht-Wiederkäuern gewonnene Gelatine und bestimmte hydrolysierte Proteine keine tierischen Proteine verfüttert werden. Bei nicht wiederkäuenden Nutztieren ist die Verfütterung von Fischmehl, Blutprodukten aus Nicht-Wiederkäuern, Di- und Tricalciumphosphat erlaubt, wenn die erforderlichen Herstellungsbestimmungen eingehalten werden. Fleischfressende Nutztiere sind von diesen Verboten ausgenommen (VO (EG) 999/2001, Artikel 7 und Anhang IV). Zur Herstellung von Futtermitteln tierischer Herkunft dürfen nur Tiere verwendet werden, die nach der Schlachtung als geeignet zum menschlichen Verzehr beurteilt wurden (VO (EG) 1774/2002). Für die Tiermehlherstellung wurden die Herstellungsbedingungen verschärft (mind. 133 °C, 20 Minuten, 3 bar: Entscheidung des Rates 1999/534/EG).

Gewebe, für die während der Inkubationszeit und der klinischen Erkrankung ein relativ großes Risiko besteht TSE-Erreger zu enthalten (Spezifiziertes Risikomaterial = SRM),

dürfen nicht in den Verkehr gelangen und müssen unschädlich entsorgt werden. In den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union sind die Eingeweide von Duodenum bis Rectum, das Gekröse und die Tonsillen aller Rinder, der Schädel, ohne Unterkiefer, jedoch mit Gehirn und Augen sowie das Rückenmark aller Rinder über 12 Monate, die Wirbelsäule ohne Schwanzwirbel, Dorn- und Querfortsätze, jedoch mit Spinalganglien aller Rinder über 30 Monate, die Milz und das Ileum aller Schafe und Ziegen, der Schädel mit Gehirn, Tonsillen und Augen sowie das Rückenmark aller Schafe und Ziegen über 12 Monate als SRM klassifiziert. Die SRM müssen im Schlachthof bzw. im Zerlegebetrieb separiert und farblich markiert werden. Die unschädliche Beseitigung erfolgt mit oder ohne Vorbehandlung durch Verbrennung oder Vergrabung auf zugelassenen Landflächen (VO (EG) 999/2001, Artikel 8, Anhang V und VO (EG) 1774/2002 Art. 4).

Zu den tierischen Erzeugnissen, deren Herstellung reglementiert wurde, gehören Separatorenfleisch, Kopffleisch, Gelatine, Dicalciumphosphat und ausgelassenes Fett. Zum Beispiel darf die Gewinnung von Separatorenfleisch nicht unter Verwendung von Rinder-, Schaf- und Ziegenknochen erfolgen, während für Kopffleisch Bestimmungen bezüglich der Gewinnung und der Untersuchung von Stichproben zur Kontrolle auf ZNS bestehen (VO (EG) 999/2001, Artikel 8 und Anhang V).

Zur Tötung betäubter Rinder, Schafe und Ziegen ist die Zerstörung des ZNS durch Einführung eines konischen Stabes in die Schädelhöhle nicht zulässig (VO (EG) 999/2001, Artikel 8 und Anhang V).

Die Regelungen für den Handel mit lebenden Tieren und Produkten tierischen Ursprungs zwischen Ländern der EU untereinander oder mit Drittländern sehen begleitende Gesundheitsbescheinigungen und von der BSE-Statusklasse abhängige Voraussetzungen vor, die von den Herkunftsbetrieben erfüllt werden müssen. So dürfen zum Beispiel Rinder aus einem Land mit unbestimmtem BSE-Risiko nur in ein anderes Land verbracht werden, wenn sie dauerhaft gekennzeichnet sind, so dass Muttertier und Herkunftsbestand ermittelbar sind, wenn sie mindestens zwei Jahre nach der tatsächlichen Durchführung des Verfütterungsverbots oder nach dem Tag der Geburt des letzten einheimischen an BSE erkrankten Rindes geboren worden sind und sich nachweislich nur in Betrieben aufgehalten haben, die seit mindestens sieben Jahren BSE-frei sind (VO (EG) 999/2001, Artikel 15-18 und Anhänge VIII- IX).

2.3 Nachweisverfahren für Spezifiziertes Risikomaterial (SRM)

Wie Untersuchungen der staatlichen Lebensmittelüberwachung innerhalb der Europäischen Union, veröffentlicht im Rahmen des „Rapid Alert Systems“ (www.europa.eu.int/comm/food/rapidalert/archive_eu.html), zeigen, ist trotz des Verbotes zumindest sporadisch mit einer Kontamination von Lebensmitteln tierischen Ursprungs mit SRM zu rechnen (z.B. 2005/22, 2005/29, 2005/34). Zudem sind möglicherweise auch Futtermittel für nicht Lebensmittel liefernde Tiere mit SRM kontaminiert. Aus diesem Grund ist es notwendig geeignete Nachweisverfahren für die verschiedenen SRM zur Verfügung zu haben.

Unter den SRM ist insbesondere das ZNS von Bedeutung, da es bis zu 95 % der Gesamtinfektiösität eines an BSE erkrankten Rindes trägt und es sowohl durch vorsätzliche Verwendung als auch durch unbeabsichtigte Kontamination in Lebensmittel gelangen kann. Mögliche unbeabsichtigte Kontaminationswege sind die Betäubung der Tiere durch Bolzenschuss und die Längshalbierung des Schlachtkörpers. Bei der Betäubung mittels Bolzenschuss, besonders bei mit Druckluft betriebenen Anlagen, kann es zur Verteilung von ZNS-Fragmenten über Blutgefäße in Herz, Lunge und andere Organe kommen (ANIL et al., 1999, 2001, 2002; BAUER et al., 1996; COORE et al., 2004; GARLAND et al., 1996; LOVE et al., 1999 und 2000; PRENDERGAST et al., 2003 und 2004; SCHMIDT et al., 1999a). Durch die Längshalbierung der Schlachtkörper wird der Wirbelkanal eröffnet und das Rückenmark verletzt, so dass es mit der Säge über die Schnittfläche verteilt werden kann (HELPS et al., 2002 und 2004; PRENDERGAST et al., 2003 und 2004). Vorsätzlich kann ZNS verwendet werden, um durch seinen hohen Sphingo- und Phospholipidgehalt eine emulgatorische Wirkung in Fleischerzeugnissen, z. B. Leberwürsten zu erzielen. Vor allem da ZNS kostengünstig und in ausreichender Menge zur Verfügung steht (DEALLER und LACEY, 1990; HILDEBRANDT et al., 2001; VERDRAEGER 1996 und 1997).

Bisher beschriebene Verfahren zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen basieren auf dem physikalisch-chemischen Nachweis bestimmter Fettsäuren bzw. Lipide, dem histologischen Nachweis bestimmter Zellstrukturen, dem immunologischen Nachweis bestimmter Markerproteine oder dem molekularbiologischen Nachweis bestimmter mRNA. Da das Thema dieser Arbeit die Entwicklung und Charakterisierung eines enzymimmunochemischen Verfahrens zum Nachweis von ZNS-Material war, wird im

Folgendes auf publizierte Verfahren zum Nachweis von ZNS unter besonderer Berücksichtigung der immunologischen Untersuchungsmethoden eingegangen. Für andere SRM als ZNS beschränken sich die Untersuchungsverfahren auf den nur für begrenzt homogenisierte Proben anwendbaren histologischen Nachweis von Milz, Darm, Tonsillen und Auge (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch: L 06.00 13) und den physikalisch-chemischen Nachweis von Fettsäuren zur Identifizierung der Milz (NOTI et al., 2002).

2.3.1 Immunologische Nachweisverfahren

Den immunologischen Nachweisverfahren für ZNS-Material gemeinsam ist, dass ein bestimmtes Protein als Markersubstanz durch spezifische Antikörper detektiert wird. Sie unterscheiden sich jedoch bezüglich der verwendeten Markerproteine und der verwendeten Testsysteme, wobei bisher immunhistologische Verfahren, Enzymimmuntests und immunchromatographische Verfahren (Western-Blot) beschrieben wurden.

2.3.1.1 Antikörper gegen ZNS-Markerproteine

Als Marker für den immunologischen Nachweis von ZNS können sowohl neuronale als auch gliale Proteine verwendet werden. Grundsätzliche Anforderungen an derartige Markerproteine sind: eine primäre Lokalisation im ZNS, eine ausreichend hohe und konstante Konzentration im ZNS und eine möglichst hohe Stabilität gegenüber den bei der Lebensmittelbe- und -verarbeitung eingesetzten Verfahren (z.B. Temperatur).

Von den neuronalen Proteinen sind mehrere Enzyme, Bestandteile des Zytoskeletts und Membranproteine auf ihre Eignung als Marker zum ZNS-Nachweis in Fleischerzeugnissen überprüft worden. Aus der Gruppe der Enzyme sind die Neuronen Spezifische Enolase (NSE) und die Tyrosin-Hydroxylase (TYR) in Betracht gezogen worden. Die NSE ist ein neuronenspezifisches Enzym der Glycolyse während die TYR als Enzym an der Katecholaminsynthese beteiligt ist. Zu den Bestandteilen des neuronalen Zytoskeletts, die auf ihre Eignung zum Nachweis von ZNS überprüft wurden, zählen das Neurofilament (NF) und das Tau-Protein (TAU). Das NF ist das Intermediärfilament der Neuronen und das TAU ein

an Mikrotubuli der Nervenzellen assoziiertes Protein. Von den Membranproteinen sind das Glutamat-2-Rezeptor-Protein der Synapse und Synaptophysin als Membranprotein der synaptischen Vesikel überprüft worden.

Als gliale Marker sind das Saure Gliafaserprotein (GFAP = glial fibrillary acidic protein) und das basische Myelinprotein (MBP = myelin basic protein) in Betracht gezogen worden. GFAP ist Hauptbestandteil der Intermediärfilamente in Astrozyten und somit Teil des Zytoskeletts während MBP ein Bestandteil des Myelins in zentralen und peripheren Gliazellen ist.

Die bisher in verschiedenen Untersuchungsverfahren auf ihre Eignung zum Nachweis von ZNS in Lebensmitteln überprüften Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt. Bei den bisherigen Untersuchungen zeigten die auf ihre Tierart- oder Gewebespezifität gegen bovines ZNS überprüften Antikörper jeweils Kreuzreaktionen mit ZNS anderer Spezies oder anderen Geweben (HERDE et al., 2005 und HUGHSON et al., 2003). Die jeweilige Eignung der Antikörper für die verschiedenen Verfahren wird jeweils bei der Beschreibung der Verfahren genannt.

2.3.1.2 Testsysteme

2.3.1.2.1 Immunhistologische Nachweisverfahren

Zur immunhistologischen Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen werden mit Formalin (KELLEY et al., 2000 und TERSTEEG et al., 2002) oder Bouin-Medium (HERDE et al., 2005) fixierte Paraffinschnitte (HOSSNER et al., 2006; KELLEY et al., 2000 und TERSTEEG et al., 2002) oder Gefrierschnitte (LÜCKER et al., 1999 und 2000; WENISCH et al., 1999) verwendet. Die Schnitte werden mit Antikörpern, die gegen ZNS-spezifische Proteine gerichtet sind, inkubiert. Über konjugierte Sekundärantikörper und ein Enzym-Chromogen-System werden die gebundenen Primärantikörper sichtbar gemacht. Im Lichtmikroskop sind die an das Gewebe gebundenen Antikörper als farbige Punkte erkennbar (Farbe je nach verwendetem Chromogen).

Tabelle 2: Antikörper, die mittels verschiedener Untersuchungsmethoden (Immunhistologie = IH, Enzymimmunoassay = EIA, Western Blot = WB) auf ihre Eignung zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen überprüft worden sind

Marker- protein	Antikörper	verwendetes Untersuchungsverfahren			Referenz
		IH	EIA	WB	
GFAP	monoklonal, Klon G-A-5 (BioGenex, USA)	x			KELLEY et al. (2000)
	monoklonal (Maus) (Roche/Boehringer, Deutschland)	x		x	LÜCKER et al. (2000)
	monoklonal, GF 500 (Biologo, Deutschland)	x		x	HERDE et al. (2005)
	monoklonal, Klon E008 (Camon, Deutschland)			x	LÜCKER et al. (2000) HORLACHER (2002)
	monoklonal, BBS/NC/IV/H14 (Dako, Deutschland)			x	OVERHOFF und LÜCKER (2003)
	monoklonal (Boehringer, USA)				SCHMIDT et al. (1999b, 2001)
	monoklonal (ICN Biomedical, USA)		x		RENCOVA (2005)
	polyklonal, Kaninchen (Dako, Deutschland)	x		x	AUPPERLE et al. (2002)

Fortsetzung Tabelle 2:

Marker- protein	Antikörper	verwendetes Untersuchungsverfahren			Referenz
		IH	EIA	WB	
GFAP	polyklonal (Biotrend, Deutschland)	x			TERSTEEG et al. (2002)
	polyklonal, Kaninchen (Dako, USA)		x		SCHMIDT et al. (1999b, 2001)
MBP	monoklonal, Maus (Bohringer, Deutschland)	x		x	AUPPERLE et al. (2002)
	monoklonal, MBP129 (Biologo, Deutschland)	x		x	HERDE et al. (2005)
	monoklonal, 7HM (Medac GmbH, Deutschland)			x	OVERHOFF und LÜCKER (2003)
	monoklonal, (Sigma, USA)		x		RENCOVA (2005)
	polyklonal, (Biogenesis, Großbritannien)	x			TERSTEEG et al. (2002)
	monoklonal SM1455 (Acris, Deutschland)			x	HOLTBECKER und STOLLE (2005)
NF	monoklonal, Maus (Chemicon, Deutschland)	x		x	AUPPERLE et al. (2002)
	monoklonal, Klon 2F11 (BioGenex, USA)	x			KELLEY et al. (2000)

Fortsetzung Tabelle 2:

Marker- protein	Antikörper	verwendetes Untersuchungsverfahren			Referenz
		IH	EIA	WB	
NF	monoklonal, NR4 (Chemicon, Deutschland)			x	OVERHOFF und LÜCKER (2003)
	monoklonal, (Sigma, USA)		x		RENCOVA (2005)
	polyklonal, (Sigma, USA)		x		RENCOVA (2005)
	monoklonal, (Aurora, USA)	x			TERSTEEG et al. (2002)
NSE	monoklonal, Maus (Dako, Deutschland)	x			AUPPERLE et al. (2002)
	monoklonal, Klon BBS/NC/VI-H14 (Dako, Deutschland)			x	HORLACHER (2002) LÜCKER et al. (1999, 2000)
	monoklonal, Maus (Camon, Deutschland)	x			LÜCKER et al. (1999) WENISCH et al. (1999)
	monoklonal, BF2 (Dako, Deutschland)			x	OVERHOFF und LÜCKER (2003)
	monoklonal, (Dako, Dänemark)	x			TERSTEEG et al. (2002)

Fortsetzung Tabelle 2:

Marker- protein	Antikörper	verwendetes Untersuchungsverfahren			Referenz
		IH	EIA	WB	
Synaptophysin	monoklonal, Klon SY 38 (Chemicon, Deutschland)	x		x	KELLEY et al. (2000) OVERHOFF und LÜCKER (2003)
Syntaxin 1B	monoklonal, Klon 78.2 (Synaptic Systems, Deutschland)		x		ANIL et al. (1999) LOVE et al. (2000)
	monoklonal, A10C (Chemicon, Deutschland)			x	OVERHOFF und LÜCKER (2003)
	polyklonal, Kaninchen (Synaptic Systems, Deutschland)		x		ANIL et al. (1999) LOVE et al. (2000)

Mit den meisten, der für den immunhistologischen Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen untersuchten Antikörpern, traten Kreuzreaktionen mit peripherem Nervensystem oder unspezifische Reaktionen mit ZNS-freiem Material auf. Des Weiteren reagierten die Antikörper, soweit darauf untersucht, auch mit ZNS anderer Tierarten, insbesondere Schwein, und/oder zeigten unspezifische Reaktionen bei der Untersuchung erhitzter Proben. Aus diesem Grund schlugen HERDE et al. (2005) die Kombination der immunhistologischen Untersuchung auf MBP und GFAP vor, da beide Proteine auch in erhitzten Erzeugnissen nachweisbar waren, GFAP keine Kreuzreaktionen mit peripherem Nervensystem zeigte und MBP bovines Nervengewebe spezifisch nachwies. Die Nachweisgrenze beträgt bei immunhistologischen Untersuchungen zwischen 0,25 % (HOSSNER et al., 2006) und 1 %

ZNS (TERSTEEG et al., 2002). Die immunhistologische Untersuchung ist immer mit einem hohen Zeit-, Arbeits- und Materialaufwand verbunden.

Grundsätzlich ist auch der rein histologische Nachweis von ZNS möglich, durchgeführt nach der Amtlichen Sammlung für Untersuchungsverfahren (L 06.00 13) oder einer modifizierten Methode (KELLEY et al., 2000; WENISCH et al., 1999). Mit diesem Verfahren kann ZNS jedoch nur in Form morphologisch intakter Stücke ab einer Größe von 2-3 mm nachgewiesen werden und zudem kann mittels dieser Methode das Gewebe hinsichtlich Tierart und Alter nicht differenziert werden. (KELLEY et al., 2000; LÜCKER et al., 1999; WENISCH et al., 1999). Wie die immunhistologische ist auch die histologische Untersuchung sehr zeit-, arbeits- und materialaufwändig.

2.3.1.2.2 Enzymimmuntests (EIA)

Bisher zum Nachweis von ZNS in Lebensmitteln entwickelte oder überprüfte EIA-Verfahren beruhen auf dem Prinzip des Sandwich-EIA oder des indirekten EIA. Für einen Sandwich-EIA werden Mikrotiterplatten mit Antikörperlösungen (Fängerantikörper) beschichtet. Nach Inkubation der Platten mit Proteinstandardlösungen bzw. Probenextrakten wird ein zweiter Antikörper (Detektionsantikörper) zugegeben. Dieser ist entweder enzymmarkiert oder wird durch Zusatz eines weiteren enzymmarkierten Antikörpers „markiert“. Die Detektion erfolgt über eine Enzymsubstrat-Chromogen-Lösung und die Messung der Farbintensität im Photometer (ANIL et al., 1999; LOVE et al., 2000; SCHMIDT et al., 1999b) oder über eine fluorogene Substrat-Lösung und die Messung im Fluoreszenzphotometer (SCHMIDT et al., 2001). Im Sandwich-EIA ist die Farb- bzw. Fluoreszenzintensität direkt proportional der nachzuweisenden Substanz. Für einen indirekten EIA werden Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen Markerprotein beschichtet und die Extrakte der zu untersuchenden Proben sowie die Antikörper gleichzeitig zugegeben. Die an die Mikrotiterplatten gebundenen Antikörper wurden über konjugierte Sekundärantikörper und ein chromogenes oder fluorogenes Substrat sichtbar gemacht. Die Farbintensität ist hier umgekehrt proportional zur Konzentration des nachzuweisenden Antigens in der Probe.

SCHMIDT et al. (1999b und 2001) verwendeten GFAP als Markerprotein in einem Sandwich-EIA. Sie setzten als Fängerantikörper polyklonales Kaninchen-Antiserum (Dako,

USA) und als Detektionsantikörper monoklonale Antikörper (Boehringer Mannheim, USA) ein. Zur Untersuchung wurden die homogenisierten Proben mit dem 10-fachen Volumen heißer SDS extrahiert und mindestens 1: 12 in Triton X-100/PBS verdünnt, um im Enzymimmuntest eingesetzt zu werden. Mit einem chromogenen Sandwich-Enzymimmuntest lag die Nachweisgrenze bei 1 ng GFAP/ml und mit einem fluorogenen System bei 0,2 ng GFAP/ml. Dies entspricht bei einem GFAP-Gehalt von 600 ng/mg im Gehirn (SCHMIDT et al., 2002) einer Nachweisgrenze von 0,2 % bzw. 0,04 % Gehirn in Fleischerzeugnissen.

Auf der Basis des von SCHMIDT et al. (1999b) beschriebenen chromogenen Sandwich-Enzymimmuntest ist auch ein kommerzielles Testsystem erhältlich (Ridascreen® Risk Material Test, R-Biopharm, Deutschland). Die Nachweisgrenze wird vom Hersteller mit 0,2 % ZNS angegeben. In mehreren Studien wurde die Anwendbarkeit des Ridascreen® Risk Material Test zum qualitativen und quantitativen ZNS-Nachweis überprüft: da es sich bei dem Standard des Testsystems um einen Mischstandard aus Gehirn und Rückenmark handelt, die Konzentration von GFAP im Rückenmark mit ca. 2000 ng/mg (SCHMIDT et al., 2002) jedoch wesentlich höher als im Gehirn ist, wird der Gehalt von Gehirn in Fleischerzeugnissen tendenziell unterschätzt und der Gehalt von Rückenmark in Fleischerzeugnissen tendenziell überschätzt. Die Nachweisgrenze für Gehirn liegt dadurch bei 0,5-1 % während die Nachweisgrenze für Rückenmark unter 0,2 % liegt (Ridascreen® Risk Material Test, 2004; AGAZZI et al., 2002; HAJMEER et al., 2003; HOSSNER et al., 2006 und HUGHSON et al., 2003).

ANIL et al. (1999) und LOVE et al. (2000) entwickelten einen Sandwich-EIA mit Syntaxin 1b als Markerprotein. Sie verwendeten als Fängerantikörper monoklonales Maus-Antiserum (Klon 78.2, Synaptic Systems, Deutschland) und als Detektionsantikörper polyklonales Kaninchen-Antiserum (Synaptic Systems, Deutschland). Mit diesen Antikörpern lag die Nachweisgrenze bei 2 ng Syntaxin 1B/ml. ANIL et al. (1999) und LOVE et al. (2000) verwendeten den Enzymimmuntest nur zum Nachweis von ZNS in Blut. SCHMIDT et al. (2001) überprüften diesen Enzymimmuntest auch zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen und untersuchten die für den GFAP-Nachweis gewonnenen Extrakte. Sie gaben an, dass die Sensitivität des Syntaxin 1B-ELISA unter diesen Bedingungen um das 10fache geringer war, als die des GFAP-ELISA. Der Syntaxingehalt im Rückenmark ist 50-100fach höher als im Gehirn (LOVE et al., 2000).

RENCOVA (2005) verwendete einen indirekten Enzymimmuntest um verschiedene monoklonale Antikörper gegen GFAP, MBP und NF sowie einen polyklonalen Antikörper gegen GFAP auf ihre Eignung zum Nachweis von ZNS zu überprüfen (s. Tabelle 2). Außer dem monoklonalen Antikörper gegen GFAP zeigten alle Antikörper Kreuzreaktionen mit peripherem Nervensystem. Die Nachweisgrenze lag unter Verwendung der monoklonalen Antikörper bei 10 % und unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers bei 2,5 %.

HOLTBECKER und STOLLE (2005) entwickelten einen indirekten Enzymimmuntest mit MBP als Markerprotein. Die Nachweisgrenze für ZNS betrug in diesem System 0,1-0,4 % Rindergehirn in Fleischerzeugnissen. Kreuzreaktionen mit ZNS vom Schwein waren ab einer Konzentration von 10 % Schweinegehirn zu beobachten, Kreuzreaktionen mit peripherem Nervengewebe traten bei Untersuchung von Muskelfleisch des Rindes, jedoch nicht bei Untersuchung von Muskelfleisch des Schweins auf.

2.3.1.2.3 Western Blot

Die Antikörper, die im Western Blot auf ihre Eignung zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen überprüft wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Detektion erfolgte jeweils über kommerziell verfügbare monoklonale Antikörper. Für die Untersuchung im Western Blot werden fettreiche Proben (z. B. Leberwürste) vor der Untersuchung durch Soxhlet-Extraktion mit Petroleumäther entfettet. Die eigentliche Protein-Extraktion erfolgt mittels Tris-Harnstoff-Puffer bei 4 °C (AUPPERLE et al., 2002; HORLACHER, 2002; LÜCKER et al., 1999 und 2000, OVERHOFF und LÜCKER, 2003), bei stark erhitzten Proben unter Zusatz von Mercaptoethanol und Dithiothreitol (HORLACHER, 2002). Die extrahierten Proteine werden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und durch Elektroblothing auf Polyvinyliden-Difluorid (PVDF) Membranen übertragen. Das Zielprotein wird durch spezifische Primärantikörper, konjugierte Sekundärantikörper und ein Enzymsubstrat-Chromogen visuell detektiert. Neben der qualitativen visuellen Auswertung ist auch eine semiquantitative Aussage möglich, insbesondere unter Verwendung der Densitometrie. Die Nachweisgrenze für NSE und für GFAP lag bei ca. 0,1 % ZNS in erhitzten und 0,01 % in rohen Fleischerzeugnissen (HORLACHER, 2002; LÜCKER, 2003). Für MBP wurde die Nachweisgrenze nicht ermittelt. SALMAN et al. (2005) modifizierten den Western Blot mit NSE als Markerprotein und

ermittelten sowohl für die Originalversion als auch für die modifizierte Version eine Nachweisgrenze von 0,2-0,5 % ZNS in rohen und 0,2-1 % ZNS in erhitzten Fleischerzeugnissen.

Die Vorteile des Western Blot liegen in der Identifizierung der Proteine durch den eingebauten Trennschritt, nachteilig sind allerdings die mangelnde Tierartspezifität sowie die hohen Untersuchungskosten zu sehen. Die meisten der untersuchten Antikörper zeigten Kreuzreaktionen mit peripherem Nervensystem oder unspezifische Reaktionen mit ZNS-freiem Material. Soweit untersucht traten auch hier Kreuzreaktionen mit ZNS anderer Tierarten oder unspezifischen Reaktionen bei der Untersuchung erhitzten Probenmaterials auf. Auf der Basis des Western Blot zum Nachweis von NSE war über mehrere Jahre auch ein kommerzielles Western Blot Testsystem erhältlich (Schebo Brainostic Test, Schebo Biotech AG, Deutschland). Die Nachweisgrenze für ZNS beträgt laut Hersteller 0,25 % ZNS, HAJMEER et al. (2003) und HUGHSON et al. (2003) ermittelten mit diesem Testsystem eine Nachweisgrenze von 1 % ZNS.

AGAZZI et al. (2002), HAJMEER et al. (2003) und HUGHSON et al. (2003) führten Vergleichsstudien zwischen dem kommerziell erhältlichen Sandwich-Enzymimmuntest zum Nachweis von GFAP (Ridascreen Risk Material Test) und dem damals noch kommerziell erhältlichen Western Blot zum Nachweis von NSE (Schebo Brainostic Test) durch. Alle drei Studien kamen zu dem Ergebnis, dass der Ridascreen[®] Risk Material Test wesentlich schneller, weniger aufwendig und kostengünstiger sei, bei nur geringen Unterschieden zwischen den Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, Quantifizierungsgenauigkeit und Wiederholbarkeit. Inzwischen hat die Firma Schebo auch auf den Sandwich-Enzymimmuntest zum Nachweis von GFAP umgestellt.

2.3.2 Chemische und Chemisch-Physikalische Nachweisverfahren

2.3.2.1 Cholesterinbestimmung

Der durchschnittliche Gesamtcholesteringehalt im Gehirn liegt mit ca. 2000 mg/100 g höher als in anderen tierischen Geweben (Muskulatur bis ca. 100 mg/100 g; Leber, Niere bis ca. 400 mg/100 g), nur Eigelb (1200 mg/100 g) erreicht ähnlich hohe Werte (SOUCI et al., 1994).

Der Cholesteringehalt ist jedoch zudem abhängig vom Fettgehalt des Gewebes (MORITZ, 1995) und liegt im ZNS sehr heterogen verteilt vor (RUNQUIST et al., 1995).

Auf Grund dieser relativen Gewebespezifität wurden die enzymatische Gesamtcholesterinbestimmung (HORLACHER, 2002; LÜCKER, 2003; LÜCKER et al., 1999) bzw. die gaschromatographische Cholesterinbestimmung (LÜCKER, 2003) als Screening-Methode zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen verwendet. Die Methoden basieren auf den Anleitungen zur Bestimmung des Cholesteringehaltes in Eiern und Eiprodukten der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (L 05.00-17 und L 05.00-18). Zur Bestimmung des Cholesteringehaltes wird dieses durch alkalische Hydrolyse aus Esterbindungen freigesetzt. Die Durchführung der enzymatischen Gesamtcholesterinbestimmung erfolgt mit kommerziell erhältlichen Testsystemen von Boehringer bzw. R-Biopharm, Deutschland und einer, nach Anleitung der Testsysteme, modifizierten Probenaufbereitung für Fleischerzeugnisse (LÜCKER et al., 1999; HORLACHER, 2002). Für die gaschromatographische Bestimmung des Cholesteringehaltes wird Cholesterin in sein Trimethylsil-Derivat überführt und detektiert.

In künstlich kontaminierten Proben konnten diese Verfahren grundsätzlich für den ZNS-Nachweis in Fleischerzeugnissen verwendet werden (HORLACHER, 2002; LÜCKER et al., 1999 und 2000). Zum Screening von Fleischerzeugnissen auf ZNS-Gehalt sind diese Methoden jedoch nur bedingt geeignet, da ZNS-Gehalte ab einer Mindestkonzentration von 1 % nur bei sehr niedrig gewählten Cut-off-Werten erfasst werden können, mit dem Risiko eines sehr hohen Anteils falsch positiver Ergebnisse (HORLACHER, 2002; LÜCKER, 2003 und LÜCKER et al., 1999). Mit der enzymatischen Gesamtcholesterinbestimmung können auch Kreuzreaktionen mit pflanzlichen Sterinen auftreten (WORTBERG, 1975).

Vorteile der Cholesterinbestimmung sind die hohe Stabilität der Markersubstanz, auch in stark prozessierten und erhitzten Lebensmitteln, sowie der relativ geringe Kostenaufwand. Nachteilig sind der relativ hohe Arbeitsaufwand und die mangelnde Spezifität bezüglich Tierarten- und Altersdifferenzierung.

2.3.2.2 Gaschromatographische Fettsäurenanalyse

Bei diesem Verfahren basiert der Nachweis von ZNS auf der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse von Fettsäurederivaten, die fast ausschließlich im ZNS vorkommen (BIEDERMANN et al., 2002 und 2004; NIEDERER und BOLLHALDER, 2001). Die zu untersuchenden Proben werden homogenisiert und die Fettsäuren zuerst durch flüssige Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und danach durch Festphasenextraktion an Silikatgel gewonnen. Die Fraktion der neutralen Lipide wird verworfen, die Fraktion der komplexen Lipide wird mit methanolischer Chloroform-Salzsäure in Methyl ester (= FAME = fatty acid methyl esters) überführt. Die Lipide werden erneut mit organischen Lösungsmitteln extrahiert und anschließend gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert (BIEDERMANN et al., 2002 und 2004; NIEDERER und BOLLHALDER, 2001). Alternativ können die Lipide nach der flüssigen Extraktion auch direkt in FAME überführt werden, die Auftrennung erfolgt dann mittels Flüssig-Chromatographie und Gelfiltration (BARCAROLO et al., 2003). Durch den Vergleich der Ergebnisse mit bestimmten reinen, einfach ungesättigten Fettsäuren und deren cis/trans-Isomeren bzw. cis-Positionsisomeren können Rückschlüsse auf den Gehalt von ZNS-Material und dessen Herkunft in Bezug auf Tierart und Alter gezogen werden (BARCAROLO et al., 2003; BIEDERMANN et al., 2002 und 2004; NIEDERER und BOLLHALDER, 2001). Die Verhältnisse der cis/trans-Isomere und der cis-Positionsisomere bestimmter Fettsäuren, z. B. Nervensäure (C 24:1), variieren im ZNS der verschiedenen Tierarten. Die exakten Verhältnisse sind jedoch abhängig von den angewandten Extraktions- und Analysemethoden (BARCAROLO et al., 2003; BIEDERMANN et al., 2002 und 2004; NIEDERER und BOLLHALDER, 2001).

Die Nachweisgrenzen für den tierartspezifischen ZNS-Nachweis schwanken, je nach System, zwischen 0,004 % und 0,05 % (BARCAROLO et al., 2003; BIEDERMANN et al., 2002 und 2004; NIEDERER und BOLLHALDER, 2001). BIEDERMANN et al. (2002) berichteten jedoch, dass diese Werte sich nur auf die technische Erfassungsmöglichkeit bezögen und auf Grund der nicht absoluten Gewebespezifität Cut-off Werte von 0,39 % ZNS (bzw. 0,61 % ZNS für stark erhitzte Erzeugnisse) festgelegt werden müssten. Nachteile dieser Methode sind die sehr hohen Kosten, der große Zeitaufwand und die anspruchsvolle Analysenmethode, so dass eine Anwendung dieses Systems nur als Bestätigungsreaktion positiver Proben in Frage kommt. Doch sind vor dem praktischen Einsatz noch weitere Validierungsstudien notwendig (BIEDERMANN et al., 2004).

2.3.3 Molekularbiologische Nachweisverfahren

Der molekularbiologische gewebe- und tierartspezifische Nachweis von bovinem ZNS erfolgt über die mRNA ZNS-typischer Proteine mittels reverser Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR = reverse transcriptase – polymerase chain reaction). Zwei Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit diesen Verfahren, beide verwendeten GFAP als Markersubstanz (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2003; SEYBOLDT et al., 2002 und 2003). Nach Extraktion der RNA wird durch die Reverse Transkriptase deren komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese wird mit gewebespezifischen Primern für die PCR-Amplifikation verwendet.

SEYBOLDT et al. (2002 und 2003) beschrieben Primer, für die nach Angabe der Autoren keine Kreuzreaktionen mit anderem Gewebe, peripherem Nervensystem und ZNS von Huhn und Pute auftraten. Eine weitere Tierartspezifizierung war mit diesen Primern jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die RT-PCR kombiniert mit dem Routineverfahren zur Tierartendifferenzierung, dem Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP). Durch Restriktionsenzyme wurden die PCR-Amplifikate der verschiedenen Tierarten an unterschiedliche Stellen geschnitten. Die unterschiedlichen Fragmente konnten nach Elektrophorese durch Betrachtung im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Mit dieser Methode konnte, nach Angaben der Autoren, ZNS vom Rind ab einer Kontamination von 0,5 % gewebespezifisch in rohen und erhitzten Fleischerzeugnissen nachgewiesen und anhand des RFLP von dem der Schweine, Pferde, Schafe, Ziegen, Rotwild und Rehwild unterschieden werden. Nur ZNS vom Damwild war mit den verwendeten Restriktionsenzymen nicht von Rinder-ZNS differenzierbar.

SCHÖNENBRÜCHER et al. (2003) entwickelten nach Teilsequenzierung des GFAP-Gens von Rind, Schaf, Ziege und Schwein ein rinderspezifisches Primerpaar und führten mit diesen Primern eine Real-Time PCR der cDNA durch. Unter diesen Bedingungen konnte ZNS in erhitzten Fleischerzeugnissen ab 0,1 % Kontamination und in rohen und gering erhitzten Fleischerzeugnissen ab 0,01 % Kontamination sicher detektiert werden. Kreuzreaktionen mit ZNS von Schwein, Huhn, Ente und Pute traten nicht auf, das ZNS von Schaf und Ziege wurde ähnlich dem vom Rind erkannt.

Sowohl für die RT-PCR-RFLP als auch für die Real-Time PCR wurden Untersuchungen zur Haltbarkeit der mRNA von GFAP durchgeführt. Die mRNA war sowohl in rohen, als auch in erhitzten Fleischerzeugnissen für mind. 28 Tage nachweisbar (NOWAK et al., 2005; SCHÖNENBRÜCHER et al., 2003; SEYBOLDT et al., 2002 und 2003). Der Nachteil des molekularbiologischen Nachweisverfahrens besteht in seinem großen Kosten- und Zeitaufwand, so dass es insbesondere für den Einsatz als Bestätigungsreaktion geeignet ist (NOWAK et al., 2005).

2.4 Saures Gliafaserprotein (GFAP)

Da in der vorliegenden Arbeit GFAP als Markerprotein verwendet wurde, sollen an dieser Stelle einige Eigenschaften des Proteins näher dargestellt werden. Das saure Gliafaserprotein ist Hauptbestandteil der Gliafilamente, die mit einem Durchmesser von 8-10 nm (ENG et al., 1971) zur Klasse der Intermediärfilamente gehören und dort auf Grund der Aminosäuresequenz dem Typ III zugeordnet werden. GFAP besteht aus einer zentralen α -Helix und nicht-helikalen Enden.

2.4.1 Chemisch-Physikalische Eigenschaften

Die relative Molekularmasse von GFAP beträgt 50 000 Da (\pm 1 000 Da) (BIGBEE und ENG, 1982; CHIU et al., 1980; RUEGER et al., 1978). Durch Proteolyse des Ausgangsmaterials können Abspaltungen von Teilstücken auftreten, so dass in autolyisiertem Gewebe auch GFAP-Moleküle mit geringerer Molekularmasse nachgewiesen werden können (DAHL und BIGNAMI, 1976; ENG und DEARMOND, 1983; SCHLAEPFER und ZIMMERMANN, 1981). Der Hauptteil des Proteins ist jedoch über mehrere Tage stabil und nachweisbar (DAHL und BIGNAMI, 1976; ENG und DEARMOND, 1983; SCHMIDT et al., 1999b). Wie alle Proteine der Intermediärfilamente zeichnet GFAP sich durch hohe mechanische und chemische Stabilität aus. Zu seinen chemischen Eigenschaften gehören die relativ geringe Wasserlöslichkeit (15-20 %) (ENG et al., 1971; ENG und DEARMOND, 1983; ENG et al., 2000), die Neigung zur Polymerisierung und zur Aggregation mit anderen Proteinen sowie die Empfindlichkeit gegenüber neutralen Proteasen (SCHLAEPFER und ZIMMERMANN, 1981). Durch Detergenzien wie Sodiumdodecylsulfat oder Harnstoff kann die

Wasserlöslichkeit verbessert werden (ENG und DEARMOND, 1983). Im Hinblick auf seine Eignung als Immunogen ist von Bedeutung, dass GFAP hoch spezifische und antigene Epitope enthält (ENG und DEARMOND, 1983; UYEDA et al., 1972).

2.4.2 Lokalisation und Funktion

Physiologisch ist GFAP vor allem im ZNS lokalisiert. Während es im ausgereiften ZNS auf die Astrozyten (BIGNAMI und DAHL, 1974; BIGNAMI et al., 1972; LUDWIN et al., 1976; UYEDA et al., 1972 und YEN und FIELDS, 1981), die Bergmann-Stützzellen (LUDWIN et al., 1976; SCHACHNER et al., 1977) und die Ependymzellen beschränkt ist, kann es während der Fetalperiode auch in Glioblasten und Oligodendrozyten nachgewiesen werden (ANTANITUS et al., 1976; CHOI und KIM, 1984; CHOI und LAPHAM, 1978; LEVITT und RAKIC, 1980). In ausdifferenzierten Astrozyten besteht der Großteil des Zytoplasmas aus GFAP, wobei der Gehalt mit dem Lebensalter steigt (NICHOLS et al., 1993). SCHMIDT et al. (2002) geben den Gehalt von GFAP im Rückenmark mit 2000 ng/mg und im Gehirn mit 600 ng/mg an. Außer im ZNS kann GFAP auch in anderen Geweben nachgewiesen werden, diese Lokalisationen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die GFAP-Konzentration im ZNS ist jedoch wesentlich höher als in diesen Geweben, z.B. ist der GFAP-Gehalt im Gehirn ca. achtfach höher als in den myenterischen Plexi, 20- bis 50-fach höher wie im peripheren Nervensystem und 300-fach höher wie in den Zervikalganglien (JESSEN et al., 1984; SCHMIDT et al., 1999b und 2002). Zudem zeigt GFAP in diesen Geweben teilweise auch Unterschiede bezüglich der exprimierten Epitope und Protease-Schnittstellen (ALBRECHTSEN et al., 1984; DAVISON und JONES, 1981; JESSEN et al., 1984).

Als Teil des Zytoskeletts hat GFAP in Zellen form- und stabilitätsgebende Funktion. Ein Großteil der GFAP-Funktionen kann in GFAP-Knockout Mäusen jedoch von Vimentin, dem Intermediärfilament welches während der Fetal- und Embryonalentwicklung in den Gliazellen überwiegt, übernommen werden (GOMI et al., 1995; PEKNY et al., 1995). Auf Verletzungen und Erkrankungen des ZNS reagieren die Astrozyten mit starker Vermehrung, der sogenannten Astroglie, die mit einer gesteigerten GFAP-Synthese einhergeht. Zu den Astroglie auslösenden Faktoren gehören Traumata, Ischämie, Toxine (z.B. Dichlorethan, Xylen und Colchicin), Enzephalomyelitiden, Adrenoleukodystrophie, Multiple Sklerose, Speicherkrankheiten (z. B. Alzheimer und Parkinson), genetisch bedingte Erkrankungen

(z.B. Alexander-Krankheit und Down Syndrom) und Tumore (ENG et al., 2000; ENG und GHIRNIKAR 1994). Neben den Tumoren glialen Ursprungs ist GFAP auch in anderen Tumoren nachweisbar. Die Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der Tumorarten in denen GFAP nachgewiesen werden kann.

Tabelle 3: Vorkommen von GFAP in Geweben außerhalb des ZNS

Lokalisation	Referenz
nicht-myelinbildende Schwann`sche Zellen des peripheren Nervensystems	ALBRECHTSEN et al. (1984) BARBER und LINDSAY (1982) DAHL et al. (1982, 1985) DAVISON und JONES (1981) JESSEN et al. (1984) JESSEN und MIRSKY (1983, 1985)
Mantelzellen der Ganglien	JESSEN und MIRSKY (1985) JESSEN et al. (1984)
Gliazellen des enterischen Nervensystems	BJÖRKLUND et al. (1984b) JESSEN et al. (1984) JESSEN und MIRSKY (1980, 1983, 1985)
Kupfer`sche Sternzellen der Leber	GARD et al. (1985)
Zirbeldrüse	MØLLER et al. (1978)
Hypophyse	HÖFLER et al. (1984) SUESS und PLIŠKA (1981)
Linsenepithel	HATFIELD et al. (1984) BJÖRKLUND et al. (1984a)
Epiglottisknorpel	MCLENDON und BIGNER (1994)

Tabelle 4: Tumorarten, in denen GFAP nachweisbar ist

Tumorart	Referenz
Alle glialen Tumore: Astrozytome	VAN DER MEULEN et al. (1978)
Oligodendrogliome	VELASCO et al. (1980)
Ependymome	
Hypophysentumore	HÖFLER et al. (1984)
Pineale Tumore	MCLENDON und BIGNER (1994)
Papilläre Meningeome	BUDKA (1986)
Papillome des Choroid-Plexus	RUBINSTEIN und BRUCHER (1980)
Hämangioblastome	MCLENDON und BIGNER (1994)
Pleomorphe Speicheldrüsenadenome	STEAD et al. (1988)
Metastasierende Nierenzellkarzinome	BUDKA (1986)

2.4.3 Bedeutung als Markersubstanz

Auf Grund seiner quantitativ bevorzugten Lokalisation im zentralen Nervensystem wird GFAP als Markersubstanz für die Tumordiagnostik, neurale Schäden und den Nachweis von ZNS in Lebensmitteln verwendet. In der Tumordiagnostik erfolgt der Nachweis immunhistochemisch mittels mono- oder polyklonalen Antikörpern. Dabei ist zu beachten, dass nur positive GFAP Nachweise aussagekräftig sind und in den glialen Tumoren bei steigender Malignität eine Abnahme des GFAP-Gehaltes festzustellen ist (KROS et al., 1990). Für die Diagnose neuraler Schäden wird GFAP im Liquor mittels Radio- (NOPPE et al., 1986) oder Enzymimmuntest (ALBRECHTSEN et al., 1984; ROSENGREN et al., 1992 und 1994) und im Blut mittels Enzym- (VAN GEEL et al., 2002) oder Fluoreszenzimmuntest (MAGERKURTH, 2003) nachgewiesen. Diese Methoden finden in der Humanmedizin insbesondere Anwendung zur Diagnose und Beurteilung von Hirninfarkten (AURELL et al., 1989; HERMANN et al., 2000; VAN GEEL et al., 2002) und Schädel-Hirn-Traumen

(MAGERKURTH, 2003; WOERTGEN et al., 2002). Als Marker für ZNS in Lebensmitteln wird GFAP immunhistologisch, enzymimmunchemisch und immunchromatographisch nachgewiesen (s. auch 2.3.1.2).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aqua ad iniectabilia	(Fresenius, Ampuwa)
Aqua bidest.	
Ammoniumsulfat	(Riedel-de Haën, 31119)
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat	(DAKO, PO 217)
Anti-Schaf-IgG-Peroxidase-Konjugat	(DAKO, PO 163)
Anti-Schwein-IgG-Peroxidase-Konjugat	(DAKO, PO 164)
Bovines Casein Natriumsalz	(Sigma, C 8654)
Bovines Serumalbumin	(Sigma, A 9642)
Citronensäure-1-monohydrat	(Merck, 100062)
CnBr-aktivierte Sepharose 4B	(Amersham Biosciences, 17-0430-01)
Essigsäure 99,9 %	(Merck, 100062)
Ethanol	(Merck, 100986)
Glycin	(Bio-Rad, 161-0718)
Horseradish Peroxidase	(Roche, 814407)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck, 104877)
Komplettes Freund'sches Adjuvans	(Sigma, F 5881)
Methanol	(Merck 106009)
Natriumacetat	(Merck, 106264)
Natriumborhydrid	(Aldrich, 21346-2)
Natriumcarbonat, wasserfrei	(Merck, 106392)
Natriumchlorid	(Merck, 106404)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck, 106329)
di-Natriumhydrogenphosphat	(Merck, 106586)
Natrium-meta-perjodat	(Sigma, S 1878)
Salzsäure 37 %	(Riedel-de Haën, 30721)
Saures Gliafaserprotein, bovin	(Progen, 62007)
Saures Gliafaserprotein, porcine	(Chemicon, AG 230)
Schwefelsäure 95-97 %	(Merck, 100731)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	(Sigma, L 4509)

3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin	(Sigma, T 2885)
Thimerosal	(Sigma, T 5125)
Tris-Salzsäure	(Sigma, T 1503)
Triton X-100	(Sigma, T 9284)
Tween 20	(Sigma, P 1379)
Wasserstoffperoxid	(Merck, 107209)

3.1.2 Lösungen und Puffer

Ammoniumsulfatlösung:	gesättigt
Bicarbonatpuffer (pH 9,6):	0,05 mol/l
Bindungspuffer (pH 7-8):	0,01 mol/l Phosphatpuffer 0,5 mol/l Natriumchlorid
Blockierungspuffer (pH 8):	0,1 mol/l Tris-Salzsäure mit Salzsäure (5 mol/l) auf pH 8 eingestellt
Kasein/PBS:	1 % und 2 %
Citratpuffer (pH 3,9):	0,21 mol/l Citronensäure-1-monohydrat 3,15 mmol/l Wasserstoffperoxid
Elutionspuffer (pH 2,5):	0,1 mol/l Glycin mit Salzsäure (5 mol/l) auf pH 2,5 eingestellt
Kopplungspuffer (pH 7,9):	0,1 mol/l Natriumhydrogencarbonat 0,5 mol/l Natriumchlorid
Natriumacetatpuffer (pH 4,4):	1 mmol/l
Natriumborhydridlösung:	4 mg/ml
Natriumcarbonatlösung (pH 12):	0,5 mol/l
Natrium-meta-Perjodatlösung:	0,1 mol/l
Neutralisationspuffer (pH 8,8-9,0):	0,1 mol/l Tris-Salzsäure mit Salzsäure (5 mol/l) auf pH 8,8-9 eingestellt
Phosphate Buffered Saline (PBS):	0,01 mol/l Phosphatpuffer 0,12 mol/l Natriumchlorid
Phosphatpuffer:	0,01 mol/l
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung:	0,01 mol/l Phosphatpuffer 1 mol/l Natriumchlorid

Salzsäure:	1 mmol/l und 5 mol/l
Schwefelsäure:	1 mol/l
SDS-Lösung:	0,1 % und 1 %
SDS/PBS:	0,00001 %; 0,0001 %; 0,001 %; 0,01 %; 0,1 % und 1 %
SDS/Phosphatgepufferte Kochsalzlösung:	1 %
SDS/0,5 % Triton X-100/PBS:	0,00001 %; 0,0001 %; 0,001 %; 0,01 %; 0,1 % und 1 %
Substratlösung:	20 Teile Citratpuffer 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung
Tetramethylbenzidinlösung:	1 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in: 9 Teilen Methanol 1 Teil Aceton
Triton X-100-Lösung:	0,5 %
Triton X-100/PBS:	0,5 %
Waschlösung:	0,15 mol/l Natriumchlorid 0,025 % Tween 20
Waschpuffer basisch (pH 8):	Blockierungspuffer mit 0,5 mol/l Natriumchlorid
Waschpuffer sauer (pH 4):	Natriumacetatpuffer mit 0,5 mol/l Natriumchlorid

3.1.3 Untersuchungsmaterial

Hackfleisch	(Fleischereifachgeschäft in Gießen)
Hühnergehirn	(Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, Justus-Liebig-Universität Gießen)
Kaninchengehirn	(Zentrales Tierlabor, Justus-Liebig-Universität Gießen)
Pferdegehirn	(Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde des Institutes für Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen)
Putengehirn	(Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, Justus-Liebig-Universität Gießen)

Rindergehirn und -rückenmark	(Institut für Veterinärpathologie und Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Justus-Liebig-Universität Gießen)
Schafsgehirn	(örtlicher Schlachthof)
Schweinegehirn und -rückenmark	(Fleischereifachgeschäft in Wetzlar mit eigener Schlachtung)
Dreiviertelkonserven (F-Wert 0,84):	künstlich kontaminiert mit 0 %; 0,1 %; 1 %; 2 % und 8 % Rindergehirn (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen)
Kesselkonserven (F-Wert 0,45):	künstlich kontaminiert mit 0 %; 0,1 %; 1 %; 2 % und 8 % Rindergehirn bzw. Schweinegehirn (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen)
Vollkonserven (F-Wert 5,4)	künstlich kontaminiert mit 0 %; 0,1 %; 1 %; 2 % und 8 % Rindergehirn (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen)
Wurstproben	Anzahl: 30 (örtliche Supermärkte)

3.1.4 Geräte und Sonstiges

Chromatographiegerät	(Bio-Rad, Biologic LP 731-8350)
Chromatographiesäule C 10	(Amersham Biosciences, 19-5001-01)
Dialyseschlauch 16 mm	(Serva, 44110)
Elektronische Analysenwaage	(Sartorius, Basic Plus)
Elektronische Präzisionswaage	(Sartorius, Master Pro LA)
Filternutsche P4	(VWR, 511-1324)
Fraktionssammler	(Bio-Rad, 2110)

Gelfiltrationssäule Sephacryl S-200 16/60	(Amersham Biosciences, 17-1166-01)
Heizrührer	(Heidolph, MR 3001)
Küvetten 10 mm	(Hellma, 108 002 QS)
Mikrotiterplatten	(ImmunoPlate MaxiSorp Nunc, 439454)
Mikrotiterplattenlesegerät	(Tecan, ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise)
Moulinette	(Krupps, Speedy Pro)
pH-Messgerät	(WTW, inolab Level 1 mit Sen Tox HW Elektrode)
RIDASCREEN Risk Material Test	(R-Biopharm, R 6701)
Schlauch und Anschlussmaterialien	(Bio-Rad)
Spektrophotometer	(Shimadzu, UV-1601)
Stomacher	(Seward, Stomacher 400 Circulator)
Stomacherbeutel	(Transia, 85051)
Taumelgerät	(Heidolph, Polymax 1040)
Zentrifuge	(Hereus, 750 043 71, Multifuge 3 S-R)

3.2 Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen bovines GFAP

3.2.1 Immunisierung von Kaninchen, Schafen und Schweinen

Zur Entwicklung polyklonaler Antikörper gegen bovines GFAP wurden Tiere dreier Spezies immunisiert: drei Kaninchen, zwei Schafe und zwei Schweine. Als Immunogen wurde lyophilisiertes bovines GFAP verwendet. Die Immunisierung der Schafe wurde bei Charles River Wiga Deutschland GmbH (Kisslegg), die der Schweine bei biomedical consulting and development (bcd) GmbH (Berlin) durchgeführt. Die Zeitpunkte der Restimulierungen und Blutentnahmen, das jeweils entnommene Blutvolumen und die Dauer der Immunisierungsphase sind in Tabelle 5 dargestellt. Pro Tier und Applikation wurden 250 µg bovines GFAP in 0,5 ml Aqua ad iniectabilia gelöst und mit 1,5 ml komplettem Freund'schem Adjuvans emulgiert. Die Applikation erfolgte bei den Schafen und Schweinen subkutan, zur Grundimmunisierung auf vier Stellen, zur Restimulierung auf zwei Stellen verteilt. Die Grundimmunisierung der Kaninchen erfolgte intrakutan auf 20 Stellen verteilt, deren Restimulierung intramuskulär auf 2 Stellen verteilt. Zur Blutentnahme wurde bei den Kaninchen die *Arteria auricularis*, bei den Schafen und Schweinen die *Vena jugularis* verwendet.

Tabelle 5: Immunisierungsschema für Kaninchen, Schafe und Schweine

	Kaninchen	Schafe	Schweine
Interne Nummern	K09, K10, K11	Sf01, Sf02	Sw01, Sw02
Zeitpunkte der Restimulierung [Wochen nach Grundimmunisierung]	16, 35	1, 4, 8, 14	1, 4
Zeitpunkte der Blutentnahmen	alle 2-3 Wochen	alle 2-3 Wochen	alle 2-3 Wochen
Jeweils entnommenes Blutvolumen [ml]	10-30	50-100	50-100

3.2.2 Serumgewinnung und Kontrolle des Immunisierungsverlaufes

Das jeweilige Anti-GFAP-Serum wurde durch zweimalige Zentrifugation (3000 x g, 15 min, 4 °C) von den restlichen Blutbestandteilen abgetrennt und in Portionen à 3,5 ml bei -18 °C aufbewahrt. In regelmäßigen Abständen wurde der spezifische Antikörpertiter gegen bovines GFAP mittels eines indirekten Enzymimmuntests bestimmt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit bovinem GFAP in einer Konzentration von 100 ng/ml in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Platten wurden zur Entfernung der Restflüssigkeit ausgeschlagen und freie Proteinbindungsstellen durch dreißigminütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 2 % Kasein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität) abgesättigt. Danach wurden die Platten dreimal mit Waschlösung gewaschen und erneut ausgeschlagen, um die Restflüssigkeit zu entfernen. Es wurden Verdünnungsstufen der zu testenden Antiseren (1: 10 000 bis 1: 21 870 000 in PBS für Kaninchen, 1: 100 bis 1: 218 700 in PBS für Schaf und Schwein; 100 µl/Kavität) im Doppelansatz einpipettiert. Die Platten wurden erneut eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, mit Waschlösung dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Im Anschluss daran wurde Antikörper-Enzymkonjugat (100 µl/Kavität), 1: 1 000 in 1 % Kasein/PBS verdünnt, zugegeben. Je nach zu testendem Antiserum wurde Anti-Kaninchen-, Anti-Schwein- oder Anti-Schaf-IgG-Meerrettichperoxidase als Antikörper-Enzymkonjugat verwendet. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur, dreimaligem

Waschen und Ausschlagen der Platten wurde pro Kavität 100 µl Substratlösung zupipettiert. Die Enzymreaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Farbintensität photometrisch bei 450 nm gemessen. Als Titer 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 mituntersucht. Um erste Erkenntnisse über die Spezifität der Antiseren zu gewinnen, wurde diese Titerbestimmung mit ausgewählter Wochenseren auch vergleichend auf jeweils zur Hälfte mit bovinem und porcinem GFAP beschichteten Mikrotiterplatten ausgeführt.

3.2.3 Ergebnisse

In den Seren aller immunisierten Tiere konnten spezifische Antikörper gegen bovines GFAP ab der ersten Blutentnahme nach Grundimmunisierung nachgewiesen werden. Der Antikörpertiter konnte bei allen immunisierten Tieren durch Restimulierung auf einem hohen Niveau stabilisiert bzw. weiter gesteigert werden. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen den anhand ausgewählter Wochenseren erstellten Titerverlauf der drei Kaninchen (bis zur 60. Woche) und der beiden Schafe.

Bei vergleichender Titerbestimmung auf jeweils zur Hälfte mit bovinem und porcinem GFAP beschichteten Platten ergaben sich für die Kaninchen- und Schafantisereen weit höhere Titer für porcines GFAP als für bovines GFAP, während sich für die Antiseren der Schweine nur geringgradig höhere Titer für porcines GFAP als für bovines GFAP ergaben. Die Abbildung 5 zeigt exemplarisch für die Verdünnungsstufe 1: 8 100 der Schweineantisereen den Unterschied zwischen boviner und porciner Extinktion im Verlauf der Immunisierungsphase.

3.3 Herstellung von Immunreagenzien

Um möglichst frühzeitig Aufschluss über die Eignung der Antiseren für den spezifischen Nachweis von bovinem ZNS zu gewinnen, wurden bereits während der laufenden Immunisierungsphase Antiseren einzelner Blutentnahmen (Wochenseren), die hohe Antikörpertiter aufwiesen, gereinigt und daraus Antikörper-Enzym-Konjugate hergestellt.

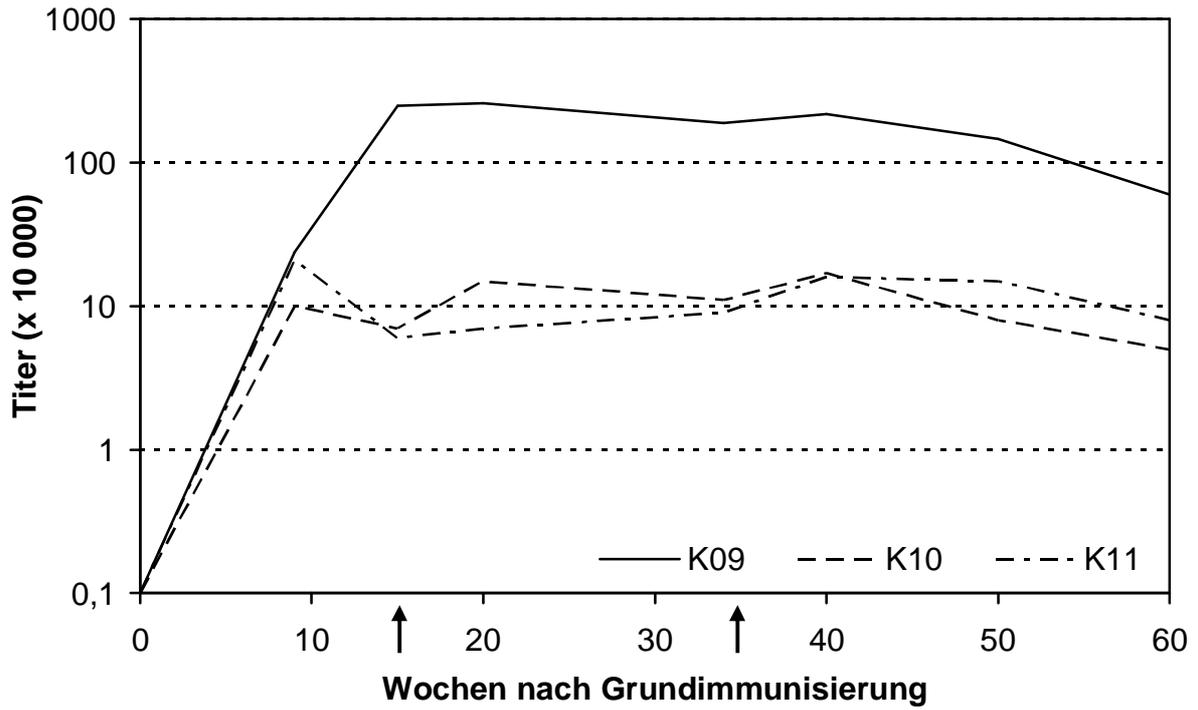


Abbildung 3: Serومتiter der mit bovinem GFAP immunisierten Kaninchen. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Restimulierungen.

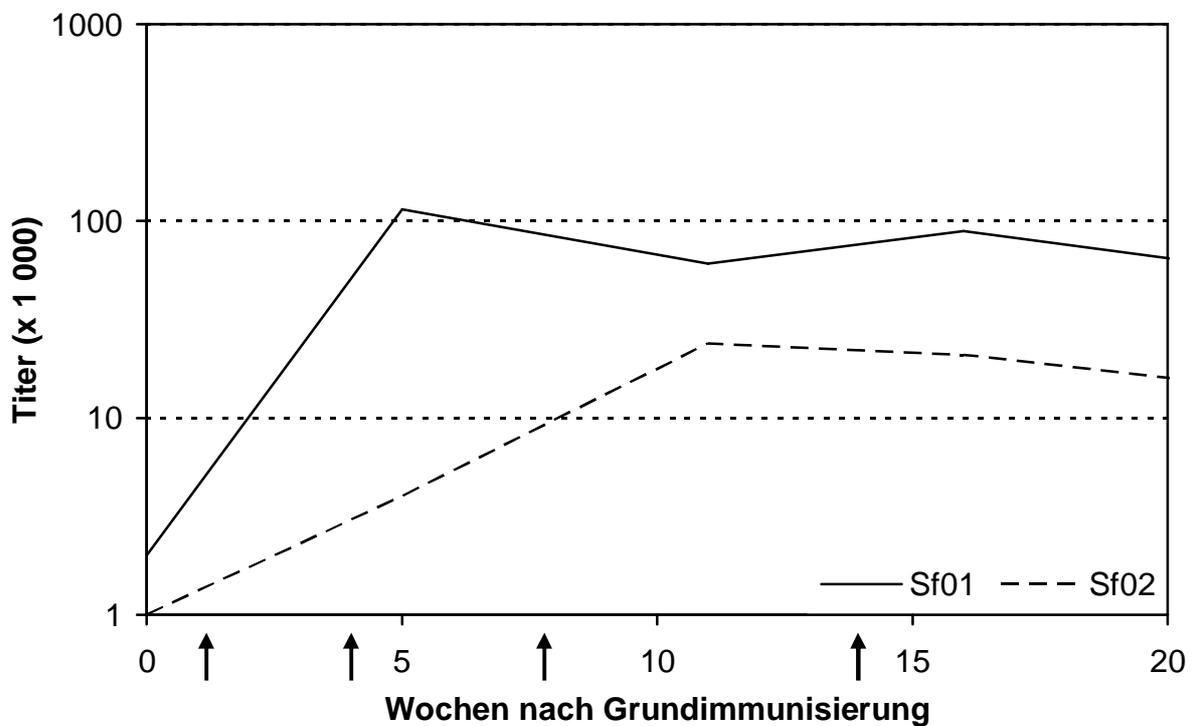


Abbildung 4: Serومتiter der mit bovinem GFAP immunisierten Schafe. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Restimulierungen.

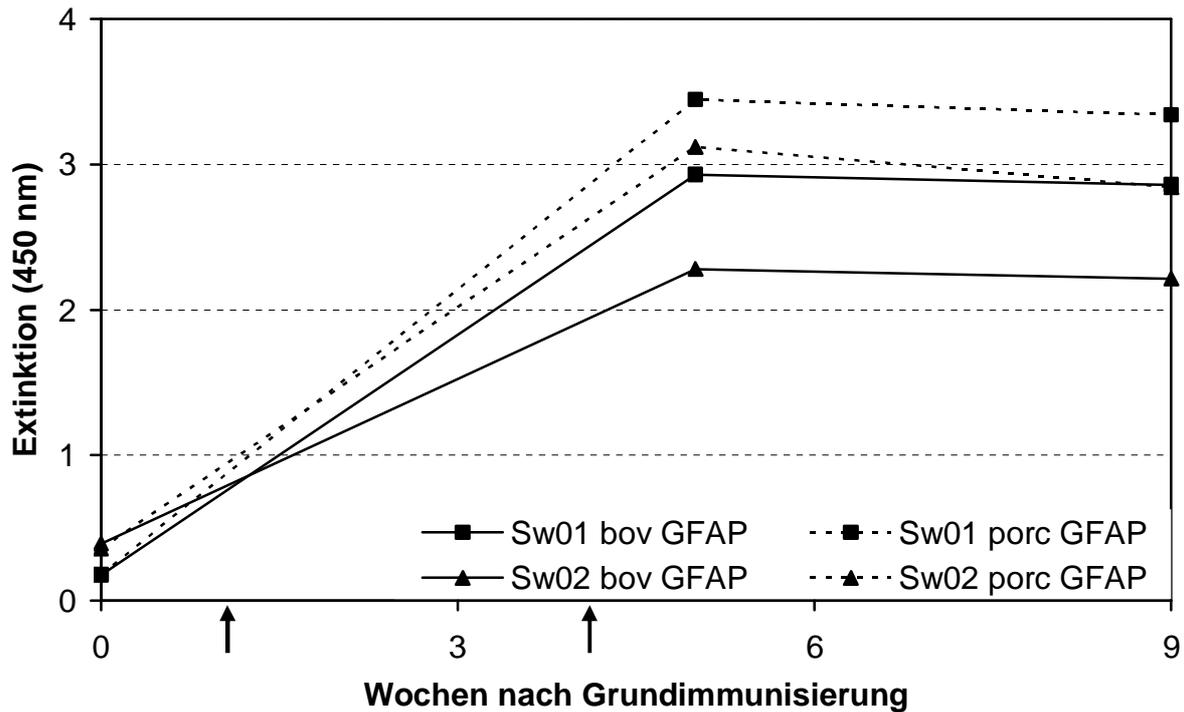


Abbildung 5: Vergleichender Serumtiter der mit bovinem GFAP immunisierten Schweine unter Verwendung von bovinem bzw. porcinem GFAP als Beschichtungsantigen. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Restimulierungen.

3.3.1 Reinigung der Antikörper (Serumpräzipitation)

Die nach 3.2.1 gewonnenen Antiseren wurden nach der Methode von HERBERT et al. (1973) mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und dreimal für mindestens fünf Stunden gegen PBS dialysiert. Anschließend wurde die Extinktion der dadurch erhaltenen IgG-Rohfraktion photometrisch bei 280 nm bestimmt. Mittels folgender Formel wurde der Proteingehalt der IgG-Rohfraktion berechnet:

$$\text{IgG - Konzentration [mg/ml]} = \frac{\text{Extinktion (280 nm)}}{1,37 \times 1 \text{ mg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Die Immunglobulinlösung wurde auf eine Konzentration von 8 mg/ml eingestellt und zur Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten (s. 3.3.2) verwendet bzw. als Fängerantikörper im Sandwich-Enzymimmuntest eingesetzt (s. 3.4).

3.3.2 Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten

3.3.2.1 Enzymmarkierung der IgG-Rohfraktion (Kopplung)

Als Markerenzym wurde Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase = HRP) verwendet, welche nach dem Verfahren von WILSON und NAKANE (1978) an die jeweiligen Antikörper gekoppelt wurde. Bei dieser Methode erfolgt die Kopplung der Antikörper an die HRP 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, wodurch die Schiff'schen Basen in sekundäre Amine überführt werden.

Die Durchführung der Kopplung erfolgte entsprechend der Beschreibung 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 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz über Nacht bei 4 °C gegen zweimal 5 l Natriumacetatpuffer (1 mmol/l; pH 4,4) dialysiert. Zu dieser aktivierten Meerrettichperoxidase-Lösung wurde 1 ml der auf 8 mg/ml eingestellten IgG-Rohfraktion gegeben. Der pH-Wert wurde sofort mit 20-30 µl Natriumcarbonatlösung (0,5 mol/l, pH 12) auf 9,5 eingestellt und der Kopplungsansatz wurde daraufhin zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 0,1 ml frisch angesetzter Natriumborhydridlösung (4 mg/ml) wurde die Kopplungsreaktion gestoppt. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei 4 °C.

3.3.2.2 Gelchromatographische Reinigung der Kopplungsprodukte

Zur Abtrennung nicht gekoppelter Bestandteile (ungebundene Peroxidase- und Antikörpermoleküle) von den Kopplungsprodukten wurde eine Gelchromatographie an Sephacryl S-200 durchgeführt. Die Säulendimension betrug 60 cm x 1,6 cm bei einem Gelbettvolumen von 120 ml. Als Fließmittel wurde PBS verwendet. Der Kopplungsansatz wurde auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,75 cm/h eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen à 2 ml aufgefangen. Zur Bestimmung der 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.

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

3.3.2.3 Überprüfung und Bewertung der Konjugatfraktionen

Die Konjugatfraktionen, die sowohl hohe absolute Proteingehalte als auch Reinheitszahlen zwischen 0,3 und 0,6 aufwiesen, wurden in modifizierten Sandwich-Enzymimmuntests überprüft. Für den Sandwich-Enzymimmuntest wurden Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen gefällten Antiserum (s. 3.3.1) in einer Verdünnung von 1: 500 in Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität) beschichtet. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Platten ausgeschlagen. Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen wurde 2 % Kasein/PBS verwendet (200 µl/Kavität, 30 Minuten). Nach dreimaligem Waschen und Ausschlagen der Platten, wurde in eine Hälfte der Platte antigenhaltige PBS-Lösung (bovines GFAP, 100 ng/ml, 100 µl/Kavität), in die andere Hälfte der Platte antigenfreie PBS-Lösung (100 µl/Kavität) pipettiert. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal gewaschen und zum Entfernen von Restflüssigkeit ausgeschlagen. Anschließend wurden die Konjugatfraktionen in vier Verdünnungsstufen (1: 100 bis 1: 2 000 in 1 % Kasein/PBS) im Doppelansatz jeweils auf beide Plattenhälften pipettiert. Nach erneuter einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal gewaschen, die Restflüssigkeit entfernt und Substratlösung zugegeben (100 µl/Kavität). Die Enzymreaktion wurde nach 10 Minuten durch Zugabe von 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm photometrisch bestimmt.

Konjugatfraktionen, die in diesem Testaufbau hohe Extinktionswerte für die antigenhaltige Probenlösung und gleichzeitig möglichst geringe Extinktionswerte für die antigenfreie Probenlösung ergaben, wurden gepoolt, mit 0,01 % Thimerosal versetzt und portionsweise bei -18 °C gelagert. Die so gewonnenen Antikörper-Enzym-Konjugate wurden als Detektionsantikörper im Sandwich-Enzymimmuntest (s. 3.4) eingesetzt.

3.3.3 Ergebnisse

Sowohl die nach 3.3.1 hergestellten Fängerantikörper, als auch die nach 3.3.2 hergestellten Detektionsantikörper erwiesen sich in der Überprüfung mittels modifiziertem Sandwich-Enzymimmuntest (s. 3.3.2.3) als geeignet zum Nachweis von bovinem GFAP: es ergaben sich hohe Extinktionen bei antigenhaltiger und geringe Extinktionen bei antigenfreier Probenlösung. Tabelle 6 zeigt eine Aufstellung aller zur Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten verwendeten Seren der drei Spezies.

3.4 Erstellung von Sandwich-Enzymimmuntests, Überprüfung derer Tierartspezifität und Selektion der geeignetsten Testkombination

3.4.1 Erstellung von Sandwich-Enzymimmuntests

Mit den gefällten Anti-GFAP-Antiseren (als Fängerantikörper) in Kombination mit den daraus hergestellten Anti-GFAP-Enzym-Konjugaten (als Detektionsantikörper) wurden Sandwich-Enzymimmuntests im Mikrotiterplatten-System entwickelt. Dazu wurden

Tabelle 6: Übersicht der gefällten Wochenseren und der daraus hergestellten Antikörper-Enzym-Konjugate

Serum von (Immunisierungswoche)	Antikörper-Enzym-Konjugat	
	Verwendete Fraktionen nach Gelchromatographie	Durchschnittliche Reinheitszahl
K09 (40. Woche)	22 – 27	0,57
K10 (20. Woche)	25 – 28	0,54
K11 (40. Woche)	26 – 29	0,41
Sf01 (11. Woche)	25 – 27	0,28
Sf02 (11. Woche)	25 – 27	0,37
Sw01 (5. Woche)	25 + 26	0,38
Sw02 (5. Woche)	25 + 26	0,35

Mikrotiterplatten mit den gefällten Antiseren beschichtet (1: 500 in Bicarbonatpuffer verdünnt; 100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Restflüssigkeit wurde durch Ausklopfen aus den Platten entfernt und freie Bindungsstellen durch Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 % Kasein/PBS (200 µl/Kavität) blockiert. Nach dreimaligem Waschen und Ausschlagen der Platten, wurde pro Kavität 100 µl GFAP-Lösung zugegeben. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, erneut dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Anschließend wurde Anti-GFAP-Enzym-Konjugat, 1: 500 in 1 % Kasein/PBS verdünnt, zugegeben (100 µl/Kavität). Nach erneuter einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Pro Kavität wurden 100 µl Substratlösung zupipettiert. Nach 10 Minuten wurde die Farbreaktion durch Zugabe einmolarer Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm im Photometer gemessen.

3.4.2 Überprüfung der Tierartspezifität

Zur Überprüfung der Tierartspezifität aller 49 möglichen Testkombinationen aus Fänger- und Detektionsantikörper wurden zunächst vergleichende Untersuchungen zwischen bovinem und porcinem GFAP durchgeführt. Für die Untersuchung wurden sowohl Proteinstandardlösungen als auch Extrakte aus ZNS von Rind und Schwein verwendet. Mit den jeweiligen Proteinstandardlösungen wurden Standardkurven für bovines und porcines GFAP in einem Konzentrationsbereich von 1,4 bis 3000 ng/ml (100 µl/Kavität) erstellt und im unter 3.4.1 beschriebenen Mikrotiterplatten-System eingesetzt. Als Verdünnungsmedium für die Proteinstandardlösungen wurde PBS verwendet. Für die ZNS-Extrakte wurden Gehirn- und Rückenmarkspalten von Rind und Schwein extrahiert. Die Extraktion erfolgte in Anlehnung an die für ein kommerzielles GFAP-Testsystem beschriebene Arbeitsanleitung (RIDASCREEN[®] Risk Material Test, R-Biopharm). Das Gehirn- bzw. Rückenmarksmaterial wurde mittels einer Moulinette homogenisiert. Jeweils 5 g des homogenisierten Probenmaterials wurden mit 50 ml einer 1 %igen SDS-Lösung versetzt und drei Minuten im Stomacher homogenisiert. Anschließend wurde die Extraktionsmischung 15 Minuten bei 100 °C gekocht, abgekühlt und bei 3500 x g für 10 Minuten bei 10 °C zentrifugiert. Die aufzentrifugierte Fettschicht wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette entfernt und der wässrige Extrakt gewonnen. Zur Untersuchung im Sandwich-Enzymimmuntest wurden diese Extrakte

1: 10 bis 1: 10⁶ in 0,5 % Triton-X-100/PBS verdünnt und als GFAP-Lösung (100 µl/Kavität) im oben beschriebenen Mikrotiterplatten-System eingesetzt.

Da auf Grund der verfügbaren Immunreagenzien (7 Antiseren, 7 Enzymkonjugate) insgesamt 49 Testaufbauten möglich waren, wurde zum Vergleich der Testsysteme die Speziespezifität unter standardisierten Bedingungen verwendet: als Maß für die jeweilige Testspezifität (Spezifitätskennzahl) wurde der Messsignalunterschied im Enzymimmuntest zwischen bovinem und porcinem GFAP bzw. Rinder- und Schweinegehirn bei gleicher Protein- bzw. Extraktkonzentration eingesetzt:

$$\text{Spezifitätskennzahl} = \frac{\text{Messwert bei 450 nm für bovines GFAP (bzw. Gehirnextrakt)}}{\text{Messwert bei 450 nm für porcines GFAP (bzw. Gehirnextrakt)}}$$

3.4.3 Ergebnisse

Mittels aller 49 möglichen Testkombinationen konnte GFAP sowohl in Proteinstandardlösungen als auch in ZNS-Extrakten nachgewiesen werden. Mit einem Teil der Kombinationen konnte eine spezifischere Erkennung bovines GFAPs gegenüber porcinen GFAPs über mindestens drei Verdünnungsstufen nachgewiesen werden. Die Abbildung 6 zeigt exemplarisch einen Standardkurvenvergleich aus Proteinstandardlösungen mit diesem Ergebnis. In Spezifitätskennzahlen quantifiziert bedeutet dies, dass der Quotient aus den Messsignalen für bovines und porcines GFAP > 1 war. Ergaben sich Spezifitätskennzahlen ≤ 1 , so bedeutet dies, dass porcines und bovines GFAP mit gleichen Messsignalen erkannt wurden, bzw. dass porcines GFAP ein höheres Messsignal als bovines GFAP ergab. Abbildung 7 zeigt exemplarisch einen Standardkurvenvergleich mit Spezifitätskennzahlen < 1 . In Tabelle 7 sind die Spezifitätskennzahlen aller 49 möglichen Kombinationen über zwei Verdünnungsstufen für Proteinstandardlösungen und in Tabelle 8 für Gehirnextrakte aufgelistet. Insgesamt ergaben sich für 34 Kombinationen unter Verwendung von Proteinstandardlösungen und für 26 Kombinationen unter Verwendung von Gehirnextrakten Spezifitätskennzahlen > 1 . Bei einigen Kombinationen wichen die mittels Gehirnextrakt ermittelten Spezifitätskennzahlen signifikant von den unter Verwendung von Proteinstandardlösungen ermittelten ab. Teilweise ergaben sich dadurch Spezifitätskonversionen, z. B. für die Kombination aus Antiserum K09 mit Antikörper-Enzym-Konjugat K11: hier lag die mittels Gehirnextrakten berechnete Spezifitätskennzahl

> 1, während sie unter Verwendung der Proteinstandardlösungen < 1 war. Für andere Kombinationen, z.B. Antiserum Sw02 mit Antikörper-Enzym-Konjugat K10, lagen die für Gehirnextrakte ermittelten Spezifitätskennzahlen unter den für Proteinstandardlösungen ermittelten.

Die Extinktion für die Rückenmarksextrakte lag jeweils über der Extinktion für Gehirnextrakte. Nur für wenige Kombinationen lag die Extinktion für Rindergehirn auch signifikant höher, als diejenige für Schweinerückenmark. Die Abbildung 8 zeigt vergleichend die Reaktivität des Testsystems Sw01/K09 mit Gehirn- und Rückenmarksextrakten von Schwein und Rind. Diese Kombination erzielte die höchsten Spezifitätskennzahlen unter Verwendung der Gehirnextrakte und die höchsten Extinktionsunterschiede zwischen Rindergehirn und Schweinerückenmark. Ein absoluter Gehalt von 10 µg Rindergehirn im Extrakt (entspricht Verdünnungsstufe 1: 10 000) ergab hier die gleiche Messsignalstärke (0,5 Einheiten) wie die 10-fach höhere Konzentration an Schweinegehirn (Verdünnung 1: 1 000).

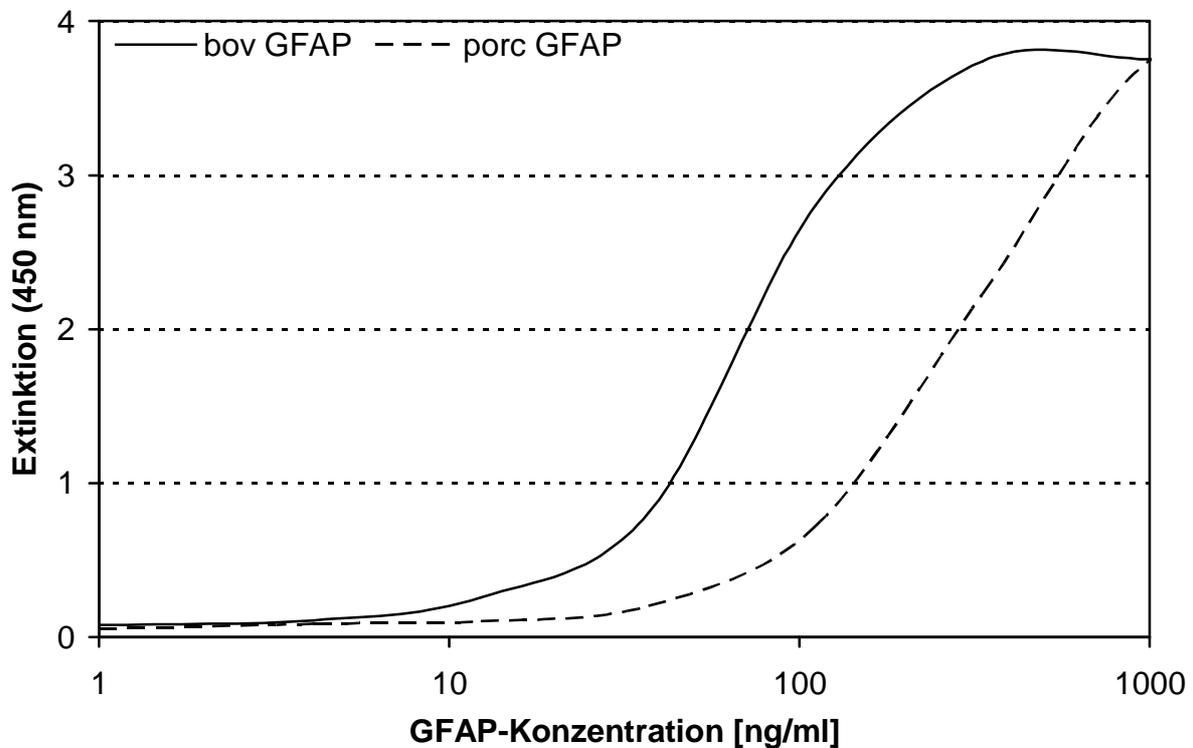


Abbildung 6: Standardkurvenvergleich mit bovinen und porcinen GFAP-Standardlösungen im Sandwich-Enzymimmuntest K09/ K09.

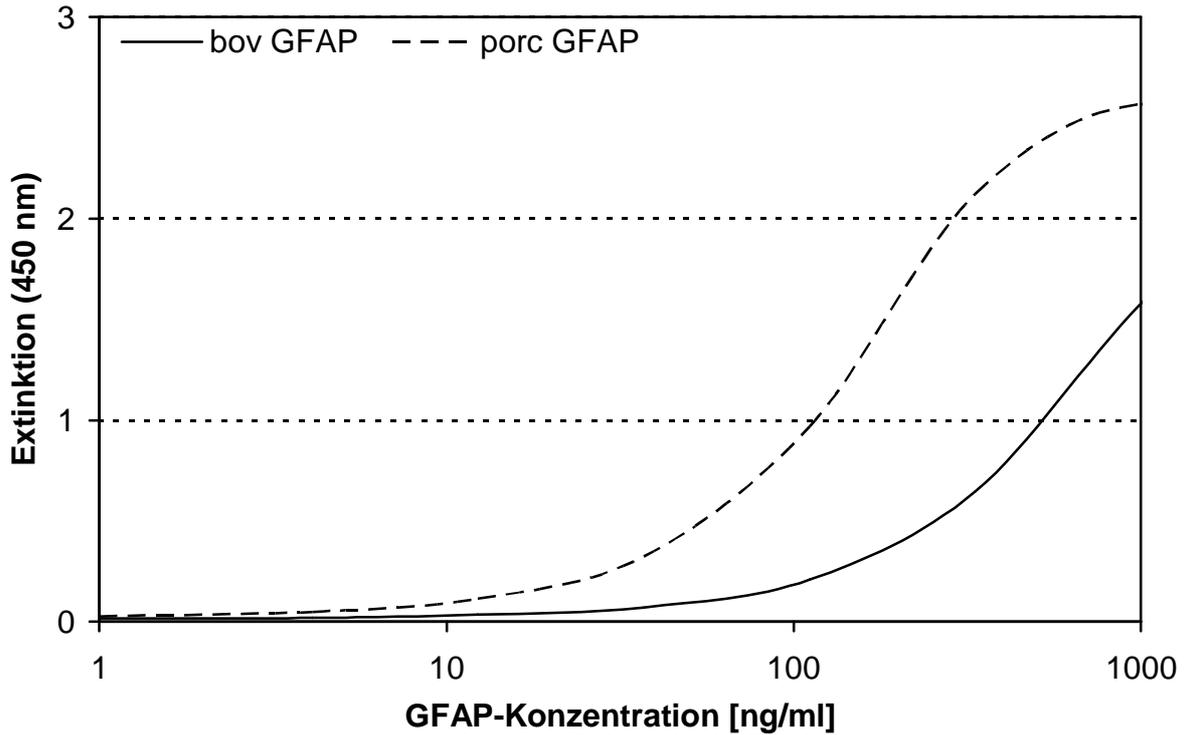


Abbildung 7: Standardkurvenvergleich mit bovinen und porcinen GFAP-Standardlösungen im Sandwich-Enzymimmuntest K09/ K11

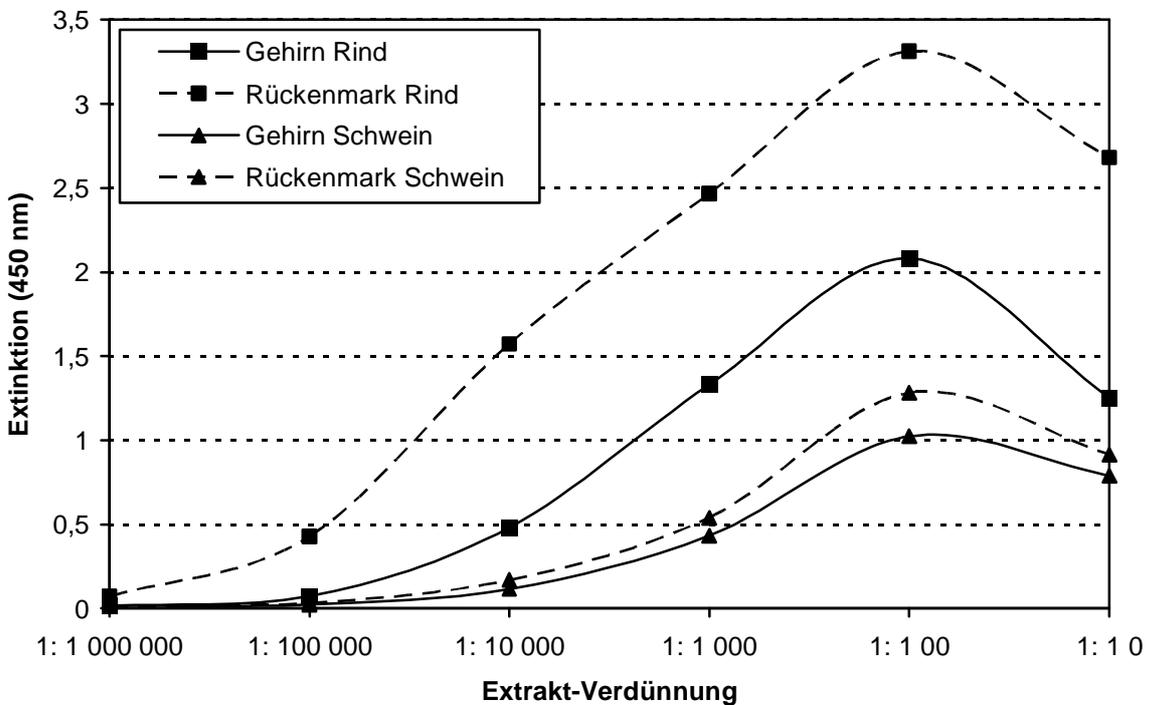


Abbildung 8: Reaktivität von Gehirns- und Rückenmarksextrakten von Rind und Schwein im Sandwich-Enzymimmuntest Sw01/K09.

Tabelle 7: Spezifitätskennzahlen* für den Nachweis von bovinem GFAP im Verhältnis zu porcinem GFAP, ermittelt bei GFAP-Standard-Konzentrationen von 37 ng/ml und 111 ng/ml

Beschichtung mit Fängerantikörper	GFAP-Konzentration [ng/ml]	Spezifitätskennzahl unter Verwendung des Detektionsantikörpers							
		K09	K10	K11	Sf01	Sf02	Sw01	Sw02	
K09	37	6,3	0,6	0,4	1,1	1,1	1,2	1,0	
	111	5,8	0,6	0,4	1,2	1,3	1,1	1,0	
K10	37	3,8	0,6	1,0	1,4	1,2	1,1	0,4	
	111	2,7	0,7	0,5	2,2	1,8	1,2	1,1	
K11	37	2,6	3,4	1,3	1,2	1,2	1,1	1,0	
	111	2,4	3,6	1,5	2,1	1,5	1,4	2,2	
Sf01	37	1,9	1,4	1,4	1,0	1,0	1,3	1,1	
	111	2,8	1,4	2,1	1,1	1,0	1,6	1,0	
Sf02	37	2,3	1,0	1,7	1,0	1,0	1,3	1,3	
	111	3,5	1,0	1,9	0,9	1,0	1,0	1,6	
Sw01	37	1,4	1,0	0,9	1,2	1,3	2,1	2,2	
	111	1,7	1,3	1,0	1,5	1,8	2,6	2,7	
Sw02	37	3,4	3,1	0,4	1,0	1,1	2,2	1,3	
	111	3,0	3,8	0,2	1,1	1,2	3,6	1,6	

* Spezifitätskennzahl = Verhältnis der Extinktion für bovines GFAP zur Extinktion für porcines GFAP, gemessen bei 450 nm

Tabelle 8: Spezifitätskennzahlen* für den Nachweis von Extrakten aus Rindergehirn im Verhältnis zu Extrakten aus Schweinegehirn, ermittelt bei Extrakt-Verdünnungsstufen von 1: 1 000 und 1: 10 000

Beschichtung mit Fängerantikörper	Extrakt-Verdünnung	Spezifitätskennzahl unter Verwendung des Detektionsantikörpers						
		K09	K10	K11	Sf01	Sf02	Sw01	Sw02
K09	1: 1 000	1,1	0,9	1,2	1,1	1,1	1,0	0,9
	1:10 000	1,0	0,6	1,5	1,0	1,2	0,9	0,7
K10	1: 1 000	1,1	1,0	1,4	1,5	1,3	1,8	1,3
	1:10 000	1,3	1,0	2,0	1,0	1,2	1,5	1,1
K11	1: 1 000	0,9	1,1	1,3	1,4	1,1	1,9	1,3
	1:10 000	1,1	1,0	1,8	0,9	0,9	1,5	0,8
Sf01	1: 1 000	2,9	2,0	1,8	1,1	1,1	2,6	1,0
	1:10 000	2,1	1,6	1,2	1,1	1,0	1,3	0,9
Sf02	1: 1 000	2,6	1,5	1,9	0,9	1,0	2,1	0,9
	1:10 000	1,7	1,5	1,5	0,9	1,0	1,3	0,7
Sw01	1: 1 000	2,5	2,0	2,3	0,9	0,9	1,0	0,7
	1:10 000	3,4	2,1	2,0	0,9	1,0	0,9	0,6
Sw02	1: 1 000	2,3	1,5	2,2	1,2	1,0	2,4	1,1
	1:10 000	2,3	1,1	1,9	1,1	1,0	1,5	0,9

* Spezifitätskennzahl = Verhältnis der Extinktion für Extrakt aus Rindergehirn zur Extinktion für Extrakt aus Schweinegehirn, gemessen bei 450 nm

3.4.4 Selektion der geeignetsten Immunreagenzien-Kombination für den Sandwich-Enzymimmuntest

Da nach bisherigen Veröffentlichungen (s. 2.3) insbesondere die mangelnde Tierartspezifität von Anti-GFAP-Antikörpern das Problem des eindeutigen Rinder-ZNS-Nachweises war, wurde zur Selektion des geeignetsten Testsystems die Speziespezifität als entscheidendes Kriterium festgelegt. Für die praktische Anwendung des Testsystems ist die im Extrakt ermittelte Spezifität entscheidend. Deshalb erfolgte die Auswahl der optimalen Immunreagenzien anhand der Spezifitätskennzahlen für ZNS-Extrakte, unter Berücksichtigung der Spezifitätskennzahlen für GFAP-Standardlösungen im Sandwich-Enzymimmuntest. Für die Kombination aus Sw01 als Fängerantikörper und K09 als Detektionsantikörper konnten, wie in Tabelle 8 dargestellt, die höchsten Spezifitätskennzahlen unter Verwendung der ZNS-Extrakte ermittelt werden. Da für diese Kombination auch unter Verwendung von Proteinstandardlösungen Spezifitätskennzahlen > 1 errechnet werden konnten (s. Tabelle 7), wurde diese Kombination als die geeignetste identifiziert.

Um ein möglichst großes Volumen gleichwertigen Antiserums zu erhalten, wurden die Wochenseren mit hohen spezifischen Antikörpertitern von K09 (alle entnommenen Wochenseren zwischen 20. und 50. Woche) und das Endserum von Sw01 verwendet. Die Antiseren von K09 wurden gepoolt, präzipitiert und mit HRP konjugiert. Das Endserum von Sw01 wurde ebenfalls präzipitiert. Dieses im Folgenden ausschließlich verwendete Standard-Testsystem wurde als Enzymimmuntest Sw01/K09-HRP bezeichnet.

3.5 Optimierung der Sensitivität und Überprüfung der Probenaufbereitung

3.5.1 Optimierung der Sensitivität

Eine Optimierung der Nachweisempfindlichkeit des Testsystems kann durch Wahl der geeigneten Immunreagenzien-Konzentration erzielt werden. Zur Ermittlung der optimalen Konzentration der nach 3.4.4 ausgewählten Immunreagenzien wurden Mikrotiterplatten mit Verdünnungsreihen (1: 125 bis 1: 16 000) des Antiserums von Sw01 beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absättigung für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 % Kasein/PBS (200 μ l/Kavität), dreimaligem Waschen und Ausschlagen der Platten,

wurde in die eine Plattenhälfte antigenfreie (100 µl/Kavität) und in die andere Plattenhälfte antigenhaltige PBS-Lösung (100 ng/ml; 100 µl/Kavität) einpipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Antikörper-Enzym-Konjugat von K09 wurde in einer Verdünnungsreihe (1: 125 bis 1: 16 000 in 1 % Casein/PBS, 100 µl pro Kavität) zugegeben. Die Platten wurden erneut eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, ausgeschlagen und gewaschen. Anschließend wurde Substratlösung (100 µl/Kavität) zupipettiert. Nach 10 Minuten wurde die Farbreaktion mit 1 molarer Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm im Photometer bestimmt.

Diejenigen Konzentrationen der Immunreagenzien, welche bei möglichst geringen Extinktionswerten der antigenfreien Lösung den größten Extinktionsunterschied zwischen antigenhaltiger und antigenfreier Probenlösung aufwiesen, wurden ausgewählt um Standardkurven mit bovinem GFAP im Konzentrationsbereich von 1,4 bis 3 000 ng/ml zu erstellen. Als Nachweisgrenze wurde diejenige Antigenkonzentration definiert, deren Extinktion den dreifachen Wert (300 %) der Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes (PBS) erreichte.

3.5.2 Ergebnisse der Sensitivitätsoptimierung

Änderungen im Konzentrationsbereich der jeweiligen Immunreagenzien beeinflussten das Testsystem erheblich, wobei die Variation der Beschichtungskonzentration (Abbildung 10) einen geringeren Einfluss auf den Standardkurvenverlauf hatte, als die der Konjugatkonzentration (Abbildung 11). Bei einer Beschichtungskonzentration (Sw01/9. Woche) von 1: 4 000 in Kombination mit einer Konjugatkonzentration (K09/Pool 20.-50. Woche) von 1: 500 konnten bei sehr geringen Extinktionen der antigenfreien PBS-Lösung die größten Extinktionsdifferenzen zwischen antigenhaltiger und antigenfreier Probenlösung ermittelt werden. Die Nachweisgrenze für bovines GFAP lag unter diesen Bedingungen zwischen 4,1 ng/ml und 12,3 ng/ml. In den weiteren Versuchen wurden die Immunreagenzien jeweils in dieser Konzentration eingesetzt.

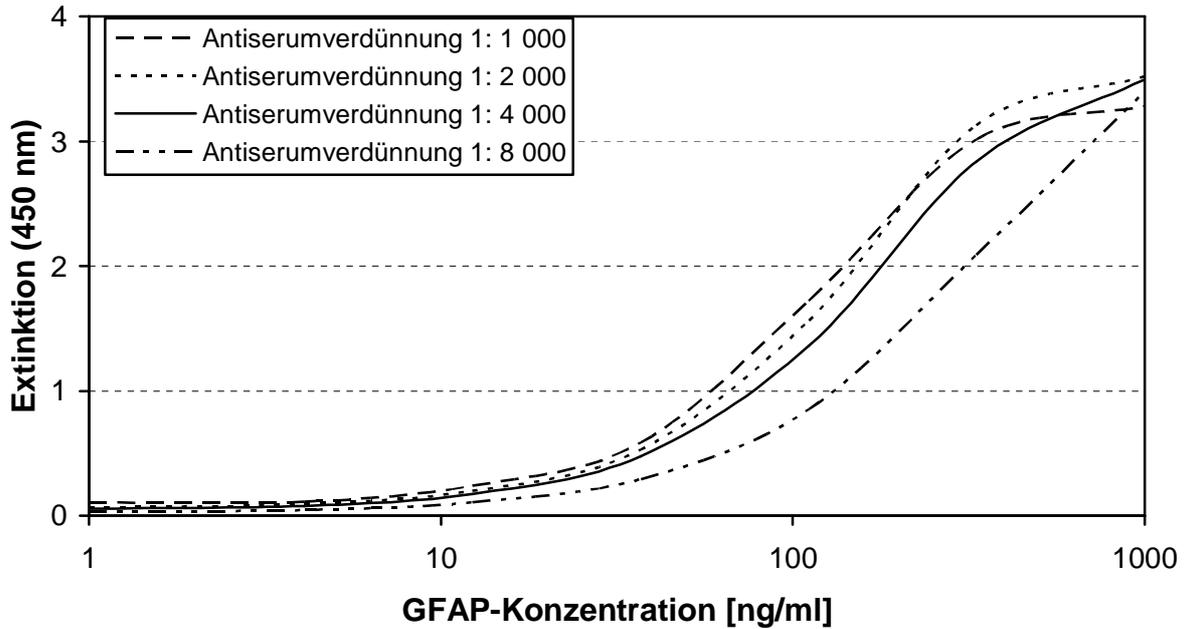


Abbildung 10: Standardkurven (in PBS) für den Nachweis von bovinem GFAP unter Verwendung verschiedener Beschichtungskonzentrationen des Antiserums Sw01/9.Woche und des Antikörper-Enzym-Konjugates K09/Pool 20.-50. Woche (1: 500)

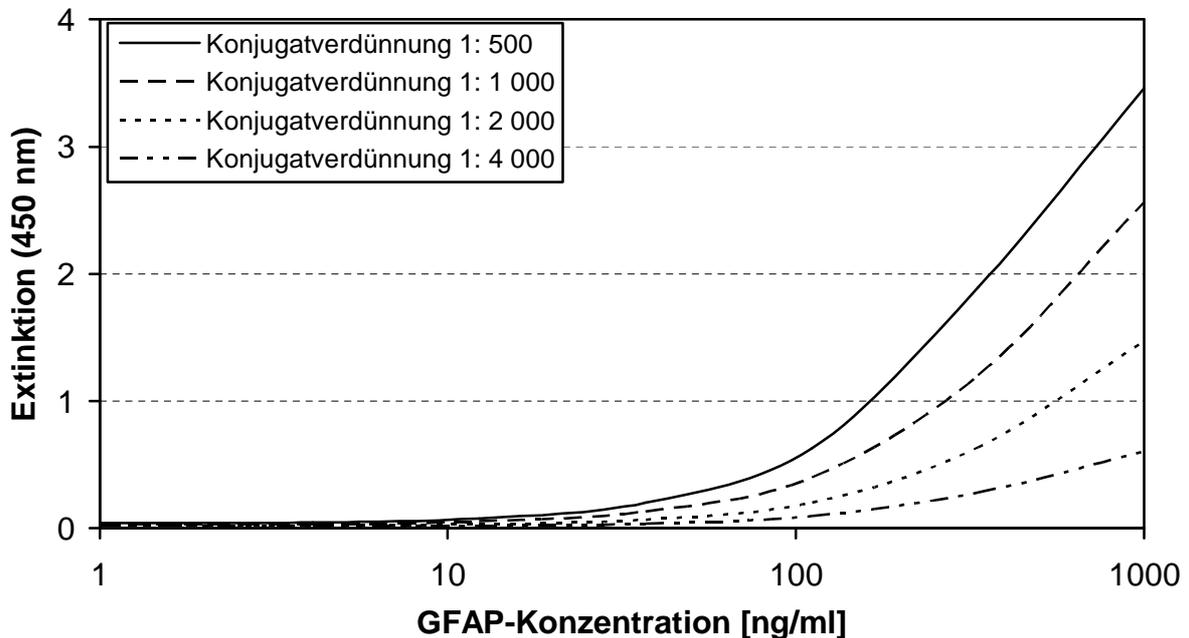


Abbildung 11: Standardkurven (in PBS) für den Nachweis von bovinem GFAP unter Verwendung des Standard-Testsystems Sw01/K09-HRP bei einer Beschichtungskonzentration entsprechend einer Verdünnung von 1 : 4 000 und verschiedenen Verdünnungen des Antikörper-Enzym-Konjugats von K09

3.5.3 Überprüfung der Probenaufbereitung

Um eine möglichst einfache und effektive Probenaufbereitung zu gewährleisten, unter Berücksichtigung variabler Matrixeinflüsse durch verschiedene Fleischerzeugnisse, wurden die Untersuchungen zur Probenaufbereitung mit künstlich kontaminiertem rohem Schweinehackfleisch durchgeführt. Für die Kontamination wurde das Schweinehackfleisch mit jeweils 10 % Rindergehirn oder Schweinegehirn versetzt, mittels einer Moulinette homogenisiert und bis zur Verwendung bei -18 °C gelagert. Die Überprüfung der Extrakte erfolgte im nach 3.5.2 optimierten Enzymimmuntest.

Neben der bisher als Extraktionsmittel verwendeten 1 %igen SDS-Lösung wurden die kontaminierten Hackfleischproben ebenfalls mit A. dest., PBS, 0,1 % SDS, 1 % SDS/PBS und 1% SDS/Phosphatgepufferter Kochsalzlösung extrahiert. Die ansonsten auf die in 3.4.4 beschriebene Weise hergestellten Extrakte wurden für die Überprüfung im Enzymimmuntest 1: 100 bis 1: 10 000 in 0,5 % Triton X-100/PBS verdünnt.

Für die Überprüfung der Extraktionsbedingungen wurden die Proben bei Temperaturen von 95 oder 100 °C und verschiedener Zeitdauer extrahiert. Zusätzlich zu dem bisher durchgeführten 15minütigen Kochen, wurden Proben 5, 10, 15 oder 20 Minuten bei 95 °C inkubiert bzw. eine der Proben wurde statt bei Raumtemperatur mit 95 °C heißer 1 %iger SDS-Lösung gestomachert. Für die Überprüfung im Enzymimmuntest wurden die Extrakte 1: 100 bis 1: 10 000 in 0,5 % Triton X-100/PBS verdünnt. Auch hier wurden alle anderen Extraktionsschritte nach der unter 3.4.4 beschriebenen Methode durchgeführt.

Als Verdünnungsmedium für den nach 3.4.4 hergestellten Extrakt wurden A. dest, PBS, 0,5 % Triton X-100, 0,5 % Triton X-100/PBS und Verdünnungsreihen von 1 % bis 0,00001 % SDS in PBS bzw. 0,5 % Triton X-100/PBS verwendet. Der Extrakt wurde jeweils 1: 10 in diesen Medien verdünnt und im Enzymimmuntest Sw01/K09-HRP eingesetzt.

3.5.4 Ergebnisse der Überprüfung der Probenaufbereitung

Die Anwendung der unterschiedlich konzentrierten und zusammengesetzten Extraktionsmittel hatte einen erheblichen Einfluss auf die Extraktion des bovinen GFAPs aus mit ZNS

kontaminierten Fleischerzeugnissen. Wie die Abbildung 12 zeigt, konnten unter Verwendung einprozentiger SDS-Lösung in A. dest und PBS die höchsten Extinktionen bei gleichen Extraktverdünnungsstufen erzielt werden. Bei fehlendem bzw. geringerem SDS-Zusatz oder hohen Salzkonzentrationen konnten im Gegensatz dazu nur geringe Mengen bovinen GFAPs im Extrakt nachgewiesen werden. Dies trifft sowohl für mit Rinder-, als auch für mit Schweinegehirn kontaminierte Proben zu. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle folgenden Extraktionen weiterhin mit der bisher verwendeten 1 %igen SDS-Lösung durchgeführt.

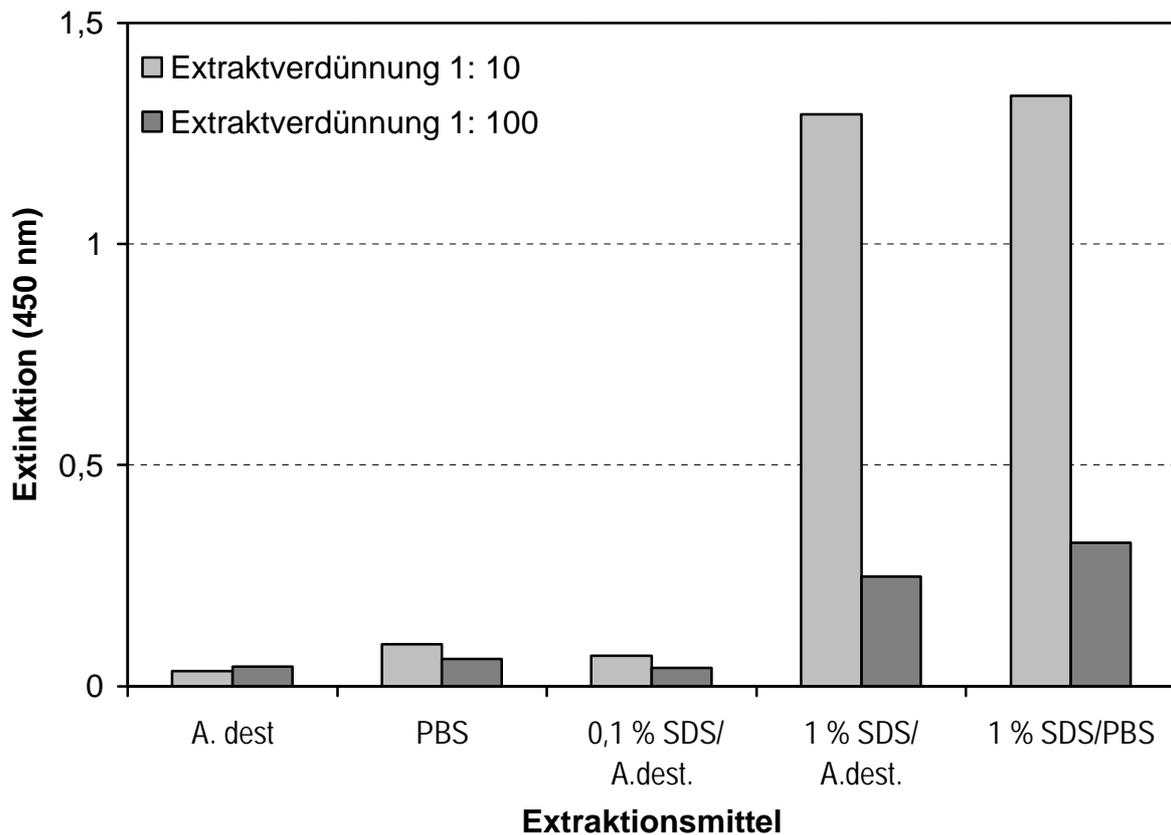


Abbildung 12: Messwerte (Extinktion bei 450 nm) für Extrakte einer mit 10 % Rindergehirn kontaminierten Schweinehackfleisch-Probe (jeweils 1: 10 und 1: 100 verdünnt in 0,5 % Triton X-100/PBS) unter Verwendung verschiedener Extraktionsmittel, Nachweis im Sandwich-Enzymimmuntest Sw01/K09-HRP.

Bei keiner der gewählten Temperatur-Zeit-Verhältnisse zwischen 15 minütigem Kochen und Stomachern in 95 °C heißer 1 %iger SDS-Lösung konnte ein entscheidend höheres Ergebnis ermittelt werden. Im Vergleich erreichten alle untersuchten Proben, wie in Abbildung 13 dargestellt, bei gleichen Verdünnungsstufen ähnliche Extinktionswerte. Dies trifft ebenfalls sowohl für mit Rinder-, als auch für mit Schweinehirn kontaminierte Proben zu. Wegen der einfachsten und schnellsten Durchführbarkeit wurden die Proben bei den folgenden Extraktionen nach dem Stomachern mit 1 % SDS für 5 Minuten bei 95 °C im Wasserbad inkubiert.

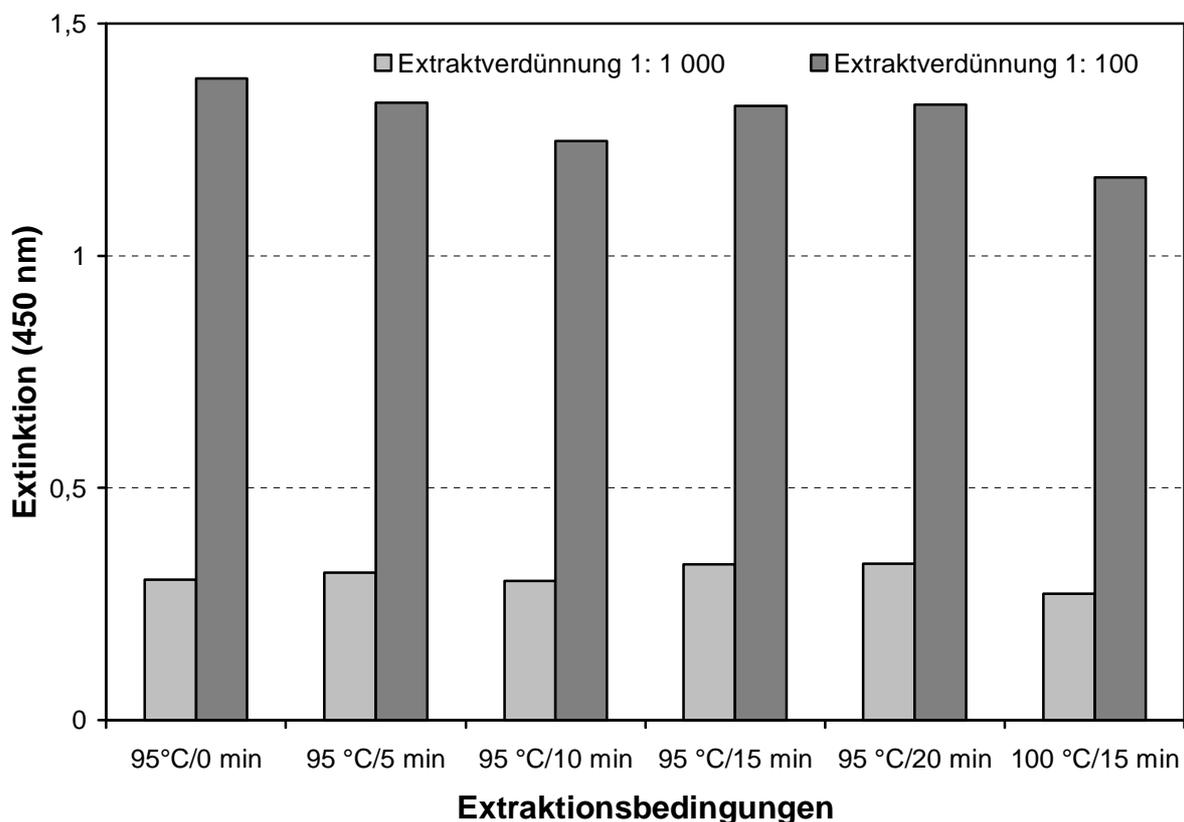


Abbildung 13: Messwerte (Extinktion bei 450 nm) für unter Verwendung von 1 % SDS/PBS bei verschiedenen Temperatur-Zeit-Bedingungen hergestellte Extrakte einer mit 10 % Rinderhirn kontaminierten Schweinehackfleisch-Probe (jeweils 1: 100 und 1: 1 000 verdünnt in 0,5 % Triton X-100/PBS), Nachweis wie Abb. 12 im Enzymimmunttest Sw01/K09-HRP

Unter Verwendung der verschiedenen Verdünnungsmedien bei gleichen Extraktverdünnungen ergaben sich wesentlich höhere Extinktionen bei Verdünnung der Extrakte in 0,5 % Triton X-100/PBS, wie in Abbildung 14 anhand ausgewählter Verdünnungsmedien dargestellt. Die Abbildung 14 zeigt ebenfalls, dass bei Kombination von 0,5 % Triton X-100/PBS mit verschiedenen SDS Konzentrationen ein SDS-Gehalt $\leq 0,01$ % keinen signifikant negativen Einfluss auf die Höhe der Extinktion hatte. Durch Wahl einer Mindestverdünnung für alle Extrakte (enthalten 1 % SDS) von 1: 100 kann somit erreicht werden, dass Einflüsse auf die Extinktion durch SDS minimiert werden.

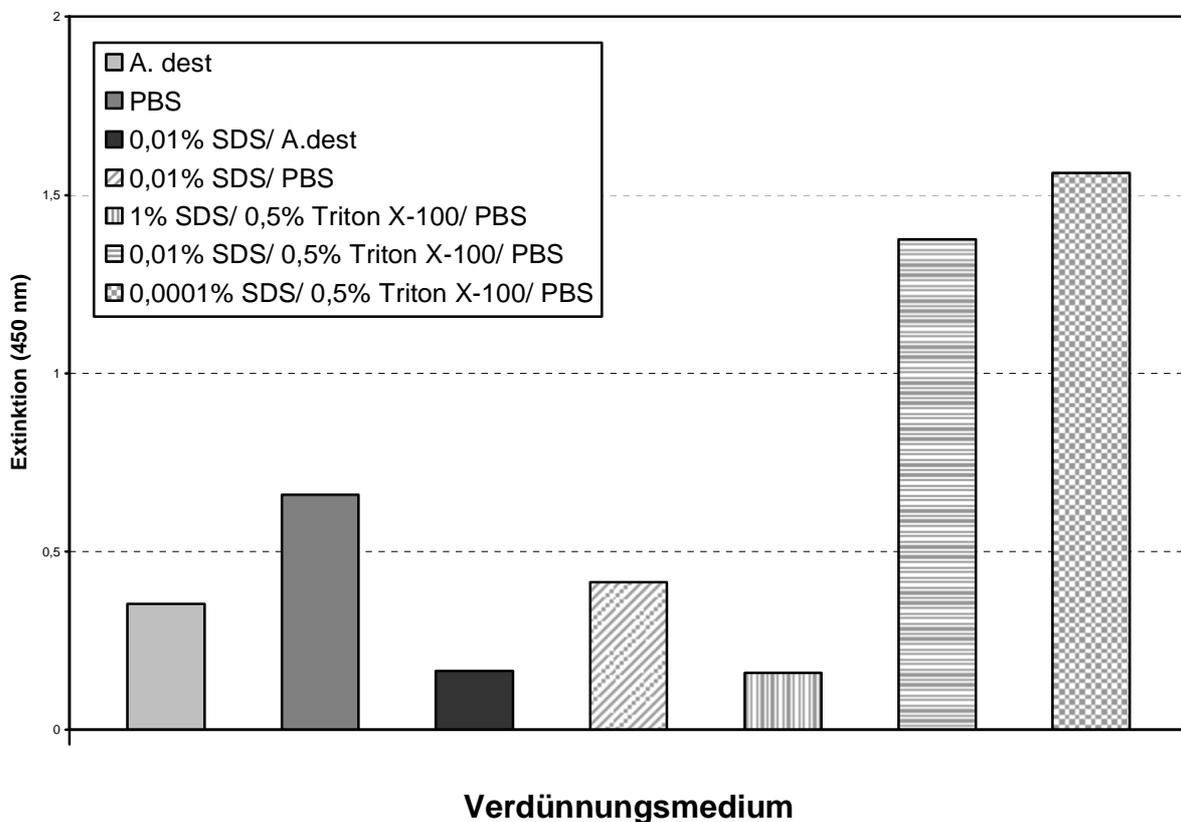


Abbildung 14: Extinktion bei 450 nm für Extrakte (1 % SDS/PBS, 95 °C, 5 min) von mit 10 % Rindergehirn kontaminiertem Schweinehackfleisch nach Extraktverdünnung in verschiedenen Lösungsmitteln, Nachweis im Enzymimmuntest Sw01/K09-HRP wie in Abb. 12

3.6 Standardisierung des Testsystems zum Nachweis von Gehirnäquivalenten

3.6.1 Durchführung der Standardisierung

Um bei der Untersuchung von Fleischerzeugnissen eine quantitative Aussage über den ZNS-Gehalt treffen zu können, wurde das Testsystem mittels eines selbst hergestellten „internen Gehirnstandards“ kalibriert. Dazu wurden komplette Großhirne dreier adulter Rinder jeweils einzeln mittels einer Moulinette homogenisiert und zu gleichen Anteilen miteinander homogenisiert. Dieses Mischhomogenisat wurde unter denselben Bedingungen wie die zu untersuchenden Proben extrahiert. Dazu wurden jeweils 5 g des gemischten Gehirnhomogenisats mit 50 ml 1 %iger SDS/A. dest.-Lösung versetzt und drei Minuten im Stomacher homogenisiert. Anschließend wurde die Extraktionsmischung 5 Minuten bei 95 °C im Wasserbad inkubiert, bei Raumtemperatur abgekühlt und bei 3500 x g für 10 Minuten bei 10 °C zentrifugiert. Die aufzentrifugierte Fettschicht wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette entfernt und der wässrige Extrakt gewonnen. Die ZNS-Konzentration im unverdünnten Extrakt entspricht hier 100 mg Rindergehirn-Äquivalent (GÄq) pro ml Extrakt. Zur Standardisierung des Tests wurde eine Verdünnungsreihe mit 1 bis 27 µg GÄq/ml Extrakt erstellt. Die Nachweisgrenze wurde analog zu 3.5.1 als diejenige Antigenkonzentration definiert, deren Extinktion den dreifachen Wert (300 %) der Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes (PBS) erreichte.

3.6.2 Ergebnisse der Standardisierung

Unter Verwendung des mittels „internem Gehirnstandard“ genormten Testsystems lag die Nachweisgrenze zwischen 1 µg und 3 µg GÄq/ml Extrakt. In Abbildung 15 ist exemplarisch eine Standardkurve für diesen Testaufbau dargestellt.

3.7 Überprüfung der Testsensitivität in Fleischerzeugnissen

Zur Ermittlung der Nachweisempfindlichkeit des Enzymimmuntests für ZNS vom Rind wurden rohe und erhitzte Fleischerzeugnisse mit definierten Mengen Gehirn und Rückenmark hergestellt, extrahiert und im Enzymimmuntest untersucht.

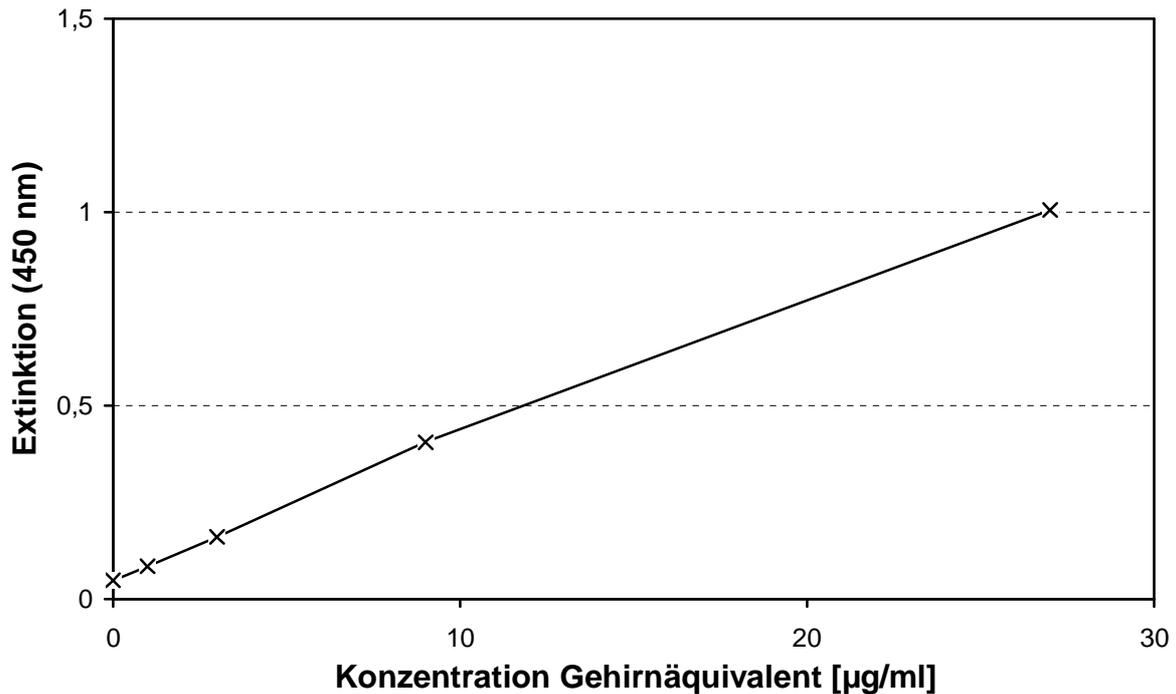


Abbildung 15: Standardkurve für Rindergehirnextrakt (in 0,5 % Triton X-100/PBS) im Sandwich-Enzymimmunttest Sw01/K09-HRP

3.7.1 Herstellung mit ZNS vom Rind kontaminierter Fleischerzeugnisse

Die Tabelle 9 zeigt eine Übersicht aller hergestellten, mit ZNS vom Rind kontaminierten, rohen und erhitzten Fleischerzeugnisse. Die Kontaminationskonzentrationen lagen jeweils zwischen 0 % und 8 %. Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der rohen Fleischerzeugnisse wurde Hackfleisch frisch in einer örtlichen Metzgerei erworben. Für die Kontamination mit Rindergehirn wurde das Mischhomogenisat der drei Rinder-Großhirne verarbeitet, welches auch zur Herstellung des „internen Gehirnstandards“ (s. 3.6.1) verwendet wurde. Um mit Rinderrückenmark kontaminierte Proben herzustellen wurden zwei Rückenmarke adulter Rinder mittels einer Moulinette homogenisiert und zu gleichen Anteilen miteinander homogenisiert. Für die Herstellung der verschiedenen Konzentrationsstufen wurden Hackfleisch und ZNS-Material abgewogen, ebenfalls mit einer Moulinette homogenisiert und bis zur Untersuchung bei -18 °C gelagert. Es wurde jeweils zuerst die höchste Kontaminationsstufe hergestellt und als Ausgangsmaterial für die geringeren Konzentrationsstufen verwendet.

Tabelle 9: Übersicht der zur Überprüfung der Testsensitivität hergestellten, künstlich mit ZNS vom Rind kontaminierten, rohen und erhitzten Probenmaterialien (x = hergestellt)

ZNS Konzentration [%]	Gehirn				Rückenmark
	rohes Hackfleisch	Kessel- konserve	Dreiviertel- konserve	Voll- konserve	rohes Hackfleisch
0	x	x	x	x	x
0,1	x	x	x	x	x
0,25	x				x
0,5	x				x
1		x	x	x	
2	x	x	x	x	x
8	x	x	x	x	
n Mischungsansätze	3	1	1	1	2

Die kontaminierten erhitzten Fleischerzeugnisse wurden durch das Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, der Justus-Liebig-Universität Gießen hergestellt. Bei den zur Verfügung gestellten Produkten 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).

3.7.2 Extraktion und Untersuchung der Proben im Enzymimmuntest

Für die Untersuchung im Enzymimmuntest wurden die nach 3.7.1 hergestellten, künstlich mit ZNS vom Rind kontaminierten, Proben nach dem unter 3.5.2 optimierten Verfahren extrahiert. Dazu wurden jeweils 5 g des homogenisierten Probenmaterials mit 50 ml 1 %iger SDS-Lösung versetzt und drei Minuten im Stomacher homogenisiert. Anschließend wurde die Extraktionsmischung 5 Minuten bei 95 °C im Wasserbad inkubiert, bei Raumtemperatur abgekühlt und bei 3500 x g für 10 Minuten bei 10 °C zentrifugiert. Die aufzentrifugierte

Fettschicht wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette entfernt und der wässrige Extrakt gewonnen. Zur Untersuchung im Sandwich-Enzymimmuntest wurden die Extrakte 1: 100, 1: 300 und 1: 900 in 0,5 % TritonX-100/PBS verdünnt. Neben den künstlich kontaminierten Proben wurden die mit 0 % kontaminierten Proben als Negativkontrolle mitgeführt. Bei Untersuchung der mit Rückenmark kontaminierten Proben wurde jeweils eine mit 0,5 % Gehirn kontaminierte Probe als Positivkontrolle mitgeführt.

Für den Sandwich-Enzymimmuntest wurden Mikrotiterplatten mit dem gefällten Antiserum von Schwein 1/9. Woche beschichtet (1: 4 000 in Bicarbonatpuffer verdünnt; 100 µl pro Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 % Kasein/PBS (200 µl/Kavität) blockiert. Nach dreimaligem Waschen und Ausschlagen der Platten, wurde pro Kavität 100 µl „interner Gehirnstandard“ (1-27 µg GÄq/ml) bzw. Probenlösung im Vierfachansatz zugegeben. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, erneut dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Anschließend wurde Anti-GFAP-Enzym-Konjugat von Kaninchen 09/Pool 20.-50. Woche, 1: 500 in 1 % Kasein/PBS verdünnt, zugegeben (100 µl/Kavität). Nach erneuter einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Pro Kavität wurde 100 µl Substratlösung zupipettiert. Nach 10 Minuten wurde die Farbreaktion durch Zugabe 1 molarer Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm im Photometer gemessen.

Als Nachweisgrenze wurde 3 µg GÄq/ml Extrakt festgelegt. Der prozentuale Anteil des als GÄq quantifizierten ZNS-Gehaltes am tatsächlichen ZNS Gehalt wurde als Wiederfindungsrate definiert:

$$\text{Wiederfindungsrate} = \frac{\text{Rindergehirn} - \text{Äquivalent (GÄq)}}{\text{tatsächlicher ZNS - Gehalt}} \times 100$$

Jede der hergestellten Proben wurde mindestens zweimal extrahiert und im Enzymimmuntest eingesetzt. Die Ergebnisse von Enzymimmuntests, deren Standardkurven nicht monoton waren, die Variationskoeffizienten von > 15 % oder die Korrelationskoeffizienten von < 0,97 für die Standardkurve aufwiesen, wurden durch wiederholte Untersuchungen überprüft. Proben, deren Extinktionen Variationskoeffizienten > 15 % aufwiesen, wurden erneut untersucht.

3.7.3 Sensitivität in künstlich kontaminierten Fleischerzeugnissen

In orientierenden Vorversuchen zeigte sich, dass die Extinktionen der Standardwerte bei linearer Auswertung annähernd auf einer Gerade lagen und die Wiederfindungsraten bei Verwendung der linearen Regression konstanter waren, als unter Standardkurvenauswertungen mittels kubischem Spline oder Logarithmus. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf die Eichgerade zur Auswertung der Ergebnisse verwendet.

Wie in den Tabellen 10 und 11 dargestellt, ergaben alle rohen Fleischerzeugnisse, die mindestens 0,5 % Rindergehirn oder 0,1 % -rückenmark enthielten, und alle erhitzten Fleischerzeugnisse, die mindestens 1 % Rindergehirn enthielten, im Enzymimmuntest ein Messsignal oberhalb der Nachweisgrenze, d.h. es wurde ZNS in der jeweiligen Probe detektiert. Innerhalb eines Enzymimmuntests konnte dabei stets ein quantitativer Unterschied zwischen den Messsignalen der verschiedenen Kontaminationskonzentrationen festgestellt werden, wie in Abbildung 16 für einen Enzymimmuntest dargestellt.

Tabelle 10: Qualitativer Nachweis von ZNS in künstlich mit Gehirn (Mischungsansätze 1 bis 3) oder Rückenmark (Mischungsansätze 1 und 2) vom Rind kontaminiertem Hackfleisch

ZNS	Ergebnis im Enzymimmuntest (n = 2)					
	Gehirn			Rückenmark		
	1	2	3	1	2	
Konzentration [%]						
0	--	--	--	--	--	
0,1	--	--	--	++	++	
0,25	--	-+	++	++	++	
0,5	++	++	++	++	++	
2	++	++	++	++	++	
8	++	++	++	++	++	

-- = beide Mischungsansätze negativ

-+ = einer der beiden Mischungsansätze positiv

++ = beide Mischungsansätze positiv

Tabelle 11: Qualitativer Nachweis von ZNS in künstlich mit Gehirn vom Rind kontaminierten erhitzten Fleischerzeugnissen

ZNS	Ergebnis im Enzymimmuntest (n = 2)		
	Kesselkonserve	Dreiviertelkonserve	Vollkonserve
0	--	--	--
0,1	--	--	--
1	++	++	++
2	++	++	++
8	++	++	++

-- = beide Mischungsansätze negativ

++ = beide Mischungsansätze positiv

- + = einer der beiden Mischungsansätze positiv

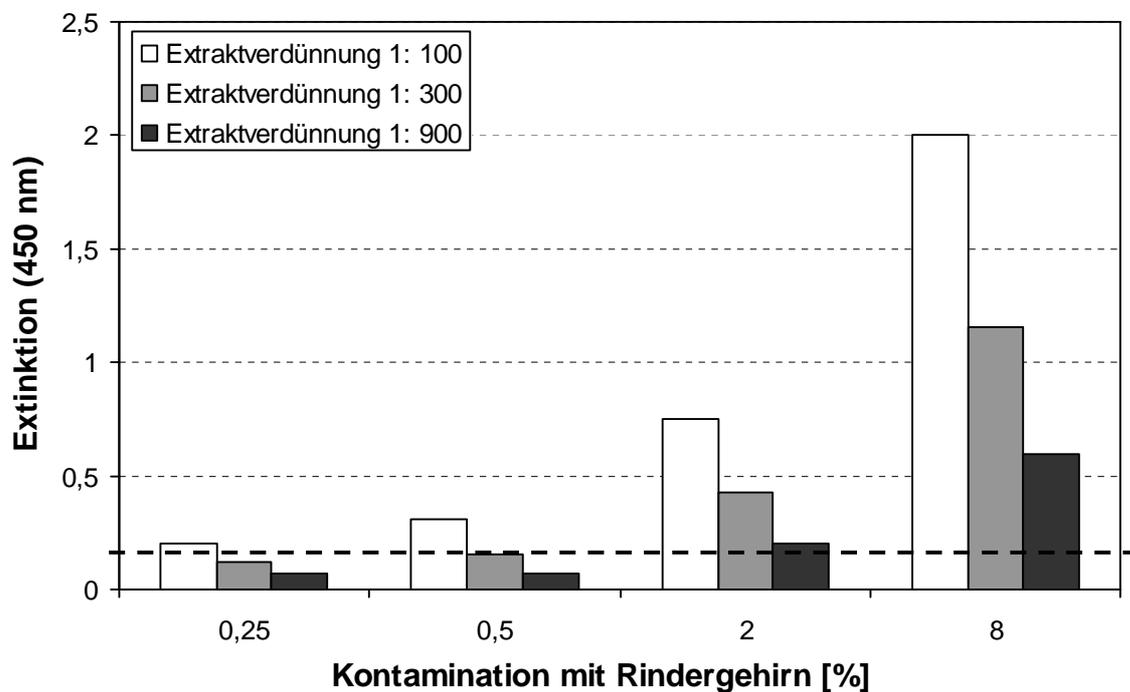


Abbildung 16: Messwerte des Enzymimmuntests Sw01/K09-HRP zur Untersuchung roher, mit Rindergehirn kontaminierter Fleischerzeugnisse, in Abhängigkeit von Kontaminationskonzentration und Probenverdünnung (-- = Nachweisgrenze)

Die bei Untersuchung der rohen, mit Rindergehirn kontaminierten Fleischerzeugnisse ermittelten Wiederfindungsraten sowie die zugehörigen Standardabweichungen sind in Tabelle 12 in Abhängigkeit von den Kontaminationskonzentrationen und Extraktverdünnungen aufgelistet. Insgesamt wurden Wiederfindungsraten zwischen 49 und 215 % ermittelt. Je mehr Extrakt-Verdünnungsstufen zur Berechnung des ZNS-Gehaltes verwendet werden konnten, desto höher war die Wiederfindungsrate: für die Verwendung aller drei Verdünnungsstufen lag die durchschnittliche Wiederfindungsrate bei 98 %, während sie bei ausschließlicher Verwendung der Verdünnungsstufe 1: 100 bei 86 % lag. Mit steigender Anzahl der verwendeten Verdünnungsstufen stieg jedoch auch die Standardabweichung. Zudem konnte festgestellt werden dass die durchschnittliche Wiederfindungsrate mit sinkender Kontaminationskonzentration stieg.

Die Wiederfindungsraten für die mit Rindergehirn kontaminierten erhitzten Proben sind in Tabelle 13 dargestellt. Variationen der Wiederfindungsrate traten sowohl in Abhängigkeit von Verdünnungsstufe und Kontaminationskonzentration als auch in Abhängigkeit von der Erhitzungsstufe auf: je höher der F-Wert der Probe war, das bedeutet je höher der Erhitzungsgrad der Probe war, desto geringer war die Wiederfindungsrate. Die Variationen der Wiederfindungsraten in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe und der Kontaminationskonzentration entsprachen denen der rohen Proben.

Auf Grund der größeren Wiederholbarkeit (geringere Standardabweichung) wurde für alle folgenden Berechnungen der ZNS-Gehalte nur noch die Verdünnungsstufe 1: 100 verwendet, obwohl dann eine Quantifizierung der mit 8 % kontaminierten Proben nicht mehr möglich war, da der Messwert für diese Probe jeweils über dem des höchsten Standards lag.

Für die mit Rückenmark vom Rind kontaminierten Proben ergab sich unter diesen Bedingungen eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 470 %: das heißt, Rückenmark wurde in diesem, mit Gehirn vom Rind standardisierten, Enzymimmuntest mit dem 4,7-fachen seines tatsächlichen Gehaltes quantifiziert. Weiterhin bedeutet dies, dass die Wiederfindungsrate von Rückenmark ca. das 5,5-fache der Wiederfindungsrate von Gehirn betrug (86 %).

Tabelle 12: Wiederfindungsraten und Standardabweichungen der rohen, mit Gehirn vom Rind kontaminierten Fleischerzeugnisse, in Abhängigkeit von den Kontaminationskonzentrationen und den zur Berechnung verwendeten Probenverdünnungen. Bei Verwendung mehrerer Verdünnungsstufen wurde jeweils der Mittelwert aller resultierenden Messwerte verwendet.

Probe	verwendete Verdünnungsstufen	Wiederfindungsrate [%]				n (EIA)
		Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	
0,5 %	1:100	62	186	101	39	6
	1:100, 1:300	<*	<	<	<	6
	1:100, 1:300, 1:900	<	<	<	<	6
2 %	1:100	56	87	71	10	6
	1:100, 1:300	64	129	88	22	6
	1:100, 1:300, 1:900	64	215	104	49	6
8 %	1:100	>>*	>>	>>	>>	6
	1:100, 1:300	>>	>>	>>	>>	6
	1:100, 1:300, 1:900	49	152	88	35	6
Gesamt	1:100	56	186	86	32	6
	1:100, 1:300	62	188	95	33	6
	1:100, 1:300, 1:900	49	215	98	42	6

* < = Extinktion in den Verdünnungsstufen 1: 300 und 1: 900 unterhalb der Nachweisgrenze
 >> = stark positiv, nicht auswertbar, da Messwert größer als höchster Standard

Tabelle 13: Wiederfindungsraten der erhitzten mit Rindergehirn kontaminierten Fleischerzeugnisse in Abhängigkeit von der Herstellungsart und den zur Berechnung verwendeten Probenverdünnungen, wie Tab. 12

Probe	verwendete Verdünnungsstufen	Wiederfindungsrate [%]				n (EIA)
		Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	
Voll- konserve	1:100	49	60	54	4	2
	1:100, 1:300	55	65	58	4	2
	1:100, 1:300, 1:900	43	65	55	6	2
Drei- viertel- konserve	1:100	108	136	117	12	2
	1:100, 1:300	124	171	144	18	2
	1:100, 1:300, 1:900	142	171	154	10	2
Kessel- konserve	1:100	122	139	131	6	2
	1:100, 1:300	137	165	151	11	2
	1:100, 1:300, 1:900	114	195	157	26	2
Gesamt	1:100	49	139	94	36	2
	1:100, 1:300	55	171	109	46	2
	1:100, 1:300, 1:900	43	195	115	51	2

3.8 Überprüfung der Testspezifität in Fleischerzeugnissen

Für die Ermittlung der Tierartspezifität des Enzymimmuntests in Fleischerzeugnissen wurden rohe und erhitzte Fleischerzeugnisse mit definierten Mengen ZNS von Schwein, Schaf, Pferd, Kaninchen, Huhn oder Pute hergestellt, extrahiert und im Enzymimmuntest untersucht.

3.8.1 Herstellung künstlich kontaminierter Proben

Die Tabelle 14 zeigt eine Übersicht aller hergestellten und mit ZNS von Schwein, Schaf, Pferd, Kaninchen, Huhn oder Pute kontaminierten Fleischerzeugnisse. Die Kontaminationskonzentrationen lagen sowohl in den rohen als auch in den erhitzten Fleischerzeugnissen zwischen 0 % und 8 %.

Für die Herstellung kontaminierter roher Fleischerzeugnisse wurde frisches, vom örtlichen Metzger erworbenes Schweinehackfleisch mit ZNS mindestens zweier Individuen versetzt. Die Herstellung erfolgte analog zur Herstellung der mit Rindergehirn kontaminierten rohen Fleischerzeugnisse (s. 3.7.1). Neben den kontaminierten rohen Fleischerzeugnissen wurden auch mit Schweinegehirn kontaminierte erhitzte Fleischerzeugnisse, welche durch das Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, der Justus-Liebig-Universität Gießen hergestellt worden waren, untersucht. Bei den erhitzten Fleischerzeugnissen handelte es sich um nach den Leitsätzen für Fleisch- und Fleischerzeugnisse hergestellte Brühwürste in Form von Kesselkonserven (F-Wert 0,48).

Tabelle 14: Übersicht der zur Testvalidierung verwendeten, künstlich mit ZNS von Huhn, Kaninchen, Pferd, Pute, Schaf und Schwein kontaminierten Probenmaterialien

ZNS	Probenart	Konzentrationsstufen [%]						n*
		8	2	1	0,5	0,1	0	
Schweinegehirn	rohes Hackfleisch	x	x	x	x		x	3
	Kesselkonserve	x	x	x		x	x	1
Schweinerückenmark	rohes Hackfleisch	x	x	x	x		x	2
Schafsgehirn	rohes Hackfleisch	x	x	x	x		x	3
Pferdegehirn	rohes Hackfleisch	x	x	x	x		x	1
Kaninchengehirn	rohes Hackfleisch	x	x	x	x		x	1
Putengehirn	rohes Hackfleisch	x	x	x	x		x	1
Hühnergehirn	rohes Hackfleisch	x	x	x	x		x	1

*n = Mischungsansätze

3.8.2 Extraktion und Untersuchung der Proben im Sandwich-Enzymimmuntest

Die nach 3.8.1 hergestellten Proben wurden analog der mit ZNS vom Rind versetzten Proben mindestens zweimal extrahiert und im Enzymimmuntest untersucht (s. 3.7.2). Als Negativkontrolle wurde die mit 0 % kontaminierte Probe, als Positivkontrolle eine mit 0,5 % Rindergehirn kontaminierte Probe mitgeführt. Analog zu 3.7.2 wurde 3 µg Rindergehirn-Äquivalent/ml Extrakt als Nachweisgrenze festgelegt. Ebenfalls analog zu 3.7.2 wurde die Wiederfindungsrate als der prozentuale Anteil des als GÄq quantifizierten ZNS-Gehaltes am tatsächlichen ZNS Gehalt berechnet:

$$\text{Wiederfindungsrate} = \frac{\text{Rindergehirn} - \text{Äquivalent (GÄq)}}{\text{tatsächlicher ZNS - Gehalt}} \times 100$$

3.8.3 Testspezifität in künstlich kontaminierten Fleischerzeugnissen

Die Tabelle 15 zeigt eine Übersicht der qualitativen Untersuchungsergebnisse der künstlich mit ZNS von Schwein, Schaf, Pferd, Kaninchen, Huhn und Pute kontaminierten Fleischerzeugnisse. Wurden die mit Gehirn vom Schwein kontaminierten rohen und erhitzten Fleischerzeugnisse im Enzymimmuntest untersucht, ergab sich ab einer Mindestkontamination von 1 % immer ein Messsignal oberhalb der Nachweisgrenze, d.h. es wurde ZNS nachgewiesen. Die mit Rückenmark vom Schwein kontaminierten Proben ergaben ab einer Konzentration von 0,5 % stets einen positiven ZNS-Nachweis im Enzymimmuntest. In den künstlich mit Schafs- oder Kaninchenhirn kontaminierten rohen Hackfleischproben wurde ab einem Gehalt von 0,5 % Gehirn immer ZNS nachgewiesen. Wurden die mit Pferdehirn kontaminierten Proben untersucht, so wurde einmal 0,5 % und einmal 1 % als geringste ZNS-Menge erkannt. Im Gegensatz dazu ergaben die künstlich mit Hühner- oder Putengehirn kontaminierten Proben kein positives Ergebnis im Enzymimmuntest.

Die minimalen, maximalen und durchschnittlichen Wiederfindungsraten der verschiedenen ZNS-Arten sind in Tabelle 16 dargestellt. Für Schweinehirn lag die durchschnittliche Wiederfindungsrate in Hackfleisch bei 32 % und in erhitzten Proben bei 24 %. Dies bedeutet, dass mit diesem EIA Gehirn vom Schwein in Proben mit 32 % bzw. 24 % seines tatsächlichen

Gehaltes erkannt und quantifiziert wird. Weiterhin bedeutet dies, dass die Wiederfindungsraten von Schweinegehirn ca. ein Drittel der Wiederfindungsraten von Rindergehirn betragen: 86 % in rohen und bei 94 % in erhitzten Proben (s. 3.7.3). Das heißt, bei gleicher Kontamination wird Schweinegehirn um ca. den Faktor 3 geringer erkannt als Gehirn vom Rind. Die Wiederfindungsrate für Schafsgehirn betrug 104 %, für Pferdegehirn 67 % und für Kaninchengehirn 50 %. Die Wiederfindungsraten für Schafsgehirn liegen somit höher, die für Pferd und Kaninchen niedriger als für Rindergehirn. Auch bei diesen Proben lagen die Wiederfindungsraten für ZNS in geringer kontaminierten Fleischerzeugnissen höher, als in stärker kontaminierten Proben.

Tabelle 15: Qualitativer Nachweis von ZNS in künstlich mit Schweinegehirn und -rückenmark kontaminierten Fleischerzeugnissen

ZNS	Probenart	Charge	Ergebnis im Enzymimmuntest (n = 2)					
			0%	0,1%	0,5%	1%	2%	8%
Schweinegehirn	roh	1	--	n.u.	- +	++	++	++
		2	--	n.u.	- +	++	++	++
		3	--	n.u.	--	++	++	++
	Kessel-	1	--	--	n.u.	- +	++	++
	konserven							
Schweinerückenmark	roh	1	--	n.u.	++	++	++	++
		2	--	n.u.	++	++	++	++
Schafsgehirn	roh	1	--	n.u.	++	++	++	++
		2	--	n.u.	++	++	++	++
		3	--	n.u.	++	++	++	++
Pferdegehirn	roh	1	--	n.u.	- +	++	++	++
Kaninchengehirn	roh	1	--	n.u.	++	++	++	++
Hühnergehirn	roh	1	--	n.u.	--	--	--	--
Putengehirn	roh	1	--	n.u.	--	--	--	--

-- negatives Ergebnis in beiden Versuchsansätzen - + ein negatives, ein positives Ergebnis

+ + positives Ergebnis in beiden Versuchsansätzen n. u. = nicht untersucht

Tabelle 16: Wiederfindungsraten und Standardabweichungen für mit Schweine-, Schafs-, Pferde- und Kaninchenhirn, sowie Schweinerückenmark kontaminierten Fleischerzeugnisse

ZNS	Probenart	Wiederfindungsraten [%]			
		Mittelwert	Minimum	Maximum	Standardabweichung
Schweinegehirn	roh	32	19	52	10
	Kesselkonserve	24	20	26	2
Schweinerückenmark	roh	67	45	90	16
Schafsgehirn	roh	104	59	170	27
Pferdegehirn	roh	64	32	97	23
Kaninchengehirn	roh	50	20	119	32

3.9 Vergleich des Testsystems mit einem kommerziell erhältlichen Enzymimmuntest zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen

Bei dem kommerziell erhältlichen Enzymimmuntest zum Nachweis von ZNS-Material in Fleischerzeugnissen handelt es sich um den RIDASCREEN[®] Risk Material Test von R-Biopharm. Dieses Testsystem verwendet ebenfalls bovines GFAP als Marker für ZNS-Gewebe.

3.9.1 Durchführung des kommerziell erhältlichen Enzymimmuntests

Um eine vergleichende Aussage zwischen den beiden Testsystemen treffen zu können, wurden die hergestellten Proben (s. 3.7.1 und 3.8.1) auch mit dem RIDASCREEN[®] Risk Material Test untersucht. Dazu wurden die Proben nach dem unter 3.7.2 beschriebenen Verfahren (entspricht dem Verfahren der Testanleitung) extrahiert und anschließend, wie in der Testanleitung beschrieben, 1: 20 im testinternen Probenpuffer verdünnt. Ein Teil der

Proben wurde auch in den Verdünnungsstufen 1: 60 und 1: 180 untersucht. Pro Kavität wurden im Doppelansatz 50 µl Probenlösung bzw. testinterne Standardlösung und 50 µl Konjugat einpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal mit 200 µl Waschpuffer pro Kavität gewaschen und ausgeschlagen. Nun wurde pro Kavität 100 µl testinterne Substratlösung einpipettiert. Nach dreißigminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde pro Kavität 100 µl testinterne Stop-Lösung zugegeben und die Extinktion bei 450 nm im Photometer gemessen. Analog zu 3.7.2 wurde die Wiederfindungsrate als der prozentuale Anteil des als GÄq quantifizierten ZNS-Gehaltes am tatsächlichen ZNS Gehalt definiert:

$$\text{Wiederfindungsrate} = \frac{\text{Rindergehirn} - \text{Äquivalent (GÄq)}}{\text{tatsächlicher ZNS - Gehalt}} \times 100$$

Die mit dem RIDASCREEN® Risk Material Test ermittelten Wiederfindungsraten wurden mit denen des hier entwickelten Enzymimmuntests verglichen.

3.9.2 Ergebnisse

Auch mit dem Ridascreen® Risk Material Test wurde in den mit Hühner- und Putengehirn künstlich kontaminierten Proben kein ZNS nachgewiesen. Die Wiederfindungsraten der anderen künstlich kontaminierten und mit diesem Test untersuchten Proben sind in Tabelle 17 dargestellt. Die höchste Kontaminationsstufe der mit Rinder-, Schweine- und Schafsgehirn sowie der mit Rinder- und Schweinerückenmark kontaminierten Proben konnte jeweils nicht quantifiziert werden, da die Extinktionen höher als die des höchsten Standards lagen. Die Wiederfindungsraten bei den verschiedenen Konzentrationsstufen und Extraktverdünnungen waren weitestgehend konstant.

Tabelle 17: Wiederfindungsraten der mittels Ridascreen® Risk Material Test untersuchten künstlich kontaminierten Proben

ZNS	Probenart	untersuchte Mischungs- ansätze	Wiederfindung [%]		
			Minimum	Maximum	Mittelwert
Rindergehirn	roh	3	44	98	82
	Vollkonserve	1	24	38	29
Rinderrückenmark	roh	2	288	730	516
Schweinegehirn	roh	3	84	141	103
Schweinerückenmark	roh	2	122	180	132
Schafsgehirn	roh	3	141	266	186
Kaninchengehirn	roh	1	23	28	25
Pferdegehirn	roh	1	30	38	33

3.10 Überprüfung der Anwendbarkeit des Testsystems zur Untersuchung von Fleischerzeugnissen aus dem Handel auf ZNS-Kontamination

3.10.1 Durchführung der Probenuntersuchung

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des Testsystems für die Untersuchung von Praxisproben wurden Wurstwaren (n = 30) im Lebensmittelhandel in Gießen gekauft und nach dem unter 3.7.2 beschriebenen Verfahren extrahiert. Bei den Probenmaterialien (s. Anhang 1) handelte es sich um Brühwürste (n = 16), Rohwürste (n = 8) und Kochwürste (n = 6). Um die Sensitivität zu erhöhen, wurden die Proben zur Untersuchung 1: 50, 1: 150 und 1: 450 in 0,5 % Triton X-100/PBS verdünnt (statt wie unter 3.8. und 3.9 beschrieben 1: 100, 1: 300 und 1: 900). Zur Überprüfung eines möglichen Einflusses bestimmter Zutaten (z. B. Gewürze) auf das Testsystem wurden zehn der Extrakte mit jeweils 1 000 µg GÄq/ml Extrakt kontaminiert, dies entspricht 1 % ZNS im Ausgangsprodukt, und in den gleichen Verdünnungsstufen im

Enzymimmuntest untersucht. Analog zu 3.7.2 wurde die Wiederfindungsrate als der prozentuale Anteil des als GÄq quantifizierten ZNS-Gehaltes am tatsächlichen ZNS Gehalt definiert:

$$\text{Wiederfindungsrate} = \frac{\text{Rindergehirn} - \text{Äquivalent (GÄq)}}{\text{tatsächlicher ZNS - Gehalt}} \times 100$$

3.10.2 Ergebnisse der Untersuchung kommerziell erhältlicher Fleischerzeugnisse

Für keines der 30 untersuchten kommerziell erhältlichen Fleischerzeugnisse ergaben sich Hinweise auf eine Kontamination mit ZNS. Wurden zehn dieser Extrakte mit 1 000 µg GÄq/ml Extrakt künstlich kontaminiert, so wurde stets ZNS mit den erwarteten Messwerten nachgewiesen. Die mittlere Wiederfindung betrug 1001 µg GÄq/ml Extrakt, dies entspricht 100 %, und schwankte zwischen 637 GÄq/ml Extrakt und 1211 µg GÄq/ml Extrakt, das heißt zwischen 64 und 121 %.

3.11 Orientierende Untersuchungen zur Speziespezifitätssteigerung durch immunaffinitätschromatographische Aufreinigung der Antiseren

3.11.1 Kopplung von bovinem bzw. porcinem GFAP an CnBr-aktivierte Sepharose 4B

Zur Kopplung wurde 1 mg bovines GFAP (Lyophilisat) in 4 ml Kopplungspuffer gelöst und über Nacht gegen Kopplungspuffer dialysiert. Das porcine GFAP (Lösung, 1 mg/ml) wurde ohne weitere Verdünnung gegen Kopplungspuffer über Nacht dialysiert. Die folgenden Schritte wurden bei beiden Ansätzen analog durchgeführt. Nach der Dialyse wurde das Volumen der GFAP-Lösung ermittelt und durch Zugabe von Kopplungspuffer auf 7 ml eingestellt. Zur Kopplung wurde 1 g CnBr-aktivierte Sepharose 4B in 50 ml Salzsäure (1 mmol/l) suspendiert, auf eine Nutsche (P4) überführt und mit weiteren 200 ml Salzsäure sowie 100 ml Kopplungspuffer gewaschen. Der Pufferüberstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die GFAP-Lösung zugegeben. Dieser Ansatz wurde mindestens 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Taumler inkubiert. Zur Kontrolle des Kopplungserfolges wurde während der Kopplung mehrmals Überstand zur photometrischen Bestimmung (Extinktion bei 280 nm) des Proteingehaltes entnommen. Bei Erreichen eines

Extinktionswertes $< 0,1$ Einheiten wurde die Kopplungsreaktion beendet. Nicht gebundenes GFAP wurde durch Waschen des Gels mit 200 ml Kopplungspuffer entfernt. Noch vorhandene aktive Gruppen des Gels wurden durch zweistündige Inkubation in Blockierungspuffer abgesättigt. Danach wurde das Gel dreimal jeweils abwechselnd mit 200 ml saurem und basischem Waschpuffer und schließlich mit 100 ml Bindungspuffer gewaschen.

3.11.2 Immunaffinitätschromatographische Aufreinigung der Anti-GFAP-Antiseren an boviner bzw. porciner GFAP-Sepharose-Säule

Zur Aufreinigung der Antikörper gegen bovines GFAP wurde eine Chromatographie-Säule (1,0 x 10 cm) mit boviner GFAP-Sepharose befüllt (hergestellt nach 3.11.1; Gelbettvolumen 3,5 ml). Alle Arbeitsschritte zur chromatographischen Aufreinigung erfolgten bei einer Flussrate von 75 cm/h. Nach Equilibrierung der Säule mit mindestens 50 ml Bindungspuffer wurden pro Lauf 2 ml gefälltes Antiserum (1: 3 in Bindungspuffer verdünnt) aufgetragen. Nicht gebundene Probenbestandteile wurden durch Spülen mit 50-100 ml Bindungspuffer entfernt. Die Elution der an bovines GFAP gebundenen Antikörper erfolgte mittels 10 ml Glycin/Salzsäurepuffer. Der Probendurchlauf und das Eluat wurden in Fraktionen à 2 ml aufgefangen und der pH-Wert durch Zugabe von 150 μ l Tris/Salzsäurepuffer pro Fraktion auf ca. 7 eingestellt. Der Antikörpergehalt der Fraktionen wurde photometrisch (analog zu 3.3.1) bestimmt. Diejenigen eluierten Fraktionen und durchgelaufenen Fraktionen, die hohe Antikörperkonzentrationen aufwiesen wurden enzymimmunochemisch überprüft. Die Durchführung der Antikörperaufreinigung gegen porcine GFAP-Sepharose erfolgte in analoger Weise.

3.11.3 Enzymimmunochemische Überprüfung und Bewertung der gereinigten Antiserumfraktionen im indirekten Enzymimmuntest

Zur Überprüfung der nach 3.11.2 gewonnenen und fraktionierten Antikörper wurden Mikrotiterplatten jeweils zur Hälfte mit bovinem und porcinem GFAP in einer Konzentration von 100 ng/ml (100 μ l/Kavität) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden durch dreißigminütige Inkubation mit 2 % Kasein/PBS (200 μ l

pro Kavität) bei Raumtemperatur blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung wurden diejenigen Fraktionen, die hohe Antikörperkonzentrationen aufwiesen, 1: 10 in Phosphatpuffer verdünnt und jeweils im Doppelansatz in mit porcinem oder bovinem GFAP beschichtete Kavitäten pipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten erneut dreimal gewaschen und trockengeschlagen. Je nach zu testendem Antiserum wurde Anti-Kaninchen-, Anti-Schaf- oder Anti-Schwein-IgG-Meerrettichperoxidase, jeweils 1:1 000 in 1 %iger Kasein/PBS-Lösung verdünnt, zupipettiert (100 μ l pro Kavität). Die Platten wurden erneut eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal gewaschen und trockengeschlagen. Nun erfolgte die Zugabe von 100 μ l Substratlösung pro Kavität. Nach 10 Minuten wurde die Enzymreaktion durch Zugabe 1 molarer Schwefelsäure (100 μ l/Kavität) gestoppt und die Extinktion photometrisch bei 450 nm bestimmt.

Die eluierten Fraktionen der gegen bovines GFAP aufgereinigten Antiseren und die durchgelaufenen Fraktionen der gegen porcines GFAP aufgereinigten Antiseren, die hohe Extinktionen für bovines GFAP aufwiesen wurden gepoolt, zweimal mindestens 12 Stunden gegen Phosphatpuffer dialysiert, mit 0,01 % Thimerosal versetzt und bei 4 °C gelagert. Fraktionen des Durchlaufs der gegen bovines GFAP aufgereinigten Antiseren, die hohe Extinktionen für bovines GFAP aufwiesen, wurden erneut auf die Säule aufgetragen.

3.11.4 Überprüfung im Sandwich-Enzymimmuntest

Zur Überprüfung der gepoolten Antiserumfraktionen im Sandwich-Enzymimmuntest wurden nach 3.4.4 hergestellte Extrakte von Rindergehirn und Schweinerückenmark verwendet und alle 98 möglichen Kombinationen aus immunaffinitätschromatographisch gereinigten Antiseren mit den nach 3.3.2 hergestellten Antikörper-Enzym-Konjugaten getestet. Dazu wurden Mikrotiterplatten 1: 100 in Bicarbonatpuffer (100 μ l/Kavität) mit den immunaffinitätschromatographisch gereinigten Antiseren beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2% Kasein/PBS (200 μ l/Kavität) blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung und Ausschlagen der Platten, wurde pro Kavität 100 μ l ZNS-Extrakt, 1: 10 und 1: 100 in 0,5 % Triton X-100/PBS verdünnt, zugegeben. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, erneut dreimal gewaschen und

ausgeschlagen. Anschließend wurde Anti-GFAP-Enzym-Konjugat, 1: 500 in 1 % Kasein/PBS verdünnt, zugegeben (100 µl/Kavität). Nach erneuter einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Pro Kavität wurden 100 µl Substratlösung zupipettiert. Nach 10 Minuten wurde die Farbreaktion durch Zugabe 1 molarer Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm im Photometer gemessen.

3.11.5 Ergebnisse der immunaffinitätschromatographischen Reinigung der Antiseren

Die nach 3.11.4 immunaffinitätschromatographisch gereinigten Antiseren erwiesen sich im indirekten Enzymimmuntest nach 3.11.3 als geeignet zum Nachweis von bovinem GFAP. Im Vergleich lag die Extinktion für porcines GFAP bei allen gereinigten Antiseren höher als die Extinktion für bovines GFAP.

Bei der Überprüfung der gepoolten Antiserumfraktionen im Sandwich-Enzymimmuntest lag die Extinktion für Rindergehirn jeweils unterhalb oder auf gleicher Höhe der Extinktion für Schweinerückenmark.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung der Nachweisverfahren für ZNS

Zum Schutz des Verbrauchers muss eine Kontamination von Lebensmitteln tierischen Ursprungs mit SRM vermieden werden. Ergänzend zu den hierfür erforderlichen technologischen Maßnahmen bei der Schlachtung und Verarbeitung der Tierkörper erfordert dies auch die Verfügbarkeit von geeigneten Nachweisverfahren. Da die Klassifizierung bestimmter Gewebe als SRM von der jeweiligen Tierart und dem Alter des Tieres abhängig ist, sollten geeignete Testsysteme idealerweise nicht nur gewebe- sondern auch tierart- und altersspezifisch sein. Dieses Ziel ist mit einer Methode allein nicht realisierbar. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Aspekt der Altersbestimmung ausgeklammert. Zudem beschränkt sich diese Arbeit auf den Nachweis von ZNS, dem wohl wichtigsten SRM.

Generell gewährleistet eine einzelne Methode nie eine absolute Sicherheit der Ergebnisse, so dass es sich bewährt hat, zur Untersuchung bestimmter Sachverhalte mindestens zwei voneinander unabhängige Methoden zu verwenden: eine kostengünstige und schnell durchführbare Methode (Screening-Methode) wird zur Erstuntersuchung bzw. zur ausgedehnten Probenuntersuchung verwendet, bei positivem Ergebnis wird die Probe mittels eines sogenannten Referenzverfahrens erneut untersucht. Eine geeignete Screening-Methode sollte neben der einfachen Durchführbarkeit eine hohe Sicherheit bezüglich falsch negativer Ergebnisse aufweisen, während bei der Häufigkeit falsch positiver Ergebnisse, in Abhängigkeit von der individuellen Fragestellung, eher Kompromisse eingegangen werden können. Allerdings darf die Häufigkeit falsch positiver Ergebnisse nicht den wirtschaftlichen Einsatz eines Screening-Verfahrens in Frage stellen. Für ein Referenzverfahren zur Nachuntersuchung positiver Ergebnisse ist eine kostengünstige und schnelle Durchführbarkeit zwar wünschenswert, jedoch nicht unbedingt notwendig. Wichtiger ist eine möglichst hohe Sicherheit des Ergebnisses, insbesondere in Bezug auf falsch positive Aussagen.

Die bisher zum Screening von Proben auf SRM anwendbaren Verfahren, die Cholesterinbestimmung (s. 2.3.2.1) und der Enzymimmuntest zum Nachweis von GFAP (s. 2.3.1.2.2), weisen keine Tierartspezifität und im ersteren Fall auch nur eine geringe Gewebespezifität auf, so dass die Zahl falsch positiver Ergebnisse sehr groß ist. Aus diesem Grund ist es notwendig, ein weiteres Screening-Verfahren zu entwickeln, welches bei schneller und kostengünstiger Durchführbarkeit eine höhere Spezifität als die beiden

letzten genannten Verfahren gewährleistet. Mit den molekularbiologischen Nachweisverfahren (s. 2.3.3), der kombinierten immunhistologischen Untersuchung auf GFAP und MBP (s. 2.3.1.2.1) sowie der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Fettsäureanalyse (s. 2.3.2.2) stehen tierartsspezifische, und im letzten Fall auch bedingt altersspezifische, Methoden zur Verfügung, die auf Grund des hohen Arbeits- und Kostenaufwandes jedoch nur als Referenzverfahren geeignet sind.

4.2 Antikörper gegen GFAP

Für die Entwicklung eines immunologischen Nachweisverfahrens sind die gewonnenen Antikörper von entscheidender Bedeutung, da sie die Spezifität und Sensitivität des Nachweissystems bestimmen. Somit spielt die Wahl des Immunogens, des Immunisierungsmodus, der Versuchstierspezies und der Antikörperaufreinigung eine große Rolle für die Qualität und Praktikabilität des erstellten enzymimmunologischen Nachweisverfahrens (BAUDNER und DREHER, 1991).

Um ein bestimmtes Gewebe, in diesem Fall ZNS, mit einem antikörperbasierten Verfahren nachweisen zu können, ist es notwendig einen geeigneten Marker als Immunogen zu wählen. GFAP kommt zwar nicht ausschließlich im ZNS vor, die Konzentration in anderen Geweben ist jedoch mindestens um den Faktor 20 geringer (JESSEN et al., 1984; SCHMIDT et al., 1999b und 2002), so dass eine weitestgehende Gewebespezifität vorliegt. Zudem hat GFAP hohe antigene Eigenschaften und ist bereits mehrfach erfolgreich zur Gewinnung von Antikörpern eingesetzt worden (UYEDA et al., 1972). Um, wie in diesem Fall, einen Sandwich-Enzymimmuntest zu entwickeln, ist es zudem notwendig, dass das nachzuweisende Antigen eine gewisse Mindestgröße hat, da mindestens zwei Epitope vorhanden sein müssen. GFAP, als ein Protein mit einer Molekularmasse von 50 000 Da, erfüllt diese Voraussetzung. Aus diesen Gründen bietet sich GFAP als Markerprotein zur Entwicklung eines Sandwich-Enzymimmuntests für ZNS an. Eine weitere Voraussetzung stellt die Stabilität des Markerproteins gegenüber den in der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln eingesetzten thermischen und biochemischen Verfahren dar. Auch dies ist im Falle von GFAP erfüllt (DAHL und BIGNAMI, 1976; ENG und DEARMOND, 1983; SCHMIDT et al., 1999b).

Als Immunogen wurde lyophilisiertes bovines GFAP mit einer Reinheit > 98 % verwendet und in Aqua ad iniectabilia gelöst. Durch Emulsion des Immunogens mit komplettem Freund'schem Adjuvans und intracutaner bzw. subcutaner Applikation auf mehrere Stellen verteilt, wurde eine starke Immunantwort gewährleistet. Über die regelmäßige Kontrolle des Antikörpertiters und Restimulation bei dessen Abfall oder Stagnation, konnten über mehrere Wochen konstant hohe Antikörpertiter erzielt werden (s. 3.2.3), wobei die Antikörpertiter der Kaninchen wesentlich höher, als die der Schafe und Schweine lagen.

Die Wahl verschiedener Tierarten zur Immunisierung erfolgte aufgrund der Annahme, dass im Sandwich-Enzymimmuntest die Verwendung von Antiseren zweier verschiedener Hostspezies zur Optimierung der Testspezifität vorteilhaft ist. Kaninchen eignen sich generell gut zur Immunisierung bzw. Gewinnung polyklonaler Antikörper und sind bereits erfolgreich mit GFAP immunisiert worden (UYEDA et al., 1972). Da die Primärstruktur von GFAP, soweit bekannt, bei den zur Lebensmittelerzeugung verwendeten Spezies weitestgehend homolog ist, wurde durch Immunisierung weiterer Tierarten versucht, möglichst spezifische Epitope des bovines GFAPs zu erfassen. Die Arbeitshypothese zur Immunisierung der Schafe war, dass Antikörper dieser Tierart, da phylogenetisch eng mit dem Rind verwandt, die für das Rind spezifischen Epitope des GFAP erkennen sollte. Die Immunisierung der Schweine erfolgte zur Überprüfung der Möglichkeit, dass Antikörper gegen artfremde Aminosäuresequenzabschnitte bevorzugt gebildet werden.

Die Überprüfung der polyklonalen Antikörper aus den drei Tierarten im indirekten Enzymimmuntest (s. 3.2.2 und 3.2.3) zeigte, dass kein Antiserum eine höhere Affinität für bovines GFAP als für porcines GFAP aufwies. Während dies für die in Kaninchen gewonnenen Antikörper den Erwartungen entsprach, war die sehr starke Bindung oviner und insbesondere porciner Seren an das GFAP des Schweines als Testphasenantigen überraschend. Offensichtlich wurden auch in den beiden letztgenannten Spezies überwiegend Antikörper gegen die allen Spezies gemeinsamen GFAP-Epitope gebildet. Das heißt, auch die immunisierten Schweine bildeten bevorzugt porcines GFAP erkennende Antikörper, nicht jedoch solche gegen artfremde Abschnitte des Immunogens. Dies ist erklärbar durch die Tatsache, dass GFAP im Körper strukturell gebunden vorliegt, wogegen das Immunogen und die im indirekten EIA verwendeten GFAP-Proteine isoliert, möglicherweise auch partiell denaturiert vorliegen. Dieselbe Problematik gilt im Übrigen auch für alle anderen polyklonalen GFAP-Antikörperpräparate und für monoklonale Antikörper.

Die Tatsache, dass die hergestellten Antikörperpräparationen überwiegend identische GFAP-Epitope erkannten, wurde auch durch die Versuche zur immunaffinitätschromatographischen Reinigung an Trägersäulen mit immobilisiertem bovinem bzw. porcinem GFAP bestätigt. Die Arbeitshypothese für die immunaffinitätschromatographische Aufreinigung der Antiseren war, dass in jedem Antiserum nur eine geringe Zahl (2-3) gegen verschiedene Epitope eines Antigen gerichtete Antikörperpopulationen vorkommen. Mittels der immunaffinitätschromatographischen Aufreinigung müsste es dann möglich sein, die verschiedenen Populationen zu trennen und einen tierartspezifischen Antikörper zu erhalten. Sowohl das gereinigte Eluat der über bovines GFAP getrennten Antiseren als auch die Durchläufe der Säule mit porcinem GFAP (subtraktive Immunaffinitätschromatographie) zeigten weiterhin sehr starke Reaktivität mit porcinem GFAP. Dies bedeutet, dass die dominierenden Antikörperpopulationen stets beide Proteine erkannten.

Diese an sich für die Etablierung eines rinderspezifischen Nachweises nachteiligen Eigenschaften der Antikörper konnten jedoch durch Etablierung eines Sandwich-Enzymimmuntest unter Verwendung zweier verschiedener Antikörper ausgeglichen werden. Der Vorteil eines Sandwich-Enzymimmuntests liegt in der Bindung an zwei verschiedene Molekülteile des Antigens, wobei dem Detektionsantikörper durch das schon gebundene und räumlich orientierte Antigen nur noch eine begrenzte Zahl von Bindungsstellen angeboten wird. Aus diesem Grund kann es durch Kombination von Antikörpern im Sandwich-Enzymimmuntest zu Spezifitätskonversionen kommen. Dies war auch hier der Fall: 34 der möglichen Kombinationen aus Fänger- und Detektionsantikörper zeigten unter Spezifitätsprüfung mittels Proteinstandardlösungen spezifischere Reaktionen für bovines als für porcines GFAP (s. 3.4.2 und 3.4.3). Interessanterweise traten weitere Spezifitätskonversionen bzw. teilweise auch Rekonversionen bei Überprüfung der Spezifität mittels ZNS-Extrakten auf (s. 3.4.4 und 3.4.5). Dies könnte mit der Extraktionsmethode der Proben zusammenhängen. Das zur Immunisierung der Tiere verwendete bovine GFAP wurde laut Herstellerangaben mittels Harnstoff extrahiert, über Anionen-Austauscher-Chromatographie aufgereinigt und kann sich wieder zu Filamenten zusammenlagern. Die untersuchten Proben wurden mit SDS extrahiert. SDS gilt als starke Detergenz, welche die Tertiärstruktur und die Funktion von Proteinen aufhebt. So könnten von dem mittels SDS extrahiertem GFAP andere Epitope präsentiert werden als in den Proteinstandardlösungen.

Zudem bestätigte sich die Annahme, dass die Verwendung zweier verschiedener Hostspezies im Sandwich-Enzymimmuntest vorteilhaft ist: die höchsten Extinktionsunterschiede zwischen bovinem und porcinem ZNS konnten in der Kombination von einem Kaninchenantiserum mit einem Schweineantiserum ermittelt werden.

Für die Herstellung der Antikörper-Enzym-Konjugate wurde gefälltes Antiserum gegen bovines GFAP mittels der reaktiven Alkylierung („Periodatmethode“, WILSON und NAKANE, 1978) an Meerrettichperoxidase gekoppelt, gelchromatographisch gereinigt und schließlich im modifizierten Sandwich-Enzymimmuntest überprüft. Zur Kopplung an Antikörper sind Enzyme geeignet, die leicht und ohne Aktivitätsverlust konjugierbar sind, über eine hohe spezifische Aktivität gegenüber einem gut nachweisbaren Substrat verfügen und sich über einen längeren Zeitraum ohne Aktivitätsverlust lagern lassen. Die Meerrettichperoxidase verfügt über diese Eigenschaften und ist über die Periodatmethode sehr effektiv an Antikörper konjugierbar (TRESKA et al., 1995).

4.3 Validierung des Testsystems

Die Überprüfung der Sensitivität und der Gewebespezifität des entwickelten Testsystems erfolgte anhand roher und erhitzter Probenmaterialien, wobei sowohl künstlich kontaminiertes Material als auch reguläre Handelsware untersucht wurden. Bei den rohen, künstlich kontaminierten Proben handelte es sich um Hackfleisch, ohne Zusatz von Gewürzen, Emulgatoren oder anderen Zutaten (s. 3.7). Dies ermöglichte die Überprüfung der Sensitivität und Gewebespezifität hinsichtlich Muskulatur und Fettgewebe als Probenmatrix. Für die Überprüfung der Anwendbarkeit des Testsystems zur Untersuchung erhitzter Fleischerzeugnisse wurden nach den Leitsätzen für Fleisch- und Fleischerzeugnisse hergestellte Kessel-, Dreiviertel- und Halbkonserven verwendet (s. 3.7). So konnte das Testsystem nicht nur auf den Einfluss der Nachweisempfindlichkeit durch Hitzeeinwirkung auf die Proben, sondern auch in Bezug auf die Interferenzen mit einigen Gewürzen, wie z. B. Nitritpökelsalz, überprüft werden. Durch die Untersuchung von Fleischerzeugnissen aus dem Handel, sowohl ohne als auch mit künstlichem Zusatz von ZNS zu den Extrakten, konnte der Einfluss verschiedener Zutaten und Zubereitungsarten auf das Testsystem überprüft werden (s. 3.10). Da in den künstlich kontaminierten Extrakten ZNS im Bereich der gleichen Wiederfindungsraten nachgewiesen wurde wie bei Untersuchung der künstlich mit

Rindergehirn kontaminierten rohen und erhitzten Fleischerzeugnisse (64-121 %), kann davon ausgegangen werden, dass das entwickelte Testsystem gewebespezifisch und stabil gegenüber Probenmatrixeinflüssen ist.

In Bezug auf die Thermostabilität des Markerproteins wurde bei höherer Erhitzung ein reduziertes Messsignal festgestellt: während in rohen Fleischerzeugnissen Rindergehirn durchschnittlich mit 86 % des Ausgangsgehaltes wieder gefunden wurde, betrug die Wiederfindungsrate in Vollkonserven nur 54 %. Dies stimmt mit den Ergebnissen von SCHMIDT et al. (2001) überein, die in mit ZNS kontaminierten Produkten nach Sterilisierung kein GFAP nachweisen konnten. Da das hier entwickelte Testsystem ohnehin nur semiquantitativ zur Bestimmung des ZNS-Gehaltes in Fleischerzeugnissen anwendbar ist, dürfte dieser Aspekt von untergeordneter Relevanz bei der praktischen Anwendung sein.

Für die Überprüfung der Tierartspezifität wurden künstlich mit Schweine-, Schafs-, Kaninchen-, Pferde- Hühner- und Putengehirn kontaminierte rohe Fleischerzeugnisse untersucht. In Deutschland besteht der Hauptteil der Fleischerzeugnisse aus Schweinefleisch. Zunehmend mehr Fleischerzeugnisse werden auf der Grundlage von Geflügel hergestellt und nur wenige Produkte enthalten Zutaten von Rind, Schaf, Ziege, Kaninchen oder Pferd. Da ZNS sowohl von Rindern, als auch von Schafen und Ziegen als SRM klassifiziert ist, wäre eine Kreuzreaktion wünschenswert. Auf Grund der phylogenetisch engen Verwandtschaft zwischen den beiden kleinen Wiederkäuern und deren äquivalenten Verwandtschaft zum Rind, wurde jedoch auf eine separate Überprüfung der Ziege verzichtet. Das ZNS der anderen erwähnten Tierarten ist nicht als SRM klassifiziert. Weil ZNS vom Schwein einerseits nicht als SRM klassifiziert ist aber andererseits der Hauptteil der Fleischerzeugnisse aus Schweinefleisch hergestellt wird, ist die Unterscheidung zwischen bovinem und porcinem ZNS das Hauptkriterium der Tierartspezifität: Schweinegehirn wird erst ab mindestens 1 % Kontamination nachgewiesen und mit ca. 30 % der Intensität von Rindergehirn erkannt. Die Gehirne von Huhn und Pute werden nicht erkannt, während die Gehirne von Kaninchen und Pferd mit ca. 50 % der Intensität von Rindergehirn erkannt werden. Dies bedeutet, dass der hier entwickelte Enzymimmuntest eine relative Spezifität für ZNS vom Rind aufweist.

Das hier beschriebene Testsystem erfüllt mit seiner schnellen und kostengünstigen Durchführbarkeit das Hauptkriterium einer Screening-Methode. Ab der Nachweisgrenze von $\leq 0,5$ % Rindergehirn treten keine falsch negativen Ergebnisse auf. Falsch positive Ergebnisse

konnten nur unter Beimischung von ZNS anderer Herkunft (Schwein, Pferd, Kaninchen) ermittelt werden. Dies bedeutet, dass der entwickelte Test gewebespezifisch und die Zahl der falsch positiven Ergebnisse stark eingeschränkt ist. Damit erfüllt der hier entwickelte Sandwich-Enzymimmuntest auch die weiteren Kriterien einer Screening-Methode. Auf Grund der falsch positiven Ergebnisse unter Kontamination mit ZNS vom Schwein, Pferd oder Kaninchen und dem mangelnden Vermögen der Altersdifferenzierung eignet sich dieses Verfahren jedoch nicht als Referenzverfahren bzw. ist bei positivem Ergebnis die Nachuntersuchung mittels eines spezifischeren Verfahrens notwendig.

4.4 Vergleich des Testsystems mit anderen Nachweisverfahren für ZNS

Während die Sensitivität des hier entwickelten Testsystems mit einer Nachweisgrenze von $\leq 0,5$ % Rindergehirn geringer als die Sensitivität der RT-PCR (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2003), der GC-MS Fettsäureanalyse (BIEDERMANN et al., 2002 und NIEDERER und BOLLHALDER, 2001), des immunhistologischen Nachweises nach TERSTEEG et al. (2002), des immunchemischen Nachweisverfahrens über Western Blot nach WENISCH et al. (1999) und des Enzymimmuntests nach SCHMIDT et al. (1999b, 2001) ist, liegt die Nachweisgrenze des molekularbiologischen Nachweisverfahrens von SEYBOLDT et al. (2002, 2003) im gleichen Bereich. Die Sensitivität der Cholesterinbestimmung als Marker für ZNS-Gewebe ist geringer als die des hier entwickelten Enzymimmuntests.

Die Gewebespezifität des entwickelten Sandwich-ELISA für ZNS war in den bisher durchgeführten Analysen immer gegeben, das heißt es traten keine Kreuzreaktionen mit anderen Geweben auf. Dies bezieht sich nicht nur auf rohe, sondern auch auf erhitzte Fleischerzeugnisse. Das heißt in diesem Bereich ist das Testsystem als gleichwertig mit der immunhistologischen Untersuchung auf GFAP (monoklonaler Antikörper, GF 500, Biologo, Deutschland) nach HERDE et al. (2005) und auf NSE (monoklonaler Maus-Antikörper, Dako, Dänemark) nach LÜCKER et al. (1999), den molekularbiologischen Untersuchungsmethoden, der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Fettsäureanalyse, dem Western Blot mit Antikörpern gegen GFAP (monoklonal, GF 500, Biologo, Deutschland) nach HERDE et al. (2005) und dem Enzymimmuntest von SCHMIDT et al. (1999b, 2001) einzustufen. Der entwickelte ELISA ist in diesem Bereich den übrigen

immunhistologischen und enzymimmunchemischen Verfahren sowie der Cholesterinbestimmung überlegen.

Bezüglich der Tierartspezifität ist der hier entwickelten Enzymimmuntest der Cholesterinbestimmung nach HORLACHER (2002) und LÜCKER et al. (1999, 2000), sowie den immunologischen Verfahren, außer der immunhistologischen Untersuchung auf MBP nach HERDE et al. (2005) und der immunchemischen Untersuchung auf MBP nach HOLTBECKER und STOLLE (2005), überlegen. Dies zeigte sich auch im direkten Vergleich des hier entwickelten ELISA mit dem „RIDASCREEN Risk material“ Test. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Enzymimmuntest wurde bovines ZNS ca. um den Faktor 3 besser erkannt als porcines ZNS, während mit dem kommerziellen Testsystem bovines ZNS ca. um den Faktor 0,8 schlechter erkannt wurde, als porcines ZNS. Damit kann das Risiko falsch-positiver Befunde erheblich reduziert werden. Bezüglich der anderen Tierarten ist die Spezifität der beiden Testsysteme als gleichwertig einzustufen: Gehirn von Huhn und Pute wird mit beiden Testsystemen nicht erkannt, obwohl dies als Kreuzreaktion in der Testanleitung des „RIDASCREEN Risk Material“ Test angegeben wird. Gehirn von Kaninchen und Pferd wird in beiden Testsystemen geringer quantifiziert als Rindergehirn, wobei die Quantifizierung im kommerziellen Testsystem (ca. 30 % der Erkennung von Rindergehirn) unterhalb der des hier entwickelten Testsystems liegt (ca. 50 % der Erkennung von Rindergehirn). Schafsgehirn wird in beiden Testsystemen höher als Rindergehirn quantifiziert: im „RIDASCREEN Risk Material“ Test mit ca. 200 % der Erkennung von Rindergehirn und im neu entwickelten Enzymimmuntest mit ca. 120 % der Erkennung von Rindergehirn. In beiden Testsystemen wird Rückenmark besser als Gehirn erkannt, so dass sich beide Testsysteme nur zu semiquantitativen Analysen eignen. Da die Tierartspezifität der RT-PCR und der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Fettsäurenanalyse jedoch fast absolut sind, sind diese Nachweisverfahren dem neu entwickelten Testsystem als überlegen einzustufen.

Die Entwicklung eines altersspezifischen Testsystems bei gleichzeitiger Tierart- und Gewebespezifität dürfte insgesamt sehr schwierig sein. Bisher sind kaum Markersubstanzen bekannt, die erst ab einem bestimmten Alter auftreten. Die meisten dieser Substanzen treten ab einem bestimmten Zeitpunkt während der Embryonal- oder Fetalperiode, bzw. kurz nach der Geburt auf. Bekannt sind vor allem Substanzen, deren Gehalt im Körper sich mit dem Alter ändert. In Fleischerzeugnissen sind diese Substanzen nicht zur Altersdifferenzierung

geeignet, da der Gehalt der Markersubstanzen in erster Linie von der Kontamination der Probe mit ZNS abhängt. Eine Altersbestimmung wäre nur möglich, wenn, wie bei der gaschromatographischen Fettsäureanalyse, zwei gewebespezifische Marker in ihrem Verhältnis zueinander verglichen werden.

Unter Berücksichtigung der Testparameter Nachweisempfindlichkeit (Sensitivität), Tierartszpezifität, Testrobustheit gegenüber verschiedensten Probenmatrices sowie Einfachheit der Testdurchführung ist das hier entwickelte Testsystem zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen als Screening-Methode zur Untersuchung von Lebensmitteln geeignet. Im Vergleich zu anderen Verfahren auf der Basis des Nachweises von GFAP ist insbesondere die erhebliche verbesserte Testspezifität hervorzuheben. Auch wenn derzeit die Relevanz von TSE als nahrungsbedingtes Gesundheitsrisiko im Vergleich zur Jahrtausendwende etwas zurückhaltender beurteilt wird, dürfte zur Vermeidung einer erneuten „BSE-Krise“ die Kontrolle von Lebensmitteln tierischen Ursprungs auf ZNS, insbesondere für Monitoringstudien, von Bedeutung bleiben.

5 Zusammenfassung

Es wurde ein enzymimmunologisches Verfahren nach dem Sandwich-Prinzip zum Nachweis von Rinder-ZNS in Fleisch und Fleischerzeugnissen entwickelt. Das Verfahren basiert auf dem Nachweis von GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), dem Hauptbestandteil der Gliafilamente, mittels polyklonaler Antikörper.

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen bovines GFAP wurden drei Kaninchen, zwei Schafe und zwei Schweine immunisiert. In allen Tieren konnte eine spezifische Immunantwort induziert werden. Die gewonnenen Antiseren wurden gereinigt und zur Herstellung von Antikörper-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugaten verwendet. Die 49 möglichen Kombinationen aus Antiseren und Antikörper-HRP-Konjugaten wurden mittels GFAP und ZNS von Rind und Schwein insbesondere hinsichtlich ihrer Tierartspezifität überprüft. Die zum Nachweis von bovinem ZNS geeignetste Kombination aus Antiserum und Antikörper-HRP-Konjugat wurde ausgewählt und die optimale Konzentration der Immunreagenzien ermittelt. Die Nachweisgrenze für bovines GFAP lag unter diesen Bedingungen zwischen 4,1 und 12,3 ng/ml.

Zur Ermittlung der optimalen Probenaufbereitung von Fleisch- und Fleischerzeugnissen wurden verschiedene Extraktionsmittel, Temperatur-Zeit-Kombinationen und Verdünnungsmedien miteinander verglichen. Die Probenaufbereitung, die die höchsten Extinktionen ergab, wurde verwendet, um aus ZNS einen „internen Gehirnstandard“ zur direkten Quantifizierung des ZNS-Gehaltes in Proben zu erstellen. Unter diesen Bedingungen lag die Nachweisgrenze bei 1-3 µg Gehirnäquivalent (GÄq) / ml Extrakt.

Die Überprüfung der Testsensitivität für den Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen erfolgte durch Untersuchung künstlich mit Rindergehirn und -rückenmark kontaminierter roher und erhitzter Fleischerzeugnisse: rohe Fleischerzeugnisse, die mindestens 0,5 % Rindergehirn oder 0,1 % -rückenmark enthielten, ergaben im Enzymimmuntest stets ein Messsignal oberhalb der Nachweisgrenze. Die Wiederfindungsraten für Rindergehirn betragen durchschnittlich 86 % in rohen und 94 % in erhitzten Fleischerzeugnissen. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate für Rinderrückenmark betrug das 5,5-fache der durchschnittlichen Wiederfindungsrate für Rindergehirn.

Zur Überprüfung der Tierartspezifität des Enzymimmuntests in Fleischerzeugnissen wurden rohe und erhitzte Fleischerzeugnisse mit definierten Mengen ZNS verschiedener Tierarten versetzt. Kontaminierte Proben mit mind. 1 % Schweinegehirn, 0,5 % Schweinerückenmark und 0,5 % Kaninchen-, Schafs- oder Pferdegehirn ergaben jeweils ein Messsignal oberhalb der Nachweisgrenze. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate für Schweinegehirn betrug ca. 1/3 der durchschnittlichen Wiederfindungsrate für Rindergehirn, während die Wiederfindungsraten für Schafgehirn geringgradig höher und für Pferde- und Kaninchengehirn geringgradig niedriger als für Rindergehirn waren. Mit Hühner- oder Putengehirn kontaminierte Proben ergaben keine Messsignale oberhalb der Nachweisgrenze.

Der entwickelte Sandwich-Enzymimmuntest wurde mit einem kommerziell erhältlichen Enzymimmuntest zum Nachweis von ZNS in Fleischerzeugnissen, dem RIDASCREEN Risk Material Test von R-Biopharm, der ebenfalls bovines GFAP als Markerprotein verwendet, verglichen. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug für Rindergehirn 82 % in rohen und 29 % in erhitzten Fleischerzeugnissen. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate für Schweinegehirn betrug 103 %. Für Schafsgehirn war die Wiederfindungsrate ca. doppelt so hoch wie für Rindergehirn, die Wiederfindungsraten für Kaninchen- und Pferdegehirn lagen bei ca. 1/3 der Wiederfindungsraten für Rindergehirn.

Für die Überprüfung der Anwendbarkeit des Testsystems zur Untersuchung von Fleischerzeugnissen aus dem Handel auf ZNS-Kontamination wurden 30 Wurstwaren untersucht und ein Teil der Extrakte auch künstlich mit ZNS-Extrakt kontaminiert. In keiner der untersuchten Proben konnte ZNS nachgewiesen werden, die in künstlich kontaminierten Extrakten ermittelten Wiederfindungsraten betragen zwischen 64 und 121 %.

Durch immunaffinitätschromatographische Aufreinigung der Antiseren mit an Sepharose gekoppeltem bovinem und porcinem GFAP wurde versucht, eine weitere Spezifitätssteigerung zu erzielen. Sowohl die gereinigten Eluate der über boviner-GFAP-Sepharose getrennten Antiseren als auch die Probendurchläufe der Säule mit porciner-GFAP-Sepharose (subtraktive Immunaffinitätschromatographie) zeigten im indirekten Enzymimmuntest und im Sandwich-Enzymimmuntest keine Verbesserung der Spezifität gegenüber den nicht aufgereinigten Antiseren.

6 Summary

Development and validation of an enzyme immunoassay for the detection of bovine CNS tissue in meat and meat products

A sandwich enzyme immunoassay (EIA) for the detection of bovine tissue from the central nervous system (CNS) in meat and meat products was developed. The test is based on the detection of GFAP (glial fibrillary acidic protein), the major protein constituent of glial filaments, by polyclonal antibodies.

In order to produce polyclonal antibodies against bovine GFAP, three rabbits, two sheep and two pigs were immunized. A specific immunoresponse could be induced in all animals. The gained antisera were purified and used to prepare antibody-horse-radish-peroxidase (HRP) conjugates. All 49 possible combinations of antisera and antibody-HRP-conjugates were examined with regard to their species specificity with GFAP and CNS of cattle and pig. The most suitable combination of antiserum and antibody-HRP-conjugate was chosen and the optimal concentration of immunoreagents was determined. On these conditions the detection limit for bovine GFAP was between 4.1 and 12.3 ng/ml.

In order to establish a suitable sample preparation for meat and meat products, different extraction media, temperature-time combinations and dilution media were compared. The sample preparation which yielded the highest measurement signal was used to produce an internal brain-standard with bovine CNS in order to quantify CNS contents in samples directly. On these conditions the detection limit was between 1 and 3 µg brain-equivalent per ml extract.

The sensitivity of the EIA for the detection of CNS in meat products was examined by analyzing raw and heated samples which were artificially contaminated with bovine brain or spinal cord: raw meat products with at least 0.5 % bovine brain or 0.1 % bovine spinal cord yielded always signals above the detection limit. The mean recovery rates of bovine brain were 86 % in raw and 94 % in heated meat products. The mean recovery rate of bovine spinal cord was about 5.5 fold higher than those of bovine brain.

In order to examine the species specificity of the EIA in meat products, raw and heated meat products were artificially contaminated with CNS of different animal species. Contaminated samples with at least 1 % porcine brain, 0.5 % porcine spinal cord or 0.5 % sheep, horse or rabbit brain yielded always signals above the detection limit. The mean recovery of porcine brain was one third of the mean recovery of bovine brain while the recovery rates of ovine brain were slightly higher and these of horse and rabbit brain were slightly lower than the recovery rates of bovine brain. If brain of chicken or turkey was used to contaminate meat products, no signal above the detection limit could be found.

The developed sandwich EIA was compared with a commercial EIA for the detection of CNS in meat products (RIDASCREEN risk material test, R-Biopharm), which also uses bovine GFAP as a marker protein. In this test the mean recovery rates of bovine brain were 82 % in raw meat products and 29 % in heated meat products. The mean recovery of porcine brain was 103 %, while the mean recovery of ovine brain was twice as high as those of bovine brain. Brain of rabbits and horses was detected with recovery rates of one third of those of bovine brain.

In order to check the applicability of the test for real food sample material as sold by retail shops 30 meat products were analysed and part of the extractions were artificially contaminated with ZNS-extracts. All samples were negativ for CNS. Artificially contaminated extracts yielded recoveries between 64 % and 121 %.

Attempts to improve the species specificity of the antisera by purification with immunoaffinity chromatography were made. The chromatography was carried out with bovine and porcine GFAP which was coupled to Sepharose 4B. Neither the eluates whose were gained by using bovine-GFAP-Sepharose nor the antisera which had obtained by subtractive immunoaffinity chromatography using porcine-GFAP-Sepharose have resulted in an improvement of species specificity in the indirect or sandwich EIA.

7 Literaturverzeichnis

AGAZZI, M.-E., J. BARRERO-MORENO, E. LÜCKER, C. VON HOLST, 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

ALBRECHTSEN, M., A. C. VON GESTENBERG, E. BOCK (1984)

Mouse monoclonal antibodies reacting with human brain Glial Fibrillary Acidic Protein

J. Neurochem. 42, 86-93

ALPER, T., D. A. HAIG, M. C. CLARKE (1978)

The scrapie agent: evidence against its dependence for replication on intrinsic nucleic acid

J. Gen. Virol. 41, 503-516

ANDERSON, R. M., C. A. DONNELLY, N. M. FERGUSON, M. E. J. WOOLHOUSE, C. J. WATT, H. J. UDY, S. MCWHINNEY, S. P. DUNSTAN, T. R. E. SOUTHWOOD, J. W. WILESMITH, J. B. M. RYAN, C. J. HOINVILLE, J. E. HILLERTON, A. R. AUSTIN, G. A. H. WELLS (1996)

Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle

Nature 382, 779-788

ANIL, M. H., S. LOVE, C. R. HELPS, D. A. HARBOUR (2002)

Potential for carcass contamination with brain tissue following stunning and slaughter in cattle and sheep

Food Control 13, 431-436

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

Jugular venous emboli of brain tissue induced in sheep by the use of captive bolt guns

Vet. Rec. 148, 619-620

ANIL, M. H., S. LOVE, S. WILLIAMS, A. SHAND, J. L. MCKINSTY, C. R. HELPS, A. WATERMAN-PEARSON, J. SEGATCHIAN (1999)

Potential contamination of beef carcasses with brain tissue at slaughter

Vet. Rec. 145, 460-462

ANONYM (1998)

BSE diagnosed more than a year before government warning

Nature 391, 626

ANTANITUS, D. S., B. H. CHOI, L. W. LAPHAM (1976)

The demonstration of glial fibrillary acidic protein in the cerebrum of the human fetus by indirect immunofluorescence

Brain Res. 103, 613-616

AUPPERLE, H., E. LÜCKER, M. OVERHOFF, 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

Fleischwirtsch. 82, 100-104

AURELL, A., L. E. ROSENGREN, B. KARLSSON, J. E. OLSSON, V. ZBORNOKOVA, K. G. HAGLID (1989)

Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infection

Stroke. 22, 1254-1258

BARBER, P.C., R. M. LINDSAY (1982)

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

Neuroscience 7, 3077-3090

BARCAROLO, R., A. BAU, J. BARRERO-MORENO, B. DIMITROVA, E. ANKLAM
(2003)

On-line LC-GC method for determination of isomers of nervonic acid in meat-derived food
J. Sep. Sci. 26, 1347-1352

BASLER, K., B. OESCH, M. SCOTT, D. WESTAWAY, M. WÄLCHLI, D. F. GROTH, M.
P. MCKINLEY, S. B. PRUSINER, C. WEISSMANN (1986)

Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene
Cell. 46, 417-428

BAUDNER, S. und R. M. DREHER (1991)

Immunochemische Methoden in der Lebensmittelanalytik – Prinzip und Anwendung
Lebensmittelchem. 45, 53-69

BAUER, N. E., T. GARLAND, J. F. EDWARDS (1996)

Brain emboli in slaughtered cattle
Vet. Pathol. 33, 600

BEEKES, M., E. BALDAUF, S. CAßENS, H. DIRINGER, P. KEYES, A. C. SCOTT, G. A.
H. WELLS, P. BROWN, C. J. Jr. GIBBS, D. C. GAJDUSEK (1995)

Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with
transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method
J. Gen. Virol. 76, 2567-2576

BEGHI, E., C. GANDOLFO, C. FERRARESE, N. RIZZUTO, G. POLI, M. C. TONINI, G.
VITA, M. LEONE, G. LOGROSCINO, E. GRANIERI, G. SALEMI, G. SAVETTIERI, L.
FRATTOLA, G. RU, G. L. MANCARDI, C. MESSINA (2004)

Bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease: facts and uncertainties
underlying the causal link between animal and human diseases
Neurol. Sci. 25, 122-129

BELAY, E. D., L. B. SCHÖNBERGER (2005)

The public health impact of prion diseases
Annu. Rev. Public Health 26, 191-212

BELLINGER KAWAHARA, C., T. O. DIENER, M. P. MCKINLEY, D. F. GROTH, D. R. SMITH, S. B. PRUSINER (1987)

Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids

Virology 160, 271-274

BELT, P. B., I. H. MUILEMAN, B. E. C. SCHREUDER, J. B. RUIJTER, A. L. J. GIELKENS, M. A. SMITS (1995)

Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie

J. Gen. Virol. 76, 509-517

BIEDERMANN, W., E. LÜCKER, A. HENSEL (2002)

Detection of tissues of the central nervous system (CNS) as specified risk material (SRM) in meat products by means of gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS)

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 115, 131-134

BIEDERMANN, W., E. LÜCKER, J. PÖRSCHMANN, S. LACHHAB, U. TRUYEN, A. HENSEL (2004)

Structural characterisation of some fatty acids from bovine brain as biomarkers of BSE risk material

Anal. Bioanal. Chem. 379, 1031-1038

BIGBEE, J. W., L. F. ENG (1982)

Analysis and comparison of *in vitro* synthesized Glial Fibrillary Acidic Protein with rat CNS Intermediate Filament Proteins

J. Neurochem. 38, 130-134

BIGNAMI, A., D. DAHL (1974)

Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein

J. Comp. Neur. 153, 27-38

BIGNAMI, A., L. F. ENG, D. DAHL, C. T. UYEDA (1972)

Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence

Brain Res. 43, 429-435

BJÖRKLUND, H., D. DAHL, L. OLSON, Á. SEIGER (1984a)

Glial Fibrillary Acidic Protein-like immunoreactivity in the iris: development, distribution and reactive changes following transplantation

J. Neurosci. 4, 978-988

BJÖRKLUND, H., D. DAHL, Á. SEIGER (1984b)

Neurofilament and glial fibrillary acidic protein-related immunoreactivity in rodent enteric nervous system

Neurosci. 12, 277-287

BOLTON, D. C., M. P. MCKINLEY, S. B. PRUSINER (1982)

Identification of a protein that purifies with the scrapie prion

Science 218, 1309-1311

BORCHELT, D. R., M. SCOTT, A. TARABOULOS, N. STAHL, S. B. PRUSINER (1990)

Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells

J. Cell. Biol. 110, 743-752

BOSSERS, A., B. E. C. SCHREUDER, I. H. MUILEMAN, P. B. G. M. BELT, M. A. SMITS (1996)

PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie

J. Gen. Virol. 77, 2669-2673

BRADLEY, R. (1996)

Bovine spongiform encephalopathy – distribution and update on some transmission and decontamination studies

In: Gibbs, C. J. jr. (ed.): Bovine spongiform encephalopathy – the BSE dilemma. Springer, New York, N.Y.

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

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

Vet. Rec. 143, 101-105

BROTHERSTON, J. G., C. C. RENWICK, J. T. STAMP, I. ZLOTNIK (1968)

Spread of Scrapie by contact to goats and sheep

J. Comp. Path. 78, 9-17

BROWN, D. R., K. QIU, J. W. HERMS, A. MADLUNG, J. MANSON (1997a)

The cellular prion protein binds copper *in vivo*

Nature 390, 684-687

BROWN, D. R., W. J. SCHULZ-SCHAEFFER, B. SCHMIDT, H. A. KRETSCHMAR (1997b)

Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity

Exp. Neurol. 146, 104-112

BROWN, P. (1988)

Human growth-hormone therapy and Creutzfeldt-Jakob Disease: a drama in three acts

Pediatrics 81, 85-92

BROWN, P., C. J. GIBBS, D. C. GAJDUSEK (1982)

Chemical disinfection of Creutzfeldt-Jakob Disease virus

N. Engl. J. Med. 306, 1279-1282

BROWN, P., C. J. GIBBS, P. RODGERS-JOHNSON, D. M. ASHER, M. P. SULIMA, A. BACOTE, L. G. GOLDFARB, D. C. GAJDUSEK (1994)

Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health – series of 300 cases of experimentally transmitted disease

Ann. Neurol. 35, 513-519

BROWN, P., R. G. ROHWER, D. C. GAJDUSEK (1986)

Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob Disease virus in brain tissue

J. Infect. Dis. 153, 1145-1148

BRUCE, M. E. (1996)

Strain typing studies of scrapie and BSE

In: Baker, H.F. et al. (eds.). Methods in molecular medicine, Humana Press, Totowa, NJ

pp. 223

BRUCE, M. E., I. MCCONNELL, H. FRASER, A. G. DICKINSON (1991)

The disease characteristics of different strains of scrapie in sine congenic mouse lines : implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis

J. Gen. Virol. 72, 595-603

BRUCE, M. E., R. G. WILL, J. W. IRONSIDE, I. MCCONELL, D. DRUMMOND, A. SUTTIN, L. MCCARDLE, A. CHREE, J. HOPE, C. BIRKETT, S. COUSENS, H. FRASER, C. J. BOSTOCK (1997)

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

Nature 389, 498-501

BUDKA, H. (1986)

Non-glial specificities of immunocytochemistry for the glial fibrillary acidic protein (GFAP). Triple expression of GFAP, vimentin and cytokeratins in papillary meningioma and metastasing renal carcinoma

Acta Neuropathol. 72, 43-54

BUDKA, H. (1998)

Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Wien. Klin. Wochenschr. 110, 451-454

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

Mice devoid of PrP are resistant to scrapie

Cell 73, 1339-1347

CAUGHLEY, B., G. J. RAYMOND (1991)

Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP(27-30) in water by infrared spectroscopy

Biochemistry 30, 7672-7680

CHIU, F.-C., B. KOREY, W. T. NORTON (1980)

Intermediate filaments from bovine, rat and human CNS: mapping analysis of the major proteins

J. Neurochem. 34, 1149-1159

CHOI, B. H., R. C. KIM (1984)

Expression of glial fibrillary acidic protein in immature oligodendroglia

Science 223, 407

CHOI, B. H., L. W. LAPHAM (1978)

Radial Glia in the human fetal cerebrum: A combined golgi, immunofluorescent and electron microscopy study

Brain Res. 148, 295-311

COLLING, S. B., J. COLLINGE, J. G. R. JEFFREYS (1996)

Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca²⁺-activated K⁺ currents

Neurosci. Lett. 209, 49-52

COLLINGE, J. (2001)

Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis

Annu. Rev. Neurosci. 24, 519-550

COLLINGE, J., K. C. SIDLE, J. MEADS, J. W. IRONSIDE, A. F. HILL (1996)

Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of “new-variant” CJD

Nature 383, 685-690

COLLINGE, J., M. A. WHITTINGTON, K. C. L. SIDLE, C. J. SMITH, M. S. PALMER, A. R. CLARKE, J. G. R. JEFFRERYS (1994)

Prion protein is necessary for normal synaptic function

Nature 370, 295-297

COORE, R. R., S. LOVE, J. L. MCKINSTRY, H. R. WEAVER, A. PHILLIPS, T. HILLMANN, M. J. HILES, A. SHAND, C. R. HELPS, M. H. ANIL (2004)

Dissemination of brain emboli following captive bolt stunning of sheep: capacity for entry into the systemic arterial circulation

J. Food Protect. 67, 1050-1052

COUSENS, S. N., M. ZEIDLER, T. F. ESMONDE, R. DESILVA, J. W. WILESMITH, P. G. SMITH, R. G. WILL (1997)

Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: analysis of epidemiological surveillance data from 1970-1996

BMJ 315, 389-396

CREUTZFELDT, H. G. (1920)

Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems

Z. Ges. Neurol. Psychiatr. 57, 1-18

DAHL, D., A. BIGNAMI (1976)

Immunogenic properties of the glial fibrillary acidic protein

Brain Res. 116, 150-157

DAHL, D., N. H. CHI, L. E. MILES, B. T. NGUYEN, A. BIGNAMI (1982)

Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Schwann cells: Fact or Artifact ?

J. Histochem. Cytochem. 30, 912-918

DAHL, D., C. J. CROSBY, J. S. SETHI, A. BIGNAMI (1985)

Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies

J. Comp. Neur. 239, 75-88

DAHMS, S. (1997)

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

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 161-165

DAVISON, P. F., R. N. JONES (1981)

Filament proteins in central, cranial and peripheral mammalian nerves

J. Cell. Biol. 88, 67-72

DEALLER, S., R. LACEY (1990)

Transmissible spongiform encephalopathies: the threat of BSE to man

Food Microbiol. 7, 253-279

DELASNERIE-LAUPETRE, N., S. POSER, M. POCCHIARI, D. P. W. M. WIENTJENS, R. WILL (1995)

Creutzfeldt-Jakob disease in Europe (letter)

Lancet 346, 898

DICKINSON, A. G., J. T. STAMP, C. C. RENWICK (1974)

Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep

J. Comp. Path. 84, 19-25

DODELET, V. C., N. R. CASHMAN (1998)

Prion protein expression in human leukocyte differentiation

Blood 91, 1556-1561

DONNELLY, C. A., A. C. GHANI, N. M. FERGUSON, J. W. WILESMITH, R. M. ANDERSON (1997)

Analysis of the bovine spongiform encephalopathy maternal cohort study: evidence for direct maternal transmission

Appl. Statist. 46, 321-344

EIGEN, M. (1996)

Prionics or the kinetic basis of prion diseases

Biophys. Chem. 63, A1-18

ENG, L. F., S. J. DEARMOND (1983)

Immunochemistry of the glial fibrillary acidic protein

In: Progress in Neuropathology, Vol. 5, ed.: Zimmermann, H., Raven Press, New York
pp. 19-39

ENG, L. F., R. S. GHIRNIKAR (1994)

GFAP and astrogliosis

Brain Pathol. 4, 229-237

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

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

Neurochem. Res. 25, 1439-1351

ENG, L. F., J. J. VANDERHAEGHEN, A. BIGNAMI, B. GERSTL (1971)

An acidic protein isolated from fibrous astrocytes

Brain Res. 28, 351-354

FICHET, G., E. COMOY, C. DUVAL, K. ANTLOGA, C. DEHEN, A. CHARBONNIER, C. MCDONNELL, P. BROWN, C. I. LASMÈZAS, J.-P. DESLYS (2004)

Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices

Lancet 364, 521-526

FISCHER, M., T. RULICKE, A. RABER, A. SAILER, M. MOSER, B. OESCH, S. BRANDNER, A. AGUZZI, C. WEISSMANN (1996)

Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knock-out mice to scrapie

EMBO J. 15, 1255-1264

FLECHSIG, E., D. SHMERLING, I. HEGYI, A. J. RAEBER, M. FISCHER, A. COZZIO, C. VON MERING, A. AGUZZI, C. WEISSMANN (2000)

Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout-mice

Neuron 27, 394-408

FORD, B. J. (ed.) (1996)

BSE – the facts (mad cow disease and the risk to mankind)

Gorgi Books, Transworld Publications, London

FRASER, H. (1983)

A survey of primary transmission of Icelandic scrapie (Rida) in mice

In: Court, L. et al. (eds.). Virus non-conventionnels et affections du système nerveux central

Masson, Paris. pp. 34

GARD, A.L., F. P. WHITE, G. R. DUTTON (1985)

Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver

J. Neuroimmunol. 8, 359-375

GARLAND, T., N. BAUER, M. BAILEY (1996)

Brain emboli in the lungs of cattle after stunning (letter)

Lancet 348, 610

GERMAN, T. L., B. C. MCMILLAN, B. E. CASTLE, C. DEES, W. F. WADE, R. F. MARSH (1985)

Comparison of RNA from healthy and scrapie-infected hamster brain

J. Gen. Virol. 66, 839-844

GIBBS, C. J. jr., D. C. GAJDUSEK, D. M. ASHER, M. P. ALPERS, E. BECK (1968)
Creutzfeldt-Jakob Disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee
Science, 161, 388-389

GOMI, H., T. YOKOHAMA, K. FUJIMOTO, T. IKEDA, A. KATOK, T. HOH, S. ITOHARA (1995)
Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions
Neuron 14, 29-41

HADLOW, W. J. (1961)
The pathology of experimental scrapie in the dairy goat
Res. Vet. Sci. 2, 289-314

HADLOW, W. J., R. C. KENNEDY, R. E. RACE (1982)
Natural infection of Suffolk Sheep with Scrapie virus
Journal Infect. Dis. 146, 657-664

HAIK, S., J. P. BRANDEL, C. OPPENHEIM, V. SAZDOVITCH, D. DORMONT, J. J. HAUW, C. MARSAULT (2002)
Sporadic CJD clinically mimicking variant CJD with bilateral increased signal in the pulvinar
Neurology 58, 148-149

HAJMEER, M., D. O. CLIVER, R. PROVOST (2003)
Spinal cord tissue detection in comminuted beef: comparison of two immunological methods
Meat Science 65, 757-763

HARALAMBIEV, H. (1973)
An attempt to induce scrapie in local sheep in Bulgaria
Zbl. Vet. Med. (B.) 20, 701-709

HATFIELD, P. J., R. P. SKOFF, H. MAISEL, L. F. ENG (1984)
Glial fibrillary acidic protein is localized in the lens epithelium
J. Cell. Biol. 98, 1895-1898

HELPS, C. R., A. V. FISHER, D. A. HARBOUR, D. H. O'NEILL, A. C. KNIGHT (2004)
Transfer of spinal cord material to subsequent bovine carcasses at splitting
J. Food Protect. 67, 1921-1926

HELPS, C. R., P. HINDELL, T. J. HILLMANN, A. V. FISHER, H. ANIL, A. C. KNIGHT,
R. T. WHYTE, D. H. O'NEILL, T. G. KNOWLES, D. A. HARBOUR (2002)
Contamination of beef carcasses by spinal cord tissue during splitting
Food control 13, 417-423

HERBERT, G. A., P. L. PELHAM, B. PITTMANN (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, C. LANG, R. LEISER, 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, 823-827

HERMANN, M., P. VOS, M. T. WUNDERLICH, C. H. de BRUIJN, K. L. LAMERS (2000)
Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum
concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein
Stroke 31, 2670-2677

HERMS, J., T. TINGS, S. GALL, A. MADLUNG, A. GIESE, H. SIEBERT, P.
SCHÜRSMANN, O. WINDL, N. BROSE, H. KRETSCHMAR (1999)
Evidence of presynaptic location and function of the prion protein
J. Neurosci. 15, 8866-8875

HILDEBRANDT, G., E. LÜCKER, 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 (1997a)

The same prion strain causes vCJD and BSE

Nature 389, 448-450

HILL, A. F., M. ZEIDLER, J. W. IRONSIDE, J. COLLINGE (1997b)

Diagnosis of new-variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy

Lancet 349, 99-100

HILTON, D. A., E. FATHERS, P. EDWARDS, J. W. IRONSIDE, J. ZAJICEK (1998)

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

Lancet, 352, 703-704

HÖFLER, H., G. F. WALTER, H. DENK (1984)

Immunohistochemistry of folliculo-stellate cells in normal human adenohypophyses and in pituitary adenomas

Acta Neuropathol. 65, 35-40

HÖRNLIMANN, B., D. GUIDON, C. GRIOT (1994)

Risikoeinschätzung für die Einschleppung von BSE

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 101, 295-298

HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER, H. KRETZSCHMAR (2001)

Prionen und Prionenkrankheiten

Walter de Gruyter Verlag, Berlin

HOLTBECKER, J., A. STOLLE (2005)

Speziespezifischer Nachweis von zentralem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen unter Verwendung des Myelin Basic Protein

Archiv Lebensmittelhygiene 56, 108-109

HORLACHER, S. (2002)

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

Inaugural-Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen

HOSSNER, K. L., R. S. YEMM, S. E. SONNENSHEIN, G. L. MASON, B. A. CUMMINGS, M. C. S. REDDY, J. N. SOFOS, J. A. SCANGA, J. D. TATUM, G. C. SMITH, K. E. 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, 644-650

HSICH, G., K. KENNEY, J. R. GIBBS Jr., K. H. LEE, M. G. HARRINGTON (1996)

The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies

N. Engl. J. Med. 335, 924-930

HUGHSON, E., P. REECE, M. J. DENNIS, S. OEHLISCHLAGER (2003)

Comparative evaluation of the performance of two commercial kits for the detection of central nervous system tissue in meat

Food Additives and Contaminants 20, 1034-1043

HUNTER, N., J. D. FOSTER, W. GOLDMANN, M. J. STEAR, J. HOPE, C. BOSTOCK (1996)

Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes

Arch. Virol. 141, 809-824

HUNTER, N., W. GOLDMANN, J. D. FOSTER, D. CAIRNS, G. SMITH (1997b)

Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep

Vet. Rec. 141, 137-140

HUNTER, N., L. MOORE, B. D. HOSIE, W. S. DINGWALL, A. GREIG (1997a)
Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland
Vet. Rec. 140, 59-63

JAKOB, A. M. (1921)
Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (Spastische Pseudosklerose – Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden)
Dtsch. Z. Nervenheilk. 70, 132-146

JESSEN, K. R., R. MIRSKY (1980)
Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein
Nature 286, 736-737

JESSEN, K. R., R. MIRSKY (1983)
Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia
J. Neurosci. 3, 2206-2218

JESSEN, K. R., R. MIRSKY (1985)
Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia: molecular weight, heterogeneity and distribution
J. Neuroimmunology 8, 377-393

JESSEN, K. R., R. THORPE, 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. Neurocyt. 13, 187-200

JOHNSON, C. T., C. J. WHITAKER (1988)
Bovine spongiform encephalopathy (letter)
Vet. Rec. 122, 142

KELLEY, L. C., S. HAFNER, P. C. MCCASKEY, M. T. SUTTON, 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, 1107-1112

KELLINGS, K., N. MEYER, C. MIRENDA, S. B. PRUSINER, D. RIESNER (1992)

Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis

J. Gen. Virol. 73, 1025-1029

KITAMOTO, T., J. TATEISHI, Y. SATO (1988)

Immunohistochemical verification of senile and kuru plaques in Creutzfeldt-Jakob Disease and allied diseases

Ann. Neurol. 24, 537-542

KROS, J. M., C. G. VAN EDEN, S. Z. STEJANKO, M. WAAYER-VAN BATENBURG, T. H. VAN DER KWAST (1990)

Prognostic implications of glial fibrillary acidic protein containing cell types in oligodendrogliomas

Cancer 66, 1204-1212

LAPREVOTTE, I., A. HENAUT (2003)

The new variant Creutzfeldt-Jakob disease accounts for no relative increase of the Creutzfeldt-Jakob disease mortality rate in the United Kingdom; this fits ill with the new variant being the consequence of consumption of food infected with the agent of bovine spongiform encephalopathy

BMC Publ. Health 3, 25-29

LASMÉZAS, C. I., J.-P. DESLYS, R. DELMALMAY, K. T. ADJOU, F. LAMOURY, D. DORMONT, O. ROBAIN, J. IRONSIDE, J.-J. HAUW (1996)

BSE transmission to macaques (letter)

Nature 381, 743-744

LEE, K. H., M. G. HARRINGTON (1997)

14-3-3 and BSE

Vet. Rec. 140, 206-207

LEGNAME, G., I. V. BASKAKOV, H.-O. B. NGUYEN, D. RIESNER, F. E. COHEN, S. J. DEARMOND, S. B. PRUSINER (2004)

Synthetic mammalian prions

Science 305, 673-676

LEMSTRA, A. W., M. T. VAN MEEGEN, J. P. VREYLING, P. H. S. MEIJERINK, G. H. JANSEN, S. BULK, F. BAAS, W. A. VAN GOOL (2000)

14-3-3 testing in diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease. A prospective study

Neurology 55, 514-516

LEVITT, P., P. RAKIC (1980)

Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain

J. Comp. Neurol. 193, 815-840

LOVE, S., M. H. ANIL, S. WILLIAMS, A. SHAND (1999)

Embolism of brain tissue associated with the use of a pneumatically operated captive bolt gun in cattle

Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25, 152

LOVE, S., C. R. HELPS, S. WILLIAMS, A. SHAND, J. L. MCKINSTY, S. N. BROWN, D. A. HARBOUR, M. H. ANIL (2000)

Methods for detection of haematogenous dissemination of brain tissue after stunning of cattle with captive bolt guns

J. Neuroscience Methods 99, 53-58

LUDWIN, S. K., J. C. KOSEK, L.F. ENG (1976)

The topographical distribution of S-100 and GFA Proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies

J. Comp. Neur. 165, 197-208

LÜCKER, E. (2003)

Zum aktuellen Stand der Nachweisverfahren von SRM in Fleischerzeugnissen

43. DVG-Arbeitstagung Lebensmittelhygiene in Garmisch-Partenkirchen vom 29.09 – 02.10.2003, S. 94-95

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

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

Journal of food protection 62, 268-276

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

Identification of central nervous system tissue in retail meat products

J. Food Protect. 63, 258-263

LÜHKEN, G., A. BUSCHMANN, M. H. GROSCHUP, G. ERHARDT (2004)

Prion protein allele A₁₃₆H₁₅₄Q₁₇₁ is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep

Arch. Virol. 149, 1571-1580

MACDIARMID, S. C. (1996)

Scrapie: the risk of its introduction and effects on trade

Aust. Vet. J. 73, 161-164

MAGERKURTH, O. (2003)

Nachweis von saurem glialem Faserprotein (GFAP) in humanem Serum und erste klinische Ergebnisse

(Dissertation) Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilian-Universität München

MCGOWAN, J. P. (1922)

Scrapie in sheep

Scottish J. Agric. 5, 365-375

MCKINLEY, M. P., R. K. MEYER, L. KENAGA, F. RAHBAR, R. COTTER, A. SERBAN,
S. B. PRUSINER (1991)

Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis
J. Virol. 65, 1340-1351

MCLENDON, R. E., D. D. BIGNER (1994)

Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations
Brain Pathol. 4, 221-228

MERZ, P. A., R. A. SIMERVILLE, H. M. WISNIEWSKI, K. IQBAL (1981)

Abnormal fibrils from scrapie-infected brain
Acta Neuropathol. 54, 63-74

MEYER, N., V. ROSENBAUM, B. SCHMIDT, K. GILLER, C. MIRENDA, D. GROTH, S.
B. PRUSINER, D. RIESNER (1991)

Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids
J. Gen. Virol. 72, 37-49

MØLLER, M., A. INGILD, E. BOCK (1978)

Immunohistochemical demonstration of S-100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland
Brain Res. 140, 1-13

MORITZ, A. (1995)

Cholesterin- und Puringehalte von Wildfleisch
Fleischwirtschaft 75, 814-818

MOYNAGH, J., H. SCHIMMEL (1999)

Tests for BSE evaluated
Nature 400, 105

MURDOCH, G. H., T. SKLAVIADIS, E. E. MANUELIDIS, L. MANUELIDIS (1990)

Potential retroviral RNAs in Creutzfeldt-Jakob disease

J. Virol. 64, 1477-1486

NICHOLS, N. R., J. R. DAY, N. J. LAPING, S. A. JOHNSON, C. E. FINCH (1993)

GFAP mRNA increases with age in rat and human brain

Neurobiology of aging 14, 421-429

NIEDERER, M., 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

NOPPE, M., R. CROLS, D. ANDREIS, A. LOWENTHAL (1986)

Determination in human cerebrospinal fluid of glial fibrillary acidic protein, S-100, and myelin basic protein as indices of non-specific or specific central nervous tissue pathology

Clin. Chim. Acta 155, 143-150

NOTI, A., S. BIEDERMANN-BREM, M. BIEDERMANN, K. GROB (2002)

Determination of central nervous and organ tissue in meat products through GC-MS analysis of marker fatty acids from sphingolipids and phospholipids

Mitt. Lebensm. Hyg. 93, 387-401

NOWAK, B., T. v. MUEFFLING, A. KUEFEN, K. GANSEFORTH, 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 Prot. 68, 2178-2183

OBERTHÜR, R. C. (2004)

Modellrechnung zur Erklärung der BSE-Inzidenz in Deutschland

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 117, 230-242

OESCH, B., D. WESTAWAY, M. WALCHI, M. MCKINLEY, S. B. H. KENT, R. AEBERSOLD, R. A. BARRY, D. TEMPST, D. B. TEFLOW, L. HOOD, S. B. PRUSINER, C. WEISSMANN (1985)

A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein

Cell 40, 735-746

O`ROURKE, K. I., T. V. BASZLER, T. E. BESSER, J. M. MILLER, R. C. CUTLIP, G. A. H. WELLS, S. J. RYDER, S. M. PARIH, A. N. HAMIR, N. E. COCKETT, A. JENNY, D. P. KNOWLES (2000)

Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue

J. Clin. Microbiol. 38, 3254-3259

O`ROURKE, K. I., T. V. BASZLER, S. M. PARISH, D. P. KNOWLES (1998)

Preclinical detection of PrP^{sc} in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep

Vet. Rec. 142, 489-491

OVERHOFF, M., E. LÜCKER (2003)

Verfahren zum Nachweis von im Hinblick auf die BSE unerwünschten Zutaten in Fleischerzeugnissen, 9. Eignung monoklonaler Antikörper für den spezifischen Nachweis zentralen Nervengewebes in Fleischerzeugnissen

Fleischwirtsch. 83, 93-96

PARRY, H. B. (1983)

Scrapie disease in sheep

In: Oppenheimer, D. R. (ed.). Academic Press, London

PATTISON, I. H., M. N. HOARE, J. N. JEBBETT, W. A. WATSON (1972)

Spread of Scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep

Vet. Rec. 90, 465-468

PEKNY, M., P. LEVEEN, P. PEKNA, C. ELIASSON, C. H. BERTHOLD, B. WESTERMARK, O. BETSHOLTZ (1995)

Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally

EMBO J. 14, 1490-1498

PRENDERGAST, D. M., J. J. SHERIDAN, D. J. DALY, D. A. MCDOWELL, I. S. BLAIR (2003)

Dissemination of central nervous system tissue from the brain and spinal cord of cattle after captive bolt stunning and carcass splitting

Meat Science 65, 1201-1209

PRENDERGAST, D. M., J. J. SHERIDAN, D. J. DALY, D. A. MCDOWELL, I. S. BLAIR (2004)

Dissemination of central nervous system tissue during the slaughter of cattle in three Irish abattoirs

Vet. Rec. 154, 21-24

PRUSINER, S. B. (1982)

Novel proteinaceous particles cause scrapie

Science 216, 136-144

PRUSINER, S. B. (1991)

Molecular biology of prion diseases

Science 252, 1515-1522

PRUSINER, S. B., D. E. GARFIN, S. P. COCHRAN, J. R. BARINGER (1978)

Evidence for hydrophobic domains on the surface of the Scrapie agent

Trans. Natl. Acadl. Neuropath. ,62-64

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, 630-632

RIEK, R., S. HORNE MANN, G. WIDER, M. BILLETER, R. GLOCKSHUBER, K. WÜTHRICH (1996)

NMR structure of the mouse prion proteins domain PrP (121-231)

Nature 382, 180-182

RIEK, R., S. HORNE MANN, G. WIDER, R. GLOCKSHUBER, K. WÜTHRICH (1997)

NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP (23-231)

FEBS Lett. 413, 282-288

ROBEY, W. G., R. JACKSON, R. L. WALTERS, H. J. M. BRACKE, C. A. HARRINGTON, W. R. KILLIAN (1998)

Use of cerebrospinal fluid levels of 14-3-3 in predicting neurodegeneration in confirmed BSE symptomatic cattle

Vet. Rec. 143, 50-51

ROSENGREN, L. E., G. AHLSEN, M. BELFRAGE, C. GILLBERG, K. G. HAGLID, A. HAMBERGER (1992)

A sensitive ELISA for glial fibrillary acidic protein: Application in cerebrospinal fluid of children

J. Neurosci. Meth. 44, 113-119

ROSENGREN, L. E., C. WIKKELSO, L. HAGBERG (1994)

A sensitive ELISA for glial fibrillary acidic protein: Application in cerebrospinal fluid of adults

J. Neurosci. Meth. 51, 197-204

RUBINSTEIN, R. (1987)

Detection of scrapie associated fibrils (SAF) and SAF-proteins from scrapie-affected sheep

J. Infect. Dis. 156, 36-42

RUBINSTEIN, R., G. BRUCHER (1980)

Focal ependymal differentiation in choroid plexus papillomas. An immunoperoxidase study

Acta Neuropathol. 52, 29-33

RUEGER, D. C., D. DAHL, A. BIGNAMI (1978)

Purification of a brain-specific astroglial protein by immunoaffinity chromatography

Anal. Biochem. 89, 360-371

RUNQUIST, M., I. PARMYRD, A. THELIN, T. CHOJNACKI, T. DALLNER (1995)

Distribution of branch point phenyltransferases in regions of bovine brain

J. Neurochem. 65, 2299-2306

SABUNCU, E., S. PETIT, A. LE DUR, T. LAN LAI, J. L. VILOTTE, H. LAUDE, D. VILETTE (2003)

PrP polymorphisms tightly control sheep prion replication in cultured cells

J. Virol. 77, 2696-2700

SAILER, A., H. BÜELER, M. FISCHER, A. AGUZZI, C. WEISSMANN (1994)

No propagation of prions in mice devoid of PrP

Cell 77, 967-968

SAKAGUCHI, S., S. KATAMINE, K. SHIGEMATSU, A. NAKATANI, R. MORIUCHI, N. NISHEDA, K. KUROKAWA, R. NAKAOKE, H. SATO, K. JISHAGE, J. KUNO, R. NODA, T. MIYAMOTO (1995)

Accumulation of proteinase K-resistant prion-protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent

J. Virol. 69, 7586-7592

SALMAN, M. D., T. JEMMI, J. TRIANTIS, R. D. DEWELL (2005)

Assessment and modification of a Western Blot Assay for detection of central nervous system tissue in meat products in the united states

J. Food Prot. 68, 1796-1711

SARRADET, M. (1883)

Un cas de tremblante sur un boeuf

Rev. Vét. 3, 310-312, Referenz gemäß Hörnlimann, B. (ed.). Prionen und Prionenkrankheiten, Walter de Gruyter, Berlin und New York, 2001

SCHACHNER, M., E. T. HEDLEY-WHITE, D. W. HSU, G. SCHOONMAKER, A. BIGNAMI (1977)

Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labeling

J. Cell. Biol. 75, 57-73

SCHICKER, E. (1997)

Klinische Befunde bei Kühen mit Bovines Spongiformer Enzephalopathie (BSE)

(Dissertation) Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Zürich

SCHLAEPFER, W. W., U.-J. P ZIMMERMANN (1981)

Calcium-mediated breakdown of glial filaments in rat optic nerve and spinal cord

Neurochem. Res. 6, 243-255

SCHMIDT, G. R., K. L. HOSSNER, R. S. YEMM, 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, 390-393

SCHMIDT, G. R., K. L. HOSSNER, R. S. YEMM, D. H. GOULD, 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, 394-397

SCHMIDT, G. R., R. S. YEMM, K. D. CHILDS, J. P. O'CALLAGHAN, K. L. HOSSNER (2001)

The detection of central nervous system tissue on beef carcasses and in comminuted beef

J. Food Protect. 64, 2047-2052

SCHMIDT, G. R., R. S. YEMM, K. D. CHILDS, J. P. O'CALLAGHAN, K. L. HOSSNER (2002)

Verification of different glial fibrillary acidic protein (GFAP) analyses as accurate detectors of central nervous system tissue in advanced meat recovery (AMR) products

Meat Science 62, 79-84

SCHÖNENBRÜCHER, H., A. ABDULMAWJOOD, M. BÜLTE (2003)

Erstmaliger tierartspezifischer Nachweis von GFAP in prozessierten Lebensmitteln mit einem Real Time-PCR-Verfahren

DVG 44. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen

SCHREUDER, B. E. C., L. J. M. VAN KEULEN, M. E. W. VROMANS, J. P. M. LANGEVELD, M. A. SMITS (1996)

Preclinical test for prion diseases (letter)

Nature 381, 563

SCHREUDER, B. E. C., L. J. M. VAN KEULEN, M. E. W. VROMANS, J. P. M. LANGEVELD, M. A. SMITS (1998)

Tonsillar biopsy and PrP^{sc} detection in the preclinical diagnosis of scrapie

Vet. Rec. 142, 564-568

SCHWANINGER, M., R. WINTER, W. HACKE, R. VON KUMMER, C. SOMMER, M. KIESSLING, W. J. SCHULZ-SCHAEFFER, H. A. KRETZSCHMAR (1997)

Magnetic resonance imaging in Creutzfeldt-Jakob disease: evidence of focal involvement of the cortex

J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 63, 408-416

SCOTT, P. R., B. M. ALDRIDGE, M. CLARKE, R. G. WILL (1990)

Cerebrospinal fluid studies in normal cows and cases of bovine spongiform encephalopathy

Br. vet. J. 146, 88-90

SCOTT, P. R., R. G. WILL, J. W. IRONSIDE (1999)

Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 26, 15137-15142

SEYBOLDT, C., A. JOHN, T. v. MUEFFLING, B. NOWAK, S. WENZEL (2003)

Reverse-tanscription-polymerase chain reaction assay for species-specific detection of bovine central nervous system tissue in meat and meat products

J. Food Protec. 66, 644-651

SEYBOLDT, C., A. JOHN, T. VON MÜFFLING, B. NOWAK, S. WENZEL (2002)

Nachweis von bovinem ZNS-Gewebe in Fleischerzeugnissen mittels RT-PCR

DVG 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen

SOUCL, S. W., W. FACHMANN, H. KRAUT (1994)

Food composition and nutrition tables, 5th ed.

Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, Deutschland

STAHL, N., D. R. BORCHELT, K. HSIAO, S. B. PRUSINER (1987)

Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid

Cell 51, 229-240

STEAD, R. H., A. H. QIZILBASH, T. KONTOZOGLOU, A. D. DAYA, R. H. RIDDELL (1988)

An immunohistochemical study of pleomorphic adenomas of the salivary gland: glial-fibrillary acidic protein-like immunoreactivity identifies a major myoepithelial component

Hum. Pathol. 19, 32-40

STÖCKEL, J., J. SAFAR, A. C. WALLACE, F. E. COHEN, S. B. PRUSINER (1998)

Prion protein selectively binds copper(II) ions

Biochemistry 37, 7185-7193

SUESS, U., V. PLIŠKA (1981)

Identification of the pituicytes as astroglial cells by indirect immunofluorescence-staining for the glial fibrillary acidic protein

Brain Res. 221, 27-33

TAYLOR, K. C. (1991)

The control of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain

Vet. Rec. 129, 522-526

TAYLOR, D. M., H. FRASER, I. MCCONNELL, D. A. BROWN, K. L. BROWN, K. A. LAMZA, G. R. A. SMITH (1994)

Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie

Arch. Virol. 139, 313-326

TAYLOR, D. M., I. MCCONNELL, H. FRASER (1996)

Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice

J. Gen. Virol. 77, 1595-1599

TAYLOR, D. M., S. L. WOODGATE, M. J. ATKINSON (1995)

Inactivation of bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures

Vet. Rec. 137, 605-610

TAYLOR, D. M., S. L. WOODGATE, A. J. FLEETWOOD, R. J. G. CAWTHORNE (1997)

The effect of rendering procedures on the scrapie agent

Vet. Rec. 141, 643-649

TERSTEEG, M. H. G., P. A. KOOLMEES, F. van KNAPEN (2002)

Immunohistochemical detection of brain tissue in heated meat products

Meat Science 61, 67-72

TOBLER, I., T. DEBOER, M. FISCHER (1997)

Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice

J. Neurosci. 17, 1869-1879

TOBLER, I., S. E. GAMS, T. DEBOER, P. ACHERMANN, M. FISCHER, T. RÜLICHE, M. MOSER, B. OESCH, P. A. MCBRIDE, J. C. MANSON (1996)

Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein
Nature 380, 639-642

TRESCA, J. P., R. RICOUX, M. PONTET, R. ENGLER (1995)

Comparative activity of peroxidase-antibody conjugates with periodate and glutaraldehyde coupling according to an enzyme immunoassay
Ann. Biol. Clin. 53, 227-231

UYEDA, C. T., L. F. ENG, A. BIGNAMI (1972)

Immunological study of the glial fibrillary acidic protein
Brain Res. 37, 81-89

VAN DER MEULEN, J. D. M., H. J. HOUTHOFF, E. J. EBELS (1978)

Glial fibrillary acidic protein in human gliomas
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 4, 177-190

VAN EVERBROECK, B. S. QUOILIN, J. BOONS, J. J. MARTIN, P. GRAS (2003)

A prospective study of CSF markers in 250 patients with possible Creutzfeldt-Jakob disease
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 74, 1210-1214

VAN GEEL, W. J., H. P. DE REUS, H. NIJZING, M. M. VERBECK, P. E. VOS, K. J. LAMERS (2002)

Measurement of glial fibrillary acidic protein in blood: an analytical method
Clin. Chim. Acta 326, 151-154

VAN KEULEN, L. J., B. E. C. SCHREUDER, R. H. MELOEN, G. MOOIJ-HARKES, M. E. W. VROMANS, J. P. M. LANGEVELD (1996)

Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie
J. Clin. Microbiol. 34, 1228-1231

VELASCO, M. E., D. DAHL, U. ROSSMANN, P. L. GAMBRETTI (1980)
Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms
Cancer 45, 484-494

VERDRAEGER, J. (1996)
Creutzfeldt-Jakob disease
Lancet 347, 1704

VERDRAEGER, J. (1997)
Kuru and new variant CJD
Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 28, 535-539

WEBER, T., A. GIESE, N. PIENING, G. MITTEREGGER, A. THOMZIG, M. BEEKES, H.
A. KRETZSCHMER (2007)
Generation of genuine prion infectivity by serial PMCA
Vet. Microbiol. 123, 346-357

WELLS, G. A. (1994)
Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy
Vet. Rec. 135, 40-41

WELLS, G. A. (1996)
Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy
In: Gibbs, C. J. jr. (ed.): *Bovine spongiform encephalopathy – the BSE dilemma*. Springer, New York, N.Y.

WELLS, G. A. H., M. DAWSON, S. A. C. HAWKINS, R. B. GREEN, I. DEXTER, M. E. FRANCIS, M. M. SIMMONS, A. R. AUSTIN, M. W. HOURRIGAN (1998)
Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update
Vet. Rec. 142, 103-106

WELLS, G. A. H., A. C. SCOTT, C. T. JOHNSON, R. F. GUNNING, R. D. HANCOCK, M. JEFFREY, M. DAWSON, R. BRADLEY (1987)

A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle

Vet. Rec. 121, 419-420

WENISCH, S., E. LÜCKER, E. EIGENBRODT, R. LEISER, M. BÜLTE (1999)

Detection of central nervous tissue in meat products -an immunohistochemical approach-

Nutrition Research 19, 1165-1172

WIJERATNE, W. V. S., R. N. CURNOW (1990)

A study of the inheritance of susceptibility to bovine spongiform encephalopathy

Vet. Rec. 126, 5-8

WILESMITH, J. W., J. B. RYAN (1992)

Bovine spongiform encephalopathy recent observations on the age-specific incidences

Vet. Rec. 130, 491-492

WILESMITH, J. W., J. B. M. RYAN, M. J. ATKINSON (1991)

Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin

Vet. Rec. 128, 199-203

WILESMITH, J. W., G. A. H. WELLS, M. P. CRANWELL, J. B. M. RYAN (1988)

Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies

Vet. Rec. 123, 638-644

WILL, R. G., A. ALPEROVITCH, S. POSER (1998)

Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six European countries, 1993-1995

Ann. Neurol. 43, 763-767

WILL, R. G., J. W. IRONSIDE, M. ZEIDLER, S. N. COUSENS, K. ESTIBEIRO, A. ALPÉROVITCH, S. POSER, M. POCCHIARI, A. HOFMAN, P. G. SMITH (1996)

A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK

Lancet 347, 921-925

WILL, R. G., M. ZEIDLER, G. E. STEWART (2000)

Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease

Ann. Neurol 47, 575-582

WILSON, M. B., P. NAKANE (1978)

Recent developments in the periodat method of conjugating horseradish peroxidase (HRP) to antibodies

in: Knapp, W., K. Holubar, G. Wick: Immunofluorescence and related staining techniques, p. 215-224, Elsevier, Amsterdam

WINELAND, N. E., L. A. DETWILER, M. D. SALMAN (1998)

Epidemiologic analysis of reported scrapie in sheep in the United States: 1,117 cases (1947-1992)

J. Am. Vet. Med. Assoc. 212, 713-718

WOOD, J. L., L. J. LUND, S. H. DONE (1992)

The natural occurrence of scrapie in moufflon

Vet. Rec. 130, 25-27

WÖRNER, W. (1990)

Kopplung von Peroxidase

In : Peters, J. H., . Baumgarten: Monoklonale Antikörper, p. 294-296, Springer Verlag, Berlin

WOERTGEN, C., R. D. ROTHOERL, M. WIESMANN, U. U. MISSLER, A. BARAWANSKI (2002)

Glial and neuronal serum markers controlled cortical impact injury in the rat

Acta Neurochir. Suppl. 81, 205-207

WORTBERG, B. (1975)

Zur Spezifität der Cholesterinoxidase für die enzymatische Cholesterinbestimmung

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 157, 333-338

YEN, S.-H., 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., E. C. JOHNSTONE, R. W. K. BAMBER, C. M. DICKENS, C. J. FISHER, A. F. FRANCIS, R. GOLDBECK, R. HIGGIO, E. C. JOHNSON-SABINE C. J. LODGE, P. MCGARRY, S. MITCHELL, L. TARLO, M. TURNER, P. TYLEY, R. G. WILL (1997a)

New variant Creutzfeldt-Jakob disease: psychiatric features

Lancet 350, 908-910

ZEIDLER, M., R. J. SELLAR, D. A. COLLIE, R. KNIGHT, G. STEWART, M.-A. MACLEOD, J. W. IRONSIDE, S. COUSENS, A. F. C. COLCHESTER, D. M. HADLEY, R. G. WILL (2000)

The pulvinar sign on magnetic resonance imaging in variant Creutzfeldt-Jakob disease

Lancet 355, 1412-1418

ZEIDLER, M., G. E. STEWART, C. R. BARRACLOUGH, D. E. BATEMAN, D. BATES, D. J. BURN, A. C. COLCHESTER, W. DURWARD, N. A. FLETCHER, S. A. HAWKINS, J. M. MACKENZIE, R. G. WILL (1997b)

New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurologic features and diagnostic tests

Lancet 350, 903-907

ZEIDLER, M., G. E. STEWART, S. N. COUSENS (1997c)

Codon 129 genotype and variant Creutzfeldt-Jakob disease

Br. Med. J. 322, 841-844

ZERR, I., M. BODEMER, O. GEFELLER. (1998)

Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease

Ann. Neurol 43, 32-40

ZERR, I., M. POCCHIARI, S. COLLINS, J. P. BRANDEL, J. DE PEDRO CUESTA, R. S. G. KNIGHT, H. BERNHEIMER, F. CARDONE, N. DELASNERIE-LAUPÊTRE, N. CUADRADO CORRALUS, A. LADOGANA, M. BODEMER, A. FLETCHER, T. AWAN, A. RUIZ BRÉMON, H. BUDKA, J. L. LAP LANCHE, R. G. WILL, S. POSER (2000)
Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease
Neurology 55, 811-815

ZLOTNIK, I. (1962)
A comparative study of lesions in the brain of sheep and goats
Acta Neuropathol. Suppl. 1, 61-70

Gesetze und Verordnungen

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFBG)

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

Verordnung (EG) Nr. 163/2009 der Kommission vom 26.02.2009 zur Änderung von Anhang 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. der Europäischen Gemeinschaft L 55 vom 27.02.2009, S. 17-18

Verordnung (EG) Nr. 220/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11.03.2009 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien

ABl. der Europäischen Gemeinschaft L 87 vom 31.03.2009, S. 155-156

Verordnung (EG) Nr. 777/2008 der Kommission vom 04.08.2008 zur Änderung der Anhänge I, V und VII der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte

ABl. der Europäischen Gemeinschaft L 207 vom 05.08.2008, S. 9-10

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, zuletzt geändert am 11.03.2009

ABl. der Europäischen Gemeinschaft L 147 vom 31.05.2001, S. 1-40

Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 03.10.2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte, zuletzt geändert am 04.08.2008

ABl. der Europäischen Gemeinschaft L 273 vom 10.10.2002, S. 3-3

Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) vom 03.11.2004, zuletzt geändert am 06.04.2009

BGBI I S. 2764, BGBI II S. 752

Verordnung zur fleischhygienerechtlichen Untersuchung von geschlachteten Rindern auf BSE (BSE-Untersuchungsverordnung – BSEUntersV) vom 18.09.2002, zuletzt geändert am 11.12.2008

BGBI I S. 3730, BGBI. I S. 2461

1999/534/EG: Entscheidung des Rates vom 19.07.1999 über Maßnahmen zum Schutz gegen die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien bei der Verarbeitung bestimmter tierischer Abfälle und zur Änderung der Entscheidung 97/735/EG der Kommission

ABl. der Europäischen Union L204 vom 04.08.1999, S. 37-42

2007/453/EG: Entscheidung der Kommission vom 29.06.2007 zur Festlegung des BSE-Status von Mitgliedstaaten, Drittländern oder Gebieten davon nach ihrem BSE-Risiko

ABl. der Europäischen Gemeinschaft L172 vom 30.06.2007, S. 84-86

2008/829/EG: Entscheidung der Kommission vom 30.10.2008 zur Änderung des Anhangs der Entscheidung 2007/453/EG der Kommission zur Festlegung des BSE-Status von Mitgliedstaaten, Drittländern oder Gebieten davon nach ihrem BSE-Risiko

ABl. der Europäischen Gemeinschaft L 294 vom 1.11.2008, S. 14-15

8 Anhang

Proben aus dem Handel, die auf ZNS vom Rind untersucht worden sind:

Nr.	Marke	Produkt	MHD	Erzeugerbetrieb	Verkäufer	Kaufdatum
1	Gutfried	Puten Kräuterpastete, geräuchert	04.12.04	D EV 23 EWG	Minimal, Gießen (Marburger Str.)	24.11.04
2	Gutfried	Puten Bierschinken, geräuchert	04.12.04	D EV 23 EWG	Minimal, Gießen (Marburger Str.)	24.11.04
3	Gutfried	Puten Salami, zarte Rauchnote	18.12.04	D EV 435 EWG	Minimal, Gießen (Marburger Str.)	24.11.04
4	Stock- meyer	Salami 1a, ungarische Art	29.12.04	D EV 15 EWG	Minimal, Gießen (Marburger Str.)	24.11.04
5	ja	Jagdwurst norddeutsche Art, Spitzenqualität	05.12.04	D EV 234 EWG	Minimal, Gießen (Marburger Str.)	24.11.04
6	ja	Rheinische Schinkenwurst, Spitzenqualität	07.12.04	D EV 234 EWG	Minimal, Gießen (Marburger Str.)	24.11.04
7	ja	Salami in Scheiben, Spitzenqualität	21.12.04	D EV 1712 EWG	Minimal, Gießen (Marburger Str.)	24.11.04
8	Provital	Truthahn Fleischwurst	15.12.04	D EUZ 14 EWG	Karstadt, Gießen	29.11.04
9	Provital	Hähnchenfleisch, gewürfelt in pikantem Aspik	08.12.04	D EUZ 14 EWG	Karstadt, Gießen	29.11.04
10	Herta	Delikatess Leberwurst, geräuchert	04.12.04	D EV 39 EWG	Karstadt, Gießen	29.11.04
11	Zimbo	Schwäbische Paprikalyoner	28.11.04	D EV 292 EWG	Karstadt, Gießen	29.11.04
12	Zimbo	Thüringer feinste Filetpastete	05.12.04	D EV 838 EWG	Karstadt, Gießen	29.11.04
13	Zimbo	Westfälisches Hänchenbrustfilet in Weinaspik	01.12.04	D NW-EUZ 204 EWG	Karstadt, Gießen	29.11.04
14	Zimbo	Westfälische Schinkensülze mit 5 % Champignons	03.12.04	D NW-EUZ 204 EWG	Karstadt, Gießen	29.11.04
15	Herta	Grobe Leberwurst, geräuchert	19.12.04	D EV 39 EWG	Karstadt, Gießen	29.11.04
16	Wies- bauer	Käsewurst, gebraten	26.12.04	Österreich W9 EWG	Karstadt, Gießen	29.11.04

Fortsetzung: Proben aus dem Handel, die auf ZNS vom Rind untersucht worden sind

Nr.	Hersteller	Produkt	MHD	Erzeugerbetrieb	Verkäufer	Kaufdatum
17	Höll	Hubertus Pastete, imitierte Wildschweinpastete	15.12.04	D EV 45 EWG	Karstadt, Gießen	29.11.04
18	Genuss Pur	Mortadella	20.12.04	D NW-EUZ 217 EWG	Aldi, Gießen (Walltorstr.)	30.11.04
19	Genuss Pur	Salami Milano	20.12.04	D NW-EUZ 217 EWG	Aldi, Gießen (Walltorstr.)	
20	Genuss Pur	Geflügelschinken pastete mittelgrob, Spitzenqualität	07.12.04	D EV 367 EWG	Aldi, Gießen (Walltorstr.)	30.11.04
21	Böcklunder	Delikatess Wiener, Spitzenqualität	16.12.04	D EV 809 EWG	Aldi, Gießen (Walltorstr.)	30.11.04
22	Genuss Pur	Leberkäs fein	16.12.04	D BY-EV 401 EWG	Aldi, Gießen (Walltorstr.)	30.11.04
23	Könecke	Mortadella Spitzenqualität	15.12.04	D EV 73 EWG	Aldi, Gießen (Walltorstr.)	30.11.04
24	Tillmann	Frische Schinkenzwiebelmettwurst, Spitzenqualität	09.12.04	D EV 107 EWG	Aldi, Gießen (Walltorstr.)	30.11.04
25	Könecke	Kindergesicht Mosaikpastete	09.12.04	D EV 73 EWG	Aldi, Gießen (Walltorstr.)	30.11.04
26	Könecke	Schinkenrotwurst Spitzenqualität	15.12.04	D EV 73 EWG	Aldi, Gießen (Walltorstr.)	30.11.04
27	Tillmann	Delikatess Leberwurst classic	24.12.04	D EV 107 EWG	Aldi, Gießen (Walltorstr.)	30.11.04
28	Rügenwalder	Teewurst grob	15.03.05	D EV 67 EWG	Edeka, Gießen (Ludwigstr.)	22.02.05
29	Land-schmecker	Paprikasalami	23.03.05	D EV 15 EWG	Edeka, Gießen (Ludwigstr.)	22.02.05
30	Land-schmecker	Bierwurst	03.03.05	D Ev 73 EWG	Edeka, Gießen (Ludwigstr.)	22.02.05

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber für die Überlassung des Themas sowie für sein unermüdliches Interesse und seine Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Frau Dr. Elisabeth Schneider danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung und die vielfältigen Anregungen, insbesondere in der Anfangsphase dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften, insbesondere Frau Yvonne Contzen, Frau Dr. Caroline Gassen, Frau Dr. Bianca Kerp, Frau Margit Kessler und Frau Renate Stumpf möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Inbesondere möchte ich meinem Mann Rainer danken für seine unermüdliche Geduld und sein Verständnis während dieser Zeit.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben haben. 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.