

Aus der Fakultät
Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München
Lehrstuhl für Tierhygiene
Univ.-Prof. Dr. Johann Bauer

Vorgelegt über den
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

**Zum Vorkommen
Transmissibler Spongiformer Enzephalopathien
und bakterieller ZNS-Infektionen
beim Reh-, Rot- und Gamswild
in Bayern**

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

von
Karin Schwaiger
aus Moosburg

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. M. El-Matbouli

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	4
2	LITERATUR	5
2.1	Chronic Wasting Disease	5
2.1.1	Begriff	5
2.1.2	Vorkommen	7
2.1.3	Ätiologie	9
2.1.4	Pathogenese	13
2.1.5	Klinik	14
2.1.6	Pathologie	15
2.1.7	Diagnose	16
2.1.8	Differentialdiagnose	16
2.2	Bakteriell bedingte Enzephalitiden.....	18
2.2.1	Listeriose	18
2.2.1.1	Ätiologie.....	18
2.2.1.2	Züchtung	18
2.2.1.3	Kulturell-biochemische Eigenschaften	19
2.2.1.4	Epidemiologie	22
2.2.1.5	Pathologie und Pathogenese.....	22
2.2.1.6	Klinik	23
2.2.1.7	Diagnose und Differentialdiagnose.....	24
2.2.2	Andere bakteriell bedingte Meningoenzephalitiden.....	24
2.2.2.1	Begriff	24
2.2.2.2	Ätiologie, Pathologie und Pathogenese	25
2.2.2.3	Klinik	27
3	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	Probenbeschaffung	28
3.2	Probenentnahme.....	30
3.2.1	Entnahme von Stammhirn über das Foramen Occipitale.....	30
3.2.2	Hirnsektion	31

3.3	Bakteriologische Untersuchungen	32
3.3.1	Allgemeine bakteriologische Untersuchung	32
3.3.1.1	Anzucht des Probenmaterials	32
3.3.1.2	Bakteriendifferenzierung	32
3.3.2	Selektiver Listerien-Nachweis	36
3.3.2.1	Kultureller Nachweis	36
3.3.2.1.1	Anzuchtmedien	36
3.3.2.1.2	Differenzierungskriterien	38
3.3.2.1.3	Untersuchungsgang	38
3.3.2.2	PCR	39
3.3.2.2.1	Prinzip	39
3.3.2.2.2	Real-Time PCR mit dem Lightcycler	39
3.4	Nachweis von PrP mittels ELISA	44
3.4.1	Das ELISA-Prinzip (enzyme-linked immunosorbent assay)	44
3.4.2	Nachweis von PrP ^{res}	45
3.4.2.1	Reinigung des PrP ^{res}	45
3.4.2.1.1	Inhalt des Kits	45
3.4.2.1.2	Entnahme von Hirngewebe	45
3.4.2.1.3	Durchführung der Reinigung	46
3.4.2.2	Detektion des PrP ^{res}	48
3.4.2.2.1	Inhalt des Kits	48
3.4.2.2.2	Testdurchführung	49
3.4.3	Überprüfung des Testsystems für Cervidae	51
3.4.3.1	Nachweis von PrP ^{sen}	51
3.4.3.2	Prüfung von CWD-positiven Proben	51
3.4.4	Untersuchung der Feldproben	52
3.4.5	Berechnung der Prävalenz	52
3.5	Histologische Untersuchungen	52
3.5.1	Hämalaun-Eosin- (HE-) Färbung	52
3.5.2	Immunhistochemie	55
3.5.2.1	Prinzip	55
3.5.2.2	Optimierung der Vorbehandlung der Schnittpräparate	55
3.5.2.3	Durchführung der optimierten Methode	57
4	ERGEBNISSE	61
4.1	Bakteriologische Untersuchung	61
4.1.1	Allgemeine bakteriologische Untersuchung	61
4.1.2	Selektiver Listerien-Nachweis	65
4.1.2.1	Resultate der kulturell-biochemischen Identifizierung	65
4.1.2.2	Ergebnisse der PCR-Identifizierung	66
4.1.2.3	Verteilung der Listerienbefunde	68
4.1.3	Histologie	69

4.2	TSE-Nachweis	74
4.2.1	Eignung des Verfahrens zum Nachweis cervider Prionen	74
4.2.2	Resultate der „Feldproben“	75
4.2.3	Immunhistochemie	75
4.2.3.1	Optimierung der Vorbehandlung der Schnittpräparate	76
4.2.3.2	Durchführung der Immunhistochemie mit der optimierten Methode	79
5	DISKUSSION	80
5.1	Methodisches Vorgehen	80
5.1.1	Gewinnung des Probenmaterials	80
5.1.2	Bakteriologische Methoden	80
5.1.3	Nachweis von PrP ^{res} mittels ELISA	83
5.1.4	Histologische Untersuchungen	84
5.2	Feldproben	85
5.2.1	Bakteriologische und histologische Untersuchungsergebnisse	85
5.2.2	TSE bei Wildwiederkäuern in Bayern	90
6	ZUSAMMENFASSUNG	92
7	SUMMARY	94
8	LITERATURVERZEICHNIS	96
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	116
10	ANHANG	118
10.1	Abbildungsverzeichnis	118
10.2	Tabellenverzeichnis	120
10.3	Detaillierte Auflistung der Befunde der allgemeinen bakteriologischen Untersuchung	121
10.4	BBL-Auswertung und Konfidenz der einzelnen Isolate	133

1 EINLEITUNG

Seit Mitte der 60er Jahre tritt bei einigen Hirscharten in Nordamerika die Chronic Wasting Disease (chronisch zehrende Hirschkrankheit, CWD) auf. Es handelt sich hierbei, wie auch bei BSE, um eine Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE), gekennzeichnet durch sehr lange Inkubationszeiten und einen chronisch progredienten Verlauf mit stets tödlichem Ausgang.

Als am 26. November 2000 der erste BSE-Fall eines in Deutschland geborenen und aufgewachsenen Rindes vom nationalen Referenzlabor in Tübingen amtlich bestätigt wurde, rückten die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien in den Mittelpunkt des öffentlichen Interesses. Da über den Ursprung und die Übertragbarkeit der TSE auf den Menschen nur wenig bekannt war, wuchs die Unsicherheit des Verbrauchers. Bald wurden vom Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft Forderungen laut, auch Wildtiere auf die sogenannten Prionenerkrankungen zu untersuchen. Ein entsprechendes Gesetz sollte eine stichprobenartige Untersuchung von erlegtem Reh- und Damwild regeln und Anfang 2002 in Kraft treten.

Da noch keine Daten vorlagen, inwieweit die Chronic Wasting Disease auch hierzulande ein Problem darstellt, sollten erste, orientierende Analysen prüfen, ob die CWD auch bei unseren heimischen Tierarten vorkommt. Aus differentialdiagnostischen und epidemiologischen Gründen wurden zusätzlich bakteriell bedingte Enzephalopathien (insbesondere Listeriose) berücksichtigt.

2 LITERATUR

2.1 Chronic Wasting Disease

2.1.1 Begriff

Die Chronic Wasting Disease (CWD) zählt zur Gruppe der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE), was wörtlich übersetzt „übertragbare schwammartige Hirnerkrankungen“ bedeutet. Sie tritt seit Mitte der 60er Jahre bei Großbohrhirschen (*Odocoileus hemionus hemionus*), Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginianus*), Schwarzwedelhirschen (*Odocoileus hemionus columbianus*) und Rocky-Mountain-Rothirschen (*Cervus elaphus nelsoni*) in Nordamerika auf (Williams und Young, 1980, 1982; Spraker et al., 1997).

Alle bekannten TSE-Erkrankungen des Menschen und der Säugetiere sind tödlich verlaufende, neurodegenerative Krankheiten, für die es bisher keine Therapie gibt. Sie sind gekennzeichnet durch sehr lange, symptomlose Inkubationszeiten und eine relativ kurz andauernde, progressive Krankheitsphase, in der nach leichten neurologischen Symptomen wie Zittern schnell schwere Krankheitserscheinungen wie Muskelkrämpfe, Demenz und Bewusstseinsverlust auftreten (Zobeley und Glockshuber, 2001). Nach dem derzeitigen Kenntnisstand können die in den Tabellen 1 und 2 dargestellten Formen der TSE unterschieden werden.

Tabelle 1: TSE-Erkrankungen des Menschen (Zobeley und Glockshuber, 2001)

Krankheit	Herkunft und Verbreitung	Typische Symptome
Sporadische Creutzfeld-Jakob Krankheit (CJD)	Spontane Umwandlung des gutartigen Prionproteins ohne Mutation, ein Fall pro Million Einwohner pro Jahr	Demenz, Verlust der Koordinationsfähigkeit, Gedächtnisverlust, Myoklonie, unwillkürliche Bewegungen
Erbliche Form der Creutzfeld-Jakob Krankheit	Keimbahnmutationen im Gen für das Prionprotein, 20 Varianten sind bekannt in verschiedenen betroffenen Familien	
Iatrogene Creutzfeld-Jakob-Krankheit (erworben bei invasiver medizinischer Behandlung)	Infektion durch kontaminiertes Wachstumshormon, chirurgische Instrumente, Dura mater- und Hornhauttransplantate	Demenz, Verlust der Koordinationsfähigkeit, Gedächtnisverlust, Myoklonie, unwillkürliche Bewegungen
Neue Variante der Creutzfeld-Jakob Krankheit (nvCJD)	Verzehr von BSE-infiziertem Rindfleisch (?)	Depression, Ängstlichkeit, Ataxie, Gleichgewichtsstörungen (Alter bei Beginn der Krankheit: 19 – 39 Jahre)
Gerstmann-Sräussler-Scheinker-Syndrom (GSS), erblich	Keimbahnmutationen im Gen für das Prionprotein	Ataxie, progressive Demenz
Fatale familiäre Schlaflosigkeit (FFI)	Keimbahnmutationen im Gen für das Prionprotein	Tödliche Schlaflosigkeit
Kuru	Infektion durch rituellen Kannibalismus (Papua Neuguinea)	Ataxie, Zittern, Inkoordination, Demenz

Tabelle 2: TSE-Erkrankungen beim Tier (Zobeley und Glockshuber, 2001)

Krankheit	Wirt	Herkunft und Verbreitung	Typische Symptome
Scrapie	Schafe, Ziegen	Infektion von (genetisch) anfälligen Tieren, sporadisch (?)	Ataxie, Kratzen, chronische Auszehrung
Transmissible Nerz Enzephalopathie (TME)	Nerz	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl (?)	Ataxie, Kratzen, Jucken, metabolische Auszehrung
Chronische Auszehrungskrankheit (CWD)	Hirschartige	Herkunft unbekannt; Verbreitung Nordamerika; bis zu 15 % des natürlichen Wildbestandes infiziert	Metabolische Auszehrung, Ataxie
Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	Rind	Infektion durch kontaminiertes (Scrapie oder BSE) Tiermehl, maternale Übertragung (?)	Ataxie, Unkoordiniertheit, Reiben
Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)	Hauskatze, Raubkatzen im Zoo	Infektion durch kontaminiertes Rindfleisch	Chronische Auszehrung, Reiben, Ataxie
Exotische Huftier Enzephalopathie	Nyala-, Oryx-, Kudu-Antilope	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl	Ataxie

2.1.2 Vorkommen

In den Jahren 1967 - 1979 konnten Williams und Young (1980) bei 53 Großbohrhirschen (*Odocoileus hemionus hemionus*) und einem Schwarzwedelhirsch (*Odocoileus hemionus columbianus*) die Chronic Wasting Disease diagnostizieren. Es handelte sich hierbei um in Gattern gehaltene Tiere aus Colorado und Wyoming (USA). Zwischen 1981 und 1995 wurden bei 49 in freier Wildbahn lebenden Cerviden (Hirschartigen) spongiforme Enzephalopathien nachgewiesen.

Es handelte sich hierbei im Einzelnen um

- 41 Großbohrhirsche (*Odocoileus hemionus hemionus*)
- 6 Rocky-Mountain-Rothirsche (*Cervus elaphus nelsoni*)
- 2 Weißwedelhirsche (*Odocoileus virginianus virginianus*)

aus dem Norden Colorados (USA) (Spraker et al., 1997; Williams und Young, 1982).

1996 wurde die CWD erstmals auf einer Wapiti-Ranch in Saskatchewan in Kanada nachgewiesen (Knight, 2002). Nach einer Lockerung der kanadischen Einfuhrbestimmungen für lebendes Wild waren bis zum Jahr 2000 weitere 40 Ranches in Saskatchewan und 2 in Alberta betroffen. Im April 2001 traten dann 5 Fälle in der freien Wildbahn Kanadas (in Saskatchewan) bei Maultierhirschen auf (Huber, 2001; Canadian Food Inspection Agency, 2002).

Seit 1996 trat die CWD noch bei 13 Wapiti-Farmen in 5 verschiedenen Staaten Nordamerikas (South Dakota, Nebraska, Oklahoma, Colorado und Montana) auf (Williams und Miller, 2002; Miller und Fischer, 2000).

Bis April 2002 wurden zusätzlich 12 infizierte Tiere in Wisconsin entdeckt. Außerdem wurden 2 infizierte Großbohrhirsche westlich der Rocky Mountains in Colorado gefunden. Die Rocky Mountains galten bislang als natürliche Barriere für die Ausbreitung der CWD nach Westen (Knight, 2002).

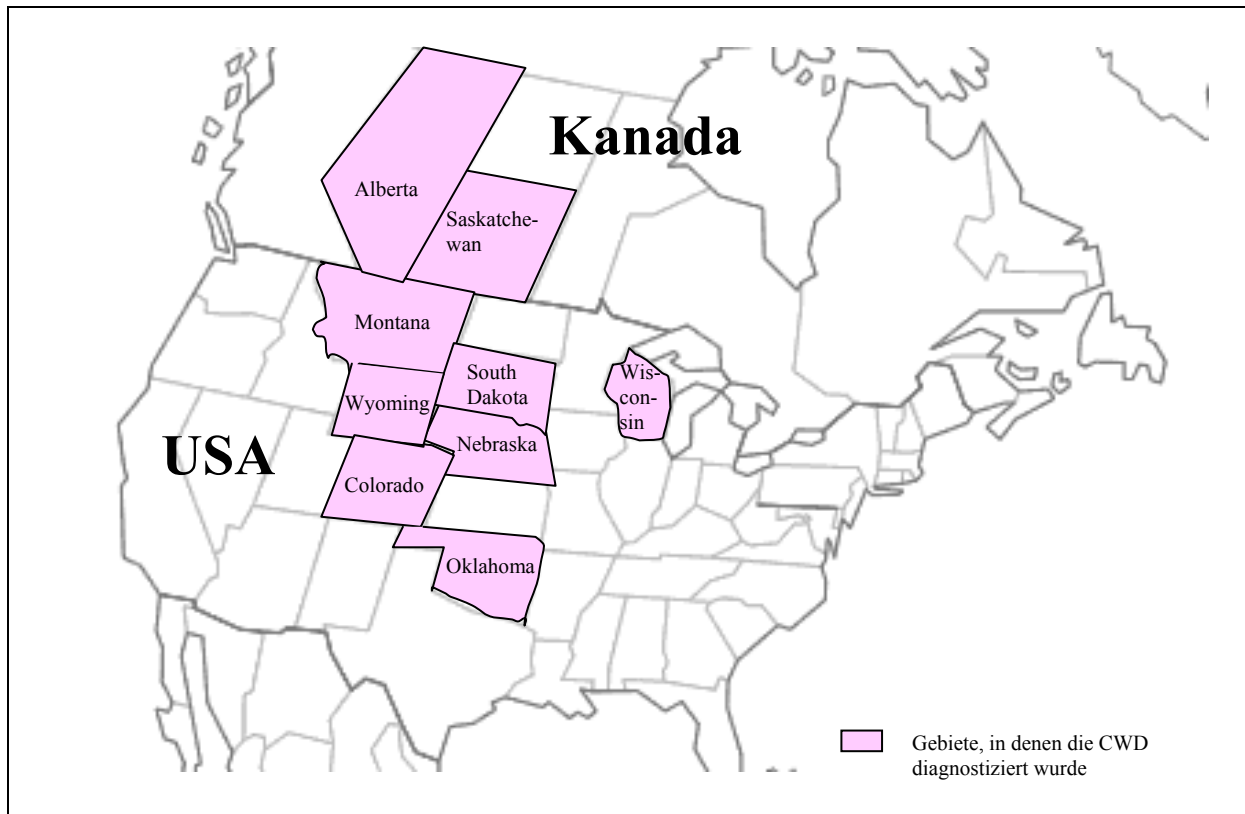


Abbildung 1: CWD in Nordamerika und Kanada

Immunhistochemische Untersuchungen an freilebenden Cerviden ($n = 5513$) in Colorado und Wyoming ergaben eine mittlere Prävalenzrate von 4,9 % bei Großohrhirschen, 2,1 % bei Weißwedelhirschen und 0,5 % bei Rocky-Mountain-Rothirschen in den endemischen Gebieten. In den nicht endemischen Gebieten wurde dagegen kein einziger positiver Fall entdeckt (Miller et al., 2000).

2.1.3 Ätiologie

Der Auslöser bzw. Erreger der CWD ist bis heute nicht eindeutig identifiziert, aber wahrscheinlich handelt es sich, wie bei den anderen transmissiblen spongiformen Enzephalopathien, um ein Proteinase-resistentes Prion (PrP^{res}).

Folgende Resultate bekräftigen diese Theorie:

Bei einer Untersuchung von 49 Cerviden, deren Histologie charakteristisch war für eine spongiforme Enzephalopathie (schwammartige Durchlöcherung der grauen Substanz, intraneuronale Vakuolisierung und Neuronendegeneration), konnte in 26 Fällen sogenanntes Scrapie-assoziiertes Prionprotein mittels Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie und Western blot nachgewiesen werden (Spraker et al., 1997).

Ferner untersuchten Peters et al. (2000) Hirngewebe von 17 Wapiti-Hirschen, die aus einer in Gefangenschaft gehaltenen Herde stammten, in der die Chronic Wasting Disease kurz vorher auftrat. Mit einer immunhistochemischen Methode konnte in 10 Fällen das Protease-resistente Prionprotein detektiert werden, welches speziesunabhängig als Marker für spongiforme Enzephalopathien gilt.

Der Name „Prion“ wurde 1982 von Prusiner eingeführt und steht für „Proteinaceous infectious particle“, wobei die genaue Abkürzung „Proin“ zugunsten der leichteren Sprechweise in „Prion“ geändert wurde (Prusiner, 2001). Im Gegensatz zu den bisher bekannten, konventionellen Erregern (Bakterien, Pilze, Viren, Parasiten) konnte in den infektiösen Prionen keine Nucleinsäure als Erregerbestandteil gefunden werden: Verschiedene Scrapie-Hirnextrakte wurden mit UV-Licht und mit kurzweiliger ionisierender Strahlung behandelt, wodurch die postulierte vorhandene Nucleinsäure zerstört werden sollte. Dennoch blieben diese Extrakte infektiös (Alper et al., 1966; Alper et al., 1967), während Substanzen, die Proteine abbauen oder deren natürliche Faltung auflösen (denaturieren), die Infektiosität verringerten (Prusiner, 1982; Prusiner, 1984). Dies führte zu der Annahme, dass dem Erreger die Nucleinsäuren fehlen, so dass er weder ein Virus noch ein anderes konventionelles infektiöses Agens sein konnte. Bereits 1967 erwähnte Griffith erstmals für den Erreger der Scrapie-Krankheit bei Schafen die „Nur-Eiweiß-Hypothese“, und Prusiner formulierte sie 1982 in allgemeiner Form neu. Zur Abgrenzung dieser Erregerklasse prägte Prusiner den Begriff Prion. Kurz danach wurde entdeckt, dass Scrapie-Prionen konstant ein Protein enthalten, das kurz „PrP“ für „Prion-Protein“ genannt wird (Bolton et al., 1982).

Das Gen, das für das Prionprotein codiert, konnte auf den Chromosomen von allen untersuchten Säugetierspezies gefunden werden. Zudem zeigte sich, dass dieses PrP-Gen die meiste Zeit aktiv ist, so dass jeder tierische und menschliche Organismus PrP-mRNA und Prion-Protein herstellt, ohne selbst zu erkranken (Basler et al., 1986; Oesch et al., 1985). Die normale Funktion dieses im Körper weit verbreiteten Proteins ist nur teilweise bekannt, da PrP-Knockout-Mäuse keine Entwicklungs- oder Verhaltensauffälligkeiten zeigten (Collinge, 1994; Büeler, 1992). Es wird angenommen, dass es als kupferbindendes Protein an der Synapse eine Rolle spielt. Kupferionen binden an eine hoch konservierte Oktapeptid-Repeatsequenz (PHGGGWGQ) in der Nähe des N-Terminus des Prionproteins. Eine verminderte Kupferkonzentration in synaptischen Membranfraktionen der PrP^{0/0}-Maus kommt vermutlich durch eine aufgrund des Verlusts des Prionproteins verminderte Wiederaufnahme des Kupfers zustande, das bei der synaptischen Vesikelfreisetzung in den

synaptischen Spalt gelangt. (Broussolle et al., 1989; Collinge et al., 1994; Stöckel et al., 1998; Viles et al., 1999). Über die primäre Funktion des PrP^C gibt es verschiedene Hypothesen: entweder soll es das bei der synaptischen Vesikelfreisetzung freigesetzte Kupfer abfangen, um somit unspezifische Bindungen an andere Proteine zu verringern, oder die Bindung von Kupfer durch PrP^C dient primär der Wiederaufnahme von Kupfer aus dem extrazellulären Milieu in die Präsynapse über Endozytose (Pauly und Harris, 1998; Shyng et al., 1994), oder aber das Cu²⁺ ist von struktureller Bedeutung für den N-Terminus des Prion-Proteins (Marcotte und Eisenberg, 1999).

Da Prionen auch natürlicherweise im Körper vorkommen, folgerte Prusiner (1982) daraus, dass PrP in zwei Formen auftritt – einer normalen, harmlosen Form und einer veränderten, pathogenen Form. Diese beiden Formen werden unter anderem aufgrund ihrer Proteinase-Empfindlichkeit unterschieden: Die physiologische Form reagiert Proteinase-sensitiv, während sich die krankmachende Form als sehr resistent gegenüber Protein abbauenden Enzymen erweist (Barry et al., 1986). Genau genommen sind jedoch nur die C-terminalen 141 Aminosäuren von PrP^{Sc} gegen Proteinase K Proteolyse stabil, während ein N-terminales Peptid von etwa 68 Aminosäuren abgespalten wird, wobei die Infektiosität voll erhalten bleibt. Hierbei wird das Molekulargewicht von 33.000 – 35.000 Da auf 27.000 – 30.000 Da reduziert, weshalb man von PrP 27 – 30 spricht. Dieses Folgeprodukt von PrP^{Sc} bildet bei Einwirkung von Proteinase K und Detergenzien amyloide Strukturen aus, die sogenannten „Prion-Rods“ (McKinley et al., 1991), welche schon 1981 elektronenmikroskopisch unabhängig vom Prion-Modell im Hirnmaterial infizierter Individuen entdeckt und als Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) bezeichnet wurden (Merz et al., 1981).

Die in infektiösen Prionen enthaltene unlösliche und oligomere Form des Prionproteins bezeichnet man als „Scrapie-Form“, abgekürzt PrP^{Sc}. Der wesentliche Unterschied zwischen dem gutartigen, zellulären PrP (PrP^C) und dem Scrapie-PrP liegt in der Art ihrer Konformation, also ihrer räumlichen Faltung; die Aminosäuresequenz (Konstitution) ist innerhalb einer Spezies gleich: Bei PrP^C ist die Aminosäurekette zu einem großen Teil zu α -Helices schraubig aufgewunden, während PrP^{Sc} mehr zu β -Faltblättern gestreckte Bereiche enthält, wobei zwei antiparallel aneinander gelagerte β -Stränge eine sog. β -Faltblattstruktur ausbilden, vgl. Abbildung 2 (Pan et al., 1993). Kommt PrP^C mit PrP^{Sc} in Kontakt, wird es im Sinne einer Konformationsänderung umgewandelt. Vermutlich wird ein katalytischer Zyklus in Gang gesetzt, indem das umgewandelte, d. h. neu entstandene PrP^{Sc} gleichzeitig als

Umwandlung induzierendes PrP^{Sc} wirkt. Die Polypeptidkette wird selbst nicht neu synthetisiert (Prusiner, 1982).

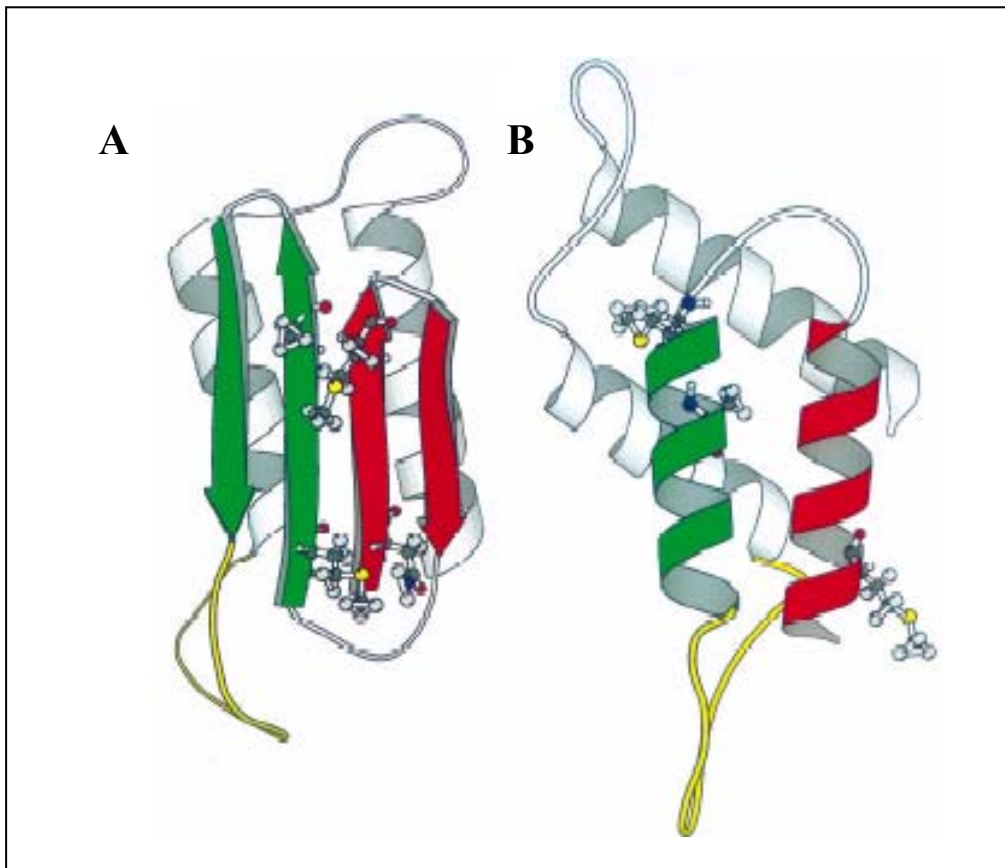


Abbildung 2: Struktur des PrP^{Sc} (A) und des PrP^C (B) (Huang et al., 1996)

Hinweise für die Richtigkeit der „Nur-Eiweiß-Hypothese“ konnte die Gruppe von C. Weissmann (1993) durch Versuche mit PrP-knockout-Mäusen geben: PrP 0/0-Mäuse, also Mäuse, denen das Gen für das Prionprotein in beiden Chromosomensätzen fehlt, blieben nach Infektion mit PrP^{Sc} für mindestens 13 Monate gesund, während alle Wildtyp-Kontrollmäuse innerhalb von 6 Monaten starben. Auch heterozygote PrP 0/+ -Mäuse zeigten eine verstärkte Scrapie-Resistenz.

Eine weitere Theorie besagt, dass ein Mangan-Überschuss bei gleichzeitigem Cu/Se/Zn- und Fe-Mangel die Krankheit auslösen könnte, indem Mn bei einem Cu-Mangel das Cu im PrP^C ersetzt und so zu einer Konformationsänderung in die Proteinase-K-resistente Form führt. Cu-bindende Insektizide könnten dabei eine Rolle als Co-Faktor spielen. Dies wird durch entsprechende Boden- und Futterpflanzenuntersuchungen bekräftigt (Purdey, 2000; Brown et al., 2000).

2.1.4 Pathogenese

Die CWD wird vermutlich horizontal, also durch direkten Kontakt mittels Se- und Exkrete (Speichel, Urin, Kot), übertragen. Eine intrauterine Ansteckung oder Übertragung vom Mutter- auf das Jungtier spielt vermutlich keine Rolle (Miller et al., 1998; 2000).

Im Gegensatz zur BSE erscheint eine Infektion mit verseuchtem Tiermehl unwahrscheinlich, da weder in Gefangenschaft gehaltene noch frei lebende Tiere Zugang zu Futter mit tierischem Eiweiß hatten (Miller et al., 1998; Williams und Young, 1992).

Großohrhirschen wurde Hirnmaterial von an CWD erkrankten Tieren oral verabreicht. Bereits nach 42 Tagen konnte PrP^{res} in den retropharyngealen Lymphknoten, Tonsillen, Peyerschen Platten und ileocaecalen Lymphknoten nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis auf den Übertragungsweg der CWD sein (Sigurdson et al., 1999).

Die Epidemiologie der CWD wurde ausführlich von Conner et al. (2000) und Miller et al. (1998; 2000) untersucht. Die Morbidität lag bei den Ausbrüchen bei Gattertieren zwischen 17 % und 36 %. Andere Autoren (Williams und Young, 1980; 1982; 1992) fanden eine Erkrankungsrate zwischen 3 % und 90 %. Diese großen Differenzen lassen sich evtl. auf die unterschiedlich langen Beobachtungszeiträume zurückführen, die wegen der langen Inkubationszeit der Krankheit eine wesentliche Rolle bei der Bewertung der kumulierten Morbiditätsrate spielen dürften (Beiglböck, 2001).

Eine große Rolle bei der Übertragbarkeit von TSE zwischen verschiedenen Spezies spielt die Ähnlichkeit des Prionprotein-Genotyps von Wirt und Empfänger. Je größer die Übereinstimmung zwischen den Spezies, um so effektiver die Konversion der PrP^{sen} (= PrP^C) in die proteaseresistente Form (Prusiner et al., 1990).

Raymond et al. (2000) untersuchten Hirnhomogenat von CWD-infizierten Tieren (Großohrhirsche, Rocky-Mountain-Rothirsche und Weißwedelhirsche) mittels Immunoblot. Das Material zeigte Proteinase K resistente Banden in der erwarteten Größe von ungefähr 19 – 30 kDa. Anschließend wurde Hirnhomogenat von gesunden Cerviden, Schafen, Rindern und Menschen mit dem infizierten Homogenat inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein erhöhtes Signal der Proteinase K Resistenz mittels Immunoblot nachgewiesen. Diese in-vitro-Untersuchungen zeigten eine hohe PrP^{CWD}-induzierte Konversionsrate des PrP^{sen} bei Cerviden, eine mittlere Rate bei Schafen und eine sehr niedrige Rate bei Rindern und Menschen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Speziesbarriere hin. Damit wird das Risiko einer Infektion von Nicht-Cerviden mit CWD als relativ gering eingeschätzt.

Allerdings entwickelten 24 und 27 Monate nach intrazerebraler Applikation von CWD-infiziertem Hirnmaterial 3 von 13 Rindern neurologische Symptome. Mittels Immunhistochemie und Western blot konnte PrP^{res} in allen 3 Fällen nachgewiesen werden. Die verbliebenen 10 Tiere waren 3 Jahre nach Inokulation noch am Leben und erschienen gesund (Hamir et al., 2001).

Dass auch die genetische Disposition eine Rolle spielen könnte, zeigte eine Studie von O'Rourke et al. (1998), da Rocky-Mountain-Rothirsche, die am PrP^C Codon 132 homozygot für Methionin waren, im Vergleich zu heterozygoten Kontrollgruppen bei den erkrankten Tieren überrepräsentiert waren.

2.1.5 Klinik

Typisch für den Verlauf der Krankheit sind die lange Inkubationszeit, die ca. 2 Jahre beträgt, und der protrahierte Verlauf (bis zu 12 Monate), der stets letal endet. Betroffen sind weibliche, männliche und kastrierte Tiere in gleichem Maße ab einem Alter von 2 Jahren.

Zunächst kann man Apathie, progressiven Gewichtsverlust und Niedergeschlagenheit beobachten. Am auffälligsten sind die Dehydratation und die hochgradige Abmagerung der Tiere, was auch der Krankheit den Namen gab: Chronic Wasting Disease bedeutet „Chronische Auszehrungskrankheit“ (Williams und Young, 1980; vgl. Abbildung 3).



(http://www.gmfsh.state.nm.us/PageMill_TExt/WildlifeMgmt/deermgmt.html)

Abbildung 3: Maultierhirsch: Hochgradige Abmagerung und struppiges Haarkleid; typisch für CWD

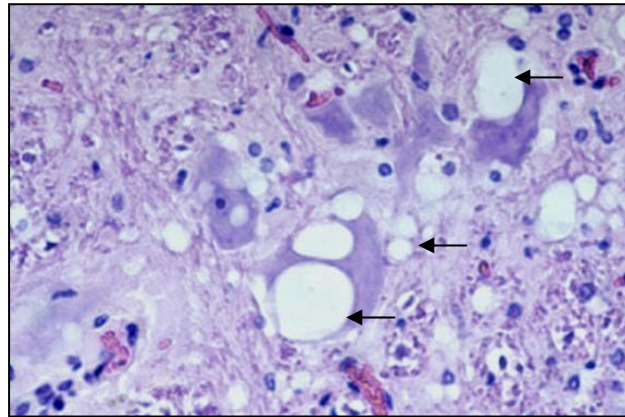
Die Mehrheit der betroffenen Tiere zeigt Polydipsie, Polyurie, vermehrten Speichelfluss, Zähneknirschen, Hypotonie der Gesichtsmuskulatur, Hängenlassen von Kopf und Ohren und Anorexie. Bei manchen Tieren treten Oesophagushypotonie und -dilatation auf. Daraus resultieren Schwierigkeiten beim Abschlucken, Regurgitieren von Panseninhalt und Appetitlosigkeit. Verhaltensänderungen können sich in Teilnahmslosigkeit, aber auch in Übererregbarkeit zeigen (Williams und Young, 1980; Spraker et al., 1997). Nur selten weisen die Tiere Nachhandataxien auf, nie ist Juckreiz vorhanden (Braun, 1998). Oft sterben die Tiere an einer sekundären Aspirationspneumonie (Williams und Young, 1980; Spraker et al., 1997).

2.1.6 Pathologie

Bei der Sektion können makroskopisch keine spezifischen Veränderungen festgestellt werden. Der häufig auftretende schaumige Inhalt und die starke Versandung des Pansens sind als Folgen der gestörten Futteraufnahme zu werten. Blut-, Harn- oder Liquoruntersuchungen erscheinen ebenfalls unauffällig. Lediglich das spezifische Gewicht des Urins ist infolge der Dehydratation erhöht (Williams und Young, 1980).

Stets kann Abmagerung mit vollständigem Verlust des subkutanen und abdominalen Fettgewebes und eine seröse Atrophie der noch verbleibenden Fettdepots beobachtet werden (Spraker et al., 1997).

Charakteristische Veränderungen finden sich bei der neurohistopathologischen Untersuchung des ZNS: Multiple Vakuolisierung oder spongiforme Veränderungen des Neuropils, v. a. der grauen Substanz von Rückenmark, Medulla oblongata, Pons, Mesenzephalon, Thalamus, Hypothalamus und Cortex; darüber hinaus findet man einzelne oder multiple intrazytoplasmatische Vakuolen in den Perikaryen und Degeneration der Neuronen. Herdförmige Läsionen treten auch im Bulbus olfactorius der Frontallappen auf (vgl. Abbildung 4).



(http://www.cvmb.colostate.edu/dlab/webdocs/special_cases/histostain.html)

Abbildung 4: Histopathologie der CWD: Multiple Vakuolisierung des Nervengewebes

In spezifischen Nuclei von Thalamus, Mesencephalon und Medulla oblongata, die immer betroffen sind, zeigen sich Astrozytenhypertrophie und fibrilläre Hyperplasie, wobei entzündliche Infiltrate fehlen (Williams und Young, 1980; 1982; 1992; 1993).

Immunhistochemisch können Amyloidablagerungen nachgewiesen werden, die als SAF (Scrapie associated fibrils) bezeichnet werden, da diese Plaques auch bei Schafen mit Scrapie nachgewiesen wurden (Guiroy et al., 1991; 1993; Bahmanyar et al., 1985).

2.1.7 Diagnose

Die beschriebenen klinischen Veränderungen (Abmagerung, struppiges Haarkleid usw.) sollten den Verdacht auf CWD lenken.

Hamir et al. (2001), Peters et al. (2000) und O'Rourke et al. (1998) beschreiben die Immunhistochemie mittels monoklonaler Antikörper (F 89/160.1.5) an Gewebeschnitten der Medulla oblongata (v. a. der Obexregion) als zuverlässigste Nachweismethode, da präklinisch infizierte Tiere oft noch keine histopathologischen Veränderungen zeigten, während die Immunhistochemie schon eindeutig positiv reagierte.

2.1.8 Differentialdiagnose

Alle Krankheiten, die das ZNS betreffen, müssen differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden. Dabei können in Anlehnung an Beiglböck (2001), Bago et al. (2001) und El Dirdiri et al. (1981) folgende Erkrankungen eine Rolle spielen:

➤ ***viral bedingte Enzephalopathien***

- Aujeszkysche Krankheit
- Bornasche Krankheit
- bovine Herpesvirus-Meningoenzephalitis
- FSME (Frühsommer-Meningoenzephalitis)
- Tollwut
- Visna

➤ ***bakteriell bedingte Enzephalopathien***

- Listeriose
- Streptokokkenenzephalitis
- Fusobakterien, Corynebakterien, E. coli usw.

➤ ***parasitär bedingte Enzephalopathien***

- Toxoplasmose
- Sarcosporidiose
- Setarienbefall
- Bandwurmfinnenbefall usw.

➤ ***Mangelercheinungen***

- Kupfermangel
- Vitamin B₁-Mangel

➤ ***Vergiftungen***

- Blei
- Arsen
- Quecksilber
- diverse Pflanzen (z. B. gemeiner Stechapfel, Datura stramonium)

➤ ***Sonstiges***

- Kreuzlähme
- Erkrankungen der peripheren Nerven und der Muskulatur

2.2 Bakteriell bedingte Enzephalitiden

2.2.1 Listeriose

2.2.1.1 Ätiologie

Listeria monocytogenes ist der Erreger der weltweit verbreiteten Listeriose, einer bei Tieren und beim Menschen sporadisch auftretenden Infektionskrankheit.

Frisch isolierte Stämme erscheinen fast ausschließlich in der S-Form (Abkürzung für Smoothform, Glattform). Unter künstlichen Züchtungsbedingungen können R-Formen (Abkürzung für Roughform, Rauform) auftreten, deren Fäden eine Länge zwischen 50 und 100 µm erreichen. Die Konsistenz dieser Kolonien ist bröckelig, die Hämolyse nur schwach angedeutet.

Im Mikroskop stellen sich Listerien als grampositive, kokkoide, bewegliche, etwa 0,6 bis 2 µm lange Stäbchen dar. In Kulturausstrichen sind zwar häufiger Palisaden-, V- und Y-Formen zu sehen, dennoch kann die Anordnung der Kurzstäbchen zueinander nicht als besonderes Charakteristikum bezeichnet werden. (Bisping und Amtsberg, 1988).

2.2.1.2 Züchtung

Listeria monocytogenes wächst auf einfachen festen und in flüssigen Nährmedien. Zusätze von Blut, Serum oder Traubenzucker wirken wachstumsfördernd. Das Wachstum erfolgt in einem Temperaturbereich von 3 bis 45 °C, das Optimum liegt zwischen 30 und 37 °C. Listerien gedeihen in einem pH-Bereich von 5,6 bis 9,6, das pH-Optimum liegt bei pH 7. Zur Anzucht werden neutrale oder schwach alkalische Nährmedien bevorzugt. Die Kultivierung wird unter aeroben Bedingungen vorgenommen; durch eine 5- bis 10 %ige CO₂-Atmosphäre lässt sich das Wachstum verbessern (Krämer, 1997; Seeliger, 1958).

Auf Blutagar, der zur Anzucht gut geeignet ist, bilden sich nach 24 h bei 37 °C sehr kleine, durchscheinende, glattrandige Kolonien, die nach 48 h eine grauweiße Farbe annehmen, etwa 0,5 bis 2 mm groß sind und von einem schmalen hämolytischen Hof umgeben werden (Bisping und Amtsberg, 1988; Seeliger, 1958).

Für die Beurteilung der auf durchsichtigen Nährmedien (Nähragar, Tryptoseagar) gewachsenen *L. monocytogenes*-verdächtigen Kolonien wird die Schrägdurchleuchtung der Plattenkulturen empfohlen (Bisping und Amtsberg, 1988; Henry, 1933). Da die Kolonien der S-Form hierbei eine charakteristische, blaugüne bis blaugraue Farbe und eine zart gewebte

Oberfläche (Textur) aufweisen, sind sie in Mischkulturen schnell zu identifizieren (Bisping und Amtsberg, 1988).

Bei Züchtungstemperaturen von 20 bis 25 °C bildet *L. monocytogenes* 4 peritrich angeordnete Geißeln aus; über 30 °C nimmt die Zahl der Geißeln ab, so dass für die Beweglichkeitsprüfung im hängenden Tropfen oder im Schwärmagar eine Anzüchtung bei 20 °C notwendig ist. Dabei zeigen sie typische taumelnde, sich überschlagende, rotierende Bewegungen (Bisping und Amtsberg, 1988; Lovett, 1990).

Bemerkenswert ist die hohe Kochsalzresistenz der Listerien: in 10 % NaCl können sie sich noch vermehren. (Krämer, 1997; Lovett, 1990). Auch gegenüber sonstigen Umwelteinflüssen sind die Keime relativ widerstandsfähig, wie der Nachweis in Wasser, Boden, Kot usw. zeigt (Selbitz, 2002).

2.2.1.3 Kulturell-biochemische Eigenschaften

Aufgrund serologischer Antigenanalysen (verschiedene O- und H-Antigene in unterschiedlichen Kombinationen (Paterson, 1939; Seeliger, 1958)) lassen sich die Serotypen 1/2, 3, 4, 5, 6, 7 und eine Reihe von Subtypen unterscheiden. Die Serotypen 1 und 4 kommen am häufigsten vor, v. a. 1/2 a, 1/2 b und 4 b (Vazquez-Boland et al., 2001; Low und Linklater, 1985) Die zur Identifizierung erforderlichen biochemischen Reaktionen sind in der Tabelle 3 dargestellt .

Tabelle 3: Biochemische Eigenschaften von Listerien (in Anlehnung an Sneath, 1986)

Charakteristika	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i> ssp. <i>grayi</i>	<i>L. grayi</i> ssp. <i>murrayi</i>	<i>L. denitrificans</i>
Unregelmäßige, gramlabile Stäbchen	-	-	-	-	-	-	-	+
β-Hämolyse	+	-	+	-	+	-	-	-
CAMP-Test (<i>Staph. aureus</i>)	+	-	+	-	-	-	-	-
CAMP-Test (<i>Rhodococcus equi</i>)	-	-	-	-	+	-	-	-
Säureproduktion von:								
L-Arabinose	-	-			-	-	-	+
Dextrin	d	-			-	+	+	+
Galactose	d	-			d	+	+	+
Glycogen	-	-			-	-	-	+
Lactose	d	+			+	+	+	+
D-Lyxose	-	-			-	+	+	
Mannitol	-	-	-	-	-	+	+	-
Melezitose	d	d			d	-	-	-
Melibiose	-	-			-	-	-	+
α-Methyl-D-Glucosid	+	+			+	+	+	-
α-Methyl-D-Mannosid	+	+	-	+	-			
L-Rhamnose	+	d	-	d	-	-	d	-
Sorbitol	d	-			-	-	-	-
Löslicher Stärke	-	-			-	+	+	
Saccharose	-	d			d	-	-	+
D-Xylose	-	-	+	+	+	-	-	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	-
Hydrolyse von:								
Cellulose	-	-			-	-	-	+
Hippurat	+	+			+	-	-	-
Stärke	d	d			-	-	-	+
Lecithinase	d	d			+	-	-	-
Phosphatase	+	+			+	+	+	-
Reduktion von NO ₃ zu NO ₂	-	-			-	-	+	+
Pathogenität für Mäuse	+	-	-	-	+	-	-	+
Mol % G + C	37-39 (T _m); 38 (Bd)	36-38 (T _m); 38 (Bd)	36 (T _m)	36 (T _m)	37-38 (T _m)	41-42 (T _m); 41 (Bd)	41-42,5 (T _m); 42 (Bd)	56-58 (T _m); 57 (Bd)
Haupt-Peptidoglycan Diaminosäure	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP	L-Lysin
Haupt-Menaquinon	MK-7	MK-7			MK-7	MK-7	MK-7	MK-9

d: 11-89 % positiv

Für die Pathogenitätsfaktoren der Listerien sind sogenannte Virulenzgene verantwortlich, von denen sich die meisten auf dem PrfA-abhängigen Virulenzcluster befinden (Kuhn und Goebel, 1999). Dieses Cluster enthält die folgenden 6 Gene:

prfA (positiver Regulationsfaktor)

plcA und *plcB* codieren für Enzyme mit Phospholipase C-Aktivität, um Vakuolen von eukaryotischen Zellen hämolysinunabhängig zu zerstören (Kuhn und Goebel, 1999)

hly legt die Aminosäuresequenz des Listeriolysins 0 fest; dieses Hämolyisin dient der interzellulären Beweglichkeit, indem es den Listerien bei der Befreiung aus dem Phagosom der Zelle hilft, welches bei der Fortbewegung von einer Zelle zur nächsten entsteht (Gedde et al., 2000). Zusätzlich bewirkt es Reaktionen der Wirtszelle, die u. a. zur Aufnahme von Listerien in Epithelzellen, intestinale Zellen und Makrophagen sowie zur Apoptose von Nervenzellen führen (Vasquez-Boland et al., 2001).

mpl (Metalloprotease)

actA gewährleistet mit seinem Produkt, dem ActA Protein, die auf Aktin basierende intra- und interzelluläre Beweglichkeit der Listerien, indem es das eukaryotische Protein WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein) imitiert, welches das VASP (Vasodilator-Stimulated-Phosphoprotein) zur Aktinpolymerisation benötigt. VASP bindet deshalb an das Oberflächenprotein ActA der Listerien und führt so zur Polymerisation von Aktin (Cossart und Bierne, 2001). ActA ist evtl. auch an der Aufnahme der Listerien in die eukaryotische Zelle beteiligt (Vasquez-Boland et al., 2001).

Die Invasionsgene *inlA*, *inlB* und *inlC* codieren für Internaline. Diese Proteine dienen der rezeptorvermittelten Aufnahme der pathogenen *Listeria* spp. in die Wirtszelle (Kuhn und Goebel, 1999). Sie befinden sich, wie auch das *iap*-Gen (codiert für das „invasion associated protein“, das vermutlich beim Anheften und der Invasion von *Listeria monocytogenes* in Fibroblasten (Bubert et al., 1992) und evtl. auch an der Invasion von Makrophagen und Hepatozyten (Hess et al., 1995) beteiligt ist), nicht auf dem Virulenzcluster, sind aber davon abhängig, da sie durch den Transkriptionsaktivator PrfA reguliert werden (Kuhn und Goebel, 1999).

Durch die Phenol-Wasser-Extraktion wurden von *L. monocytogenes* endotoxinähnliche Substanzen isoliert, die einen positiven Limulustest erbrachten, bei Kaninchen pyrogen und

auf Hühnerembryonen toxisch wirkten (Bisping und Amtsberg, 1988; Singh et al., 1981; Wexler und Oppenheim, 1979).

Außerdem wird ein Monozyten proliferierendes Agens (MPA) gebildet, das bei Kaninchen einen Anstieg der Monozyten im Blut hervorruft. Das MPA ist nicht toxisch und wirkt nicht antigen, es besteht aus verschiedenen Lipoidkomponenten (Bisping und Amtsberg, 1988; Stanley, 1949).

2.2.1.4 Epidemiologie

Listerien sind ubiquitär verbreitete Bodenkeime; sie wurden auch auf Pflanzen, im Abwasser und im Schlamm nachgewiesen. Die vom Boden mit dem Futter aufgenommene Keimmenge ist jedoch in der Regel zu gering, um eine Krankheit auszulösen. Als Infektionsquelle kommt hauptsächlich schlechte Silage in Frage, in der sich die Listerien bei pH-Werten über 5,0 bis 5,2 vermehren können. Auch latent infizierte Überträger können den Keim unbemerkt ausscheiden und damit eine indirekte Infektionsquelle darstellen (Hirsh und Zee, 1999).

Über andere Infektionsquellen ist wenig bekannt. Eine Ausnahme bilden Listerienaborte, bei denen die Erreger mit den Abgängen massenhaft ausgeschieden werden. Eine Erregerausscheidung kann über Milch, Kot, Harn und Nasenschleim erfolgen.

Listerien wurden bei allen Haustieren nachgewiesen, aber auch bei vielen Wildsäugetieren, Vögeln, Fischen, Amphibien und Reptilien. Evtl. spielen Arthropoden bei der Übertragung eine Rolle, da bei einigen Arten Listerien isoliert wurden. In jedem Fall setzt eine Listerieninfektion keinen Kontakt mit infizierten Tieren voraus. Direkte Übertragungen sind zwar möglich, aber seltener als die Ansteckung über Umweltmaterial und Lebensmittel (Selbitz, 2002).

2.2.1.5 Pathologie und Pathogenese

Die Listeriose ist in erster Linie eine Fütterungsinfektion. Eintrittspforte ist in der Regel der Verdauungskanal, wobei der Erreger vermutlich über die Peyer'schen Plaques oder die Mucosa in die Pfortader und die Lymphe gelangen (Pron et al, 1998). Die pathogenen Listerien können sich in den Makrophagen der Leber und der Milz mit Hilfe ihres Hämolytins, das Listeriolysin O genannt wird, vermehren (Quinn et al., 1998). Die Infektion der Feten erfolgt diaplazentar über die Nabelvenen. Bei der Listerienenzephalitis des Schafes erfolgt die Infektion des Gehirns auf neurogenem Wege über Zweige des Nervus trigeminus bzw. des Nervus glossopharyngeus. Als Eintrittspforten kommen in diesem Falle

Verletzungen der Maulschleimhaut bzw. des Kopfes in Frage, z. B. während des Zahnwechsels oder durch scharfkantige Futtermittel (Selbitz, 2002). Diesem Ausbreitungsmodus entsprechend kann es zunächst zu einer Ganglioneuritis kommen, d. h. zu eitrig-granulomatösen Entzündungen im Nervenverlauf und im Ganglion semilunare (Sandersleben et al., 1989).

Makroskopisch fehlen bei der zerebralen Listeriose, die beim Wiederkäuer mit einer lymphozytären Meningoenzephalomyelitis einhergeht, meist typische Veränderungen, lediglich Liquortrübung, Verstopfung der Meningealgefäße, Blutfülle und Dunkelfärbung der Milz treten mitunter auf (Hirsh und Zee, 1999). Beim Öffnen der Schädelkapsel wird stets die Blutfülle der Gehirnhäute und in manchen Fällen sogar eine zur Nekrotisierung neigende Entzündung des Gehirns selbst erkennbar (Boch und Schneidawind, 1988; Schellner, 1982).

Histopathologisch lassen sich typische Läsionen beobachten: ausgeprägte Stammhirnenzephalitis mit Mikroabszessen und lymphohistiozytären perivaskulären Infiltraten. Letztere sind zum Teil auch in den rostralen Hirnregionen sowie in der Leptomeninx nachweisbar. In einzelnen Fällen dominieren sehr stark die nicht-eitrigen Komponenten (histiozytäre bzw. lymphozytäre Infiltration des Neuroparenchyms) (Bago et al., 2001).

Beim Schaf sind Pons, Medulla oblongata, Mittel- und Kleinhirn am stärksten befallen. Der Schwerpunkt der Veränderungen liegt jedoch im Regelfall im Rhombenzephalon, wo sich die Infektion zunächst faszikulär weiter ausbreitet und multifokale, granulo- und monozytär-mikrogliale Reaktionen auslöst. Meningitische Veränderungen bleiben auf das Umfeld der entzündlich veränderten Trigeminiwurzel beschränkt (Sandersleben et al., 1989).

Die Listerien sind bei üblichen histologischen Färbungen extra- und intrazellulär, d. h. primär in Nervenzellperikaryen und sekundär phagozytiert in Monozyten liegend, zu erkennen (Dahme und Weiss, 1999).

2.2.1.6 Klinik

Die Listeriose tritt in verschiedenen Formen auf:

1. Latente Darmbesiedelung mit fäkaler Ausscheidung
2. Meningoenzephalitische Form oder Listeriose des Zentralnervensystems
3. Septische Listeriose (besonders bei Neugeborenen und Jungtieren)
4. Organlisteriose (z. B. Mastitis, selten)

5. Trächtigkeitlisteriose mit Abort (besonders Schaf und Rind)
6. Manifestation am Auge (Keratokonjunktivitis, Iritis, Uveitis)

In den meisten Fällen verläuft die Infektion jedoch klinisch inapparent oder symptomarm mit vorübergehender Temperaturerhöhung und nur wenige Tage anhaltender Bakteriämie. Diese Tiere können die Listerien monatelang mit dem Kot ausscheiden. Nur in wenigen Fällen entwickelt sich eine klinisch manifeste Krankheit. Diese kann perakut, akut, subakut oder chronisch verlaufen (Selbitz, 2002).

Bei der Beobachtung des lebenden Wildes fallen die zunehmenden Bewusstseinsstörungen auf. Die erkrankten Tiere verlieren ihr natürliches Fluchtverhalten, sie liegen viel oder stehen mehr oder weniger teilnahmslos mit gekrümmtem Rücken und hängendem Kopf. Die Nahrungsaufnahme ist zunächst verzögert und wird dann ganz eingestellt. Speichelfluss und Lähmungserscheinungen, besonders im Kopfbereich (hängende Ohren), aber auch an den Hinterläufen, können auftreten. Werden solche Stücke nicht erlegt, verenden sie im Koma (Boch und Schneidawind, 1988).

2.2.1.7 Diagnose und Differentialdiagnose

Am lebenden Tier, vor allem beim Wildtier, ist die Diagnose aufgrund der Symptomatologie kaum zu stellen.

Mit Hilfe einer bakteriologischen Untersuchung kann der Keim bei der viszeralen Form aus Leber, Nieren oder Milz isoliert werden, bei der zentralnervösen Form aus Liquor oder Medulla oblongata und beim Abort aus der Plazenta oder aus dem Abomasum des Fötus (Hirsh und Zee, 1999, Quinn et al., 1994).

Johnson et al (1995) empfehlen die Immunhistochemie als aussagekräftigste Methode zum Nachweis einer Listerienenzephalitis.

Differentialdiagnostisch ist an andere ZNS-Erkrankungen zu denken, wie in Punkt 2.1.8 bereits beschrieben.

2.2.2 Andere bakteriell bedingte Meningoenzephalitiden

2.2.2.1 Begriff

Unter einer Meningitis versteht man im allgemeinen Sprachgebrauch eine Entzündung der weichen Hirnhäute (Leptomeningitis). Sie entsteht fast ausschließlich erregerbedingt, und zwar entweder hämatogen, als fortgeleiteter Prozess neuro-, oto- und rhinogen, oder infolge

Übergreifens entsprechender Primärprozesse aus der Nachbarschaft bzw. offener Verletzungen. Sie kann umschrieben (Basilarmeningitis, Konvexitätsmeningitis) oder diffus angelegt sein und entwickelt sich häufig gemeinsam mit Hirn- und Rückenmarksentzündungen (Meningoenzephalitis, Meningomyelitis) (Dahme und Weiss, 1999).

Eine vergleichsweise selten vorkommende Entzündung der Dura mater heißt Pachymeningitis. Die eitrige Form (Pachymeningitis purulenta) steht v. a. mit offenen Verletzungen, Übergreifen eitriger Prozesse aus der Nachbarschaft oder septischen Thrombosen in Zusammenhang. Hämorrhagische, fibroplastische und fibrinöse Formen können zu Verwachsungen, Zysten- bzw. Hygrombildungen und damit zu raumfordernden Prozessen führen (Dahme und Weiss, 1999).

2.2.2.2 Ätiologie, Pathologie und Pathogenese

Bakterielle Infektionen des ZNS können sich, je nach Art und Angriffspunkt der Toxinwirkungen, alternativ-exsudativ, eitrig, proliferativ oder granulomatös gestalten. Für die Entzündungsqualität sind ferner Verlaufsdauer und –intensität der Infektion maßgebend. Hinsichtlich des Verteilungsmusters ist v. a. der Infektionsweg von Bedeutung (Dahme und Weiss, 1999):

Septikämisch entstandene Infektionen des ZNS

Diffuse, fibrinös-eitrige Meningoenzephalomyelitiden entstehen im Rahmen hämatogen-septikämischer Bakterienausbreitung und betreffen vorwiegend Tiere in der frühen postnatalen Lebensphase. Als Erreger kommen *E. coli*, Streptokokken, seltener Pasteurellen, Mycoplasmen und Listerien in Betracht (Sandersleben et al., 1989; Summers et al., 1995).

Bei der makroskopischen Beurteilung zeigen sich zunächst in der perakut septikämischen Phase disseminierte meningeale Petechien, begleitet von Serodiapedesen, und eine trüb-graue bis grau-gelbe Exsudatfüllung des Arachnoidealraumes. Die Furchungen der Hirnoberfläche erscheinen verstrichen. In der Regel bestehen diese Ausfüllungen aus geronnenem Material (Dahme und Weiss, 1999).

Histologisch können in diffuser Verteilung fibrinös-eitrige Exsudate im Spatium leptomeningicum (subarachnoidale) von Hirn und Rückenmark, ferner im Hirnventrikelsystem und im Zentralkanal des Rückenmarks beobachtet werden. Das ZNS-Gewebe ist von Fall zu Fall wechselnd stark in Form malazisch-granulozytärer Prozesse ohne spezifisches Lokalisationsmuster einbezogen (Sandersleben et al., 1989). Dahme und Weiss

beschreiben außerdem fibrinoide Gefäßwandnekrosen, Thrombosen, fibrinoide Nekrosen der Plexus chorioidei, allgemeine Granulozytenemigration und perivaskuläre Rundzellproliferate. „Die Mitbeteiligung der Ventrikelräume (Chorioiditis) kann sich bis zur Totalverlegung des Liquorabflusses im Aquaeductus Sylvii und in den Foramina Luschkae steigern, woraus ein Aufstau trüb-flockigen Liquors in den Hirnkammern resultiert. Die sub- und epiduralen Räume sind insgesamt wenig einbezogen, wie auch die Dura mater stets nur geringgradige zellige Infiltrate erkennen lässt. Bei entsprechender Vergrößerung lassen sich im histologischen Präparat zahlreiche Bakterien und regelrechte Bakterienkolonien, z. T. aber auch granulozytär phagozytierte Erreger nachweisen.“ (Dahme und Weiss, 1999)

Embolisch entstandene Infektionen des ZNS

Die embolische und thromboembolische Enzephalomyelitis bzw. Meningoenzephalomyelitis findet sich bei den Haussäugetieren in allen Altersstufen. Die wichtigsten Erreger beim Wiederkäuer sind: *Fusobacterium necrophorum*, *Actinomyces pyogenes*, *Haemophilus somnus* und *agni*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus spp.* Pathogenetisch spielen als Primärleiden Pneumonien und Thromboendokarditiden eine wichtige Rolle (Sandersleben et al., 1989; Dahme und Weiss, 1999).

In der Histologie dominiert der septische Thrombus in allen Arterienkalibern, bis hin zu Blutkapillaren. Venolen sind – wenn überhaupt – nur sekundär einbezogen. Infolge der fortschreitenden Gefäßwandzerstörung kommt es zur erregerbedingten Gewebeeinschmelzung, die von zumeist massiven Emigrationen neutrophiler Granulozyten, bisweilen auch von Abszessbildungen, gefolgt werden. Als Ausdruck solch schwerer Endothel- und Gefäßwandschädigungen sind auch die gelegentlich auftretenden Parenchymlutungen zu verstehen (Sandersleben et al., 1989).

Auf direktem Wege oder oto-, rhino- und neurogen entstandene Infektionen des ZNS

Vor allem bei offenen Hirn- und Rückenmarkverletzungen können bakterielle Meningoenzephalomyelitiden auf *direktem* Wege entstehen, wobei neben pathogenen Mikroorganismen auch Saprophyten das Entzündungsbild bestimmen können. Eine *otogene* Infektion führt i. d. R. zu einer eitrig- oder abszedierenden Basilar meningitis und später zu einer Meningoenzephalitis, die insbesondere Mittel- und Rautenhirn einbezieht. Die *rhinogene* Infektion, die meist aufgrund tiefgreifender Nekrosen im Nasenraum entsteht, spielt kaum eine Rolle (Dahme und Weiss, 1999).

Besondere Formen bakterieller Infektionen des ZNS

Die Tuberkulose des ZNS betrifft bevorzugt die Meningen der Hirnbasis (tuberkulöse Basilar meningitis) und kann von dort aus unmittelbar auf das Hirngewebe übergreifen, wobei die Erreger (Mykobakterien) hämatogen über die Plexus chorioidei und Meninxgefäße mit dem Liquorstrom in das basale Zisternensystem gelangen; seltener kommt eine Direktmanifestation im Rahmen der postprimären Generalisation vor.

Ebenfalls zu den seltenen bakteriellen ZNS-Infektionen zählen die Aktinomykose (*Actinomyces bovis*), die Aktinobazillose (*Actinobacillus lignieresii*), Botryomykose (*Staphylococcus aureus*) und die Nocardiose (*Nocardia asteroides*), die auf direktem, rhinogenem und (seltener) hämatogenem Weg entstehen können. Histologisch können dabei granulomatös-eitrige bzw. apostematöse Entzündungsformen mit typischen Drusenbildungen beobachtet werden (Dahme und Weiss, 1999).

2.2.2.3 Klinik

Klinisch können bei bakteriell bedingten ZNS-Infektionen Fieber, Anorexie und Schläfrigkeit oder Depressionen in der frühen Phase der Bakteriämie beobachtet werden. Neurologische Symptome sind diffus und unspezifisch. Wenn zerebellomedulläre Anteile betroffen sind, zeigt sich das oft in Parese, Ataxie, Gleichgewichtsstörungen, Nystagmus und Tremor. Zum Schluss sieht man häufig Entkräftung, Opisthotonus, Koma und Anfälle (Summers et al., 1995).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenbeschaffung

Die Proben wurden unter Beachtung der Schonzeiten (s. Tabelle 4) in dem Zeitraum vom 01.05.01 bis zum 30.01.02 in Bayern gesammelt.

Tabelle 4: Schonzeiten für ausgewählte Wildtiere in Bayern (grün hinterlegte Felder mit Kreuz)

Wildart		Apr.	Mai	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Okt.	Nov.	Dez.	Jan.	Feb.	Mär.			
Rotwild	<i>Kälber, Hirsche, Alttiere</i>	x	x	x	x	x	x	x					x	x	x	x
	<i>Schmalwild</i>	x	x	x	x								x	x	x	x
Damwild, Sikawild	<i>Kälber, Hirsche, Alttiere</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x
	<i>Schmalwild</i>	x	x	x	x	x							x	x	x	x
Rehwild	<i>Kitze, Ricken</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x						
	<i>Schmalrehe</i>	x	x													
	<i>Böcke</i>	x	x													
Gamswild		x	x	x	x	x	x	x								

Die 4 Forstdirektionen

- Oberbayern/Schwaben mit 44 bayerischen Forstämtern
- Niederbayern/Oberpfalz mit 34 bayerischen Forstämtern
- Oberfranken/Mittelfranken mit 34 bayerischen Forstämtern
- Unterfranken mit 26 bayerischen Forstämtern

wirkten an dem Forschungsvorhaben mit, indem die Forstämter die Häupter der für die Untersuchung relevanten Tiere per Paketdienst an den Lehrstuhl für Tierhygiene in Weihenstephan schickten, oder die Köpfe wurden von Mitarbeitern des Lehrstuhls beim jeweiligen Erleger abgeholt. Untersuchungsmaterial, das nicht binnen 24 h am Lehrstuhl zur Weiterverarbeitung eintreffen konnte, wurde tiefgefroren.

Zusätzlich stellten uns das Bundesforstamt Grafenwöhr und der Fürst zu Öttingen-Wallerstein Hirnproben zur Verfügung.

Die Verteilung der getesteten Tiere auf die einzelnen Regierungsbezirke kann der Karte (s. Abbildung 5) entnommen werden.

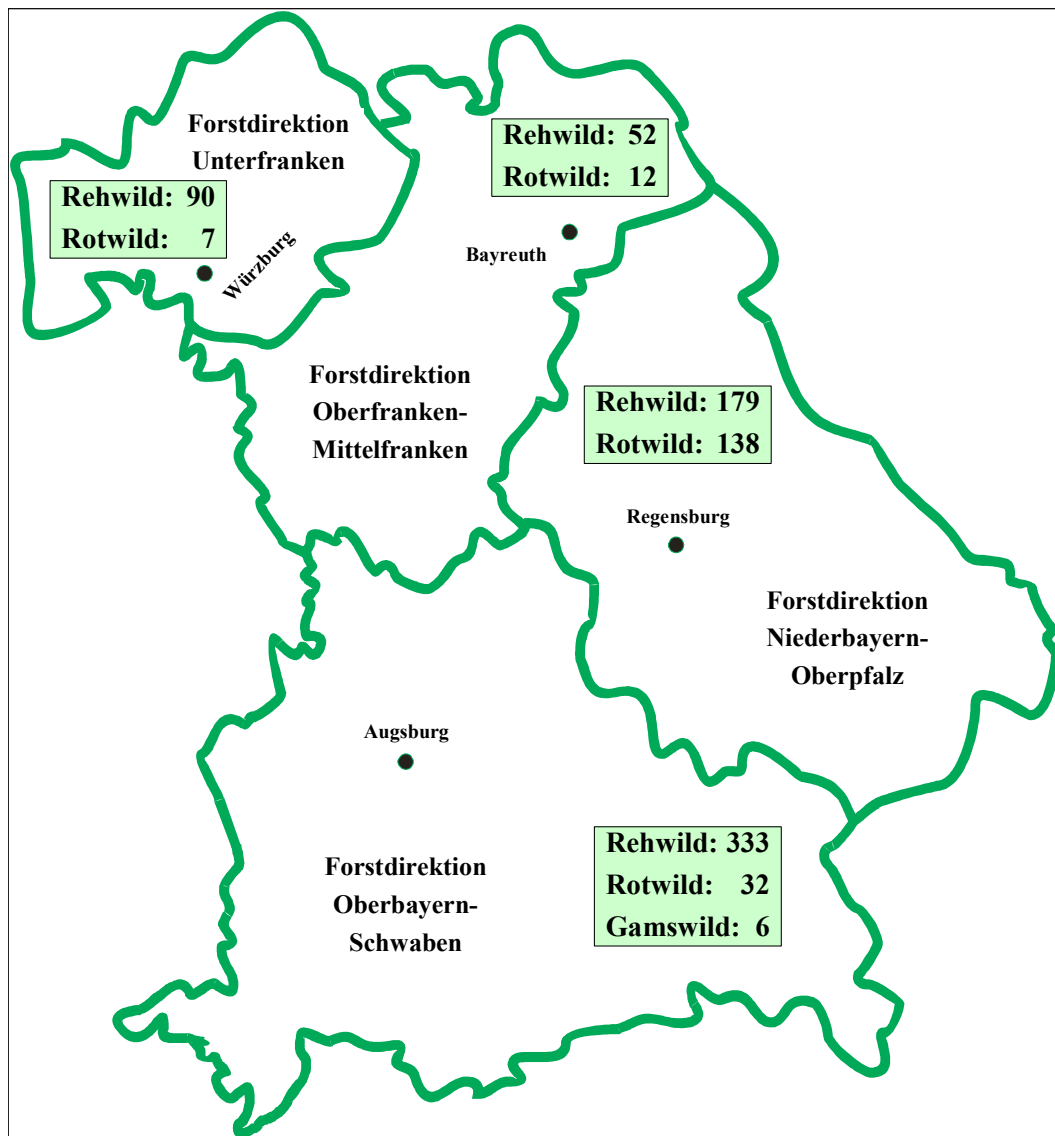


Abbildung 5: Regionale Probenverteilung

In der Tabelle 5 wird aufgeführt, in welchem Verhältnis die Probenanzahl in den einzelnen Forstdirektionen zu den jeweiligen Jahresstrecken steht. Insgesamt konnten Hirnproben von 849 Cerviden gesammelt werden, davon 654 vom Reh-, 189 vom Rot- und 6 vom Gamswild.

Tabelle 5: Jahresstrecken in den bayerischen Staatsjagdrevieren der Staatsforstverwaltung des Jagdjahres 2001/2002 beim Reh-, Rot- und Gamswild im Vergleich zur Probenanzahl

Wildart	Forstdirektion							
	Oberbayern-Schwaben		Niederbayern-Oberpfalz		Oberfranken-Mittelfranken		Unterfranken	
	Jahresstrecke ¹⁾	Probenanzahl	Jahresstrecke ¹⁾	Probenanzahl	Jahresstrecke ¹⁾	Probenanzahl	Jahresstrecke ¹⁾	Probenanzahl
Rehwild	15.898	333	7.328	179	8.513	52	3.938	90
Rotwild	1.850	32	279	138	179	12	282	7
Gamsw.	2.448	6	-	-	-	-	-	-
Gesamt	20.196	371	7.607	317	8.692	64	4.220	97

¹⁾ Information: Jahresbericht 2001 der bayerischen Staatsforstverwaltung

Aufgrund der langen Inkubationszeit der CWD wurden nur Wildwiederkäuer untersucht, die älter als zwei Jahre waren.

3.2 Probenentnahme

3.2.1 Entnahme von Stammhirn über das Foramen Occipitale

Bei Jagden des Bundesforstamtes Grafenwöhr und im Revier des Fürsten zu Öttingen-Wallerstein wurde jeweils eine enorm große Stückzahl erlegt (bis zu 40 Tiere > 2 Jahre/Tag). Hier wurde vor Ort nach dem Strecke legen das Stammhirn direkt entnommen:

Zunächst muss von ventral entlang des Kieferwinkels die Halsmuskulatur durchtrennt werden. Dann durchschneidet man die Bänder des Atlantookzipitalgelenks und kann so den Kopf nach hinten zurückklappen, ohne ihn vollständig abzusetzen.

Nach dem Durchtrennen des Rückenmarks wird zunächst eine Tupferprobe für die bakteriologische Untersuchung durch das Foramen occipitale in rostraler Richtung genommen, und anschließend kann das Stammhirn mit einem speziell geschliffenen Eislöffel entnommen werden:

- Mit einem Ausbeinmesser die Nervenstränge zwischen Gehirnhäuten und Hirnstamm durchtrennen
- Einführen des Löffels in das Foramen occipitale

- Den Löffel um 180 ° in Richtung zur Schädelbasis nach rechts und links drehen und dabei den Hirnstamm in Höhe der Brücke (Pons) durchtrennen
- Den unterhalb des Löffels liegenden, abgetrennten Hirnstamm mit dem Löffel vorsichtig, ohne Quetschung, in einem Stück aus der Schädelhöhle herausziehen

3.2.2 *Hirnsektion*

Wurden ganze (im Atlantookzipitalgelenk abgetrennte) Köpfe zur Verfügung gestellt, konnte das Hirn in toto entnommen werden. Hierzu wird, nach Abziehen der Kopfhaut und Abpräparieren der Musculi temporales, nach Anlegen von 3 Sägeschnitten (vgl. Abbildung 6) das Schädeldach abgehoben.

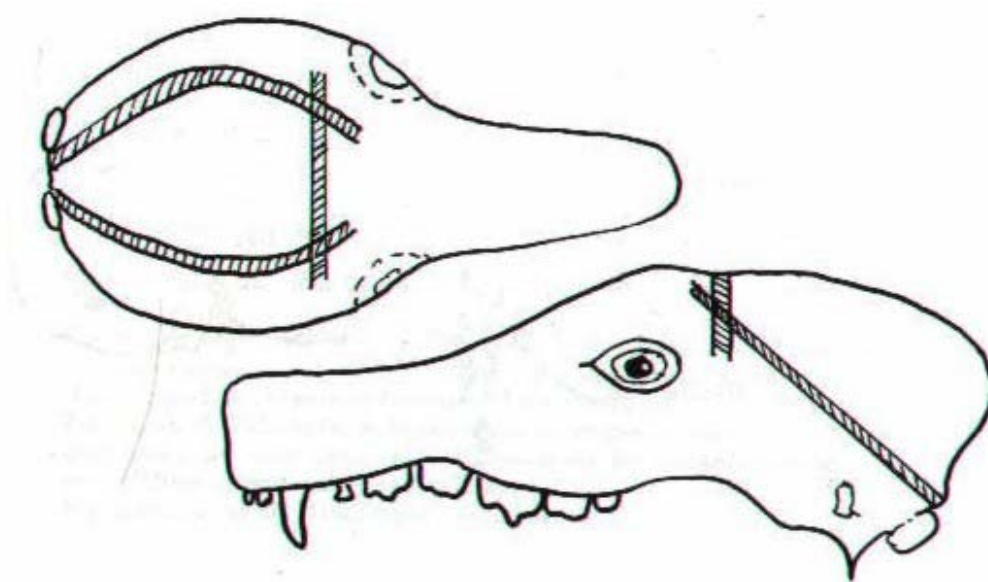


Abbildung 6: Führung der Sägeschnitte bei der Hirnsektion (Sektionsanleitung Pathologie)

Ein steriler Tupfer wird zwischen Groß- und Kleinhirn in der Fissura transversa cerebri in Richtung Stammhirn in die Tiefe geführt. Die Entnahme des Gehirns erfolgt durch Drehen des Schädels um 180 ° und Durchtrennen der Hirnnerven und des Hypophysenstieles.

3.3 Bakteriologische Untersuchungen

3.3.1 Allgemeine bakteriologische Untersuchung

3.3.1.1 Anzucht des Probenmaterials

Die an den beschriebenen Stellen entnommenen Tupferproben werden auf 3 verschiedene Nährböden ausgestrichen:

- Blutagar (Blutagar-Basis Nr. 2; Art.: CM 271; Fa. Oxoid; mit 7 % defibriniertem Schafsblut; Art.: 1000100; Fa. Fiebig)
- Nähragar (Blutagar-Basis Nr. 2; Art.: CM 271; Fa. Oxoid; ohne Blutzusatz)
- Gassner-Agar (Wasserblau-Metachromgelb-Lactose-Agar nach Gassner; Art.: 1282; Fa. Merck); Selektivagar zum Nachweis und zur Isolierung von Enterobacteriaceae

Beim Ausstreichen der Tupfer wird mit einem unselektiven Medium (in diesem Fall Blut- oder Nähragar) begonnen, um ein Übertragen von Hemmstoffen zu vermeiden.

Die Nährböden werden anschließend bei 37 °C im Brutschrank für 24 h bis zu 7 Tage bebrütet und täglich kontrolliert.

3.3.1.2 Bakteriendifferenzierung

Makroskopische Kriterien

Die Beurteilung der gewachsenen Kolonien erfolgt nach den Kriterien Größe, Morphologie (z. B. Rau- oder Glattform), Pigmentbildung, Hämolyseform (z. B. vollständige oder vergrünende Hämolyse) und Anzahl.

Weitergehende Untersuchungen (s. unten) erfordern meist eine Subkultivierung der Kolonien mittels 3-Ösen-Ausstrich, um Reinkulturen zu erhalten.

Mikroskopische Kriterien

- Gramfärbung

Prinzip

Sogenannte grampositive Bakterien, die über ein mehrschichtiges Mureinnetz verfügen, erscheinen in der Farbe des 1. Farbstoffes, da sie sich mittels Alkohol nicht mehr entfärben lassen, während gramnegative Bakterien, deren Mureinnetz nur ein bis drei

Schichten umfasst, mit Alkohol entfärbt werden können und deshalb in der Farbe der Gegenfärbung erscheinen.

Durchführung

- Eine Öse des Kulturmaterials mit einem Tropfen NaCl auf einem Objektträger verreiben
- Präparat lufttrocknen und hitzefixieren (3 x durch die Flamme ziehen)
- Mit Karbolgentianaviolett-Lösung bedecken; 3 min warten, dann abgießen
- Ohne abzuspülen mit Lugolscher Lösung bedecken; 1 ½ min stehen lassen
- Abgießen und mit Leitungswasser nachspülen
- In Alkohol und Aceton-Alkohol (1:1 v/v) entfärben, bis keine Farbwolken mehr abgehen; abspülen
- Gegenfärben mit Fuchsin-Lösung für 30 s
- Abspülen und trocknen
- Grampositive Keime: blau; gramnegative Keime: rot

Biochemische Kriterien

- Katalase-Test

Prinzip

Nachweis des Enzyms Katalase, das Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umwandelt

Durchführung

- Von einer Bakterienkolonie eine Öse voll abnehmen, ohne den Blutagar zu berühren, um falschpositive Ergebnisse zu vermeiden
- Kolonie auf einen sauberen Objektträger geben
- 3-prozentiges Wasserstoffperoxid auftropfen
- Ein Aufschäumen des Sauerstoffs innerhalb weniger s zeigt eine positive Reaktion an

- Oxidase-Test

Prinzip

Nachweis des Enzyms Cytochrom-c-Oxidase in einer Bakterienzelle

Durchführung

- Ein kleines Stückchen Filterpapier auf einen Objektträger legen und mit 1-prozentigem Tetramethyl-p-Phenylendiamin-Dihydrochlorid benetzen
- Kolonie mit einer sterilen Öse auf dem Papier ausstreichen, ohne dass dabei die (eisenhaltige) Öse das Filterpapier berührt, um falschpositive Ergebnisse zu vermeiden
- Eine blau-violette Färbung entlang des Striches zeigt eine positive Reaktion an

- Oxidation-Fermentation (O-F)-Test

(Testnährböden nach Hugl und Leifson (Basis); Art.: 1.10282; Fa. Merck)

Prinzip

Nachweis des oxidativen oder fermentativen Kohlenhydrat-Stoffwechsels eines Bakteriums. Das Medium ist halbfest und enthält Glucose als Test-Zucker und Bromthymolblau als pH-Indikator. Das im unbeimpften Zustand grüne Medium (pH 7,1) wird gelb, wenn das Bakterium infolge der Verwertung von Glucose Säure produziert (pH. 6,0). Bakterien, die Glucose sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen verstoffwechseln, werden als fermentativ bezeichnet. Aerobier benötigen atmosphärischen Sauerstoff für ihr Wachstum und sind oxidativ. Einige Bakterien sind im OF-Medium unreaktiv, entweder weil sie schlechte Wachstumsbedingungen vorfinden, oder weil sie unfähig sind, Glucose zu verwerten.

Durchführung

- Zwei Röhrchen mit OF-Medium unmittelbar vor Gebrauch 10 min in kochendem Wasser erhitzen, um jeglichen gelösten Sauerstoff zu entfernen
- Schnelles Abkühlen der Röhrchen unter fließendem kaltem Wasser
- Beimpfen beider Röhrchen mit Bakterienmaterial mittels einer Stichöse
- Abdichten eines Röhrchens mit einer ca. 1 cm dicken sterilen Paraffinschicht
- Bebrütung bei 37 °C für 24 bzw. 48 h
- Fermentativ: beide Röhrchen färben sich gelb
Oxidativ: das offene Röhrchen wird gelb und das mit Paraffin abgedichtete Röhrchen bleibt grün
Unreaktiv: beide Röhrchen bleiben grün

- BBL Crystal Testsystem

(BBL Crystal grampositive bzw. BBL Crystal enteric; Art.: 245140 bzw. 245000; Fa. Becton, Dickinson and Company (BD))

Prinzip

Beim BBL Crystal Testsystem handelt es sich um eine miniaturisierte Identifizierungsmethode für Bakterien, die modifizierte konventionelle, fluorogene und chromogene Substrate verwendet.

Der BBL Crystal Kit besteht aus Deckeln für die Panels, Untersätzen und Röhrchen mit Inokulumsflüssigkeit. Die ID-Panels enthalten 29 getrocknete biochemische und enzymatische Substrate. Zur Rehydrierung der Substrate dient eine Bakteriensuspension in der Inokulumsflüssigkeit. Die im System verwendeten Tests basieren auf mikrobieller Nutzung und mikrobiellem Abbau spezifischer Substrate, die von verschiedenen Indikatorsystemen nachgewiesen werden.

Durchführung

- Je nach Ergebnis der Gramfärbung Verwendung des BBL Crystal GP für grampositive oder des BBL Crystal enteric für gramnegative Keime
- Mehrere Kolonien einer Reinkultur mit einem sterilen Baumwolltupfer (BBL Crystal GP) bzw. einer sterilen Öse (BBL Crystal Enteric) abnehmen und in der Inokulumsflüssigkeit suspendieren
- Röhrchen wieder verschließen und etwa 10 bis 15 s lang homogenisieren; die Trübung sollte McFarland Standard 0,5 entsprechen
- Den ganzen Inhalt des Inokulum-Röhrchens in das dafür vorgesehene Reservoir des Untersatzes füllen
- Inokulumsflüssigkeit entlang der Laufspur fließen lassen, bis alle Vertiefungen gefüllt sind
- Zur Durchführung einer Reinheitsprüfung mit einer sterilen Öse einen kleinen Tropfen der Inokulumsflüssigkeit entnehmen und damit eine Agarplatte (bei grampositiven Keimen Blut-, bei gramnegativen Keimen Nähragar) beimpfen
- Deckel mit den Substraten aufsetzen und einrasten lassen
- Panel mit dem Etikett nach unten und Agarplatte für 18 bis 24 h bei 37 °C im Inkubator bebrüten

- Ablesen der Reaktionen mit Hilfe der Farbreaktionstabelle (die Spalten A bis D des BBL Crystal GP im UV-Licht betrachten)
- Eintragen der Reaktionen in den Berichtsbogen
- Errechnen der Profilnummer: Jedem positiven Testergebnis wird, entsprechend der Reihe, in der sich das Ergebnis befindet, ein Wert von 4, 2 oder 1 zugeordnet. Jedes negative Ergebnis erhält den Wert 0. Die Werte von jedem positiven Ergebnis in jeder Reihe werden dann addiert. Daraus ergibt sich die zehnstellige Profilnummer.
- Profilnummer und Zellmorphologie, wenn bekannt; bei gramnegativen Keimen auch die Oxidase-Reaktion, in einen Computer eingeben, in dem das Elektronische Codebuch für das BBL Crystal ID-System installiert wurde
- Das Computerprogramm gibt an, um welchen Keim es sich handelt. In der Rubrik „Statistik“ kann man die Konfidenz ablesen.

3.3.2 Selektiver Listerien-Nachweis

3.3.2.1 Kultureller Nachweis

3.3.2.1.1 Anzuchtmedien

Zur selektiven Anreicherung von Listerien werden die unten aufgeführten Selektiv-Nährmedien in Anlehnung an die AVID-Mitteilungen IV/1994 verwendet.

- **Anreicherungsmedium**

Zubereitung

Trypticase Soya Broth (Art.: 211825; Fa. BD)	30 g
Hefeextrakt (Art.: 11929; Fa. BD)	6 g
Aqua dest.	1000 ml

Mischen und 15 min autoklavieren bei 121 °C

Wirkungsweise

Dextrose dient als Kohlenhydratquelle, Natriumchlorid hält das osmotische Gleichgewicht, Phosphat dient als Puffer (In der Trypticase Soya Broth enthalten). Insgesamt dient das Anreicherungsmedium als Nährgrundlage.

- Selektivsupplement I

Zubereitung

Acriflavin (Art.: A 8251; Fa. Sigma)	15 mg
Nalidixinsäure (Art.: N 4382; Fa. Sigma)	40 mg
Aqua dest.	10 ml

sterilfiltrieren mit Millipore-Filter 0,22 µm

Wirkungsweise

Der Farbstoff Acriflavin und das Antibiotikum Nalidixinsäure hemmen weitgehend die unerwünschte Begleitflora bei der selektiven Anreicherung von *Listeria monocytogenes*.

- Selektivsupplement II

Zubereitung

Cycloheximid (Art.: C 7698; Fa. Sigma)	50 mg
Ethanol	4 ml
Aqua dest.	6 ml

sterilfiltrieren mit Millipore-Filter 0,22 µm

Wirkungsweise

Das Antibiotikum Cycloheximid unterdrückt das Wachstum der Begleitflora

- Oxford-Agar

Zubereitung

Listeria Agar-Basis (Oxford) (Art.: CM 856; Fa. Oxoid)	27,75 g
Aqua dest.	500 ml

lösen, autoklavieren (15 min bei 121 °C)

Listeria Selektiv Supplement (Art.: SR 140; Fa. Oxoid)	1 Fläschchen
--	--------------

*mit 5 ml sterilem Ethanol/Wasser (1:1) lösen und dem Nährboden zugeben
in Platten ausgießen und erstarren lassen*

Wirkungsweise

Die Zusammensetzung des Oxford-Agars basiert auf der Formulierung des Columbia-Agars. Zur Unterdrückung der unerwünschten Begleitflora enthält der Nährboden Lithiumchlorid, Acriflavin, Colistinsulfat, Cefotetan, Cycloheximid und Fosfomycin als wachstumshemmende Bestandteile. *Listeria monocytogenes* spaltet das im Nährboden

vorhandene Äsculin zu Äsculetin unter Bildung von Eisen(III)-Ionen, welche schwarze Komplexverbindungen eingehen, die dann die Kolonien von *Listeria monocytogenes* schwarz färben (Curtis et al., 1989).

3.3.2.1.2 Differenzierungskriterien

Verschiedene differenzierende Tests eignen sich dazu, *Listeria monocytogenes* eindeutig von anderen *Listeria spp.* zu unterscheiden.

- Modifizierter CAMP-Test

Zubereitung

Auf eine Blutagar-Platte einen *Staphylococcus aureus*-Stamm strichförmig ausstreichen. Senkrecht dazu einen *L. monocytogenes*-Kontrollstamm sowie parallel dazu, jeweils im Abstand von 1 – 3 cm, die zu überprüfenden Isolate aufbringen und 1 bis 2 Tage bei 37 °C bebrüten.

Wirkungsweise

Nur *L. monocytogenes* (und *L. seeligeri*) bewirken eine Verstärkung des β -Hämolysins von *Staph. aureus*, die anderen *Listeria spp.* zeigen diese Reaktion nicht (Sneath, 1986).

- BBL Crystal

Das BBL Crystal Testsystem wurde bereits in Nr. 3.3.1.2 (Bakteriendifferenzierung) ausführlich beschrieben.

3.3.2.1.3 Untersuchungsgang

Um die Wildwiederkäuerproben auf das Vorkommen zerebraler Listeriosen zu testen, muss zunächst eine selektive Anreicherung durchgeführt werden. Anschließend werden die Keime biochemisch differenziert. Im Einzelnen wird wie folgt vorgegangen:

- 4 g Probenmaterial (von rechter und linker Stammhirnhälfte, da die Listeriose oft nur unilateral auftritt) in sterile PP-Röhrchen, 50 ml (Art.: 227.2; Fa. Greiner) einwiegen.
- 36 ml Anreicherungsmedium zugeben und evtl. 4 h bei 30 °C bebrüten, um das Wachstum von geschädigten Listerien zu unterstützen
- Zugabe von jeweils 0,4 ml Selektivsupplement I und II
- Bebrütung bei 30 °C für 7 Tage
- 0,4 ml auf Oxford-Selektivagar ausspateln

- Bebrütung für 24 h bis 7 Tage und tägliche Kontrolle bei 37 °C
- Listerien wachsen in konkaven, dunkelbraunen Kolonien mit schwarzem Zentrum, umgeben von einem schwarzen Hof
- Die verdächtigen, schwarzen Kolonien werden auf Blutagar ausgestrichen, wo Listerien nach 18 bis 22 h als kleine, durchscheinende, glattrandige Kolonien wachsen, die nach 44 bis 48 h eine graue Farbe annehmen.
- Kolonien von *L. monocytogenes* sind von einem schmalen β -hämolytischen Hof umgeben, während Kolonien von *L. ivanovii* eine breite Zone von β -Hämolyse aufweisen. *L. innocua*, *L. grayi ssp. grayi*, *L. grayi ssp. murrayi* und *L. welshimeri* bilden keine Hämolyse.
- Listerien stellen sich als grampositive, kurze Stäbchen dar, die in Palisaden, V- oder Y-Form vorliegen.
- Alle Listerien sind Katalase-positiv und Oxidase-negativ.
- Beim CAMP-Test mit *Staph. aureus* reagieren *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* positiv, während alle anderen *Listeria spp.* negativ reagieren (Sneath, 1986).
- Zur biochemischen Differenzierung wird der BBL Crystal GP verwendet.

3.3.2.2 PCR

3.3.2.2.1 Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction; PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nucleinsäuren. Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der Replikation (Verdopplung) der DNA in der Zelle: Eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen Nucleinsäure-Matrize (Lachmund und Sachse, 1994).

3.3.2.2.2 Real-Time PCR mit dem Lightcycler

Die Extraktionsmethode und die Auswahl der Primer, Sonden und der Lightcycler-Einstellungen erfolgt nach der optimierten Methode von Grünefeld (2001).

DNA-Extraktion mit Lysispuffer

Zur Extraktion der Listerien-DNA werden die Bakterien durch Proteinase K und Erhitzen auf 100 ° C lysiert. Diese Methode bewirkt ein Freisetzen der DNA.

- Ca. 10 Kolonien von der Reinkultur abnehmen und in 1 ml PBS (Art.: L18505; Fa. Biochrom) lösen
- 10 min bei 10.000 g zentrifugieren
- Überstand abpipettieren
- Lysispuffer herstellen:

Tween 20	10 µl
PCR-Puffer	200 µl
Aqua bidest, steril	1790 µl
- Bakterienpellet in 200 µl Lysispuffer und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml; Art.: P 2308; Fa. Sigma) resuspendieren
- 10 min kochen

Primer und Sonden zum Nachweis des iap-Gens

Listeria monocytogenes weist in seinem Genom das iap-Gen auf, das deshalb zum Nachweis dieser Spezies als Template verwendet wird (Bubert et al., 1999; Hein et al., 2001; Makino et al., 1995, Manzano et al., 1997; Niederhauser et al., 1992). Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird durch die Primer LIM 2bn und Lim Reb markiert, die nach Denaturierung der Doppelstrang-DNA an Anfang und Ende der Gensequenz hybridisieren. Die beiden Sonden LIM2 FL und LIM2 LC binden nur wenige Basenpaare voneinander entfernt an das Amplikon, wobei ein Energietransfer von einem Fluoreszenzfarbstoff auf den anderen stattfindet (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, FRET). Dieses Signal wird am Ende der Annealingphase detektiert.

Die Herstellung und Anpassung der Sonden an die Primer erfolgte durch die Firma tib-molbiol (vgl. Abbildung 7).

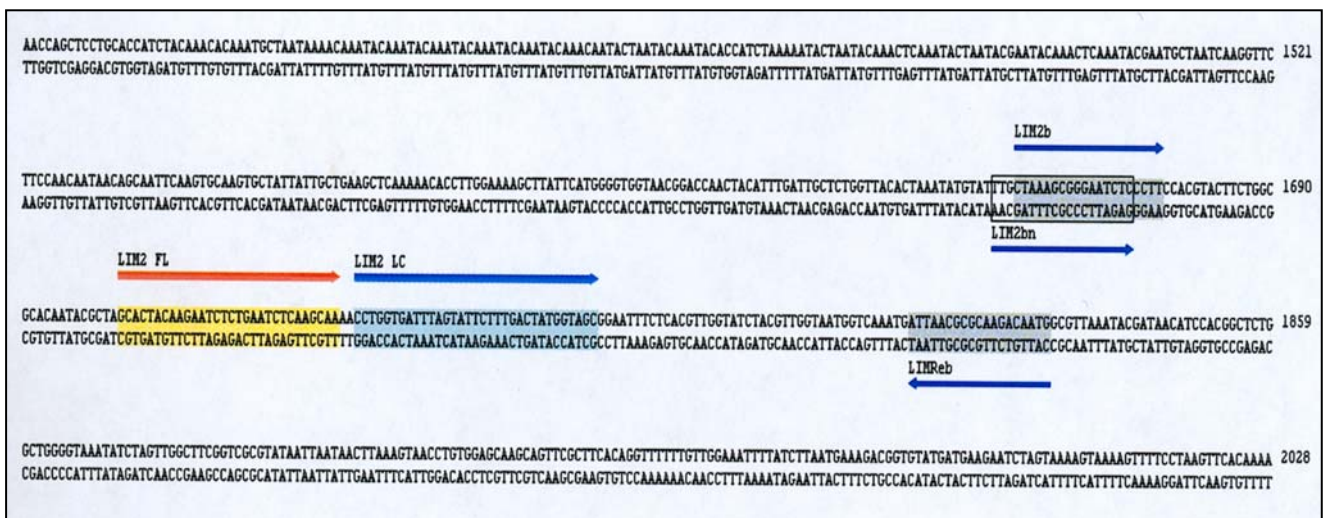


Abbildung 7: Lage und Basensequenz der Primer (LIM 2bn und LIM Reb) und Sonden (LIM2 FL und LIM2 LC) auf dem *iap*-Gen

- Primer mit TE-Puffer (10mM Tris-HCl + 1 mM EDTA) zu 10 μ M Stocklösungen mischen und in 50 μ l Aliquoten bei -20 $^{\circ}$ C lagern
- Sonden als 4 μ M Stocklösungen in 50 μ l-Portionen bei -20 $^{\circ}$ C lagern
- Gesamtmastermix herstellen (s. Tabelle 6)

Tabelle 6: Gesamtmastermix Hybridization-Probe Fast Start[®] (pro Kapillare)

Fast Start DNA Master Hybridization Probes (Art.: 2 239 272; Fa. Roche)	
Mastermix-Stocklösung ¹⁾	2,0 µl
MgCl ₂	2,4 µl (3mM)
Primer 1 (LIM 2 bn)	1 µl (0,2 µM)
Primer 2 (LIM Reb)	1 µl (0,2 µM)
Sonde 1 (LIM2 FL)	1 µl (0,2 µM)
Sonde 2 (LIM2 LC)	1 µl (0,2 µM)
H ₂ O	7,6 µl
Template	4,0 µl

¹⁾ Inhalt der Stocklösung: FastStart Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer und dNTP-Mix (Desoxynukleosidtriphosphat)

- 20 µl in Kapillaren (Light Cycler Capillaries; Art.: 1 909 339; Fa. Roche) pipettieren
- Mit den in Tabelle 7 aufgeführten Einstellungen im Lightcycler amplifizieren

Tabelle 7: Einstellungen am Lightcycler

Denaturation			
Cycles	1		
Analysis Mode	None		
Target Temperature (°C)	95		
Incubation Time (h:min:s)	00:10:00		
Temperature Transition Rate (°C/s)	20,0		
Acquisition Mode	None		
Amplifikation			
	Denaturation	Annealing	Elongation
Cycles	50		
Analysis Mode	Quantification		
Target Temperature (°C)	95	60	72
Incubation Time (h:min:s)	00:00:10	00:00:10	00:00:05
Temperature Transition Rate (°C/s)	20,0	20,0	20,0
Acquisition Mode	None	Single	None
Schmelzkurve			
	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Cycles	1		
Analysis Mode	Melting Curves		
Target Temperature (°C)	95	45	72
Incubation Time (h:min:s)	00:00:00	00:00:60	00:00:00
Temperature Transition Rate (°C/s)	20,0	20,0	0,1
Acquisition Mode	None	None	Cont.
Cooling			
Cycles	1		
Analysis Mode	None		
Target Temperature (°C)	40		
Incubation Time (h:min:s)	00:00:30		
Temperature Transition Rate (°C/s)	20,0		
Acquisition Mode	None		

3.4 Nachweis von PrP mittels ELISA

3.4.1 Das ELISA-Prinzip (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Zum Antigen-Nachweis wird der sogenannte Sandwich-ELISA (Syn.: Antibody capture ELISA) verwendet. Dieses serologische Nachweisverfahren ist geeignet, auch geringe Antigen-Mengen nachzuweisen. Der Test erfolgt in folgenden Schritten:

Bekannte Antikörper (Ak) gegen ein bestimmtes Antigen (Ag), in diesem Fall das Prionprotein, werden an ein Feststoffsystem aus Polystyrol (Mikrotiterplatte) fixiert. Im zweiten Schritt wird die Testlösung zugegeben. Enthält diese Antigen, das zum Antikörper passt, entsteht ein Ak-Ag-Komplex, wenn nicht, lässt sich das überschichtete Material abwaschen. Im dritten Schritt werden enzymmarkierte Antikörper zugegeben, die auch antigenspezifisch binden. Wurde das Prionprotein im Ak-Ag-Komplex gebunden, erfolgt eine Haftung, sonst werden sie abgewaschen. Im letzten Schritt wird Substrat zugegeben. Dieses wird durch das Ak-gebundene Enzym hydrolysiert; eine Farbreaktion, die wiederum photometrisch nachgewiesen werden kann, zeigt dies an (Lottspeich und Zorbas, 1998).

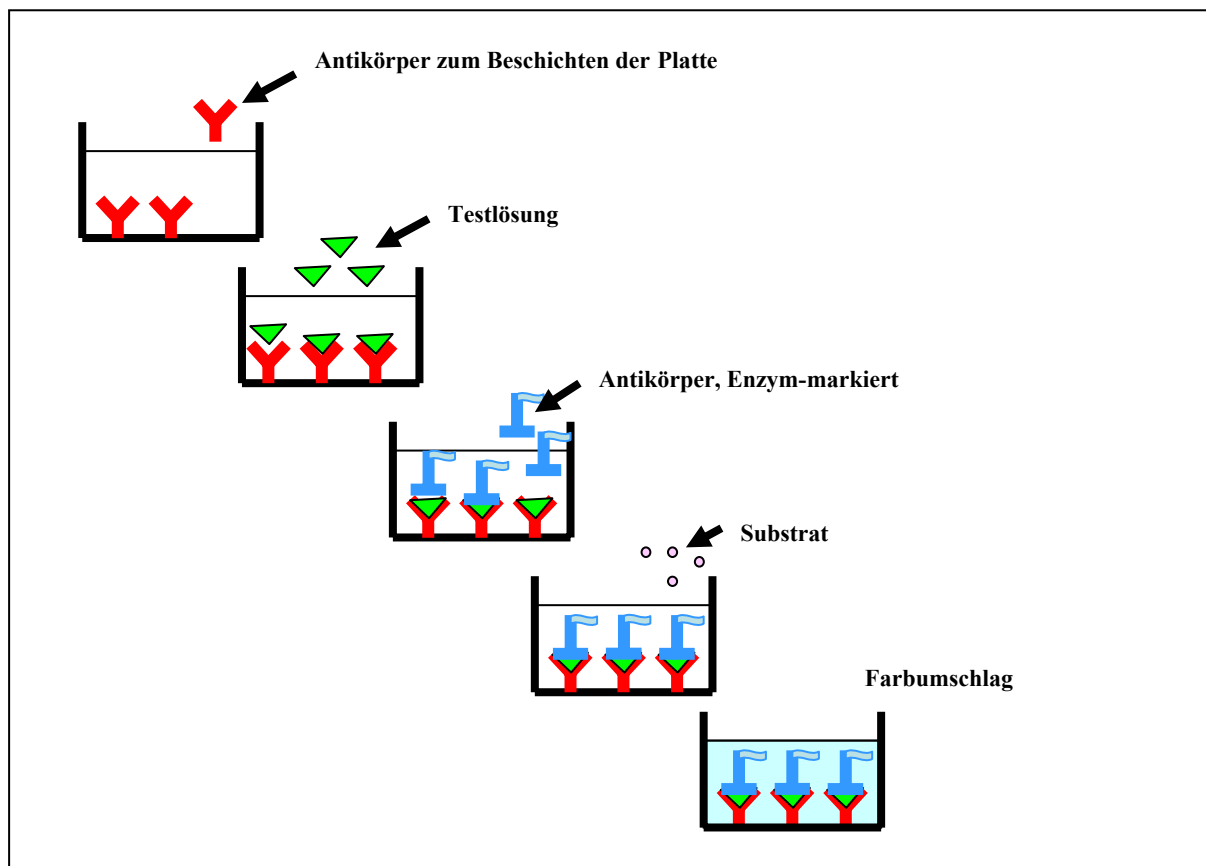


Abbildung 8: Prinzip eines Sandwich-ELISA

3.4.2 Nachweis von PrPres

3.4.2.1 Reinigung des PrP^{res}

3.4.2.1.1 Inhalt des Kits

Alle zur Aufreinigung des Probenmaterials erforderlichen Chemikalien, mit Ausnahme der Proteinase K, sind in dem Testkit (BSE Reinigungskit; Art.: 355-1102; Fa. BioRad) vorhanden (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Inhalt des Reinigungskits

Bezeichnung	Art der Reagenzien	Menge
Probenröhrchen	Probenröhrchen mit Keramikugeln in Pufferlösung Konservierungsmittel: Proclin 300 (0,1 %)	100 Röhrchen
Reagenz A	Denaturierungspuffer	2 Flaschen (25 ml)
Reagenz B	Fällungspuffer Farbstoff: Bromphenolblau	1 Flasche (50 ml)
Reagenz C1	Solubilisierungspuffer	1 Flasche (6 ml)

3.4.2.1.2 Entnahme von Hirngewebe

Mit der BSE-Probenentnahmespritze (Art.: 355-1121; Fa. BioRad) wird aus dem Obexbereich (vgl. Abbildung 9) eine Nervengewebemasse von 350 +/- 40 mg entnommen.

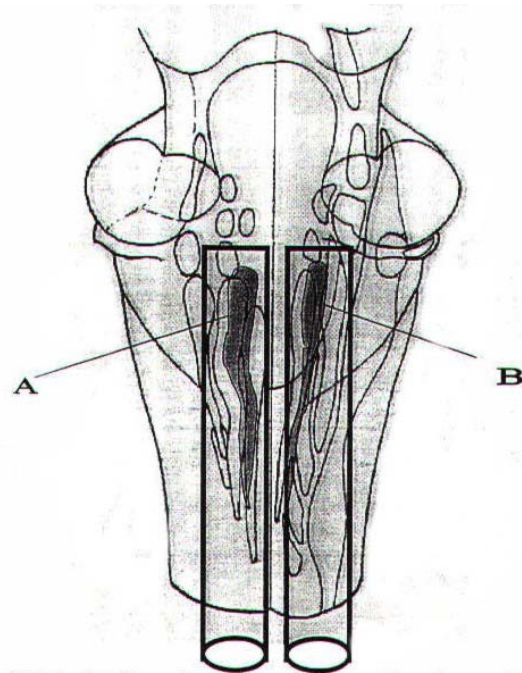


Abbildung 9: Probenentnahme aus dem Obexbereich (Arbeitsanweisung der Fa. BioRad)

3.4.2.1.3 Durchführung der Reinigung

Um proteinaseresistente Prionen nachweisen zu können, muss das Probenmaterial zunächst aufgereinigt werden:

- Die Nervengewebeproben in die Probenröhrchen geben, die Deckel der Röhrchen sehr fest verschließen und die Probe im Ribolyser (BSE-Ribolyser/Fast Prep (für Probenaufschluss); Art.: 358-9158; Fa. Hybaid) homogenisieren.
- Um eine optimale Zerkleinerung zu erreichen, immer 2 x einen 45 s dauernden Zyklus bei Stärke 6,0 durchführen, wobei die Rohrmühle zwischen den einzelnen Zyklen immer wieder auf Raumtemperatur gebracht werden muss.
- Die Röhrchen aus dem Ribolyser nehmen, vor dem Öffnen des Röhrchens das Homogenat durch Umdrehen wieder suspendieren und 500 µl mit Hilfe der Kalibrationspritze (Art.: 355-1123; Fa. BioRad) und der Kalibrationsnadel (Art.: 355-1124; Fa. BioRad) entnehmen. Dabei darauf achten, dass die Nadel in das Kugelsediment eingeführt wird, um eine Entnahme schlecht homogenisierter Gewebefragmente zu vermeiden. Das nicht verwendete Homogenat kann bei -20 °C im Probenröhrchen aufbewahrt werden. Im Fall einer späteren Verwendung bei Raumtemperatur auftauen und nach dem Auftauen erneut ribolysen, bevor die 500 µl entnommen werden. (Die Proben können bis zu 3 mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.)

- Alle entnommenen 500 µl Proben in 2 ml-Röhrchen vom Typ Eppendorf (Safe-Lock Tubes 2,0 ml; Art.: 0030120.094; Fa. Eppendorf AG) geben.
- Vorbereiten der Proteinase K-Lösung: 4 µl Proteinase K (Code Nr. 355-1100; Fa. BioRad) in 1 ml Reagenz A (Verdünnungspuffer) pipettieren und durch mehrfaches Umdrehen (mind. 10x) gut mischen (kein Vortex-Mischen), bis eine homogene rote Lösung entsteht. Nach dem Verdünnen kann die Proteinase K-Lösung 4 h bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.
- In jedes Röhrchen 500 µl der rekonstituierten Proteinase K-Lösung (Raumtemperatur!) geben und sofort mit einem Mischgerät vom Typ Vortex (Test Tube Shaker; Best.-Nr. MELB 1719; Fa. Merck Eurolab) gut durchmischen. Die Proben müssen für exakt 10 min bei 37 °C inkubieren. Da diese Temperatur erst nach 5 min erreicht wird, müssen die Röhrchen insgesamt 15 min im Heizblock bleiben. Beim Verteilen der Proteinase K zwischen dem ersten und dem letzten Röhrchen dürfen nicht mehr als 5 min, zwischen Homogenisierung und Beginn der Inkubation nicht mehr als 2 min vergehen. Die Röhrchen können während der Verteilung der Proteinase K im gestoßenen Eis bleiben, um die Enzymaktivität zu hemmen. Unter diesen Bedingungen kann die Wartezeit bis zu 10 min betragen.
- Die Röhrchen aus dem Inkubator nehmen und jeweils 500 µl Reagenz B zugeben. Bis zum Erhalt einer homogenen Blaufärbung mit dem Test Tube Shaker gut mischen. Die gleiche Verteilungsreihenfolge wie beim vorherigen Schritt einhalten. Dabei sollten nicht mehr als 2 min vergehen. Wenn die Röhrchen während der Verteilung im Eisblock belassen werden, um die Aktivität der Proteinase K zu blockieren, kann die Wartezeit bis zu 10 min betragen.
- Die Röhrchen 5 min lang bei 20.000 g zentrifugieren (Biofuge primo R; Best.-Nr. 75005440; Fa. Heraeus).
- Den Überstand innerhalb von 5 min abgießen und anschließend die Röhrchen trocknen (durch Umdrehen auf saugfähiges Papier während 5 min oder Absaugen, nachdem das Restvolumen sich 5 min lang im unteren Teil des Röhrchens sammeln konnte).
- In jedes Röhrchen 50 µl Reagenz C1 geben. Zwischen dem Ende des Trocknungsvorgangs und der Verteilung des Reagenzes C1 sollten nicht mehr als 10 min vergehen.

- 5 +/- 1 min bei 100 °C +/- 1 °C inkubieren. Zwischen der Verteilung des Reagenzes C1 und dem Beginn der Inkubation sollten nicht mehr als 2 min vergehen.
- Die Röhren aus dem Inkubator nehmen und mit dem Test Tube Shaker homogenisieren, bis das Pellet ganz gelöst ist. Die gelösten Proben können 5 h bei +2 bis +8 °C aufbewahrt werden, dann aber vor Zugabe von R6 erneut für 5 min auf 100 °C erhitzen.
- 250 µl Reagenz R6 aus dem Platelia® BSE Nachweiskit hinzufügen.

3.4.2.2 Detektion des PrP^{res}

3.4.2.2.1 Inhalt des Kits

In dem Detectionkit befinden sich alle zum Nachweis des PrPres erforderlichen Reagenzien (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Inhalt des Detectionkits

Bezeichnung	Art der Reagenzien	Menge
R1	Mikrotiterplatte: 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, mit monoklonalem PrP-Antikörper beschichtet	1 Platte
R2	Waschlösung: 10-fach konzentrierter Puffer Tris-NaCl, pH 7,4 Konservierungsmittel: Natriummerthiolat (0,01 %)	1 Flasche (100 ml)
R3	negative Kontrolle: PBS-Puffer, pH 7,4, mit BSA versetzt Konservierungsmittel: Proclin 300 (0,1 %)	1 Flasche (2 ml)
R4	positive Kontrolle: lyophilisiertes rekombinantes Prionprotein	1 Flasche (für 2 ml)
R6	Probenverdünnungsmittel: PBS-Puffer, pH 7,4, mit BSA und Phenolrot versetzt Konservierungsmittel: Proclin 300 (0,1 %)	1 Flasche (25 ml)
R7	Konjugat: 10fach konzentrierter Monoklonaler PrP-Antikörper, peroxydasemarkiert, gelöst in Puffer Tris-NaCl, pH 7,4, mit bovinen Proteinen und Phenolrot versetzt Konservierungsmittel: Proclin 300 (0,1 %)	1 Flasche (1,5 ml)

Fortsetzung Tabelle 9: Inhalt des Detectionkits

Bezeichnung	Art der Reagenzien	Menge
R8	Peroxidasesubstratpuffer: Zitronensäurelösung und Natriumacetat, pH 7,4 mit 0,015 % H ₂ O ₂ und 4 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 Flasche (60 ml)
R9	Chromogen: Tetramethylbenzidinlösung (TMB)	1 Flasche (5 ml)
R10	Stopplösung: Schwefelsäurelösung 1 N	1 Flasche (28 ml)
	Klebefolien	4

3.4.2.2.2 Testdurchführung

Nach der Aufreinigung der Proben kann nun die Detektion der proteinaseresistenten Prionen erfolgen.

- Die Reagenzien müssen bei +2 bis + 8 °C aufbewahrt werden; vor Gebrauch müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (1 h).
- Die Proben vor der Bestimmung mit dem PLATELIA[®] BSE Nachweiskit homogenisieren.
- Den Halterahmen und die notwendige Anzahl an Streifen (R1) aus der Schutzhülle nehmen. Die nicht verwendeten Streifen in die Packung zurücklegen und diese wieder verschließen.
- Die positive Kontrolle R4 herstellen: Fläschchen leicht gegen die Tischfläche klopfen, um evtl. am Gummistopfen anhaftendes Reagenz loszulösen. Die Flasche öffnen und mit 2 ml Reagenz R6 auffüllen. Wieder verschließen und 1 min stehen lassen, von Zeit zu Zeit leicht homogenisieren, um die Auflösung zu erleichtern.

- In folgender Reihenfolge in die Vertiefungen geben:
 - Vertiefungen A1, B1, C1, D1: 100 µl negative Kontrolle R3
 - Vertiefungen E1, F1: 100 µl positive Kontrolle R4
 - Vertiefungen G1, H1, A2, etc: 100 µl mit Reagenz R6 verdünnte Probe
- Mit Klebefolie bedecken und 75 min bei 37 °C +/- 1 °C inkubieren.
- Die Waschlösung herstellen: Reagenz R2 1:10 mit Aqua dest. verdünnen (z. B. 100 ml Reagenz R2 in 900 ml Aqua dest.).
- Die Konjugatlösung herstellen: Reagenz R7 in der rekonstituierten Waschlösung auf 1:10 verdünnen (z. B. 0,1 ml Reagenz R7 in 0,9 ml gebrauchsfertiger Waschlösung) und vorsichtig homogenisieren, nicht vortexen.
- Die Klebefolie entfernen, 3 Waschzyklen mit einem geeigneten Waschgerät (anthos fluído; Version 1.3; Fa. Anthos Mikrosysteme GmbH) durchführen. Vor dem nächsten Schritt durch Umdrehen auf saugfähiges Papier restliche Flüssigkeit entfernen. Innerhalb 1 min weitere Zugabe, um Austrocknung der Mikrotiterplatte zu vermeiden.
- In die Vertiefungen 100 µl der Konjugatlösung geben. Darauf achten, dass keine Tropfen am Rand der jeweiligen Vertiefung hängen bleiben.
- Mit Klebefolie abdecken und 60 min bei +2 bis +8 °C inkubieren.
- Die enzymatische Entwicklungslösung herstellen: Das Reagenz R9 im Reagenz R8 1:11 verdünnen (z. B. 0,1 ml Reagenz R9 in 1 ml Reagenz R8). Nicht in einem Glasgefäß ansetzen. Vorsichtig homogenisieren, nicht vortexen. Zur Vermeidung von Oberflächenoxidation keine Umluft im Raum und Röhrchen sofort gut verschließen; die Entwicklungslösung im Dunkeln lagern.
- Die Klebefolie entfernen; 5 Waschzyklen vornehmen. Die Mikrotiterplatte nicht mehr als 5 min nach dem letzten Waschzyklus stehen lassen; vor dem nächsten Schritt durch Umdrehen auf saugfähiges Papier trocknen.
- 100 µl der Entwicklungslösung in die Vertiefungen geben und die Platte 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren. Hierbei keine Klebefolie verwenden.
- In jede Vertiefung 100 µl Stopplösung in der zeitlich gleichen Reihenfolge wie bei Zugabe der Entwicklungslösung pipettieren.

- Die Extinktion bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach dem Anhalten der Reaktion mit einem Photometer (Reader ATC; Messzeit: 5 s; Lichtquelle: Halogenlampe 50 Watt; Fa. SLT Labinstrumente Deutschland; Software: Easy-Base; Version 2.0; Fa. SLT Labinstrumente) messen. Die Streifen müssen vor der Ablesung immer im Dunklen bleiben.

3.4.3 Überprüfung des Testsystems für Cervidae

Das vorgestellte Testsystem ist zum Nachweis boviner PrP^{res} zugelassen, die Eignung zum Nachweis cervider Proben musste erst überprüft werden.

3.4.3.1 Nachweis von PrP^{sen}

Um festzustellen, ob das Testsystem mit Wildtierproben überhaupt funktioniert, wurde bei 25 Proben der Proteinase K-Verdau weggelassen. Auf diese Weise bleiben die im Stammhirn enthaltenen physiologischen Prionen (PrP^{sen}) erhalten. Da der Platelia[®] BSE Nachweiskit (Art.: 355-1103; Fa. BioRad) 2 monoklonale Antikörper verwendet, die nicht zwischen PrP^{res} und PrP^{sen} unterscheiden können (keine Unterschiede in der Primärstruktur), binden PrP^{res} und PrP^{sen} gleichermaßen an die ELISA-Platte. Wenn also die Extinktionen der unverdaut getesteten Proben deutlich über denen der mit Proteinase K verdauten Proben liegen, so spricht das für eine Bindung der Wildwiederkäuerprionen an die Antikörper, die in den Testkits verwendet werden.

Der Test wird durchgeführt wie Punkt 3.4.2 beschrieben, wobei der Proteinase K-Verdau weggelassen wird.

3.4.3.2 Prüfung von CWD-positiven Proben

Zusätzlich überließ uns das Deutsche Referenzzentrum für die Erkrankungen des Zentralen Nervensystems, unter der Leitung von Prof. Kretschmar, Hirnmaterial von 2 durch Histopathologie und Immunhistochemie als CWD-positiv diagnostizierte „elks“ (amerikanisch für Wapiti). Die Tiere wurden von dem „National Services Laboratory“ in Ames, Iowa, USA, zur Verfügung gestellt. Sie waren 2 bzw. 3 Jahre alt und männlich. Ein positives Testergebnis würde ein Funktionieren des Testsystems bei Wildwiederkäuern bestätigen.

Der Test wurde analog Punkt 3.4.2 durchgeführt.

3.4.4 Untersuchung der Feldproben

Die im Jagdjahr 2001/2002 in ganz Bayern gewonnenen 849 Stammhirnproben wurden untersucht wie in Punkt 3.4.2 beschrieben. Es handelte sich hierbei im Einzelnen um 654 Reh-, 189 Rot- und 6 Gamswildproben.

3.4.5 Berechnung der Prävalenz

Die Berechnung der wahren mittleren Prävalenzraten erfolgte in Anlehnung an eine persönliche Mitteilung der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (Tübingen), in der eine Stichprobenkalkulation zur Ermittlung einer repräsentativen Stichprobe je Bundesland für die Untersuchung auf TSE-Erkrankungen beim erlegten Reh- und Rotwild ausgearbeitet wurde.

3.5 Histologische Untersuchungen

3.5.1 Hämalaun-Eosin- (HE-) Färbung

Proben, deren mikrobiologische Untersuchungsergebnisse eine Enzephalitis erwarten ließen, wurden einer histologischen Untersuchung unterzogen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

- Die in 5 – 7 prozentigem Formalin fixierten Hirnproben (hauptsächlich Stammhirn) werden nach Wässerung unter fließendem Leitungswasser automatisch entwässert (Hypercenter).
- Flüssiges Paraffin mit Schmelzpunkt bei 56 °C (Paraplast[®]; Fa. Sherwood Medical Co.) dient als Einbettungsmedium
- Anfertigung von 8 µm dicken Schnitten mit Hilfe eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom HM 355; Fa. Microm International GmbH bzw. RM 2055; Fa. Jung)
- Aufziehen der Paraffinschnitte auf Objektträger und Trocknen bei 37 °C im Brutschrank für bis zu 24 h

- Entparaffinieren der Schnitte in absteigender Alkoholreihe bis 30 %:
 - Xylol (Art.: 50741098; Fa. Biesterfeld Graen) 3 x 10 min
 - Ethanol 100 % (Art.: 000000642; Fa. BfB) 2 x 5 min
 - Ethanol 96 % 5 min
 - Ethanol 80 % 5 min
 - Ethanol 70 % 5 min
 - Ethanol 50 % 5 min
 - Ethanol 30 % 5 min
 - Aqua dest. 5 min

- Hämalaun Eosin-Färbung (HE-Färbung):
 - Hämalaun-Kernfärbung (Art.: A 0884.1000; Fa. Spicker) 3 - 10 min
 - Bläuen in fließendem Leitungswasser 30 min
 - Aqua dest. 2 x schwenken
 - Gegenfärben mit Eosin ca. 10 s

- Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol:
 - Ethanol 70 % schwenken
 - Ethanol 80 % schwenken, bis keine Farbwolken mehr abgehen
 - Ethanol 96 % 5 min
 - Ethanol 100 % 2 x 5 min
 - Xylol 3 x 10 min

- Eindeckeln und Konservieren der Präparate mit Eukitt® (Fa. O. Kindler GmbH u. Co.)

- Beurteilung der Präparate unter dem Lichtmikroskop bei 100- bis 400-facher Vergrößerung; Kerne sind blau, Muskulatur und Bindegewebe rot.

➤ **Semiquantitative Auswertung:**

O. b. B.: Ohne besonderen Befund (keine Entzündungszellen vorhanden)

Perivaskuläre Infiltrate: Nur bei wenigen Blutgefäßen (2 - 3 pro Präparat) treten Entzündungszellen aus, ansonsten o. b. B.

Geringgradige Meningitis bzw. Chorioiditis: weiche Hirnhäute (Meningen) bzw. Adergeflechte (Plexus chorioideus) sind geringgradig infiltriert (an 3 - 4 verschiedenen Stellen des Präparates), ansonsten o. b. B.

(Meningo)enzephalitis bzw. Chorioiditis: Blutgefäße der Meningen und/oder des Hirnparenchyms bzw. Adergeflechts sind zu ca. 70 % entzündlich infiltriert

Hochgradige (Meningo)enzephalitis: Blutgefäße der Meningen und/oder des Hirnparenchyms bzw. Adergeflechts sind zu über 90 % entzündlich infiltriert

Multiple Vakuolisierung des Neuropils oder Neuronendegeneration könnten bei gleichzeitigem Fehlen von entzündlichen Infiltraten Hinweise auf transmissible spongiforme Enzephalopathien geben.

3.5.2 Immunhistochemie

3.5.2.1 Prinzip

Durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper, die spezifisch mit dem Wiederkäuer-Prion-Protein reagieren, können auch geringe Mengen an abgelagertem PrP^{Sc} im Hirngewebe spezifisch nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Untersuchung gehört zu den vom internationalen Tierseuchenamt (O.I.E.) vorgeschriebenen TSE-Diagnostikmethoden.

Nach einer speziell auf diese Anwendung abgestimmten Vorbehandlung der Schnittpräparate erfolgt die Inkubation mit einem Prionprotein-spezifischen Antikörper. Diese Reaktion wird durch ein mit Biotin markiertes Konjugat und mit Hilfe eines Avidin-Biotin-Komplexes sichtbar gemacht (BFAV, 2002).

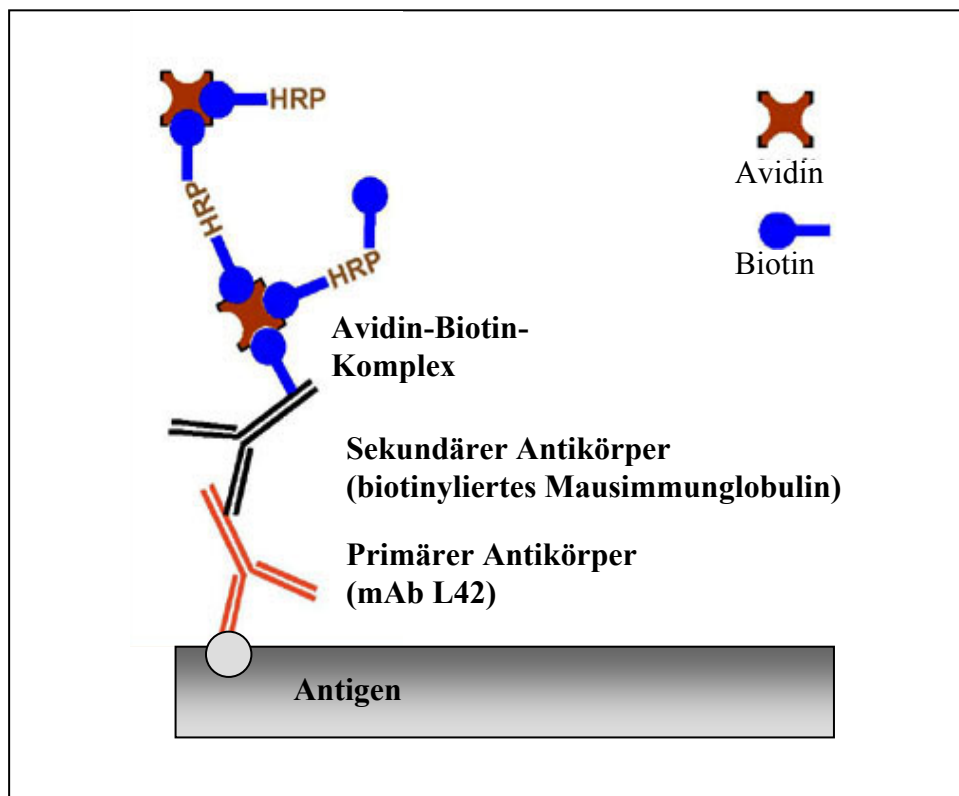


Abbildung 10: Prinzip der Immunhistochemie mit biotinylierten Antispezies-Antikörpern

3.5.2.2 Optimierung der Vorbehandlung der Schnittpräparate

Um unspezifische und falsch positive Reaktionen zu verhindern und spezifische Bindungen zu verstärken, wurde die Vorbehandlung der Schnittpräparate mit Ameisensäure, Proteinase K und Autoklavieren variiert und ausgewertet (vgl. Tabelle 10):

Tabelle 10: Vorbehandlung der Schnittpräparate zum immunhistochemischen Nachweis von PrP^{Sc}

Versuch	Art der Vorbehandlung	Temperatur (°C)	Dauer (min)
1	20 mg/ml Proteinase K (Art.:P2308; Fa. Sigma)	37	30
2	20 mg/ml Proteinase K (Art.:P2308; Fa. Sigma)	37	45
3	4 µl/ml Proteinase K (Art.: 355-1100; Fa. BioRad)	37	45
4	4 µl/ml Proteinase K (Art.: 355-1100; Fa. BioRad)	37	30
5	Autoklavieren	121	15
6	88 % Ameisensäure (Art.: 1.00264.1000; Fa. Merck)	20 - 22	30
	Autoklavieren	121	20
7	88 % Ameisensäure	20 - 22	30
	4 µl/ml Proteinase K	37	10
	Autoklavieren	121	20
8	4 µl/ml Proteinase K	37	30
	Autoklavieren	121	15
9	4 µl/ml Proteinase K (Art.: 355-1100; Fa. BioRad)	37	10
	Autoklavieren	121	20

Die Versuche Nr. 6 und 7 basieren auf den Angaben von Sigurdson et al. (1999); diesen Autoren zu Folge führt eine Vorbehandlung der Schnitte mit 88 % Ameisensäure für 30 min, 25 µg/ml Proteinase K für 10 min und Autoklavieren bei 121 °C für 20 min zu den sensitivsten und spezifischsten Resultaten.

Jeder Versuch wurde mit je einem Schnitt eines BSE-positiv getesteten Rinder-, eines negativ getesteten Rinder- und eines negativ getesteten Rehirns durchgeführt. Zu jeder einzelnen Probe wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, d. h. der jeweilige Schnitt wurde nicht mit dem monoklonalen Antikörper L42 beschichtet.

3.5.2.3 Durchführung der optimierten Methode

Die optimierte Methode wurde entsprechend Versuch 9 (s. Tabelle 10) durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte zunächst mit 4 µl/ml Proteinase K bei 37 °C für 10 min vorbehandelt und anschließend für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

- Die in 5 – 7 prozentigem Formalin fixierten Hirnproben werden nach Wässerung unter fließendem Leitungswasser automatisch entwässert (Hypercenter).
- Flüssiges Paraffin mit Schmelzpunkt bei 56 °C (Paraplast®; Fa. Sherwood Medical Co.) dient als Einbettungsmedium
- Anfertigung von 5 µm dicken Schnitten mit Hilfe eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom HM 355; Fa. Microm International GmbH bzw. RM 2055; Fa. Jung)
- Aufziehen der Paraffinschnitte auf Objektträger und Trocknen bei 37 °C im Brutschrank für bis zu 24 h
- Herstellen des PBS-Puffers (pH 7,0 – 7,6):
 - 7,4 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Art.:1.06580.1000; Fa. Merck)
 - 36 g NaCl (Art.:1.06404.1000; Fa. Merck)
 - 2,15 g Kaliumdihydrogenphosphat (Art.:1.04873.0250; Fa. Merck)*in 1 l Aqua dest. lösen*
- Herstellen des Tris-Puffers:
 - 6,1 g Tris (Art.: 1.08382.1000; Fa. Merck)*in 50 ml Aqua dest. lösen*
 - 37 ml 1 N HCl (Art.: 1.09057.2500; Fa. Merck)*mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen*

- Entparaffinieren der Schnitte in absteigender Alkoholreihe bis 50 %:
 - Xylol (Art.: 8685.2500; Fa. Merck) 2 x 20 min
 - Isopropanol 100 % (Art.: 1.09634.1000; Fa. Merck) 5 min
 - Isopropanol 96 % 5 min
 - Isopropanol 70 % 5 min
 - Isopropanol 50 % 5 min
 - Aqua dest. 5 min

- Spülen in PBS-Puffer:
 - PBS-Puffer 3 x 5 min

- Inkubieren in 3 % H₂O₂-Methanol (3 ml 30 % H₂O₂; Art.: 7209.0250; Fa. Merck; in 100 ml Methanol; Art.:8402; Fa. J. T. Baker):
 - H₂O₂-Methanol 30 min

- Spülen in PBS-Puffer:
 - PBS-Puffer 3 x 5 min

- Benetzen mit Proteinase K (Art.: 355-1100; Fa. BioRad); 4 µl Proteinase K mit 1 ml Reagenz A (Verdünnungspuffer aus dem BSE Reinigungskit; Art.:355-1102; Fa. BioRad) verdünnen:
 - Proteinase K (4 µl/ml) bei 37 °C 10 min

- Spülen in PBS-Puffer:
 - PBS-Puffer 3 x 5 min

- Autoklavieren bei 121 °C 20 min

- Spülen in PBS-Puffer:
 - PBS-Puffer 3 x 5 min

- Inkubation mit Ziegennormalserum, um eine unspezifische Bindung von sekundären Antikörpern zu verhindern (Art.: X0907; Fa. DAKO); 1:20 mit PBS verdünnt; Raumtemperatur:
 - Normalserum Ziege 1:20 30 min

- Inkubation mit dem Erstantikörper (RIDA[®] mAb L42, anti-PrP Mouse Monoclonal Antibody; Art.: R 8005; Fa. R-Biopharm AG), 1:500 mit PBS-Puffer verdünnt, bei 4 °C
 - primärer Ak über Nacht
- Spülen in PBS-Puffer:
 - PBS-Puffer 3 x 5 min
- Inkubation mit dem zweiten Antikörper goat anti mouse (biotinyliertes Mausimmunglobulin; Art.: E 0433; Fa. DAKO), 1:200 mit PBS-Puffer verdünnt, bei Raumtemperatur:
 - biotinylierter Ak 30 min
- Spülen in PBS-Puffer:
 - PBS-Puffer 3 x 5 min
- ABC-Komplex (Vectastain[®] ABC Kit; Art.: PK 4000; Fa. Vector Laboratories) mischen (1 Tropfen von Flasche A mit 1 Tropfen von Flasche B auf 5 ml Aqua dest.; 30 min vor Gebrauch ansetzen), bei Raumtemperatur auftragen und dunkel inkubieren:
 - ABC-Komplex 30 min
- Spülen in PBS-Puffer:
 - PBS-Puffer 3 x 5 min
- Chromogen (DAKO[®] DAB Chromogen; Art.: S 300; Fa DAKO) lösen (1 Tablette in 10 ml Tris-Puffer auflösen und pro Milliliter 1 µl 30 % H₂O₂ als Starter zugeben) und Schnitt färben:
 - Chromogen max. 10 min
- Mit Aqua dest. spülen
- Mit Häkalaunlösung (Art.: 0884.1000; Fa. Spicker) ca. 3 s färben

- In aufsteigender Alkoholreihe entwässern:
 - fließendes Leitungswasser 5 min
 - Isopropanol 30 % 5 min
 - Isopropanol 50 % 5 min
 - Isopropanol 65 % 5 min
 - Isopropanol 70 % 5 min
 - Isopropanol 96 % 5 min
 - Isopropanol 100 % 2 x 5 min
 - Xylol 2 x 10 min

- Eindeckeln und Konservieren der Präparate mit Eukitt[®] (Fa. O. Kindler GmbH u. Co.)

Zu jedem Gesamtansatz wird 1 Positivkontrolle (5 µm dicke Schnitte vom positiv getesteten, in Formalin fixiertem und 20 min in 100 % Ameisensäure eingelegten Material CWD I und zu jeder Probe eine entsprechende Negativkontrolle (keine Inkubation mit dem Erstantikörper L42) mitgeführt; anschließend erfolgt eine Beurteilung der Präparate unter dem Lichtmikroskop bei 100- bis 400-facher Vergrößerung.

4 ERGEBNISSE

4.1 Bakteriologische Untersuchung

4.1.1 Allgemeine bakteriologische Untersuchung

Bei der kulturellen Untersuchung der 849 Hirntupferproben wurden in 49,9 % der Proben Bakterien nachgewiesen; 50,1 % der Proben, also insgesamt 425, erwiesen sich als keimfrei. 64 Proben waren mit verschiedenen als „unspezifisch“ einzustufenden Keimen kontaminiert, d. h. auf den Agarplatten wuchsen sehr viele verschiedene Bakterienarten (z. B. *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus luteus* und *Bacillus spp.*), was für eine Kontamination bei der Probengewinnung spricht. Aus den restlichen 360 Proben wurden 464 Bakterienisolate angezüchtet, von denen 229 bis zur Gattungsebene und 235 bis auf die Speziesebene differenziert werden konnten. Insgesamt wurden 35 verschiedene Bakterienspezies differenziert (s. Tabelle 11). Eine detaillierte Auflistung der Befunde der einzelnen Tiere befindet sich im Anhang (s. Nr. 10.3).

Am häufigsten wurden *Micrococcus spp.* (n = 99), *Bacillus spp.* (n = 81) und *E. coli* (n = 71) isoliert. *Streptococcus spp.* und *Staphylococcus spp.* waren mit jeweils 32 Isolaten im Untersuchungsgut vertreten, während *Acinetobacter spp.* (n = 25), *Pseudomonas spp.* (n = 16) und *Moraxella spp.* (n = 13) seltener anzutreffen waren. Vertreter anderer Gattungen waren nur vereinzelt festzustellen.

Tabelle 11: Vorkommen von Bakteriengattungen bzw. -arten (ohne *Listeria spp.*) im Hirngewebe von Rehwild (n = 654) und Rotwild (n = 189)

Bakteriengattung/ -spezies	Rehwild		Rotwild		Cervidae insgesamt	
	n	%	n	%	n	%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4	0,6	1	0,5	5	0,6
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	3	0,5	-	-	3	0,4
<i>Acinetobacter spp.</i>	13	2,0	4	2,1	17	2,0
Acinetobacter insgesamt	20	3,1	5	2,6	25	2,9
<i>Actinomyces pyogenes</i>	3	0,5	2	1,1	5	0,6
<i>Actinomyces spp.</i>	2	0,3	1	0,5	3	0,4
Actinomyces insgesamt	5	0,8	3	1,6	8	0,9

Fortsetzung Tabelle 11: Vorkommen von Bakteriengattungen bzw. -arten (ohne *Listeria spp.*) im Hirngewebe von Rehwild (n = 654) und Rotwild (n = 189)

Bakteriengattung/ -spezies	Rehwild		Rotwild		Cervidae insgesamt	
	n	%	n	%	n	%
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	0,6	1	0,5	5	0,6
<i>Aeromonas veronii</i>	2	0,3	-	-	2	0,2
<i>Aeromonas spp.</i>	2	0,3	-	-	2	0,2
Aeromonas insgesamt	8	1,2	1	0,5	9	1,1
<i>Aerococcus viridans</i>	3	0,5	-	-	3	0,4
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1	0,2	-	-	1	0,1
<i>Arsenophonus nasoniae</i>	-	-	1	0,5	1	0,1
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	1	0,5	1	0,1
<i>Bacillus coagulans</i>	7	1,1	-	-	7	0,8
<i>Bacillus spp.</i>	52	8,0	21	11,1	73	8,6
Bacillus insgesamt	59	9,0	22	11,6	81	9,5
<i>Burkholderia cepacia</i>	6	0,9	-	-	6	0,7
<i>Bordetella spp.</i>	2	0,3	-	-	2	0,2
<i>Brevuundimonas diminuta</i>	2	0,3	-	-	2	0,2
<i>Corynebacterium renale</i>	1	0,2	-	-	1	0,1
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	2	0,3	1	0,5	3	0,4
<i>Corynebacterium spp.</i>	2	0,3	-	-	2	0,2
Corynebacterium insgesamt	5	0,8	1	0,5	6	0,7
<i>Chromobacterium violaceum</i>	3	0,5	-	-	3	0,4
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	1	0,2	-	-	1	0,1
E. coli	61	9,3	10	5,3	71	8,4
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0,3	-	-	2	0,2
<i>Enterobacter sakazakii</i>	2	0,3	-	-	2	0,2
Enterobacter insgesamt	4	0,6	-	-	4	0,5

Fortsetzung Tabelle 11: Vorkommen von Bakteriengattungen bzw. -arten (ohne *Listeria spp.*) im Hirngewebe von Rehwild (n = 654) und Rotwild (n = 189)

Bakteriengattung/ -spezies	Rehwild		Rotwild		Cervidae insgesamt	
	n	%	n	%	n	%
<i>Enterococcus raffinosus</i>	1	0,2	-	-	1	0,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	0,8	-	-	5	0,6
<i>Enterococcus spp.</i>	-	-	2	1,1	2	0,2
Enterococcus insgesamt	6	0,9	2	1,1	8	0,9
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	4	0,6	-	-	4	0,5
<i>Flavobacterium spp.</i>	3	0,5	-	-	3	0,4
<i>Klebsiella spp.</i>	1	0,2	1	0,5	2	0,2
<i>Lactococcus lactis</i>	3	0,5	-	-	3	0,4
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1	0,2	-	-	1	0,1
<i>Lactococcus spp.</i>	1	0,2	-	-	1	0,1
Lactococcus insgesamt	5	0,8	-	-	5	0,6
<i>Leuconostoc citreum</i>	2	0,3	-	-	2	0,2
<i>Micrococcus luteus</i>	45	6,9	13	6,9	58	6,8
<i>Micrococcus spp.</i>	35	5,4	6	3,2	41	4,8
Micrococcus insgesamt	80	12,2	19	10,1	99	11,7
<i>Moraxella spp.</i>	11	1,7	2	1,1	13	1,5
<i>Neisseria spp.</i>	6	0,9	-	-	6	0,7
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0,2	-	-	1	0,1
<i>Proteus spp.</i>	1	0,2	-	-	1	0,1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	0,5	-	-	3	0,4
<i>Pseudomonas cepacia</i>	1	0,2	-	-	1	0,1
<i>Pseudomonas spp.</i>	11	1,7	1	0,5	12	1,4
Pseudomonas insgesamt	15	2,3	1	0,5	16	1,9
<i>Rhodococcus equi</i>	3	0,5	3	1,6	6	0,7
<i>Serratia plymuthica</i>	1	0,2	-	-	1	0,1

Fortsetzung Tabelle 11: Vorkommen von Bakteriengattungen bzw. -arten (ohne *Listeria spp.*) im Hirngewebe von Rehwild (n = 654) und Rotwild (n = 189)

Bakteriengattung/ -spezies	Rehwild		Rotwild		Cervidae insgesamt	
	n	%	n	%	n	%
Shewanella putrefaciens	2	0,3	-	-	2	0,2
Sphingomonas paucimobilis	4	0,6	-	-	4	0,5
Staphylococcus aureus	3	0,5	-	-	3	0,4
Staphylococcus spp.	22	3,4	7	3,7	29	3,4
Staphylococcus insgesamt	25	3,8	7	3,7	32	3,8
Stenotrophomonas maltophilia	1	0,2	3	1,6	4	0,5
Streptococcus bovis	3	0,5	-	-	3	0,4
Streptococcus mutans	1	0,2	-	-	1	0,1
Streptococcus circulans	1	0,2	-	-	1	0,1
Streptococcus equinus	1	0,2	-	-	1	0,1
α -häm. Streptococcus spp.	9	1,4	3	1,6	12	1,4
β -häm. Streptococcus spp.	7	1,1	1	0,5	8	0,9
γ -häm. Streptococcus spp.	5	0,8	1	0,5	6	0,7
Streptococcus insgesamt	27	4,1	5	2,6	32	3,8

Vergleicht man die Untersuchungsergebnisse von Rehwild und Rotwild, so ist festzustellen, dass - abgesehen von den sporadisch zu isolierenden Bakterienarten - nur geringe Unterschiede bezüglich der Häufigkeit des Vorkommens von Bakterien bestehen. So waren in 49,5 % der Rehwild- und in 49,7 % der Rotwildproben Bakterien nachweisbar. Keine wesentlichen Unterschiede konnten im Hinblick auf das Vorkommen von *Bacillus spp.* (Rehwild: 9,0 %, Rotwild: 11,6 %), *Micrococcus spp.* (Rehwild: 12,2 %, Rotwild: 10,1 %) oder *Staphylococcus spp.* (Rehwild: 3,8 %, Rotwild: 3,7 %) beobachtet werden. Unterschiede bezüglich der nur vereinzelt nachweisbaren Bakterienarten (z. B. *Streptococcus circulans*, *Serratia plymuthica* usw.) dürften vor allem zufällig bedingt sein.

Ein regional häufigeres Vorkommen eines bestimmten Keimes konnte nur bei der Spezies *Chromobacterium violaceum* erkannt werden; diese Bakterienspezies wurde nur bei Tieren, die im Bereich des Forstamtes Landshut erlegt wurden, nachgewiesen.

4.1.2 Selektiver Listerien-Nachweis

4.1.2.1 Resultate der kulturell-biochemischen Identifizierung

Bei 55 der 849 untersuchten Hirnproben konnten Listerien nachgewiesen werden, was einer Infektionsrate von 6,5 % entspricht. 52 dieser Isolate wurden anhand biochemischer Reaktionen als *L. monocytogenes* identifiziert, wobei bei 3 der CAMP-Test nur sehr schwach ausfiel; 4 Isolate führten nur zu einer vergrünenden Hämolyse. 3 weitere Isolate wurden im BBL-Test als *L. grayi ssp. murrayi* identifiziert, von denen sich jedoch ein Stamm (W589) im CAMP-Test als eindeutig positiv erwies.

Tabelle 12: Ergebnisse der Listerien-Selektivanreicherung

Tagebuchnummer	Tierart	BBL-Ergebnis	Konfidenz	CAMP-Test	Hämolyse
W 159	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+	+
W 164	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+	+
W 167	Rehwild	L. monoc.	87,70%	+	+
W 168	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+	+
W 169	Rehwild	L. grayi ssp. murrayi	96,81%	-	vergrünend
W 171	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 172	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+	+
W 194	Rehwild	L. monoc.	99,25%	+	+
W 225	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 242	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 324	Rehwild	L. monoc.	87,70%	+	+
W 331	Rehwild	L. monoc.	87,70%	+	+
W 414	Rehwild	L. monoc.	87,70%	+	+
W 423	Rehwild	L. monoc.	87,70%	+	+
W 424	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 425	Rehwild	L. grayi ssp. murrayi	96,81%	-	vergrünend
W 426	Rehwild	L. monoc.	87,70%	+	+
W 461	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+/-	+
W 462	Rehwild	L. monoc.	87,70%	+	n
W 579	Rehwild	L. monoc.	64,36%	+	vergrünend
W 580	Rehwild	L. monoc.	64,36%	+	vergrünend
W 582	Rehwild	L. monoc.	92,52%	+	vergrünend
W 583	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 589	Rehwild	L. grayi ssp. murrayi	96,81%	+	vergrünend
W 590	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 596	Rehwild	L. monoc.	87,70%	+	+
W 607	Rehwild	L. monoc.	81,18%	+	+
W 608	Rehwild	L. monoc.	81,18%	+	+
W 609	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+	+

Fortsetzung Tabelle 12: Ergebnisse der Listerien-Selektivanreicherung

Tagebuchnummer	Tierart	BBL-Ergebnis	Konfidenz	CAMP-Test	Hämolyse
W 610	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 611	Rehwild	L. monoc.	99,97%	+	+
W 612	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+	+
W 613	Rehwild	L. monoc.	81,18%	+	+
W 614	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+	+
W 615	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+/-	+
W 618	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+/-	+
W 625	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+	+
W 631	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+	+
W 632	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+	+
W 633	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 636	Rehwild	L. monoc.	99,97%	+	+
W 750	Rehwild	L. monoc.	99,60%	+	+
W 754	Rehwild	L. monoc.	99,97%	+	+
W 782	Rehwild	L. monoc.	46,08%	+	vergrünend
W 783	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 790	Rehwild	L. monoc.	99,00%	+	+
W 792	Rehwild	L. monoc.	99,00%	+	+
W 825	Rehwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 836	Rehwild	L. monoc.	87,70%	+	+
W 244	Rotwild	L. monoc.	99,93%	+	+
W 482	Rotwild	L. monoc.	95,98%	+	+
W 501	Rotwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 503	Rotwild	L. monoc.	81,73%	+	+
W 787	Rotwild	L. monoc.	99,60%	+	+
W 391	Gams	L. monoc.	81,73%	+	+

+: vollständige Hämolyse

-: keine Hämolyse

4.1.2.2 Ergebnisse der PCR-Identifizierung

Die Überprüfung der mittels konventioneller Verfahren erzielten Resultate durch Amplifikation eines Abschnitts des *iap*-Gens, unter Verwendung spezifischer Gensonden, führte in allen Fällen zu einem Amplifikationsprodukt. 53 der 55 isolierten Listerienstämme wiesen eine ähnliche Schmelzkurve, mit einer Schmelztemperatur von 62,5 °C, auf (vgl. Abbildung 11 A). Dagegen wurde bei den Isolaten *W 607* und *W 609* ein eindeutig biphasischer Verlauf der Schmelzkurve beobachtet: Ein erstes „Maximum“ der DNA-Schmelze liegt bei 49 °C, ein zweites bei 59 °C (vgl. Abbildung 11 B).

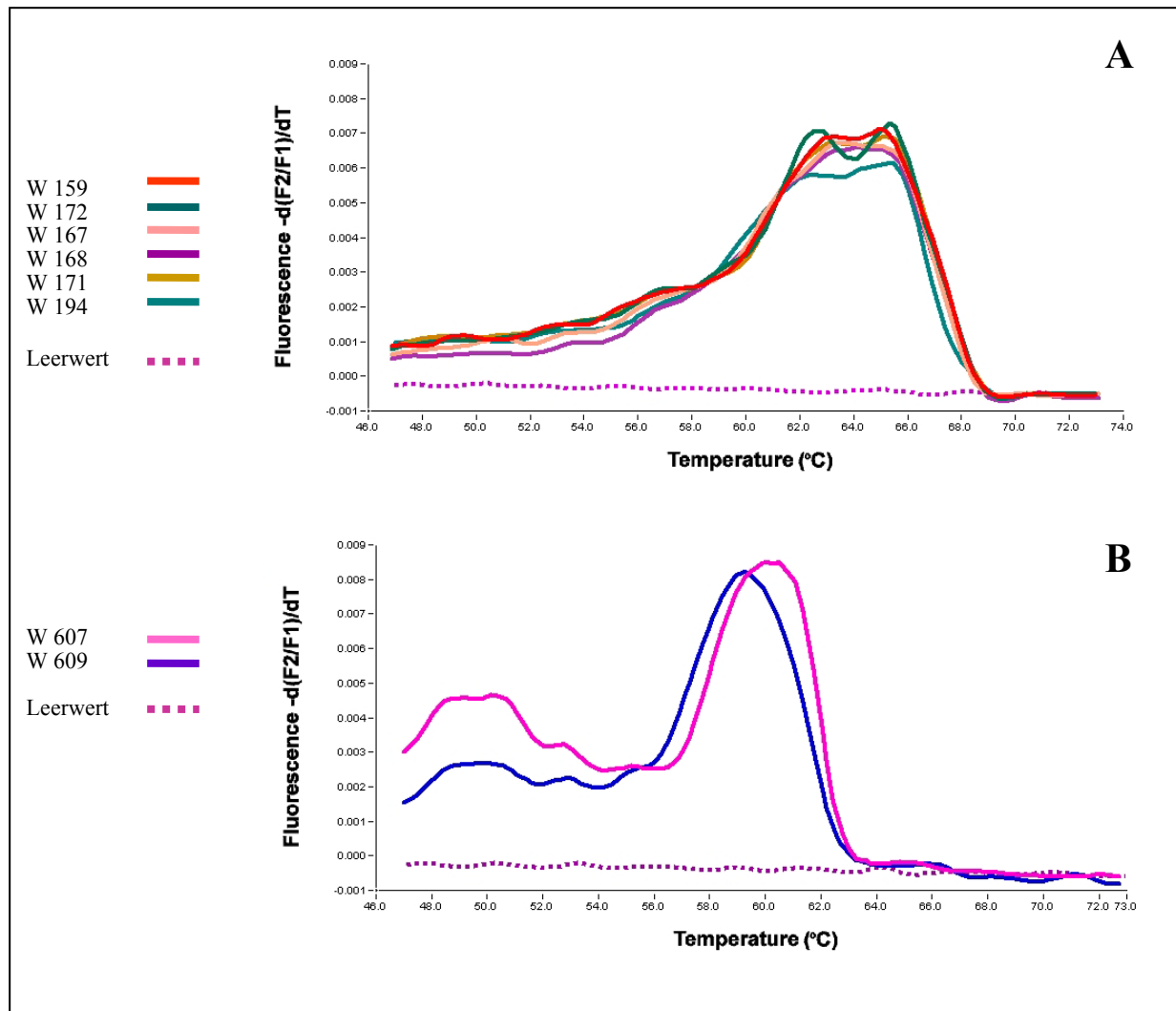


Abbildung 11: Schmelzkurvenverlauf von aus Hirnproben vom Wild isolierten Listerienstämmen (n = 55)
 A: Kurvenverlauf bei 53 Stämmen
 B: Kurvenverlauf bei 2 Stämmen

Bei der Bewertung dieser Befunde fällt auf, dass die mittels BBL-System als *L. grayi ssp. murrayi* identifizierte Stämme auch in der PCR zu einem positiven Ergebnis führten. Da der Referenzstamm, der vom Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU Weihenstephan zur Verfügung gestellt wurde, jedoch ein negatives Resultat lieferte (s. Abbildung 12), ist die Aussagekraft des BBL-Ergebnisses zu hinterfragen.

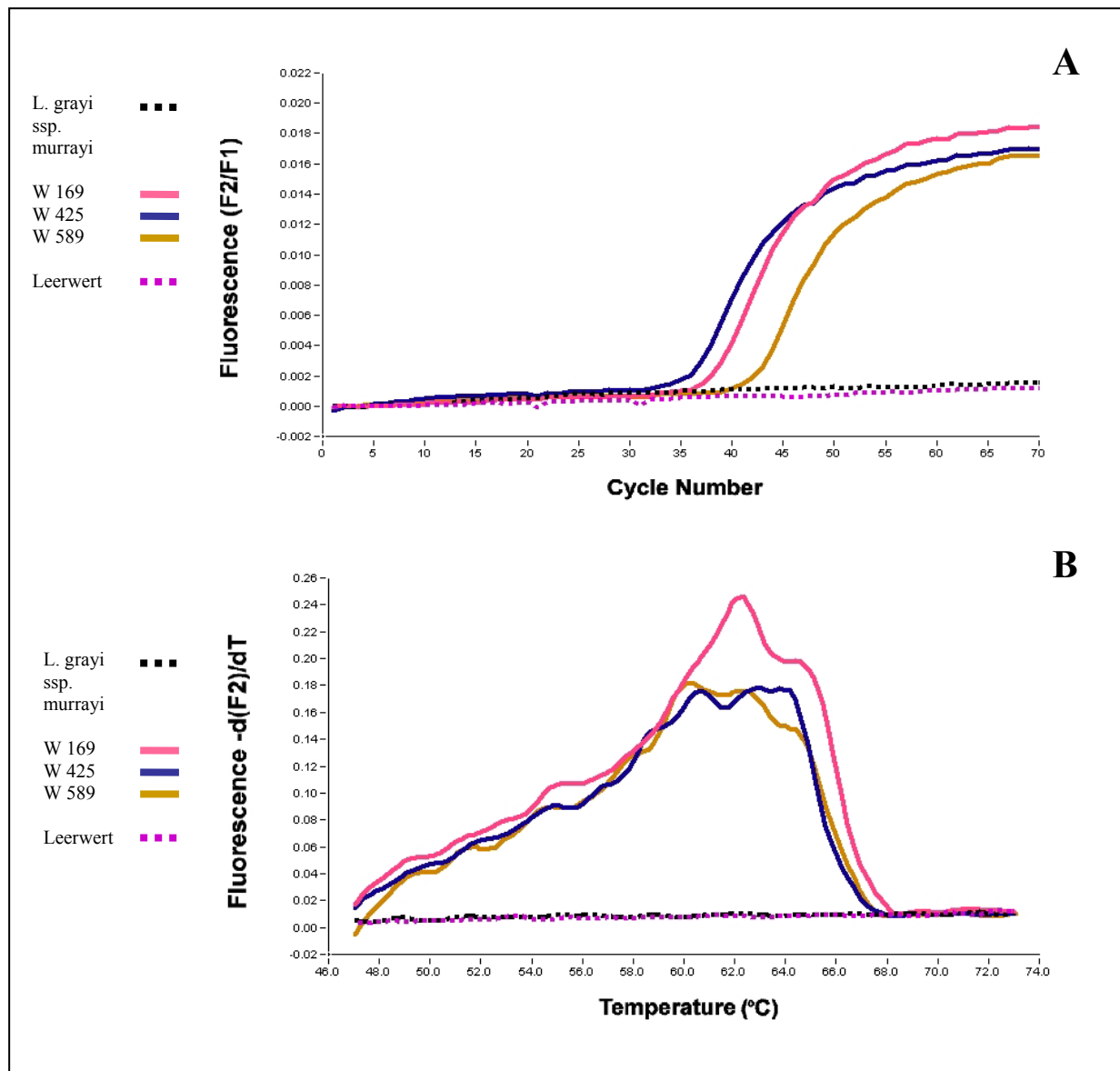


Abbildung 12: Amplifikationskurven (A) bzw. Schmelzkurvenverläufe (B) von *L. grayi ssp. murrayi* (Referenzstamm) und den Isolaten *W 169*, *W 425* und *W 589*

4.1.2.3 Verteilung der Listerienbefunde

Insgesamt konnten in 55 Hirnproben Listerien nachgewiesen werden. 49 dieser Stämme wurden aus Rehwild und 5 aus Rotwild isoliert; daraus errechnet sich eine Inzidenz von 7,49 % für Reh- und 2,65 % für Rotwild (s. Abbildung 13). Von 6 vom Gamswild stammenden Proben war eine positiv.

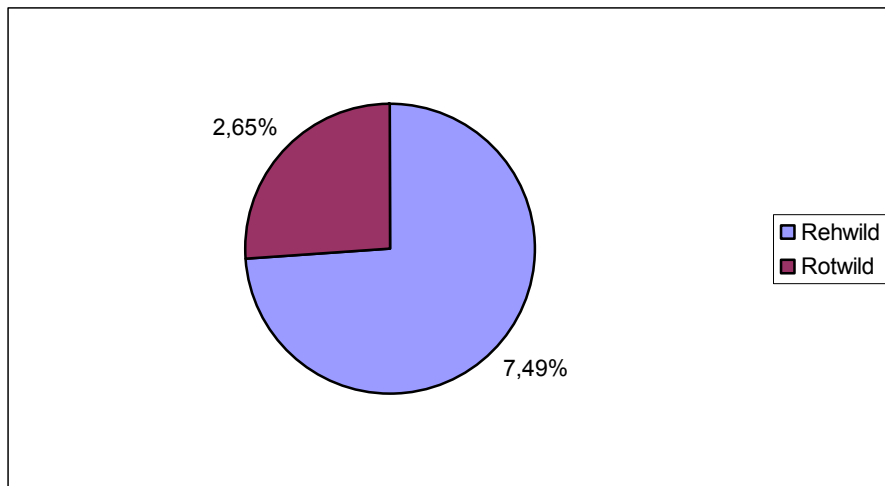


Abbildung 13: Verteilung der Tierarten bei den Listeriosefällen

Betrachtet man die regionale Verteilung der positiven Proben, so ist festzustellen, dass 24 (1 Gams-, 1 Rot-, 22 Rehwild) der positiven Fälle der Forstdirektion Oberbayern-Schwaben, 17 (1 Rotwild, 16 Rehwild) der Forstdirektion Unterfranken und 14 (3 Rot-, 11 Rehwild) der Forstdirektion Niederbayern-Oberpfalz zuzuordnen sind. Dabei fällt eine Verdichtung des Vorkommens in Unterfranken auf; die Prävalenzrate beträgt hier 17,78 % beim Rehwild (s. Abbildung 14).

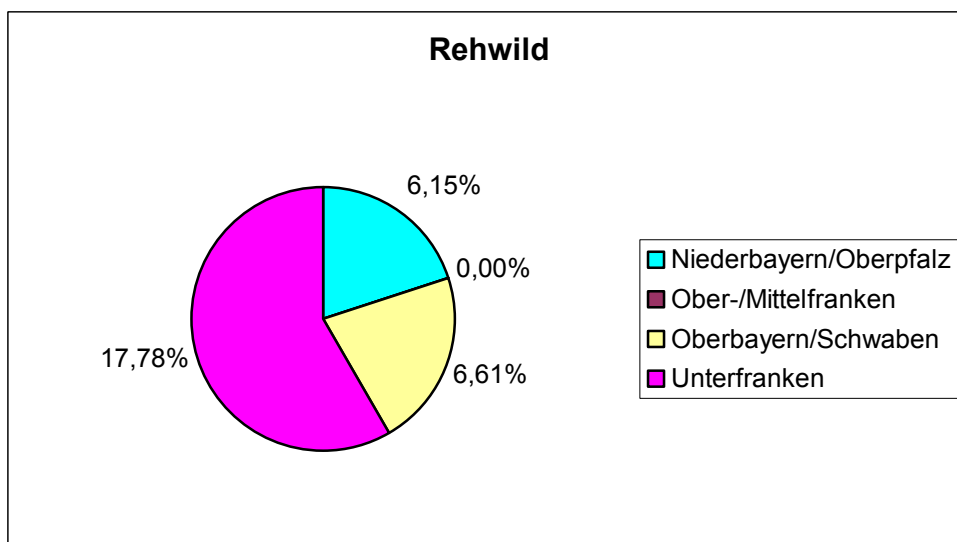


Abbildung 14: Regionale Verteilung der Listeriose beim Rehwild in Bayern

4.1.3 Histologie

Anhand der allgemeinen bakteriologischen Untersuchung und der Listerien-Selektivanreicherung konnten einige enzephalitisrelevante Keime isoliert werden. Um

festzustellen, inwieweit das Vorhandensein dieser Erreger mit einem Entzündungsgeschehen korreliert, wurden insgesamt 87 Proben histologisch untersucht (s. Tabelle 13). Von besonderem Interesse waren hierbei Proben, aus denen *Listeria monocytogenes* (n = 39), *Listeria grayi ssp. murrayi* (n = 3) und *Streptococcus spp.* (n = 13) nachgewiesen wurden.

Tabelle 13: Histologische Befunde von bakteriologisch auffälligen Hirnproben vom Wild (n = 87)

Nr.	Tierart	Bakteriologischer Befund		Histologischer Befund
		Bakteriengattung/ -spezies	Kontaminations- grad ¹⁾	
W 667	Rehwild	Acinetobacter iwoffii	+	o. b. B.
W 782	Rehwild	Acinetobacter spp.	++	o. b. B.
W 768	Rehwild	Actinobacillus spp.	++	o. b. B.
W 623	Rehwild	Aerococcus viridans	(+)	perivaskuläre Infiltrate
W 783	Rehwild	Aeromonas hydrophila	++	o. b. B.
W 493	Rotwild	Arsenophonus nasoniae	(+)	o. b. B.
W 201	Rehwild	Bordetella spp.	(+)	Meningoenzephalitis
W 216	Rehwild	Bordetella spp.	(+)	Nervenzellnekrosen
W 648	Rehwild	Burkholderia cepacia	++	o. b. B.
W 791	Rehwild	Burkholderia cepacia Flavimonas oryzihabitans	++ +	o. b. B.
W 720	Rehwild	Chromobacterium violaceum	++	Enzephalitis
W 222	Rehwild	Chryseobact. meningosepticum	+	Meningoenzephalitis
W 238	Rehwild	Corynebact. aquaticum	+	perivaskuläre Infiltrate
W 179	Rehwild	E. coli	+	perivaskuläre Infiltrate
W 714	Rehwild	E. coli	++	o. b. B.
W 752	Rehwild	Enterobacter cloacae	+	Meningoenzephalitis
W 750	Rehwild	Enterococcus faecalis	++	o. b. B.
W 559	Rehwild	Enterococcus raffinosus	+++	perivaskuläre Infiltrate
W 409	Rehwild	Klebsiella spp.	(+)	Meningitis, Chorioiditis
W 169	Rehwild	L. grayi ssp. murrayi	n. V. ²⁾	o. b. B.
W 425	Rehwild	L. grayi ssp. murrayi	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 589	Rehwild	L. grayi ssp. murrayi	n. V.	Meningoenzephalitis
W 159	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 164	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 167	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 168	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 171	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 225	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate Nervenzellnekrosen
W 242	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate

Fortsetzung Tabelle 13: Histologische Befunde von bakteriologisch auffälligen Hirnproben vom Wild (n = 87)

Nr.	Tierart	Bakteriologischer Befund		Histologischer Befund
		Bakteriengattung/ -spezies	Kontaminations- grad ¹⁾	
W 244	Rotwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 324	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 331	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 391	Gamswild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 414	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 423	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	Enzephalitis
W 424	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 426	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 461	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 462	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	ggr. perivaskuläre Infiltrate
W 482	Rotwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 501	Rotwild	List. monocytogenes	n. V.	ggr. perivaskuläre Infiltrate
W 503	Rotwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 579	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 580	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 582	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 583	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	ggr. perivaskuläre Infiltrate
W 590	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 596	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 607	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 608	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	ggr. perivaskuläre Infiltrate
W 609	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 610	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 613	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 614	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 615	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 618	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 625	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	Meningoenzephalitis
W 631	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 632	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 633	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	perivaskuläre Infiltrate
W 636	Rehwild	List. monocytogenes	n. V.	o. b. B.
W 508	Rotwild	Micrococcus spp.	+	o. b. B.
W 177	Rehwild	Moraxella spp.	+	Meningoenzephalitis

Fortsetzung Tabelle 13: Histologische Befunde von bakteriologisch auffälligen Hirnproben vom Wild (n = 87)

Nr.	Tierart	Bakteriologischer Befund		Histologischer Befund
		Bakteriengattung/ -spezies	Kontaminations- grad ¹⁾	
W 777	Rehwild	Neisseria spp. β-häm. Streptococcus spp.	(+) (+)	o. b. B.
W 271	Rehwild	Neisseria spp.	(+)	o. b. B.
W 348	Rehwild	Neisseria spp.	(+)	ggr. Chorioiditis und Meningitis
W 456	Rehwild	Neisseria spp.	+	Chorioiditis; Meningitis
W 468	Rehwild	Neisseria spp.	(+)	o. b. B.
W 261	Rehwild	Pseudomonas aeruginosa	(+)	o. b. B.
W 654	Rehwild	Pseudomonas aeruginosa	++	o. b. B.
W 250	Rehwild	Pseudomonas aeruginosa β-häm. Streptococcus spp.	(+) (+)	perivaskuläre Infiltrate
W 200	Rehwild	Pseudomonas aeruginosa Streptococcus mutans	(+) (+)	o. b. B.
W 239	Rehwild	Sphingomonas paucimobilis	(+)	Meningitis
W 267	Rehwild	Sphingomonas paucimobilis	(+)	o. b. B.
W 512	Rotwild	Staphylococcus spp.	+	o. b. B.
W 236	Rehwild	Staphylococcus spp. γ-häm. Streptococcus spp.	+ (+)	perivaskuläre Infiltrate
W 112	Rotwild	Stenotrophomonas maltophilia E. coli Rhodococcus equi	(+) (+) (+)	o. b. B.
W 142	Rotwild	α-häm. Streptococcus spp.	+	o. b. B.
W 439	Rehwild	α-häm. Streptococcus spp.	(+)	o. b. B.
W 582	Rehwild	α-häm. Streptococcus spp.	+++	perivaskuläre Infiltrate
W 708	Rehwild	α-häm. Streptococcus spp.	(+)	o. b. B.
W 330	Rehwild	Streptococcus bovis	(+)	o. b. B.
W 696	Rehwild	Streptococcus bovis	+++++	hgr. Meningoenzephalitis
W 175	Rehwild	γ-häm. Streptococcus spp.	+	o. b. B.
W 270	Rehwild	γ-häm. Streptococcus spp.	(+)	o. b. B.
W 628	Rehwild	γ-häm. Streptococcus spp.	+	Nervenzellnekrosen
W 325	Rehwild	γ-häm. Streptococcus spp. Neisseria spp.	(+) (+)	o. b. B.

1) (+): 1 - 2 Kolonien
 +: 3 - 4 Kolonien
 ++: 5 - 7 Kolonien
 +++: 8 - 16 Kolonien
 ++++: 17 - 50 Kolonien
 +++++: > 50 Kolonien

2) n. V.: nach Voranreicherung

Von den insgesamt 87 Präparaten waren 46 histologisch unauffällig, das entspricht 53,5%. Nur in 41 Fällen (47,1 %) wurden Abweichungen von der Norm festgestellt. Dabei dominierten perivaskuläre Infiltrate (vgl. Abbildung 15), während Meningoenzephalitis, Nervenzellnekrosen, Enzephalitis, Meningitis oder Chorioiditis nur vereinzelt feststellbar waren (vgl. Tabelle 14).

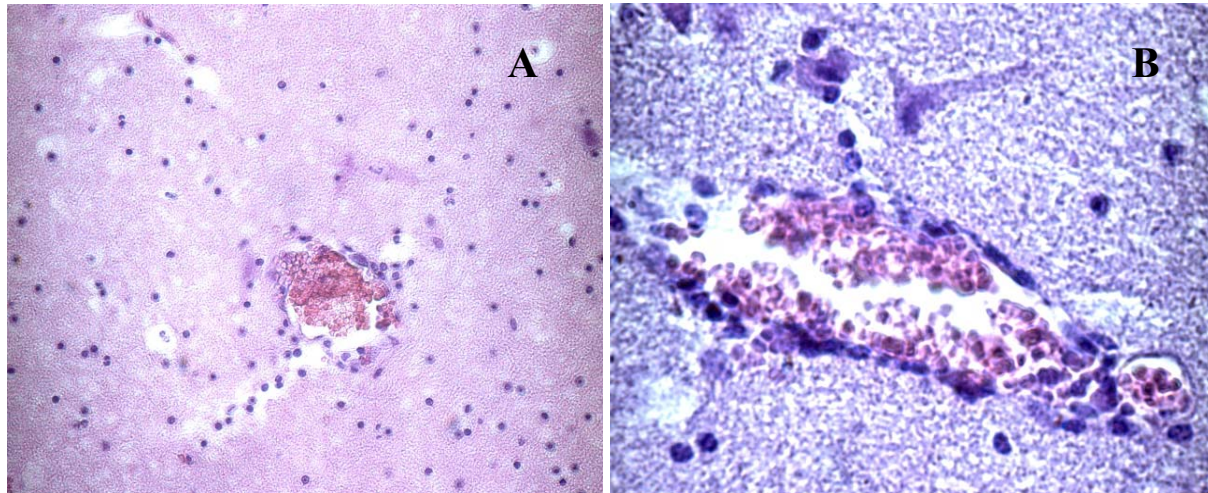


Abbildung 15: Histologische Präparate von bakteriologisch auffälligen Hirnproben vom Wild
 A: perivaskuläre Infiltrate; Vergrößerung 400x
 B: perivaskuläre granulo- und lymphozytäre Infiltrate, Vergrößerung 1000x

Tabelle 14: Vorkommen pathologisch-histologischer Veränderungen in vorselektierten Hirnproben von Wildwiederkäuern (n = 87)

Befund	Häufigkeit (n)
Perivaskuläre Infiltration	26
Meningoenzephalitis	7
Meningitis	4
Nervenzellnekrosen	3
Chorioiditis	3
Enzephalitis	2

Betrachtet man die bakteriologischen Befunde der histologisch auffälligen Proben, so ist festzustellen, dass in diesem Kontingent 14 unterschiedliche Genera vorkamen. Neben bekannten neurotrophen Erregern, wie *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus spp.* oder *Neisseria spp.*, waren dabei auch andere Keime zu finden, die nur gelegentlich im Zusammenhang mit entzündlichen Hirnveränderungen beobachtet werden, z. B. *Corynebacterium aquaticum*, *Sphingomonas paucimobilis* oder *Pseudomonas aeruginosa*.

Vergleicht man die histologischen Befunde der als *Listeria*-positiv bewerteten Proben mit denen anderer, mit Enzephalitis-relevanten Keimen infizierten Proben, so kommt man zu dem Ergebnis, dass bei 22 der insgesamt 42 Schnittpräparate (= 52,4 %), bei denen durch Selektivanreicherung *Listerien* nachgewiesen wurden, auch Entzündungsgeschehen festgestellt werden konnten, darunter auch bei zwei Proben, bei denen im BBL *Listeria grayi* ssp. *murrayi* diagnostiziert wurde (*W* 425 und *W* 589). Im Vergleich dazu waren nur bei 19 der restlichen 45 Präparate (= 42,2 %) mit anderen Keimen, nachgewiesen in der allgemeinen bakteriologischen Untersuchung, Entzündungszellen zu sehen.

4.2 TSE-Nachweis

4.2.1 Eignung des Verfahrens zum Nachweis cervider Prionen

Um nachzuweisen, dass der eingesetzte ELISA auch PrP^{res} von Wildwiederkäuern detektieren kann, wurde bei 25 Hirnhomogenaten der Proteinase K-Verdau weggelassen. Die Extinktionen der unverdaut getesteten Proben lagen um den Faktor 12 über denen der mit Proteinase K verdauten (vgl. Tabelle 15).

Tabelle 15: Durchschnittliche Extinktion (OD) von Hirnhomogenaten vom Rehwild im ELISA nach unterschiedlicher Behandlung

	Verdau mit Proteinase K	
	ja (n = 25)	nein (n = 849)
Durchschnittl. Extinktion	0,228	0,018

Diese höheren Werte zeigen an, dass Prionen von Wildwiederkäuern mit dem Testsystem erfasst werden können. Da dieses Resultat noch keine Gewähr dafür bietet, dass auch PrP^{res} nachweisbar ist, wurde zusätzlich Hirnmaterial von 2 durch Histopathologie und Immunhistochemie positiv diagnostizierte Wapitis getestet.

Die beiden Proben reagierten nach einer 1:3 Verdünnung eindeutig positiv (vgl. Tabelle 16).

Tabelle 16: ELISA-Extinktionen (OD) von CWD-positivem Hirngewebe

	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	CWD I^{*)}	CWD II^{*)}
Extinktion	0,046	1,186	1,320	1,344

^{*)} 1:3 verdünnt

Diese Ergebnisse belegen prinzipiell die Eignung des angewendeten Testkits für den Nachweis von PrP^{tes} bei Wildwiederkäuern.

4.2.2 Resultate der „Feldproben“

Die Untersuchung der 849 Hirnproben von Wildwiederkäuern erfolgte mit Hilfe des BioRad-ELISA in 73 Versuchsansätzen. Die durchschnittliche Extinktion der mitgelieferten „Negativkontrolle“ betrug 0,020 (+/- 0,010).

Die durchschnittlichen Extinktionen betragen beim Rehwild 0,018 (+/- 0,008), beim Rotwild 0,020 (+/- 0,010) und beim Gamswild 0,014 (+/- 0,005). Die jeweiligen Höchstwerte lagen beim Rehwild bei 0,043, beim Rotwild bei 0,041 und beim Gamswild bei 0,020.

Tabelle 17: ELISA-Extinktionen (OD) von Hirnhomogenaten von Wildwiederkäuern bayerischer Provinienz

Tierart	Probenanzahl	O (s)	Bereich min...max	Varianz
Rehwild	654	0,018 (0,008)	0,001...0,043	43,125
Rotwild	189	0,020 (0,010)	0,001...0,041	49,024
Gamswild	6	0,014 (0,005)	0,008...0,020	31,408
Negativkontrolle	73	0,020 (0,010)	0,003...0,046	50,472

4.2.3 Immunhistochemie

Zur Überprüfung der ELISA-Ergebnisse wurden 10 % des Gesamtprobenumfangs immunhistochemisch untersucht. Dazu war zunächst eine Optimierung der vorgegebenen Methode erforderlich (Versuch 1, s.Tabelle 10).

4.2.3.1 Optimierung der Vorbehandlung der Schnittpräparate

In den ersten 4 Versuchsansätzen (s. Tabelle 10) wurden die Schnitte nur mit Proteinase K in verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlich lang inkubiert. Auf Autoklavieren wurde zunächst verzichtet.

Im ersten Versuch wirkte die Proteinase K in einer Konzentration von 20 mg/ml bei 37 °C 45 min lang ein. Daraufhin färbten sich die Kerne aller Präparate (Positivkontrolle: PrP^{res}-positives Hirngewebe vom Rind; Negativkontrolle: PrP^{res}-negativ getestetes Hirngewebe von Rind und Reh), einschließlich Nerven-, Endothel- und Entzündungszellen, braun an (s. Abbildung 16). Ein derartiges Bild ist normalerweise typisch für ein positives Ergebnis. Es kommt zustande, wenn das Chromogen an einen Antigen-Antikörperkomplex binden kann. Da aber sowohl Rinder- als auch Rehirn bereits im ELISA als negativ bewertet wurden, lag nahe, dass diese immunhistochemische Methode falschpositive Ergebnisse liefert. Daraus wurde gefolgert, dass evtl. die Verdauung der physiologischen Prionen unvollständig war, so dass der verwendete primäre Antikörper L42 an die noch vorhandenen (unverdauten) PrP^{sen} binden konnte. Deshalb wurde die Einwirkzeit der Proteinase K von 30 min auf 45 min erhöht (Versuch 2), um alle PrP^{sen} zu zerstören. Aber auch die Verlängerung der Einwirkzeit konnte die Kernfärbung nicht verhindern, sie schien diese im Gegenteil sogar noch zu intensivieren.

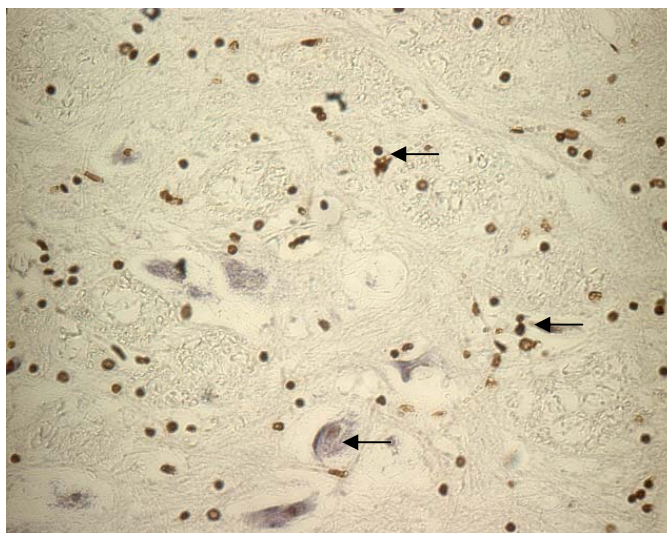


Abbildung 16: Immunhistochemische Untersuchung (Versuch 1) von Hirngewebe eines im ELISA negativ getesteten Rehs: Braun gefärbte Kerne täuschen TSE vor (falsch-positives Resultat)

Nachdem ein Mehr an Proteinase K nicht den erhofften Effekt brachte, wurde die Konzentration von 20 mg/ml auf 4 µl/ml verringert. Die Einwirkzeit betrug wieder 45 min (Versuch 3) bzw. 30 min (Versuch 4), bei einer Temperatur von 37 °C. Nun färbten sich die

Kerne schon deutlich weniger braun an, aber das Ergebnis konnte noch nicht als „negativ“ ausgewertet werden.

In den folgenden Versuchen 5 bis 9 wurden die Schnitte bei 121 °C autoklaviert, um unspezifische Bindungsstellen zu zerstören.

In Versuch 5 wurde auf Proteinase K-Verdau verzichtet; die Vorbehandlung beschränkte sich auf 15 min Autoklavieren bei 121 °C. Nun erschienen zwar die negativ getesteten Rinder- und Rehirne negativ, d. h. auf den jeweiligen Schnittpräparaten war keine braune Färbung mehr zu sehen, aber auch die Positivkontrollen ließen sich nicht mehr spezifisch anfärben.

Auch im Versuch 6, in dem die Schnitte zunächst mit 88 % Ameisensäure bei Raumtemperatur (20 - 22 °C) für 30 min benetzt und anschließend für 20 min bei 121 °C autoklaviert wurden, waren die Positivkontrollen (falsch-)negativ.

Mit der von Sigurdson et al. (1999) favorisierten Methode (88 % Ameisensäure bei 20 - 22 °C für 30 min, 4 µl/ml Proteinase K bei 37 °C für 10 min und Autoklavieren bei 121 °C für 20 min; Versuch 7) konnte die Positivkontrolle angefärbt werden, allerdings gab es auch unspezifische Reaktionen. So färbten sich die Nervenzellkerne und das Lipofuszin zu stark an, und auch der Hintergrund der negativen Proben erschien zu dunkel.

Die letzten beiden Versuche kombinieren eine Vorbehandlung mit 4 µl/ml Proteinase K bei 37 °C für 30 min (Versuch 8) bzw. 10 min (Versuch 9) und Autoklavieren bei 121 °C für 15 min (Versuch 8) bzw. 20 min (Versuch 9). Beide Methoden führten zu einer spezifischen Anfärbung der Positivkontrollen (s. Abbildung 17 A), während sich die im ELISA negativ getesteten Rinder- und Rehpräparate nicht anfärben ließen und somit auch in der Immunhistochemie als negativ beurteilt werden konnten (s. Abbildung 17 B und Abbildung 18 B); die Kerne färben sich nur aufgrund der Hämalaun-Färbung blau an. Als Positivkontrolle war das Schnittpräparat des BSE-positiven Rindes besser geeignet, da das CWD-positive Hirnmaterial des Wapiti-Hirsches durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen in seiner Struktur schon stark geschädigt war und die fortgeschrittene Autolyse eine Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse erheblich erschwerte oder gar unmöglich machte (s. Abbildung 18 A).

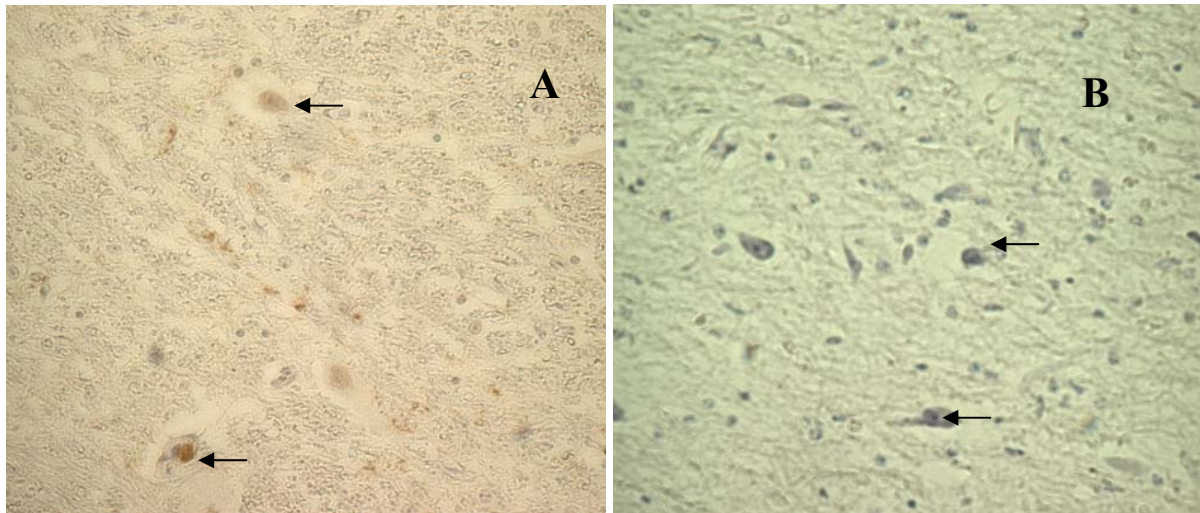


Abbildung 17: Immunhistochemie vom Hirngewebe von Rindern:
Vorbehandlung mit Proteinase K und Autoklavieren (Versuch 9)
A: BSE-positives Rind: PrP^{res} wird braun angefärbt
B: BSE-negatives Rind: Kerne färben sich nur aufgrund des Hämalauns blau an

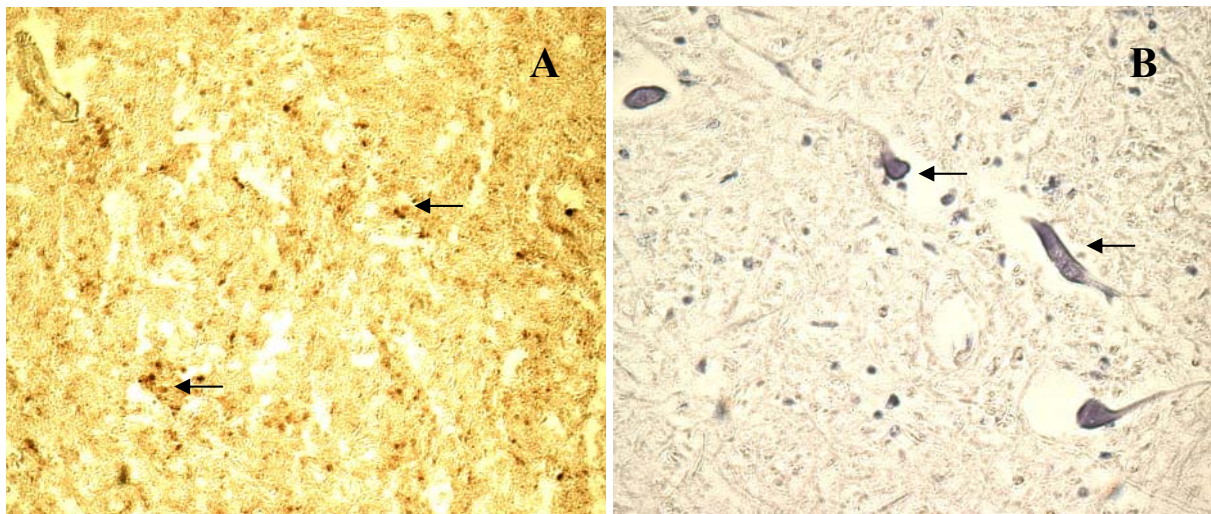


Abbildung 18: Immunhistochemie vom Hirngewebe von Cervidae: Vorbehandlung mit Proteinase K und Autoklavieren (Versuch 9)
A: CWD-positiver Wapitihirsch: Qualität durch Autolyse beeinträchtigt, dadurch sind nur noch braun angefärbte Kernfragmente erkennbar
B: CWD-negatives Reh: Kerne färben sich nur aufgrund des Hämalauns blau an

Für die Durchführung der nachfolgenden Versuche wurde deshalb aufgrund der spezifischen Ergebnisse Versuch 9 angewendet. Diese optimierte Methode ist wegen des geringeren Zeitaufwands auch Versuch 8 vorzuziehen.

4.2.3.2 Durchführung der Immunhistochemie mit der optimierten Methode

Zur Absicherung der ELISA-Ergebnisse wurden 87 Proben (77 Rehwild, 9 Rotwild, 1 Gamswild) immunhistochemisch untersucht; das entspricht etwa 10 % der 849 ELISA-Proben. 39 Tiere stammten aus Oberbayern-Schwaben, 32 aus Niederbayern-Oberpfalz, 2 aus Oberfranken-Mittelfranken und 13 aus Unterfranken.

In keinem der Präparate konnten Hinweise auf Scrapie assoziierte Fibrillen oder Florid Plaques gefunden werden; in der Positivkontrolle wurde dagegen stets eine Anfärbung des PrP^{res} nachgewiesen.

5 DISKUSSION

Enzephalopathien haben bei Wildtieren, wie bei anderen Tierarten, unterschiedliche Ursachen. In der vorgelegten Studie wurden einerseits bakteriologische Krankheitsursachen näher berücksichtigt, andererseits wurde erstmals eine größere Probenanzahl auf das Vorkommen von PrP^{res} untersucht. Da die gewählten Methoden die Resultate sehr stark mit beeinflussen, werden zunächst die eingesetzten Methoden diskutiert, bevor dann die eigentlichen Ergebnisse intensiver beleuchtet werden.

5.1 Methodisches Vorgehen

5.1.1 Gewinnung des Probenmaterials

Eine aseptische Entnahme des Probenmaterials ist für die Aussagekraft bakteriologischer Untersuchungsergebnisse von entscheidender Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit war dies nur bedingt möglich. Zum Teil wurden die Proben auf dem freien Feld gewonnen, so dass eine Kontamination mit „Umweltkeimen“ möglich war. Bei der Einsendung ganzer Köpfe war die Gefahr einer aufsteigenden Kontamination des Hirngewebes über das Foramen occipitale gegeben, insbesondere dann, wenn das Material nicht optimal gekühlt war. Dies mag mit der Grund dafür sein, dass bei 7,5 % der Proben (5,7 % beim Reh-, 14,3 % beim Rotwild) eine sogenannte „unspezifische, umweltbedingte Mischflora“ diagnostiziert wurde. Allerdings hat es sich auch gezeigt, dass dieser Einfluss nicht überbewertet werden darf, da sich 50,1 % der Proben (50,5 % beim Reh-, 50,3 % beim Rotwild) als „keimfrei“ erwiesen.

Auf den Nachweis von PrP^{res} dürfte eine bakterielle Kontamination des Materials weniger Einfluss haben, da diese Eiweissmoleküle Proteinase resistent sind (Madec et al., 1997).

5.1.2 Bakteriologische Methoden

Zur bakteriologischen Untersuchung des Probenmaterials wurden einerseits konventionelle Kulturverfahren (Anzucht auf Blut-, Nähr-, Gassneragar, Listerienanreicherung) herangezogen, andererseits auch moderne biotechnologische Methoden (PCR) benutzt. Wie wichtig dabei ein gezieltes, selektives Vorgehen ist, kann am Beispiel *Listeria* aufgezeigt werden. Der Nachweis dieser Bakteriengattung gelang immerhin in 55 Fällen, allerdings nur dann, wenn Voranreicherung und selektive Nährböden Verwendung fanden: Das Ausstreichen von Hirnmaterial bzw. einer Tupferprobe auf Agarplatten führte in keinem Fall

zu einem positiven Befund. In einigen Fällen lag das sicherlich daran, dass bei den Tupferausstrichen die relativ kleinen Listerienkolonien von anderen rasch wachsenden Keimen, z. B. *E. coli* oder *Micrococcus luteus*, auf den Agarplatten „überwuchert“ oder verdrängt wurden. In 27 Fällen wurden jedoch mittels Anreicherungsverfahren Listerien nachgewiesen, während auf den Agarplatten der entsprechenden Tupferproben überhaupt kein Keimwachstum zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer Selektivanreicherung, wenn ein Verdacht auf Listeriose besteht.

War die Anzucht der Keime aus dem Probenmaterial noch relativ unproblematisch, so muss die Identifizierung mittels BBL-Crystal-System zumindest in Einzelfällen hinterfragt werden. Zwar liefert dieses System, neben der Speziesbestimmung, auch noch einen „Konfidenz-Wert“, der ein Maß für die „Richtigkeit“ darstellt (s. Anhang, Nr. 10.4), aber dennoch sind selbst bei hohen Konfidenzwerten in dem einen oder anderen Fall gewisse Zweifel angebracht. Anhand von 3 BBL-Resultaten soll dies näher erläutert werden:

Bei dem Keim *Enterococcus faecalis* wurde die relativ niedrige Wahrscheinlichkeit von 58,30 % angegeben (s. Anhang: Nr. 10.4) In so einem Fall muss man auch die Eigenschaften der Kolonien (Morphologie, Farbe, Größe, Hämolyse) bewerten und beurteilen, ob das Ergebnis plausibel ist. Teilweise werden deshalb noch weitergehende Untersuchungen notwendig.

Zur Überprüfung der Richtigkeit der BBL-Ergebnisse wurden 2 Isolate an die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) gesandt.

Es handelte sich zum einen um den im BBL mit einem Konfidenz-Wert von 98,57 % als „*Chryseobacterium meningosepticum*“ definierten Erreger. Die Identifizierung in der DSMZ ergab jedoch, anhand einer partiellen Sequenzierung der 16S rDNA, eine Ähnlichkeit von 99,4 % zu Vertretern von *Stenotrophomonas maltophilia*; auch die biochemischen Eigenschaften, Zellform, Gram-Reaktion, Beweglichkeit, Begeißelung, Pigmente, das Profil der zellulären Fettsäuren und die physiologischen Tests wiesen auf *Stenotrophomonas maltophilia* hin.

Zum anderen wurde der im BBL mit einer Konfidenz von 97,63 % als „*Chromobacterium violaceum*“ erkannte Keim eingeschickt. Wieder ergab eine partielle Sequenzierung der 16S rDNA ein abweichendes Ergebnis, nämlich eine Ähnlichkeit von 99,3 % zum Typstamm von *Arsenophonus nasoniae*. Da die physiologischen Tests fast ausnahmslos negativ ausfielen und der Stamm auf Standardmedien relativ schwach wächst, so dass keine Analyse der zellulären

Fettsäuren erfolgen konnte, merkte die DSMZ an, dass dieser Stamm evtl. nicht unter optimalen Bedingungen getestet werden konnte. Zudem gibt es in der Literatur keine Hinweise auf eine Pigmentierung von *Arsenophonus nasoniae*, während die Kolonie nach der ersten Bebrütung eine violette Färbung aufwies. Dieses Pigment wurde allerdings nach Subkultivierung nicht mehr gebildet. Da es typisch für diesen Organismus ist, bei der Subkultivierung auf künstliche Nährmedien unpigmentierte Varianten auszubilden (Sivendra und Lo, 1975), dürfte die Einordnung dieses Stammes als „*Chromobacterium violaceum*“ angebracht sein.

Auch die Resultate der Differenzierung der *Listeria*-Arten mit dem BBL-System weisen zu denen der PCR-Untersuchungen gewisse Differenzen auf. Die Stämme *W 169*, *W 425* und *W 589* wurden im BBL-System, mit einem Konfidenz-Wert von 96,81 %, als *Listeria grayi ssp. murrayi* identifiziert. *W 169* und *W 425* reagierten im CAMP-Test negativ, während *W 589* zu einem „positiven“ Befund führte. Alle drei Isolate zeigten auf Blutagar vergrünende Hämolyse. Diese Resultate sind nicht eindeutig zuzuordnen: *Listeria grayi ssp. murrayi* wird als anhämolysierend beschrieben und reagiert im CAMP-Test negativ (Sneath, 1986). In der PCR konnte allerdings ein Abschnitt des *iap*-Gens bei allen drei Stämmen amplifiziert werden, und auch die Schmelzkurven wiesen den für *L. monocytogenes* typischen Verlauf auf. Demgegenüber führte die PCR-Untersuchung des Referenzstammes *L. grayi ssp. murrayi*, der uns vom Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU Weihenstephan zur Verfügung gestellt wurde, zu keiner Bildung eines Amplifikationsproduktes (vgl. Abbildung 12).

Literaturangaben zufolge ist das *iap*-Gen zwar sowohl in allen virulenten Stämmen von *L. monocytogenes* als auch in allen anderen *Listeria*-Arten vorhanden (Köhler et al., 1990; Bubert et al., 1992; Wesley et al., 2002); allerdings konnte keine Literaturstelle gefunden werden, die explizit über den Nachweis von *L. grayi ssp. murrayi* mit *iap*-Gen-spezifischen Primern berichtet. Bei der Entwicklung von verschiedenen PCR-Verfahren, die das *iap*-Gen als Zielsequenz verwenden, konnten Wesley et al. (2002) *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* und *L. welshimeri* nachweisen. Dagegen konnte *L. grayi ssp. murrayi* nicht amplifiziert werden. Wang und Hong (1999) benutzten ebenfalls spezifische Primer, die ein 131 Basenpaare langes DNA-Fragment des *iap*-Gens amplifizieren. Mit dieser Methode konnten sie Amplifikationsprodukte von *L. welshimeri* und verschiedenen Serotypen von *L. monocytogenes* nachweisen, nicht jedoch von *L. grayi ssp. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und *L. murrayi*. Diese Erkenntnisse legen den Schluss nahe, dass sich eine PCR mit

iap-Gen-spezifischen Primern, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet werden, dazu eignet, *L. monocytogenes* von *L. grayi ssp. murrayi* zu differenzieren.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse und unter Berücksichtigung der einschlägigen Literatur kann deshalb angenommen werden, dass es sich bei den 3 im BBL als *L. grayi ssp. murrayi* diagnostizierten Bakterienstämmen um *Listeria monocytogenes*-Stämme handelt, die biochemisch ungewöhnlich reagieren (α -D-Glucosid negativ, Lactose positiv und Mannitol negativ). 15 weitere Listerienstämme waren ebenfalls α -D-Glucosid negativ, 27 Lactose positiv und 18 Mannitol negativ, jedoch wiesen sie nicht gleichzeitig diese 3 ungewöhnlichen Reaktionen auf. Eine Sequenzierung der 16S rDNA könnte hier eine genauere Aufklärung liefern.

5.1.3 Nachweis von PrPres mittels ELISA

Der zum Nachweis von PrP^{res} bei Wildwiederkäuern eingesetzte ELISA war weder für die zu untersuchenden Tierarten validiert, noch waren anderweitig irgendwelche Informationen zur Tauglichkeit dieses Testsystems erhältlich. Aus diesem Grunde wurden zunächst Hirnproben vom Rehwild ohne Anwendung von Proteinase K untersucht, um zu testen, inwieweit PrP^{sen} mit dem Testsystem nachweisbar ist. Die durchschnittliche Extinktion war mit 0,228 zwar höher als die nach Proteinase K-Verdau (0,018), aber die Werte waren deutlich niedriger als die entsprechenden Werte von Rinderproben (1,507 bzw. 0,069). Eine Ursache für diese Diskrepanz kann zum einen darin liegen, dass PrP^{sen} im Gehirn nicht homogen verteilt ist (Moya et al., 2000) und möglicherweise noch zusätzliche speziesabhängige Unterschiede bestehen. Zum anderen ist zu berücksichtigen, dass die Aminosäuresequenz und -anzahl von PrP^{sen} tierartsspezifische Variationen aufweist (Wopfner et al., 1999; Schätzl, 2001), so dass die Affinität der verwendeten Antikörper gegenüber PrP von Reh- bzw. Rotwild nicht als optimal bezeichnet werden kann. Dennoch wurde dieses Verfahren für ein Screening des Probenmaterials verwendet, da mit diesem Testsystem CWD-positives Hirngewebe eindeutig identifiziert werden konnte. Die OD-Werte der 1:3 verdünnten Proben lagen mit 1,320 und 1,344 eindeutig im „positiven Bereich“. Zwar sind auch diese Werte etwas niedriger als die vom Hirnmaterial BSE-positiver Rinder (Deslys et al., 2001), aber dies ist letztendlich auch vom Infektionsgrad des Gewebes abhängig. Da die Menge des CWD-positiven Materials sehr begrenzt war, konnten keine weiteren Versuche zur Testvalidierung durchgeführt werden. Um eine gewisse, nicht weg zu diskutierende, Unsicherheit bezüglich der Sensitivität des Tests auszuräumen, wurden 10 % des gesamten Probenmaterials stichprobenartig einer immunhistologischen Untersuchung unterzogen.

5.1.4 Histologische Untersuchungen

Zur histologischen Untersuchung wurden die HE-Färbung und der immunhistochemische Nachweis von PrP^{res} herangezogen. Während die erste Methode problemlos umgesetzt werden konnte, traten bei dem zweitgenannten Verfahren, obwohl der Antikörper mAb L42 bei Wildwiederkäuern sehr gut anwendbar sein soll (Groschup, persönl. Mitteilung), zunächst gewisse Schwierigkeiten auf; eine einfache Probenvorbehandlung ausschließlich mit Proteinase K führte zu falsch positiven Resultaten. Erst eine Kombination von 4 µl/ml Proteinase K für 10 min bei 37 °C mit Autoklavieren bei 121 °C für 20 min konnte eine Anfärbung von negativem Material verhindern. Erstaunlicherweise wird in der Literatur fast ausschließlich das gegensätzliche Problem beschrieben, nämlich der Fall der falsch negativen Ergebnisse, da zu lange Fixation des Probengewebes in Formalin die Antigenität von PrP^{res} erheblich reduziert (McBride et al., 1988).

Hardt et al. (2000) beschäftigten sich intensiv mit der Thematik, in welcher Weise unterschiedliche Vorbehandlungen die Nachweisbarkeit von PrP^{res} beeinflussen. Hierfür verwendeten sie unter anderem den in der vorliegenden Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper L42 an formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Scrapie-infizierten Hirngewebe von Schafen. Dabei geben sie an, dass die Proteinase K (empfohlen wird speziell für den mAb L42 eine Konzentration von 1 µg/ml; 15 min; 37 °C) für eine enzymatische Demaskierung der Epitope hilfreich ist, wobei der Antikörper L42 angeblich auch ohne enzymatische Hydrolisierung PrP^{res} erkennen kann; eine Konzentration von > 8 µg/ml soll Gewebszerstörung und Verlust des Antigens bewirken. Diese Angaben decken sich nicht mit den Erfahrungen dieser Arbeit, denn hier führt ein Weglassen der Proteinase K zu (falsch-)negativen Ergebnissen, während steigende Konzentrationen die Anfärbung (bis zu 20 mg/ml) bedeutend verstärken.

Eine gewisse Diskrepanz besteht auch bezüglich der Wirkung des Autoklavierens zwischen den in der Literatur dargestellten Erfahrungen und den eigenen: Häufig wird beschrieben, dass bei verschiedenen, ohne entsprechende Vorbehandlung als negativ zu beurteilende Proben, durch das Autoklavieren die Gewebeoberfläche aufgeschlossen wurde und so die entsprechenden Epitope präsentiert werden konnten (Bier et al., 1995; Ominato und Nozaki, 2002; Haritani et al., 1994; Piffko et al., 1995). Ein Probenaufschluss durch Autoklavieren soll also die Anfärbbarkeit von positivem Material begünstigen und den Effekt proteolytischer Enzyme (Proteinase K) verstärken (Namba et al., 1992; Brorson und Nguyen, 2001; Hardt et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wird zwar auch eine Vorbehandlung der Schnitte mit Proteinase K und Autoklavieren als optimierte Methode angewendet, jedoch aus dem gegenteiligen Grund, nämlich der Unterdrückung unerwünschter Färbungen. Wie diese scheinbar gegensätzlichen Reaktionen zu erklären sind, ist noch unklar; evtl. werden dadurch unspezifische Epitope zerstört, an denen sich das Chromogen anlagert. Möglicherweise sind diese Diskrepanzen auch mit speziesspezifischen Unterschieden, z. B. in der Aminosäuresequenz des Prionproteins, zu begründen, da der mAb L42 nur an Scrapie-infizierten Schafen und BSE-infizierten Rindern getestet wurde. Dies erklärt jedoch nicht, warum die negativen Rinderproben anfangs ebenfalls positiv reagierten.

5.2 Feldproben

5.2.1 Bakteriologische und histologische Untersuchungsergebnisse

Bei der bakteriologischen Untersuchung wurden Vertreter von 34 Gattungen isoliert. Am häufigsten kamen dabei die Gattungen *Micrococcus* (11,7 %), *Bacillus* (9,5 %), *Escherichia* (8,4 %), *Listeria* (6,5 %), *Staphylococcus* (3,8 %), *Streptococcus* (3,8 %), *Acinetobacter* (2,9 %) und *Pseudomonas* (1,9 %) vor. Die Inzidenz aller anderen Gattungen lag unter 1 %.

Aufgrund der bereits angesprochenen Probleme bei der Probennahme bedarf es einer differenzierten Betrachtung, inwieweit diese Keime als Erreger von Enzephalopathien in Betracht kommen, bzw. inwieweit es sich dabei überwiegend um Kontaminanten „post mortem“ handelt.

Micrococcus-Arten sind ubiquitär verbreitet. Sie kommen in Erdboden und Wasser, in der Haut und auf den Schleimhäuten von Mensch und Tier vor (Bisping und Amtsberg, 1988). Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass das häufige Vorkommen in erster Linie auf eine Kontamination nach dem Tod der Tiere zurückzuführen sein dürfte.

In gleicher Weise ist das Vorkommen von *Bacillus spp.* im Probenmaterial zu beurteilen. Die meisten *Bacillus spp.* haben ihren primären Standort in Boden, Luft und Staub und treten oft als Kontaminanten bei bakteriologischen Untersuchungen auf. Nur wenige Arten sind pathogen (Bisping und Amtsberg, 1988).

E. coli ist einerseits ein wichtiger Kommensale der Dickdarmflora der meisten Säugetiere und des Menschen, andererseits sind pathogene Serovare bedeutende Diarrhö- und

Intoxikationserreger (Burkhardt, 1992). *E. coli* wird vergleichsweise selten als Erreger von Enzephalitiden und Meningitiden beschrieben (Edberg und Kontnick, 1986; Sandersleben, 1989), so dass diese Befunde weitestgehend als postmortale Kontamination zu werten sind.

Einer anderen Interpretation bedarf der Befund *Listeria*, insbesondere *Listeria monocytogenes*. Immerhin waren 6,5 % der untersuchten Proben *Listeria* positiv. Die Untersuchung dieser Isolate mittels Real-time-PCR führte in allen Fällen zu einem Amplifikationsprodukt, allerdings konnten zwei unterschiedliche Typen von Schmelzkurven beobachtet werden (s. Abbildung 11). Die unterschiedlichen Schmelzkurvenverläufe lassen sich evtl. mit Mutationen in der Nucleotidsequenz begründen. 2001 untersuchte Grünefeld 36 verschiedene *Listeria monocytogenes* Stämme. Dabei bemerkte sie, dass einige Amplifikationskurven verringerte Schmelztemperaturen aufwiesen, und zwar nur solche der Stämme 1/2a. Diese Kurvenverläufe ähnelten denen der Abbildung 11 B. Eine Sequenzierung dieser Stämme ergab diverse Mutationen im Amplifikat, wobei sich zwei dieser Mutationen im Hybridisierungsbereich der Hybridization-Probes befanden.

Nicht uninteressant ist auch die zeitliche und räumliche Verteilung der *Listeria* positiven Fälle: Listerien konnten erst ab der Tagebuchnummer *W 159*, dann aber in regelmäßigen Abständen, nachgewiesen werden. Die Nummern *W 1* bis *W 68* wurden im Mai in Nördlingen geschossen (Rehböcke und Schmaltiere). *W 69* bis *W 158* wurden dann ab Anfang September bis zum 03. November erlegt, alle weiteren Tiere nach dem 05. November. Da alle in dieser Arbeit nachgewiesenen Listeriosefälle nach dem 05. November auftraten, ist davon auszugehen, dass Stressoren (winterliche Kälte, Trächtigkeit, Jungtieraufzucht, Futtermangel) eine Listerieninfektion begünstigen. Betrachtet man die regionale Verteilung, so fällt eine Verdichtung der Listeriosefälle in Unterfranken auf. Hier beträgt die Prävalenzrate beim Rehwild 17,78 %, während sie in Niederbayern-Oberpfalz nur 6,15 %, in Oberbayern-Schwaben 6,61 % und in Oberfranken-Mittelfranken 0 % beträgt. Über regionale Unterschiede wird auch aus dem humanmedizinischen Bereich berichtet: Die Inzidenz für Listeriose-Erkrankungen in Deutschland betrug im Jahr 2001 0,3 Fälle/100.000 Einwohner. In den Bundesländern Thüringen (0,38/100.000 E.), Sachsen-Anhalt (0,76/100.000 E.) und Sachsen (0,45/100.000 E.) lagen die gemessenen Werte deutlich oberhalb dieses Durchschnittswertes (Hartung, 2002).

Wie bereits im Literaturteil ausführlich dargestellt, handelt es sich bei *L. monocytogenes* um einen klassischen Erreger von Meningoenzephalitiden (Hirsch und Zee, 1999; Bago et al., 2001). Immerhin konnten bei 22 von 42 untersuchten *Listeria*-positiven Proben im

histologischen Schnitt Zeichen von Entzündungserscheinungen festgestellt werden. Bei 20 histologischen Präparaten konnten keine perivaskulären Infiltrate nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass zwar eine Listerieninfektion stattfand, diese aber (noch) nicht zu einer entzündlichen Reaktion führte, bzw. sich auf einen sehr kleinen abgegrenzten Bereich beschränkte, z. B. in der frühen Infektionsphase. Andererseits könnte aber auch die Entzündung in einem anderen Hirnareal lokalisiert sein, wo sie mit dem relativ kleinen Objektträgerausschnitt nicht erfasst wurde.

Die Gattung *Staphylococcus* umfasst 27 verschiedene Arten, von denen vor allem die koagulasepositiven auf der Haut und den Schleimhäuten von Mensch und Tier anzutreffen sind (Holt et al., 1994). Die koagulasenegative Staphylokokken sind ubiquitär verbreitet. Vor allem *Staph. aureus* ist medizinisch relevant. Dieser kann u. a. eine hochletale Meningitis verursachen (Seeliger und Schröter, 1990; Francke, 1987). Dies bedeutet, dass Staphylokokken sowohl als Infektionserreger als auch als Probenkontaminanten in Frage kommen. Inwieweit die bei der Probe *W 236* festgestellten perivaskulären Infiltrate Folge eines Staphylokokkenbefalls sind, ist nicht zu bewerten, da gleichzeitig auch noch *Streptococcus*-Arten vorhanden waren.

Die Gattung *Streptococcus* umfasst apathogene und pathogene Arten (Sneath, 1986). *Streptococcus bovis* kommt zwar natürlicherweise im Wiederkäuermagen vor, soll aber auch Endokarditis und Meningitis (*W 696*) verursachen (Grant et al., 1999). Bei 9 Proben wurden in der bakteriologischen Untersuchung *Streptococcus spp.* isoliert, während die entsprechende Histologie keine Hinweise auf bakteriell bedingte Entzündungen ergab. In diesen Fällen ist von einer Kontamination des Probenmaterials auszugehen.

Acinetobacter spp., z. B. *A. iwoffii* oder *A. baumannii*, sind in der Umwelt weitverbreitet und werden normalerweise als apathogen betrachtet; allerdings wurden derartige Spezies bei Fällen von Septikämie, Meningitis, Endokarditis, Hirnabszessen usw. nachgewiesen (Levin et al., 2003; Krieg und Holt, 1984). Da jedoch bei dieser Untersuchung in den entsprechenden histologischen Schnitten (*W 667* und *W 782*) keine Entzündungen nachweisbar waren, handelt es sich vermutlich um Probenkontaminationen.

Saprophytische Arten von *Pseudomonas spp.*, z. B. *P. fluorescens*, *chlororaphis* etc. bewirken das Verderben von Lebensmitteln; *P. aeruginosa* kann als Komplikation von Wundmischinfektionen an Pneumonien, Peritonitiden, Meningitiden und Sepsis beteiligt sein (Arnold und Weaver, 1948; Murray, 1995). So können diese Keime im einen Fall eine

Enzephalitis verursacht haben (*W 250*), während es sich in anderen Fällen (s. *W 200*; *W 261* und *W 654*) um Kontaminationen handelt.

Chromobacterium violaceum wird mit Meningitiden in Verbindung gebracht (Shetty et al., 1987). Eine partielle Sequenzierung der 16S rDNA dieses Keimes in der DSMZ ergab jedoch eine Ähnlichkeit von 99,3 % zum Typstamm von *Arsenophonus nasoniae*, einem Bakterium, das die Abtötung von männlichen Embryonen in der parasitischen Wespe *Vitripennis Nasonia* bewirkt (Balas et al., 1996). In der Literatur konnte kein Hinweis gefunden werden, dass diese Spezies mit ZNS-Infektionen im Zusammenhang steht. An einem histologischen Präparat, bei dem dieser Keim nachgewiesen wurde (*W 493*) konnten keine pathologischen Veränderungen festgestellt werden, wohl aber bei einer anderen Probe (*W 720*), in der ebenfalls mittels BBL-System *Chromobacterium violaceum* identifiziert wurde. Da eine endgültige Klassifizierung dieses Keimes noch aussteht, ist eine Beurteilung der Befunde nicht möglich.

Actinobacillus spp. gelten als Kommensalen im Verdauungs-, Respirations- und Genitaltrakt (Crane et al., 1989).

Aeromonas hydrophila kommt im frischen Wasser und im Erdboden vor und kann für Frösche, Fische und Säugetiere pathogen sein; in einigen Fällen wurde z. B. Bakteriämie bei ausgedehnten Verbrennungen beobachtet (Barillo et al, 1996).

Burkholderia cepacia kommt im Erdreich vor und ist als Opportunist teilweise assoziiert mit verschiedenen Gruppen- und Nosokomialinfektionen, z. B. Septikämie, Meningitis, Endokarditis, Pneumonie, Harnwegsinfektionen usw. (Arnold und Weaver, 1948; Murray, 1995).

Flavimonas oryzihabitans ist in der Außenwelt zu finden, gilt als Saprophyt bei Warmblütern, wurde aber auch bei von schwerer Magendarmblutung begleiteter Septikämie isoliert (Arnold und Weaver, 1948; Murray, 1995).

In keinem der entsprechenden histologischen Präparate der 4 oben beschriebenen Keime konnten entzündliche Infiltrationen nachgewiesen werden, so dass es sich bei der allgemeinen bakteriologischen Untersuchung vermutlich um Kontaminationen handelte.

Bei *Sphingomonas paucimobilis* handelt es sich um einen Opportunisten mit Beteiligung an Meningitis, Harnwegsinfektionen, Peritonitis, Hautgranulomen, Mikroabszessen etc. (Arnold und Weaver, 1948; Murray, 1995). Bei 4 Proben wurde *Sphingomonas paucimobilis* isoliert. Eine histologische Überprüfung dieser Befunde bei 2 Proben ergab in einem Fall (*W 239*) eine

Meningitis, der zweite Schnitt (*W 267*) war ohne besonderen Befund, was die unterschiedliche Virulenz dieses Erregers belegt.

Einige Neisserien gelten als Saprophyten. Manche werden aber auch als Erreger von Meningitiden beschrieben, z. B. *N. flavescens* oder *N. meningitidis* (Mastrantonio et al., 2003; Coovadia, 1984). Ebenso konnten bei dem bakteriologischen Befund *Neisseria spp.* in der Histologie unterschiedliche Ergebnisse beobachtet werden: 3 Schnittpräparate wiesen keine Entzündungsmerkmale auf (*W 271*, *W 325* und *W 468*), während bei zweien (*W 409* und *W 456*) jeweils Chorioiditis und Meningitis vorlagen.

Alle nachstehend erläuterten Keime können im Probenkontingent der vorliegenden Untersuchung mit ZNS-Erkrankungen in Verbindung stehen, da in den jeweiligen histologischen Präparaten bakteriell bedingte Enzephalopathien, z. B. in Form perivaskulärer Infiltrate oder Nervenzellnekrosen, festzustellen waren.

Bestimmte Moraxella spp. (z. B. *M. liquefaciens*) können, neben Konjunktivitis, Otitis, Sinusitis, Bakteriämie und Krankheiten des Respirationstrakts, auch Meningitis verursachen (Krieg und Holt, 1984; Matee und Matre, 2001; Enright und Mc Kenzie, 1997).

Bordetella spp. spielen als Sekundärerreger bei Staupe und keuchhustenähnlichen Erkrankungen bzw. beim Keuchhusten des Menschen eine Rolle. Sie können als Komplikation auch u. a. Enzephalopathien mit Krampfanfällen und spastischen Lähmungen bei Krankheitsherden in Ammonshorn, Stirnhirn und Insel hervorrufen (Krieg und Holt, 1984; Mertsola, 1985; Chouakri et al., 2001).

Chryseobacterium meningosepticum (früher *Flavobacterium meningosepticum*) kann Meningitis, Pneumonie, Endokarditis, Cellulitis, Abdominalinfektionen, Infektionen des Auges und Septikämie auslösen (Bloch et al., 1997).

Corynebacterium aquaticum wird in der Umwelt gefunden, die natürliche und pathogene Bedeutung muss jedoch erst noch bestimmt werden. Der Keim wird mit Endophthalmitis, Meningitis und Sepsis in Verbindung gebracht (Baron et al., 1994, Ferguson und Hook, 1943).

Klebsiella spp. gehören zur Familie Enterobacteriaceae. Diese Opportunisten können, neben Nosokomialinfektionen und Pneumonien, auch Meningitiden verursachen (Matee und Matre, 2001).

Enterococcus raffinosus kann ebenfalls als Opportunist an Meningitiden beteiligt sein (Ferguson und Hook, 1943).

Aerococcus viridans kommt natürlicherweise in der Umwelt vor. Dieser Keim wurde aber auch in Fällen von Bakteriämie, Endokarditis, Meningitis und Osteomyelitis isoliert (Baron et al., 1994; Edberg und Kontnick, 1986; Ferguson und Hook, 1943).

Enterobacter cloacae kommt in Wasser und Erdreich, Fleisch, Abwasser, tierischer und menschlicher Haut und im Intestinaltrakt vor. Er kann an Meningitiden beteiligt sein (Bachmann und Weaver, 1951; Bronfenbrenner und Schlesinger, 1918; Lambert-Zechovsky et al., 1992).

5.2.2 TSE bei Wildwiederkäuern in Bayern

Die Untersuchung der 849 Hirnproben von Wildwiederkäuern mittels ELISA ergab keine Anhaltspunkte für ein Vorhandensein von PrP^{res} in diesem Material. Die höchsten gemessenen Extinktionswerte lagen bei 0,044. Wenn man die Berechnung des Cutoff-Wertes der Testanweisung entsprechend durchführt und dabei den „Korrekturwert“ von 0,210 entsprechend der Extinktionen unverdauter Proben von Rind (1,507) und Reh (0,228) linear abgleicht, dann ergibt sich ein Wert von 0,052. Dieser Wert liegt deutlich über dem Höchstwert, der bei den Feldproben gemessen wurde. Auch bei den HE-Präparaten und bei den immunhistochemischen Untersuchungen konnten keine Hinweise für das Vorliegen PrP^{res}-induzierter Veränderungen nachgewiesen werden. Man kann deshalb davon ausgehen, dass in dem Probenkontingent kein PrP^{res} vorhanden war.

Aufgrund der Probenanzahl kann deshalb mit 95 %iger Sicherheit die Aussage getroffen werden, dass die wahren mittleren Prävalenzen von TSE-Erkrankungen in Bayern beim Rehwild unter 0,5 % und beim Rotwild unter 1,5 % liegen (vgl. Tabelle 18). Beim Gamswild ist aufgrund der niedrigen Probenanzahl (n = 6) keine entsprechende Aussage möglich.

Tabelle 18: Prävalenzen von TSE-Erkrankungen bei Wildwiederkäuern in Bayern

Tierart	Jahresstrecke 2001/2002 ¹⁾ in Bayern	Geschätzte Anzahl (15 %) weibliche Tiere > als 2 Jahre	Probenanzahl (TSE-Untersuchung)	Prävalenz (95 % Sicherheit)
Rehwild	275.279	41.292	654	< 0,5 %
Rotwild	8.642	1.296	189	< 1,5 %

¹⁾ Information: Deutscher Jagdschutz-Verband

Vergleicht man diese Prävalenzwerte mit den Ergebnissen epidemiologischer Untersuchungen in den USA, so wird deutlich, dass in den endemischen Gebieten die Prävalenzen immer relativ hoch sind: Miller et al. (2000) führten epidemiologische Untersuchungen in einem 38.137 km² großen endemischen Gebiet in Colorado und Wyoming (USA) durch. Hierfür wurden 5513 Cerviden immunhistochemisch untersucht. Dabei ergaben sich mittlere Prävalenzraten zwischen 0,5 % bei Rocky-Mountain-Rotirschen und 4,9 % bei Großohrhirschen. Dagegen ergaben 5700 Proben, die außerhalb der endemischen Gebiete untersucht wurden, keinen einzigen positiven Fall (Miller und Fischer, 2000).

Wenn man diese Erkenntnisse der Epizootiologie in den USA auf Bayern überträgt, können die Prävalenzen von < 0,5 % beim Rehwild und < 1,5 % beim Rotwild dahingehend gewertet werden, dass in Bayern eine endemische Situation bezüglich CWD kaum vorliegen dürfte.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Hirnproben von 849 Wildwiederkäuern (654 vom Reh-, 189 vom Rot- und 6 vom Gamswild) aus ganz Bayern auf TSE bzw. bakterielle Enzephalopathie-Erreger untersucht. Hierzu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Allgemeine bakteriologische Untersuchung (aerobe Anzucht auf Blut-, Nähr- und Gassner-Agar)
- Selektiver Listeriennachweis
 - Kultureller Nachweis; Identifizierung der Isolate mittels BBL-Crystal-System
 - Nachweis des iap-Gens mittels Real-Time PCR (Lightcycler)
- Nachweis von PrP^{res} mittels ELISA (Fa. BioRad)
- Histologische Untersuchung
 - HE-Färbung
 - Immunhistochemie (mAb L42)

Bei der bakteriologischen Untersuchung wurden 464 Bakterienisolate angezchtet, von denen 229 bis zur Gattungsebene und 235 bis auf die Speziesebene differenziert werden konnten. Insgesamt wurden 35 verschiedene Bakterienisolate isoliert, am häufigsten *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.* und *E. coli*. Listerien waren in 55 Hirnproben (49 vom Reh-, 5 vom Rot- und 1 vom Gamswild) nachzuweisen. 52 Isolate wurden mittels BBL-Crystal-System als *L. monocytogenes* identifiziert, 3 als *L. grayi ssp. murrayi*. Der Nachweis des iap-Gens gelang in allen Fällen, so dass die Richtigkeit des BBL-Resultates bezüglich *L. grayi ssp. murrayi* hinterfragt werden muss. Die Auswertung der räumlichen Verteilung der Listeria-Befunde weist auf eine regionale Verdichtung in Unterfranken hin (Prävalenzrate Rehwild: 17,8 % versus 6,6 % in Oberbayern-Schwaben, 6,1 % in Niederbayern-Oberpfalz und 0 % in Oberfranken-Mittelfranken).

Die histologische Untersuchung (HE-Färbung) von 87 Proben, bei denen in der bakteriologischen Untersuchung enzephalitisrelevante Keime nachgewiesen wurden, ließ in 41 Fällen Entzündungsgeschehen unterschiedlichen Schweregrades (z. B. perivaskuläre Infiltrationen (n = 26) oder (Meningo-)enzephalitiden (n = 13)) erkennen.

Die Validierungsuntersuchungen zur Überprüfung der Tauglichkeit des ELISA-Testes ergaben, dass bei der Prüfung von Hirngewebe von Wildwiederkäuern grundsätzlich niedrigere Extinktionen zu erwarten sind als bei Rinderhirnproben. Da Hirnhomogenat von 2 bekannt CWD-positiven Wapiti-Hirschen zu eindeutig positiven Resultaten führte, wurde das Probenmaterial mit diesem Test untersucht: Es wurden keine Hinweise gefunden, die für ein Vorliegen von TSE sprechen. Auch die immunhistochemische Untersuchung von 10 % des Gesamtprobenumfangs ergab keine Anzeichen, die auf das Vorhandensein von PrP^{res} schließen lassen.

Anhand der großen Probenanzahl kann deshalb für Bayern die Aussage getroffen werden, dass mit 95 %iger Sicherheit die Prävalenzraten beim Rehwild unter 0,5 % und beim Rotwild unter 1,5 % liegen.

7 SUMMARY

About the occurrence of Transmissible Spongiform Encephalopathies and bacterial CNS infections in roe deer, red deer and chamois in Bavaria

Brain samples of 849 wild ruminants (654 roe deer, 189 red deer and 6 chamois) from Bavaria were examined for the occurrence of TSE and encephalopathies caused by bacteria, respectively. For this, the following investigations were carried out:

- General bacteriological investigation (aerobic incubation on blood, standard I nutrient and Gassner Agar)
- Detection of *Listeria spp.* by selective procedures
 - Cultural isolation and biochemical identification with the BBL crystal ID system
 - Detection of the *iap* gene using real time PCR (Lightcycler)
- Detection of PrP^{res} by ELISA technique (BioRad)
- Histological investigation
 - HE staining
 - Immunohistochemistry (mAb L42)

Using conventional bacteriological methods, 464 different bacteria were isolated. 229 of them could be differentiated at the genus level and 235 at the species level. Totally, 35 different bacteria species were isolated, most frequently *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.* and *E. coli*. *Listeria spp.* were detected in 55 brain samples (49 from roe deer, 5 from red deer and 1 from chamois). 52 isolates were identified with the BBL crystal ID system as *Listeria monocytogenes* and 3 as *Listeria grayi ssp. murrayi*. As the *iap* gene was detected in all strains, the correctness of the BBL result concerning *L. grayi ssp. murrayi* must be scrutinised. Analysis of the geographical distribution of the *Listeria* findings indicate a regional aggregation in Unterfranken (prevalence for roe deer: 17,8 %, versus 6,6 % in Oberbayern-Schwaben, 6,1 in Niederbayern-Oberpfalz and 0 % in Oberfranken-Mittelfranken).

The histological investigation (HE staining) of 87 tissue samples contaminated with encephalitis relevant bacteria showed inflammation of different severity (e. g. perivascular infiltration (n = 26) or (meningo)encephalitis (n = 13)) in 41 cases.

The validation of the ELISA technique for detecting prionprotein from wild ruminants pointed out that the examination of brain of wild ruminants lead to lower extinctions than that of bovine brain samples. Due to the fact that brain homogenate of 2 known CWD positive wapitis showed definite positive results, all samples were analysed with this test: There were no indications for the occurrence of TSE in any sample. In addition, immunohistochemical investigations of 10 % of all samples did not show PrP^{res}.

Due to the large number of samples, the prevalence of TSE can be quoted under 0,5 % for roe deer and under 1,5 % for red deer with a certainty of 95 %.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Alper, T.; Haig, D. A.; Clarke, M. C. (1966):

The exceptionally small size of the scrapie agent
Biochem. Biophys. Res. Commun. **22**, 278 – 284

Alper, T.; Cramp, W. A.; Haig, D. A.; Clarke, M. C. (1967):

Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?
Nature **214**, 764 – 766

Arnold, W. M. Jr.; Weaver, R. H. (1948):

Quick microtechniques for the identification of cultures. I. Indole production
J. Lab. Clin. Med. **33**, 195 – 196

Bachmann, B.; Weaver, R. H. (1951):

Rapid microtechniques for identification of cultures. V. Reduction of nitrates
Am. J. Clin. Pathol. **21**, 195 - 196

Bago, Z.; Bauder, B.; Baumgartner, W.; Weissenböck, H. (2001):

Zur Ätiologie von Enzephalitiden bei Wiederkäuern: eine retrospektive Analyse
Wien. Tierärztl. Mschr. **88**, 289 – 303

Bahmanyar, S.; Willams, E. S.; Johnson, F. B.; Young, S.; Gajdusek, D. C. (1985):

Amyloid plaques in spongiform encephalopathy of mule deer
J. Comp. Pathol. **95**, 1 – 5

Balas, M.T.; Lee, M. H.; Werren, J. H. (1996):

Distribution and fitness effects of the son-killer bacterium in *Nasonia*
Evolutionary ecology **10**, 593-607

Barillo, D. J.; McManus, A. T.; Cioffi, W. G.; McManus, W. F.; Kim, S. H.; Pruitt, B. A. (1996):

Aeromonas bacteraemia in burn patients

Burns **22**, 48 - 52

Baron, E. J.; Bailey, W. R.; Scott, E. G. (1994):

Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 9th ed.

Mosby Verlag., St. Louis

Barry, R. A.; Kent, S. B.; McKinley, M. P.; Meyer, R. K.; DeArmond, S. J.; Hood, L. E.; Prusiner, S. B. (1986):

Scrapie and cellular prion proteins share polypeptide epitopes

J. Infect. Dis. **153**, 848 - 854

Basler, K.; Oesch, B.; Scott, M.; Westaway, D.; Wälchli, M.; Groth, D. F.; Mc Kinley, M. P.; Prusiner, S. B.; Weissman, C. (1986):

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

Cell **46**, 417 - 428

Beiglböck, C. (2001):

Die Chronic Wasting Disease (CWD) der Cerviden in Nordamerika - eine Literaturübersicht

Wien. Tierärztl. Mschr. **88**, 147 – 152

Bier, B.; Bankfalvi, A.; Grote, L.; Blasius, S.; Ofner, D.; Böcker, W.; Jasani, B.; Schmid, K. W. (1995):

Wet autoclave pretreatment for immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routinely processed breast carcinoma tissue

Histochem. J. **27:2**, 148 - 154

Bisping, W.; Amtsberg, G. (1988):

Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere

Parey Verlag, Berlin, Hamburg

Bloch, K. C.; Nadarajah, R.; Jacobs, R. (1997):

Chryseobacterium meningosepticum: an emerging pathogen among immunocompromised adults. Report of 6 cases and literature review

Medicine (Baltimore) **76**, 30 - 41

Boch, J.; Schneidawind, H. (1988):

Krankheiten des jagbaren Wildes

Parey Verlag, Hamburg, Berlin

Bolton, D. C.; Mc Kinley, M. P.; Prusiner, S. B. (1982):

Identification of a protein that purifies with the scrapie prion

Science **218**, 1309 - 1311

Braun, U. (1998):

BSE und andere spongiforme Enzephalopathien

Blackwell Verlag, Berlin (Wien)

Bronfenbrenner, J.; Schlesinger, M. J. (1918):

A rapid method for the identification of bacteria fermenting carbohydrates

Am. J. Public Health **8**, 922 - 923

Brorson, S. H.; Nguyen, G. H. (2001) :

Increased level of immunogold labeling of epoxy sections by rising the temperature significantly beyond 100 °C in the antigen retrieval medium

Micron **32**, 591 - 597

Broussolle, E.; Setiey, A.; Moene, Y.; Trielett, M.; Chazot, G. (1989):

Reversible Creutzfeldt-Jakob like syndrome induced by lithium plus levodopa treatment

J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry **52**, 686 – 687

Brown, D. R.; Hafiz, F.; Glassmith, L. L.; Wong, B.; Jones, I. M.; Clive, C.; Haswell, S. (2000):

Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance

EMBO J. **19**, 1180 – 1186

Bubert, A.; Kuhn, M.; Goebel, W.; Kohler, S. (1992):

Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species

J. Bacteriol. **174**, 8166 - 8171

Bubert, A.; Hein, I.; Rauch, M.; Lehner, A.; Yoon, B.; Goebel, W.; Wagner, M. (1999):

Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR

Appl. Environ. Microbiol. **65**, 4688 - 4692

Büeler, H.; Fischer, M.; Lang, Y.; Bluethmann, H.; Lipp, H. P.; DeArmond, S. J.;

Prusiner, S. B.; Aguet, M.; Weissmann, C. (1992):

Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein

Nature **356**, :577 - 582

Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (2002):

Protokoll zur immunhistochemischen PrP-Färbung von Paraffinschnitten am NRZ für Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

BFAV Insel Riems

Burkhardt, F. (1992):

Mikrobiologische Diagnostik

Thieme Verlag, Stuttgart

Canadian Food Inspection Agency (CFIA) (2002):

Chronic Wasting Disease (CWD) of Deer and Elk

Canadian Food Inspection Agency fact sheet

(<http://inspection.gc.ca/english/anima/disemala/cwdmdce.shtml>)

Chouakri, O.; Ktari, F.; Lavaud, J.; Maury, I.; Lode, N. ; Durand, S. ; Chabernaud, J. L. ; Arbaoui, H. ; Lemouchi, A.; Barbier, M. L. (2001):

Severe bacterial infections in children. Survey by the pediatric mobile intensive care unit AP/HP in the Ile-de-France area

Arch. Pediatr. **8**, 712s - 720s

Collinge, J.; Whittington M. A.; Sidle, K. C.; Smith, C. J.; Palmer, M. S.; Clarke, A. R.; Jefferys, J. G. (1994):

Prion protein is necessary for normal synaptic function

Nature **370**, 295 - 297

Conner, M.M.; McCarty, C. W.; Miller, M. W. (2000):

Detection of bias in harvest-based estimates of chronic wasting disease prevalence in mule deer

J. Wildl. Dis. **36**, 691 – 699

Coovadia, Y. M. (1984):

Neisseria flavescens septicaemia with meningitis. A case report

S. Afr. Med. J. **66**, 308 - 309

Cossart, P.; Bierne, H. (2001):

The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*

Curr. Opin. Immunol. **13**, 96 - 103

Crane, S. A.; Ziermer, E. L.; Sweeney, C. R. (1989):

Cytologic and bacteriologic evaluation of tracheobronchial aspirates from clinically normal foals

Am. J. Vet. Res. **50**, 2042 - 2048

Curtis, G. D. W.; Mitchell, R. G.; King, A. F.; Emma, J. (1989):

A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*

Lett. in Appl. Microbiol. **8**, 95-98

Dahme, E.; Weiss, E. (Hrsg.) (1999):

Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 5. Auflage

Enke Verlag, Stuttgart

Deslys, J. P.; Comoy, E.; Hawkins, S.; Simon, S.; Schimmel, H.; Wells, G.; Grassi, J.; Moynagh, J. (2001):

Screening slaughtered cattle for BSE

Nature **409:6819**, 476 - 478

Edberg, S. C.; Kontnick, C. M. (1986):

Comparison of β -glucuronidase-based substrate systems for identification of *Escherichia coli*

J. Clin. Microbiol. **24**, 368 - 371

El Dirdiri, N. I.; Wasfi, I. A.; Adam, S. E.; Edds, G. T. (1981):

Toxicity of *Datura stramonium* to sheep and goats

Vet. Hum. Toxicol. **23**, 241-246

Enright, M. C.; Mc Kenzie, H. (1997):

Moraxella (*Branhamella*) *catarrhalis* - clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen

J. Med. Microbiol. **46**, 360 - 371

Ferguson, W. W.; Hook, A. E. (1943):

Urease activity of *Proteus* and *Salmonella* organisms

J. Lab. Clin. Med. **28**, 1715 - 1720

Francke, E. (1987):

The many causes of meningitis

Postgrad. Med. **82**, 175 – 178; 181 – 183; 187 – 188

Gedde, M. M.; Higgings, D. E.; Tilney, L. G.; Portnoy, D. A. (2000):

Role of Listeriolysin O in Cell-to-Cell Spread of *Listeria monocytogenes*

Infect. Immun. **68:2**, 999 - 1003

Grant, R. J.; Whitehead, T. R.; Orr, J. E. (1999):

Streptococcus Bovis Meningitis in an Infant

J. Clin. Microbiol. **38:1**, 462 - 463

Griffith, J. S. (1967):

Self-replication and scrapie

Nature **215**, 1043 - 1044

Grünefeld, A. (2001):

Nachweis von *Listeria monocytogenes* mittels Real-Time-PCR

TUM; Lehrstuhl für Tierhygiene; Dipl. **174**; Weihenstephan

Guiroy, D. C.; Williams, E. S.; Yanagihara, R.; Gajdusek, D. C. (1991):

Immunolocalization of scrapie amyloid (PrP²⁷⁻³⁰) in chronic wasting disease of Rocky Mountain elk and hybrids of captive mule deer and white-tailed deer.

Neurosci. Lett. **126**, 195 – 198

Guiroy, D. C.; Williams, E. S.; Song, K. J.; Yanagihara, R.; Gajdusek, D. C. (1993):

Fibrils in brains of Rocky Mountain elk with chronic wasting disease contain scrapie amyloid.

Acta Neuropathol. (Berl.) **86**, 77 – 80

Hamir, A. N.; Cutlip, R. C.; Miller, J. M.; Williams, E. S.; Stack, M. J.; Miller, M. W.; O'Rourke, K. I.; Chaplin, M. J. (2001):

Preliminary findings on the experimental transmission of chronic wasting disease agent of mule deer to cattle

J. Vet. Diagn. Invest. **13**, 91 – 96

Hardt, M.; Baron, T.; Groschup, M. H. (2000):

A Comparative Study of Immunohistochemical Methods for Detecting Abnormal Prion Protein with Monoclonal and Polyclonal Antibodies

J. Comp. Path. **122**, 43 - 53

Haritani, M.; Spencer, Y. I.; Wells, G. A. H. (1994):

Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain

Acta Neuropathol. (Berl.) **87**, 86 - 90

Hartung, M. (2002):

Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 2001

Übersicht über die Meldungen der Bundesländer, zusammengestellt vom Nationalen

Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen

BgVV-Heft **6** (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin)

Hein, I.; Klein, D.; Lehner, A.; Bubert, A.; Brandl, E.; Wagner, M. (2001):

Detection and quantification of the iap gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay

Res. Microbiol. **152**, 37 - 46

Henry, B. S. (1933):

Dissociation in the genus *Brucella*

J. Infect. Dis. **52**, 374 – 402

Hess, J.; Gentschev, I.; Szalay, G.; Ladel, C.; Bubert, A.; Goebel, W.;**Kaufmann, S. H. (1995):**

Listeria monocytogenes p60 supports host cell invasion by and in vivo survival of attenuated *Salmonella typhimurium*

Infect. Immun. **63**, 2047 - 2053

Hirsh, D. C.; Zee, Y. C. (Hrsg.) (1999):

Veterinary Microbiology

Blackwell Verlag, Berlin

Holt, J. G.; Krieg; Bergey, D. H. (1994):

Bergey's manual of determinative bacteriology

Williams & Wilkins Verlag, Baltimore

Huang, Z.; Prusiner, S. B.; Cohen, F. E. (1996):

Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment

Fold. Des. **1**, 13 - 19

Huber, G. (2001):

CWD - BSE bei Hirsch und Reh

LWF (Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft) **29**, 44 - 47

Johnson, G. C.; Fales, W. H.; Maddox, C. W.; Ramos-Vara, J. A. (1995):

Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants

J. Vet. Diagn. Invest. **7:2**, 223 - 228

Knight, J. (2002):

Ranches blamed over spread of mad deer

Nature **416:6881**, 569 – 570

Köhler, S.; Leimeister-Wächter, M.; Chakraborty, T.; Lottspeich, F.; Goebel, W. (1990):

The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*

Infect. Immun. **58**, 1943 - 1950

Krämer, J. (1997):

Lebensmittelmikrobiologie, 3. Auflage

Ulmer Verlag, Stuttgart

Krieg, N. R.; Holt, J. G. (Hrsg.) (1984):

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1

Williams & Wilkins Verlag, Baltimore

Kuhn, M.; Goebel, W. (1999):

Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Ryser, E. T.; Marth, E. H. (Hrsg.)

Dekker Verlag, New York, 97 - 130

Lachmund, A.; Sachse, G. (1994):

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ihre Anwendungsbereiche. In: *PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion*. Gassen, H. G.; Sachse, G. E.; Schulte, A. (Hrsg.)

Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1 - 13

Lambert-Zechovsky, N.; Bingen, E.; Denamur, E.; Brahimi, N.; Brun, P.; Mathieu, H.; Elion, J. (1992):

Molecular analysis provides evidence for the endogenous origin of bacteremia and meningitis due to *Enterobacter cloacae* in an infant

Clin. Infect. Dis. **15**, 30-32

Levin, A. S.; Levy, C. E.; Manrique, A. E.; Medeiros, E. A.; Costa, S. F. (2003):

Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam

Int. J. Antimicrob. Agents **21**, 58 - 62

Lottspeich, F.; Zorbas, H. (Hrsg.) (1998):

Bioanalytik

Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin,

Lovett, J. (1990):

Taxonomy and general characteristics of *Listeria* spp. In: *Foodborn Listeriosis*. Miller, A. J.; Smith, J. L.; Somkuti, G. A. (Hrsg.)

Elsevier Verlag, Amsterdam

Low, C.; Linklater, K. (1985):

Listeriosis in sheep

In Practice **7**, 66 - 67

Madec, J. Y.; Vanier, A.; Dorier, A.; Bernillon, J. Belli, P.; Baron, T. (1997):

Biochemical properties of protease resistant prion protein PrP^{sc} in natural sheep scrapie

Arch. Virol. **142**, 1603 - 1612

Makino, S.; Okada, Y.; Maruyama, T. (1995):

A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* from foods by PCR

Appl. Environ. Microbiol. **61**, 3745 - 3747

Manzano, M.; Cocolin, L.; Cantoni, C.; Comi, G. (1997):

Detection and identification of *Listeria monocytogenes* from milk and cheese by a single-step PCR

Food Microbiol. **15**, 651 - 657

Marchant, C. D. (1990):

Spectrum of disease due to *Branhamella catarrhalis* in children with particular reference to acute otitis media

Am. J. Med. **88**, 15S - 19S

Marcotte, E. M.; Eisenberg, D. (1999):

Chicken prion tandem repeats form a stable, protease-resistant domain

Biochemistry **38**, 667 - 676

Mastrantonio, P.; Stefanelli, P.; Fazio, C.; Sofia, T.; Neri, A.; La Rosa, G.; Marianelli, C.; Muscillo, M.; Caporali, M. G.; Salmaso, S. (2003):

Serotype distribution, antibiotic susceptibility, and genetic relatedness of *Neisseria meningitidis* strains recently isolated in Italy

Clin. Infect. Dis. **36**, 422 - 428

Matee, M. I.; Matre, R. (2001):

Pathogenic isolates in meningitis patients in Dar Es Salaam, Tanzania

East Afr. Med. J. **78**, 458-460

McBride, P. A.; Bruce, M. E.; Fraser, H. (1988):

Immunostaining of scrapie cerebral amyloid plaques with antisera raised to scrapie-associated fibrils (SAF)

Neuropathol. Appl. Neurobiol. **14**, 325 - 336

McKinley, M. P.; Meyer, R. K.; Kenaga, L.; Rahbar, F.; Cotter, R.; Serban, A.; Prusiner, S. B. (1991):

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

Mertsola, J. (1985):

Mixed outbreak of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis infection in Finland
Eur. J. Clin. Microbiol. **4**, 123 - 128

Merz, P. A.; Somerville, R. A.; Wisniewski, H. M.; Iqbal, K. (1981):

Abnormal fibrils from scrapie-infected brain
Acta Neuropathol. (Berl.) **54**, 63 - 74

Miller, M. W.; Fischer, J. R. (2000):

Report of the Committee on Wildlife Diseases
2000 Committee Reports
(<http://www.usaha.org/reports/reports00/r00wd.html>)

Miller, M. W.; Wild, M. A.; Williams, E. S. (1998):

Epidemiology of chronic wasting disease in captive Rocky Mountain elk
J. Wildl. Dis. **34**, 532 – 538

Miller, M. W.; Williams, E. S.; McCarty, C. W.; Spraker, T. R.; Kreeger, T. J.; Larsen, C. T.; Thorne, E. T. (2000):

Epizootiology of chronic wasting disease in free-ranging cervides in Colorado and Wyoming
J. Wildl. Dis. **36**, 676 – 690

Moya, K. L.; Salès, N.; Hässig, R.; Crèminon, C.; Grassi, J.; Di Giamberardino, L. (2000):

Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain
Microsc. Res. Tech. **50**, 58 - 65

Murray, P. R. (Hrsg.) (1995):

Manual of Clinical Microbiology, 6th ed.
ASM Press Verlag (American Society for Microbiology), Washington, D. C.

Namba, Y.; Tsuchiya, H.; Ikeda, K. (1992):

Apolipoprotein B immunoreactivity in senile plaque and vascular amyloids and neurofibrillary tangles in the brains patients with Alzheimer's disease
Neurosci. Lett. **134**, 264 - 266

Niederhauser, C.; Candrian, U.; Höfelein, C.; Jermini, M. H.; Bühler, H. P.; Lüthy, J. (1992):

Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food
Appl. Environ. Microbiol. **58**, 1564 - 1568

Oesch, B.; Westaway, D.; Wälchli, M.; McKinley, M. P.; Kent, S. B.; Aebersold, R.; Barry, R. A.; Tempst, P.; Teplow, D. B.; Hood, L. E. (1985):

A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein
Cell **40**, 735 - 746

Ominato, K.; Nozaki, M. (2002):

Distribution of growth hormone-like cells in the pituitary of adult sea lampreys, *Petromyzon marinus*
Zoolog. Sci. **19**, 1055 - 1059

O'Rourke, K. I.; Baszler, T. V.; Miller, J. M.; Spraker, T. R.; Sadler-Riggelman, I.; Knowles, D. P. (1998):

Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein
J. Clin. Microbiol. **36**, 1750 - 1755

Pan, K. M.; Baldwin, M.; Nguyen, J.; Gasset, M.; Serban, A.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; Huang, Z.; Fletterick, R. J.; Cohen, F. E. (1993):

Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 10962 - 10966

Paterson, J. S. (1939):

Flagellar antigens of organisms of the *Listerella*

J. Path. Bact. **48**, 25 – 32

Pauly, P. C.; Harris, D. A. (1998):

Copper stimulates endocytosis of the prion protein

J. Biol. Chem. **273**, 33107 - 33110

Penzak, S. R.; Abate, B. J. (1997):

Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia: a multidrug-resistant nosocomial pathogen

Pharmacotherapy **17**, 293 - 301

Peters, J.; Miller, J. M.; Jenny, A. L.; Peterson, T. L.; Carmichael, K. P. (2000):

Immunohistochemical diagnosis of chronic wasting disease in preclinically affected elk from a captive herd

J. Vet. Diagn. Invest. **12**, 579 – 582

Piffko, J.; Bankfalvi, A.; Ofner, D.; Joos, U.; Böcker, W.; Schmid, K. W. (1995):

Immunohistochemical detection of p53 protein in archival tissues from squamous cell carcinomas of the oral cavity using wet autoclave antigen retrieval

J. Pathol. **176**, 69 - 75

Pron, B. ; Boumaila, C. Jaubert, F. ; Sarnacki, S. ; Monnet, J. P. ; Berche, P. ; Gaillard, J. L. (1998) :

Comprehensive study of the intestinal stage of Listeriosis in a rat ligated ileal loop system

Infect. Immun. **66** (2), 747 - 755

Prusiner, S. B. (1982):

Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie

Science 1982, **216**, 136 - 144

Prusiner, S. B. (1984):

Prionen

Spektrum der Wissenschaft, **Dez.**, 48 – 58

Prusiner, S. B.; Scott, M.; Foster, D.; Pan, K. M.; Groth, D.; Mirenda, C.; Torchia, M.;

Yang, S. L.; Serban, D.; Carlson, G. A. (1990):

Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication

Cell **63**, 673 - 686

Prusiner, S. B. (2001):

Die Geschichte der Erforschung von Prionen. In: Prionen und Prionkrankheiten. Hörnlimann, B.; Riesner, D.; Kretzschmar, H. (Hrsg)

De Gruyter Verlag, Berlin, New York, 36 - 49

Purdey, M. (2000):

Ecosystems supporting clusters of sporadic TSEs demonstrate excesses of the radical-generating divalent cation manganese and deficiencies of antioxidant co factors Cu, Se, Fe, Zn. Does a foreign cation substitution at prion proteins' s Cu domain initiate TSE?

Med. Hypotheses **54**, 278 – 306

Quinn, P. J.; Carter, M. E.; Markey, B. K.; Carter, G. R. (1994):

Clinical Veterinary Microbiology

Wolfe Verlag, London

Raymond, G. J.; Bossers, A.; Raymond, L. D.; O'Rourke, K. I.; McHolland, L. E.;

Bryant III, P.K.; Miller, M. W.; Willams, E. S.; Smits, M.; Caughey, B. (2000):

Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease

EMBO J. **19**, 4425 – 4430

Sandersleben, J. v.; Dämmrich, K.; Dahme, E. (1989):

Pathologische Histologie der Haustiere

Fischer Verlag, Stuttgart, New York

Schätzl, H. M. (2001):

Die Phylogenetik des PrP. In: Prionen und Prionkrankheiten. Hörnlimann, B.; Riesner, D.; Kretzschmar, H. (Hrsg.)

De Gruyter Verlag, Berlin, New York, 92 - 116

Schellner, H. P. (1982):

Untersuchungsergebnisse von Fallwild und ausgewählten Musteliden von 1988 - 1981 in Bayern

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **95**, 462 – 464

Seeliger, H. P. R. (1958):

Listeriose, 2. Auflage

Barth Verlag, Leipzig

Seeliger, H. P. R.; Schröter, G. (1990):

Medizinische Mikrobiologie. Labordiagnostik und Klinik, 2. Auflage

Urban & Schwarzenberg Verlag, München

Selbitz, H. J. (2002):

Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 6. Auflage. Rolle, M.; Mayr A.; (Hrsg.)

Enke Verlag, Stuttgart, 417 - 588

Shetty, M.; Venkatesh, A.; Shenoy, S.; Shivananda, P.G. (1987):

Chromobacterium violaceum meningitis - a case report

Indian J. Med. Sci. **41**, 275-276

Shyng, S. L.; Heuser, J. E.; Harris, D. A. (1994):

A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits

J. Cell. Biol. **125**, 1239 - 1250

Siddique, I. H.; Lin, I. F.; Chung, R. A. (1974):

Purification and characterization of hemolysin produced by *Listeria monocytogenes*

Am. J. Vet. Res. **35**, 289 – 296

Sigurdson, C. J.; Williams, E. S.; Miller, M. W.; Spraker, T. R.; O'Rourke, K. I.; Hoover, E. A. (1999):

Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrP^{res} in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*)

J. Gen. Virol. **80**, 2757 – 2764

Singh, S. P.; Moore, B. L.; Siddique, I. H. (1981):

Purification and further characterization of phenol extract from *Listeria monocytogenes*

Am. J. Vet. Res. **42**, 1266 – 1268

Sivendra, R.; Lo, H. S. (1975):

Identification of *Chromobacterium violaceum*: pigmented and non-pigmented strains

J. Gen. Microbiol. **90**, 21-31

Sneath, P. H. A. (Hrsg.) (1986):

Bergey's manual of systematic bacteriology; Vol. 2

Williams & Wilkins Verlag, Baltimore

Spraker, T. R.; Miller, M. W.; Williams, E. S.; Getzy, D. M.; Adrian, W. J.; Schoonveld, G. G.; Spowart, R. A.; O'Rourke, K. I.; Miller, J. M.; Merz, P. A. (1997):

Spongiform encephalopathy in free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) in northcentral Colorado

J. Wildl. Dis. **33**, 1 – 6

Stanley, N. F. (1949):

Studies on *Listeria monocytogenes*. I. Isolation of a monocytosis producing agent (MPA)

Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. **27**, 123 – 131

Stöckel, J.; Safar, J.; Wallace, A. C.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B. (1998):

Prion protein selectively binds copper (II) ions

Biochemistry **37**, 7185 - 7193

Summers, B. A.; Cummings, J. F.; de Lahunta, A. (1995):

Veterinary Neuropathology

Mosby Verlag, St. Louis

Vazquez-Boland, J. A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Dominguez-Bernal, G.; Goebel, W.; Gonzalez-Zorn, B.; Wehland, J.; Kreft, J. (2001):

Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants

Clin. Microbiol. Rev. **14**, 584 - 640

Viles, J. H.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Goodin, D. B.; Wright, P. E.; Dyson, H. J. (1999):

Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 2042 - 2047

Wang, C.; Hong, C. (1999):

A rapid PCR-based hybridization assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in channel catfish

Food Microbiology **16**, 291 - 297

Weissmann, C.; Büeler, H.; Aguzzi, A.; Sailer, A.; Greiner, R. A.; Autenried, P.; Aguet, M. (1993):

e* Mice devoid of PrP are resistant to scrapie

Cell **73**, 1339 - 1347

Welshimer, H. J. (1968):

Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation

J. Bacteriol. **95**, 300 - 303

Wesley, I. V.; Jourdan, A. D.; Hurd, H. S.; Pinkerton, A. L. (2002):

5' Fluorogenic PCR Assay for the iap Gene of Listeria species

Food Safety, ASL-R1790, Iowa State University

Wexler; H.; Oppenheim, J. D. (1979):

Isolation, characterization, and biological properties of an endotoxin-like material from the gram-positive organism *Listeria monocytogenes*

Infect. Immun. **23**, 845 – 857

Williams, E. S.; Miller, M. W. (2002):

Chronic wasting disease in deer and elk in North America

Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. **21:2**, 305 - 316

Williams, E.S.; Young, S. (1980):

Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy

J. Wildl. Dis. **16**, 89 – 98

Williams, E. S.; Young, S. (1982):

Spongiform encephalopathy of Rocky Mountain elk

J. Wildl. Dis. **18**, 465 – 471

Williams, E. S.; Young, S. (1992):

Spongiform encephalopathies in Cervidae

Rev. Sci. Tech. **11**, 551 – 567

Williams, E. S.; Young, S. (1993):

Neuropathology of chronic wasting disease of mule deer (*Odocoileus hemionus*) and elk (*Cervus elaphus nelsoni*)

Vet. Pathol. **30**, 36 – 45

**Wopfner, F.; Weidenhöfer, G.; Schneider, R.; von Brunn, A.; Gilch, S.; Schwarz, T. F.;
Werner, T.; Schätzl, H. M. (1999):**

Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of
the prion protein

J. Mol. Biol. **289**, 1163 - 1178

Zobeley, E.; Glockshuber, R. (2001):

Prionen: Neuartige, immer noch rätselhafte Erreger

Nachrichten aus der Chemie **49**, 454 - 461

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Acinetobacter
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
amerik.	amerikanisch
Aqua dest.	destilliertes Wasser
B.	Bordetella
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
BU	Bakteriologische Untersuchung
°C	Grad Celsius
CJD	Creutzfeld-Jakob Krankheit
Cu	Kupfer
CWD	Chronic Wasting Disease
Da	Dalton
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E. coli	Escherichia coli
Fe	Eisen
FFI	Fatale Familiäre Schlaflosigkeit
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
ggr.	geringgradig
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
h	Stunde
hgr.	hochgradig
i. d. R.	in der Regel
L.	Listeria
L. monoc.	Listeria monocytogenes
M.	Moraxella
min	Minute
ml	Milliliter
Mn	Mangan
N.	Neisseria
Ndb.	Niederbayern
NRZ	Nationales Referenzzentrum
nvCJD	neue Variante der Creutzfeld-Jakob Krankheit
o. b. B.	ohne besonderen Befund
Obb.	Oberbayern
P.	Pseudomonas
PK	Proteinase K
PCR	Polymerase chain reaction
PrP	Prionprotein

PrP ^C	zelluläres Prionprotein
PrP ^{CWD}	Prionprotein Chronic Wasting Disease
PrP ^{res}	resistentes Prionprotein
PrP ^{Sc}	Prionprotein Scrapie
PrP ^{sen}	sensibles Prionprotein
s	Sekunde
Se	Selen
spp.	Spezies
ssp.	Subspezies
Staph. aureus	Staphylococcus aureus
Syn	Synonym
TME	Transmissible Mink Encephalopathy
TSE	Transmissible Spongiforme Encephalopathie
u. a.	unter anderem
unspez. Mischflora	unspezifische Mischflora
vgl.	vergleiche
Zn	Zink
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 ANHANG

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CWD in Nordamerika und Kanada	9
Abbildung 2: Struktur des PrP ^{Sc} (A) und des PrP ^C (B) (Huang et al., 1996)	12
Abbildung 3: Maultierhirsch: Hochgradige Abmagerung und struppiges Haarkleid; typisch für CWD	14
Abbildung 4: Histopathologie der CWD: Multiple Vakuolisierung des Nervengewebes	16
Abbildung 5: Regionale Probenverteilung	29
Abbildung 6: Führung der Sägeschnitte bei der Hirnsektion (Sektionsanleitung Pathologie)	31
Abbildung 7: Lage und Basensequenz der Primer (LIM 2bn und LIM Reb) und Sonden (LIM2 FL und LIM2 LC) auf dem iap-Gen	41
Abbildung 8: Prinzip eines Sandwich-ELISA	44
Abbildung 9: Probenentnahme aus dem Obexbereich (Arbeitsanweisung der Fa. BioRad) .	46
Abbildung 10: Prinzip der Immunhistochemie mit biotinylierten Antispezies-Antikörpern ...	55
Abbildung 11: Schmelzkurvenverlauf von aus Hirnproben vom Wild isolierten Listerienstämmen (n = 55) A: Kurvenverlauf bei 53 Stämmen B: Kurvenverlauf bei 2 Stämmen	67
Abbildung 12: Amplifikationskurven (A) bzw. Schmelzkurvenverläufe (B) von <i>L. grayi</i> <i>ssp. murrayi</i> (Referenzstamm) und den Isolaten <i>W 169</i> , <i>W 425</i> und <i>W 589</i> ...	68
Abbildung 13: Verteilung der Tierarten bei den Listeriosefällen	69
Abbildung 14: Regionale Verteilung der Listeriose beim Rehwild in Bayern	69
Abbildung 15: Histologische Präparate von bakteriologisch auffälligen Hirnproben vom Wild A: perivaskuläre Infiltrate; Vergrößerung 400x; B: perivaskuläre granulo- und lymphozytäre Infiltrate, Vergrößerung 1000x.	73
Abbildung 16: Immunhistochemische Untersuchung (Versuch 1) von Hirngewebe eines im ELISA negativ getesteten Rehs: Braun gefärbte Kerne täuschen TSE vor (falsch-positives Resultat)	76
Abbildung 17: Immunhistochemie vom Hirngewebe von Rindern: Vorbehandlung mit Proteinase K und Autoklavieren (Versuch 9) A: BSE-positives Rind:	

PrP^{res} wird braun angefärbt B: BSE-negatives Rind: Kerne färben sich nur aufgrund des Hämalauns blau an 78

Abbildung 18: Immunhistochemie vom Hirngewebe von Cervidae: Vorbehandlung mit Proteinase K und Autoklavieren (Versuch 9) A: CWD-positiver Wapiti-hirsch: Qualität durch Autolyse beeinträchtigt, dadurch sind nur noch braun angefärbte Kernfragmente erkennbar B: CWD-negatives Reh: Kerne färben sich nur aufgrund des Hämalauns blau an..... 78

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TSE-Erkrankungen des Menschen (Zobeley und Glockshuber, 2001).....	6
Tabelle 2:	TSE-Erkrankungen beim Tier (Zobeley und Glockshuber, 2001).....	7
Tabelle 3:	Biochemische Eigenschaften von Listerien (in Anlehnung an Sneath, 1986)	20
Tabelle 4:	Schonzeiten für ausgewählte Wildtiere in Bayern	28
Tabelle 5:	Jahresstrecken in den bayerischen Staatsjagdrevieren der Staatsforstverwaltung des Jagdjahres 2001/2002 beim Reh-, Rot- und Gamswild im Vergleich zur Probenanzahl	30
Tabelle 6:	Gesamtmastermix Hybridization-Probe Fast Start [®] (pro Kapillare).....	42
Tabelle 7:	Einstellungen am Lightcycler.....	43
Tabelle 8:	Inhalt des Reinigungskits	45
Tabelle 9:	Inhalt des Detectionkits	48
Tabelle 10:	Vorbehandlung der Schnittpräparate zum immunhistochemischen Nachweis von PrP ^{Sc}	56
Tabelle 11:	Vorkommen von Bakteriengattungen bzw. -arten (ohne Listeria spp.) im Hirngewebe von Rehwild (n = 654) und Rotwild (n = 189).....	61
Tabelle 12:	Ergebnisse der Listerien-Selektivanreicherung.....	65
Tabelle 13:	Histologische Befunde von bakteriologisch auffälligen Hirnproben vom Wild (n = 87).....	70
Tabelle 14:	Vorkommen pathologisch-histologischer Veränderungen in vorselektierten Hirnproben von Wildwiederkäuern (n = 87).....	73
Tabelle 15:	Durchschnittliche Extinktion (OD) von Hirnhomogenaten vom Rehwild im ELISA nach unterschiedlicher Behandlung	74
Tabelle 16:	ELISA-Extinktionen (OD) von CWD-positivem Hirngewebe	75
Tabelle 17:	ELISA-Extinktionen (OD) von Hirnhomogenaten von Wildwiederkäuern bayerischer Provinienz	75
Tabelle 18:	Prävalenzen von TSE-Erkrankungen bei Wildwiederkäuern in Bayern.....	90

10.3 Detaillierte Auflistung der Befunde der allgemeinen bakteriologischen Untersuchung

Nr. ¹⁾	Forst-direktion	Forstamt/Forst-dienststelle	Bakteriengattung/-spezies	Kontami-nations-grad ²⁾
W 1	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Staphylococcus spp.	(+)
W 3	Obb.-Schwaben	Nördlingen	nicht durchgeführt	
W 4	Obb.-Schwaben	Nördlingen	nicht durchgeführt	
W 7	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Staphylococcus spp. Micrococcus spp.	(+) (+)
W 8	Obb.-Schwaben	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 9	Obb.-Schwaben	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 10	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus spp.	+
W 11	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Staphylococcus spp. E. coli	(+) +++
W 12	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Staphylococcus spp. Micrococcus luteus E. coli	(+) (+) +++
W 13	Obb.-Schwaben	Nördlingen	E. coli	+++
W 14	Obb.-Schwaben	Nördlingen	E. coli Micrococcus spp.	+++ ++
W 15	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Serratia plymuthica α -häm. Streptococcus spp. Micrococcus spp. Micrococcus luteus E. coli	++ (+) ++ ++ ++
W 16	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus Bacillus spp. E. coli Micrococcus spp.	++ + + ++
W 17	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus spp. Micrococcus luteus E. coli Bacillus spp.	+ +++ ++ (+)
W 18	Obb.-Schwaben	Nördlingen	β -häm. Streptococcus spp. Micrococcus spp. E. coli Micrococcus luteus	(+) + +++ ++
W 19	Obb.-Schwaben	Nördlingen	E. coli Micrococcus luteus Staphylococcus aureus	+++ (+) +
W 20	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Staphylococcus spp. Micrococcus spp. E. coli	(+) (+) +++
W 21	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp. Staphylococcus spp. Micrococcus spp.	(+) (+) (+)
W 22	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Staphylococcus spp. Micrococcus spp.	(+) (+)
W 23	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Staphylococcus spp. Micrococcus spp.	(+) (+)

Nr. ¹⁾	Forst- direktion	Forstamt/Forst- dienststelle	Bakteriengattung/-spezies	Kontami- nations- grad ²⁾
W 25	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Staphylococcus spp. Micrococcus spp. E. coli	(+) (+) (+)
W 26	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus spp.	(+)
W 29	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus spp.	(+)
W 30	Obb.-Schwaben	Nördlingen	E. coli	+
W 31 bis W 67	Obb.-Schwaben	Nördlingen	nicht durchgeführt	
W 70	Obb.-Schwaben	Freising	nicht durchgeführt	
W 72	Obb.-Schwaben	Garmisch- Partenkirchen	E. coli	(+)
W 76	Oberfranken	Bayreuth	E. coli	+++
W 79	Oberfranken	Bayreuth	β -häm. E. coli Actinomyces pyogenes	(+) (+)
W 80	Oberfranken	Bayreuth	E. coli α -häm. Streptococcus spp. Klebsiella spp.	+++ (+) ++
W 83	Oberfranken	Bayreuth	E. coli Staphylococcus spp.	+++ +
W 84	Oberfranken	Bayreuth	Bacillus spp.	(+)
W 85	Ndb.-Oberpfalz	Kirchham	E. coli Micrococcus luteus	+++ ++
W 87	Obb.-Schwaben	Kaisheim	E. coli Pseudomonas spp.	++ ++
W 90	Oberfranken	Pegnitz	E. coli	(+)
W 91	Obb.-Schwaben	Kaisheim	Actinomyces pyogenes	(+)
W 96	Oberfranken	Pegnitz	β -häm. Streptococcus spp.	(+)
W 100	Ndb.-Oberpfalz	Deggendorf	Bacillus spp. E. coli Rhodococcus equi	(+) (+) (+)
W 101	Ndb.-Oberpfalz	Neureichenau	nicht durchgeführt	
W 102	Ndb.-Oberpfalz	Neureichenau	nicht durchgeführt	
W 103	Ndb.-Oberpfalz	Neureichenau	nicht durchgeführt	
W 104	Ndb.-Oberpfalz	Pfreimd	E. coli α -häm. Streptococcus spp. Actinobacillus spp.	+ (+) (+)
W 106	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Actinobacillus spp.	(+)
W 110	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Rhodococcus equi	(+)
W 112	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Stenotrophomonas maltophilia E. coli Rhodococcus equi	(+) (+) (+)
W 115	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Stenotrophomonas maltophilia	(+)
W 116	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Rhodococcus equi	(+)
W 117	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Staphylococcus spp.	(+)
W 118	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Micrococcus spp.	(+)
W 125	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Acinetobacter spp.	(+)
W 133	Oberfranken	Fichtelberg	Aeromonas hydrophila Rhodococcus equi Pseudomonas spp.	+ + ++

Nr. ¹⁾	Forst- direktion	Forstamt/Forst- dienststelle	Bakteriengattung/-spezies	Kontami- nations- grad ²⁾
W 135	Ndb.-Oberpfalz	Pielenhofen	E. coli α -häm. Streptococcus spp. Staphylococcus spp.	+++ +++ +++
W 142	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	α -häm. Streptococcus spp.	+
W 143	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Acinetobacter baumannii	(+)
W 145	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Acinetobacter spp.	(+)
W 146	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Staphylococcus spp.	(+)
W 147	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Actinobacillus spp. Moraxella spp.	++ +
W 148	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Stenotrophomonas maltophilia	(+)
W 149	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Moraxella spp.	+
W 158	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Flavimonas oryzihabitans	(+)
W 160	Obb.-Schwaben	Nördlingen	E. coli	++
W 162	Obb.-Schwaben	Nördlingen	α -häm. Streptococcus spp. E. coli	(+) (+)
W 163	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Acinetobacter spp. E. coli Bacillus spp.	(+) + +
W 164	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Acinetobacter iwoffii	+
W 169	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Staphylococcus spp.	+
W 171	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus spp.	+
W 172	Obb.-Schwaben	Nördlingen	α -häm. Streptococcus spp. E. coli Staphylococcus spp.	++ ++ ++
W 173	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Acinetobacter spp. E. coli	(+) +++
W 174	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Actinobacillus spp. Staphylococcus spp.	+ (+)
W 175	Obb.-Schwaben	Nördlingen	γ -häm. Streptococcus spp. E. coli	+ (+)
W 176	Obb.-Schwaben	Nördlingen	E. coli Actinobacillus spp.	+ +
W 177	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Moraxella spp.	+
W 178	Obb.-Schwaben	Nördlingen	E. coli Staphylococcus spp. Aeromonas spp.	+ (+) +
W 179	Obb.-Schwaben	Nördlingen	E. coli Micrococcus spp.	+ (+)
W 180	Obb.-Schwaben	Landsberg a. Lech	Rodococcus equi Moraxella spp.	(+) (+)
W 187	Ndb.-Oberpfalz	Parsberg	Aeromonas spp.	(+)
W 190	Obb.-Schwaben	Kreuth	nicht durchgeführt	
W 194	Obb.-Schwaben	Illertissen	Pseudomonas spp.	+
W 200	Mittelfranken	Rothenburg o. d. T.	Pseudomonas aeruginosa Streptococcus mutans Micrococcus spp.	(+) (+) (+)
W 201	Mittelfranken	Rothenburg o. d. T.	Bordetella spp. Bacillus spp.	(+) (+)
W 215	Obb.-Schwaben	Neuburg a. d. D.	Misc. gramneg. Bacilli	(+)
W 216	Obb.-Schwaben	Neuburg a. d. D.	Bordetella spp.	(+)

Nr. ¹⁾	Forst-direktion	Forstamt/Forst-dienststelle	Bakteriengattung/-spezies	Kontami-nations-grad ²⁾
W 218	Obb.-Schwaben	Neuburg a. d. D.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(+)
W 219	Obb.-Schwaben	Neuburg a. d. D.	<i>Micrococcus</i> spp.	(+)
W 221	Ndb.-Oberpfalz	Tirschenreuth	unspez. Mischflora	
W 222	Ndb.-Oberpfalz	Pielenhofen	<i>Chryseobact. meningosepticum</i>	+
W 223	Ndb.-Oberpfalz	Pielenhofen	<i>Acinetobacter</i> spp.	+
W 226	Ndb.-Oberpfalz	Freyung	<i>Acinetobacter</i> spp. <i>E. coli</i> <i>Rodococcus equi</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	(+) + (+) (+)
W 227	Ndb.-Oberpfalz	Waldmünchen	<i>Bacillus</i> spp. <i>Micrococcus luteus</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Rhodococcus equi</i>	(+) (+) (+) (+)
W 236	Ndb.-Oberpfalz	Bad Griesbach	<i>Staphylococcus</i> spp. γ -häm. <i>Streptococcus</i> spp.	+ (+)
W 238	Obb.-Schwaben	Freyung	<i>Corynebact. aquaticum</i>	+
W 239	Obb.-Schwaben	Freyung	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> Misc. gramneg. Bacilli	(+) (+)
W 242	Obb.-Schwaben	Freyung	<i>Pantoea agglomerans</i>	(+)
W 250	Obb.-Schwaben	Mindelheim	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter iwoffii</i> <i>Actinobacillus</i> spp. <i>Corynebact. aquaticum</i> β -häm. <i>Streptococcus</i> spp.	(+) (+) (+) (+) (+)
W 255	Obb.-Schwaben	Nördlingen	<i>E. coli</i>	(+)
W 256	Obb.-Schwaben	Nördlingen	<i>Micrococcus</i> spp.	(+)
W 257	Obb.-Schwaben	Nördlingen	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	(+)
W 258	Obb.-Schwaben	Nördlingen	<i>Flavobact. spp.</i> <i>Rhodococcus equi</i>	(+) (+)
W 259	Obb.-Schwaben	Nördlingen	<i>Moraxella</i> spp.	(+)
W 260	Obb.-Schwaben	Nördlingen	nicht durchgeführt	
W 261	Obb.-Schwaben	Nördlingen	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Actinobacillus</i> spp. <i>Bacillus</i> spp.	(+) (+) (+) (+) +
W 265	Obb.-Schwaben	Nördlingen	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Rodococcus equi</i>	(+) (+) ++
W 266	Obb.-Schwaben	Nördlingen	<i>Bacillus</i> spp.	(+)
W 267	Obb.-Schwaben	Nördlingen	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Aeromonas veronii</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Rodococcus equi</i> <i>E. coli</i> <i>Nocardia</i> spp. <i>Actinobacillus</i> spp.	(+) + (+) (+) (+) (+) (+) (+)
W 268	Obb.-Schwaben	Nördlingen	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Acinetobacter baumannii</i>	(+) (+) (+)

Nr. ¹⁾	Forst- direktion	Forstamt/Forst- dienststelle	Bakteriengattung/-spezies	Kontami- nations- grad ²⁾
W 270	Obb.-Schwaben	Nördlingen	γ -häm. Streptococcus spp. Bacillus spp. Micrococcus spp.	(+) (+) (+)
W 271	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Neisseria spp.	(+)
W 273	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Aerococcus viridans Rodococcus equi Moraxella spp.	(+) (+) (+)
W 274	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Moraxella spp.	(+)
W 275	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Rodococcus equi	(+)
W 276	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Rodococcus equi Aeromonas veronii	(+) +
W 278	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Flavimonas oryzihabitans Moraxella spp.	(+) (+)
W 280	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Sphingomonas paucimobilis Micrococcus luteus	(+) (+)
W 282	Ndb.-Oberpfalz	Pielenhofen	Bacillus spp. Rodococcus equi	(+) (+)
W 293	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus	(+)
W 294	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus	(+)
W 295	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus Micrococcus spp.	(+) (+)
W 297	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp.	(+)
W 298	Obb.-Schwaben	Nördlingen	E. coli	(+)
W 299	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp. Micrococcus luteus Moraxella spp.	(+) (+) (+)
W 300	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp. Micrococcus luteus	(+) (+)
W 301	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus	(+)
W 302	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp. E. coli	(+) (+)
W 304	Obb.-Schwaben	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 305	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp. Micrococcus luteus Rodococcus equi	(+) ++ (+)
W 306	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp.	(+)
W 307	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp. Rodococcus equi Micrococcus luteus	(+) (+) (+)
W 308	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp. Micrococcus spp. Micrococcus luteus	(+) (+) (+)
W 309	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp. Micrococcus luteus	(+) +
W 310	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus	(+)
W 311	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp. Rodococcus equi E. coli	(+) (+) (+)
W 312	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Bacillus spp.	(+)
W 313	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus spp.	(+)

Nr. ¹⁾	Forst- direktion	Forstamt/Forst- dienststelle	Bakteriengattung/-spezies	Kontami- nations- grad ²⁾
W 315	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus Bacillus spp.	(+) (+)
W 317	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus	(+)
W 319	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus Rodococcus equi	(+) (+)
W 321	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus Bacillus spp. β-häm. Streptococcus spp.	+ + (+)
W 324	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus β-häm. Streptococcus spp. Moraxella spp.	(+) + (+)
W 325	Obb.-Schwaben	Nördlingen	γ-häm. Streptococcus spp. Neisseria spp.	(+) (+)
W 330	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Streptococcus bovis Rodococcus equi Micrococcus spp. Actinobacillus spp.	(+) (+) (+) (+)
W 331	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus spp. Bacillus spp.	+ (+)
W 332	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus spp.	(+)
W 333	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus spp. Bacillus spp.	(+) (+)
W 334	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus	(+)
W 340	Obb.-Schwaben	Weilheim	Bacillus spp.	(+)
W 341	Obb.-Schwaben	Weilheim	unspec. Mischflora	
W 342	Obb.-Schwaben	Weilheim	Bacillus spp.	(+)
W 345	Obb.-Schwaben	Eichstätt	Bacillus spp.	(+)
W 348	Obb.-Schwaben	Eichstätt	Neisseria spp. Acinetobacter baumannii Actinomyces spp.	(+) + (+)
W 349	Obb.-Schwaben	Eichstätt	Lactococcus lactis ssp.lactis Misc. gramneg. Bacilli Acinetobacter baumannii	(+) (+) +
W 354	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 358	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 359	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 361	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 362	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 363	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 364	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 365	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 366	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 367	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Micrococcus luteus	(+)
W 369	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Micrococcus luteus	(+)
W 370	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 371	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 372	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Micrococcus luteus	(+)
W 373	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp.	(+)
W 374	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	
W 375	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspec. Mischflora	

Nr. ¹⁾	Forst- direktion	Forstamt/Forst- dienststelle	Bakteriengattung/-spezies	Kontami- nations- grad ²⁾
W 376	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspez. Mischflora	
W 377	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspez. Mischflora	
W 378	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspez. Mischflora	
W 380	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspez. Mischflora	
W 381	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspez. Mischflora	
W 389	Ndb.-Oberpfalz	Selb	nicht durchgeführt	
W 390	Ndb.-Oberpfalz	Mindelheim	nicht durchgeführt	
W 395	Ndb.-Oberpfalz	Kreuth	Bacillus spp.	(+)
W 405	Ndb.-Oberpfalz	Kaufbeuren	Micrococcus luteus	(+)
W 408	Ndb.-Oberpfalz		unspez. Mischflora	
W 409	Ndb.-Oberpfalz	Schwangau	Klebsiella spp. Micrococcus luteus E. coli	(+) +++ (+)
W 411	Ndb.-Oberpfalz	Neuburg a. d. D.	Micrococcus spp.	(+)
W 417	Ndb.-Oberpfalz	Nördlingen	Micrococcus spp.	(+)
W 418	Ndb.-Oberpfalz	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 419	Ndb.-Oberpfalz	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 420	Ndb.-Oberpfalz	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 424	Ndb.-Oberpfalz	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 425	Ndb.-Oberpfalz	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 427	Ndb.-Oberpfalz	Nördlingen	Bacillus spp.	(+)
W 431	Ndb.-Oberpfalz	Feuchtwangen	unspez. Mischflora	
W 439	Ndb.-Oberpfalz	Runding	α -häm. Streptococcus spp.	(+)
W 441	Ndb.-Oberpfalz	Wasserburg	unspez. Mischflora	
W 443	Ndb.-Oberpfalz	Mittenwald	nicht durchgeführt	
W 444	Ndb.-Oberpfalz	Mittenwald	nicht durchgeführt	
W 445	Ndb.-Oberpfalz	Mittenwald	nicht durchgeführt	
W 446	Ndb.-Oberpfalz	Mittenwald	nicht durchgeführt	
W 448	Ndb.-Oberpfalz	Mittenwald	unspez. Mischflora	
W 449	Ndb.-Oberpfalz	Mittenwald	unspez. Mischflora	
W 450	Ndb.-Oberpfalz	Mittenwald	unspez. Mischflora	
W 451	Ndb.-Oberpfalz	Mittenwald	unspez. Mischflora	
W 452	Ndb.-Oberpfalz	Pfreimd	nicht durchgeführt	
W 453	Ndb.-Oberpfalz	Pressath	Enterococcus spp. E. coli	+ +
W 454	Ndb.-Oberpfalz	Pressath	Enterococcus spp. E. coli	+ +
W 455	Ndb.-Oberpfalz	Pressath	E. coli Bacillus spp.	+++ +
W 456	Ndb.-Oberpfalz	Pressath	Neisseria spp.	+
W 457	Ndb.-Oberpfalz	Pressath	Micrococcus luteus E. coli	(+) (+)
W 460	Obb.-Schwaben	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 462	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus	(+)
W 463	Obb.-Schwaben	Nördlingen	E. coli Micrococcus luteus Bacillus spp.	++ (+) +
W 464	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus α -häm. Streptococcus spp. E. coli	(+) (+) (+)

Nr. ¹⁾	Forst- direktion	Forstamt/Forst- dienststelle	Bakteriengattung/-spezies	Kontami- nations- grad ²⁾
W 465	Obb.-Schwaben	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 468	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Neisseria spp. E. coli Staphylococcus aureus	+ + (+)
W 470	Obb.-Schwaben	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 471	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus Bacillus spp. Corynebact. renale	++ ++ +
W 473	Obb.-Schwaben	Nördlingen	unspez. Mischflora	
W 476	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Micrococcus luteus	(+)
W 477	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Rodococcus equi	(+)
W 479	Obb.-Schwaben	Nördlingen	Staphylococcus aureus Rodococcus equi	(+) (+)
W 481	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp.	(+)
W 485	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspez. Mischflora	
W 486	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp. Micrococcus luteus	(+) (+)
W 487	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp.	(+)
W 489	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspez. Mischflora	
W 490	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspez. Mischflora	
W 491	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp. Micrococcus luteus	(+) (+)
W 493	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Arsenophonus nasoniae	(+)
W 495	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp.	(+)
W 499	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp. Micrococcus luteus	(+) (+)
W 501	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Staphylococcus spp. Acinetobacter spp. Bacillus spp.	(+) (+) (+)
W 504	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Staphylococcus spp.	(+)
W 505	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	E. coli Actinomyces spp.	+ +
W 506	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp.	(+)
W 507	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp.	(+)
W 508	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Micrococcus spp.	+
W 510	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	E. coli	(+)
W 512	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Staphylococcus spp.	+
W 514	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp.	(+)
W 518	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Micrococcus spp.	(+)
W 519	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspez. Mischflora	
W 521	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Micrococcus spp.	+
W 522	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Staphylococcus spp.	(+)
W 524	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	α -häm. Streptococcus spp.	(+)
W 526	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Staphylococcus spp.	(+)
W 527	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Micrococcus spp.	(+)
W 528	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	γ -häm. Streptococcus spp	(+)
W 531	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspez. Mischflora	
W 532	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp.	(+)
W 533	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp. Micrococcus luteus	(+) (+)

Nr. ¹⁾	Forst- direktion	Forstamt/Forst- dienststelle	Bakteriengattung/-spezies	Kontami- nations- grad ²⁾
W 535	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp. Micrococcus spp. Actinomyces pyogenes	(+) (+) +
W 537	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	Bacillus spp. Actinomyces pyogenes	(+) +
W 538	Ndb.-Oberpfalz	Grafenwöhr	unspez. Mischflora	
W 540	Oberfranken	Pegnitz	Micrococcus spp.	(+)
W 549	Oberfranken	Pegnitz	Pseudomonas spp.	(+)
W 559	Ndb.-Oberpfalz	Schnaittenbach	Enterococcus raffinosus Corynebact. spp. E. coli	+++ + (+)
W 565	Obb.-Schwaben	Wasserburg	Bacillus spp.	(+)
W 566	Obb.-Schwaben	Wasserburg	Bacillus spp.	(+)
W 568	Obb.-Schwaben	Starnberg	E. coli	(+)
W 569	Obb.-Schwaben	Öd	Flavobact. spp.	(+)
W 570	Obb.-Schwaben	Öd	Flavobact. spp.	(+)
W 575	Unterfranken	Altenbuch	E. coli	(+)
W 582	Unterfranken	Mittelsinn	α -häm. Streptococcus spp.	+++
W 589	Unterfranken	Mellrichstadt	Bacillus spp.	(+)
W 592	Unterfranken	Gerolzhofen	Bacillus spp.	(+)
W 593	Unterfranken	Gerolzhofen	E. coli Bacillus spp.	++ +
W 594	Unterfranken	Wiesentheid	Bacillus spp.	(+)
W 595	Unterfranken	Wiesentheid	Bacillus spp.	(+)
W 600	Obb.-Schwaben	Kreuth	Bacillus spp.	(+)
W 601	Obb.-Schwaben	Kreuth	nicht durchgeführt	
W 602	Obb.-Schwaben	Thierhaupten	Bacillus spp.	+
W 604	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	Streptococcus bovis	+++
W 607	Unterfranken	Arnstein	unspez. Mischflora	
W 608	Unterfranken	Arnstein	Streptococcus circulans	(+)
W 609	Unterfranken	Arnstein	E. coli	+++
W 610	Unterfranken	Arnstein	unspez. Mischflora	
W 611	Unterfranken	Arnstein	E. coli Micrococcus spp.	++ (+)
W 612	Ndb.-Oberpfalz	Burglengenfeld	Micrococcus spp.	(+)
W 620	Ndb.-Oberpfalz	Wegscheid	Actinobacillus spp. Enterococcus faecalis	(+) (+)
W 622	Unterfranken	Arnstein	unspez. Mischflora	
W 623	Unterfranken	Arnstein	Aerococcus viridans Bacillus coagulans E. coli	(+) (+) +++
W 624	Ndb.-Oberpfalz	Passau	E. coli Aeromonas hydrophila Staphylococcus spp.	++ (+) (+)
W 625	Ndb.-Oberpfalz	Passau	unspez. Mischflora	
W 626	Ndb.-Oberpfalz	Passau	Aeromonas hydrophila Acinetobacter spp.	(+) (+)
W 627	Ndb.-Oberpfalz	Passau	unspez. Mischflora	
W 628	Ndb.-Oberpfalz	Passau	γ -häm. Streptococcus spp. Rhanella aquatilis	++ (+)

Nr. ¹⁾	Forst- direktion	Forstamt/Forst- dienststelle	Bakteriengattung/-spezies	Kontami- nations- grad ²⁾
W 629	Ndb.-Oberpfalz	Passau	Acinetobacter spp. Actinomyces spp.	(+) (+)
W 630	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	Chromobact. violaceum Aerococcus viridans E. coli	(+) (+) (+)
W 631	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	unspez. Mischflora	
W 632	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	Actinobacillus spp.	+
W 634	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	unspez. Mischflora	(+)
W 635	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	E. coli Rodococcus equi Bacillus coagulans	(+) (+) (+)
W 639	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	unspez. Mischflora	
W 640	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	Bacillus coagulans	(+)
W 641	Obb.-Schwaben	Geisenfeld	Micrococcus luteus Bacillus coagulans	(+) (+)
W 642	Obb.-Schwaben	Geisenfeld	unspez. Mischflora	
W 644	Obb.-Schwaben	Geisenfeld	Bacillus coagulans	(+)
W 648	Ndb.-Oberpfalz	Amberg	Burkholderia cepacia	++
W 650	Obb.-Schwaben	NPV Berchtesgaden	Actinobacillus spp.	(+)
W 652	Unterfranken	Rothenbuch	Rodococcus equi	(+)
W 653	Unterfranken	Rothenbuch	unspez. Mischflora	
W 654	Ndb.-Oberpfalz	Mitterfels	Pseudomonas aeruginosa	++
W 658	Ndb.-Oberpfalz	Mitterfels	unspez. Mischflora	
W 667	Ndb.-Oberpfalz	Roding	Acinetobacter iwoffii	+
W 671	Ndb.-Oberpfalz	Roding	β -häm. Streptococcus spp. Actinomyces pyogenes Pseudomonas spp. Micrococcus spp.	(+) (+) (+) (+)
W 673	Ndb.-Oberpfalz	Roding	Bacillus coagulans	+
W 678	Ndb.-Oberpfalz	Roding	Corynebact. spp.	(+)
W 680	Ndb.-Oberpfalz	Roding	unspez. Mischflora	
W 681	Unterfranken	Arnstein	unspez. Mischflora	
W 687	Ndb.-Oberpfalz	Roding	Bacillus spp. Acinetobacter spp. Staphylococcus spp.	(+) (+) (+)
W 696	Ndb.-Oberpfalz	Roding	Streptococcus bovis	+++++
W 700	Ndb.-Oberpfalz	Riedenburger	Shewanella putrefaciens	(+)
W 701	Ndb.-Oberpfalz	Riedenburger	Shewanella putrefaciens Burkholderia cepacia	(+) (+)
W 703	Ndb.-Oberpfalz	Roding	Staphylococcus spp. Bacillus spp.	(+) (+)
W 704	Ndb.-Oberpfalz	Roding	Micrococcus luteus Bacillus spp.	(+) (+)
W 705	Ndb.-Oberpfalz	Roding	Micrococcus spp.	(+)
W 706	Ndb.-Oberpfalz	Roding	E. coli	(+)
W 707	Ndb.-Oberpfalz	Roding	Enterobacter sakazakii	(+)
W 708	Ndb.-Oberpfalz	Amberg	α -häm. Streptococcus spp.	(+)
W 710	Ndb.-Oberpfalz	Amberg	Enterobacter sakazakii	++
W 714	Obb.-Schwaben	Biburg	E. coli	+++
W 715	Obb.-Schwaben	Biburg	unspez. Mischflora	

Nr. ¹⁾	Forst- direktion	Forstamt/Forst- dienststelle	Bakteriengattung/-sepzies	Kontami- nations- grad ²⁾
W 716	Obb.-Schwaben	Biburg	E. coli	+++
W 717	Obb.-Schwaben	Biburg	unspez. Mischflora	
W 719	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	Chromobacterium violaceum	+++
W 720	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	Chromobacterium violaceum Brevuundimonas diminuta	++ (+)
W 721	Obb.-Schwaben	Füssen	unspez. Mischflora	
W 724	Obb.-Schwaben	Isen I	unspez. Mischflora	
W 729	Obb.-Schwaben	Isen I	Bacillus coagulans	(+)
W 730	Obb.-Schwaben	Isen I	unspez. Mischflora	
W 733	Unterfranken	Münnerstadt	Staphylococcus spp.	(+)
W 744	Unterfranken	Münnerstadt	Streptococcus equinus	+++
W 748	Ndb.-Oberpfalz	Flossenbürg	Flavimonas oryzihabitans Leuconostoc citreum	(+) (+)
W 749	Ndb.-Oberpfalz	Flossenbürg	Enterococcus faecalis Burkholderia cepacia Bacillus spp.	(+) (+) (+)
W 750	Ndb.-Oberpfalz	Flossenbürg	Enterococcus faecalis	++
W 752	Ndb.-Oberpfalz	Flossenbürg	Enterobacter cloacae	+
W 760	Unterfranken	Bad Neustadt a. d. Saale	nicht durchgeführt	
W 761	Unterfranken	Bad Neustadt a. d. Saale	nicht durchgeführt	
W 762	Ndb.-Oberpfalz	Neunburg vorm Wald	nicht durchgeführt	
W 765	Ndb.-Oberpfalz	Neunburg vorm Wald	nicht durchgeführt	
W 767	Ndb.-Oberpfalz	Neunburg vorm Wald	Micrococcus luteus	(+)
W 768	Ndb.-Oberpfalz	Neunburg vorm Wald	Actinobacillus spp. Pseudomonas fluorescens	++ +
W 770	Ndb.-Oberpfalz	Neumarkt i. d. Opf.	Actinobacillus spp. Pseudomonas fluorescens	(+) (+)
W 774	Ndb.-Oberpfalz	Neumarkt i. d. Opf.	Moraxella spp. Pseudomonas aeruginosa Burkholderia cepacia Acinetobacter spp. Pasteurella spp.	(+) + + (+) (+)
W 775	Ndb.-Oberpfalz	Sulzbach- Rosenberg	Actinobacillus spp. Moraxella spp.	+ +
W 776	Ndb.-Oberpfalz	Sulzbach- Rosenberg	E. coli Actinobacillus spp. Lactococcus lactis ssp. lactis	(+) + (+)
W 777	Ndb.-Oberpfalz	Sulzbach- Rosenberg	Neisseria spp β-häm. Streptococcus spp. E. coli	(+) (+) (+)
W 778	Obb.-Schwaben	Aichach	Acinetobacter spp. E. coli Staphylococcus spp. Misc. gramneg. Bacilli	(+) (+) (+) (+)
W 779	Obb.-Schwaben	Aichach	unspez. Mischflora	

Nr. ¹⁾	Forst- direktion	Forstamt/Forst- dienststelle	Bakteriengattung/-spezies	Kontami- nations- grad ²⁾
W 780	Obb.-Schwaben	Aichach	Brevuundiomonas diminuta Pseudomonas fluorescens Burkholderia cepacia	(+) ++ (+)
W 781	Obb.-Schwaben		unspez. Mischflora	
W 782	Obb.-Schwaben	Sauerlach	Acinetobacter spp.	++
W 783	Obb.-Schwaben	Sauerlach	Aeromonas hydrophila Micrococcus spp. Acinetobacter spp.	++ (+) (+)
W 784	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	Actinobacillus spp. Enterococcus faecalis	(+) (+)
W 785	Ndb.-Oberpfalz	Landshut	Enterococcus faecalis E. coli	+ ++
W 789	Unterfranken	Steinach	unspez. Mischflora	
W 791	Unterfranken	Steinach	Burkholderia cepacia Flavimonas oryzihabitans	++ +
W 794	Unterfranken	Steinach	Burkholderia cepacia	(+)
W 796	Unterfranken	Steinach	Moraxella spp.	+
W 809	Ndb.-Oberpfalz	Kelheim	E. coli Lactococcus raffinolactis Micrococcus luteus	(+) (+) (+)
W 812	Unterfranken	Marktheidenfeld	Bacillus spp.	(+)
W 813	Unterfranken	Marktheidenfeld	Leuconostoc citreum	(+)
W 817	Obb.-Schwaben	Zusmarshausen	Lactococcus lactis ssp. Lactis	(+)
W 820 bis W 849			nicht durchgeführt	

¹⁾: Bei den nicht aufgeführten Nummern konnte kein Wachstum auf den Agarplatten festgestellt werden.

²⁾: (+): 1 – 2 Kolonien
 +: 3 – 4 Kolonien
 ++: 5 – 7 Kolonien
 +++: 8 - 16 Kolonien
 ++++: 17 - 50 Kolonien
 +++++: > 50 Kolonien

10.4 BBL-Auswertung und Konfidenz der einzelnen Isolate

Nummer	BBL-Ergebnis	
	Spezies	Konfidenz
W 143	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99,28%
W 267	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99,99%
W 268	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99,28%
W 348	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99,16%
W 349	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99,28%
W 164	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	98,52%
W 250	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	38,18%
W 667	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	98,52%
W 623	<i>Aerococcus viridans</i>	99,74%
W 630	<i>Aerococcus viridans</i>	99,74%
W 622	<i>Aeromonas hydrophila</i>	96,61%
W 634	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,74%
W 626	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,65%
W 783	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,65%
W 133	<i>Aeromonas hydrophila</i>	84,88%
W 267	<i>Aeromonas veronii</i>	68,08%
W 276	<i>Aeromonas veronii</i>	80,20%
W 623	<i>Bacillus coagulans</i>	99,43%
W 635	<i>Bacillus coagulans</i>	79,30%
W 640	<i>Bacillus coagulans</i>	99,43%
W 641	<i>Bacillus coagulans</i>	76,79%
W 644	<i>Bacillus coagulans</i>	79,30%
W 673	<i>Bacillus coagulans</i>	99,43%
W 729	<i>Bacillus coagulans</i>	84,73%
W 226	<i>Bacillus licheniformis</i>	76,79%
W 720	<i>Brevuundimonas diminuta</i>	90,04%
W 780	<i>Brevuundimonas diminuta</i>	71,12%
W 648	<i>Burkholderia cepacia</i>	99,51%
W 701	<i>Burkholderia cepacia</i>	99,79%
W 749	<i>Burkholderia cepacia</i>	99,80%
W 774	<i>Burkholderia cepacia</i>	92,01%
W 780	<i>Burkholderia cepacia</i>	98,69%
W 794	<i>Burkholderia cepacia</i>	95,75%
W 626	<i>Chromobacterium violaceum</i>	86,52%
W 719	<i>Chromobacterium violaceum</i>	99,82%
W 720	<i>Chromobacterium violaceum</i>	99,99%
W 222	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	99,02%
W 112	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	98,57%
W 238	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	99,98%
W 250	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	99,87%
W 378	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	99,99%
W 471	<i>Corynebacterium renale</i>	99,98%

Nummer	BBL-Ergebnis	
	Spezies	Konfidenz
W 265	Enterobacter cloacae	95,08%
W 752	Enterobacter cloacae	95,08%
W 707	Enterobacter sakazakii	26,33%
W 710	Enterobacter sakazakii	26,33%
W 620	Enterococcus faecalis	99,24%
W 749	Enterococcus faecalis	58,30%
W 750	Enterococcus faecalis	56,82%
W 784	Enterococcus faecalis	99,71%
W 785	Enterococcus faecalis	98,94%
W 559	Enterococcus raffinosus	84,48%
W 158	Flavimonas oryzihabitans	86,28%
W 278	Flavimonas oryzihabitans	81,08%
W 748	Flavimonas oryzihabitans	54,99%
W 791	Flavimonas oryzihabitans	89,71%
W 776	Lactococcus lactis ssp. lactis	87,38%
W 817	Lactococcus lactis ssp. lactis	87,38%
W 349	Lactococcus lactis ssp. lactis	73,01%
W 809	Lactococcus raffinolactis	99,45%
W 748	Leuconostoc citreum	99,53%
W 813	Leuconostoc citreum	99,53%
W 242	Pantoea agglomerans	88,28%
W 261	Pseudomonas aeruginosa	79,71%
W 218	Pseudomonas aeruginosa	97,70%
W 265	Pseudomonas aeruginosa	57,34%
W 654	Pseudomonas aeruginosa	99,84%
W 774	Pseudomonas aeruginosa	88,44%
W 200	Pseudomonas aeruginosa	98,65%
W 250	Pseudomonas aeruginosa	94,24%
W 791	Pseudomonas cepacia	93,04%
W 768	Pseudomonas fluorescens	33,14%
W 770	Pseudomonas fluorescens	88,84%
W 780	Pseudomonas fluorescens	88,84%
W 700	Shewanella putrefaciens	97,56%
W 701	Shewanella putrefaciens	99,65%
W 239	Sphingomonas paucimobilis	96,87%
W 261	Sphingomonas paucimobilis	99,03%
W 267	Sphingomonas paucimobilis	99,77%
W 280	Sphingomonas paucimobilis	98,45%
W 115	Stenotrophomonas maltophilia	91,32%
W 148	Stenotrophomonas maltophilia	59,23%
W 268	Stenotrophomonas maltophilia	99,93%
W 330	Streptococcus bovis	92,73%
W 604	Streptococcus bovis	99,99%
W 696	Streptococcus bovis	71,76%
W 608	Streptococcus circulans	78,57%
W 744	Streptococcus equinus	99,98%
W 200	Streptococcus mutans	97,67%

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2001 bis April 2003 am Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Johann Bauer, angefertigt.

Ihm möchte ich meinen ganz besonderen Dank aussprechen für die Überlassung dieses interessanten und aktuellen Themas und die große Freiheit bei der Ausgestaltung. Ganz besonders zu schätzen weiß ich auch sein mir entgegengebrachtes Vertrauen, seine jederzeit gewährte, freundliche Betreuung, seine Motivationskraft und natürlich die geduldige Unterstützung bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schmahl für die Übernahme dieser Arbeit. Er und seine Mitarbeiterin, Frau Dr. Birgit Stierstorfer, hatten stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme und natürlich auch immer kompetente Antworten parat. Ich erhielt von ihnen jederzeit Hilfe bei der Anfertigung und Auswertung der histologischen Untersuchungen, v. a. bei der Entwicklung der immunhistochemischen Methode. Bei dieser Gelegenheit danke ich auch allen Mitarbeitern des Institutes für Veterinärpathologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, die mich bei der Durchführung der Histologie unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch:

- Allen Forstämtern sowie dem Fürsten zu Öttingen-Wallerstein und deren Mitarbeiter, für das zur Verfügung stellen des Untersuchungsmaterials und die ermöglichten interessanten Einblicke in die waidmännischen Sitten und Gebräuche.
- Herrn Stefan Achatz, für seine Rolle als Chauffeur, bei der wir unser Heimatland Bayern sehr gut kennen lernen konnten, und für seine tatkräftige Unterstützung bei der Probenentnahme. Ich hoffe, er hat sich mittlerweile von dieser schweißtreibenden und nicht immer geruchsneutralen Arbeit erholt...
- Frau Maria Biber, für die nette „Einführung in die Laborpraxis“ und in die Grundlagen der bakteriologischen Untersuchung.

- Frau Andrea Kolm, für die wertvolle Hilfe bei der Histologie, der Immunhistochemie und der PCR.
- Allen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden des Lehrstuhls für Tierhygiene, für das gute Betriebsklima und die stets gewährte Hilfe bei der Durchführung meiner Experimente, bei organisatorischen Fragen und für so manchen guten Rat.
- Meinem Freund Stephan, für die Hilfe bei Computerfragen, bei der Probenentnahme, und für seine stetige (und für ihn wohl oft auch ziemlich anstrengende) Motivationsarbeit, diesen Weg überhaupt einzuschlagen und durchzuhalten.
- Und natürlich meinen Eltern, zunächst für ihre aktive Hilfe bei der Probenentnahme, für das Korrekturlesen, aber auch und vor allem für ihre vorbehaltlose Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Schwaiger

Vorname: Karin

Geburtsdatum: 20.08.1974

Geburtsort: Moosburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

- 1980 – 1984: Grundschule Moosburg
- 1984 – 1986: Hauptschule Moosburg
- 1986 – 1990: Staatliche Realschule Moosburg
- 1990 – 1992: Ausbildung zur Bürokauffrau bei der
Flughafen München GmbH
- 1992 – 1993: Tätigkeit als Bürokauffrau bei der
Flughafen München GmbH
- 1993 – 1995: Berufsoberschule Landshut

Studium:

November 1995 – Januar 2001:
Tiermedizinstudium an der LMU München
Approbation als Tierärztin am 09.01.01

Februar 2001 – April 2003:
Promotion am Lehrstuhl für Tierhygiene, TU Weihenstephan