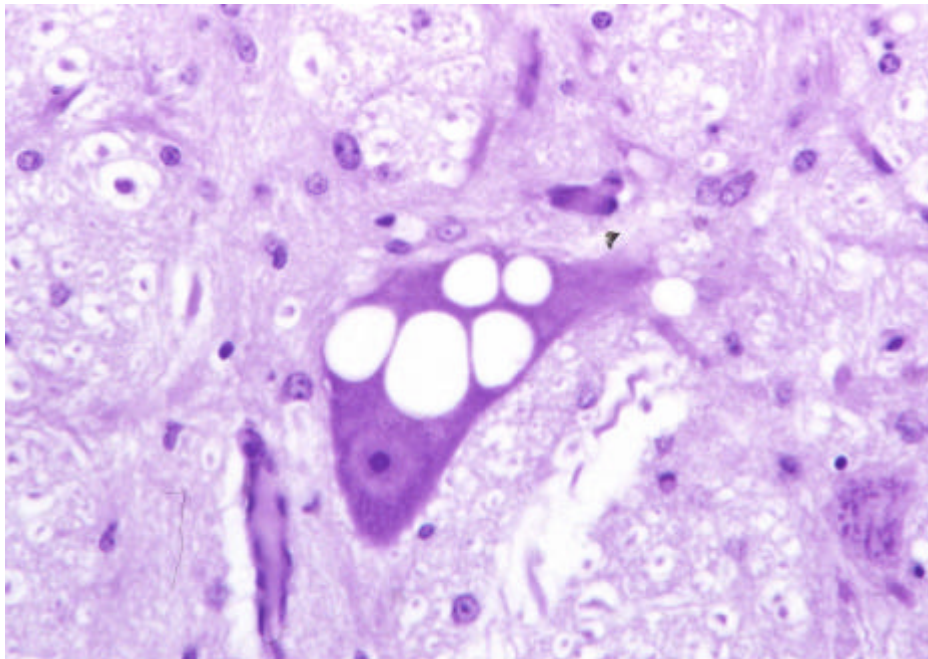


Neuropathologische Untersuchungen bei BSE- Verdachtsrindern in Bayern



Mali Miyashita

Aus dem Institut für Tierpathologie
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Leitung: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. W. Schmahl)

**Neuropathologische Untersuchungen bei BSE-
Verdachtsrindern in Bayern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Mali Miyashita
aus Colorado, USA

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Korreferent: Univ. Prof. Dr. E. Kienzle

Tag der Promotion: 18.7.2003

Gliederung

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Allgemeines und Epidemiologie	3
2.1.1	Transmissible Spongiforme Encephalopathie	3
2.1.2	Prionerkrankungen beim Menschen	4
2.1.3	Nicht-BSE-Prionerkrankungen bei Tieren	6
2.1.4	Bovine Spongiforme Encephalopathie	8
2.1.4.1	Weltepidemiologische Situation	8
2.1.4.2	Ausbreitung von BSE in Deutschland	8
2.1.4.3	Gesetzliche Hintergründe in Europa	9
2.1.4.4	Maßnahmen im Falle der Feststellung von BSE in Deutschland	10
2.2	Allgemeine Pathologie der TSE	11
2.2.1	Prionprotein	11
2.2.2	Genetische Prädisposition	13
2.2.3	Pathogenese von Scrapie	14
2.3	BSE: Klinik und Neuropathologie	16
2.3.1	Klinische Symptomatik der BSE-Rinder	16
2.3.2	Histologie und Molekularpathologie	17
2.3.2.1	Astrogliose	17
2.3.2.2	Mikrogliose	20
2.3.2.3	Nervenzelldegeneration	21
2.3.2.4	Spongiforme Auflockerung des Neuropils	23
2.3.2.5	Lipofuszin	23
2.3.3	Immunhistochemie	25
2.3.3.1	Glial Fibrillary Acid Protein	25
2.3.3.2	Synaptophysin	26
2.3.3.3	Prionprotein	26
2.3.3.4	Neuron-Specific-Enolase	26

2.4	Erkrankungen mit differentialdiagnostischem Charakter zur BSE	27
2.4.1	Infektionskrankheiten	28
2.4.1.1	Listeriose	28
2.4.1.2	Tuberkulose	29
2.4.1.3	Aktinobazillose	30
2.4.1.4	Bösartiges Katarrhalfieber	30
2.4.1.5	Europäische Sporadische Bovine Meningoencephalitis	31
2.4.2	Nicht-infektiöse Krankheiten	32
2.4.2.1	Cerebrocorticalnekrose	32
2.4.2.2	Hypomagnesämie	33
2.4.2.3	Hirnödem	34
3	Tiere, Material und Methoden	36
3.1	Tiere	36
3.2	Sektion	36
3.2.1	Räumlichkeit und Schutzbekleidung	36
3.2.2	Probenentnahme	37
3.3	Histologie	39
3.3.1	Fixierung und Herstellung von Paraffinschnitten	39
3.3.2	Färbungen und histologische Untersuchungen	39
3.3.3	Zusätzliche Behandlung von BSE-positivem Material	40
3.4	Immunhistochemie	41
3.4.1	Allgemeines	41
3.4.2	PrP-Immunhistochemie	42
3.4.3	GFAP/Synaptophysin/NSE-Immunhistochemie	43
3.5	Diagnostische Methoden	44
4	Ergebnisse	46
4.1	Histologie der BSE-positiven Tiere	46
4.1.1	Lichtmikroskopische Untersuchungsergebnisse und Tabellen	46
4.1.2	Nervenzelldegenerationen	62
4.1.3	Spongiforme Auflockerung des Neuropils	63
4.1.4	Astrogliose	64

4.1.5	Mikrogliose	65
4.1.6	Axonale Schwellung	65
4.1.7	Lipofuszin	66
4.2	Diagnosen und Histologie der BSE-negativen Tiere	76
4.2.1	Diagnosen der BSE-negativen Tiere	76
4.2.2	Infektionskrankheiten	77
4.2.2.1	Listeriose	77
4.2.2.2	Tuberkulose	77
4.2.2.3	Aktinobazillose	78
4.2.2.4	Bösartiges Katarrhalfieber	78
4.2.2.5	Europäische Sporadische Bovine Encephalitis	79
4.2.3	Nicht-infektiöse Erkrankungen	79
4.2.3.1	Cerebrokorticalnekrose	79
4.2.3.2	Hypomagnesämie	80
4.2.3.3	Hirnödem	80
4.2.3.4	Arthritis purulenta und Traumafolgen	81
4.2.3.5	Rinder ohne histologischen Befund	82
4.2.3.6	Vergleich der BSE-positiven und BSE-negativen Rinder	85
4.3	Immunhistochemie	86
4.3.1	Prionprotein	86
4.3.2	GFAP	86
4.3.3	Synaptophysin	87
4.3.4	NSE	87
5	Diskussion	94
5.1	BSE-positive Tiere	94
5.2	BSE-negative Tiere	100
6	Zusammenfassung	107
7	Summary: Neuropathological findings in Bavarian cattle with a clinical suspect of Bovine Spongiform Encephalopathy	109
8	Literaturverzeichnis	111

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellen

2-1	PrP ^{Sc} vs. PrP ^c	12
3-1	Untersuchte Rinder	37
3-2	Entnommene Proben	38
4-1	Histologische Ergebnisse der BSE-positiven Rinder	47
4-2	Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse (BSE)	59
4-3a	Läsionsprofil-abhängiger Vergleich von Lipofuszin zwischen BSE-positiven und -negativen Rindern	69
4-3b	Alters-abhängiger Vergleich von Lipofuszin bei BSE-positiven und -negativen Rindern	69
4-4	Vorkommen von Vakuolen und Axonschwellungen bei BSE-negativen Rindern	83
4-5	Histologischer Vergleich zwischen BSE-positiven und -negativen Rindern	84
4-6	Immunhistochemische Verteilung von PrP ^{Sc} im Mesencephalon	89
4-7	Immunhistochemische Verteilung von GFAP im Mesencephalon	90
4-8	Immunhistochemische Verteilung von Synaptophysin im Mesencephalon	91
4-9	Immunhistochemische Verteilung von NSE im Mesencephalon	93
5-1	Prozentuale Verteilung der Diagnosen der BSE-negativen Tiere	100

Abbildungen

Abb. 1	Vakuolisierung des Neuropils vs. Gliose	64
Abb. 2	Neuronale Vakuole vs. Lipofuszin	66
Abb. 3	Neuronale Vakuolen	70
Abb. 4	Dendritische Vakuolen	70
Abb. 5	Kleinvakuoläre Degeneration einer Nervenzelle	70
Abb. 6	Dark Neurons	70
Abb. 7	Spongiforme Auflockerung des Neuropils	71
Abb. 8	Mikrovakuolen im Neuropil des Hippocampus	71

Abb. 9	Astroglis und Mikrogliose	71
Abb. 10	Axonale Schwellungen	71
Abb. 11	Lipofuszin	72
Abb. 12	Neuropathologische Diagnosen der BSE-negativen Tiere	76
Abb. 13	Listeriose	72
Abb. 14	Tuberkulose	72
Abb. 15	Aktinobazillose	72
Abb. 16	Bösartiges Katarrhalfieber	73
Abb. 17	Europäische Sporadische Bovine Encephalitis	73
Abb. 18	Cerebrocorticalnekrose	73
Abb. 19	Hirnödem	73
Abb. 20	PrP ^{Sc} -Immunhistochemie	74
Abb. 21	GFAP-Immunhistochemie	74
Abb. 22	GFAP-Immunhistochemie (BSE)	74
Abb. 23	Synaptophysin-Immunhistochemie	75
Abb. 24	Synaptophysin-Immunhistochemie (BSE)	75
Abb. 25	NSE-Immunhistochemie	75
Abb. 26	NSE-Immunhistochemie (BSE)	75

Abkürzungen

BKF	Bösartiges Katarrhalfieber
BSE	Bovine Spongiforme Encephalopathie
CCN	Cerebrocorticalnekrose
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
fCJD	Familiäre CJD
iCJD	Iatrogene CJD
sCJD	Sporadische CJD
nv CJD	Neue-Variante CJD
CWD	Chronic Wasting Disease
DMNV	Nucleus motorius dorsalis n. vagi
ENS	Enterales Nervensystem
ESBE	Europäische Sporadische Bovine Encephalitis
fFI	Familiäre Fatale Insomnie
FSE	Feline Spongiforme Encephalopathie
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
HE	Hämatoxylin und Eosin
IHC	Immunhistochemie
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PNS	Peripheres Nervensystem
PrP ^c	Zelluläres Prionprotein (c = cellular)
PrP ^{Sc}	Pathogenes Prionprotein (Sc = Scrapie)
Prnp	Prionprotein-Gen
Prnp ^{0/0}	Prnp-Knockout (Mäuse)
SAF	Scrapie-associated fibrils
SOD	Superoxid Dismutase
TME	Transmissible Mink Encephalopathy
TSE	Transmissible Spongiforme Encephalopathie
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Der Begriff Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE) umfasst eine Gruppe von stets tödlich verlaufenden neurodegenerativen Erkrankungen. Scrapie, das als Archetyp der TSE gilt, ist seit dem 18. Jahrhundert bekannt. Trotzdem wurde dieser Erkrankung wenig Aufmerksamkeit geschenkt, da keine Übertragbarkeit von Schaf auf Mensch bekannt war. Erst in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts, als 1982 Stanley B. Prusiner mit seiner verblüffenden Theorie eines Proteins als Erreger von Scrapie (Prusiner 1982) die Welt überraschte, und als 1986 in England das erste Rind mit Boviner Spongiformer Enzephalopathie (BSE), gefolgt im Jahr 1996 von dem ersten Menschen mit einer vermutlich BSE-assoziierten neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) diagnostiziert wurden, erlangten die Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien eine verstärkte öffentliche Aufmerksamkeit.

Nach England breitete sich BSE in vielen europäischen Ländern aus, darunter auch in Deutschland. Am 26. November 2000 dokumentierte die Bundesrepublik das erste Rind mit BSE. Seitdem wuchs die Zahl der BSE-Fälle in Deutschland auf 245 (31.03.2003, Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft), davon stammen 94 Tiere aus Bayern. Die Europaweit steigende Anzahl der BSE- und aber auch nvCJD-Fälle führte in den letzten 15 Jahren sowohl in Deutschland als auch in der EU zu einer neuen BSE-bezogenen Gesetzgebung, und zu verstärkter Förderung der TSE-Forschung.

Am Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Tierärztlichen Fakultät an der LMU München werden seit dem 1.1.2001 Rinder aus Bayern mit einem amtlichen Verdacht auf BSE pathologisch und dabei insbesondere neuropathologisch untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist bei den BSE-Rindern die Dokumentation von pathohistologischen Läsionen des gesamten Gehirns, sowie eine ergänzende immunhistochemische Befunderhebung im Mesencephalon. Es werden ebenfalls die Tiere histopathologisch und immunhistochemisch untersucht, bei denen trotz BSE-ähnlicher klinischer Symptomatik der Verdacht auf BSE bereits in der

Western-Blot Untersuchung am Landesuntersuchungsamt Süd nicht bestätigt werden konnte. Diese Rinder dienen als Negativkontrollen und stehen gleichzeitig den BSE-Fällen differentialdiagnostisch gegenüber.

Als Lokalisation für die Immunhistochemie wurde das Mesencephalon mit den Kerngebieten Nucleus ruber und Substantia grisea centralis ausgewählt. Neuropathologische Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Jeffrey & Halliday 1994; Wells & Wilesmith 1995) über BSE erheben überwiegend Befunde aus der Medulla oblongata. Grund dafür sind Kenntnisse über die Pathogenese von Scrapie, bei dem infektiöse Proteine (Prionen) entlang parasymphatischen Fasern des N. vagus durch die Medulla oblongata ins Gehirn gelangen (van Keulen et al. 2000). Bei BSE wird eine ähnliche Pathogenese vermutet. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich insbesondere auf die Untersuchungen des Mesencephalons, um das Ausmaß der neuropathologischen Läsionen rostral der vermuteten Eintrittspforte zu ermitteln.

2 Schrifttum

2.1 Allgemeines und Epidemiologie

2.1.1 Transmissible Spongiforme Encephalopathien

Transmissible Spongiforme Encephalopathie (TSE) ist der Überbegriff für eine Gruppe von stets tödlich verlaufenden degenerativen Erkrankungen des Zentralnervensystems. TSE ist sowohl beim Menschen als auch bei Tieren bekannt.

Als Synonym wird häufig der Begriff Prionerkrankung verwendet, der auf die Ätiologie der Erkrankung hinweist. Die Prionen (eine Wortzusammensetzung aus "proteinaceous infectious particles") wurden 1982 von Stanley B. Prusiner (Prusiner 1982) als Erreger von Scrapie vorgeschlagen. Diese Theorie, auch bekannt als die Protein-Only-Hypothese, wird trotz vereinzelt anhaltender Skepsis und weiterer Suche nach anderen Erregern wie Virionen oder unkonventionellen Viren heute weitgehend akzeptiert.

Die Prionerkrankungen sind gekennzeichnet durch die Akkumulation einer partiell proteinaseresistenten Isoform des wirtseigenen Prionoproteins, eines Glykoproteins, das auf der Zelloberfläche vieler Zellen exprimiert wird und dessen Funktion nicht eindeutig geklärt ist.

Die Transmissiblen Spongiformen Encephalopathien sind außergewöhnliche Erkrankungen, denn zu dieser Gruppe zählen sowohl sporadische, genetische als auch infektiöse Formen. Als charakteristische Symptomatik zeigt der Patient Verlust zahlreicher Gehirnfunktionen, Demenz (Mensch) und Ataxie.

Wenig Aufmerksamkeit wurde diesen seltsamen Erkrankungen geschenkt, bis Mitte der 80er Jahre in Großbritannien die ersten Rinder mit Boviner Spongiformer Encephalopathie (BSE) erkrankten. Die Situation entwickelte sich dort schnell in eine Epizootie, mit bis zum heutigen Tag knapp 180000 erkrankten Rindern. Zehn Jahre nach dem Auftreten der ersten BSE-Fälle folgte die Erkrankung der ersten Menschen mit einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD), bei denen sich vermuten ließ, dass eine Ansteckung durch den Konsum von prionen-haltigem Fleisch stattgefunden hatte.

2.1.2 Prionerkrankungen beim Menschen

Beim Menschen sind mehrere Prionkrankheiten bekannt. Dazu zählen neben der Gruppe der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), die Familiäre Fatale Insomnie (fFI) und die Kuru.

Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Zu der Gruppe dieser Krankheiten gehören die sporadische, die familiäre und die iatrogene Form sowie die neue Variante.

Die sporadische Form von CJD (sCJD) tritt weltweit mit einer Rate von 0,5–2/Million/Jahr (Dalsgaard 2002) auf und betrifft sowohl Männer als auch Frauen gleichermaßen. Das Durchschnittsalter bei der Erkrankung beträgt 68 Jahre (Dearmond et al. 2002). Die Ursache der Erkrankung ist nicht geklärt.

Die familiäre Form (fCJD) hingegen wird auf eine Punktmutation des PrP-Gens (Prnp) zurückgeführt und weltweit in drei Regionen beobachtet, nämlich in Chile, in der Slowakei und bei jüdischen Familien libyscher Abstammung (Dalsgaard 2002).

Die iatrogene CJD (iCJD) wird bei chirurgischen Eingriffen mit kontaminiertem Material übertragen. Beispiele sind Kornea-Transplantationen, Dura mater-Transplantationen, intracerebrale Elektroden und Injektionen von menschlichen Wachstumshormonen.

Charakteristische neuropathologische Veränderungen bei den obengenannten Formen der CJD sind Vakuolisierungen der Neuronen und des Neuropils, Gliose, neuronaler Verlust und Amyloid-Plaques. Letztere werden allerdings nur in 5–10% der Fälle beobachtet.

Im Jahr 1996 wurde eine neue Variante der CJD in Großbritannien beschrieben, die sich von den bislang bekannten Formen unterschied. Nicht nur waren alle Patienten jünger als 40 Jahre, sondern Vorbericht, klinische Symptomatik und Muster der Elektroenzephalogramme unterschieden sie deutlich von anderen Formen der CJD. Analysen über die bei BSE und nvCJD auftretenden Prionenstämme wies auf eine eindeutige Korrelation (Bruce et al. 1997; Hill et al. 1997). Bis Ende 2001 wurden in England 113, in Irland 1 und in Frankreich 3 Menschen (Dalsgaard 2002) mit nvCJD registriert. Im Gegensatz zu den anderen Formen

der CJD wird bei der nvCJD in 100% der Fälle Amyloid-Plaques beobachtet, welche oft im Zentrum von Neuropil-Vakuolen situiert sind (Dearmond et al. 2002).

Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom

Das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom kann wie fCJD auf eine Punktmutation im Prnp zurückgeführt werden, wobei jedoch die Stellen der Punktmutation, die klinische Symptomatik und die Neuropathologie eine Differenzierung erlauben (Zerr & Poser 2002). Charakteristisch für die Neuropathologie des GSS sind die in 100% der Fälle auftretenden „multizentrischen“ Plaques, die gehäuft im Cortex cerebelli vorkommen.

Familiäre Fatale Insomnie

fFI wurde erstmals 1986 bei einer italienischen Familie beschrieben. Die wesentlichen Merkmale der Erkrankung sind progressive Insomnie, Hyperaktivität des Sympathikus und motorische Störungen. Ursache ist wiederum eine Punktmutation im Prnp. Neuropathologisch betroffen ist hauptsächlich der Thalamus. Die prominenteste Läsion ist die Gliose, vakuoläre Veränderungen werden seltener beobachtet (Dearmond et al. 2002).

Kuru

1957 wurde Kuru von Gajdusek & Zigas bei Eingeborenen in Papua Neu Guinea beschrieben (Dearmond et al. 2002). Die Krankheit wurde übertragen durch kannibalische Toten-Rituale, an denen fast ausschließlich Frauen und Kinder teilnahmen. Zwischen 1957 und 1982 starben mehr als 2,500 Menschen an Kuru, womit diese die erste dokumentierte Epidemie einer Prionerkrankung beim Menschen war. Seit dem Verbot kannibalischer Traditionen durch die australische Regierung ist die Zahl der erkrankten Personen stetig gesunken. Kuru gilt heute als „aussterbende“ Krankheit. In 75% der Fälle wurden charakteristische Amyloid-Plaques (spiked ball plaques) festgestellt, die überwiegend im Cortex cerebelli vorkommen.

2.1.3 Nicht-BSE-Prionerkrankungen bei Tieren

Bei Tieren können einige Transmissible Spongiforme Encephalopathien beobachtet werden. Scrapie, eine horizontal und vertikal übertragbare Krankheit der Schafe und Ziegen, die schon Mitte des 18. Jahrhunderts in Europa beschrieben wurde, gilt als Archetyp der TSE. Hinzu kommen die Chronic Wasting Disease der Maultierhirsche in den USA, die Transmissible Mink Encephalopathie der Farmnerzen, die Feline Spongiforme Encephalopathie der Feliden und seit 1985 die Bovine Spongiforme Encephalopathie der Rinder. Experimentell lassen sich beinahe alle Tiere von zumindest einer Form der TSE infizieren. Bis zum Auftreten der BSE war eine Übertragbarkeit auf den Menschen nicht vermutet worden.

Scrapie

Scrapie, auch unter dem Namen Traberkrankheit bekannt, wurde schon vor ca. 250 Jahren beschrieben. Kurz vor dem 2. Weltkrieg wurde Scrapie von Cuille experimentell erfolgreich übertragen (Dearmond et al. 2002), wodurch die Überzeugung, dass es sich um eine Infektionskrankheit handelte, gestärkt wurde. Epidemiologische Beobachtungen konnten Scrapie allerdings nicht in das einfache Modell der Infektionskrankheiten einreihen, denn die Krankheit trat gehäuft familiär auf und zeigte eine deutliche Rassedisposition. In 1959 machte Hadlow WJ auf die neuropathologische Ähnlichkeit zwischen Kuru und Scrapie aufmerksam (Dearmond et al. 2002).

Leitsymptome von Scrapie sind Pruritus, Koordinationsstörungen und Ataxie (Kretschmar & Dahme 1990).

Chronic Wasting Disease

Von CWD wurde 1980 bei hirschartigem Gehegewild in Colorado, USA berichtet. In den letzten Jahren wurde CWD häufig auch bei wildlebenden Tieren in USA und Canada beobachtet (Wells & McGill 1992).

Transmissible Mink Encephalopathie

TME wurde zum ersten Mal 1947 bei Farmnerzen in Wisconsin, USA beobachtet (McKenzie et al. 1996). Seitdem sind mehr als 23 Krankheitsausbrüche weltweit berichtet worden. Ätiologisch wird ein Zusammenhang mit der Verfütterung von Scrapie-infiziertem Schaffleisch diskutiert (Kretschmar & Dahme 1990).

Feline Spongiforme Encephalopathie

Ab dem Jahr 1990 sind in Großbritannien mehrere Fälle von FSE bei Hauskatzen festgestellt worden. Zudem sind Einzelfälle von FSE bei in zoologischen Gärten lebenden Felidae (Puma, Tiger, etc.) Großbritanniens und Australiens beobachtet worden (Hewicker-Trautwein 1994). Ätiologie ist vermutlich die Verfütterung von Prionen-kontaminiertem Futter.

2.1.4 Bovine Spongiforme Enzephalopathie

2.1.4.1 Weltepidemiologische Situation

Im Jahr 1986 wurde in England im Central Veterinary Laboratory bei einem Rind erstmalig BSE neuropathologisch diagnostiziert (Wells et al. 1987). Die klinischen Symptome und die histologische Untersuchung ergaben eine starke Ähnlichkeit zu Scrapie und anderen, humanen Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien. Ab diesem Jahr stieg die Anzahl der Rinder mit BSE in Großbritannien stetig auf heute insgesamt 179504 (OIE, 30.9.2002) erkrankten Tieren mit einem Höhepunkt der Epidemie in den Jahren 1987 und 1988 (Schreuder et al. 1997).

Export von lebenden Rindern vor dem EU-Exportverbot (Juli 1989, EU-Entscheidung 89/469) und Export von Futtermitteln aus England in andere Mitgliedstaaten waren vermutlich die Ursache einer sukzessiven Ausbreitung von BSE im Ausland. Im Jahr 1997 waren Irland (188 BSE-Fälle), Schweiz (288), Portugal (61), Frankreich (28), Deutschland (5), Italien (2), Oman (2), Canada (1), Dänemark (1) und die Falkland-Inseln (1) von BSE betroffen. Bei den letzten 6 Ländern handelte es sich zu Beginn nachweislich um importierte Tiere (Schreuder et al. 1997). Seit Ende 2001 ist auch Japan nicht mehr frei von BSE, und am 4.6. 2002 meldete Israel den ersten Fall (OIE).

2.1.4.2 Ausbreitung von BSE in Deutschland

Am 26. November 2000 wurde beim ersten in Deutschland geborenen und aufgewachsenen Rind BSE diagnostiziert. Die Anzahl "einheimischer" BSE-positiver Tiere ist seitdem stetig gestiegen (im Jahr 2000 7 Fälle, 2001 125 Fälle, 2002 104 Fälle) und beträgt derzeit insgesamt 245, davon 94 in Bayern (31.03.2003, Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft).

2.1.4.3 Gesetzliche Hintergründe in Europa

Im folgenden wird eine Übersicht der wichtigsten BSE-bezogenen Gesetzgebung in Deutschland und in der EU ab dem Jahr 1988 vorgelegt (Quelle: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Europäische Kommission).

- | | |
|-------------|---|
| 18.7.1988 | Tiermehlfütterungsverbot an Wiederkäuer in England. |
| 28.7.1989 | Exportverbot für lebende Rinder aus dem Vereinten Königreich in andere EU-Staaten, wenn sie vor dem 18.7.1988 geboren wurden (EU-Entscheidung 89/469). |
| 6.3.1990 | Meldepflicht für BSE (EU-Entscheidung 90/134). |
| 18.3.1994 | Tiermehlverfütterungsverbot an Wiederkäuer in Deutschland (Änderung der Viehverkehrsverordnung). |
| 27.6. 1994 | Tiermehlverfütterungsverbot an Wiederkäuer in der EU (EU-Entscheidung 94/381). |
| 18.7.1996 | Bedingungen für die Verarbeitung von Säugetierabfällen zur Inaktivierung von TSE-Erregern; 133°C-3 bar-20 Minuten (EU-Entscheidung 96/449). |
| 18.11.1998 | Exportverbot für lebende Rinder aus Portugal (Portugal-Embargo; EU-Entscheidung 98/653). |
| 29.6.2000 | Tierisches Gewebe mit hohem BSE-Risiko (Schädel, Tonsillen, etc.) wird aus der Nahrungsmittel- und Futtermittelkette entfernt (Inkrafttreten 1.10.2000, EU-Entscheidung 2000/418). |
| Ab 1.1.2001 | Durchführung von BSE-Schnelltests an allen Schlachtrindern älter als 30 Monate, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind (EU-Entscheidung 2000/374). |
| 22.2.2001 | Inkrafttreten des BSE-Maßnahmegesetzes in Deutschland: "Gesetz zur Änderung futtermittelrechtlicher, tierkörperbeseitigungsrechtlicher und tierseuchenrechtlicher Vorschriften im Zusammenhang mit der BSE-Bekämpfung". |

2.1.4.4 Maßnahmen im Falle der Feststellung von BSE in Deutschland

Quelle: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft.

Nach §9 des Tierseuchengesetzes ist der Tierbesitzer verpflichtet bei Verdacht oder Ausbruch einer anzeigepflichtigen Seuche (auch BSE) die zuständige Behörde (Veterinäramt) zu informieren.

Bei einem Verdacht auf BSE, ausgesprochen durch einen Amtstierarzt, werden Bestand gesperrt, das Tier getötet und der Verdacht in einem Staatlichen Veterinäramt abgeklärt. Sollte sich der Verdacht bestätigen, werden die Geburts- und Fütterungskohorte sowie (bei weiblichen Tieren) die Nachkommen, die innerhalb von 2 Jahren vor und nach dem Einsetzen der klinischen Erscheinungen geboren worden sind, getötet. Embryonen und Eizellen werden vernichtet. Zu den Geburts- und Fütterungskohorten gehören Mutter und Geschwister, zusätzlich alle Rinder, die während der ersten 12 Lebensmonate des Rindes geboren und aufgezogen wurden und das gleiche potentiell infektiöse Futter erhalten haben.

Im Falle eines bestätigten BSE-Falles informieren die zuständigen Behörden nach der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift über Tierseuchennachrichten unmittelbar den Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft. Weiterhin sind die Mitgliedstaaten der Europäischen Union nach der Richtlinie (82/894/EWG) des Rates vom 21.12.82 verpflichtet, innerhalb von 24 Stunden der Kommission und den anderen Mitgliedstaaten den Erstausbruch der Erkrankung mitzuteilen. Zusätzlich ist die Bundesrepublik Deutschland verpflichtet, das Internationale Tierseuchenamt (OIE) unverzüglich über BSE-Fälle zu unterrichten.

2.2 Allgemeine Pathologie der TSE

2.2.1 Prionprotein

Im Jahr 1982 isolierte Stanley B. Prusiner ein protease- und hitzeresistentes Protein aus den Gehirnen von Scrapie-infizierten Hamstern (Prusiner 1982), und nannte es Prionprotein. Dieses infektiöse Protein (PrP^{Sc} : Sc für Scrapie) vermehrt sich, in dem es seine Konformation der zellulären Form des Prionproteins (PrP^{C} ; C für cellular) aufzwingt. Aggregate von PrP^{Sc} , auch SAF (Scrapie-Associated Fibrils) genannt, sind vermutlich neurotoxisch.

Das körpereigene Prionprotein ist ein Glykoprotein, das mit einem GPI-Anker an der Zelloberfläche vieler Zellen verbunden ist, und dessen Funktion nicht völlig geklärt ist. Erstaunlicherweise entwickeln Knock-Out-Mäuse ($\text{Prnp}^{0/0}$: homozygotes Ausschalten des *Prnp*-Gens) keine nennenswerte Anomalien, sie sind jedoch resistent gegen eine TSE-Infektion (Brandner et al. 1996). Die Expression von PrP^{C} ist von allen Geweben in Neuronen am stärksten (Kretzschmar et al. 1986), insbesondere in den Synapsen (Salès 1998). Der C-Terminus von PrP^{C} beinhaltet eine funktionelle Region von 32 Aminosäuren, bestehend aus vier Octa-Repeats, die Kupfer binden (Brown et al. 1997). Dieser kupfer-bindenden Eigenschaft wird eine Superoxid-Dismutase-(SOD)ähnliche Funktion zugeschrieben (Wong et al. 2000). Möglicherweise ist die hohe Expression von PrP^{C} in den Synapsen notwendig, um diese von oxidativen Schädigungen und dessen Folgen zu schützen (Brown 2001).

PrP^{C} und PrP^{Sc} werden von derselben mRNA translatiert und haben deshalb die gleiche Primärstruktur. Sie unterscheiden sich allerdings in den Sekundär- und Tertiärstrukturen (Caughey & Raymond 1991; Pan et al. 1993). Spektroskopische Untersuchungen zeigen PrP^{C} mit hohem Anteil an α -helikalen- (40%) und wenig β -Faltblatt- (3%) Strukturen. Dagegen überwiegt bei PrP^{Sc} mit 45% die β -Faltblatt-Konformation (Pan et al. 1993). Wesentliche Unterschiede zwischen PrP^{C} und PrP^{Sc} sind in Tabelle 2-1 aufgelistet.

PrP ^C	PrP ^{Sc}
<ul style="list-style-type: none"> • Funktion unklar • Expression in vielen Zellen • GPI-assoziiertes Membranprotein • Überwiegend α-helikale Strukturen • Verdauung mit Proteinase K • Ablösung von der Zelloberfläche mit Phosphatidyl-Inositol-spezifischer Phospholipase C 	<ul style="list-style-type: none"> • TSE-assoziiert • Primär ZNS, Milz, Lymphknoten • Bildung von extracell. Aggregaten • Überwiegend β-Faltblatt Strukturen • Partielle Proteinase K-Resistenz • Keine Ablösung möglich mit Phospholipase C

Tabelle 2-1: PrP^C vs. PrP^{Sc}

Maus-PrP^C besteht aus einer Sequenz von 209 Aminosäuren (Aguzzi & Heppner 2000). Auf Position 181 und 197 sitzen zwei N-verbundenen Oligosacharide. PrP^C wird vermutlich in einer ähnlichen Konstruktion bei allen Wirbeltieren exprimiert (Brown 2001), wobei Formen mit keiner, einer oder zwei Zuckerketten vorkommen. Bei der Western-Blot-Analyse von PrP nach Proteinase K-Verdauung entstehen drei Banden, die die Abschnitte mit zweifacher, einfacher oder keiner Glykosylation darstellen. Entsprechende Western-Blot-Analysen mit PrP^{Sc} erlauben eine Klassifizierung verschiedener Prionenstämme. Prionenstamm-Analysen zeigen verblüffende Ähnlichkeiten zwischen BSE und nvCJD (Collinge et al. 1996; Hill et al. 1997), eine Erkenntnis, die die Theorie der Übertragbarkeit einer TSE von Rind auf Mensch verstärkt.

Nach der Proteinase-Verdauung von PrP^{Sc} bleibt ein Proteinase K-resistenter Kern, PrP²⁷⁻³⁰, übrig. Diese Bezeichnung wurde vom Molekulargewicht nach SDS-PAGE abgeleitet. PrP²⁷⁻³⁰ bietet die Möglichkeit zur Entwicklung eines spezifischen und zuverlässigen Molekular-Markers für PrP^{Sc}.

Forloni et al. (1993) identifizierten innerhalb dieses proteinase-resistenten Kerns die neurotoxische Sequenz vom humanen PrP als PrP106-126. Die Toxizität ist auf eine hydrophobe Region (Aminosäure-Sequenz 113-126) zurückzuführen, die das Palindrom AGAAAAGA beinhaltet. Peptide, die diese Sequenz beinhalten können *in vitro* spontan Aggregate bilden (Brown 2000). Deletion der Region AGAAAAGA hindert die Bildung von PrP^{Sc} (Chabry et al. 1998). Obwohl die pathologische Bedeutung von PrP 106-126 *in vivo* noch nicht geklärt ist,

können *in vitro*-Studien mit diesem synthetischen Peptid entscheidend zum Verständnis der TSE beitragen.

2.2.2 Genetische Prädisposition

Der Einfluss von dem PrP-Gen (Prnp) auf die Empfänglichkeit von Scrapie bei Schafen ist wiederholt untersucht worden (van Keulen et al. 2000 und 2002). Obwohl Scrapie übertragbar ist, wirkt eine gewisse genetische Konstellation fördernd oder hemmend auf die Empfänglichkeit eines Tieres für Scrapie.

Das ovine Prnp befindet sich auf dem Chromosom 13, dessen Open Reading Frame 768 bp beträgt (Tranulis 2002). Bei der Analyse der codierenden Region von Cheviots wurden drei krankheits-assoziierte polymorphe Stellen auf Codon 136, 154 und 171 entdeckt, die zu den Aminosäuren-Substitutionen A136V, R154H und Q171R führen (Baylis et al. 2002; O'Doherty et al. 2002; A=Alanin, V=Valin, R=Arginin, H=Histidin, Q=Glutamin). 136V erzeugt eine erhöhte, dagegen die Homozygotie mit Alanin (A136A) eine verminderte Empfänglichkeit für Scrapie. Trotzdem ist der Genotyp für PrP nicht der einzige beeinflussende Faktor bei der Empfänglichkeit von Scrapie. Aus Island wurde von Fällen berichtet, bei denen der erste Fall von Scrapie ein altes Tier mit V136V war. Sukzessiv erfolgte die Erkrankung anderer Tiere der Herde, möglicherweise durch horizontale und vertikale Übertragungswege nach spontan entstandenem Scrapie des alten Tieres (Tranulis 2002). In Scrapie-freien Ländern wie Australien und Neuseeland, sind alte Tiere mit einem V136V-Genotyp anzutreffen, ohne dass Scrapie ausbricht.

Bei nvCJD des Menschen spielt der Polymorphismus auf Codon 129 eine Rolle bei der Suszeptivität. Alle bislang mit nvCJD diagnostizierte Patienten sind an dieser Stelle homozygot für Methionin (Ironsides et al. 2002 b). Noch ist nicht geklärt, ob dieser Genotyp notwendig für die Entwicklung von nvCJD ist, oder ob er lediglich eine verkürzte Inkubationszeit verursacht.

Das bovine Prnp zeigt zwei polymorphe Stellen, jedoch gibt es derzeit keinen Hinweis auf eine Prnp-polymorphismus-assoziierte Empfänglichkeit für BSE (Hills et al. 2001). In einer vergleichenden Studie mit 400 gesunden und BSE-

infizierten Rindern wurde keinen Unterschied bei der Verteilung von PrP-Genotypen zwischen den zwei Gruppen festgestellt (Narang 1996).

2.2.3 Pathogenese von Scrapie

Im Gegensatz zu BSE, ist die Pathogenese von Scrapie, insbesondere der Ausbreitungsweg von PrP^{Sc}, am Tiermodell näher untersucht worden (van Keulen et al. 2002 und 2000).

Infektionsquelle von Scrapie ist wahrscheinlich die orale Ingestion. Eine Pathogenese-Studie mit Scrapie-empfindlichen Schafen vom Genotyp VV₁₃₆RR₁₇₁QQ₁₅₄ zeigt den möglichen Ausbreitungsweg nach oraler Infektion mit dem Scrapie-Agens (van Keulen et al. 2002).

Die erste Phase der Invasion erfolgt im GALT, wo PrP^{Sc} in den Tonsillen, Peyer'schen Platten des Ileums und caudalen Jejunums, Retropharyngeal- und Ileocaecallymphknoten detektiert werden kann. Möglicherweise wird PrP^{Sc} von M-Zellen durch die Mucosa transportiert. Eine darauf folgende Ausbreitung von PrP^{Sc} in die Lymph- und Blutbahnen mit Hilfe von Follikulären Dendritenzellen (FDC) und Tingible-Body-Macrophages (TBM) wird diskutiert. In diesen Zellen konnte eine erhebliche Menge an PrP^{Sc} immunhistochemisch festgestellt werden (Jeffrey et al. 2000). Der weitere Verlauf mit Ausbreitung in nicht-GALT-assoziiertem lymphatischem Gewebe, ob es eine hämatogene Ausbreitung gibt oder ausschließlich eine Neuroinvasion via vegetative Nervenfasern gibt, ist noch ungeklärt.

Die Neuroinvasion beginnt im enteralen Nervensystem. Die topographische Nähe zwischen den Peyer'schen Platten und dem Plexus myentericus sowie dem Plexus submucosus lassen diese Theorie plausibel erscheinen. Der Zugang zum zentralen Nervensystem erfolgt über zwei Wege: 1. Entlang von afferenten parasympathischen Nervenbahnen, welche die thorakalen und die abdominalen Eingeweide innervieren, erreicht PrP^{Sc} den Nucleus motorius dorsalis n. vagi (DMNV) in der Medulla oblongata. PrP^{Sc} verbreitet sich anschließend in weitere Kerngebiete der Medulla wie N. tractus solitarii, Area postrema, N. ambiguus and Nn. vestibulares, die durch neuronale Bahnen mit dem DMNV in direkter Verbindung stehen.

2. Der direkte Weg in das Rückenmark läuft über Ganglion mesenteriale craniale/coeliacum und efferente sympathische Nervenbahnen des N. splanchnicus in die Substantia intermediolaterale des Rückenmarks zwischen T8 und T10. Von dort erfolgt eine craniale und caudale Ausbreitung.

Die Pathogenese von BSE wurde noch nicht vollständig geklärt, es lässt sich aber nicht ausschließen, dass eine analoge Pathogenese mittels Neuroinvasion wie bei der Scrapie des Schafes stattfindet.

2.3 BSE: Klinik und Neuropathologie

2.3.1 Klinische Symptomatik der BSE-Rinder

Rinder mit BSE zeigen ein charakteristisches Krankheitsbild mit schleichendem Verlauf. Erste Anzeichen sind Abmagerung und verminderte Milchleistung. Die neurologischen Symptome sind durch Störungen des Verhaltens, der Bewegungskoordination und der Sensibilität gekennzeichnet (Braun 2001).

Zu den neurologischen Störungen zählen folgende Auffälligkeiten:

Verhaltensstörungen

- Ängstlichkeit, Nervosität, Schreckhaftigkeit
- Angst vor dem Kotgraben, Durchgängen und kleinsten Hindernissen
- Aggressivität, die sich in Ausschlagen beim Melken oder gegen Menschen ausdrückt
- Häufiges Belecken der Nase, Zähneknirschen
- Zittern oder Muskelzuckungen an Lippen, Flotzmaul, Ohren, Hals, Vorderkörper, Flanken oder am ganzen Körper

Sensibilitätsstörungen

- Zusammenzucken
- Überempfindlichkeit bei Berührung, vor allem im Kopf- und Halsbereich
- Überempfindlichkeit auf Lärm
- Überempfindlichkeit auf Licht
- Positive Besenprobe: Heftiges Ausschlagen bei Berührung der hinteren Fesselgelenke mit einem Besen

Bei der Empfindlichkeit auf Licht und Lärm kein Gewöhnungsverhalten zu erkennen. Bei wiederholtem Reizen ist manchmal sogar eine Steigerung des schreckhaften Verhaltens zu beobachten.

Bewegungsstörungen

- Steifer Gang, Ataxie
- Im Endstadium Festliegen

Ein klinischer Verdacht auf BSE wird dann ausgesprochen, wenn die spezielle Untersuchung auf BSE (BSE-Probe) durch einen Tierarzt für positiv empfunden wurde.

Die BSE-Probe beinhaltet folgende Untersuchungen:

- Führen des Tieres über den Kotgraben
- Führen des Tieres durch eine Türöffnung und auf dem Hof
- Führen des Tieres über eine auf dem Boden liegende Stange
- Manipulation am Kopf und am Hals mit einem Kugelschreiber (Kugelschreiber-Test). Auf Abwehrbewegungen mit dem Kopf, Rümpfen der Nase, Speicheln, Belecken des Flotzmauls wird geachtet.
- Überprüfung der Reaktion bei Lärm.
- Überprüfung der Reaktion beim Ein- und Ausschalten des Lichtes.
- Besenprobe

Quelle: Prof. Ueli Braun, Universität Zürich. Internet-Veröffentlichung des Bayerischen Staatsministeriums für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz.

2.3.2 Histologie und Molekularpathologie

2.3.2.1 Astrogliose

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden die Astrozyten zum ersten Mal von Santiago Ramon y Cajal beschrieben (Berry et al. 2002). Astroglia sind multipolare GFAP-haltige (siehe 2.3.3.1) Zellen, die im ZNS eine überwiegend metabolische Funktion ausüben. Astrozyten stammen von neuroepithelialen Stammzellen der periventrikulären Regionen des embryonalen ZNS ab. Morphologisch unterscheidet man zwischen protoplasmatischen Astrozyten der grauen Substanz und den fibrillären Astrozyten, die überwiegend in der weißen Substanz vorkommen. Weitere Phänotypen wie Bergmann-Glia des Cerebellums oder Müller'sche Zellen der Retina sind an bestimmte ZNS-Regionen gebunden (Berry et al. 2002).

Im adulten ZNS haben Astrozyten eine überwiegend metabolische Funktion. Fortsätze verschiedener Astroglia kommunizieren durch Zwischenverbindungen und bilden somit ein funktionelles Synzytium im Neuropil. Die Endstücke dieser Fortsätze stehen in Kontakt mit der Basalmembran von Blutgefäßen und mit der Pia mater. Dort bilden sie durch Tight-Junctions eine einheitliche Schicht, die als Membrana limitans gliae perivascularis/superficialis zur Blut-Hirn-Schranke bzw. zur Blut-Liquor-Schranke beitragen.

Im Säugetier-ZNS ist Glucose der Hauptenergieträger. Welcher Anteil den Gefäßen entnommener Glucose für die Eigenversorgung der Astrozyten benötigt wird, ist unklar, aber zumindest in manchen Hirnarealen sind Neuronen abhängig von der Nährstoffversorgung durch Astrozyten (Magistretti et al. 1996). Aus Glucose können die Astrozyten Glykogen synthetisieren und speichern (Forsyth 1996). Glykogen-Katabolismus erzeugt Lactat und Pyruvat, die eine wichtige Energiequelle darstellen (Ransom & Fern 1997). Der Astrozyt ist auch Syntheseort von komplexen Lipiden (Berry et al. 2002).

Eine weitere wichtige Funktion der Astrozyten ist die synaptische Aufnahme von Neurotransmittern, insbesondere von Glutamat, dessen Konzentration ohne Clearance leicht ein neuroexzitotoxisches Niveau erreicht (Meldrum & Garthwaite 1990). Glutamat wird durch das Enzym Glutaminsynthase in Glutamin umgewandelt und den umliegenden Neuronen zurückgeführt. Die Umwandlung von Glutamat zu Glutamin benötigt Ammoniak (Aschner & LoPachin 1993), wodurch extrazelluläre Räume vor zu hohen Ammoniak-Konzentrationen geschützt werden.

Astrozyten reagieren schnell auf diverse Formen von ZNS-Insulten. Die astrozytäre Hypertrophie wird bei Hypoxie, Hypoglykämie, Trauma und Kontakt mit Neurotoxinen beobachtet (LoPachin & Aschner 1993). Angeschwollene Astrozyten können homöostatische Funktionen, wie Aufnahme von Neurotransmittern, nur eingeschränkt aufrechterhalten. Bei der Glia-Schwellung wird vermutlich die membrangebundene Na^+/K^+ -ATPase gehemmt, was zu einer zytoplasmatischen Akkumulation von Na^+ , und Verlust von K^+ führt (Aschner & LoPachin 1993). Die auffälligste Eigenschaft reaktiver Astrozyten ist die vermehrte Synthese von GFAP (siehe 2.3.3.1).

Die Astrogliose ist neben der Vakuolisierung des Neuropils und der Nervenzellen ein typisches Merkmal der Prionerkrankungen, die sowohl pathohistologisch als auch immunhistochemisch mit GFAP nachgewiesen werden kann (Wells et al. 1995; Ironside et al. 2002 a; Wood & Done 1992). Die Proliferation von Astroglia ist nicht pathognomisch für Prionerkrankungen, sondern wird nach diversen Schädigungen und nach Nervenzelluntergang beobachtet.

Es gibt Hinweise, dass bei der TSE die Astrozyten vor der Neurodegeneration, jedoch gleichzeitig mit der Akkumulation von PrP^{Sc}, aktiviert werden (Giese et al. 1998). Möglicherweise stimuliert PrP^{Sc} die Vermehrung der Astrozyten, welche wiederum direkt zur Neurodegeneration beitragen. Eine hohe Anzahl von Astroglia konnte *in vitro* die PrP106-126 (PrP^{Sc})-induzierte (siehe 2.2.1) Neurodegeneration beschleunigen (Brown & Mohn 1999). In jedem Fall scheinen Astrozyten eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der TSE zu spielen. Obwohl Knockout-Mäuse (Prnp^{0/0}) resistent gegen Prionerkrankungen sind, können Tiere, bei denen nur das neuronale PrP selektiv ausgeschaltet ist, die aber in den Astrozyten PrP^C exprimieren, an einer TSE erkranken (Raeber et al. 1997).

In vitro-Studien mit reinen Astrozyten-Kulturen zeigen allerdings, dass PrP106-126 alleine keine Aktivierung der Astroglia erzeugt (Brown 1999). Die Proliferation von Astrozyten in Prionerkrankungen ist scheinbar ein multifaktorielles Geschehen. Hafiz und Brown (2000) zeigten, dass zusätzlich zur Infektion von PrP^C-exprimierenden Astrozyten mit PrP^{Sc} Sauerstoffradikale, Mikroglia und mikrogliale Substanzen, insbesondere IL-1 und IL-6, benötigt werden, um die TSE-spezifische Astrogliose zu erzeugen.

Bei Astrozyten-Kulturen, denen PrP^{Sc} zugesetzt wurde, wurde eine vermehrte Cyclin E-Expression, ein mitogener Faktor, festgestellt. PCNA, ein Marker für den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus, war nicht erhöht (Hafiz & Brown 2000). Die Behandlung dieser Zellen mit Cytosin arabinoside, einem Cytostatikum, führte zu vermehrtem Zelltod (Brown 2001). Möglicherweise verursacht PrP^{Sc} einen schnelleren Durchlauf durch den Zellzyklus, wodurch Astrozyten einen apoptotischen Zelltod umgehen, eine Option, die Neuronen offenbar nicht haben (Brown 2001).

Eine andere Wirkung von PrP^{Sc} auf Astrozyten ist die Hemmung ihrer Glutamat-Aufnahme (Brown & Mohn 1999), was indirekt neurotoxisch wirkt.

2.3.2.2 Mikrogliose

Mikroglia sind Gewebsmakrophagen des Nervensystems, die in ihrer Anzahl ca. 20% der Gliazellen ausmachen. Die Mikroglia kommen ubiquitär vor und sind gleichmäßig im ZNS verteilt. Im Gegensatz zu den anderen Zellen des ZNS stammen Mikroglia ontogenetisch von der Monozyten-Phagozyten-Linie ab und sind somit myeloischen Ursprungs (Cuadros et al. 1998; Ling & Wong 1993). Unter physiologischen Bedingungen des adulten ZNS sind die Mikroglia im Ruhezustand.

Die Aktivierung der Mikroglia erfolgt nach allen Formen von ZNS-Insulten. Kreutzberg (1996) studierte anhand von einem Modell des N. facialis die Reaktion der Mikroglia nach Axotomie. Die Mikroglia proliferierten, vermutlich durch die Stimulation von Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), produzierten Zytokine wie IL-6 und TGF- β und präsentierten einige Oberflächenantigene wie MHC. Angegriffene Neuronen können von Mikroglia mittels Synaptic Stripping geschützt werden: Das Entfernen von afferenten Synapsen kann den Nervenzellen zur Regeneration verhelfen. Beim Auftreten von Zelluntergängen im ZNS werden Mikroglia in Phagozyten umgewandelt. Zusätzlich produzieren aktivierte Mikroglia diverse potentiell zytotoxische Substanzen wie Sauerstoffradikale, Stickstoffoxid, Proteinase, Arachidonsäure-Derivate, exzitatorische Aminosäuren, Quinolinsäure und Zytokine.

Eine Proliferation von Mikroglia in Zusammenhang mit Prionerkrankungen wurde erst 1994 beschrieben (Williams et al.) und später von Betmouni et al. (1996) bestätigt. Im Maus-Modell von Betmouni erscheint die Mikroglia-Aktivierung sowohl vor dem neuronalen Tod als auch vor dem Auftreten der klinischen Symptome. Allerdings, entscheidend bei der Pathogenese von Prionerkrankungen ist nicht ein einzelner Faktor, sondern vermutlich der Einfluss verschiedener Komponenten, die sich gegenseitig verstärken, und somit einen Circulus vitiosus bilden. PrP^{Sc}, Astrogliose und Mikrogliose sind die

histologischen Hauptkomponenten. Die Mikrogliose ist verbunden mit der Expression von Sauerstoffradikalen und diversen Zytokinen, wie IL-1, IL-6 und TNF_{α} . Die Zytokine fördern die Astrogliose, und Sauerstoffradikale erhöhen den oxidativen Stress in der Umgebung. Ob die Mikrogliose die Folge oder Ursache von neuronalem Tod ist, bleibt noch ungeklärt. Gesunde Nervenzellen werden durch zytotoxische Effekte aktivierter Mikroglia nicht beschädigt. Möglicherweise führen (durch PrP^{Sc} ?) vorgeschädigte Nervenzellen bei Prionerkrankungen zur Proliferation von Mikroglia, die ihrerseits bereits angegriffene Nervenzellen noch stärker beschädigen.

2.3.2.3 Nervenzelldegeneration

Neuronale Dysfunktion und der Untergang von Nervenzellen sind entscheidend für die klinische Entwicklung der Prionerkrankungen. Neuronaler Verlust erfolgt über einen langen Zeitraum, so dass dieser bei der histologischen Untersuchung nur in ausgeprägten Fällen erkennbar ist. Alleine durch morphometrische Studien kann eine quantitative Reduktion der Neuronenanzahl dokumentiert werden. In einem Mausmodell von Jeffrey et al. (1995) sank nach intraocularer Injektion von PrP^{Sc} die Anzahl der Neuronen im Nucleus geniculatus lateralis in 50 Tagen von ca. 22,000 auf 1000.

Der TSE-assoziierte Nervenzelltod erfolgt zum Teil durch Apoptose (Giese et al. 1995; Gray et al. 1999; Williams et al. 1997). Bei BSE wurde die dafür typische DNA-Fragmentation von Theil et al. (1999) beobachtet. Ursprünglich wurde Apoptose bei der Entwicklung und physiologischen Reduktion des embryonalen ZNS auf adulte Größenverhältnisse identifiziert, jedoch ist dieser Mechanismus auch nach Traumata und bei neurodegenerativen Erkrankungen bekannt (Hughes et al. 1999). In den cerebrocorticalen und hippocampalen Neuronen von Scrapie-infizierten Hamstern waren die Expression von Bax (Apoptosis-induzierendes Protein) und von Bcl-2 (anti-apoptotisches Protein) erhöht bzw. erniedrigt (Park 2000). Auch das Fehlen von entzündlichen Reaktionen bei Prionerkrankungen stärkt den Verdacht eines apoptotischen Todes (Pawel et al. 2002). Morphologisch sind apoptotische Neuronen durch Zell-Schrumpfung und Kondensation des Chromatins erkennbar. Möglicherweise befindet sich auch eine Fraktion der

“Dark Neurons” im apoptotischen Prozeß (Pawel et al. 2002). Obwohl der Untergang von Nervenzellen bereits charakterisiert werden konnte, ist der genaue Pathomechanismus dieses apoptotischen Nervenzelltodes ungeklärt. Aus heutiger Sicht können zwei Hypothesen aufgestellt werden: (a) die Dysfunktion der Plasmamembran und (b) die endosomallysosomale Anomalie (Dearmond et al. 2002). Ad (a): In Scrapie-infizierten Hamstern ist ein Großteil der PrP^{Sc}-Akkumulation in den Caveolae-like domains (CLD) der Plasmamembran von Nervenzellen zu finden (Vey 1996). Die darauffolgende Dysfunktion der Plasmamembran bei Aufgaben wie Elektrolyt-Homöostase, synaptische Transmission und Reaktion auf neurotrophe Faktoren könnte die Überlebensfähigkeit der Nervenzellen beeinträchtigen. Ad (b): PrP^{Sc} akkumuliert ebenfalls in lysosomalen Strukturen. Hier konnte eine erhöhte Menge Cathepsin D festgestellt werden (Taraboulos et al. 1990; Laslo et al. 1996). In einer TSE-unabhängigen Experiment mit Fibroblasten konnte ein Cathepsin D-induzierte Apoptose nachgewiesen werden (Roberg et al. 1999). Möglicherweise spielt die erhöhte Cathepsin D-Expression auch beim TSE eine Rolle bei dem apoptotischen Nervenzelluntergang.

Die vakuoläre Degeneration von Nervenzellen ist eine auffällige histologische Veränderung der TSE. Vermutlich handelt es sich um autophagische Vakuolen (Liberski et al. 1992; Boellaard et al. 1989). Die Autophagie spielt eine Rolle bei der Erneuerung von Zellorganellen unter physiologischen Bedingungen. Bei der klassischen Autophagie fusionieren Autophagosomen mit Lysosomen, um enzymhaltige Autophagolysosomen zu bilden, in denen altes Zellmaterial abgebaut wird. Vermehrte Autophagie wird möglicherweise durch apoptotische Signale ausgelöst (Xue et al. 1999). Analog zu Apoptose führt über die physiologische Norm erhöhte Autophagie zu pathologischen Zuständen. Beispielsweise ist die vermehrte Autophagie bei der Huntington Disease des Menschen bekannt (Kegel et al. 2000). Elektronenmikroskopisch sind die autophagischen Vakuolen sequestrierte Zytoplasmaanteile, die mit einer einzelnen, doppelten oder multiplen Membran umhüllt sind. Das sequestrierte Zytoplasma ist entweder homogen oder beinhaltet Ribosome, gelegentlich Mitochondrien und kleinere Sekundärvakuolen. Die Membrane können

proliferieren und untereinander Verbindungen aufbauen, bis große Teile des Zytoplasmas von verschiedenen großen Vakuolen besetzt sind (Pawel et al. 2002).

2.3.2.4 Spongiforme Auflockerung des Neuropils

Ein charakteristisches Merkmal der TSE ist die spongiforme Auflockerung des Neuropils, die kurz nach der Akkumulation von PrP^{Sc} eintritt. Diese Vakuolisierung findet hauptsächlich in den synaptischen Regionen statt und ist charakterisiert durch fokale dendritische Schwellungen, Verlust von Zellorganellen, Spaltung der Plasmamembranen und Akkumulation von pathologischen Membranen (Chou et al. 1980). Die Vakuolisierung des Neuropils trägt eine ultrastrukturelle Ähnlichkeit mit der glutamat-induzierten Neurotoxizität (Olney 1986), bei der Störungen der Plasmamembranfunktion und des Elektrolyt- bzw. Wasserhaushaltes auftreten. Brown & Mohn (1999) zeigten, dass durch die Wirkung von PrP^{Sc} die Astrozyten weniger Glutamat aufnehmen. Durch die Gabe von einem nicht-kompetitiven N-Methyl-D-aspartat (NMDA) Glutamatrezeptor-Antagonist konnte die PrP^{Sc}-induzierte Neurotoxizität in corticalen Zellkulturen von Ratten verhindert werden (Dearmond et al. 2002). Dieses Experiment unterstützt die Ansicht, dass die Vakuolisierung im Neuropil durch erhöhte extrazelluläre Konzentrationen von Glutamat verursacht wird.

2.3.2.5 Lipofuszin

Lipofuszin (*lipo*: fett, aus dem griechischen; *fuscus*: dunkel, aus dem lateinischen) wird als Maßstab für die Alterung betrachtet, da postmitotische Zellen wie Neuronen und Zellen des Myokards mit dem zunehmendem Alter vermehrt Lipofuszin akkumulieren (Strehler et al. 1959). Lipofuszin ist ein braungelbes, autofluoreszierendes und elektronendichtes Material, das als Endprodukt der Oxidation in Lysosomen gespeichert wird. Ätiologisch wird Lipofuszin von Ceroid unterschieden. Während Lipofuszin unter physiologischen Bedingungen langsam in postmitotischen Zellen akkumuliert, ist die Ceroid-Akkumulation mit lysosomalen Speicherkrankheiten wie Batten's Disease beim Menschen

verbunden, und unterscheidet sich von Lipofuszin in Gewebeverteilung und Akkumulationsrate (Porta 2002).

Chemisch besteht Lipofuszin hauptsächlich aus Proteinen (30–70%) und Lipiden (20–50%). Der Proteinanteil ist sehr variabel, während Triglyzeride, freie Fettsäuren, Cholesterol, Phospholipide und Dolichole die Hauptvertreter der Lipide sind. Kohlenhydrate (4-7%) und Metalle, vor allem Eisen, sind in geringeren Mengen beinhaltet (Brunk & Terman 2002).

Lipofuszin kann durch verschiedene histochemische Techniken dargestellt werden. Beispiele dafür sind Sudanschwarz und Osmiumtetroxid (OsO_4 , Lipid-Anfärbung), oder die PAS-Färbung (Detektion von Kohlenhydratanteile durch die Reaktion mit Aldehydgruppen) und die Lectin-Immunhistochemie (Monserrat 1995). In der histologischen Untersuchung der Nervenzellen mit PAS-Färbung erscheint Lipofuszin als multiple, stark PAS-positive Körner im Perikaryon (Abb. 11). Bei der HE-Färbung ist eine gelb-braune, feingranulierte, autofluoreszierende Masse neben dem Nukleus erkennbar. Lipofuszin verteilt sich in den Neuronen meist polar. In manchen Nervenzellen kann Lipofuszin bis zu 75 % des Perikaryons ausfüllen (Brunk & Terman 2002).

Als weitere Möglichkeit Lipofuszin zu beobachten, ist der Einsatz eines Laser-Scan-Mikroskopes mit Exzitation bei verschiedenen Wellenlängen zu erwähnen. Es ist allerdings festzuhalten, dass weder Anfärbungsverfahren noch die Autofluoreszenz spezifische Detektionsmethoden für Lipofuszin sind. Beispielsweise können Fett- oder PAS-Färbungen nicht-lysosomales Material wie Fetttröpfchen oder Glykogen anfärben. Auch temporär in Lysosomen gespeichertes, noch nicht abgebautes Material kann potentiell ähnliche Bilder erzeugen (Brunk & Terman 2002). Die Autophagozytose von Mitochondrien scheint essentiell für die Lipofuszinogenese zu sein, da ein mitochondriales Protein, nämlich die ATP-Synthase Untereinheit c, eine Hauptkomponente von Lipofuszin in alternden Neuronen ist (Eller et al. 1997). Sauerstoffradikale, die unter physiologischen Bedingungen in den Mitochondrien entstehen, werden zu H_2O_2 dismutiert. In den Lysosomen kann H_2O_2 mit Eisen Hydroxyradikale produzieren, welche Vernetzungen zwischen Makromolekülen und die darauffolgende Entstehung von Lipofuszin verursachen. Im allgemeinen wird angenommen, dass Lipofuszin die

Zellfunktion nicht beeinträchtigt. Neue Studien haben aber gezeigt, dass Lipofuszin eine Photosensibilisierung verursacht (Wihlmark et al. 1997), und dass diese Eigenschaft womöglich eine Rolle bei der Sauerstoffradikalentwicklung im retinalen Pigmentepithel bei der Maculardegeneration des Menschen spielt (Davies et al. 2001).

Erhöhte Lipofuszin-Akkumulation wurde bei Fällen von CJD beobachtet (Boellaard et al. 1989; Dastur et al. 1992). Erhöhte lysosomale Aktivität, wie es in der Alzheimer'schen Krankheit und in experimentell erzeugten Nervenzellschädigungen beobachtet wurde (Adamec et al. 2000), könnte auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie BSE von Bedeutung sein. In der vorliegenden Arbeit konnte eine vermehrte neuronale Lipofuszin-Akkumulation der BSE-Rinder im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden.

2.3.3 Immunhistochemie

2.3.3.1 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)

GFAP, ein 50 kDa großes Typ III Intermediärfilamentprotein, bildet die biochemische Hauptkomponente der ca. 10 nm dicken Gliafilamenten reifer Astrozyten (Eng et al. 1971; Inagaki et al. 1994). Im Ruhezustand zeigen nicht alle Astrozyten GFAP in detektierbaren Mengen. Allerdings ist GFAP ein geeigneter Marker, um reaktive Astroglia zu erkennen (Eddleston & Mucke 1993), denn die zelluläre Zunahme von GFAP ist ein Hauptmerkmal aktivierter Astrozyten. Eine Zunahme GFAP-positiver Zellen sowie die astrozytäre Hypertrophie können bei fast allen pathologischen Zuständen des ZNS, einschließlich der CJD, beobachtet werden (Eng et al. 1992; Dearmond et al. 2002) und sind somit keine pathognomische Reaktion auf eine spezifische Erkrankung.

Veränderungen in der Expression von GFAP entstehen sowohl transkriptional als auch translational, und können durch Steroide, Wachstumsfaktoren und Zytokine (Laping et al. 1994), insbesondere mikrogliales IL-1 (Pearson et al. 1999), reguliert werden.

2.3.3.2 Synaptophysin

Synaptophysin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 38 kDa und ein integrales Membranprotein der small clear synaptic vesicles (SSV) der präsynaptischen Membran. Synaptophysin befindet sich an allen Nervenendigungen, und in beinahe gleicher Konzentration im gesamten ZNS (Navone et al. 1986). Diese Eigenschaften machen Synaptophysin zu einem zuverlässigen Molekularmarker der neuronalen Synapsen. Die genaue Funktion von Synaptophysin ist bislang nicht geklärt. Bei Knockout-Mäusen, die weder Synaptophysin I noch die Isoform Synaptophysin II (oder Synaptoporin) exprimieren, entstehen Störungen der synaptischen Plastizität (Janz et al. 1999).

2.3.3.3 Prion-Protein

PrP^C ist ein Protein mit 33-35 kDa und einer Sequenz von ca. 250 Aminosäuren. Seine Isoform PrP^{Sc} besitzt die gleiche Primärstruktur aber unterschiedliche Sekundär- und Tertiärstrukturen. PrP^{Sc} ist partiell proteinase-resistent, und nach Verdauung mit Proteinase K bleibt eine 253-256 lange Sequenz von 27-30 kDa übrig. Molekular-Marker, die Sequenzen aus PrP²⁷⁻³⁰ erkennen, werden für die Immunhistochemie zum Nachweis von PrP^{Sc} verwendet. Nach Proteinase K-Verdauung von Gewebe wird PrP^C abgebaut. Die Reaktion mit PrP-Antikörper erfolgt dann, wenn der proteinase-resistente Kern übrigbleibt. Je nach Art der Prionerkrankung muss ein geeigneter Antikörper angewandt werden (Gábor et al. 2002). Der monoklonale Antikörper 12F10 bindet an die Aminosäuresequenz 142-160 und eignet sich für den Nachweis von BSE (Thielen et al. 2001).

2.3.3.4 Neuron-Specific-Enolase

Neuron-Specific-Enolase (NSE) ist ein glykolytisches Enzym, das in Neuronen und neuroendokrinen Zellen des Nervensystems vorhanden ist. Das Protein ist ein Homodimer von 78 kDa (Schmechel et al. 1979), das aus α - (46 kDa), β - (44 kDa) oder γ -Untereinheiten (46 kDa) besteht. Die $\beta\beta$ -Isoform kommt überwiegend im Herz- und Skelettmuskel vor. Die Non-Neuronal-Enolase (α,α' -Enolase), die

astrozytäre $\alpha\gamma$ -Isoform und die γ,γ' -Enolase kommen im ZNS vor, aber lediglich die γ,γ' -Enolase, auch bekannt als 14-3-2 Protein, ist ein spezifisches Enzym der Neuronen.

Schwere neurologische Erkrankungen wie Hypoxie oder Hirnblutungen führen aufgrund der Freisetzung von NSE aus Neuronen zu einem messbaren Anstieg der γ,γ' -Enolasekonzentration im Serum und im Liquor. Daher ist NSE von großer Bedeutung in der klinischen Neurologie, da sowohl Schweregrad der Erkrankung als auch die Prognose abgeschätzt werden können. Bei nvCJD (Green et al. 2001) können erhöhte NSE-Titer im Liquor festgestellt werden.

Auch in der post mortem-Untersuchung kann die NSE-Immunhistochemie Information über den metabolischen Zustand der neuronalen Zellen geben. Silverman (1992) zeigte, dass die NSE-Immunhistochemie als Indikator des mesencephalen neuronalen Metabolismus bei Ratten dienen kann. Kirino et al. (1983) beobachteten bei Ratten 10 Tage nach Axotomie des N. hypoglossus eine deutliche Reduktion von NSE im Nucleus hypoglossus. 20 Tage nach Axotomie stieg die neuronale NSE allmählich, und wurde als Indikator für die Regeneration der Nervenzellen betrachtet.

2.4 Erkrankungen mit differentialdiagnostischem Charakter zur BSE

Die Liste der differentialdiagnostischen Erkrankungen zur BSE ist lang. Von Rindern mit einem klinischen Verdacht auf BSE weist die Mehrheit der Tiere histopathologische Veränderungen auf, wobei die häufigsten neuropathologischen Diagnosen Encephalitiden viralen, bakteriellen oder mykotischen Ursprungs (Listeriose, Tollwut, Borna'sche Krankheit, BKF, Sporadische Bovine Encephalitis, IBR, usw.), Neoplasien, Cerebrocorticalnekrose und Ödeme sind (Jeffrey 1992; McGill & Wells 1993). Die größte Einzelgruppe der BSE-Verdachtstiere sind jedoch solche, bei denen keine histopathologischen Veränderungen vorliegen, welche die neurologische Symptomatik erklären können (Hye et al. 2001; Jeffrey 1992). Es kann sich hierbei um Stoffwechselerkrankungen handeln, deren Diagnose durch die Histologie nicht möglich ist. Beispiele sind Hypomagnesämie, die nervöse Form der Ketose und das hepatoencephale Syndrom. Auch von Intoxikationen mit dem Anthelmintikum

Closantel oder mit Kochsalz bei einem BSE-Verdachtsrind wurde berichtet (Hye et al. 2001).

Im folgenden werden lediglich die Erkrankungen besprochen, die in der vorliegenden Arbeit differentialdiagnostisch von Bedeutung sind. Hierbei wird zwischen Krankheiten mit und ohne Infektionscharakter unterschieden.

2.4.1 Infektionskrankheiten

2.4.1.1 Listeriose

Die Listeriose ist eine bakterielle Infektionskrankheit, die beim Rind meist sporadisch auftritt. Je nach Infektionsart und Abwehrlage des Tieres erscheint die Listeriose in verschiedenen Formen: Meningoencephalitis, Abort bzw. Frühgeburten, in seltenen Fällen Mastitis und bei Kälbern Septikämie (Rosenberger 1994). Der Erreger der Listeriose ist *Listeria monocytogenes*, ein fakultativ aerobes, grampositives Kurzstäbchen, das durch Geißeln aktive Beweglichkeit besitzt (Rolle & Mayr 2002).

Listeria monocytogenes kommt ubiquitär im Boden vor und gelangt am häufigsten durch listerien-kontaminiertes Futter in den Organismus. Der Erreger tritt über Läsionen der Mundschleimhaut ins Gewebe ein und gelangt an Nervenendigungen, von denen eine zentripetale neurogene Erregerausbreitung erfolgt. Insbesondere ist der Nervus trigeminus häufig betroffen. Die Folgen sind eine eitrige-granulomatöse Entzündung im Nervenverlauf, eine Ganglioneuritis und eine eitrige Hirnstammencephalitis. Da der Eintritt ins Gehirn meist unilateral erfolgt, ist ein etwas asymmetrisches Entzündungsbild im Stammhirn festzustellen (von Sandersleben 1989).

Das histologische Bild der Listeriose ist eine ausgeprägte Stammhirnencephalitis mit Mikroabszessen und lymphohistiozytären, perivaskulären Gefäßinfiltraten, auch oft in Begleitung einer eitrigen Meningitis (von Sandersleben 1989). Nach Feststellung des für Listeriose charakteristischen pathohistologischen Bildes kann die Diagnose zusätzlich mittels Immunhistochemie sichergestellt werden.

2.4.1.2 Tuberkulose

Die Tuberkulose beim Rind ist eine anzeigepflichtige, meist chronisch verlaufende bakterielle Infektionskrankheit, die in Deutschland seit der Einführung eines Bekämpfungsprogramms (1952) nur noch vereinzelt beobachtet wird. Diese hochgradig infektiöse Erkrankung wird durch die Erreger *Mykobakterium bovis*, *Mykobakterium tuberculosis* oder *Mykobakterium avium* verursacht. Mykobakterien sind unbewegliche, säure- und alkoholfeste Stäbchen, die gegenüber äußeren Einflüssen relativ resistent sind (Rolle & Mayr 2002).

Die Ansteckung erfolgt meist aerogen, bei Kälbern gelegentlich auch enterogen. Der entzündliche Prozeß fängt in der Eintrittspforte und in den regionalen Lymphknoten an (Primärkomplex), mit anschließender hämatogener und lymphogener Ausbreitung auf andere Organe (Frühgeneralisation). Sollte die Frühgeneralisation überstanden werden, kann es durch Superinfektionen oder ein Wiederbeleben der Erkrankung bei Stresssituationen zu einer zweiten hämatogenen und lymphogenen Ausbreitung (Spätgeneralisation) kommen, die meistens zum Tod führt. Von dem Krankheitsprozeß können beinahe alle Organe betroffen werden, einschließlich des ZNS. Tuberkulöse Veränderungen im ZNS kommen vor allem im Rahmen der Frühgeneralisation vor und konzentrieren sich meist auf Hirnbasis und Leptomeninx. Die Beteiligung von Kleinhirn, Großhirn und Rückenmark ist relativ selten (Rosenberg 1994).

Histologisch zeigt die Tuberkulose das Bild einer granulomatösen Entzündung. Man unterscheidet zwischen den exudativen und proliferativen Entzündungsformen. Zu Beginn entsteht ein leukozytär-fibrinöses Exsudat (exsudative Form), das umliegendes Gewebe in eine käsige Nekrose zerfallen lässt. Bei ausreichender Abwehr des Organismus kommt es in den Randbezirken zu einer produktiventzündlichen Reaktion (proliferative Form) mit Histozyten, Epitheloidzellen und Riesenzellen, welche von Lymphozyten und Plasmazellen umgeben sind (von Sandersleben 1989).

Die Diagnose der Mykobakterien wird neben dem Sektionsbild und dem histopathologischen Bild auch durch Nachweis von säurefesten Stäbchen in der Ziehl-Neelsen-Färbung gestellt. Zusätzlich können Mykobakterien mittels DNA-Sondentests bakteriologisch diagnostiziert werden.

2.4.1.3 Aktinobazillose

Die Aktinobazillose ist eine chronisch verlaufende, nicht kontagiöse bakterielle Infektionskrankheit, die durch den Erreger *Aktinobazillus lignièresi* verursacht wird. Der Erreger ist ein gramnegatives, unbewegliches, nicht-sporenbildendes Stäbchenbakterium, das unter physiologischen Bedingungen die Maulhöhle vieler Tierarten bewohnt. Bei kleinen Verletzungen in der Schleimhaut können die Bakterien in das Gewebe eindringen und eine lokale Entzündungsreaktion verursachen. Es werden hauptsächlich Lymphknoten, Zunge, Muskulatur und Haut betroffen (Rosenberger 1994).

Histologisch beobachtet man bei der Aktinobazillose eine chronische eitrigranulierende Entzündung mit typischer Morphologie: Im Zentrum liegt der Erreger in Form einer Druse vor. Die Druse ist umgeben von neutrophilen Granulozyten. Ihnen ist ein faserreiches Granulationsgewebe mit Makrophagen, Riesenzellen, Lymphozyten und Plasmazellen angeschlossen. Das Granulom besteht in der äußersten Schicht aus kollagenen Fasern und Fibrozyten bzw. Fibroblasten.

Die Diagnose erfolgt durch das klinische Erscheinungsbild und die Pathohistologie.

2.4.1.4 Bösartiges Katarrhalfieber (BKF)

BKF ist eine sporadisch auftretende virale Infektionskrankheit, die in Deutschland überwiegend in der durch das ovine Herpesvirus 2 (OHV-2) verursachten schaf-assoziierten Form vorkommt (Liess 1997). Klinische Leitsymptome sind krupöse Entzündungen der Kopfschleimhäute mit Beteiligung der Augen (gelegentlich auch des ZNS), septikämische Erscheinungen und/oder hämorrhagische Enteritiden. Der Übertragungsweg ist bislang nicht eindeutig geklärt. In den meisten Fällen läßt sich ein indirekter oder direkter Kontakt zu Schafen nachweisen, die ohne klinische Symptomatik als Virusreservoir dienen. Das Virus zeigt eine ausgeprägte Affinität zu Schleimhäuten. Bei vielen Tieren werden zentralnervöse Symptome beobachtet, die sich in Depression, Zwangsbewegungen oder tobsuchtartigen Erregungen äußern. Entzündliche Veränderungen der Augen können auf die Lymphscheide des Nervus opticus

übergreifen und eine nicht-eitrige Meningoencephalitis verursachen. Diese Kopf-Augen-Form des BKF mit Beteiligung des Gehirns ist in 80-90% der Fälle fatal (Rosenberger 1994).

Das histologische Bild ist geprägt von deutlichen vaskulitischen Komponenten, die nicht nur im Gehirn, sondern auch in Leber, Niere, Herz, Lunge und Verdauungstrakt beobachtet werden. Mononukleäre Infiltrate in der Adventitia (seltener in der Media und Intima) sowie manchmal fibrinoide Gefäßwandnekrosen sind die typischen Befunde bei BKF (von Sandersleben 1989). Im Gehirn beobachtet man eine nicht-eitrige Panencephalitis und Meningitis mit diffusen lymphohistiozytären Infiltraten. Die Vaskulitis mit fibrinoiden Gefäßwandnekrosen wird hauptsächlich an Arterien und Arteriolen beobachtet, wobei Gefäße der Leptomeninx, des Parenchyms und der Plexus choroideus betroffen sind. In manchen Fällen kann eine multifokale Gliose festgestellt werden (Bagó 2001).

Die Diagnose wird im allgemeinen durch das klinische und neurohistologische Bild gestellt. Zusätzliche diagnostische Möglichkeiten bieten die Antikörpertiterbestimmung im Serum und der Antigennachweis mittels PCR.

2.4.1.5 Europäische Sporadische Bovine Meningoencephalitis (ESBE)

Von einer unspezifischen, nicht-eitrigen Encephalitis, auch Sporadische Bovine Encephalitis (SBE) genannt, wurde in der Vergangenheit berichtet (Frankhauser 1961; Theil et al. 1998; Jeffrey 1992; Bachmann et al. 1975; Heim et al. 1997). Diese europäische Form der SBE (ESBE) muss von der in Nordamerika auftretenden, durch *Chlamydia pecorum* verursachten SBE abgegrenzt werden, da bis dato keine Anhaltspunkte für eine Chlamydien-Encephalitis in Europa vorliegen.

Die SBE ist eine wichtige differentialdiagnostische Erkrankung der BSE. In einer Studie von 225 BSE-Verdachtsrindern in Schottland identifizierte Jeffrey (1992) 24 Tiere (10,7%) mit einer "chronischen, nicht-eitrigen Meningoencephalitis" unbekannter Genese. Eine ähnliche Studie in England mit 200 Rindern zeigte einen Anteil der SBE von 3,5 % (McGill & Wells 1993).

Die Ätiologie der ESBE ist noch ungeklärt. In Einzelfällen wurden Hinweise auf eine Beteiligung von Paramyxoviren (Bachmann et al. 1975) oder Morbilliviren (Theil et al. 1998) gefunden, aber bei der Mehrzahl der Fälle konnten keine Erreger isoliert werden.

Histologisch kann die ESBE in drei Gruppen eingeteilt werden (Theil et al. 1998). Die erste Gruppe ist eine Polioencephalitis/Meningitis mit Gliose, neuronalen Nekrosen und perivaskulären Rundzellularinfiltraten, die aus Lymphozyten, Histiozyten und Plasmazellen bestehen. Die Gefäße zeigen eine Endothelaktivierung und stellenweise Vaskulitis. Die zweite Gruppe ist der ersten Gruppe ähnlich, zeigt jedoch eine starke Beteiligung des Cerebellums. Auffällige Veränderungen zeigen sich insbesondere im Stratum ganglionare, wo Degeneration und Nekrose der Purkinjezellen beobachtet werden. Die dritte Gruppe schließlich zeigt ebenfalls eine Polioencephalitis, aber mit besonders starken degenerativen Erscheinungen in der Substantia grisea des Hippocampus. Neben Gefäßmanschetten mit Lymphozyten, Histiozyten und Makrophagen werden neuronale Nekrosen und Neuronophagie vom Cornu ammonis bis in den Lobus piriformis beobachtet.

Die Diagnose von ESBE basiert auf der histologischen Untersuchung nach Ausschluß von viralen Erkrankungen wie Borna, Tollwut oder BKF.

2.4.2 Nicht-infektiöse Krankheiten

2.4.2.1 Cerebrocorticalnekrose (CCN)

Die CCN ist eine sporadisch auftretende, nicht-infektiöse Erkrankung, die überwiegend junge Rinder bis 18 Monate befällt. Die Erkrankung ist oft mit einer plötzlichen Veränderung in der Fütterung verbunden. Meist werden Indigestion und Durchfall vor dem Auftreten von zentralnervösen Störungen beobachtet (Rosenberger 1994).

Die Ursache von CCN ist vermutlich auf einen Mangel an Vitamin B₁ zurückzuführen. In 1967 konnten Pill et al. einen verminderten Vitamin B₁-Gehalt im Gehirn und in der Leber von CCN-erkrankten Tieren feststellen. Parallel wurde auch gezeigt, dass die experimentelle Verarmung von Thiamin die Krankheit auslösen kann (Markson et al. 1966). Ätiologisch von Bedeutung sind die

Fütterung von thiaminase-haltigen Pflanzen und eine Gleichgewichtsstörung der Pansenflora, die zur Biosynthese der B-Vitamine befähigt ist.

Die neurohistologischen Läsionen konzentrieren sich in der Regel auf die dorsomedialen, dorsalen und dorsolateralen isokortikalen Bereiche des Großhirns. Am Anfang steht ein fleckiger oder laminärer Status spongiosus mit Nervenzellatrophien und -nekrosen, welche durch Karyopyknosen und Schrumpfung der Neuronen gekennzeichnet sind. Daneben findet sich ein astrozytäres Ödem mit besonderer Ausprägung um die Nervenzellperikarya und Blutgefäße. Im weiteren Verlauf setzt die mobile Resorption mit reaktiven Mikroglia und Gitterzellen ein (von Sandersleben 1989). Nach Ausheilung kann eine komplette Dekortikation entstehen, bei der die Meningen in direktem Kontakt mit der Substantia alba stehen (Rosenberger 1994).

Die Diagnose CCN wird nach klinischem Vorbericht und neuropathologischer Befunderhebung der charakteristischen histologischen Läsionen gestellt.

2.4.2.2 Hypomagnesämie

Die Hypomagnesämie tritt in erster Linie bei laktierenden Kühen auf, wird gelegentlich aber auch bei Mastrindern, Kälbern und hochtragenden Tieren nach Stresssituationen beobachtet. Die Hypomagnesämie wird meist von einer Hypocalcämie begleitet und äußert sich klinisch in neuromuskulären Erregungs- und Kramp fzuständen bis hin zum Festliegen und zur Bewusstseinstrübung. Beim Rind handelt es sich vorwiegend um einen ernährungsbedingten sekundären Mangel an Magnesium, welcher oft im Zusammenhang mit dem ersten Weideaustrieb im Frühjahr steht. Junges und rasch wachsendes Gras enthält wenig Magnesium (weniger als 0,15% der Trockensubstanz) (Rosenberg 1994) und relativ viel Rohprotein. Bei Böden mit intensiver N- und K-Düngung ist zusätzlich der Kalium-Gehalt im Weidegras hoch. Der hohe Gehalt an Kalium und Rohprotein behindert die enterale Resorption von Magnesium, wodurch ein sekundärer Mangel entstehen kann. Die Verwertbarkeit von Magnesium eines Rindes bei einem Rohproteinanteil von 15% der Trockensubstanz beträgt ca. 20%, bei einem solchen von 25% der Trockensubstanz jedoch nur noch ca. 10%

(Rosenberg 1994). Im jungen Weidegras kann der Rohproteinanteil bis ca. 35% der Trockensubstanz betragen (Meyer, Bronsch und Leibetseder 1993).

Es ist keine histologische Diagnostik für Hypomagnesämie am Gehirn möglich, da es nicht zu erkennbaren Läsionen kommt. Die Diagnose basiert auf der Bestimmung der Mg-Konzentration im Serum.

2.4.2.3 Hirnödem

Als Hirnödem bezeichnet man eine Umfangsvermehrung des Hirngewebes infolge eines vermehrten Wassergehaltes (Ironside & Pickard 2002). Mangels Daten für Rinder sei illustrativ auf entsprechende Werte für den Menschen verwiesen. Dort beträgt der Wassergehalt der Substantia grisea und der Substantia alba im Regelfall 80% bzw. 68% des Nettogewichtes. Bei einem Hirnödem erhöht sich der Wassergehalt auf ca. 82% in der Substantia grisea und 76-79% in der Substantia alba (Ironside & Pickard 2002). Die stärkere Zunahme in der Substantia alba erklärt sich daraus, dass deren parallel angeordnete Axonbündel mehr Raum für die Akkumulation extrazellulärer Flüssigkeit bieten.

Ätiologisch kann zwischen vasogenem, zytotoxischem und hypoosmotischem Hirnödem unterschieden werden. Das vasogene Hirnödem wird durch eine erhöhte Vasopermeabilität verursacht, welche eine plasma-ähnliche proteinhaltige Flüssigkeit durchlässt. Diese Form des Hirnödems ist häufig in der Nachbarschaft von Tumoren oder als Folge von traumatischen Hirnläsionen anzutreffen. Histologische Merkmale sind astrozytäre Hypertrophie, Astrogliose und eine Schwellung der Myelinscheiden. Klatzo (1967) definierte das zytotoxische Ödem als eine zelluläre Schwellung, die mit verkleinertem extrazellulärem Raum und mit intakter Blut-Hirn-Schranke assoziiert ist. Hypoxische und hypoglykämische Zustände des Gehirns führen zu einem Versagen der ATP-abhängigen Na^+/K^+ -Pumpen, wodurch Na^+ , Cl^- und Wasser in die Zelle einströmen. Die Folge ist eine hydropische Schwellung der Neuronen und Gliazellen. Häufige Ursachen sind Ischämie und Hypoxie. Niedrige Blut-osmolalität kann, wie im gesamten Organismus, auch im Gehirn zu vasogenem Austritt von wässriger Flüssigkeit ins Gewebe führen und ein hypoosmotisches

Hirnödem verursachen. Eine astrozytäre Schwellung und ein extrazelluläres Ödem, vor allem in der weißen Substanz, sind die Folgen.

Mögliche Komplikationen eines chronischen Hirnödems sind Kompressionen des Gehirns gegen den knöchernen Schädel mit ischämischen Folgen und Gehirnherniationen an diversen Stellen.

Die Diagnose erfolgt auf Basis histologischer Untersuchungen in Kombination mit den klinischen Untersuchungsergebnissen.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere

Aus ganz Bayern wurden 26 Rinder im Alter zwischen 2 und 13 Jahren, bei denen ein amtlicher Verdacht auf BSE durch den Amtstierarzt ausgesprochen wurde, im Zeitraum von 1.1.2001 bis 28.02.2003 dem Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Ludwig-Maximilian-Universität München zur Sektion überstellt. Nach klinischer Untersuchung und Entnahme von Blut- und Liquorproben durch Tierärzte der II. Medizinischen Tierklinik der LMU München (H. Wendel und A. Nowotni) wurden die Tiere mit T61 (Wirkstoff: Embutramid, Mebezoniumjodid, Tetracain) euthanasiert. Angaben zu den Tieren sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

3.2 Sektion

3.2.1 Räumlichkeit und Schutzbekleidung

Die Sektion der Rinder fand in einem für die BSE-Verdachtssektionen vorgesehenen Raum unter allseitigem Abschluss statt. Die Rinder wurden unmittelbar nach der Euthanasie der Sektion unterzogen. Die Obduktion führten zwei Tierärzte des oben genannten Lehrstuhls durch, unter Mithilfe eines Präparators.

Die Sekanten und der Präparator waren mit besonderer Schutzbekleidung ausgerüstet. Zusätzlich zu der üblichen Ausstattung einer Routinesektion dienten folgende Artikel als Schutzbekleidung (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland):

- Einmaloverall (Art-Nr. 0.455.1)
- Einmalschürze (Art.-Nr. A246.1)
- Gesichtsschirm (Art.-Nr. 1705.1)
- Schnittschutzhandschuhe (Art.-Nr. E357.1)

	Datum	Ohrmarke	Signalment	Geburtsdatum	Herkunft
1	26.1.01	DE 0916737088	DBV, 5j, weiblich	21.05.1996	Oberallgäu
2	7.2.01	DE 0982620993	DFV, 6j, weiblich	15.05.1995	Polling
3	15.2.01	DE 0918615643	DBV, 5j, weiblich	23.05.1996	Landsberg
4	22.2.01	DE 0916379501	DBV, 9j, weiblich	20.12.1991	Erkheim
5	5.3.01	DE 0111205839	Highl., 8,5j, weibl.	12.07.1992	Unterrallgäu
6	7.3.01	DE 0916746937	DBV, 5j, weiblich	09.05.1996	Memmingen
7	5.7.01	DE 0917072805	DFV, 8j, weiblich	08.10.1993	Tirschenreuth
8	10.9.01	DE 0980101937	DFV, 5j, weiblich	18.07.1996	Sauerlach
9	19.9.01	DE 0919795617	DBV, 5j, weiblich	19.09.1995	Landsberg
10	21.9.01	DE 0912551577	DFV, 4,5j, weiblich	29.01.1997	Eichstätt
11	26.10.01	DE 0982492853	DFV, 9,5j, weiblich	28.01.1992	Erding
12	26.11.01	DE 0982547831	DFV, 3j, weiblich	18.06.1998	Rosenheim
13	14.12.01	DE 0930593288	DFV, 4j, weiblich	28.09.1997	Bad Tölz
14	3.1.02	DE 0919827020	DBV, 6j, weiblich	11.04.1996	Weilheim
15	7.1.02	DE 0930927377	DFV, 4j, weiblich	14.12.1997	Mühl Dorf
16	10.1.02	DE 0981197346	DFV, 13j, weiblich	31.01.1989	Amberg-Sulzbach
17	14.1.02	DE 0932554288	DFV, 3j, weiblich	03.03.1999	Rosenheim
18	15.1.02	DE 0919808466	DBV, 5j, weiblich	09.12.1996	Weilheim
19	29.1.02	DE 0914988483	DFV, 8j, weiblich	24.01.1994	Mittelfranken
20	30.1.02	DE 0930226068	DFV, 6j, weiblich	20.01.1997	Cham
21	10.4.02	DE 0919808137	DBV, 5,5j, weiblich	09.09.1996	Weilheim
22	14.5.02	DE 0914180941	DFV, 6,5j, weiblich	10.11.1995	Gunzburg
23	5.6.02	DE 0982664350	DFV, 6,5j, weiblich	20.09.1995	Neuburg a.d. Donau
24	17.7.02	DE 0912419456	DFV, 5,5j, weiblich	24.02.1997	Neustadt a.d. Waldnaab
25	19.12.02	DE 0934186672	DFV, 3j, weiblich	20.03.2000	Traunstein
26	21.01.03	DE 0810139793	DFV, 6j, weiblich	20.01.1997	Ravensburg

Tabelle 3-1: Untersuchte Rinder

3.2.2 Probenentnahme

Die Rinder wurden unmittelbar post mortem einer Sektion unterzogen, die einerseits gemäß den Richtlinien der Tierpathologie (Geisel 1993) und andererseits den Anleitungen der Bundesanstalt für Viruserkrankungen der Tiere für Umgang mit TSE-Verdächtigem material (Groschup & Weiland 1992) folgte. Die makroskopischen Veränderungen wurden schriftlich dokumentiert.

Repräsentative Proben wurden sowohl von allen Organen und Geweben als auch vom peripheren und zentralen Nervensystem entnommen. Tabelle 3-2 zeigt

eine Übersicht der entnommenen Proben. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war ausschließlich das Gehirn. Die Proben anderer Organe, einschließlich des Rückenmarks wurden für weiterführende Untersuchungen am Institut aufbewahrt.

	ZNS und PNS	25	Leber
1	Großhirn	26	Lunge
2	Kleinhirn	27	Milz
3	Stammhirn	28	Pancreas
4	Hypophyse	29	Niere
5	Trigeminusganglion	30	Nebenniere
6	N. ischiadicus	31	Harnblase
7	Ganglion mesentericum	32	Aorta
8	Rückenmark	33	Vena jugularis
	Organe	34	Ovar
9	Auge	35	Uterus
10	Tränendrüse	36	Placenta
11	Parotis	37	Euter
12	Waldeyer´scher Rachenring		Lymphknoten
13	Zunge	38	Buglymphknoten
14	Schilddrüse	39	Peyer´sche Platten
15	Ösophagus	40	Mandibular Lymphknoten
16	Trachea		Muskulatur
17	Labmagen	41	M. semitendinosus
18	Pansen	42	M. triceps
19	Netzmagen	43	M. longissimus dorsi
20	Blättermagen	44	Zwerchfell
21	Dünndarm	45	M. intercostalis
22	Dickdarm		Sonstiges
23	Rektum	46	Knochenmark
24	Herz	47	Haut
		48	Fett

Tabelle 3-2: Entnommene Proben

Ein Teil der Proben wurde unmittelbar nach der Entnahme in 6-prozentiges gepuffertes Formalin eingelegt. Ein anderer Teil der Proben wurde nativ in Plastikgefäßen aufbewahrt und sofort bei -80°C eingefroren. Die eingefrorenen Proben wurde an die BSE-Gewebebank der Bundesforschungsanstalt für

Viruserkrankungen der Tiere (Insel Riems) weitergeleitet, und wurden dadurch weiteren Forschungsprojekten zur Verfügung gestellt.

Für den BSE-Schnelltest mittels ELISA wurde ein ca. 4 cm langer Abschnitt des Myelencephalons auf Höhe der Obexregion und eine Probe der Skelettmuskulatur entnommen und unbehandelt aufbewahrt. Die Einsendung der Proben für den Schnelltest erfolgte an das Landesuntersuchungsamt Oberschleißheim (LUAS; Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim). Zur Absicherung der Identität wurde dieser Lieferung ein Ohr des Rindes inklusiv Ohrmarke beigelegt.

3.3 Histologie

3.3.1 Fixierung und Herstellung von Paraffinschnitten

Nach 2- bis 4-tägiger Fixation in einem 6 %-igen Formalin wurde das komplette Gehirn quer zur Fissura longitudinalis cerebri in 0,5 – 1,0 cm dicke Scheiben geschnitten, anschließend weitere 2 Wochen in Formalin fixiert (Zusatzbehandlung je nach Ergebnis des LUA, siehe 3.3.3), über die aufsteigende Ethanolreihe und Xylol in einem Einbettungsgerät (Histokinette 2000, Automatic Tissue Processor, Fa. Reichert-Jung, Deutschland) entwässert und in Paraplast Plus® (Nr. 8889-502005, Fa. Sherwood Medical Co., St. Louis, MO, USA) mit einem Schmelzpunkt von 56°C eingebettet.

Mit einem Rotationsmikrotom (Jung RM 2055, Fa. Leica, Deutschland) wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, in einem 37°C warmen Wasserbad gestreckt und auf entfettete Objektträger aufgezogen.

3.3.2 Färbungen und histologische Untersuchungen

Die auf Objektträger aufgebrachten Gewebeschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und über die absteigende Ethanolreihe rehydriert. Für jede Gehirnlokalisation wurden 3 Färbungen angefertigt: Hämatoxylin-Eosin (HE), Nissl und Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS). Die Färbungen erfolgten nach den allgemeingültigen Färbetechniken (Romeis 1989).

Die histologische Untersuchung der Präparate erfolgte unter einem Lichtmikroskop (Axioplan, Fa. Carl Zeiss, Deutschland) bei 25–400 facher Vergrößerung. Die Beurteilung der Läsionen war semiquantitativ und richtete sich nach allgemeingültigen Kenntnissen der Neuropathologie (Hirano 1983; Graham & Lantos 2002). Zur Identifikation von Gehirnarealen wurden Gehirn-Atlanten verwendet (Johnson et al, Internetveröffentlichung; Yoshikawa 1968). Für die Beurteilung der Läsionsstärke wurde eine Scala von 0 bis 3 angewandt (0: keine Läsionen, 1: geringgradige Läsionen, 2: mittelgradige Läsionen, 3: hochgradige Läsionen).

Bei BSE-positiven Tieren wurde das komplette Gehirn histologisch untersucht. Bei BSE-negativen Tieren wurden 5 bis 6 Schnitte aus repräsentativen Hirnarealen den Untersuchungen zugrunde gelegt.

3.3.3 Zusätzliche Behandlung von BSE-positivem Material

Vor der histologischen Verarbeitung erfolgte eine Behandlung des BSE-positiven Gewebes und des mit diesem Gewebe in Kontakt gekommenen Materials, um die infektiösen Prionen zu inaktivieren.

Die Deaktivierung von PrP^{Sc} erfolgte nach den empfohlenen Methoden (Taylor 1996; Groschup & Weiland 1992):

Nach 2–4 tägiger Fixation in 6 %-igem Formalin wurde das Gehirn in einem Sicherheitslabor des Lehrstuhls für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie mit Sicherheitsstufe 2 in 0,5–1,0 cm dicke Scheiben geschnitten, anschließend 1 Stunde mit 98–100%-iger Ameisensäure (Fa. AppliChem, Nr. A 2313, Darmstadt, Deutschland) behandelt und erneut für weitere 2 Wochen in Formalin fixiert. Das Entwässern und Einbetten in Paraplast Plus[®] wurde analog zu den BSE-negativen Gehirnschnitten durchgeführt.

Die Tierkadaver der BSE-positiven Tiere wurden gemäß dem Tierkörperbeseitigungsgesetz (Bundesgesetzblatt, I S. 2313, 2610, 2. Sept. 1975, geändert am 22.2.2001) entsorgt.

Das Sektionsbesteck und die zum Aufschneiden des Gehirns verwendeten Messer wurden in einem Bad mit 98–100%-iger Ameisensäure über Nacht dekontaminiert.

Wiederverwendbare Schutzbekleidung sowie Gummistiefel und Schutzhelm, die die Behandlung mit Ameisensäure nicht vertragen, wurden über Nacht in 2M Natronlauge (NaOH, AppliChem, Nr. A 2518) behandelt.

Wegwerfgegenstände, wie Einmalschutzbekleidung und Papiertücher wurden in Autoklavtüten gut verschlossen aufbewahrt und im Institut für Mikrobiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München 90 Minuten bei 135°C und 2,5 bar Druck autoklaviert.

Das Schneiden und Färben der histologischen Schnitte von BSE-positivem Material erfolgte in einem zu diesem Zwecke eingerichteten Labor. Es wurde ein manuelles Rotationsmikrotom (Fa. Leica) zum Schneiden der Paraffinblöcke verwendet. Für große Gehirnschnitte wurde ein Schlittenmikrotom (Nr. 25617, Fa. Jung AG, Heidelberg, Deutschland) benutzt.

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Allgemeines

Immunhistochemische Verfahren für PrP^{Sc}, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Synaptophysin und Neuron Specific Enolase (NSE) wurden angewandt.

In den immunhistochemischen Darstellungen wurde das Mesencephalon auf Höhe des N. rubers untersucht. Insgesamt 6 bis 7 Kerngebiete wurden ausgewertet. Bei einem BSE-positiven Tier (Nr.1) war kein Material auf Höhe des N. rubers vorhanden und es wurde deshalb einen weiter caudal liegenden Abschnitt des Mesencephalons für die Auswertung verwendet. 8 BSE-negative Tiere, die als Kontrolle dienten und in 5 Gruppen eingeteilt wurden, wurden aus verschiedenen Krankheitsbildern ausgewählt.

- Gruppe 1: virale Erkrankungen (2 Tiere)

- Gruppe 2: bakterielle Infektionen (2 Tiere)
- Gruppe 3: ohne neuropathologischen Befund (2 Tiere, davon 1 Tier mit Hypomagnesämie)
- Gruppe 4: Hirnödeme (1 Tier)
- Gruppe 5: Trauma (1 Tier)

5 µm dicke, in Paraffin eingebettete Gehirnschnitte vom Mesencephalon wurden auf Objektträger aufgezogen und anschließend über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank getrocknet, um den Entparaffinierungsvorgang zu erleichtern und das Abschwimmen der Schnitte während der Bearbeitung zu verhindern. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Vorgänge bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Verdünnungen wurden mit PBS (phosphate buffered saline, pH 7,41 – 7,45) hergestellt.

3.4.2 PrP-Immunhistochemie

Die Methode basiert sich auf die Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode nach Hsu et al. (1981).

- Entparaffinierung in Xylol 2 mal à 5 Minuten
- Rehydrierung in absteigende Alkoholreihen (100% x 2, 96%, 70%) à 5 Minuten
- Spülen in Aqua dest.
- Demaskierung mit 4mM HCl (Fa. AppliChem, Nr. A 1434, 1M-Lösung, Darmstadt, Deutschland)
- 4 mal 4 Minuten bei 600W in der Mikrowelle (Microwave 800, Fa. Severin)
- Spülen mit Aqua dest.
- Denaturierung mit 4M Guanidiniumthiocyanat (C₂H₆N₄S, Fa. Merck, Nr. 1.04167, Darmstadt, Deutschland) 15 Minuten
- Spülen mit Aqua dest.
- 3 maliges Waschen in PBS für jeweils 5 min.
- Blockierung mit 0,04 % Casein (Art. 7555.1, Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland) 15 Minuten

- Inkubation mit dem Primärantikörper 90 Minuten: mouse α 12F10, Verdünnung 1:1000 (Monoklonaler Antikörper 12F10, mouse IgG_{2a}, in freundlicher Kooperation diesem Institut zur Verfügung gestellt von Prof. Walter Schulz-Schäffer, Zentrum für Neurologische Medizin der Universität Göttingen).
- 3 maliges Waschen in PBS für jeweils 5 min.
- Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 min.: gt α mouse (Fa. Dako, Code E0433), Verdünnung 1:500
Die Negativkontrollen werden mit PBS behandelt.
- 3 maliges Waschen in PBS für jeweils 5 min.
- Auftragen des 30 min. vorher nach Vorschrift des Herstellers angesetzten Peroxidase-gekoppelten Streptavidin-Biotin-Komplexes (ABC-Komplex, Vectastain PK-4000, Vector Laboratories, Inc. CA, USA)
Inkubation für 30 min.
- 3 maliges Waschen in PBS für jeweils 5 min.
- Inkubation mit dem Substrat für die Peroxidase: 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB; Fa. KEM-NE-TEC A/C, Copenhagen, Dänemark) gelöst in 0,05 M Tris-Puffer (pH 7,6).
Direkt vor Gebrauch wird das DAB mit 30 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂, Fa. AppliChem, Nr. A 0626) vermischt (1 μ l H₂O₂ / 1ml DAB). DAB für 3 bis maximal 10 Minuten auftragen, bis Anfärbung der Schnitte erkennbar wird.
- Spülen mit Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun für 2 Sekunden
- Spülen mit Aqua dest. Für 10 Minuten
- Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung
- 100 % Xylol und mit Eukitt eindeckeln.

3.4.3 GFAP/Synaptophysin/NSE-Immunhistochemie (ABC-Methode)

- Entparaffinieren in Xylol 2x 20 min.
- Rehydrieren in absteigende Alkoholreihen (100% x 2, 96%, 70%, Aqua dest. à 5 min.)

- Methanol + H₂O₂ (30 %) 30 Minuten um die endogene Peroxidase zu verbrauchen und dessen Bindung an den ABC-Komplex zu verhindern.
- Spülen in PBS
- Normalserum Ziege (Fa. Dako, X0907), Verdünnung 1:20, 30 min., um unspezifische Bindungen zu vermeiden.
- Spülen in PBS
- Primärer Antikörper:
 - rb α Synaptophysin (Fa. Dako 073), Verdünnung 1:100
 - rb α GFAP (Fa. Dako, Z0334), Verdünnung 1:300
 - rb α NSE (Fa. Biotrend, NA 1247), Verdünnung 1:1000
 - Inkubation über Nacht bei 4°C
- Spülen in PBS
- Sekundärer Antikörper:
 - goat anti rabbit, biotinyliert, (Fa. Dako E0432), Verdünnung 1:200
 - 30 min.
- Auftragen des mindestens 30 min. vorher angesetzten Peroxidasegekoppelten Streptavidin-Biotin-Komplexes (ABC-Komplex) (Vectastain, PK4000)
- Spülen mit PBS 3 x 5min.
- 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) mit 30 Wasserstoffperoxid vermischen und kurz auftragen, bis Anfärbung der Schnitte erkennbar wird.
- Spülen mit Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun für 3 Sekunden
- 10 Minuten in Leitungswasser spülen
- Dehydrieren der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 % - 100 %)
- 100 % Xylol 3 x 5 Min.
- Eindeckeln

3.5 Diagnostische Methoden

Die Diagnose BSE erfolgte im Landesuntersuchungsamt Süd (LUAS) mittels Western-Blot für PrP^{Sc}. Diese Diagnose konnte mit eigenen Immunhistochemischen Untersuchungen bestätigt werden (siehe 4.3.1).

Die diagnostischen Methoden der BSE-negativen Rinder wird im folgenden tabellarisch aufgeführt:

- Listeriose: Die Diagnose konnte meist aus der klinischen Untersuchung und den charakteristischen histopathologischen Veränderungen abgeleitet werden. In unklaren Fällen wurde die Diagnose mittels Immunhistochemie mit Antikörper gegen *Listeria monocytogenes* gestellt.
- Tuberkulose: Ein charakteristisches Bild der Sektion und Histologie mit der Detektion von Säure-festen Stäbchen in der Ziehl-Nielsen-Färbung ergaben die Diagnose. DNA-Sondentests konnte den Mykobakteriumtyp ermitteln.
- Aktinobazillose: Die Diagnose entstand aus dem Bild der Sektion und der Histopathologie.
- Bösartiges Katarrhalfieber: Aus dem charakteristischen histopathologischen Bild konnte eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Bei der serologischen Untersuchung wurden Antikörper gegen OHV-2 festgestellt.
- Europäische Sporadische Bovine Encephalitis: Die histopathologische Untersuchung ergab eine nicht-eitrige, virale Encephalitis. Immunhistochemisch wurden Tollwut und Borna´sche Krankheit ausgeschlossen.
- Cerebrocorticalnekrose: Die Diagnose wurde anhand der charakteristischen histopathologischen Veränderungen gestellt.
- Hypomagnesämie: Die Diagnose erfolgte auf Basis des erniedrigten Mg-Wertes in der Blutuntersuchung.
- Hirnödem: Die Diagnose erfolgte aus der histopathologischen Untersuchung.
- Rippenfraktur/Klauenproblematik: Das makroskopische Sektionsbild konnte die neurologische Symptomatik erklären.

4 Ergebnisse

4.1 Histologie der BSE-positiven Tiere

4.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchungsergebnisse und Tabellen

Das Ergebnis der histologischen Untersuchung der einzelnen BSE-positiven Rinder liegt in Tabelle 4-1 vor. Repräsentative Hirnareale und Kerngebiete der fünf Gehirnabschnitte Myelecephalon, Metencephalon, Mesencephalon, Diencephalon und Telencephalon wurden auf fünf für BSE charakteristische Merkmale untersucht: vakuoläre Nervenzelldegenerationen, spongiforme Auflockerungen des Neuropils, Astrogliose, Mikrogliose und axonale Schwellungen. Zusätzlich wurde die Menge des neuronalen Lipofuszins dokumentiert. Die Beurteilungsskala verläuft von 0 bis 3, wobei 0 für keine, 1 für geringgradige, 2 für mittelgradige und 3 für hochgradige Läsionen gilt.

In Tabelle 4-2 wurden die histologischen Ergebnisse von den 6 Tieren aus Tabelle 4-1 zusammengefasst. Ein Mittelwert für die jeweiligen Hirnareale oder Kerngebiete wurde ermittelt.

**Tabelle 4-1: Histologische Ergebnisse der BSE-positiven Rinder
BSE-Rind 1**

	VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin
Myelencephalon						
N. facialis						
N. hypoglossus						
N. motorius dorsalis n. vagi						
N. olivaris						
N. olivaris superior						
N. n. accessorii						
N. raphe	1	1	3	2	0	0-1
N. reticularis gigantocell.						
N. reticularis lateralis						
N. tractus solitarii						
N. tr. spinalis n. trigemini	1	2	2	1	0	1-2
N. vestibularis inferior						
N. vestibularis lateralis						
N. vestibularis medialis	2	1	1	1	0	1-2
N. vestibularis superior	0-1	0-1	1	1	1	0-1
Metencephalon						
Cortex cerebelli	0	0	0	1-2	0	0
Medulla cerebelli		0	0	3	0	
Corpus medullare cerebelli						
N. dentatus						
N. fastigii						
Formatio reticularis	1	1	0-1	1	0	1
Lemniscus lateralis	0		1	2	1	0
N. parapendicularis	0-1	1	0	2	0	1
Nn. pontis	0	0	0	2	0	1
N. tegmentum dorsalis	0	0	0	3	0	0
Mesencephalon						
Colliculus inferior	0	0	2-3	1	0	0
Colliculus superior	0	0	2-3	1	0	0
Corpus geniculatum lat.						
Corpus geniculatum med.	0	0			0	0
Crus pedunculi						
Lemniscus medialis						
N. interpedunculi						
N. n. trochlearis	0	1	2-3	1	0	0
N. n. oculomotorii						
N. ruber						
N. tr. mesenc. n. trigemini	0	1	1	2	0	1
Substantia grisea centralis	1-2	2	2-3	2	1	1

	VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin
Diencephalon						
Fasciculus mammillothal.						
Nn. habenulares	2-3	0	2	0	0	0
Nn. thalami	1	1				0
N. thalamus paraventricul.	0-1	0	0	0	0	0
Subthalamus						
Telencephalon						
Capsula externa						
Capsula interna						
Corpus callosum		2-3				
N. caudatus	0	0			0	0
N. septales lateralis	0	0			0	0
N. septales medialis	0	0			0	0
Cortex piriformis	0-1	0			0	0
Putamen	0-1				0	0
Septum pellucidum						
Frontalcortex:dorsomedial	1	0			0	0
Frontalcortex:lateral	1	0			0	0
Frontalcortex:basal	2	1			0	0
Occipitalcortex:dorsomed.	2	1			0	0
Occipitalcortex:lateral	1	0-1			0	0
Zentralcortex:dorsomedial	0	0	0	0	0	0
Zentralcortex:lateral	0	0	0	0	0	0
Hippocampus dorsal						
CA1	0	1	0	1	0	0
CA2	0	1	0	1	0	0
CA3/CA4	0	1	0	1	0	0
Stratum granulare	0	0	0	0	0	0
Stratum molekulare	0	0	0	0	0	0
Hippocampus basal						
CA1	0	1	0	1	0	0
CA2	0	1	0	1	0	0
CA3/CA4	0	1	0	1	0	0
Stratum granulare	0	0	0	0	0	0
Stratum molekulare	0	0	0	0	0	0

BSE-Rind 2	VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin
Myelencephalon						
Lemniscus medialis	1-2	1	1	0	0	1
N. facialis	0	1	1	0	0	1
N. hypoglossus						
N. motorius dorsalis n. vagi						
N. olivaris						
N. olivaris superior	1	1-2	1	0	0	0
N. n. accessorii						
N. raphe	0-1	2	1	1	0-1	0
N. reticularis gigantocell.	2-3	2	1	1	1	1-2
N. reticularis lateralis						
N. tractus solitarii	2	3	2	1	0	0-1
N. tr. spinalis n. trigemini	2	2	1-2	1-2	0	1
N. vestibularis inferior						
N. vestibularis lateralis	2	2	2	0-1	1	2-3
N. vestibularis medialis	0-1	1	2	1	0	1-2
N. vestibularis spinalis	2	1	1	0	1	2
N. vestibularis superior	1	1-2	1	0	0	0
Metencephalon						
Cortex cerebelli	0	0	0	0	1	0
Medulla cerebelli		0	0	0	0	
Corpus medullare cerebelli		0	0	0	0	
N. dentatus	1	0-1	1	0	0	0
N. fastigii	1-2	0	0	1	1	1
N. interpositus	1	0	0	0	1	0
Formatio reticularis	1-2	2	2	1	0	1-2
Lemniscus lateralis						
N. motorius n. trigemini	2	2	2	0	1	1-2
N. parapeduncularis	1	2	1	1	0	0
Nn. pontis	0-1	0	0	0	0-1	0
N. tegmentum dorsalis	0	1	1	0	0	0
Mesencephalon						
Colliculus inferior	2	1	1	1	0	0
Colliculus superior	0	0	1-2	0	0	0
Corpus geniculatum lat.	0	0	1	0	0	0-1
Corpus geniculatum med.	2	1-2	2	1	1	0
Crus pedunculi		0	1	1	0	
Lemniscus medialis						
N. interpedunculus	2	1	1	1	1	0
N. n. trochlearis						
N. n. oculomotorii	0-1	2	2	1	0	1-2
N. ruber	3	1	2-3	1	2	3
N. tr. mesenc. n. trigemini	2	2	2	2	0	1
Substantia grisea centralis	2	3	2	2	0	0-1

	VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin
Diencephalon						
Fasciculus mammilloth.						
Nn. habenulares	1	2	2	2	0	0-1
Nn. thalami	1	2	2	2	0	0
N. thalamus paraventrik.	1	1-2	2	1	0	0
Subthalamus						
Telencephalon						
Capsula externa		2	1	0	0	
Capsula interna		0	1	0	0	
Corpus callosum						
N. caudatus	0	0	1	0	0	0
N. septales lateralis						
N. septales medialis	1	0-1	2	1	0	1-2
Cortex piriformis	0-1	0	1	0	0	0-1
Putamen	0	1	1-2	0	0	0
Septum pellucidum						
Frontalcortex:dorsomedial	0-1	1	1	0	0	0
Frontalcortex:lateral	0-1	0	1	0	0	0
Frontalcortex:basal	0	0	0	0	0	0
Occipitalcortex:dorsomed.						
Occipitalcortex:lateral						
Zentralcortex:dorsomedial	1	0	1	0	0	0-1
Zentralcortex:lateral	0	3	0-1	0	0	0-1
Hippocampus dorsal						
CA1	0	0	0	0	0	0
CA2	0	0	0	0	0	0
CA3/CA4	0	1	1	0	0	0
Stratum granulare	0					0
Stratum moleculare	0	0	0	0	0	0
Hippocampus basal						
CA1	0	0	0-1	0	0	0
CA2	0	2	1	0	0	0
CA3/CA4	0	2	2	0-1	0	0
Stratum granulare	0					0
Stratum moleculare	0	2	2	0	0	0

BSE-Rind 3	VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin
Myelencephalon						
N. facialis	1	1	1	1	0	1-2
N. hypoglossus	0	1	1	1	2	2
N. motorius dorsalis n. vagi	2	1	3	2	2-3	1
N. olivaris	1	3	2	2	2	3
N. olivaris superior						
N. n. accessorii						
N. reticularis gigantocell.	2	2	1	0-1	1	1-2
N. reticularis lateralis	1	2	1	1	2	2
N. tractus solitarii	0	2	2	2	2	1
N. tr. spinalis n. trigemini	0	2	2	2	2	1
N. vestibularis inferior						
N. vestibularis lateralis	1	2	1	1	1	1
N. vestibularis medialis	0	1	2	2	1	1-2
N. vestibularis superior						
Metencephalon						
Cortex cerebelli	0	0	0	0	0	0
Medulla cerebelli	0	0	0	0	0	0
Corpus medullare cerebelli		1	0	0	0	
N. dentatus	2	2	2	1	1	1
N. fastigii	1	1-2	1	1	1-2	1
N. motorius n. trigemini						
Nn. pontis						
N. tegmentum dorsalis						
Mesencephalon						
Colliculus inferior	0	1	0	0	0	0
Colliculus superior	0-1	1	1	0	1	0
Corpus geniculatum lat.	0	0-1	0	1-2	0	1
Corpus geniculatum med.						
Crus pedunculli	0	0	0	0	0	0
Lemniscus medialis	1-2	1	1	0	1	0
N. interpedunculus	1	1	1	0-1	1	0
N. n. trochlearis	0-1	1-2	1	1	1-2	1-2
N. n. oculomotorii	2	2	1	1	1-2	1
N. ruber	3	2	3	1	1	2-3
N. tr. mesenc. n. trigemini	0	1-2	1	1	1-2	1-2
Substantia grisea centralis	2	2	3	1	1	1
Substantia nigra	0-1	2	1	1-2	2	1

	VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin
Diencephalon						
Fasciculus mammillothalami	1	1	1	1	0	0
Nn. habenulares	1-2	1	1	0	1	1
Nn. thalami	0	1-2	1	0	0	0
N. thalamus paraventrik.	0-1	1	2-3	1	0	0
Subthalamus	2	1-2	2	1	1-2	1
Telencephalon						
Capsula externa		0	0	0	0	
Capsula interna		0	0	0	0	
Corpus callosum	0	0	0	0	0	0
N. caudatus	0	0	0	0	0	0
N. septales lateralis	0	0	1-2	0	0	0
N. septales medialis	0	0	1-2	0	0	0
Cortex piriformis	0	2-3	0	0	2	0
Putamen	0	1	0	0	1	0
Septum pellucidum	0	0	0	0	0	0
Frontalcortex:dorsomedial	0	0	0	0	0	0
Frontalcortex:lateral	0	1	0	0	0	0
Frontalcortex:basal	0	3	0	0	0	0
Occipitalcortex:dorsomedial	0	1	0	0	0	0
Occipitalcortex:lateral	0	1	0	0	0	0
Zentralcortex:dorsomedial	0	2	0	0	0	0
Zentralcortex:lateral	0	2	0	0	0	0
Hippocampus dorsal						
CA1	0	0	0	0	0	0
CA2	0	0	0	0	0	0
CA3/CA4	0	0	0	0	0	0
Stratum granulare	0	0	0	0	0	0
Stratum molekulare	0	0	0	0	0	0
Hippocampus basal						
CA1	0	1	0	0	0	0
CA2	0	1	0	0	0	0
CA3/CA4	0	3	0	0	0	0
Stratum granulare	0	0	0	0	0	0
Stratum molekulare	0	3	0	0	0	0

BSE-Rind 4	VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin
Myelencephalon						
Lemniscus medialis						
N. facialis	0	1	1	1	0	1
N. hypoglossus	0	1	0	1	0	0
N. motorius dorsalis n. vagi	2	2-3	2	1	1	1
N. olivaris	0	1	0	1	0	2-3
N. olivaris superior	0	0	3	2	0	1
N. raphe						
N. reticularis gigantocell.	1	2	1	1	1	1-2
N. reticularis lateralis						
N. tractus solitarii	0	3	2	1	1	1
N. tr. spinalis n. trigemini	1	2	2	2	1	0
N. vestibularis inferior	1	1	2	1	0	0
N. vestibularis lateralis	2	1	2	1	1	2
N. vestibularis medialis	0	0	0	1	0	1
N. vestibularis superior						
Metencephalon						
Cortex cerebelli	0	0	0	0	0	0
Medulla cerebelli		0	0	0	0	
Corpus medullare cerebelli		0	0	0	0	
N. dentatus						
N. fastigii						
Formatio reticularis						
Lemniscus lateralis						
N. motorius n. trigemini	1	1	3	2	1	1
N. parapedicularis						
Nn. pontis						
N. tegmentum dorsalis	0	0	1	3	0	0
Mesencephalon						
Colliculus inferior						
Colliculus superior	1	1	1	0	0	0
Corpus geniculatum lat.	0	0	0	0	0	0
Corpus geniculatum med.						
Crus pedunculi	0	0	0	0	0	0
Lemniscus medialis						
N. interpedunculus	0	0	0	0	0	0
N. n. trochlearis						
N. n. oculomotorii	1	1	1	1	0	0
N. ruber	2	1	1	1	0	2
N. tr. mesenc. n. trigemini	0	0	1	1	0	1
Substantia grisea centralis	0	0	0	1	0	0
Substantia nigra						

VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin	VDNz
Diencephalon						
Fasciculus mammilloth.	0	2	1	0	0	0
Nn. habenulares	2	1	0	0	0	0
Nn. thalami	0	0	0	0	0	0
N. thalamus paraventrik.	0	0	0	2	0	0
Subthalamus						
Telencephalon						
Capsula externa		1	0	0	0	
Capsula interna		2	0	0	0	
Corpus callosum		0	0	0	0	
N. caudatus	0	0	0	0	0	0
N. septales lateralis	0	0	1	0	0	0
N. septales medialis	0	1	0	0	0	0
Cortex piriformis	0-1	0	0	0	0	0
Putamen	0-1	0	0	0	0	0
Septum pellucidum	0	0	0	0	0	0
Frontalcortex:dorsomedial	0	0	0	0	0	0
Frontalcortex:lateral	0	0	0	0	0	0
Frontalcortex:basal	0	0	0	0	0	0
Occipitalcortex:dorsomed.						
Occipitalcortex:lateral						
Zentralcortex:dorsomedial	0	0	0	0	0	0
Zentralcortex:lateral	0	1	0	0	0	0
Hippocampus dorsal						
CA1	0	0	0	0	0	0
CA2	0	0	0	0	0	0
CA3/CA4	0	2	0	0	0	0
Stratum granulare	0	0	0	0	0	0
Stratum moleculare	0	0	0	0	0	0
Hippocampus basal						
CA1						
CA2						
CA3/CA4						
Stratum granulare						
Stratum moleculare						

BSE-Rind 5	VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin
Myelencephalon						
Lemniscus medialis						
N. facialis	0	2	1-2	0	1	0-1
N. hypoglossus						
N. motorius dorsalis n. vagi						
N. olivaris						
N. olivaris superior	1	1-2	0	1	0-1	1-2
N. raphe	0	1-2	1	2	0-1	1-2
N. reticularis gigantocell.	1	1	1	0	1-2	1-2
N. reticularis lateralis						
N. tractus solitarii						
N. tr. spinalis n. trigemini	0	2	1-2	0	1	0-1
N. vestibularis inferior						
N. vestibularis lateralis	2-3	2	2	0	2	2-3
N. vestibularis medialis	0-1	2	1	1	1	2
N. vestibularis superior						
Metencephalon						
Cortex cerebelli	0	0	0-1	0	0-1	0-1
Medulla cerebelli		0-1	0	0	0	
Corpus medullare cerebelli		2	0	0	1	
N. dentatus	0	1	2	1	1	1
N. interpositus	0	0-1	1	1	1	1
N. fastigii	1	1	1	1	0-1	1
Formatio reticularis	2	1	0-1	0-1	1	2
Lemniscus lateralis	1	1	1	1	1	1-2
N. motorius n. trigemini	0	0	0-1	0	1-2	1
N. parapendicularis	0	1	2	1	1	0
Nn. pontis	0	2	1	0-1	0	1
N. tegmentum dorsalis	0	0	2	1	0	0
Mesencephalon						
Colliculus superior						
Corpus geniculatum lat.	1-2	1	0	0	0	0
Corpus geniculatum med.						
Crus pedunculli	0	0-1	0	0	0	0
Lemniscus medialis	0	2	1	1	0	0
N. interpedunkulus	0	0	0	0	1	0
N. n. trochlearis	0	0-1	1	0	0-1	1
N. n. oculomotorii	0	1	1-2	0	0	1
N. ruber	3	1-2	2	2	1-2	2
N. tr. mesenc. n. trigemini	0	0	0-1	0	0-1	1
Substantia grisea centralis	1-2	1-2	2	2	1-2	2
Substantia nigra	0-1	1	1	0	0	1

	VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin
Diencephalon						
Fasciculus mammillothal.						
Nn. habenulares	1	0-1	0	0	0	0-1
Nn. thalami	0-1	0-1	0	0	0	0-1
N. thalamus paravenrik.	0	0	0	0	0	1
Subthalamus						
Telencephalon						
Capsula externa		1	0	0	0	
Capsula interna		0-1	0	0	0	
Corpus callosum		0	0	0	0	
N. caudatus	0	0	0	0	0	0-1
N. septales lateralis						
N. septales medialis	0	0	0	0	0	0
Cortex piriformis	0	0	0	0	0	0
Putamen	0	0	0	0	0	0
Septum pellucidum		2	0	0	0	
Frontalcortex:dorsomedial	0	0	0	0	0	0
Frontalcortex:lateral	0	0	0	0	0	0
Frontalcortex:basal	0	0	0	0	0	0
Occipitalcortex:dorsomed.	0	0	0	0	0	0-1
Occipitalcortex:lateral	0	1	0	0	0	0-1
Zentralcortex:dorsomedial	0	1	0	0	0	0-1
Zentralcortex:lateral	0	0-1	0	0	0	0-1
Hippocampus dorsal						
CA1	0	0	0	0	0	0
CA2	0	0	0	0	0	0
CA3/CA4	0	0	0	0	0	0
Stratum granulare	0	0	0	0	0	0
Stratum moleculare		0	0	0	0	
Hippocampus basal						
CA1	0	0	0	0	0	0
CA2	0	0	1	0	0	0
CA3/CA4	0	0	1	0	0	0
Stratum granulare	0	0	0	0	0	0
Stratum moleculare		0	0	0	0	

BSE-Rind 6	VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin
Myelencephalon						
Lemniscus medialis						
N. facialis	1-2	1	1	1	0	2
N. hypoglossus	0	1	1	0	0	1
N. motorius dorsalis n. vagi	0	1	1	0	0	2
N. olivaris						
N. olivaris superior	0	1	1	1	0	1
N. raphe						
N. reticularis gigantocell.	0	1	1	0	0	2
N. reticularis lateralis						
N. tractus solitarii	1	0	1	0	0	1
N. tr. spinalis n. trigemini	1	2	2	1	0	2
N. vestibularis inferior						
N. vestibularis lateralis	1	2	1	0	1	2
N. vestibularis medialis	1	1	1	0	1	2
N. vestibularis superior						
Metencephalon						
Cortex cerebelli	0	0	0	0	0	0
Medulla cerebelli		1	0	1	0	
Corpus medullare cerebelli		1	0	0	0	
N. dentatus						
N. fastigii	1	3	1	1	0	1
Formatio reticularis						
Lemniscus lateralis						
N. motorius n. trigemini	1	1	1	1	0	1
N. parapendicularis						
Nn. pontis	0	1	0	0	0	1
N. tegmentum dorsalis	0	1	0	0	0	1
Mesencephalon						
Colliculus inferior	0	2	2	2	0	0
Colliculus superior	2-3	2	2	1	0	1
Corpus geniculatum lat.	0	0	0	0	0	0
Corpus geniculatum med.						
Crus pedunculli						
Lemniscus medialis						
N. interpedunculus	1	1	1	0	0	0
N. n. trochlearis						
N. n. oculomotorii	1	1	1	1	0	1
N. ruber	3	1	1	0	0	2
N. tr. mesenc. n. trigemini	0	0	0	0	0	0
Substantia grisea centralis	2	2	2-3	2-3	1	0
Substantia nigra	1	1-2	1	1	1	0

	VDNz	SAN	Astrogliose	Mikrogliose	Spheroide	Lipofuszin
Diencephalon						
Fasciculus mammillothal.						
Nn. habenulares						
Nn. thalami						
N. thalamus paraventrik.						
Subthalamus						
Telencephalon						
Capsula externa		0	0	0	0	
Capsula interna		0	0	0	0	
Corpus callosum		0	0	0	0	
N. caudatus	0	0	0	0	0	0
N. septales lateralis	0	0	0	0	0	0
N. septales medialis	0	0	0	0	0	0
Cortex piriformis	0	0	0	0	0	0
Putamen	0	0	0	0	0	0
Septum pellucidum	0	0	0	0	0	0
Frontalcortex:dorsomedial	0	2	0	0	0	0
Frontalcortex:lateral	0	0	0	0	0	0
Frontalcortex:basal	0	0	0	0	0	0
Occipitalcortex:dorsomed.	0	0	0	0	0	0
Occipitalcortex:lateral	0	0	0	0	0	0
Zentralcortex:dorsomedial	0	1	0	0	0	0
Zentralcortex:lateral	0	0	0	0	0	0
Hippocampus dorsal						
CA1	0	0	0	0	0	0
CA2						
CA3/CA4						
Stratum granulare						
Stratum moleklare						
Hippocampus basal						
CA1	0	0	0	0	0	0
CA2	0	1		0	0	0
CA3/CA4	1	1	0	0	0	0
Stratum granulare	0	0	0	0	0	0
Stratum moleklare	0	0	0	0	0	0

Tabelle 4-1: Histologische Ergebnisse der BSE-positiven Rinder

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der histologischen Ergebnissen (BSE-positive Rinder)

Myelencephalon	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.
	Nervenzellvakuolen					SAN					Astrogliose					Mikroglie					Axonschellung					Lipofuszin				
N. mot. dors. n. vagi	1		2		1,3		1	1	1	2,0		2	1	1	1,8	1	1	1		1,0	1	1		1	1,3		3			1,0
N. tractus solitarii	1	2	1		1,0	1		2	1	1,8		1	3		1,8	1	2	1		1,0	2	1	1		0,8		4			1,0
N. tr. spin. n. trigemini	1	3	2		1,1			6		2,0		6			2,0	1	2	3		2,3	3	2	1		0,6	1	3	2		1,2
N. reticul. gigantocell.	1	2	1	1	1,4		2	3		1,6		5			1,0	1	4			0,8	1	3	1		1,0			5		2,0
N. vestibularis medialis	2	3	1		0,8	1	3	2		1,1	1	3	2		1,1	1	4	1		1,0	2	3			0,6		1	5		1,8
N. vestibularis lateralis		2	2	1	1,8		1	4		1,8		2	3		1,6	2	3			0,6	1	3	1		0,8		1	2	2	2,2
N. hypoglossus	3				0		3			1,0	1	2			0,6	1	2			0,6	2	1	1		0,5	1	1	1		1,0
Nucleus facialis	3	1	1		0,6		4	1		1,2		4	1		1,2	2	1	2		1,0	4	1			0,2		3	2		1,4
N. olivaris superior	2	2			0,5		2	2		1,5	2	2			0,5	1	2		1	1,3	3	1			0,3	1	2	1		1,0
Lemniscus medialis	2	1	2		1,0	1	2	2		1,2		2	2	1	1,8	1	1	3		1,4	4	1			0,2	2	3			0,6

59

Metencephalon	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.
	Nervenzellvakuolen					SAN					Astrogliose					Mikroglie					Axonschellung					Lipofuszin				
Purkinje Zellen	6				0	6				0	6				0	5		1		0,3	4	2			0,3	5	1			0,2
Cortex cerebelli (alba)						4	2			0,3	6				0	4	1	1		0,5	6				0					
N. dentatus	1	1	1		1,0		2	1		1,3		1	2		1,6	2	1			0,3	2	1			0,3	2	1			0,3
N. fastigii		3	1		1,3	1	1	1	1	1,5	1	3			0,8		4			1,0	1	2	1		1,0		4			1,0
Nn. pontis	3	1			0,3	2	2			0,5	4				0	2	1	1		0,8	4				0	1	3			0,8
N. tegmentum dorsalis	5				0	3	1			0,3	2	2	1		1,0	2	1		2	1,4	5				0	4	1			0,2
N. mot. n. trigemini	1	3	1		1,0	1	3	1		1,0	1	3	1	1	1,3	2	2	1		0,8	2	2	1		0,8		4	1		1,2
N. parapendicularis	1	2			0,7		2	1		1,3	1	1	1		1,0		2	1		1,3	2	1			0,3	2	1			0,3
Formatio reticularis		1	1		1,5		3			1,0		3			1,0		3			1,0	1	2			0,7		1	2		1,7
Lemniscus lateralis	1		1		1,0			1		1,0		1	1		1,5		1	1		1,5	1	1			0,5	1		1		1,0

SAN:spongiforme Auflockerung des Neuropils

Mesencephalon

	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.					
	Nervenzellvakuolen					SAN					Astrogliose					Mikrogliose					Axonschwellung					Lipofuszin				
N. ruber			1	4	2,8		3	2		1,4	2	1	2		2,0	1	3	1		1,0	2	1	2		1,0			3	2	2,4
Sub. grisea centralis	1		5		1,6	1		5		1,7	1		2	3	2,2		3	2	3	2,0	3	3			0,5	3	3			0,5
Substantia nigra		3	1		1,3		1	2	1	2,0	3	1			1,3	1	1	1		1,0	3	1	1		0,6	1	3			0,8
N. n.oculomotorii	1	4	1		1,0		3	3		1,5	4	2			1,3	1	1	2		1,3	4	1	1		0,5	1	3	2		1,2
Corpus genicul.lat.	4		1		0,2	3	2			0,4	4	1			0,2	4	1			0,2	4		1		0,4	3	2			0,4
N. trochlearis	2	1			0,3		2	1		1,3	2		1		1,7	3				0	2		1		0,7	2	1			0,3
N. tr. mes. n. trigemini	5		1		0,2	3	1	1		0,6	1	4	1		1,0	2	2	1		0,8	4	1	1		0,5	1	4	1		1,0
Colliculus superior	2	1		1	1,0	2	2	1		0,8	2	3			1,6	4	1			0,2	4	1			0,2	4	1			0,2
Colliculus inferior	2	1	1		0,8	1	2	1		1,0	1	1	1	1	1,5	1	1	1		1,0	4				0	4				0
N. interpedunculus	2	2	1		0,8	2	3			0,6	2	3			0,6	3	2			0,4	2	3			0,6	5				0

Diencephalon

	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.					
	Nervenzellvakuolen					SAN					Astrogliose					Mikrogliose					Axonschwellig					Lipofuszin				
Nn. habenulares		2	2	1	1,8	1	3	1		1,0	2	1	2		1,0	4		1		0,5	4	1			0,2	2	3			0,6
Nn. thalami	2	3			0,6	1	2	2		1,2	2	2	1		0,8	4		1		0,5	5				0	4	1			0,2
Subthalamus			2		2,0		1	1		1,5	1	1			0,5	1	1			0,5	2		1		0,6		2			1,0
N. thalam. Paraventr.	2	3			0,6	3	1	1		0,6	3		1	1	1,0	2	2	1		0,8	5				0	4	1			0,2

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der histologischen Ergebnissen (BSE-positive Rinder)

Telencephalon	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.	0	1	2	3	Av.					
	Nervenzellvakuolen					SAN					Astrogliose					Mikrogliose					Axonschwellung					Lipofuszin									
Cortex frontalis (grisea)																																			
dorsomedial	4	2			0,3	4	1	1		0,8	4	1			0,2	5				0	6				0	5	1			0,2					
lateral	4	2			0,3	5	1			0,2	4	1			0,2	5				0	6				0	5	1			0,2					
basal	5		1		0,3	4	1		1	0,7	5				0	5				0	6				0	5	1			0,2					
Cortex centralis (grisea)																																			
dorsomedial	5	1			0,2	3	2	1		0,7	5	1			0,2	6				0	6				0	4	2			0,3					
lateral	6				0	2	2	1	1	1,2	5	1			0,2	6				0	6				0	4	2			0,3					
Cortex occipitalis (grisea)																																			
dorsomedial	3		1		0,4	2	2			0,5	3				0	3				0	4				0	3	1			0,3					
lateral	3	1			0,3	1	3			0,8	3				0	3				0	3				0	3	1			0,3					
Hippocampus																																			
Stratum granulare (Hc)	6				0	6				0	6				0	6				0	6				0	6				0					
St. moleculare (Hc)						3		2	1	1,2	4	1	1		0,5	6				0	6				0										
CA 1	6				0	4	2			0,3	6				0	5	1			0,2	6				0	6				0					
CA 2	6				0	2	3	1		0,8	4	2			0,3	5	1			0,2	6				0	6				0					
CA 3/4	5	1			0,2	1	1	2	2	1,8	4	1	1		0,5	4	2			0,3	6				0	6				0					
N. caudatus	5					5				0	3	1			0,3	4				0	5				0	5				0					
Putamen	3	2			0,4	2	2			0,5	3		1		0,5	4				0	4	1			0,2	5				0					
Capsula externa						2	2	1		0,8	4	1			0,2	5				0	5				0										
Capsula interna						3	1	1		0,5	4	1			0,2	5				0	5				0										
Nh. septi	5	1			0,2	4	2			0,3	3		2		0,4	4	1			0,2	5				0	5		1		0,3					
Septum pellucidum						3		1		0,5	4				0	4				0	4				0										
Piriform cortex	3	3			0,5	4			1	0,6	4	1			0,2	5				0	5		1		0,4	5	1			0,2					

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der histologischen Ergebnissen (BSE-positive Rinder)

4.1.2 Nervenzelldegenerationen

Vakuoläre Nervenzelldegenerationen wurden bei allen BSE-positiven Tieren beobachtet. Diverse Hirnareale und Kerngebiete der Hirnabschnitte Myelencephalon, Metencephalon, Mesencephalon und Diencephalon waren regelmäßig betroffen. Die optisch leer erscheinenden Vakuolen waren scharf umrandet und befanden sich meist im Perikaryon der Nervenzellen (Abb. 3), jedoch gelegentlich auch in den Axonen und Dendriten (Abb. 4). Bei manchen Nervenzellen wurden multiple Vakuolen festgestellt, die beinahe das gesamte Perikaryon räumlich in Anspruch nahmen (Abb. 4). Abgesehen von den Vakuolen wurden bei den betroffenen Nervenzellen keine Anzeichen auf Degenerationen beobachtet. Die Größe der Vakuolen variierte, was in der vorliegenden Arbeit zu der Einführung der Begriffe großvakuoläre (Abb. 3) und kleinvakuoläre (Abb. 5) Degeneration führte.

Im Myelencephalon waren neuronale Vakuolen häufig zu sehen (Tabelle 4-2). Insbesondere die Kerngebiete N. vestibularis lateralis und N. reticularis gigantocellularis zeigten verstärkt Veränderungen. Im Gegensatz dazu waren in den Kerngebieten N. hypoglossus, N. facialis und N. olivaris superior wenige neuronale Vakuolen festzustellen. Im Metencephalon waren die neuronalen Vakuolen auf die Kerngebiete des Cerebellums (N. fastigii, N. dentatus) und auf die basalen Hirnarealen konzentriert (N. motorius n. trigemini, Formatio reticularis, Lemniscus lateralis). In dem Cortex cerebelli wurden keine neuronalen Vakuolen festgestellt. Im N. ruber des Mesencephalons wurde bei allen Tieren hochgradige vakuoläre Nervenzelldegenerationen festgestellt. In den Bereichen Substantia grisea centralis und Substantia nigra wurden gering- bis mittelgradige vakuoläre Veränderungen beobachtet. Die restlichen Kerngebiete (Colliculus inferior, Colliculus superior, N. oculomotorii, Corpus geniculatum laterale, N. tractus mesencephalici n. trigemini) zeigten keine bis nur geringgradige neuronale Vakuolen. Im Subthalamus und im N. habenulares des Diencephalons wurden mittelgradige, in den Nn. thalami dagegen nur geringgradige vakuoläre Veränderungen der Nervenzellen beobachtet. Im Telencephalon konnten kaum

neuronalen Vakuolen beobachtet werden. Bei 2 Tieren wurden im dorsalen Bereich des frontalen Cortex, und bei 3 Tieren im Lobus piriformis vereinzelt vakuoläre Nervenzelldegenerationen beobachtet.

Bei 2 Tieren wurden vereinzelt „Dark Neurons“ in dem Stratum granulare des Hippocampus festgestellt (Abb. 6). Diese Nervenzellen zeigten ein geschrumpftes, basophiles Perikaryon mit einem kondensierten Zellkern.

4.1.3 Spongiforme Auflockerung des Neuropils

Bei allen 6 BSE-positiven Tieren wurde eine spongiforme Auflockerung des Neuropils, auch Vakuolisierung des Neuropils genannt, festgestellt. Morphologisch zeigten sich diese Vakuolen als scharf umrandete, optisch leer erscheinende „Löcher“ im Neuropil (Abb. 7). Gewöhnlich waren multiple Vakuolen an einer Lokalisation zu beobachten, so dass das Neuropil an dieser Stelle einen durchlöcherten Eindruck machte. Die stärksten Veränderungen wurden im Hirnstamm beobachtet.

Das Myelencephalon war in seiner gesamten Fläche beinahe gleichmäßig von spongiformen Auflockerungen des Neuropils betroffen. Durchschnittlich zeigten die Kerngebiete ein gering- bis mittelgradiges Läsionsprofil. In dem Cortex cerebelli des Metencephalons wurde weder in der Substantia grisea noch in der Substantia alba Vakuolisierungen beobachtet, die Kerngebiete des Cerebellums (N. dentatus, N. fastigii) jedoch zeigten geringe bis mittelgradige Veränderungen. In den basalen Kerngebieten des Metencephalons wurden im Durchschnitt geringgradige Läsionen festgestellt. Die Kerngebiete des Mesencephalons mit einem stärkeren Läsionsprofil (mittelgradig) waren N. ruber, Substantia grisea centralis, Substantia nigra, N. n. oculomotorii und N. trochlearis. Im Subthalamus des Diencephalons wurden gering- bis mittelgradige Veränderungen beobachtet. Nn. habenulares und Nn. thalami hingegen zeigten nur geringere Zahlen von Vakuolen im Neuropil. Im Telencephalon konnte im allgemeinen nur vereinzelt spongiforme Auflockerungen des Neuropils festgestellt werden. Auffällig jedoch war die Vakuolisierung des Neuropils in 5 von 6 Tieren in der Pyramidenzell-

schicht des Hippocampus. Insbesondere war das Neuropil im Bereich der CA3- und CA4-Zellen betroffen (Abb. 8). Die Vakuolen waren sehr klein und erst bei einer 200-fachen Vergrößerung in der Lichtmikroskopie deutlich sichtbar.

4.1.4 Astrogliose

Astrogliose wurde bei allen 6 BSE-positiven Tieren beobachtet. Abgesehen von einer Hyperplasie der Astroglia konnte histologisch nur vereinzelt Veränderung der Zellen im Sinne einer Hypertrophie festgestellt werden (Abb. 9). Eine deutliche Vermehrung der Astroglia mit mittelgradiger Ausprägung gab es hauptsächlich im Myelencephalon, Metencephalon und Mesencephalon.

Im Myelencephalon zeigten folgende Gebiete eine mittelgradige Astrogliose: N. motorius dorsalis n. vagi, N. tractus sditarii, N. tractus spinalis n. trigemini, N. vestibularis lateralis und Lemniscus medialis. Im Cerebellum des Metencephalons war lediglich im N. dentatus eine mittelgradige Astrogliose festzustellen. In den N. ruber, Substantia grisea centralis, N. trochlearis und Colliculus superior des Mesencephalons trat eine mittelgradige Astrogliose auf. Im Diencephalon und im Telencephalon war die Astrogliose entweder nicht oder nur geringgradig ausgeprägt.

Aus den histologischen Untersuchungen war der Eindruck entstanden, dass eine Korrelation zwischen Schweregrad der Astrogliose und der Vakuolisierung des Neuropils besteht. Aus dem Myelencephalon, Metencephalon, Mesencephalon und Diencephalon der 6 BSE-positiven Tieren wurden insgesamt 162 Datenpunkte ausgewertet.

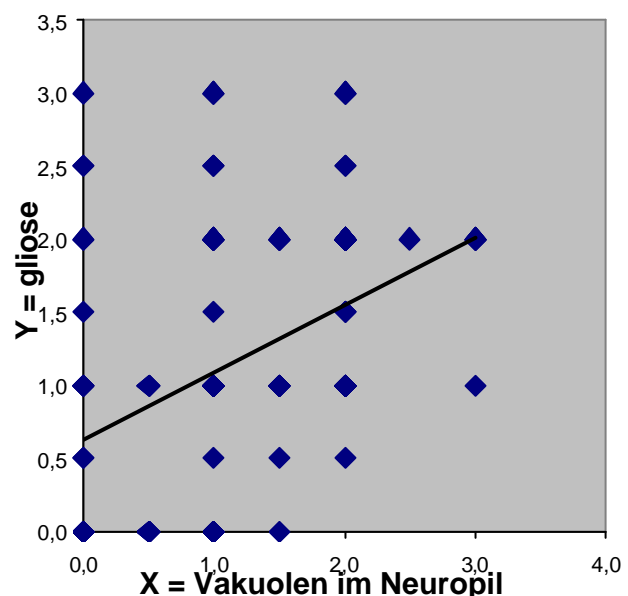


Abbildung 1: Vakuolisierung des Neuropils vs. Gliose

Abbildung 1 zeigt, dass es eine positive Korrelation zwischen der Astrogliose und der Vakuolisierung des Neuropils gibt. Die Korrelationskoeffizient ergab 0,43 (mögliche Werte: 0-1).

4.1.5 Mikrogliose

Eine Mikrogliose, die bei allen Tieren festgestellt wurde (Abb. 9), wurde hauptsächlich im Myel-, Met- und Mesencephalon beobachtet. Abgesehen von einer mittel- bis hochgradigen Mikrogliose im N. tractus spinalis n. trigemini und in der Substantia grisea centralis war das Ausmaß der Veränderung durchschnittlich geringgradig.

4.1.6 Axonale Schwellungen

Morphologisch waren angeschwollene Axone durch einen vermehrten Umfang und ein homogen-glasiges, in der HE-Färbung deutlich eosinophil anfärbendes Zytoplasma gekennzeichnet (Abb. 10).

Es konnten bei allen BSE-positiven Rindern axonale Schwellungen beobachtet werden, meist jedoch in einem geringen Umfang. Lediglich bei einem Rind wurde eine mittel- bis hochgradige Schwellung der Axone im N. motorius dorsalis n. vagi festgestellt.

4.1.7 Lipofuszin

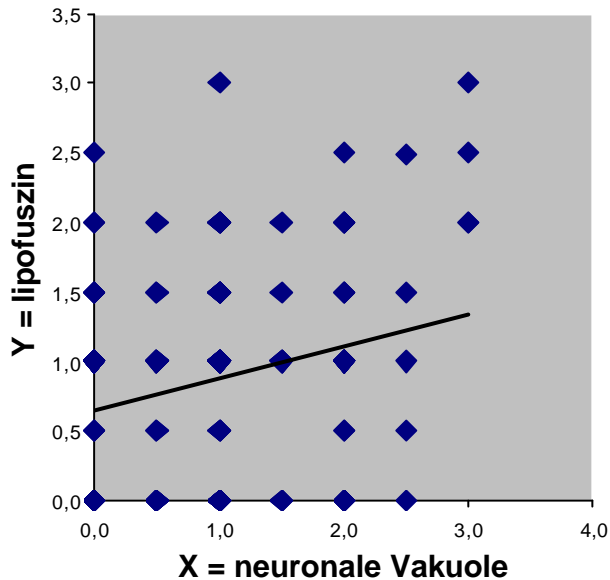


Abbildung 2: Neuronale Vakuole vs. Lipofuszin

In der HE-Färbung erschien Lipofuszin als ein autofluoreszentes, gelb-braunes, leicht granuliertes Pigment und in der PAS-Färbung als stark PAS-positive Granula (Abb. 11). Meist verteilten sich die Lipofuszingranula polar im Perikaryon, bei hochgradiger Akkumulation jedoch nahmen sie das gesamte Perikaryon in Anspruch.

Verglichen mit anderen Bereichen des Gehirns war die Lipofuszin-Akkumulation im Myel- und Mesencephalon stärker ausgeprägt. Eine mittel- bis hochgradige Lipofuszinakkumulation wurde in Kerngebieten der Formatio reticularis einschließlich des N. ruber und N. vestibularis lateralis beobachtet. Da diese Kerngebiete gleichzeitig auch mittel- bis hochgradig von neuronalen Vakuolen betroffen waren, wurde die Korrelation zwischen neuronalen Vakuolen und neuronaler Lipofuszinakkumulation innerhalb verschiedener Kerngebiete graphisch dargestellt (Abbildung 2). 152 Datenpunkte, die aus dem Myelencephalon, Metencephalon, Mesencephalon und Diencephalon der 6 BSE-positiven Tieren entnommen wurden, ergaben eine Korrelationskoeffizient von 0,26. Diese Zahl, die einen Wert von 0 bis 1 annehmen kann, zeigt, dass eine gewisse (jedoch sehr geringe) positive Korrelation zwischen Schweregrad der neuronalen Vakuolen und Lipofuszinakkumulation besteht. Trotzdem ist diese Korrelationskoeffizient zu klein, um eine eindeutige Aussage zu ermöglichen.

In den Tabellen 4-3a und 4-3b wird die Ausprägung der Lipofuszin-Akkumulation zwischen BSE-positiven und BSE-negativen Rindern in 4 ausgewählten Kerngebieten verglichen. Tabelle 4-3a zeigt den läsionsgrad-abhängigen Prozentsatz der betroffenen Tiere und deren Durchschnittsalter. Die BSE-positiven Tiere zeigen im Vergleich zu den BSE-negativen Tieren im allgemeinen höhere Läsionsprofile in den jeweiligen Kerngebieten. Um die alters-abhängige Akkumulation von Lipofuszin zu zeigen wurden 8 BSE-negative Tiere mit einem Durchschnittsalter von 5,1 Jahren (Alter zwischen 4 und 6 Jahren) verglichen mit den 6 BSE-positiven Tieren, deren Durchschnittsalter 5,0 Jahre betrug (Tabelle 4-3b). Aus Tabelle 4b kann deutlich entnommen werden, dass die BSE-positiven Tiere eine für ihr Alter erhöhte Akkumulation von Lipofuszin vorweisen.

	N. fastigii		N. vestibularis lateralis		N. ruber		Nn. habenulares	
	BSE-neg	BSE-pos	BSE-neg	BSE-pos	BSE-neg	BSE-pos	BSE-neg	BSE-pos
0	7/16 (44%)	0/4 (0%)	7/10 (70%)	0/5 (0%)	4/15 (27%)	0/5 (0%)	8/9 (89%)	2/5 (40%)
Durschnittsalter	6	-	6.5	-	4.5	-	7	5
1	5/16 (31%)	4/4 (100%)	2/10 (20%)	1/5 (20%)	6/15 (40%)	0/5 (0%)	1/9 (11%)	3/5 (60%)
Durschnittsalter	5.5	5	6	5	6	-	6	5
2	3/16 (19%)	0/4 (0%)	1/10 (10%)	2/5 (40%)	5/15 (33%)	3/5 (60%)	0/9 (0%)	0/5 (0%)
Durschnittsalter	6.5	-	9	5.3	9	5.2	-	-
3	1/16 (6%)	0/4 (0%)	0/10 (0%)	2/5 (40%)	0/15 (0%)	2/5 (40%)	0/9 (0%)	0/5 (0%)
Durschnittsalter	13	-	-	5	-	5	-	-

Table 4-3a: Läsionsprofil-abhängiger Vergleich von Lipofuszin zwischen BSE-positiven und -negativen Rindern

	N. fastigii		N. vestibularis lateralis		N. ruber		Nn. habenulares	
	BSE-neg	BSE-pos	BSE-neg	BSE-pos	BSE-neg	BSE-pos	BSE-neg	BSE-pos
Läsionsprofil	0.6	1.0	0.2	1.8	0.7	2.0	0.2	0.5

Table 4-3b: Alters-abhängiger Vergleich von Lipofuszin bei BSE-positiven und -negativen Rindern

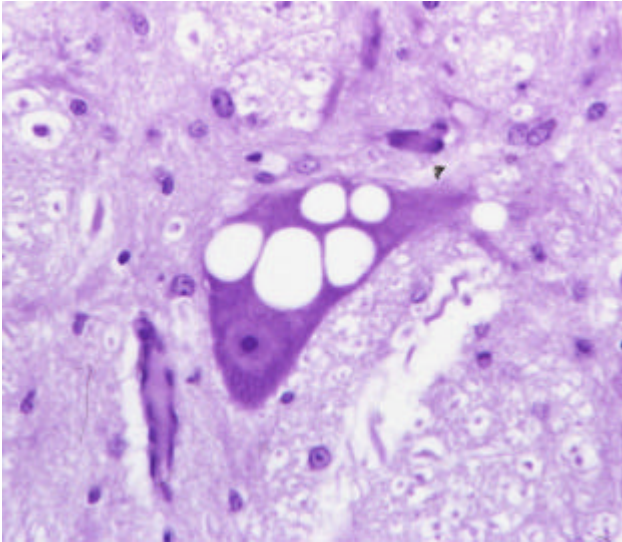


Abbildung 3: Neuronale Vakuolen

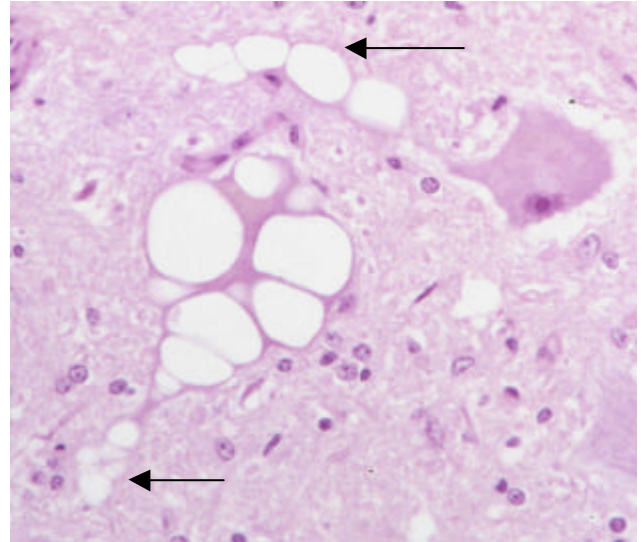


Abbildung 4: Dendritische Vakuolen

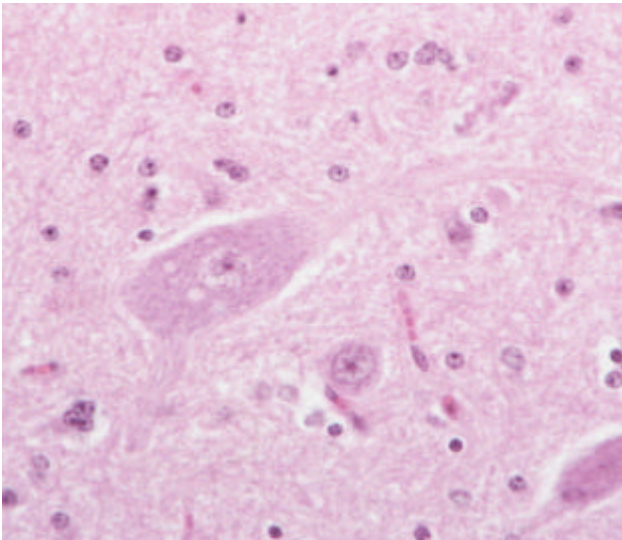


Abbildung 5: Kleinvakuoläre Degeneration

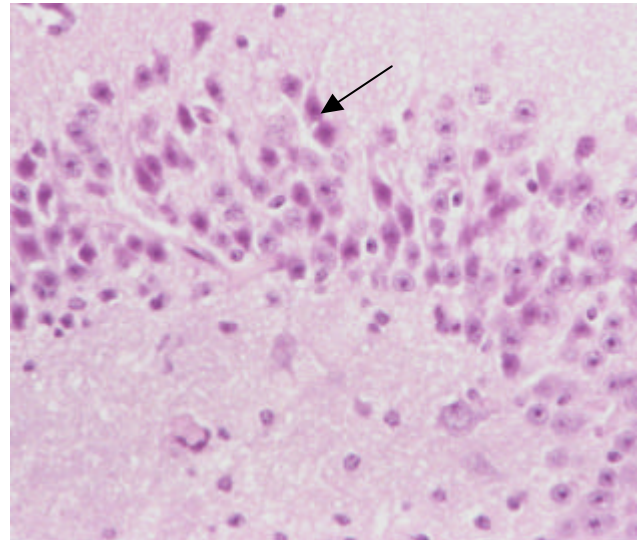


Abbildung 6: Dark Neurons

Abbildung 3: BSE-positives Rind. Vakuoläre Degeneration einer Nervenzelle mit multiplen Vakuolen im Perikaryon, N. ruber. Nissl, x 389

Abbildung 4: BSE-positives Rind, Vakuoläre Degenerationen von Nervenzellen mit multiplen Vakuolen im Perikaryon und in den Neuriten (Pfeile). N. ruber. HE, x 368

Abbildung 5: BSE-positives Rind. Kleinvakuoläre Degeneration einer Nervenzelle. N. motorius dorsalis n. vagi. HE, x 389

Abbildung 6: BSE-positives Rind. Dark Neurons im Stratum granulare des Hippocampus. HE, x 375

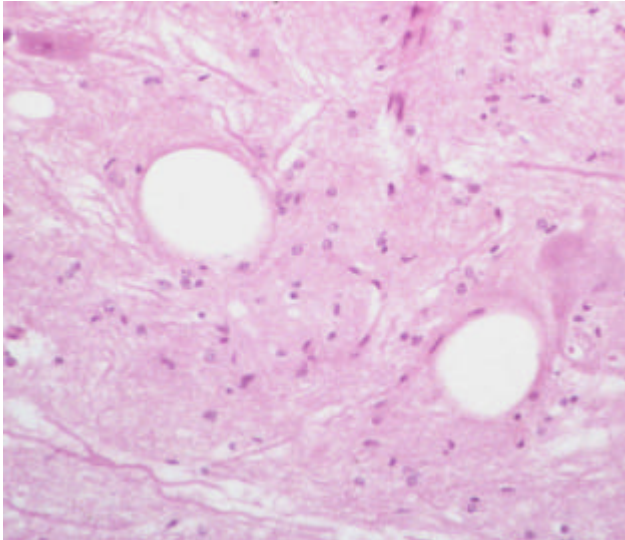


Abbildung 7: Spongiforme Auflockerung des Neuropils

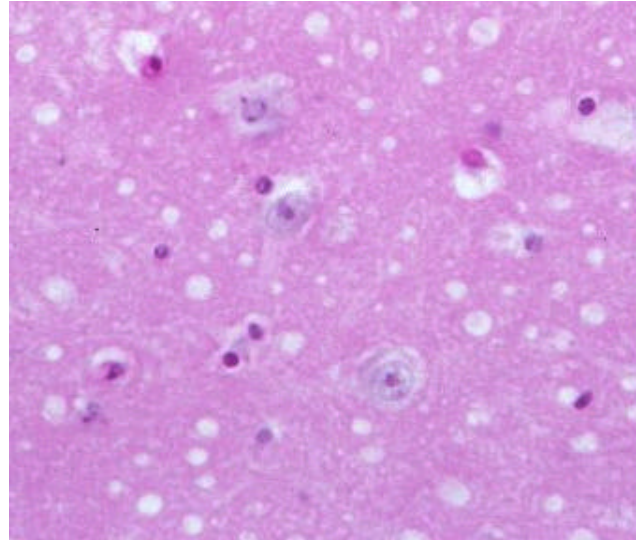


Abbildung 8: Mikrovakuolen im Neuropil des Hippocampus

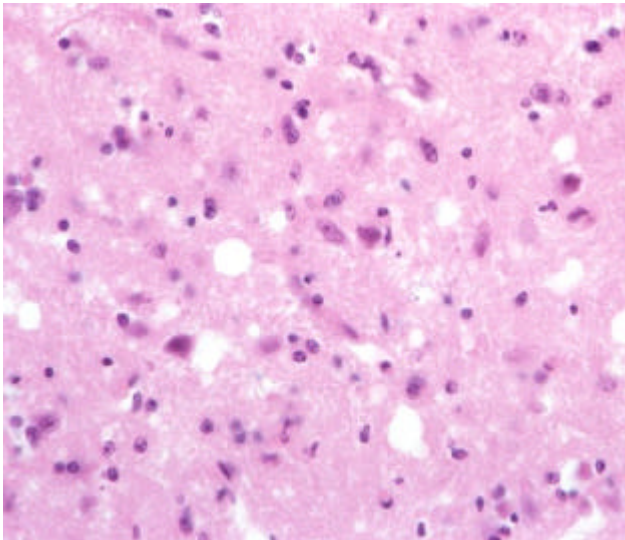


Abbildung 9: Astrogliose und Mikrogliose

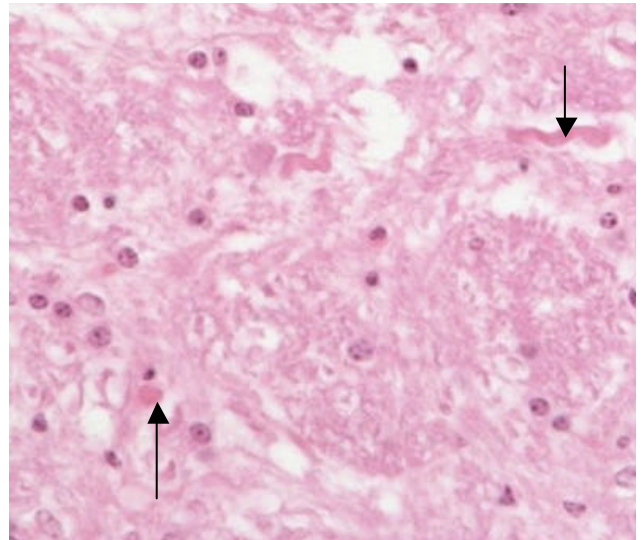


Abbildung 10: Axonale Schwellungen

Abbildung 7: BSE-positives Rind. Spongiforme Auflockerung des Neuropils. N. motorius dorsalis n. vagi (Myelencephalon). HE, x 210

Abbildung 8: BSE-positives Rind. Mikrovakuoläre Veränderungen im Neuropil des Hippocampus im Bereich der CA3-Zellen. PAS, x 389

Abbildung 9: BSE-positives Rind spongiforme Auflockerung des Neuropil, Astrogliose und Mikrogliose. N. motorius dorsalis n. vagi (Myelencephalon). HE, x 329

Abbildung 10: BSE-positives Rind. Axonale Schwellungen. N. motorius dorsalis n. vagi (Myelencephalon). HE, x 389

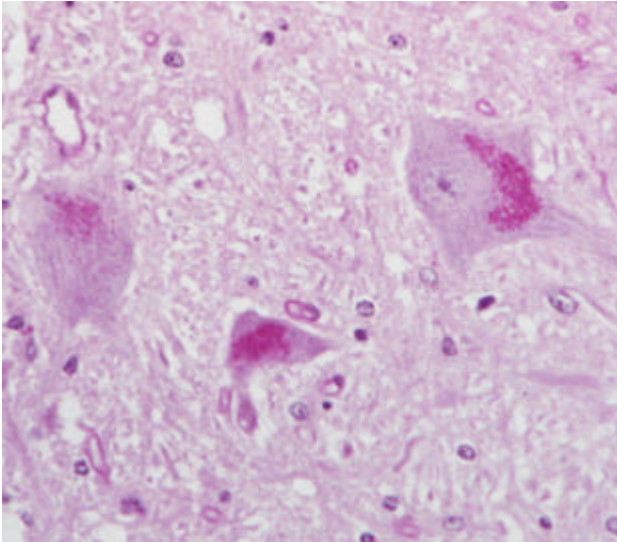


Abbildung 11: Lipofuszin

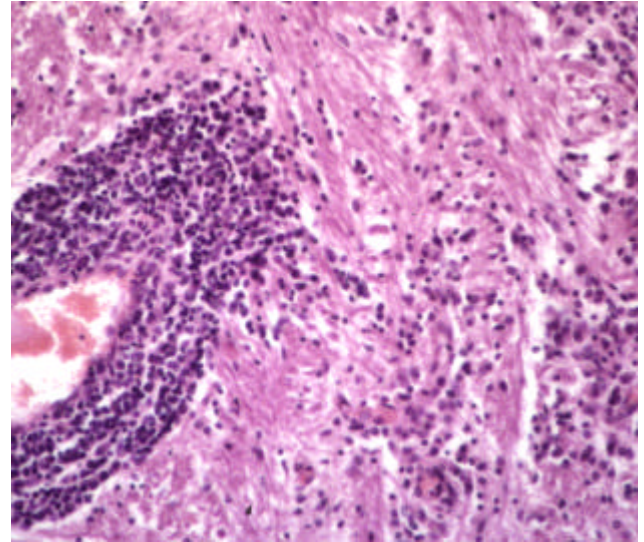


Abbildung 13: Listeriose

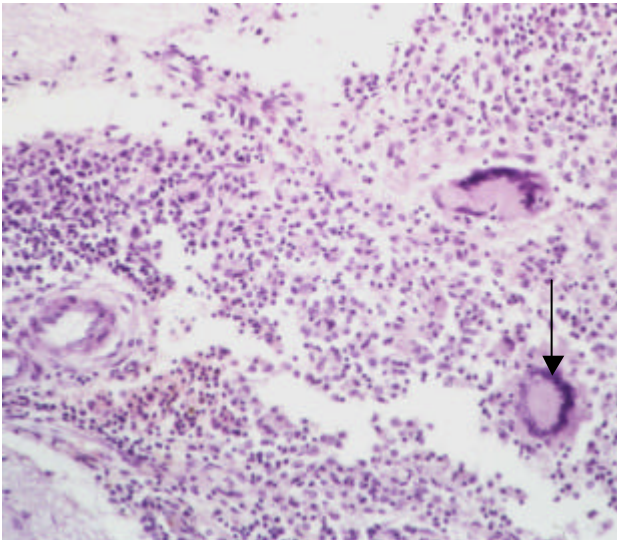


Abbildung 14: Tuberkulose

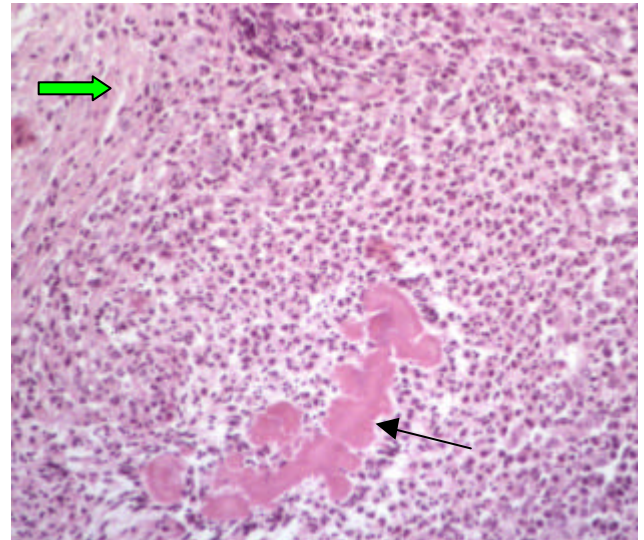


Abbildung 15: Aktinobazillose

Abbildung 11: BSE-positives Rind. Mittelgradige Lipofuszin-Akkumulation. N. ruber (Mesencephalon). PAS, x 398

Abbildung 13: Listeriose. Lymphoplasmazytäre Infiltration eines Gefäßes (links), mit diffuser Infiltration des Neuropils (rechts). Myelencephalon. HE, x 88

Abbildung 14: Tuberkulose. Granulomatöse Meningitis im Kleinhirn: zahlreiche Lymphozyten, Plasmazellen, Epitheloidzellen und Riesenzellen (Pfeil). HE, x 75

Abbildung 15: Aktinobazillose. Erregerdruse (Pfeil) umgeben von PMNs und bindegewebigem Randbereich (grüner Pfeil). Waldeyer'scher Rachering. HE, x 103

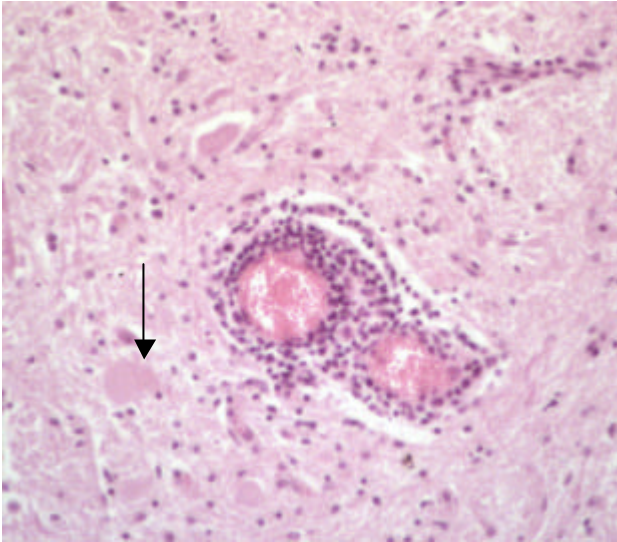


Abbildung 16: BKF

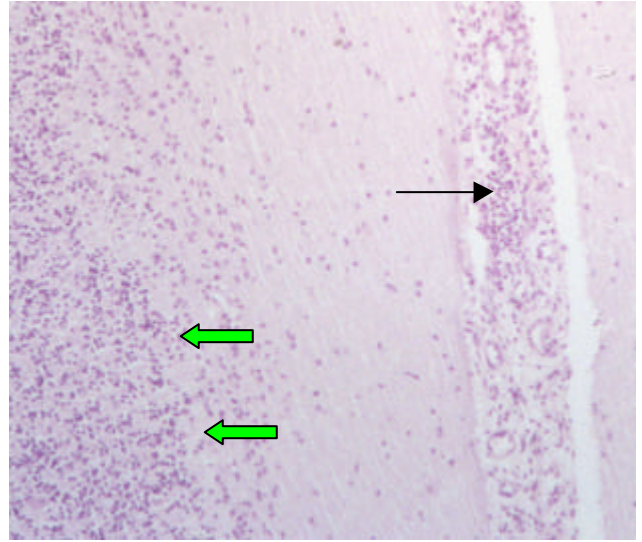


Abbildung 17: ESBE

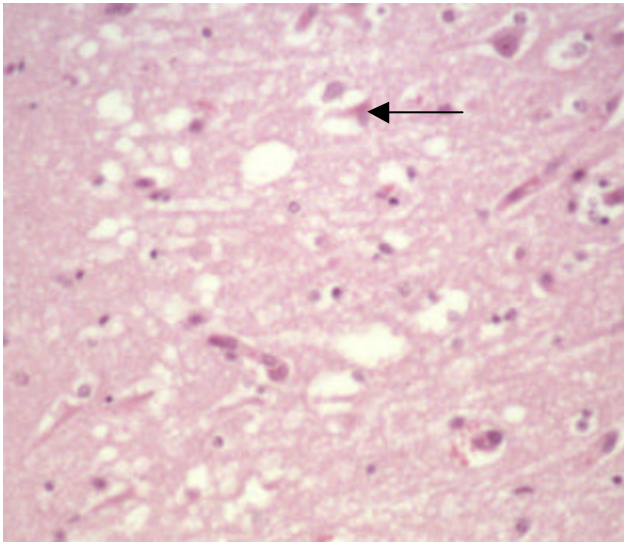


Abbildung 18: CCN

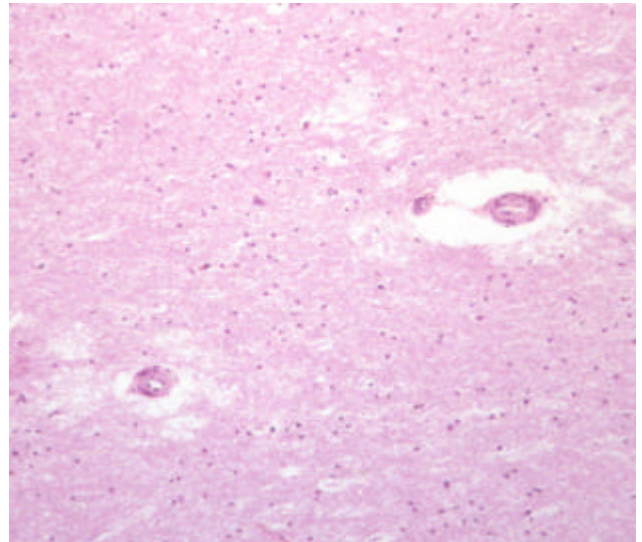


Abbildung 19: Hirnödem

Abbildung 16: BKF. Vaskulitis und Perivaskulitis. Neuropil mit Gliose und eosinophiler Nervenzelldegeneration (Pfeil). Rückenmark. HE, x 210

Abbildung 17: ESBE. Geringgradige nicht-eitrige Meningitis (Pfeil). Unregelmäßige Dichteverteilung und unscharfe Abgrenzung der Körnerzellschicht sowie völliger Verlust von Purkinjezellen (Grüne Pfeile: zu erwartender Position der Purkinjezellen). Cerebellum. Nissl, x 103

Abbildung 18: CCN. Laminärer Status spongiosus mit Nervenzelldegenerationen (Pfeil). Isocortex. HE, x 228

Abbildung 19: Hirnödem. Hochgradiges perivaskuläres Ödem mit auseinandergedrängtem Neuropil. Metencephalon. HE, x 117

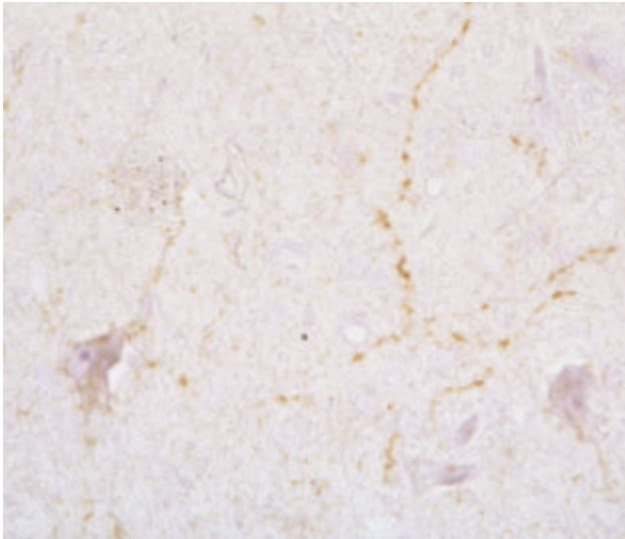


Abbildung 20: PrP^{Sc}-Immunhistochemie

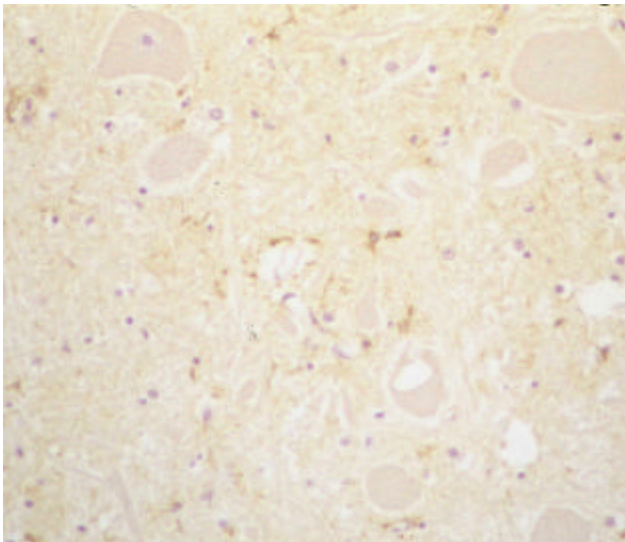


Abbildung 21:GFAP-Immunhistochemie

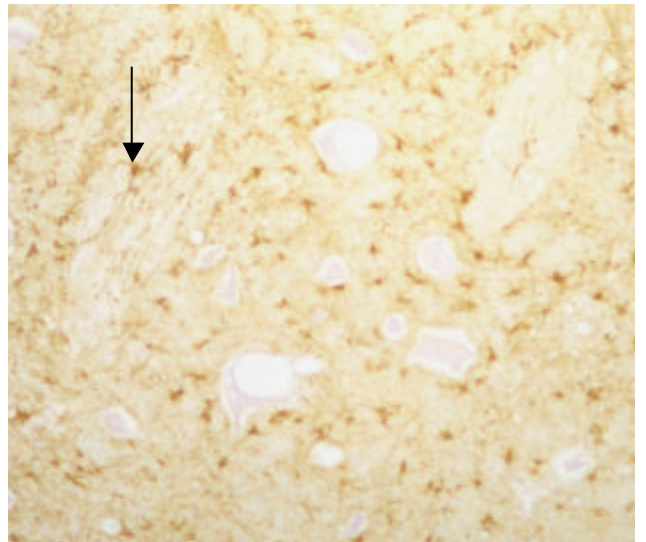


Abbildung 22: GFAP-Immunhistochemie (BSE)

Abbildung 20: PrP^{Sc}-Akkumulation auf der Nervenzellmembran und auf Neuriten.
N. n. oculomotorius (Mesencephalon). X 391

Abbildung 21:GFAP-Immunhistochemie (BSE-negatives Rind mit Listeriose). Gering-
bis mittelgradige Markierung im Zytoplasma der Astrozyten.
N. ruber (Mesencephalon). x 437

Abbildung 22:GFAP-Immunhistochemie (BSE-positives Rind). Deutliche bis
hochgradige Markierung von z. T. angeschwollenen Astrozyten (Pfeil).
N. ruber (Mesencephalon). x 450

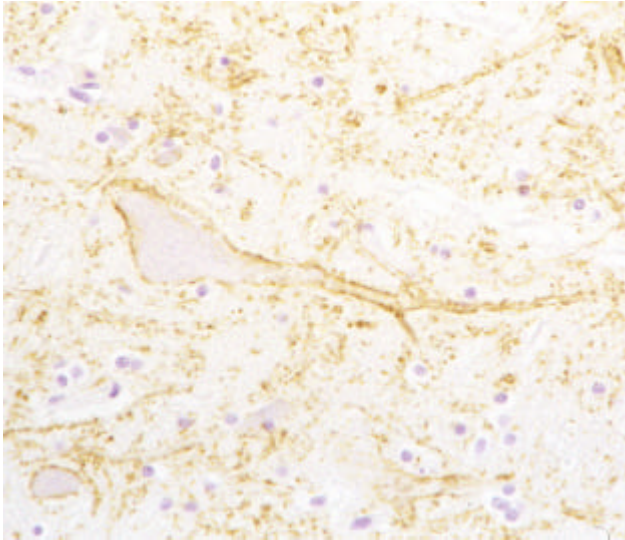


Abbildung 23: Synaptophysin-IHC

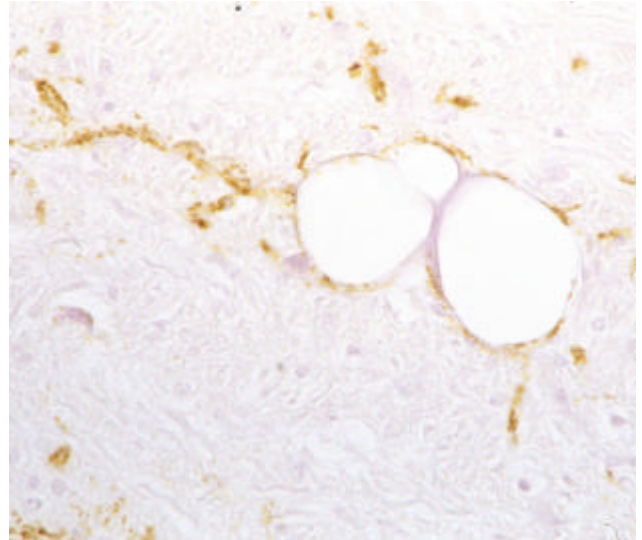


Abbildung 24: Synaptophysin-IHC (BSE)

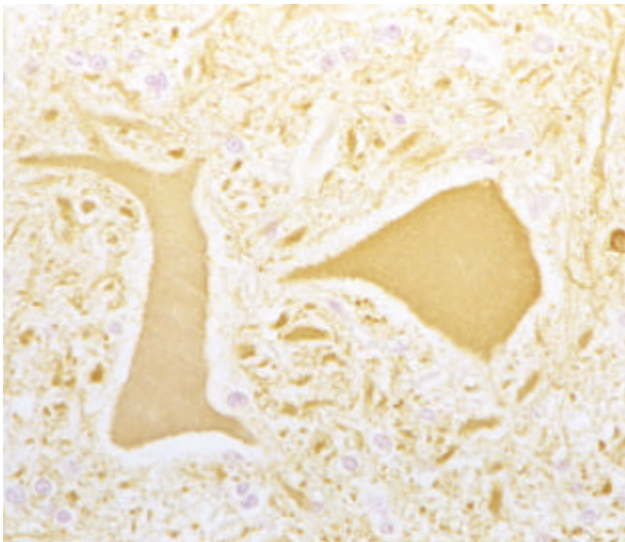


Abbildung 25: NSE-Immunhistochemie

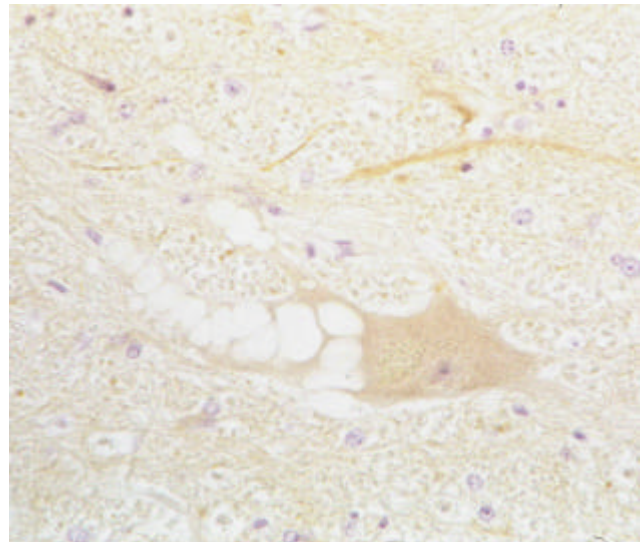


Abbildung 26: NSE-Immunhistochemie (BSE)

Abbildung 23: BSE-negatives Rind. Deutliche Synaptophysin-Immunreaktivität auf der Zellmembran und überwiegenden Teilen der Neuriten. N. ruber (Mesencephalon). x 329

Abbildung 24: BSE-positives Rind. Deutliche Synaptophysin-Immunreaktivität auf der Zellmembran, Neuriten stellenweise ohne Immunreaktion. N. ruber. x478

Abbildung 25: BSE-negatives Rind. Deutliche und homogene Immunreaktivität der Zellsomata und der Neuriten. N. ruber (Mesencephalon). x 513.

Abbildung 26: BSE-positives Rind. Inhomogene Verteilung der NSE-Immunreaktivität: Zellsoma und Neuriten überwiegen schwach markiert, lokale deutliche Markierung von Neuriten. N. ruber (Mesencephalon). x 513.

4.2 Diagnosen und Histologie der BSE-negativen Tiere

4.2.1 Diagnosen der BSE-negativen Rinder

20 der 26 untersuchten Rinder waren BSE-negativ. Die neuropathologischen Diagnosen dieser Tiere sind in Abbildung 12 und Tabelle 4-4 zusammengefasst.

Bei 6 Rindern (23%) wurden bakterielle Infektionen folgender Art festgestellt: 4 Fälle von einer Hirnstammencephalitis, verursacht durch den Erreger *Listeria monocytogenes*, 1 Fall von Tuberkulose mit dem Erreger *Mycobacterium avium*, 1 Fall von Aktinobazillose (*Actinobazillus lignieresii*) in dem Waldeyer'schen Rachenring ohne Beteiligung des ZNS. Bei 3 Rindern (12%) wurden virale Encephaliden festgestellt: 1 Fall von Bösaartigem Katarrhal-fieber (ovines Herpesvirus 2) und 2 Fälle einer Europäischen Sporadischen Bovinen Encephalitis unbekannter Ätiologie. Bei 3 weiteren Tieren (12%) wurden Hirnödeme unbekannter Genese diagnostiziert. Bei einem Rind (4%) konnte die neurologische Symptomatik durch Klauenprobleme und einer Rippenfraktur erklärt werden, und ein weiteres Tier (4%) zeigte die charakteristische histologische Morphologie einer Cerebrocorticalnekrose. In 6 Fällen (23%) war keine eindeutige neuropathologische Diagnose zu stellen, hämatologisch wurde jedoch in 2 dieser Fällen Hypomagnesämie nachgewiesen.

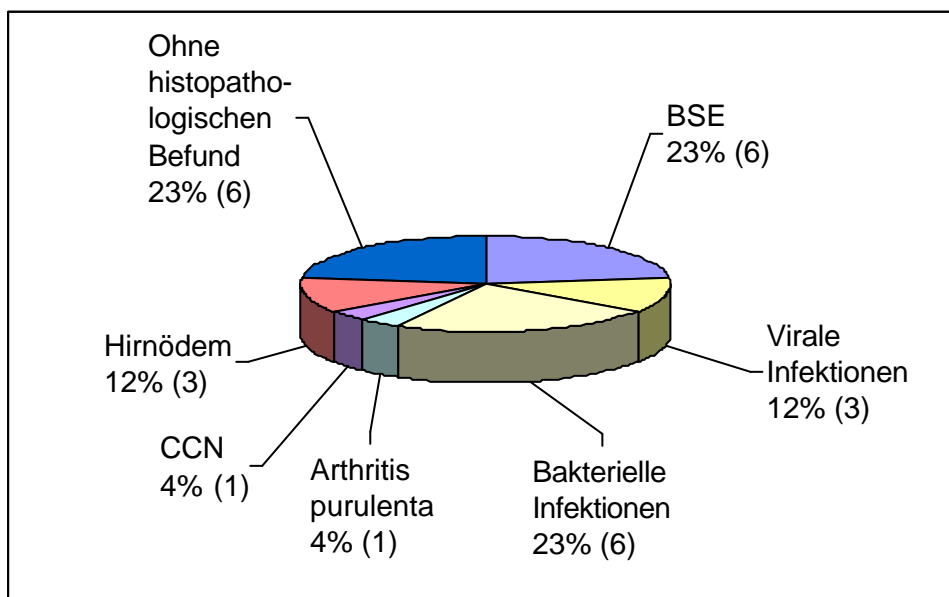


Abbildung 12: Neuropathologische Diagnosen der BSE-negativen Tiere

4.2.2 Infektionskrankheiten

4.2.2.1 Listeriose

In allen 4 Fällen der Listeriose wurde eine Hirnstammencephalitis mit eitrigen Mikroabszessen, auch teilweise in Begleitung einer nicht-eitrigen Meningitis beobachtet (Abb. 13). Die Gefäße zeigten hochgradige perivaskuläre Rundzellenfiltrate, die aus Lymphozyten, Histiocyten und Plasmazellen bestanden. Stellenweise war das Endothel aktiviert. Zahlreiche Kugelblutungen und perivaskuläre Ödeme waren zu sehen. Malazieherde bildeten sich häufig in der Nähe von den Gefäßmanschetten und waren gekennzeichnet durch aufgelockertes Parenchym, zahlreiche eosinophile Nervenzelldegenerationen, axonale Schwellungen, Hyperplasie und Hypertrophie der Astroglia, vereinzelt Gliaknötchen, hochgradige Mikrogliose und (in einem Fall) zahlreiche Gitterzellen. Einzelne Mikroabszesse waren im Myel-, Met- und Mesencephalon verteilt und durch die Anwesenheit zahlreicher neutrophiler Granulozyten zu erkennen. Eine hochgradige nicht-eitrige Meningitis im Mesencephalon und Cerebellum wurde bei einem Tier beobachtet.

Bei 3 Tieren wurden vakuoläre Degenerationen der Nervenzellen bzw. spongiforme Auflockerungen des Neuropils beobachtet (Tier 1: mittelgradige und geringgradige neuronale Vakuolen des N. ruber bzw. des N. dentatus, mikrovakuoläre spongiforme Auflockerung des Neuropils um die CA3-Zellen des Hippocampus. Tier 2: geringgradige neuronale Vakuolen im N. ruber. Tier 3: mikrovakuoläre spongiforme Auflockerungen des Neuropils um die CA3- und CA4-Zellen des Hippocampus.).

4.2.2.2 Tuberkulose

Das histologische Bild des Gehirns war gezeichnet durch eine nicht-eitrige Panencephalitis und eine panencephale granulomatöse Meningitis. Um die Gefäße des Hirnparenchyms bildeten sich lymphohistiozytäre Manschetten. An manchen Gefäßen war eine mittel- bis hochgradige Endothelaktivierung und stellenweise eine Diskontinuität des Endothels mit Blutungen festzustellen. Eine generalisierte hochgradige Mikrogliose und eine geringgradige Astrogliose wurden beobachtet. Die Meningen waren hochgradig mit Zellen

vom granulomatösen Entzündungstyp infiltriert (Lymphozyten, Histiozyten, Epitheloidzellen und Riesenzellen (Abb. 14).

4.2.2.3 Aktinobazillose

Im Waldeyer'schen Rachenring lag eine für die Aktinobazillose charakteristische granulierend-eitrige Entzündung vor: multiple Granulome mit einer zentralen, in der HE-Färbung stark eosinophil anfärbenden Erregerdruse, die von einem breiten Saum polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten umgeben war. In der äußersten Schicht befanden sich Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen, denen ein bindegewebiger Randbereich angeschlossen war (Abb.15).

Im Gehirn wurden nur geringe histologische Veränderungen beobachtet: vereinzelt Gefäße mit Aktivierung des Endothels und mit geringgradigen lymphozytären perivaskulären Infiltraten, vereinzelt Kugelblutungen in der Substantia grisea centralis auf Höhe der Vier-Hügel-Platte und eine Mikrogliose im Corpus medullare des Cerebellums.

Die klinische Symptomatik war durch die tonsilläre Aktinobazillose zu erklären.

4.2.2.4 Bösartiges Katarrhalfieber

Im ZNS war histologisch eine nicht-eitrige Polioencephalomyelitis mit einer nicht-eitrigen Meningitis zu sehen. Die Gefäße der Substantia grisea zeigten mittel- bis hochgradige lymphoplasmazelluläre, perivaskuläre Gefäßinfiltrationen, stellenweise mit vaskulonekrotischen Komponenten (Abb. 16). In der Umgebung von Gefäßinfiltraten waren eine Astro- und Mikrogliose sowie multiple geringgradige Blutungen zu beobachten. In den Meningen des Cerebellums gab es eine geringgradige lymphoplasmazytäre Meningitis. Die Entzündung war weiterhin im ganzen Rückenmark ausgebreitet und stärker ausgeprägt als im Gehirn. In der Substantia grisea des Rückenmarks wurden neben lymphoplasmazellulären perivaskulären Gefäßinfiltraten und Gefäßentzündungen auch Malazieherde mit eosinophilen Nervenzelldegenerationen, axonalen Schwellungen, Gitterzellen und Blutungen beobachtet.

4.2.2.5 Europäische Sporadische Bovine Meningoencephalitis

Bei zwei Rindern wurde die neuropathologische Diagnose ESBE gestellt. Bei einem Tier wurde eine nicht-eitrige Panecephalitis mit starken Blutungen beobachtet: auf das ganze Gehirn diffus verteilte geringgradige lymphozytäre, perivaskuläre Gefäßinfiltrate ohne Aktivierung des Endothels und hochgradige Kugelblutungen waren zu sehen. Die Astroglia und Mikroglia waren nur geringgradig aktiviert. Bei diesem Tier wurden zusätzlich mittelgradige neuronale Vakuolisierungen des N. ruber und mikrovakuoläre spongiforme Auflockerungen des Neuropils um die CA4-Zellen des Hippocampus festgestellt.

Das zweite Tier zeigte eine nicht-eitrige Meningoencephalitis mit besonderer Beteiligung des Cerebellums. Diffus im gesamten Gehirn (auch im Cortex cerebri und im Hippocampus) verteilte mittelgradige lymphohistiozytäre, perivaskuläre Gefäßinfiltrate, mittelgradige Blutungen im Mesencephalon, vereinzelt eosinophile Nervenzelldegenerationen im Mesencephalon, generalisierte Mikrogliose sowie astrozytäre Hyperplasie und Hypertrophie prägten das histologische Bild. Im Cerebellum wurden eine hochgradige Reduktion der Purkinjezellen und eine unregelmäßige Dichteverteilung der Körnerzellschicht festgestellt (Abb. 17). Im N. ruber, in den Nn. habenulares und im Lobus piriformis wurden vereinzelt neuronale Vakuolen beobachtet.

4.2.3 Nicht-infektiöse Erkrankungen

4.2.3.1 Cerebrocorticalnekrose

Im dorsalen isocorticalen Bereich des Telencephalons wurde eine laminäre CCN beobachtet (Abb. 18). Die Nervenzellen zeigten bizarre, etwas dreieckige Formen, und die Zellkerne war kondensiert. Die Perikarya, um die sich Höfe bildeten, waren geschrumpft. Das umliegende Neuropil zeigte einen hochgradigen Status spongiosus, eine mittelgradige Astrogliose und eine geringgradige Mikrogliose. Das Endothel der Gefäße im Läsionsbereich waren geringgradig aktiviert und es wurden zahlreiche Kugelblutungen festgestellt.

4.2.3.2 Hypomagnesämie

In den beiden Fällen von Hypomagnesämie ergaben die histopathologischen Untersuchungen keine Erklärung für die neurologische Symptomatik, da das Gesamtausmaß der Veränderungen zu gering ausgeprägt war. Auf Basis der Blutuntersuchung jedoch konnte Hypomagnesämie diagnostiziert werden.

Bei einem der beiden Rinder wurden histopathologisch geringgradige lymphozytäre, perivaskuläre Infiltrationen einiger Gefäße in den Meningen des Cerebellums und im lateralen Isocortex des Telencephalons beobachtet, welche mit einer mittelgradigen generalisierten Mikrogliose begleitet waren. Im Corpus medullare des Cerebellums, im Mesencephalon und im Cortex cerebri gab es multifokale gering- bis mittelgradige Blutungen. Im Stratum ganglionare des Cerebellums wurden vereinzelt eosinophile Degenerationen von Purkinjenzellen beobachtet. Im N. ruber und in den Nn. habenulares waren vakuoläre Degenerationen der Nervenzellen festzustellen. Spongiforme Auflockerungen des Neuropils wurden in den Nn. habenulares und im Hippocampus beobachtet.

Bei dem zweiten Rind mit Hypomagnesämie wurde im Myelencephalon fokale, geringgradige lymphozytäre, perivaskuläre Gefäßinfiltrationen mit Endothelaktivierung und Kugelblutungen beobachtet. Die Astroglia und Mikroglia waren dort geringgradig aktiviert. Vakuoläre Nervenzelldegenerationen wurden im N. ruber und in der Formatio reticularis des Metencephalons festgestellt. Im N. ruber waren einzelne Axone geschwollen, und sowohl in der Formatio reticularis als auch im Pedunculus cerebellaris des Myelencephalons war das Neuropil geringgradig vakuolisiert.

4.2.3.3 Hirnödem

Bei 3 Tieren wurde die Diagnose Hirnödem gestellt, wobei die Ursache unklar bleibt. Histologisch wurde bei allen Tieren generalisierte mittel- bis hochgradige perivaskuläre Ödeme und eine Gliose (Astro- und Mikroglia) gering- bis mittelgradiger Ausprägung beobachtet (Abb. 19). Zusätzliche histologische Befunde der einzelnen Tiere: das erste Tier zeigte eine mittelgradige vakuoläre Degeneration im N. ruber. Beim zweiten Tier wurde zusätzlich zu einer gering- bis mittelgradigen Hyperämie der Gefäße in den

Meningen und im Mesencephalon noch einen geringgradigen Hydrocephalus internus, der durch die Abflachung der Ependymzellen im Aquaeductus mesencephali gekennzeichnet war, festgestellt. In den Nn. habenulares gab es eine geringgradige axonale Schwellung. Der Hydrocephalus war schwach ausgeprägt und vermutlich von chronischer Natur, so dass die neurologische Symptomatik dadurch nicht erklärt werden konnte. Beim dritten Tier wurden neben multifokalen, mittelgradigen Blutungen lateral des IV. Ventrikels und ventral des Aquaeductus mesencephali, noch axonale Schwellungen im Corpus medullare des Cerebellums und ventral des IV. Ventrikels beobachtet. In den cervicalen und thoracalen Abschnitten des Rückenmarks war die Substantia grisea ödematös auseinandergedrängt und zeigte multifokale hochgradige Blutungen sowie axonale Schwellungen. Stellenweise war das Neuropil im Myel- und Mesencephalon aufgelockert. Eine Ätiologie toxischen Ursprungs wird vermutet. Vakuoläre Degenerationen der Nervenzellen waren im N. ruber zu sehen.

4.2.3.4 Arthritis purulenta und Traumafolgen

Die pathologische Untersuchung ergab eine Fraktur der 8. Rippe, eine Schwanzspitzennekrose, Klauenverletzungen und eine chronisch-fibrinöse und fibroplastische Pleuritis der Pleura pulmonalis und Pleura costalis. In der neuropathologischen Untersuchung wurde eine geringgradige lymphohistiozytäre perivaskuläre Gefäßinfiltration im Diencephalon (mit einigen pigmenthaltigen Makrophagen) und im Cortex cerebri beobachtet. Im N. reticularis lateralis (Regio gigantocellularis) gab es vereinzelt eosinophile Nervenzelldegenerationen. Mittelgradige Blutungen waren in der Substantia alba und grisea des Isocortex zu sehen. Bei der Abklärung der neurologischen Symptomatik wurden die Verletzungen und deren Folgen als vordergründig betrachtet. Vakuoläre Degenerationen der Nervenzellen gab es im N. ruber, in den Nn. habenulares, im dorsalen Isocortex und im Stratum granulare des Hippocampus. Im N. ruber und im Hippocampus war eine spongiforme Auflockerung des Neuropils zu sehen.

4.2.3.5 Rinder ohne histopathologischen Befund

In 6 Fällen konnte die Ursache der klinischen Symptomatik durch die neuropathologische Untersuchung nicht geklärt werden. Davon wurde in 2 Fällen jedoch nach hämatologischen Untersuchungen eine Hypomagnesämie festgestellt (4.2.3.2). Bei den übrigen 4 Fällen waren entweder keine oder nur sehr geringe histopathologische Veränderungen zu sehen, so dass keine eindeutige Diagnosestellung möglich war. Im folgenden sind die Fälle einzeln beschrieben: Das erste Tier zeigte multifokale geringgradige Kugelblutungen im Myel-, Met- und Mesencephalon, im Cortex cerebri und im Segment T12 des Rückenmarks. Das zweite Tier zeigte abgesehen von bilateralen vakuolären Degenerationen der Nervenzellen im N. ruber keine histopathologischen Veränderungen. Beim dritten Tier wurden mittelgradige Kugelblutungen im Colliculus superior des Mesencephalons und axonale Schwellungen in der Formatio reticularis festgestellt. Eine mittel- bis hochgradige spongiforme Auflockerung des Neuropils wurde im Corpus medullare des Cerebellums, dorsomedial der Lamina tecti sive quadrigemina und im Hippocampus (mikrovakuolär) um die CA-Zellen 1-4 beobachtet. Eine toxische Ursache der Erkrankung wurde vermutet, nicht jedoch bestätigt. Die Nervenzellen der Nn. habenulares waren hochgradig vakuolisiert. Beim vierten Tier wurden vereinzelt mittelgradige lymphozytäre, perivaskuläre Gefäßinfiltrate im Cortex cerebri und im Metencephalon, axonale Schwellungen im N. tractus spinalis n. trigemini, vereinzelt Dark Neurons im Stratum granulare des Hippocampus und eine mittelgradige generalisierte Mikrogliose im Myel-, Met-, und Mesencephalon festgestellt. Im Waldeyer'schen Rachenring gab es eine mittelgradige Tonsillenhyperplasie mit eitriger Tonsillitis. Das histologische Gesamtbild war zu gering ausgeprägt, um eine neuropathologische Diagnose stellen zu können. Die Nervenzellen des N. ruber und der Nn. habenulares waren vakuolisiert.

	Signalment	Kurzdiagnose	neuronale Vakuole	Vakuole d. Neuropils	Axonschwellungen
1	DBV, 5j, weiblich	BSE	Siehe Tabelle 3	Siehe Tabelle 3	Siehe Tabelle 4-1
2	DFV, 6j, weiblich	Hirnödem			Nn. habenulares
3	DBV, 5j, weiblich	BSE	Siehe Tabelle 3	Siehe Tabelle 3	Siehe Tabelle 4-1
4	DBV, 9j, weiblich	Listeriose		Hippocampus	N.vest.lat, Cerebellum
5	Highland, 8,5j, weibl	Hirnödem	N. ruber		
6	DBV, 5j, weiblich	BSE	Siehe Tabelle 3	Siehe Tabelle 3	Siehe Tabelle 4-1
7	DFV, 8j, weiblich	Hypomagnesämie	N. ruber, Nn. habenulares	Nn.habenul., Hippocamp.	Cerebellum
8	DFV, 5j, weiblich	BSE	Siehe Tabelle 3		
9	DBV, 5j, weiblich	Trauma	N.ruber, Nn.haben., etc.	Stammhirn,N. rub, Hippoc.	
10	DFV, 4,5j, weiblich	Ohne Befund	N. ruber, Nn. habenulares		N. tr. spin. n. trigemini
11	DFV, 9,5j, weiblich	ESBE	N. ruber	Fimbria hippocampi	
12	DFV, 3j, weiblich	BKF	N. interpositus		Um Gefäßinfiltrate
13	DFV, 4j, weiblich	Aktinobazillose	N. fastigii	Isocortex, Cerebellum.	N. ruber
14	DBV, 6j, weiblich	Ohne Befund	Nn. habenulares	Hippoc,Mesenc,Metenc	
15	DFV, 4j, weiblich	CCN		Isocortex um NzD, Hippoc	
16	DFV, 13j, weiblich	Hirnödem	N. ruber	Myelenc, Hippoc, Thal,	Metenceph, N. ruber
17	DFV, 3j, weiblich	Listeriose	N.ruber, N. dentatus	Hippocampus	In Malazieherden
18	DBV, 5j, weiblich	BSE	Siehe Tabelle 3	Siehe Tabelle 3	Siehe Tabelle 4-1
19	DFV, 8j, weiblich	Ohne Befund		N. fasigii	N. ruber, N. vest. lat
20	DFV, 6j, weiblich	Ohne Befund	N. ruber.	Isocortex	N. ruber
21	DBV, 5,5j, weiblich	BSE	Siehe Tabelle 3	Siehe Tabelle 3	Siehe Tabelle 4-1
22	DFV, 6,5j, weiblich	Tuberkulose			Um pv.Gefäßinfiltrate
23	DFV, 6,5j, weiblich	ESBE	N. rub., Nn. hab, Lobus pirif.		N. ruber
24	DFV, 5,5j, weiblich	Listeriose	N. ruber	N. ruber	In Malazieherden
25	DFV, 3j, weiblich	Hypomagnesämie	N. ruber, Form. Reticularis	Ped. Cerebell., F. reticul.	N. ruber
26	DFV, 7j, weiblich	Listeriose			

Tabelle 4-4: Vorkommen von Vakuolen und Axonschwellungen bei BSE-negativen Rindern

	BSE positive Tiere: 6 Tiere	BSE negative Tiere: 20 Tiere
1. Neuronale Vakuolen		
N. ruber	5/5 = 100 %	11/16= 68,8
Substantia grisea centralis	6/6 = 100 %	0/19 = 0 %
Nn. habenulares	5/5 = 100 %	5/11=45 %
2. Vakuolisierung des Neuropils		
Myelencephalon	6/6 = 100 %	2/15= 13,3 %
Metencephalon	6/6 = 100 %	3/19 = 15,8 %
Mesencephalon	6/6 = 100 %	3/20 = 15 %
Diencephalon	4/5 = 80 %	1/18 = 5,5 %
Cortex cerebri	6/6 = 100 %	3/20 = 15%
Hippocampus	5/6 = 83,3 %	6/20 = 30 %
3. Axonale Schwellungen		
Myelencephalon	6/6 = 100 %	7/15 = 46,7 %
Metencephalon	5/6 = 83,3 %	8/19=42,1 %
Mesencephalon	5/6 = 83,3 %	11/20 = 55 %
N. ruber	3/5 = 60%	6/16 = 37,5%
Diencephalon	1/5 = 20%	3/17 = 17,6%
Telencephalon	2/6 = 33,3 %	2/20 = 10%
Hippocampus	1/6 = 16,7 %	0/20 = 0 %
4. Astrogliose		
Myelencephalon	6/6 = 100 %	9/15 = 60 %
Metencephalon	6/6 = 100 %	11/19 = 57,9 %
Mesencephalon	6/6 = 100 %	11/20 = 55 %
Diencephalon	4/5 = 80 %	5/18 = 27,8 %
Telencephalon	2/5 = 40 %	3/20 = 15 %
Hippocampus	2/6 = 33,3 %	3/20 = 15 %
5. Mikrogliose		
Myelencephalon	6/6 = 100 %	7/15 = 46,6 %
Metencephalon	6/6 = 100 %	11/19 = 57,9 %
Mesencephalon	6/6 = 100 %	8/20 = 40 %
Diencephalon	3/5 = 60 %	5/18 = 27,8 %
Telencephalon	1/6 = 16,7 %	3/20 = 15 %
Hippocampus	3/6 = 50 %	1/20 = 5 %

Tabelle 4-5: Histologischer Vergleich zwischen BSE-positiven und –negativen Rindern

4.2.3.6 Histologischer Vergleich der BSE-negativen Rinder zu den BSE-positiven Rindern

Tabelle 4-5 zeigt einen histologischen Vergleich der BSE-positiven und -negativen Tiere im Hinblick auf 5 für BSE charakteristische histologische Merkmale: vakuoläre Degenerationen der Nervenzellen (neuronale Vakuolen), Vakuolisierungen des Neuropils, axonale Schwellungen, Astrogliose und Mikrogliose.

1. Vakuoläre Degeneration der Nervenzellen. In 3 ausgesuchten Kerngebieten des Mesencephalons und Diencephalons waren bei allen untersuchten BSE-positiven Tieren neuronale Vakuolen festzustellen. 69% und 45% der BSE-negativen Tiere zeigten neuronale Vakuolen im N. ruber bzw. in den Nn. habenulares. In der Substantia grisea centralis dagegen wurde bei keinem BSE-negativen Rind neuronale Vakuolen festgestellt. Neuronale Vakuolen bei BSE-negativen Tieren wurden zusätzlich im N. fastigii (Rind mit Aktinobazillose), im N. interpositus (BKF), im Stratum granulare des Hippocampus und im dorsalen Isocortex (Klauenverletzung/Rippenfraktur) festgestellt.

2. Vakuolisierung des Neuropils. In allen Abschnitten des Gehirns wurden bei BSE-negativen Tieren Vakuolisierungen des Neuropils beobachtet. Insgesamt war aber das Ausmaß relativ gering, insbesondere im Vergleich zu den BSE-positiven Tieren. Mikrovakuoläre Auflockerungen des Neuropils im Hippocampus wurde bei 83% der BSE-positiven und bei 32% der BSE-negativen Tieren festgestellt.

3. Axonale Schwellungen. Axonale Schwellungen wurden bei den BSE-negativen Tieren in beinahe allen Gehirnabschnitten beobachtet. Im Mesencephalon war der N. ruber besonders häufig betroffen. In 4 von 11 Fällen waren Vakuolen in den Nervenzellen des N. rubers mit axonalen Schwellungen dieses Kerngebietes verbunden.

4. Astrogliose und Mikrogliose: Astrogliose und Mikrogliose wurden bei den BSE-negativen Tieren häufig beobachtet. Im Myel-, Met-, und Mesencephalon war eine Astrogliose und Mikrogliose in durchschnittlich 56% bzw. 46% der Fälle festzustellen.

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 Prionprotein (PrP^{Sc})

Bei den BSE-negativen Tieren wurde kein PrP^{Sc} nachgewiesen. Bei den 6 BSE-positiven Tieren dagegen konnte PrP^{Sc} immunhistochemisch dargestellt werden. PrP^{Sc} war auf den Schnittebenen diffus verteilt, und es wurden keine „Plaques“ gesehen. Auf zellulärer Ebene war PrP^{Sc} überwiegend an Neuronen gebunden (Abb. 20). Dort war PrP^{Sc} vermehrt auf der Zellmembran des Perikaryons zu sehen. Auch auf axonalen und dendritischen Strukturen war PrP^{Sc} zu beobachten. Dieses erzeugte in der lichtmikroskopischen Untersuchung eine perlenkette-ähnliche Erscheinung.

Das Verteilungsmuster von PrP^{Sc} bei den BSE-positiven Tieren wird in der Tabelle 4-6 zusammengefasst. PrP^{Sc} konnte in den Lokalisationen nachgewiesen werden, wo auch vakuoläre Veränderungen der Nervenzellen und des Neuropils histologisch beobachtet wurden. Das Verteilungsmuster von PrP^{Sc} zwischen den einzelnen Tieren war in manchen Bereichen, insbesondere im Colliculus superior, sehr unterschiedlich. Auch innerhalb des Mesencephalons eines Individuums war eine große Variation der PrP^{Sc}-Verteilung zu sehen. Die PrP^{Sc}-Belastung war im N. ruber und im N. n. oculomotorii am höchsten, dagegen im Colliculus inferior, in der Substantia nigra und im N. tractus mesencephalici n. trigemini niedriger.

Es konnte keine Korrelation zwischen Schweregrad der histologischen Läsionen (siehe Tabelle 4-1) und PrP^{Sc}-Akkumulation festgestellt werden. Beispielsweise war bei dem BSE-Tier 5 (Nr. 18) im N.n. oculomotorii eine mittelgradige PrP^{Sc}-Akkumulation zu sehen, die histologischen Läsionen jedoch waren gering ausgeprägt. In der Substantia grisea centralis des gleichen Tieres gab es histologisch mittel- bis hochgradige Veränderungen, PrP^{Sc} dagegen war kaum vorhanden.

4.3.2 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)

In allen untersuchten Tieren konnte GFAP immunhistochemisch dargestellt werden. Astrozyten, die eine positive Immunreaktivität für GFAP zeigten, waren durch eine braune Färbung und eine sternförmige Form erkennbar.

Bei den BSE-positiven Tieren wurden im N. ruber und in der Substantia grisea centralis zahlreiche, dagegen im N. n. oculomotorii und im Colliculus superior nur wenige GFAP-positive Astrozyten nachgewiesen. Die Intensität der GFAP-Immunreaktivität korrelierte mit dem Schweregrad der histologisch festgestellten Astroglieose (Tabelle 4-2 und Tabelle 4-7).

In Tabelle 47 wurden die Durchschnittswerte der GFAP-Immunreaktivität für BSE-positive und -negative Tiere ermittelt. Die BSE-positiven Tiere zeigten eine deutlich höhere GFAP-Immunreaktivität als die BSE-negativen Tiere (Abb. 21 und 22).

4.3.3 Synaptophysin

Synaptophysin konnte bei allen BSE-positiven und -negativen Tieren immunhistochemisch nachgewiesen werden. Bei den Kontrolltieren war Synaptophysin als braun-pigmentierte Körner zu sehen, die an der Zellmembran des Perikaryons und an den axonalen bzw. dendritischen Strukturen der Neuronen haftet (Abb. 23). Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 4-8 zusammengefasst.

Bei den BSE-positiven Tieren war eine geringere Immunreaktivität von Synaptophysin im N. ruber zu erkennen: obwohl bei der Menge des zellmembrangebundenen Synaptophysins keinen Unterschied zu den BSE-negativen Tieren festzustellen war, war im Neuropil kaum Synaptophysin nachweisbar (Abb. 23 und Abb. 24). Beim BSE-Tier 3 wurde zusätzlich eine verminderte Menge an Synaptophysin-Immunreaktivität in der Substantia grisea centralis und im Neuropil der Substantia nigra beobachtet.

Mit Ausnahme von 2 Tieren war bei den BSE-negativen Tieren kaum eine verminderte Nachweisbarkeit von Synaptophysin festzustellen. Im N. ruber eines Tieres mit Hypomagnesämie war Synaptophysin sowohl auf den Nervenzellen als auch im Neuropil nur in geringen Maßen vorhanden. Die Colliculi superiores und inferiores des Tieres mit BKF zeigten ebenfalls eine verminderte Immunreaktivität für Synaptophysin.

4.3.4 Neuron-Specific-Enolase

Bei allen untersuchten BSE-negativen Rindern konnte NSE immunhistochemisch dargestellt werden. Sowohl Somata als auch axonale Strukturen

von beinahe allen Neuronen zeigten eine deutliche Immunreaktivität für NSE. Innerhalb eines Kerngebietes waren die Perikarya der einzelnen Nervenzellen oft unterschiedlich stark angefärbt. NSE reichte bis in die Axone und Dendriten, wodurch diese im Neuropil deutlich hervorgehoben wurden (Abb. 25).

Die Ergebnisse der NSE-Immunhistochemie sind in Tabelle 4-9 zusammengefasst. Unabhängig von der primären Erkrankung wurde bei den BSE-negativen Tieren ein weitgehend homogenes Ergebnis der NSE-Immunreaktivität beobachtet. Rechts in der Tabelle 4-9 wurde der Durchschnittswert für die jeweiligen Kerngebiete ermittelt. Bei den BSE-positiven Tieren ist kein deutlicher Unterschied gegenüber den BSE-negativen Rindern zu erkennen. Allerdings wurde bei manchen BSE-positiven Tieren eine auf einzelne Kerngebiete beschränkte Reduktion von NSE festgestellt: Bei dem BSE-Tier 2 wurde im N. ruber nur sehr geringe Mengen NSE nachgewiesen. Während die axonalen und dendritischen Strukturen im Neuropil stellenweise noch eine deutliche Immunreaktivität für NSE zeigten, waren die meisten Somata nur marginal NSE-positiv (Abbildung 26). Im N. ruber zeigte dieses Tier histologisch neben vakuolären Degenerationen der Nervenzellen eine mittel- bis hochgradige Astroglie und eine hochgradige Lipofuszin-Akkumulation. Bei dem BSE-Tier 3 wurde ebenfalls neuronale Vakuolen, hochgradige Astroglie und Lipofuszin im N. ruber festgestellt, NSE jedoch war nicht reduziert. Nervenzellen mit Vakuolen waren nicht unterschiedlich NSE-positiv als solche, die nicht von vakuolärer Degeneration betroffen waren. Es konnte insgesamt keine Korrelation zwischen den histologischen Veränderungen und der NSE-Nachweisbarkeit der Nervenzellen festgestellt werden.

	BSE 1 (Nr. 1)	BSE 2 (Nr. 3)	BSE 3 (Nr. 6)	BSE 4 (Nr.8)	BSE 5 (Nr.18)	BSE 6 (Nr. 21)	Durchschnitt
Nucleus ruber	keine Daten	2	2	2	2-3	2	2,1
Sub. grisea cent.	1	1-2	2	1-2	0-1	1	1,3
Sub. nigra	0	1	1-2	1-2	0	0-1	0,8
N. n. oculomotorii	keine Daten	2	1	2	2	3	2
Colliculus sup.	1-2	1	1	1	2-3	0-1	1,3
Colliculus inf.	keine Daten	0-1	1	0-1	0-1	1-2	0,8
N. trig. mesenc.	keine Daten	0-1	0-1	0-1	0	0	0,3

Tabelle 4-6: Immunhistochemische Verteilung von PrP^{Sc} im Mesencephalon

BSE-positive Tiere

	BSE 1 (Nr. 1)	BSE 2 (Nr. 3)	BSE 3 (Nr. 6)	BSE 4 (Nr.8)	BSE 6 (Nr. 21)	BSE 5 (Nr.18)	Durchschnitt	Astrogliose*
Nucleus ruber	Keine Daten	3	2	2	3	3	2,6	2,0
Sub. grisea cent.	2-3	3	2	1-2	2	2	2,2	2,2
Sub. nigra	2-3	2	2	1	1-2	2	1,8	1,3
N. n. oculomotorii	Keine Daten	1	1	1-2	2	1-2	1,4	1,3
Colliculus sup.	1	2	1-2	1	2	1	1,4	1,6
Colliculus inf.	1-2	3	1	1	1-2	2	1,7	1,5

* Astrogliose aus der histologischen Auswertung, entnommen aus Tabelle 4-2.

BSE-negative Tiere

	Gruppe 1 ESBE	Gruppe 2 Tuberkulose	Gruppe 3 Ohne Befund	Gruppe 4 Hirnödem	Gruppe 5 Trauma	Durchschnitt Alle	Durchschnitt Encephalitis
Nucleus ruber	1-2	1	2	0-1	0-1	1,0	1,5
Sub. grisea cent.	1	0-1	1-2	0-1	2	1,1	1,5
Sub. nigra	1	0	1	0-1	0-1	0,8	1,3
N. n. oculomotorii	1	0-1	1-2	0	0-1	0,9	1,5
Colliculus sup.	2	0-1	0-1	1	0-1	0,9	1,5
Colliculus inf.	2	0-1	2	0-1	1	1,3	2
	BKF	Listeriose	Ohne Befund				
Nucleus ruber	1	2	0-1				
Sub. grisea cent.	1-2	2	1				
Sub. nigra	2	1	1				
N. n. oculomotorii	1-2	2	1				
Colliculus sup.	1-2	1	1-2				
Colliculus inf.	2	2	2				

Tabelle 4-7: Immunhistochemische Verteilung von GFAP im Mesencephalon

BSE-positive Tiere

	BSE 1	BSE 2	BSE 3	BSE 4	BSE 5	BSE 6
Nucleus ruber	keine Daten	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert
Sub. grisea cent.	-	reduziert	-	-	-	
Sub. nigra	-	reduziert	-	-	-	
N. n. oculomotorii	-	-	-	-	-	
Colliculus sup.	-	-	-	-	-	
Colliculus inf.	-	-	-	-	-	reduziert

-: nicht reduziert

BSE-negative Tiere

	Gruppe 1 ESBE	Gruppe 2 Tuberkulose	Gruppe 3 Ohne Befund	Gruppe 4 Hirnödem	Gruppe 5 Trauma
Nucleus ruber	-	-	reduziert	-	-
Sub. grisea cent.	-	-	-	-	-
Sub. nigra	-	-	-	-	-
N. n. oculomotorii	-	-	-	-	-
Colliculus sup.	-	-	-	-	-
Colliculus inf.	-	-	-	-	-
	BKF	Listeriose	Ohne Befund		
Nucleus ruber	-	-	-		
Sub. grisea cent.	-	-	-		
Sub. nigra	-	-	-		
N. n. oculomotorii	-	-	-		
Colliculus sup.	reduziert	-	-		
Colliculus inf.	reduziert	-	-		

Tabelle 4-8: Immunhistochemische Verteilung von Synaptophysin im Mesencephalon

BSE-positive Tiere

	BSE 1	BSE 2	BSE 3	BSE 4	BSE 5	BSE 6	Durchschnitt
Nucleus ruber		0-1	2		1		1,2
Sub. grisea cent.	1-2	1-2	2	1-2	1-2	1-2	1,6
Sub. nigra		1	2		1-2	1-2	1,5
N. n. oculomotorii		2	3	2	2	0-1	1,9
Colliculus sup	2	0-1	3	3			2,3
Colliculus inf.	2		3	3	2-3	2	2,5

BSE-negative Tiere

	Gruppe 1 ESBE	Gruppe 2 Tuberkulose	Gruppe 3 Ohne Befund	Gruppe 4 Hirnödem	Gruppe 5 Trauma
Nucleus ruber	2	1-2	2	2	2
Sub. grisea cent.	0-1	1-2	1-2	1-2	2
Sub. nigra	1	1-2	2	1	2
N. n. oculomotorii	1	1	2	2	2
Colliculus sup.	2	2	3	3	3
Colliculus inf.	2	2	3	2	3
	BKF	Listeriose	Ohne Befund		
Nucleus ruber		2			
Sub. grisea cent.	2-3	1-2	2		
Sub. nigra	2	1-2	2-3		
N. n. oculomotorii	1-2	2	1		
Colliculus sup.	2	2	2		
Colliculus inf.	2	2	2		

Durchschnitt
1,9
1,9
1,6
1,7
1,6
2,4

Tabelle 4-9: Immunhistochemische Verteilung von NSE im Mesencephalon

5 Diskussion

5.1 BSE-positive Tiere

Signalment der Rinder

Von den 26 Rindern mit BSE-Verdacht wurden bei 6 Tieren mittels eines Western-Blot-Verfahrens BSE festgestellt. Bei diesen 6 Rindern fällt auf, dass sämtliche Tiere im Jahre 1996 geboren wurden. Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt des Auftretens von klinischen Erscheinungen beträgt im Durchschnitt 60 Monate (5,0 Jahre). Chronologisch betrachtet, nach Datum des Einlieferns in den Lehrstuhl für Neuropathologie, steigt das Alter der Tiere allmählich (Alter der BSE-Tiere 1-6: 56,57,58,62,61,67 Monate). Das durchschnittliche Alter aller deutschen Rinder bei Feststellung von BSE liegt bei 68,5 Monaten (Conraths et al. 2002). Eine statistische Auswertung der deutschen BSE-Rinder aus den Jahren 2000, 2001 und 2002 ergaben, dass im Jahre 1996 geborene Rinder einem maximalen BSE-Risiko ausgesetzt waren (Conraths et al. 2002). Wenn der Höhepunkt der Ansteckung im Jahre 1996 erfolgte, ist es zu erwarten, dass das Alter der Tiere beim Auftreten der klinischen Symptomatik tendenziell steigt, was auch von Conraths et al. (2002) gezeigt wurde.

Auffällig bei den 6 BSE-positiven Tieren war die Rasseverteilung. 5 von 6 Tieren gehörten der Rasse Braunvieh an. Das 6. Tier war ein Deutsches Fleckvieh. Ausgewertet nach Rasse war generell bei den deutschen BSE-Rindern das Braunvieh prozentual am häufigsten betroffen (BFAV Wusterhausen, nicht veröffentlicht). Allerdings müssen dabei eine Vielzahl von Faktoren berücksichtigt werden, so dass derzeit keine Interpretation der Rasseverteilung möglich ist (Göbel S, BFAV Wusterhausen, persönliche Mitteilung).

Histologie

Nach dem Ausbruch der BSE-Epidemie in England wurde ein histologisches Vorgehen für die staatliche Routinediagnose von BSE eingeführt (Wells et al. 1989). Dabei wird ein einziger Paraffinschnitt auf Höhe der Obex-Region des Myelencephalons histologisch beurteilt. Das Vorhandensein von vakuolären Veränderungen in zwei Kerngebieten (N. tractus spinalis n. trigemini und N. tractus solitarii) konnte 99,6% der BSE-positiven Fälle identifizieren (Wells et

al.1989). In der vorliegenden Arbeit wurde die Höhe der Obex-Region nicht untersucht, da die Medulla oblongata (mit der Obex-Region) für den BSE-Schnelltest an das Landesuntersuchungsamt eingeschickt wurde. Histologisch wurde bei uns das gesamte Gehirn rostral der Medulla oblongata aufgearbeitet. Für die Immunhistochemie wurde das Mesencephalon auf Höhe des N. ruber (soweit vorhanden) ausgewählt, da dort die BSE-assoziierten histologischen Veränderungen am stärksten ausgeprägt waren. Die Auswertung der Histologie und Immunhistochemie war semiquantitativ. Die Beurteilung der Läsionen unterlag der subjektiven Meinung der untersuchenden Person. Diese potentielle Fehlerquelle wurde minimiert, in dem die gesamte lichtmikroskopische Untersuchung durch einen einzigen Pathologen durchgeführt wurde.

Bei den BSE-positiven Rindern konnten keine makroskopisch-pathologischen, jedoch histologische Veränderungen am ZNS festgestellt werden. Bei allen 6 untersuchten BSE-positiven Rindern wurden für BSE charakteristische histologische Läsionen festgestellt: vakuoläre Degenerationen der Nervenzellen, spongiforme Auflockerungen des Neuropils, Astrogliose, Mikrogliose und axonale Schwellungen. Zusätzlich konnte bei allen Tieren eine vermehrte Akkumulation von neuronalem Lipofuszin beobachtet werden.

Zusammenfassend aus der Histologie ist festzustellen, dass die histologischen Veränderungen sich im Stammhirn konzentrieren, und zwar hauptsächlich in der *Formatio reticularis*. Von allen Läsionstypen häufig betroffene Kerngebiete sind dabei *N. motorius dorsalis n. vagi*, *N. tractus spinalis n. trigemini*, *N. tractus solitarii*, *Nn. reticulares*, *Nn. vestibulares*, *Substantia grisea centralis* und *N. ruber*. Unsere histologische Untersuchung ergab keine groben Abweichungen im Vergleich zu den Ergebnissen der histologischen Studien aus England (Wells et al. 1987). Bei BSE können die histologischen Veränderungen in Einzelfällen so gering ausgeprägt sein, dass keine Diagnose möglich ist (Wells et al. 1989). In allen 6 BSE-positiven Fällen der vorliegenden Arbeit waren jedoch die histologischen Läsionen deutlich ausgeprägt und charakteristisch für BSE.

Obwohl die Neuropathologie der BSE von Wells et al. (1987) präzise charakterisiert werden konnte, ist gleichzeitig festzustellen, dass die Läsionen

im einzelnen nicht für BSE pathognomisch sind. Astrogliose, Mikrogliose und Axonschwellungen sind Veränderungen, die nach einer Vielzahl von ZNS-Insulten auftreten. Auch neuronale Vakuolen wurden insbesondere im N. ruber häufig bei BSE-negativen Rindern beobachtet (McGill & Wells 1993; Guarda & Fatzer 1995; Gavier-Widen et al. 2001). Entscheidend für das histologische Bild der BSE ist die Häufigkeit, Intensität und Zusammensetzung der für BSE charakteristischen histologischen Läsionen.

Im N. ruber des Mesencephalons wurden sowohl histologisch als auch immunhistochemisch (siehe unten) auffällige Veränderungen beobachtet. Allerdings ist die Beurteilung der Läsionen in diesem für die Koordination der Motorik so bedeutenden Kerngebiet durch die Tatsache erschwert, dass neuronale Vakuolen häufig bei BSE-negativen Rindern vorkommen. Derzeit wird angenommen, dass neuronale Vakuolen bei Rindern ohne BSE keine nosologische und somit keine pathologische Bedeutung haben (Gavier-Widen et al. 2001). Die Nn. habenulares, in denen häufig solche unspezifische Vakuolen auftreten, zeigten allerdings bei den BSE-positiven Rindern außer neuronalen Vakuolen kaum histologische Veränderungen. Diese Tatsache weist auf eine Bedeutung des N. rubers in der Pathogenese und Klinik der BSE.

Bei der CJD wurde von einer erhöhten neuronalen Lipofuszin-Akkumulation berichtet (Boellaard et al. 1989; Dastur et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde bei allen 6 BSE-positiven Tieren vermehrt Lipofuszin festgestellt. Besonders auffällig waren die Veränderungen im N. ruber, in den Nn. vestibulares und in anderen Kerngebieten der *Formatio reticularis*. Obwohl es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen vermehrter Lipofuszin-Akkumulation und der Pathogenese von BSE gibt, ist die Bedeutung derzeit unklar. Möglicherweise führt der Verlust von synaptischem PrP^C und die damit verbundene Abnahme SOD-ähnlicher Funktionen (Wong et al. 2000; Brown 2001, siehe auch 2.2.1) zu einer erhöhten neuronalen Belastung mit oxidativem Stress. Da oxidativer Stress eine bedeutende Rolle bei der Lipofuszinogenese spielt (Brunk 2002), scheint eine BSE-assoziierte Erhöhung der Lipofuszin-Akkumulation plausibel.

Immunhistochemie

PrP^{Sc}

Bei allen BSE-positiven Tieren konnte PrP^{Sc} im Mesencephalon immunhistochemisch dargestellt werden. Das morphologische Verteilungsmuster und Erscheinungsbild von PrP^{Sc} war im Einklang mit vorangegangenen Untersuchungen von Wells & Wilesmith (1995). Es konnte keine eindeutige Korrelation zwischen allgemeinem Schweregrad der histologischen Läsionen und Intensität der PrP^{Sc}-Immunreaktivität festgestellt werden. Allerdings, wo vakuoläre Veränderungen zu beobachten waren, war auch PrP^{Sc} immunhistochemisch nachweisbar. Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass die Akkumulation von PrP^{Sc} den zellulären Reaktionen bzw. den histologischen Veränderungen vorausgeht (Giese et al. 1998).

Bei der Pathogenese von Scrapie nach oraler Infektion erfolgt der cerebrale Eintritt von PrP^{Sc} via N. vagus in den Nucleus motorius dorsalis n. vagi des Myelencephalons (van Keulen et al. 2002). Obwohl der detaillierte Ablauf der Pathogenese der BSE noch unbekannt ist, könnte PrP^{Sc} auf ähnlichem Weg ins Gehirn gelangen. Die immunhistochemisch feststellbare Akkumulation von PrP^{Sc} korreliert mit dem Vorkommen von vakuolären Veränderungen. Diese Tatsache könnte die Hypothese einer aus der Medulla oblongata ausgehenden rostralen Ausbreitung des PrP^{Sc} unterstützen, da die vakuolären Veränderungen im Diencephalon seltener werden und im Telencephalon kaum noch vorhanden sind.

GFAP

Die Astrogliose ist ein charakteristisches histologisches Merkmal der BSE, das durch die immunhistochemische Darstellung von GFAP detaillierter nachgewiesen werden kann. Die im HE-Präparat feststellbare Intensität der Astrogliose korrelierte eng mit den immunhistochemischen Ergebnissen für GFAP. Wie die Tabelle 4-7 zeigt, konnte bei allen immunhistochemisch untersuchten Tieren GFAP-positive Astrozyten festgestellt werden. In 5 BSE-negativen Tieren war jedoch GFAP nur in geringen Mengen nachweisbar. Da auch im Ruhezustand des ZNS eine gewisse Anzahl GFAP-positiver Zellen zu erwarten ist, wurden die Befunde bei diesen Tieren als unspezifisch beurteilt. Die Durchschnittswerte der 3 übrigen BSE-negativen Tiere (ESBE, Listeriose und BKF), bei denen GFAP sichtlich erhöht war, wurden mit Durchschnitts-

werten von den BSE-positiven Tieren verglichen. Die GFAP-Immunreaktivität bei den BSE-positiven Tieren war entweder gleich oder deutlich höher als bei den BSE-negativen Tieren. Es liegt bei der BSE offensichtlich eine sehr starke Aktivierung der Astrozyten vor, welche selbst bei aggressiven Encephalitiden wie Listeriose oder BKF nicht beobachtet wird.

Bei Scrapie existiert eine positive Korrelation zwischen den vakuolären Veränderungen des Neuropils und einer Astrogliose (Pattison 1967). Bei BSE scheint es eine ähnliche Korrelation zu geben (Gubler 2002). In der vorliegenden Studie konnte keine überzeugende Verbindung zwischen den beiden Läsionen festgestellt werden. Eine Auswertung der 6 BSE-positiven Tieren ergab eine gewisse aber nicht sehr ausgeprägte positive Korrelation zwischen Astrogliose und Vakuolen des Neuropils (Abbildung 1).

Synaptophysin

Im Mesencephalon aller Rinder konnte Synaptophysin immunhistochemisch dargestellt werden. Im Gegensatz zu den BSE-negativen Tieren, deren Synaptophysin-Immunreaktivität als normalgradig angenommen werden durfte, konnte in allen 5 BSE-Fällen nur ganz spärlich Synaptophysin im Neuropil des N. rubers nachgewiesen werden. Dagegen zeigte die Synaptophysin-Immunreaktivität auf der Zellmembran der Perikarya keinen Unterschied zu den Kontrolltieren.

Es gab eine gewisse Ähnlichkeit im neuronalen Verteilungsmuster von Synaptophysin und PrP^{Sc}. Eine solche Feststellung machten Wells & Wilesmith (1995) und Jeffrey et al. (1992). In den Neuronen wird PrP^C hauptsächlich in den Synapsen exprimiert (Salès et al. 1998). Da PrP^{Sc} aus Konformationsveränderungen des PrP^C entsteht, ist an der Stelle der PrP^C-Expression auch die PrP^{Sc}-Akkumulation zu erwarten.

Auffällig war der selektive Verlust der Synaptophysin-Immunreaktivität im Neuropil des N. ruber. Hier liegt möglicherweise einen Glutamat-induzierten Verlust der dendritischen Synapsen vor: In Anwesenheit von PrP^{Sc} wird die Glutamat-Aufnahme der Astrozyten gehemmt (Brown & Mohn 1999), wodurch eine glutamat-induzierte exzitotoxische Vakuolisierung der synaptischen Region und ein damit verbundener Verlust der Synapsen entsteht (Auer & Sutherland 2002). Charakteristisch für den durch Hyperexzitation verursachten Nervenzelluntergang sind selektive Läsionen an den Dendriten

(Olney et al. 1971), bei denen die Dendriten als Folge einer Störung in der Elektrolyt- und Wasserhomöostase anschwellen. Diese selektive Schädigung der Dendriten mit ihren Synapsen könnte die verminderte Synaptophysin-Immunreaktivität im Neuropil des N. ruber erklären.

NSE

Bei Patienten mit nvCJD wurde NSE in der Cerebrospinalflüssigkeit festgestellt (Green et al. 2001), was auf eine Schädigung der Nervenzellen hinweist. Die Idee, die Paraffinschnitte der BSE-positiven Rinder immunhistochemisch zusätzlich auf NSE zu untersuchen, basiert auf der Überlegung, ob die geschädigten Nervenzellen möglicherweise eine verminderte NSE-Immunreaktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigen könnten. Da die immunhistochemische Nachweisbarkeit von NSE als Maßstab für den neuronalen Metabolismus dient (Silverman 1992), könnten dysmetabolische und präletale Nervenzellen eventuell mit dieser Immunhistochemie dargestellt werden. Insbesondere Nervenzellen mit ausschließlich neuronalen Vakuolen, ohne weitere morphologische Veränderungen, könnten eine verminderte Immunreaktivität für NSE zeigen. Das Ergebnis der NSE-Immunhistochemie war allerdings nicht überzeugend. Die BSE-negativen Tiere zeigten unabhängig von der Erkrankung eine sehr uniforme NSE-Immunreaktivität. Im Gegensatz dazu war bei zwei BSE-positiven Tieren eine deutlich verminderte NSE-Immunreaktivität im N. ruber festzustellen. Der N. ruber konnte insgesamt lediglich bei 3 Tieren untersucht werden, da nach mehrmaligem Schneiden des Paraffinblocks für diverse Färbungen und immunhistochemische Untersuchungen bei 2 Tieren kein Material im Mesencephalon mit dem N. ruber mehr vorhanden war. In 2 aus 3 Fällen wurde eine verminderte NSE-Immunreaktivität im N. ruber festgestellt. Das Ergebnis weist also auf eine potentielle Bedeutung der NSE-Immunhistochemie für die BSE-Diagnostik hin, die Gesamtzahl der untersuchten Tiere ist jedoch nicht ausreichend, um eine Aussage machen zu können.

5.2. BSE-negative Tiere

Von den 20 BSE-negativen Rindern wurden bei 14 (70%) Tieren erhebliche histopathologische Läsionen festgestellt. Die auf Basis dieser Läsionen gestellten Diagnosen stimmen tendenziell mit den Ergebnissen ähnlicher Studien überein, welche mit einer größeren Anzahl von Tieren in Dänemark, England und Schottland durchgeführt wurden (Agerholm et al. 2002; McGill & Wells 1993; Jeffrey 1992). In Tabelle 5-1 wurde die prozentuale Diagnosenverteilung der BSE-negativen Tiere aus den obengenannten drei Studien zusammengefasst, um einen Vergleich mit den eigenen Ergebnissen zu ermöglichen. Obwohl die Gesamtzahl der untersuchten Tiere geringer war, wurde im Vergleich zu den anderen Studien keine unverhältnismäßigen Abweichungen in der prozentualen Verteilung der Differentialdiagnosen festgestellt.

	1	2	3	4
Listeriose	20%	11%	8%	36%
andere bakterielle Encephalitiden	5 (20^{**})	2 (17 ^{**})	1,8 (8,5 ^{**})	20 ^{**}
ESBE	10	10	3,5	
BKF	5	1,2	unbekannt	
andere virale Encephalitiden	0	0,8	2,3	
CCN	5	1,2	1,8*	1,7
Hirnödem	15	unbekannt		3,5
Neoplasie	0	1,6	2,3	4,5
Arthritis purulenta/Trauma	5	0	0	0
Ohne histopathologischen Befund	30	43	53	35
Gesamtzahl der Tiere	26	225	200	174

Tabelle 5-1: Prozentuale Verteilung der Diagnosen der BSE-negativen Tiere

1: Lehrstuhl für Allg. Pathologie u. Neuropathologie der Tierärztl. Fakultät, LMU München

2: Jeffrey, Lasswade Veterinary Laboratory, Scotland

3: McGill & Wells, Central Veterinary Laboratory, U.K.

4: Agerholm et al., Danish Veterinary Institute, Copenhagen

* CCN und Hirnödem wurden zusammengerechnet

** unabhängig von Ätiologie wurden alle Meningoencephalitiden zusammengerechnet (ausgenommen Listeriose)

Die häufigste neuropathologische Diagnose bei den BSE-negativen Tieren war die Listerien-Encephalitis (20 %), die somit eine bedeutende differentialdiagnostische Erkrankung der BSE darstellt. In Schottland wurden in 11 %, in England in 8% und in Dänemark sogar in 36 % der BSE-negativen Rinder Listeriose diagnostiziert. Da die Listeriose oft in den Wintermonaten beobachtet wird, ist bei dem klinischen Verdacht auch die Jahreszeit zu berücksichtigen. 3 der 4 Fälle mit Listeriose aus der vorliegenden Studie wurden in Januar und Februar eingeliefert.

Bei einem Tier wurde eine Mykobakterium-Infektion mit Beteiligung des ZNS festgestellt. Tuberkulose wurde bislang nicht als Differentialdiagnose der BSE erwähnt, was vermutlich daran liegt, dass heute in Europa die Rindertuberkulose sehr selten auftritt. Seit 1996 hält Deutschland den Status „frei von Rindertuberkulose“ (EU-Entscheidung 87/76/EG). Demnach sind seit 10 Jahren 99,9% der Rinderbestände amtlich anerkannt frei von Rindertuberkulose. Aus diesen Gründen kann die Rindertuberkulose zwar aus der Liste der Differentialdiagnosen nicht ausgeschlossen werden, die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von einem solchen Fall ist jedoch als sehr gering einzuschätzen, insbesondere da nicht jede Mykobakterium-Infektion mit einer Beteiligung des ZNS verbunden ist.

Unter den 6 Tieren mit bakteriellen Infektionen befand sich ein Fall von Aktinobazillose des Waldeyer'schen Rachenrings. Die granulomatöse Veränderungen in diesem Bereich reichten aus, um die neurologische Symptomatik auszulösen. Das ZNS war nicht beteiligt. Im Gehirn wurden vereinzelt geringgradige lymphozytäre perivaskuläre Gefäßinfiltrate und Kugelblutungen beobachtet, die als chronisch-subklinische Vorgänge, und damit als Zufallsbefunde betrachtet wurden.

In 15 % der BSE-negativen Tiere wurden virale Encephalitiden nachgewiesen, die aus einem Fall (5%) von Bösartigem Katarrhalfieber und zwei Fällen (10%) von Europäischer Sporadischer Boviner Meningoencephalitis bestanden. Das Vorkommen vom BKF als Differentialdiagnose zur BSE ist von Jeffrey (1992) erwähnt worden, der im Rahmen seiner Studie 3 Fälle (1,2%) diagnostizierte.

Bei 10% der BSE-negativen Tiere wurde ESBE festgestellt, die eine bedeutende Differentialdiagnose zur BSE darstellt. Jeffrey (1992) und McGill (1993) registrierten in ihren neuropathologischen Studien an BSE-Verdachtsrindern in 10% bzw. in 3,5 % der Fälle ESBE. Die Diagnose in der vorliegenden

Arbeit erfolgte nach histopathologischer Untersuchung und nach Ausschluss von differentialdiagnostischen Krankheiten wie Borna'sche Krankheit oder Tollwut. Theil et al. (1998) charakterisierte die ESBE und teilte sie histologisch in drei Gruppen ein (siehe 2.4.1.5). Die zwei Fälle der vorliegenden Studie konnten in die von Theil et al. beschriebenen Gruppen eingeteilt werden. Von besonderem Interesse war ein Fall, bei dem eine starke Beteiligung des Cerebellums mit Reduktion der Purkinjezellen beobachtet wurde.

Bei einem Tier (5%) wurde Cerebrocorticalnekrose festgestellt. In den BSE-Verdachtsstudien aus England, Schottland und Dänemark wurde ebenfalls vereinzelt CCN diagnostiziert, wobei der prozentuale Anteil stets unter 2% blieb. Normalerweise wird CCN nach Umstellung von Fütterungen bei Rindern bis ca. 18 Monaten beobachtet. In dem vorliegenden Fall bleibt die Ätiologie der CCN unklar, da das Rind schon 4 Jahre alt war, und andere Tiere der Herde nicht erkrankt waren.

In 3 Fällen (15%) wurde Hirnödem diagnostiziert. Die Diagnose Hirnödem wird aus der histologischen Morphologie abgeleitet, stellt jedoch keine eigenständige Erkrankung dar. Die Ätiologie des Hirnödems ist meist in toxisch/hypoxischen Einwirkungen zu finden. In keinem der drei Fälle konnte die Ursache ermittelt werden. In anderen Studien über BSE-Verdachtsrinder ist das Hirnödem, wenn auch in geringem Ausmaß, stets unter den untersuchten Rindern festgestellt worden.

Bei einem Tier konnte die neurologische Symptomatik durch diverse Traumata erklärt werden. Das Tier zeigte zusätzlich zu den Klauenproblemen, eine Schwanzspitzennekrose, eine Fraktur auf Höhe der 8. Rippe und eine fibrinöse Pleuritis. Die Befunde im Gehirn waren nur geringgradig ausgeprägt, so dass diese als Zufallsbefunde betrachtet wurden. In keiner der anderen Differentialdiagnose-Studien wurde Trauma angegeben. Insbesondere bei ausgeprägten Verletzungen wie in diesem Fall wäre bei einem aufmerksamen Tierbesitzer vermutlich auch kein BSE-Verdacht ausgesprochen worden.

In 6 Fällen war keine neuropathologische Diagnose möglich. Davon wurde bei zwei Tieren hämatologisch Hypomagnesämie diagnostiziert. In beiden Fällen wurden im Gehirn geringgradige lymphozytäre, perivaskuläre Gefäßinfiltrate mit Astrogliose, Mikrogliose und axonalen Schwellungen beobachtet. Bei einem Tier traten die Veränderungen verstärkt im Cerebellum auf, wo auch eosinophile Purkinjezelldegenerationen festgestellt wurden. Morphologisch

ähnelten diese Läsionen einer schwach ausgeprägten ESBE, wurden in diesem Fall jedoch als unspezifisch beurteilt. Solche geringgradige entzündliche Veränderungen des Gehirns können beim Rind subklinisch verlaufen. In einer neuropathologischen Studie mit 506 klinisch gesunden Rindern wurden bei 30% der Tiere perivaskuläre Rundzellinfiltrate der Gefäße festgestellt (Gavier-Widen et al. 2001). Da die Tiere klinisch nicht auffällig waren, wurden diese Veränderungen als häufig vorkommende, subklinische Entzündungen unklarer Ätiologie betrachtet (Gavier-Widen et al. 2001).

Bei 4 der 6 Tiere ohne neuropathologische Diagnose wurden nur geringe histologische Läsionen festgestellt. Bei einem Tier waren geringgradige lymphozytäre, perivaskuläre, Gefäßinfiltrate und axonale Schwellungen zu sehen, die aber wegen der geringen Ausprägung vermutlich subklinisch verliefen. Bei einem anderen Tier mit axonalen Schwellungen und spongiformen Auflockerungen des Neuropils wurde eine toxische Ätiologie vermutet, jedoch nicht bestätigt. Bei fehlender neuropathologischer Diagnose ist immer an Stoffwechselerkrankungen wie Hypomagnesämie, nervöse Form der Ketose oder Hypocalcämie zu denken, welche hauptsächlich funktionelle Störungen verursachen. Der Prozentsatz der Tiere ohne pathologischen Befund ist in allen Studien sehr groß (siehe Tabelle 5-1), womit die differentialdiagnostische Bedeutung von Stoffwechselerkrankungen zur BSE unterstrichen wird.

Bei den BSE-negativen Tieren wurden vakuoläre Degenerationen von Nervenzellen häufig beobachtet. Im N. ruber und in den Nn. habenulares wurden in 69% bzw. in 45 % der Tiere neuronale Vakuolen festgestellt. Bei 40% der Tiere traten die Vakuolen in beiden Kerngebieten auf. Vereinzelt wurden neuronale Vakuolen in anderen Bereichen wie in der *Formatio reticularis*, im *Lobus piriformis* und in den Kleinhirnkernen (N. *interpositus*, N. *dentatus*, N. *fastigii*) beobachtet. Die pathologische Bedeutung dieser Vakuolen ist unklar. Sie traten nämlich bei verschiedenen Krankheitsbildern auf (Listeriose, Aktinobazillose, Hypomagnesämie, ESBE usw.), aber es war nicht möglich einen Zusammenhang zwischen der Erkrankung und dem Auftreten der Vakuolen festzustellen, da Vakuolen auch bei Tieren ohne pathologischen Befund zu finden waren. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es sich um unspezifische Läsionen handelt. Ein Zusammenhang mit dem Alter der Tiere war ebenfalls

nicht eindeutig festzustellen. Das Durchschnittsalter aller BSE-negativen Tiere und aller Tiere mit neuronalen Vakuolen (unabhängig vom betroffenen Kerngebiet) betragen 6,3 bzw. 6,5 Jahre. Das Durchschnittsalter der Tiere mit neuronalen Vakuolen im N. ruber war 7 Jahre. Möglicherweise ist zumindest beim N. ruber eine altersabhängige Korrelation vorhanden.

In der BSE-Studie von McGill und Wells (1993) wurden bei 52,5% der Tiere Vakuolen im N. ruber beobachtet. Gavier-Widen et al. (2001) dokumentierte neuronale Vakuolen im N. ruber und in den Nn. habenulares bei 64,3% bzw. 50,1% der 506 Tiere, die keine neurologische Symptomatik zeigten. Diese Zahlen stimmen mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Zahlen überein. Über das Vorkommen von neuronalen Vakuolen bei gesunden Rindern in Kerngebieten außer im N. ruber und in den Nn. habenulares ist in diversen Arbeiten berichtet worden (Guarda et al. 1995; Gavier-Widen et al. 2001). Auch bei gesunden Schafen wurden neuronale Vakuolen beobachtet (Zlotnik & Rennie 1957, 1958). In einem möglicherweise pathologischen Zusammenhang wurden vakuoläre Degenerationen von Nervenzellen in einem Fall von Tollwut (Foley & Zachary 1995) und bei der spastischen Parese (Ledoux 2001) beschrieben. Derzeit wird jedoch im allgemeinen angenommen, dass neuronale Vakuolen bei Rindern, vor allem im N. ruber, unspezifische Veränderungen ohne nosologische und somit pathologische Bedeutung sind.

Die Anzahl der von Vakuolen betroffenen Nervenzellen in einem bestimmten Kerngebiet war meist sehr gering (geschätzt: 1-2 Nervenzellen/Kerngebiet), aber eine genaue Zahl konnte nicht ermittelt werden, da in den histologischen Schnitten der verschiedenen Tiere die Kerngebiete nicht alle auf gleicher Höhe getroffen waren. In der Studie von McGill und Wells (1993) waren im N. ruber durchschnittlich 1,6 Nervenzellen vakuolisiert, und der durch Lewandowsky et al. (1967) ermittelte Prozentsatz der von Vakuolen betroffenen Neuronen im N. ruber beträgt 5%.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht ermittelt ob die Vakuolen uni- oder bilateral auftraten, da eine Hälfte des Gehirns für weiterführende Untersuchungen eingefroren wurde.

Bei 60% der BSE-negativen Tiere wurden Auflockerungen im Neuropil beobachtet. Diese waren in vielen verschiedenen Bereichen des Gehirns zu sehen, wobei die Substantia grisea häufiger als die Substantia alba betroffen

war. Obwohl die Vakuolen morphologische Ähnlichkeit zu den BSE-assoziierten Vakuolen aufwiesen, traten sie deutlich weniger regelmäßig und weniger dicht nebeneinander auf. Diese Vakuolen müssen von der bei der BSE vorkommenden spongiformen Auflockerung des Neuropils abgegrenzt werden, da es sich bei Prionerkrankungen vermutlich um exzitotoxische dendritische Läsionen (siehe 2.3.2.4) handelt. Die Vakuolisierung des Neuropils bei den BSE-negativen Tieren dagegen ist vermutlich auf eine spongiforme Degeneration der Myelinscheiden in den Oligodendrozyten zurückzuführen, die bei Tieren meist einen toxischen oder hepatotoxischen Ursprung haben. Auch bei Stoffwechselerkrankungen wurden Auflockerungen des Neuropils beobachtet (Hooper 1999). Die Herkunft und Ursache der Vakuolisierung blieb bei den BSE-negativen Tieren zum großen Teil ungeklärt, insbesondere weil das Verteilungsmuster unregelmäßig war. In manchen Fällen könnten auch histologische Artefakte eine Rolle gespielt haben. Von einer Vakuolisierung in der Substantia alba bei alten Tieren ist berichtet worden. Bei Ratten ist Vakuolisierung der Substantia alba einer der häufigsten altersassoziierten Veränderungen des ZNS, aber beim Rind konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden (Gavier-Widen et al. 2001). Auch in den eigenen Untersuchungen konnte keine Korrelation zwischen Alter und Vorkommen von Vakuolen im Neuropil festgestellt werden. Das Durchschnittsalter der BSE-negativen Tiere mit Vakuolisierungen des Neuropils (Substantia alba et grisea) betrug 6,1 Jahre (Altersdurchschnitt aller BSE-negativen Tiere: 6,3 Jahre). Bei 30 % der BSE-negativen Tiere wurden mikrovakuoläre Veränderungen im Neuropil des Hippocampus beobachtet. Meist war die graue Substanz im Bereich der Pyramidenzellen betroffen. Dieses Phänomen wurde bei allen BSE-positiven Tieren beobachtet, aber die pathologische Bedeutung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Eine Großzahl von pathologischen Vorgängen sind mit der Schwellung von Axonen verbunden, dazu gehören Neoplasien, degenerative Erkrankungen, Entzündungen, toxisch/hypoxische Einwirkungen und Stoffwechselstörungen. Axonschwellungen können auch mit zunehmendem Alter als altersbedingte Veränderungen ohne klinische Bedeutung auftreten. Borrás et al. (1999) stellten bei über 12 Jahre alten Hunden axonale Schwellungen mit 50% Inzidenz fest.

Axonale Schwellungen wurden bei 70% der BSE-negativen Tieren festgestellt. In wiederum 79% dieser Fälle war ein Zusammenhang mit der neuropathologischen Diagnose zu erkennen (z.B. Hypomagnesämie, Listeriose, usw.). Die restlichen 21% (3 Tiere) zeigten axonale Schwellungen in dem Myel- und Mesencephalon, ohne dass eine dezidierte neuropathologische Diagnose gestellt werden konnte. Obwohl dieses nicht tatsächlich nachgewiesen wurde, litten diese Tiere vermutlich an Stoffwechselerkrankungen oder Vergiftungen, die das Auftreten von axonalen Schwellungen erklären würde. Insgesamt wird festgestellt, dass die axonale Schwellung zwar sehr häufig beobachtet wird, steht aber meist in Zusammenhang mit einem nachvollziehbaren pathologischen Zustand. Auffällig war das häufige Auftreten der Axonschwellungen im N. ruber bei 37,5% aller BSE-negativen Tiere. Gavier-Widen et al. (2001) dagegen berichtet von einem häufigen Vorkommen der axonalen Schwellungen in den Nn. vestibulares, was in den eigenen Untersuchungen nur bei einem Tier beobachtet wurde.

Die Verteilung der Astro- und Mikrogliose (Gliose) bei den BSE-negativen Tieren ist in Tabelle 45 zusammengefasst. In Tabelle 44 wurde die Gliose nicht berücksichtigt, da diese diffus in verschiedenen Gehirnarealen der Tiere verteilt war und sich nicht auf ein oder zwei Kerngebiete beschränkten. Sowohl Astrogliose als auch Mikrogliose sind histologische Veränderungen, die nach allen Arten von ZNS-Insulten entstehen. Ihr Vorkommen ist demnach unspezifisch und weist nicht auf eine bestimmte Erkrankung hin. Die Auswertung der Gliose bei den BSE-negativen Tieren dient in erster Linie dem Vergleichszweck, um das BSE-bedingte Ausmaß der Astro- und Mikrogliose abschätzen zu können (siehe 5.1).

6 Zusammenfassung

In einem Zeitraum von 14 Monaten wurden am Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Tierärztlichen Fakultät an der LMU München 26 Rinder aus Bayern mit einem amtlichen Verdacht auf BSE neuropathologisch untersucht, um die Veränderungen der einzelnen Hirnareale und Kerngebiete dokumentieren zu können. Bei den BSE-negativen Tieren, die den BSE-positiven Rindern differentialdiagnostisch gegenüber standen, wurden 5 bis 6 histologische Schnitte mit repräsentativen Hirnarealen untersucht. In Ergänzung zu der Histologie wurden immunhistochemische Untersuchungen für PrP^{Sc}, GFAP, Synaptophysin und NSE im Mesencephalon auf Höhe des Nucleus ruber durchgeführt. Als Negativkontrollen für die Immunhistochemie dienten 8 BSE-negative Tiere, die in 5 differentialdiagnostische Gruppen eingeteilt wurden (bakterielle Encephalitis, virale Encephalitis, Hirnödem, Arthritis purulenta und Gehirne ohne histopathologischen Befund).

In 6 Fällen wurde der BSE-Verdacht vom Landesuntersuchungsamt Süd mittels Western-Blot-Analyse bestätigt. In den Gehirnen dieser Rinder wurden BSE-charakteristische histologische Veränderungen beobachtet: vakuoläre Degenerationen der Nervenzellen, spongiforme Auflockerungen des Neuropils, Astrogliose, Mikrogliose und axonale Schwellungen. Diese histologischen Läsionen waren insbesondere in der *Formatio reticularis* des Stammhirns stark ausgeprägt. Im Gegensatz dazu waren im Kleinhirn und in der Großhirnrinde kaum histopathologische Veränderungen festzustellen. In allen 6 Fällen wurde eine deutliche Vermehrung des neuronalen Lipofuszin in diversen Kerngebieten der *Formatio reticularis* beobachtet. Möglicherweise besteht eine Korrelation zwischen dieser Lipofuszin-Akkumulation und einer späteren vakuolären Degeneration dieser Neuronen.

Im Mesencephalon aller BSE-positiven Tiere konnte PrP^{Sc} immunhistochemisch dargestellt werden. Während im Nucleus ruber und Nucleus n. oculomotorii eine mittelgradige PrP^{Sc}-Akkumulation beobachtet wurde, war die Menge von PrP^{Sc} in der Substantia nigra und im N. tractus mesencephalici n. trigemini gering. Es wurde keine Korrelation zwischen Schweregrad der histologischen Läsionen und Menge der PrP^{Sc}-Akkumulation festgestellt. PrP^{Sc}

konnte allerdings stets an Stellen nachgewiesen werden, an denen vakuoläre Veränderungen vorkamen.

GFAP als Marker der Astrogliose wurde bei allen BSE-positiven Tieren immunhistochemisch nachgewiesen. Der Nucleus ruber und die Substantia grisea centralis zeigten eine besonders starke Immunreaktivität. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war die Gesamtzahl der GFAP-positiven Astrozyten bei den BSE-Rindern eindeutig höher.

Die Immunreaktivität für Synaptophysin als Marker der Synapsendichte war bei den BSE-positiven Tieren im Neuropil des Nucleus ruber deutlich vermindert. Die normalgradige Synaptophysin-Immunreaktivität auf der Zellmembran der Perikarya deutet auf einen dendriten-bezogenen Verlust der Synapsen.

Verglichen mit den BSE-negativen Tieren war im N. ruber von 2 BSE-Fällen die NSE-Immunreaktivität der Nervenzellsomata reduziert. Die Bedeutung dieses Ergebnisses bleibt unklar, da die Fallzahl für eine Auswertung nicht ausreichte.

Die BSE-negativen Tiere waren im Hinblick auf die Differentialdiagnosen zur BSE von Bedeutung. Häufigste differentialdiagnostische Erkrankungen waren Listeriose, virale Encephalitiden, Hirnödem und Hypomagnesämie.

Sowohl in der Histologie als auch in der Immunhistochemie zeigte der N. ruber des Mesencephalons bei den BSE-positiven Tieren ein hohes Maß an Veränderungen. Die Interpretation dieser Veränderungen wird allerdings durch die Tatsache erschwert, dass auch in BSE-negativen Tieren häufig neuronale Vakuolen des Nucleus ruber beobachtet wurden. In der vorliegenden Studie wurden in 69% der BSE-negativen Rinder neuronale Vakuolen im Nucleus ruber festgestellt. Diese Nervenzellen waren jedoch nicht mit PrP^{Sc} in der Immunhistochemie darstellbar. Die Ursache dieser Vakuolenbildung bleibt demnach ungeklärt, stellt aber sicherlich nicht das Symptom einer unerkannten „sporadischen BSE“ dar.

7 Summary

Neuropathological findings in Bavarian cattle with a clinical suspect of Bovine Spongiform Encephalopathy.

During a period of 14 months, 26 Bavarian cattle with a clinical suspect of BSE were introduced to the Institute of Veterinary Neuropathology at the LMU in Munich. The brains of these animals were subjected to neuropathological examinations. Histological observations were documented from all brain regions of the BSE-positive cattle. In the BSE-negative cases 4 to 5 representative brain areas were examined. Immunocytochemical investigations for PrP^{Sc}, GFAP, Synaptophysin and NSE were conducted on the mesencephalon containing the red nucleus. The negative controls were obtained from 8 BSE-negative animals that were divided into 5 disease groups: bacterial encephalitis, viral encephalitis, brain edema, arthritis purulenta and brains without histopathological abnormalities.

In 6 cases BSE was confirmed via Western blot analysis. Characteristic histological lesion profiles including neuronal vacuoles, spongy changes in the neuropil, astrogliosis, microgliosis and axonal spheroids were observed in the brains of all BSE-positive animals. These lesions were mostly concentrated in the formatio reticularis of the brain stem. Practically no lesions were observed in the cerebellum and in the cortex cerebri. An increased amount of neuronal lipofuscin was noted in diverse nuclei of the formatio reticularis. Possibly there exists a correlation between the elevated accumulation level of lipofuscin and later vacuolar degeneration of nerve cells.

An immunocytochemical reaction for PrP^{Sc} was observed in the mesencephalon of all BSE-positive animals. PrP^{Sc}-accumulation was significant in the red nucleus and oculomotor nucleus, while moderate in the substantia nigra and nucleus tractus mesencephalici n. trigemini. No correlation was found between the severity of the histological lesion profiles and the amount of PrP^{Sc}-accumulation. However, the location of vacuoles coincided with the location of PrP^{Sc}-deposits.

Immunoreactivity for GFAP, a marker for astrogliosis, was observed in all BSE-positive animals. Especially the red nucleus and the substantia grisea centralis

stained strongly for GFAP. In comparison to the control animals there was a significant increase of GFAP-positive astrocytes in animals affected with BSE. In the red nucleus of the BSE cattle there was an obvious decrease in the neuropil staining for synaptophysin, a marker for synaptic density. Synaptophysin was not reduced in the cell membrane of the perikaryon. These findings may imply the loss of synaptic functions specifically in the dendrites. In 2 cases of BSE the immunocytochemical reaction for NSE in the red nucleus was reduced. The interpretation of this result remains unclear due to the low number of examined cases.

The BSE-negative animals were of importance in regard to the differential diagnosis of BSE. The most commonly diagnosed diseases were listeriosis, viral encephalitis, brain edema and hypomagnesaemia.

Significant lesion profiles were observed in the red nucleus both in the histology and in the immunocytochemistry. However, precaution is needed in the interpretation of these changes, due to the fact that neuronal vacuoles are commonly found in cattle without BSE. In the present study vacuoles of the red nucleus were observed in 69% of the BSE-negative animals. However, these nerve cells did not stain for PrP^{Sc}, thus leaving the etiology of such vacuolar formation unclear. Nevertheless, these vacuoles should not be considered in relation with a yet unidentified "sporadic" form of BSE.

8. Literaturverzeichnis

Adamec E, Mohan PS, Cataldo AM, Vonsattel JP, Nixon RA (2000) Up-regulation of the lysosomal system in experimental models of neuronal injury: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*; 100 : 663-675

Agerholm JS, Tegtmeyer CL, Nielsen TK (2002) Survey of laboratory findings in suspected cases of bovine spongiform encephalopathy in Denmark from 1990 to 2000. *APMIS*; 110: 54-60

Aguzzi A, Heppner FL (2000) Pathogenesis of prion diseases: a progress report. *Cell death differ*; 7: 889-902

Aksamit AJ, Preissner CM, Homburger HA (2001) Quantitation of 14-3-3 and neuron-specific enolase proteins in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*; 57: 728-730

Aschner M, LoPachin RMJ (1993) Astrocytes: targets and mediators of chemical-induced CNS injury. *J Toxicol Environ Hlth*; 38: 329-342

Auer RN, Sutherland GR (2002) Hypoxia and related conditions. *Greenfield's Neuropathology, 7th edition*. Arnold: London, New York, New Dehli

Bachmann PA, ter Meulen V, Jentsch G et al. (1975) Sporadic bovine meningo-encephalitis-isolation of a paramyxovirus. *Arch Virol*; 48(2): 107-120

Bagó Z (2001) Histologische und immunhistochemische Untersuchungen von nicht-eitrigen und eitrigen Enzephalitiden bei Wiederkäuern. Institut für Pathologie und Gerichtliche Veterinärmedizin der Universität Wien: Inaugural-Dissertation. www.arcs.ac/dissdb/rn035132n

Baylis M et al. (2002) Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock. *J Gen Virol*; 83: 2907-14

Berry M, Butt AM, Graham W, Perry VH (2002) Structure and function of glia in the central nervous system. *Greenfield's Neuropathology, 7th edition*. Arnold: London, New York, New Dehli

Betmouni S, Perry VH, Gordon JL (1996) Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience*; 74: 1-5

Boellaard JW, Schlote W, Tateishi J (1989) Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta Neuropathol*; 78: 410-418

Borras D, Ferrer I, Pumarola M (1999) Age-related changes in the brain of the dog. *Vet Pathol*; 36: 201-211

Brandner S, Raeber A, Sailer A, Blättler T, Fischer M, Weissmann C, Aguzzi A (1996) Normal host prion protein (PrP^{Sc}) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl acad Sci USA*; 93: 13148-13151

Braun U (2001) www.vis-ernaehrung.bayern.de/de/left/fachinformation/praevention/tiergesundheit/bse-klinik.htm Bayerisches Staatsministerium für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz

Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA, (1996) A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocyte in culture. *Glia*; 18:59-67

Brown DR et al. (1997) The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature*; 390: 684-687

Brown DR (1999) Prion protein peptide neurotoxicity can be mediated by astrocytes. *J Neurochem*; 73: 1105-1113

Brown DR, Mohn CM (1999) Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *Glia*; 25: 282-292

Brown DR, (2000) Prion protein peptides: Optimal toxicity and peptide blockade of toxicity. *Mol Cell Neurosci*, 15:66-78

Brown DR (2001) Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends in Neuroscience*; 24: 85-90

Bruce ME et al. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*; 389: 498-501

Brunk UT, Terman A (2002) Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*; 33: 611-619

Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
www.verbraucherministerium.de/verbraucher/bse/anzahlbse.htm

Caughey B, Raymond GJ (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease-sensitive and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem*; 266: 18217-18223

Chabry J, Caughey B, Chesebro B (1998) Specific inhibition of *in vitro* formation of protease resistant prion protein by synthetic peptides. *J Biol Chem*; 273: 13203-13207

Chou SM, Payne WN, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC (1980) Transmission and scanning electron microscopy of spongiform change in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*; 103: 885-904

Collinge J, Sidle K, Meads J, Ironside J, Hill A (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*; 383: 685-690

Conraths JF, Groschup MH, Selhorst T (2002) Zwei Jahre BSE bei in Deutschland geborenen Rindern. *Deutsches Tierärzteblatt*; 12; 1264-1272

Cuadros MA, Navascues J. (1998) The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol*; 56: 173-89

Dalsgaard NJ (2002) Prion diseases. An overview. *APMIS*; 110: 3-13

Dastur DK, Manghani DK, Singhal BS (1992) Histopathology and fine structure of the brain in six cases of Creutzfeldt-Jakob disease from western India. *J Neurol Sci*; 108: 154-167

Davies S et al. (2001) Photocytotoxicity of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Biol Med*; 31: 256-265

Dearmond. SJ, Kretzschmar HA, Prusiner SB (2002) Prion diseases. *Greenfield's Neuropathology, seventh edition. Arnold: London, New York, New Dehli*

Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes—implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*; 54: 15-36

Elder M, Sokolova J, Hrebicek M (1997) Follow-up study of subunit c of mitochondrial ATP synthase in Batten disease and in unrelated lysosomal disorder. *Acta Neuropathol*; 93: 379-390

Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*; 28: 351-4

Eng LF, Yu AC, Lee YL (1992) Astrocytic response to injury. *Prog Brain Res*; 94: 353-365

Foley GL, Zachary JF (1995) Rabies-induced spongiform change and encephalitis in a heifer. *Vet Pathol*; 32: 309-311

Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*; 362: 543-546

Forsyth RJ (1996) Astrocytes and the delivery of glucose from plasma to neurons. *Neurochem Int*; 28: 231-41

Frankhauser R (1961) Sporadische Meningo-Encephalomyelitis beim Rind. *Schweiz Arch Tierheilk*; 103: 225-235

Gábor G, Kovács MD, Mark W et al. (2002) Immunohistochemistry for the prion protein: comparison of different monoclonal antibodies in human prion disease subtypes. *Brain Pathol*; 12: 1-11

Gavier-Widen D, Wells GAH, Simmons MM, Wilesmith WW, Ryan J (2001) Histological observations on the brains of symptomless 7-year-old cattle. *J Comp Path*; 124: 52-59

Geisel O. (1993) Anleitung zur Sektion von Haussäugetieren und zur Anfertigung von Sektionsprotokollen. *Institut für Tierpathologie der Universität München*

- Giese A, Groschup MH, Hess B, Kretzschmar HA, (1995) Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol*; 5: 213-221
- Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, Kretzschmar H (1998) Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol*; 8: 449-457
- Graham D, Lantos P (2002) Greenfield's Neuropathology. 7th Edition Arnold London, New York, New Dehli
- Gray F, Chretien F, Adlebiassette H (1999) Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Exp Neurol*; 58: 321-328
- Green AJE, Thompson EJ, Stewart GE, Zeidler M et al. (2001) Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 70: 744-748
- Groschup MH, Weiland F (1992) BSE-Diagnostik. Bundesforschungsanstalt für Viruserkrankungen der Tiere (BFAV), Tübingen
- Guarda F, Fatzer R (1995) Vorkommen von BSE in Italien unter Beachtung unspezifischer neuronaler Vakuolen *Schweiz Arch Tierheilk*; 137:101-103
- Gubler E (2002) Lesion profiles and gliosis in the brainstem of 135 Swiss cows with bovine spongiforme encephalopathy. Inaugural-Dissertation, Universität Zürich Zentralstelle der Studentenschaft
- Hafiz FB, Brown DR (2000) A model of the mechanism of astrogliosis in prion disease. *Mol Cell Neurosci*; 16: 221-232
- Heim, D, Fatzer R, Hörnlimann B, Vandevælde M (1997) Häufigkeit neurologischer Erkrankungen beim Rind. *Schweiz Arch Tierheilk*; 139: 354-362
- Hewicker-Trautwein M (1994) Die feline spongiforme Enzephalopathie. *Kleintierpraxis*; 39: 855-861
- Hill A, Desbruslais M, Joiner S, Sidle K, Gowland I, Collinge J, et al. (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*; 389:448-450
- Hills D, Comincini S, Schlaepfer J, Dolf G, Ferretti L, Williams JL (2001) Complete genomic sequence of the bovine prion gene and polymorphism in its promoter region. *Animal Genetics* ;32: 231-233
- Hirano A (1983) Praktischer Leitfaden der Neuropathologie. Springer Verlag/Wien
- Hooper PT (1999) Spongy degeneration in the central nervous system of domestic animals. *Acta Neuropathol*; 31:325-334

Hsu SM, Raine H, Fanger H (1981) The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*;29: 577-580; 6: 197-198

Hughes PE, Axexi T, Walton M (1999) Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog Neurobiol*; 57: 421-450

Hye CK et al. (2001) Immunohistochemical detection of prion protein and epidemiological study of BSE in Korea. *J Vet Sci*; 2: 25-31

Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M (1994) Glial fibrillary acidic protein: Dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol*; 4: 239-243

Ironside JW, Head MW, McCarkle L, Knight R (2002 a) Neuropathology of variant Creutzfeldt-jakob disease. *Acta Neurobiologiae Experimentalia*;62: 175-82

Ironside JW, McCardle A, Horsburgh A, Lim Z, Head MW; (2002 b) Pathological diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *APMIS*;110:79-87

Ironside JW, Pickard JD (2002) Raised intracranial pressure, oedema and hydrocephalus. *Greenfield's Neuropathology, seventh edition, Arnold, London, New York, New Delhi*

Janz R, Sudhof TC, Hammer RE (1999) Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron*; 24: 687-700

Jeffrey M (1992) A neuropathological survey of brains submitted under the Bovine Spongiform Encephalopathy orders in Scotland. *Vet Rec*; 131: 332-337

Jeffrey M, Halliday WG, Goodsir CM (1992) A morphometric and immunohistochemical study of the vestibular nuclear complex in bovine spongiform encephalopathy. *Acta Neuropathol*; 84: 651-657

Jeffrey M, Halliday WG (1994) Numbers of neurons in vacuolated and non-vacuolated neuroanatomical nuclei in bovine spongiform encephalopathy-affected brains. *J Comp Path*; 110: 287-293

Jeffrey M, Fraser JR, Halliday WG, Fowler N, Goodsir CM, Brown DA (1995) Early unsuspected neuron and axon terminal loss in scrapie-infected mice revealed by morphometry and immunohistochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 21: 41-49

Jeffrey M, Halliday WG, Bell J et al. (2000 a) Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 6 41-5

Jeffrey M, McGovern G, Martin S, Goodsir CM, Brown KL (2000 b) Cellular and sub-cellular localisation of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. *Prion Diseases: Diagnosis and Pathogenesis, Springer-Verlag/Wien*; 23-38

Johnson J, Sudheimer K, Davis K, Winn B (Intrnetveröffentlichung) Atlas of the Sheep Brain Michigan State University, East Lansing, MI, USA www.msu.edu/user/brains/sheepatlas/

Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castano JG, Aronin N, DiFiglia M (2000) Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci*; 20: 7268-7278

Kirino T, Brightman MW, Oertel WH et al. (1983) Neuron-specific enolase as an index of neuronal regeneration and reinnervation. *J Neurosci*; 3: 915-923

Klatzo I (1967) Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol*; 26; 1-14

Klinke R, Sibernagl S (1996) Lehrbuch der Physiologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Kretschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ (1986) Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *American Journal of Pathology*; 122: 1-5

Kretschmar HA, Dahme E (1990) BSE: Die spongiformen Enzephalopathien und die Prionhypothese. *Dt Ärzteb. 87: Heft 38*

Kreutzberg GW (1996) Mikroglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*; 19: 312-318

Laping NJ, Teter B, Nichols NR et al. (1994) Glial fibrillary acidic protein: Regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathol*; 4: 259-275

Laszlo L, Lowe J, Self T (1996) Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J Pathol*; 166: 333-341

Ledoux JM (2001) Bovine spastic paresis: etiological hypotheses. *Medical Hypotheses*; 57: 573-579

Lewandowski M, Chomiak M, Milart Z (1967) A case of spastic paralysis of cattle in a bull. *Med Wet*; 23: 409-413

Liberski PP, Yanagihara R, Gibbs CJ, Gajdusek DC (1992) Neuronal autophagic vacuoles in experimental scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol*; 83:134-139

Liess B (1997) Virusinfektionen einheimischer Haussäugetiere: Ein Leitfaden zur klinischen Veterinärvirologie. 1. Auflage Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

- Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*; 7: 9-18
- LoPachin RMJ, Aschner M. (1993) Glial-neuronal interactions: relevance to neurotoxic mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*; 118: 141-158
- Magistretti PJ, Pellerin L (1996) Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a functional role of astrocytes. *Cereb Cortex*; 6: 50-61
- Markson LM, Terlecki S, Lewis G (1967) Cerebrocortical necrosis in calves. *Vet Rec*; 79: 578-579
- McGill IS, Wells GAH (1993) Neuropathological findings in cattle with clinically suspect but histologically unconfirmed Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). *J Comp Path*; 108: 241-260
- McKenzie D, Bartz JC, Marsh RF (1996) Transmissible mink encephalopathy. *Virology*; 7: 201-206
- McLendon RE, Bigner DD. (1994) Immunohistochemistry of glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations. *Brain Pathol*; 4:221-228
- Meldrum B, Garthwaite J. (1990) EAA pharmacology: excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol*; 11: 379-87
- Meyer H, Bronsch K, Leibetseder J (1993) Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung, 8. Auflage, Verlag M. & H. Schaper, Alfeld-Hannover
- Monserat AJ, Benavides SH, Berra A, Farina, s, Vicario S, Porta E (1995) Lectin histochemistry of lipofuscin and certain ceroid pigments. *Histochemistry*; 103: 435-445
- Narang, H (1996) Origin and implications of bovine spongiform encephalopathy. *Society for Experimental Biology and Medicine; Minireview*
- Navone F, Hahn R, Di Gioia g, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P (1986) Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol*; 103: 2511-27
- O'Doherty E et al. (2002) Prion protein gene polymorphisms associated with natural scrapie cases and their flock-mates in Ireland. *Res Vet Sci*; 73: 243-50
- IOE: Office International des Epizootie. 12, rue de Prony 75017 Paris
- Olney JW, Ho OL, Rhee V (1971) Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res*; 14:61-76
- Olney JW (1986) Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv Exp Med Biol*; 203: 63-45

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gaset M, Serban A, Groth D, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl acad Sci USA*; 90: 10962-10966

Park SK et al., (2000) Differential expression of Bax and Bcl-2 in the brains of hamsters infected with 263K scrapie agent. *Neuroreport*; 11: 1677-1682

Pattison IH, Jones KM (1967) The astrocytic reaction in experimental scrapie in the rat. *Res Vet Sci*; 8: 160-165

Pawel P, Liberski D, Gajdusek C, Brown P, (2002) How do neurons degenerate in prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies: neuronal autophagy revisited. *Acta Neurobiol Exp* 62:141-147

Pearson VL, Rothwell NJ, Toulmond S (1999) Exitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1 beta protein in microglia and astrocytes: correlation with the progression of cell death. *Glia*; 25: 311-323

Pill AH (1967) Evidence of thiamine deficiency in calves affected with cerebrocortical necrosis. *Vet Rec*; 81: 178-181

Porta E (2002) Pigments of Aging: An Overview. *Ann N Y Acad Sci*; 959: 57-65

Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie *Science*; 216: 136-44

Raeber A, Race RE, Brandner S, Priola SA, Sailer A, Bessen RA et al. (1997) Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *EMBO J*; 16: 6057-6065

Ransom BR, Fern R (1997) Does astrocytic glycogen benefit axon function and survival in CNS white matter during glucose deprivation? *Glia*; 21: 134-41

Roebig K, Johansson U, Öllinger K (1999) Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*; 27: 1228-1237

Rolle M & Mayr A (2002) Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart

Romeis B (1989) Mikroskopische Technik. 17. Auflage Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

Rosenberger G (1994) Krankheiten des Rindes. 3. Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin

Salès et al. (1998) Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci*; 10: 2426-2471

- Schmechel DE et al. (1978) Neuron specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature*; 276: 834-836
- Schreuder BEC, Wilesmith JW, Ryan JBM, Strau OC (1997) Risk of BSE from the import of cattle from the United Kingdom into countries of the European Union. *Vet Rec*; 141: 187-190
- Silvermann WF (1992) Neuron-specific enolase reflects metabolic activity in mesencephalic neurons of the rat. *Brain res*; 577: 276-284
- Strehler BL, Mark AS, Mildvan AS, Gee MV (1959) Rate of magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium. *J Gerontol*; 14: 430-439
- Taraboulos A, Serban D, Prusiner SB (1990) Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J Cell Biol*; 110: 2117-2137
- Taylor D (1996) Inactivation of the causal agents of Creutzfeldt-Jakob Disease and other human prion diseases. *Brain Path*; 6: 197-198
- Theil D, Fatzer R, Schiller I, Caplazi P, Zurbriggen A, Vandeveld M (1998) Neuropathological and aetiological studies of sporadic non-suppurative meningoencephalomyelitis of cattle. *Vet Rec*; 143; 244-249
- Theil D, Fatzer RI, Meyer R, Schobesberger M, Zurbriggen A, Vandeveld M (1999) Nuclear DNA fragmentation and immune reactivity in bovine spongiform encephalopathy. *J. Comp Pathol*; 121: 357-367
- Thielen C, Melot F, Jolois O, Leclercq F, Tsunoda R et al. (2001) Isolation of bovine follicular dendritic cells allows the demonstration of a particular cellular prion protein. *Cell Tissue Res*; 306: 49-55
- Tranulis M (2002) Influence of the prion protein gene, *Prnp*, on scrapie susceptibility in sheep. *APMIS*; 110: 33-43
- van Keulen LJM, Schreuder BEC, Vromans MEW, Langveld JPM, Smits MA (2000) Pathogenesis of natural scrapie in sheep. Prion diseases: Diagnosis and Pathogenesis, Springer-Verlag Wien/New York; 57-74
- van Keulen LJM, Vromans MEW, van Zijderveld FG (2002) Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS*; 110: 23-32
- Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ et al. (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 14945-9
- von Sandersleben J, Dämmrich K, Dahme E (1989) Pathologische Histologie der Haustiere. 3. Auflage VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (DDR)
- Wells GAH, Scott AC, Hohnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*; 121: 419-420

Wells GAH, Hancock RD, Cooley WA, Richards MS, Higgins RJ, David GP (1989) Bovine spongiform encephalopathy: Diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet Rec*; 125:521-524

Wells GAH, McGill IS (1992) Recently described Scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res Vet Sci*; 121: 419-420

Wells GAH, Wilesmith JW (1995) The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol*; 5: 91-103

Wells GAH, Sayers AR, Wilesmith JW (1995) Clinical and epidemiological correlates of the neurohistology of cases of histologically unconfirmed, clinically suspected bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec*; 136: 211-216

Wihlmark U, Wrigstad A, Roberg K, Nilsson SE, Brunk UT (1997) Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells causes enhanced sensitivity to blue light irradiation. *Free Radic Biol Med*; 22: 1229-1234

Williams AE, Lawson LJ, Perry VH, Fraser H (1994) Characterization of microglial response in murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 20: 47-55

Williams A, Lucassen PJ, Ritchie D, Bruce M (1997) PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol*; 144: 433-438

Wong BS et al. (2000) Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*; 273: 136-139

Wood JLN, Done SH (1992) Natural scrapie in goats: neuropathology. *Vet Rec*; 131: 93-96

Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM (1999) Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative death execution. *Mol Cell Neurosci*; 14:180-198

Yoshikawa, T (1968) Atlas of the Brains of Domestic Animals *University of Tokyo Press/The Pennsylvania State University Press*

Zerr I, Poser S (2002) Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD. *APMIS*; 110: 88-89

Zlotnik I, Rennie JC (1957) The occurrence of vacuolated neurons and vascular lesions in the medullas of apparently healthy sheep. *J Comp Path*; 67: 30-36

Zlotnik I, Rennie JC (1958) A comparative study of the incidence of vacuolated neurons in the medulla from apparently healthy sheep of various breeds. *J Comp Path*; 68: 411-415

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. W. Schmahl für die Überlassung des Dissertationsthemas und die jede Zeit gewährte, außerordentlich freundliche Unterstützung.

Frau Dr. B. Stierstorfer für die stetige Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit. Ihre zahlreichen Anregungen haben im sehr hohem Maße zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. K. Matiasek für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und die Hilfe beim Anfertigen des Bildmaterials.

Frau Dr. E. Betzl für die persönliche Unterstützung und Hilfe bei den mikroskopischen Untersuchungen.

Frau S. Szász für die histologische und immunhistochemische Bearbeitung der BSE-Verdachtsrinder.

Frau G. Farkas, C. Mair, E.von Lindeiner, E. Schug, A. Siebert, K. Stingl, sowie Frau Wagner und Frau Panic für die stets gewährte Hilfe und freundliche Arbeitsatmosphäre.

b

Lebenslauf

Name: Mali Miyashita

Geburt: 18.7.1967, in Colorado, USA

Nationalität: deutsch

1973-1975 Washington School Grundschule in Berkeley, USA

1975-1980 Takezono-Higashi Grundschule in Ibaraki, Japan

1980-1986 Meikei-Gakuen Highschool in Ibaraki, Japan

1986-1990 Studium der Volkswirtschaftslehre
an der University of Michigan in Ann Arbor, USA
Abschluss: Bachelor of Arts, 1990

1990-1991 Deutschkurse für Ausländer bei der Ludwig-Maximilians-
Universität München, Abschluss: PNdS

1991-1993 Japan Travel Bureau, München: Dolmetscherin

1993-1994 City Hilton München: Japanese Guest Relations

1995-2003 Bain & Company, München: Rezeptionistin

1995-2001 Studium der Tiermedizin
an der LMU München
Staatsexamen: 11.9.2001

November 2001 Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät an der Ludwig-Maximilian-
Universität München