

Untersuchung von BSE-Nachkommen auf Protease-resistentes Prion Protein (PrP^{res}) im Blut

U. Braun¹, A. Tschuor¹, M. Hässig¹, S. Franitz², E. Berli², A. El Gedaily², N. Francini², U. Matthey², R. Zahn²

¹Departement für Nutztiere der Universität Zürich, ²Alicon AG, Schlieren

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob im Blut von schweizerischen BSE-Nachkommen (Gruppe A) Protease-resistentes Prion Protein (PrP^{res}) vorkommt und ob sich die Häufigkeit des Vorkommens von derjenigen einer gesunden Kontrollpopulation aus dem Jahr 2006 (Gruppe B) unterscheidet. Die Gruppe A bestand aus 181 Nachkommen von an BSE erkrankten Kühen, die Gruppe B aus 240 gesunden Rindern aus einem Gebiet, in welchem in den Jahren 2001 bis 2006 keine BSE diagnostiziert worden war. Die Blutproben wurden mit einem BSE-Lebendtest (Alicon PrioTrap[®]) zum Nachweis von Protease-resistentem Prion Protein untersucht. Um abzuklären, ob zwischen der Zeitdifferenz von der Geburt des Nachkommens bis zur Erkrankung der Mutter an BSE eine Beziehung in Bezug auf den Nachweis von PrP^{res} beim Nachkommen bestand, wurde diese Zeitdauer bei jedem Nachkommen errechnet. Bei 29 (16.1 %) von 181 untersuchten BSE-Nachkommen wurde im Blutplasma PrP^{res} nachgewiesen, 152 Tiere waren negativ. Nachkommen, die innerhalb eines Jahres vor dem Auftreten von klinischen Symptomen des Muttertieres geboren worden waren, wiesen im Blut signifikant häufiger PrP^{res} auf als Tiere, bei denen der zeitliche Abstand von der Geburt bis zur Erkrankung mehr als ein Jahr betragen hatte ($P < 0.05$). In der Kontrollgruppe wurden 10 von 240 Tieren (4.2 %) positiv auf PrP^{res} getestet. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass beim Rind im Blut Protease-resistentes Prion Protein nachgewiesen werden kann und dass dieses bei Nachkommen von BSE-Kühen häufiger vorkommt als bei Tieren aus einer gesunden Kontrollpopulation.

Schlüsselwörter: Rind, BSE-Nachkommen, Protease-resistentes Prion Protein

¹Die vorliegende Publikation beruht auf den Ergebnissen der Dissertation von Dr. Andreas Tschuor

Protease-resistant prion protein (PrP^{res}) in the blood of offspring of cows that developed BSE

The goal of the present study was to investigate whether protease-resistant prion protein (PrP^{res}) occurs in plasma samples of offspring of cows that developed bovine spongiform encephalopathy (BSE; group A) and to compare the prevalence with that of a healthy control group in 2006 (Group B). Group A consisted of 181 offspring of cows that developed BSE and group B consisted of 240 healthy animals from a region in Switzerland where no cases of BSE occurred from 2001 to the end of 2006. All plasma samples were evaluated using Alicon PrioTrap[®], an antemortem test for PrP^{res}. The time between birth of the offspring and onset of BSE in the dam was calculated to determine its relationship with the presence of PrP^{res} in the plasma of the offspring. From 181 offspring, 29 (16.1 %) had PrP^{res}-positive plasma samples. Offspring that were born within one year of the onset of BSE in the dam had a significantly higher prevalence of PrP^{res}-positive plasma samples than those born more than one year before the onset of BSE in the dam. Ten (4.2 %) of 240 control cattle had PrP^{res}-positive plasma samples. Thus, PrP^{res} can be detected in bovine blood and occurs more frequently in the offspring of cows that develop BSE than in cattle of a healthy control population.

Keywords: cattle, offsprings of BSE cows, PrP^{res}

434 Originalarbeiten

Einleitung

Bei Nachkommen von britischen BSE-Kühen wurde neurohistologisch signifikant häufiger BSE diagnostiziert als bei Nachkommen von Kühen, die nicht an BSE erkrankt waren (SEAC, 1996). Das Risiko eines BSE-Nachkommens, selbst an BSE zu erkranken, wurde vom britischen Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF) auf ca. 10 % geschätzt, und es wurde proklamiert, dass eine Übertragung von BSE von der erkrankten Mutter auf das Kalb nicht ausgeschlossen werden kann (Masood, 1996). Diese Untersuchungen veranlassten die schweizerischen Behörden im Jahr 1996, alle Nachkommen von BSE-Kühen klinisch untersuchen, euthanasieren und danach auf BSE abklären zu lassen. Bei keinem Tier wurden damals Hinweise für eine BSE-Infektion gefunden (Braun et al., 1998; Fatzer et al., 1998). In der seither vergangenen Zeit haben sich viele Forschergruppen mit der Entwicklung eines Bluttests zum Nachweis von BSE beschäftigt. Einer dieser Gruppen ist es gelungen, einen Test zum Nachweis von Protease resistentem Prion Protein (PrP^{res}) in Körperflüssigkeiten zu entwickeln (Firma Alicon, unveröffentlicht). In der vorliegenden Arbeit wurde ein in der Validierung befindlicher Prototyp des ante mortem Testverfahrens zum Nachweis von BSE eingesetzt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe des neuen Testverfahrens zu untersuchen, ob im Blut von schweizerischen BSE-Nachkommen Protease-resistentes Prion Protein (PrP^{res}) vorkommt und ob sich die Häufigkeit des Vorkommens von derjenigen einer gesunden Kontrollpopulation aus dem Jahr 2006 unterscheidet.

Tiere, Material und Methoden

Tiere

Blutproben von 2 Tiergruppen (A und B) wurden auf das Vorhandensein von Protease resistentem Prion Protein (PrP^{res}) im Blut untersucht. Die Gruppe A bestand aus 181 Nachkommen von an BSE erkrankten Kühen. Die Nachkommen dieser Kühe waren im Winter 1996/97 auf Anordnung des schweizerischen Bundesrats an der Klinik für Wiederkäuer untersucht und danach euthanasiert worden (Braun et al., 1998). Bei den Müttern dieser Tiere konnte BSE in allen Fällen histologisch und immunhistochemisch nachgewiesen werden. Bei den 181 Nachkommen dieser Tiere war BSE postmortal weder bei der neurohistologischen noch bei der immunhistochemischen Untersuchung gefunden worden (Fatzer et al., 1998). Für den Nachweis von Protease-resistentem Prion Protein stand von jedem Nachkommen eine Blutplasmaprobe zur Verfügung, die seit 1996/97 bei -80 °C gelagert worden war. Die Gruppe B bestand aus 240 gesunden Rindern der Schweizer Braunviehrasse im Alter von 1 bis 9 Jahren aus dem Vorderrheintal des Kantons Graubünden.

Die Blutplasma Proben von diesen Tieren waren im Jahr 2006 speziell für diese Untersuchung gewonnen worden. BSE war in diesem Gebiet in den Jahren 2001 bis 2006 bei keinem einzigen Tier nachgewiesen worden.

Untersuchung der Blutproben auf PrP^{res}

Die Blutproben wurden mit dem Ante Mortem BSE-Test untersucht. Das Testprinzip beruht darauf, dass in einem ersten Schritt die Prion Proteine PrP^C und PrP^{res} an ein Liganden-gekoppeltes Harz (Franscini et al. 2006) gebunden werden, welches die Prion Proteine mit hoher Affinität und Spezifität bindet. In einem zweiten Schritt wird PrP^{res} nach Behandlung der Probe mit Proteinase K wie beschrieben (McKinley 1983) im Westernblot nachgewiesen. Das normale Prion Protein, PrP^C, ist Protease-sensitiv und wird daher im Test nicht nachgewiesen. Ob es sich bei dem nachgewiesenen Protein tatsächlich um infektiöses Prion Protein (PrP^{Sc}) handelt, muss im Tierexperiment noch bestätigt werden.

Zeitdifferenz von der Geburt der BSE-Nachkommen zur BSE-Erkrankung der Mutter

Um abzuklären, ob zwischen der Zeitdifferenz von der Geburt des Nachkommens bis zur Erkrankung der Mutter an BSE eine Beziehung in Bezug auf den Nachweis von PrP^{res} beim Nachkommen besteht, wurde diese Zeitdauer für jeden Nachkommen errechnet.

Statistik

Die statistische Auswertung der Häufigkeiten erfolgte mit dem Programm StatView 5.0 (SAS Institut, 8602 Wangen, Schweiz).

Ergebnisse

Nachweis von PrP^{res}

Bei 29 (16.1 %) der 181 untersuchten BSE-Nachkommen wurde im Blutplasma PrP^{res} nachgewiesen, 152 Tiere waren im Test negativ. In der Kontrollgruppe wurden 10 von 240 Tieren (4.2 %) positiv auf PrP^{res} getestet (Differenz $P < 0.05$).

Zeitdifferenz von der Geburt der BSE-Nachkommen zum Diagnosedatum BSE beim Muttertier

41 Nachkommen waren ein Jahr, 79 Nachkommen zwei Jahre, 41 Nachkommen drei Jahre und 20 Nachkommen 4 oder mehr Jahre vor der BSE-Diagnose beim Muttertier geboren worden. Nachkommen, die innerhalb eines Jahres vor der Erkrankung des Muttertieres geboren worden waren, wiesen im Blut signifikant häufiger PrP^{res}

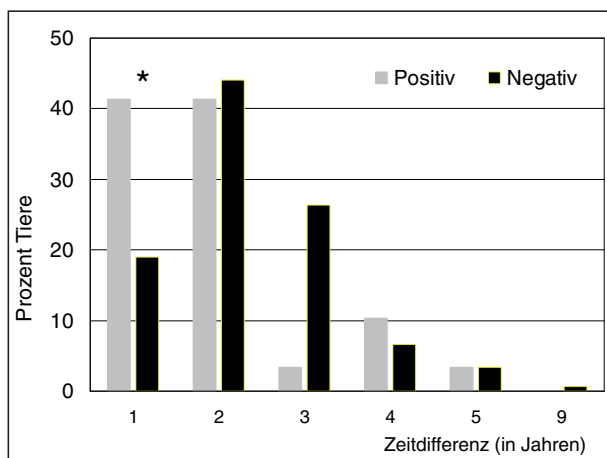


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung der zeitlichen Abstände von der Geburt der BSE-Nachkommen bis zur Erkrankung der Muttertiere an BSE bei Rindern mit positivem und negativem Nachweis von PrP^{res} im Blut (*Differenz zwischen den 2 Gruppen zum Zeitpunkt 1 P < 0.05).

auf als Tiere, bei denen der zeitliche Abstand von der Geburt bis zur Erkrankung mehr als ein Jahr betragen hatte (P < 0.05, Mann-Whitney-U-Test, Abb. 1).

Diskussion

Bei 16.1 % der schweizerischen BSE-Nachkommen konnte im Blut PrP^{res} nachgewiesen werden, obschon diese Tiere neurohistologisch und immunhistochemisch BSE-negativ waren. Im Vergleich dazu wurde PrP^{res} nur bei 4.2 % der gesunden Kontrollpopulation aus dem Jahr 2006 gefunden. Unsere Befunde sind ähnlich wie diejenigen der britischen Kohortenstudie. Bei dieser Studie zeigten 14 % von 301 BSE-Nachkommen die für BSE charakteristischen neurohistologischen Befunde (SEAC, 1997). Die Ergebnisse können verschieden interpretiert werden. Einerseits ist es möglich, dass bei den BSE-Nachkommen deshalb mehr positive Fälle entdeckt wurden als bei den Kontrolltieren, weil die Nachkommen von ihren an BSE erkrankten Müttern infiziert wurden. Andererseits kann die niedrigere Häufigkeit bei den Kontrolltieren mit dem starken Absinken der BSE-Häufigkeit in der Schweiz erklärt werden. Die Tatsache, dass nur 16.1 % der BSE-Nachkommen PrP^{res} positiv reagiert haben, zeigt, dass der maternalen Übertragung von BSE nur eine Nebenrolle bei der Verbreitung der BSE zukommt. Für die Bekämpfung der BSE ist es aber wichtig, dass auch dieser Infektionsweg durch die Keulung der Nachkommen von BSE-Kühen unterbrochen wird. Eine weitere Frage stellt sich, weshalb in der britischen Studie 14 % der Nachkommen neurohistologische Symptome zeigten und in unserer Studie kein einziges Tier. Dieser Unterschied ist damit zu erklären, dass die von uns untersuchten Nachkommen im Alter von 3.1 ± 0.8 Jahren getötet und unter-

sucht wurden, das heisst zu einem Zeitpunkt, wo es nur in seltensten Fällen zur BSE-Erkrankung gekommen ist. Im Gegensatz dazu wurden die britischen Tiere erst im Alter von 7 Jahren neurohistologisch untersucht. Die im Blut positive Reaktion bei gleichzeitig negativem neurohistologischem Befund weist darauf hin, dass die Infektion im Blut nachweisbar ist, bevor es zur Ausbildung neurohistologischer Veränderungen kommt.

Bei den BSE-Nachkommen mit einem einjährigen Zeitabstand zwischen ihrer Geburt und der BSE-Erkrankung der Mutter wurde signifikant häufiger PrP^{res} detektiert als bei den Tieren mit längerem Zeitabstand. Die Befunde decken sich mit den Befunden der MAFF-Studie, in welcher für den gleichen Zeitabstand ebenfalls eine signifikante Häufung der neurohistologisch positiven Ergebnisse festgestellt wurde (Donnelly et al., 1997). Eine mögliche Erklärung für die Befunde liegt darin, dass PrP^{Sc} gegen Ende der Inkubationszeit ausser im Nervengewebe auch vermehrt im Blut vorkommt und über den Blutweg den Fetus transplazentar infiziert (Aguzzi, 2006). Die maternale Transmission einer TSE konnte allerdings bisher erst bei Scrapie nachgewiesen werden, als in den placentären Kotyledonen von präklinisch und klinisch kranken Scrapie-Schafen PrP^{Sc} gefunden wurde (Andreoletti et al., 2002). Die maternale Übertragung von BSE bei einer Antilope (Aldhous, 1990) und die BSE-Erkrankung einer Kuh, bei deren Mutter ebenfalls BSE diagnostiziert worden war, liessen allerdings den Verdacht aufkommen, dass eine maternale Transmission auch bei mit BSE infizierten Rindern vorkommen könnte (Aldhous, 1991).

Literatur

- Aguzzi, A., M. Glatzel: Prion infections, blood and transfusions. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2006, 6: 321–329.
- Aldhous, P.: Maternal transmission in antelope. *Nature* 1990, 348: 666.
- Aldhous, P.: BSE: First maternal transmission? *Nature* 1991, 350: 368.
- Andreoletti, O., C. Lacroux, A. Chabert, L. Monneret, G. Tabouret, F. Lantier, P. Berthon, F. Eychenne, S. Lafond-Benestad, J. M. Elsen, F. Schelcher: PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J. Gen. Virol.* 2002, 83: 2607–2616.
- Braun, U., E. Amrein, U. Estermann, J. Egli, T. Schweizer, H. Lutz, F. Ehrensperger, M. Vandeveld, U. Kihm: Untersuchungen an 182 Nachkommen von an boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) erkrankten Kühen in der Schweiz. Teil 1: Klinische Befunde. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 1998, 140: 240–249.
- Donnelly, C. A., A. C. Ghani, N. M. Ferguson, J. W. Wilesmith, R. M. Anderson: Analysis of the bovine spongiform encephala-

436 Originalarbeiten

lopathy maternal cohort study: evidence for direct maternal transmission. *Applied Statistics* 1997, 46: 321–344.

Fatzer, R., F. Ehrensperger, D. Heim, J. Schmidt, A. Schmitt, u. Braun, M. Vandeveld: Untersuchungen an 182 Nachkommen von an boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) erkrankten Kühen in der Schweiz. Teil 2: Epidemiologische und pathologische Befunde. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 1998, 140: 250–254.

Franscini, N., A. El Gedaily, U. Matthey, S. Franitza, M.-S. Sy, A. Bürkle, M. Groschup, U. Braun, R. Zahn: Prion protein in milk. *PLoS ONE* 2006, (1), e71. doi:10.1371/journal.pone.0000071.

Masood, E.: BSE transmission data pose dilemma for UK scientists. *Nature* 1996, 382: 483.

McKinley, M. P., D. C. Bolton, S. B. Prusiner: A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 1983, 35: 57–62.

SEAC: Statement on maternal transmission of BSE. Spongiform Encephalopathy Advisory Committee. www.seac.gov.uk/statements/state29jul96.htm, 1996.

SEAC: Statement on maternal transmission of BSE. Spongiform Encephalopathy Advisory Committee. www.seac.gov.uk/statements/state16apr97.htm, 1997.

Tschuor, A. C.: Untersuchung von BSE-Nachkommen auf Protease-resistentes Prion Protein im Blut. Dissertation, Universität Zürich, 2007.

Zahn, R.: Persönliche Mitteilung, 2007.

Korrespondenz

Ueli Braun
Departement für Nutztiere
Winterthurerstrasse 260
CH-8057 Zürich
E-Mail: ubraun@vetclinics.uzh.ch
Fax: + 41 44 63 58 904

Manuskripteingang: 23. November 2008

Angenommen: 25. November 2008

Examens de descendants d'animaux BSE quant à la présence de protéines prioniques protéases résistantes (PrP^{res}) dans le sang

Le but du présent travail était d'étudier si les protéines prioniques protéase résistantes (PrP^{res}) étaient présentes dans le sang de descendants d'animaux BSE (groupe A) et de voir si la fréquence de cette présence était différente de celle constatée dans une population de contrôle en 2006 (groupe B). Le groupe A se composait de 181 descendants de vaches atteintes de BSE, le groupe B de 240 bovins d'une région dans laquelle de 2001 à 2006 aucun cas de BSE n'avait été diagnostiqué. Les échantillons ont été testés avec Alicon Prio Trap[®] pour mettre en évidence la protéine prionique protéase résistante (PrP^{res}). Afin de savoir s'il y avait une relation entre l'intervalle de temps séparant la naissance du veau de la maladie de la mère par rapport à la mise en évidence de PrP^{res} chez le veau, cette durée a été calculée pour chaque animal. Chez 29 (16.1 %) des 181 descendants BSE, la PrP^{res} a été trouvée dans le plasma, 152 animaux étaient négatifs. Les animaux qui étaient nés dans l'année précédant l'apparition des symptômes cliniques chez leur mère avaient de façon significative plus souvent la PrP^{res} dans le sang que les animaux chez lesquels l'intervalle entre la naissance et la maladie dépassait une année ($P < 0.05$). Dans le groupe de contrôle, 10 des 240 animaux (4.2 %) ont été positifs au PrP^{res}. Ces examens montrent que la protéine prionique protéase résistante peut être mise en évidence chez les bovins dans le sang et qu'elle est plus souvent présente chez les descendants d'animaux BSE que dans une population de contrôle saine.

Esame sanguigno della proteina prionica resistente alle proteasi (PrP^{res}) nella discendenza da mucche affette da BSE

Scopo del seguente studio è di esaminare se, nel sangue della discendenza da BSE svizzera (gruppo A), era presente la proteina prionica resistente alle proteasi (PrP^{res}) e se si distingueva, nella sua frequenza, dalla popolazione di controllo sana del 2006. Il gruppo A era composto da 181 discendenti di mucche malate di BSE, il gruppo B era formato da 240 bovini sani provenienti da una regione nella quale dal 2001 al 2006 non sono stati diagnosticati casi di BSE. Le prove di sangue sono state analizzate con un test BSE (Alicon PrioTrap[®]) per la ricerca della proteina prionica resistente alle proteasi. Per chiarire se nel lasso di tempo tra la nascita della discendenza alla malattia (BSE) della madre ci sia un rapporto in relazione alla presenza di PrP^{res} nella discendenza, questa durata temporale è stata calcolata per ogni discendente. In 29 (16.1 %) dei 181 discendenti da BSE è stato rilevato nel plasma sanguigno la presenza di PrP^{res}, mentre 152 animali sono risultati negativi. I discendenti nati nell'arco di un anno dall'apparizione dei sintomi clinici della madre mostravano nel sangue una frequenza più significativa di PrP^{res} che gli animali nei quali il lasso di tempo dalla nascita fino alla malattia della madre era maggiore di un anno ($P < 0.05$). Nel gruppo di controllo 10 dei 240 animali (4.2 %) sono risultati positivi al test. Gli esami hanno rilevato che, si può ritrovare nei bovini, la proteina prionica resistente alle proteasi (PrP^{res}) e che la discendenza da mucche con BSE appare più di frequente che negli animali provenienti da una popolazione di controllo sana.