

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungsbericht 201 73 241
UBA-FB 000460



**Bewertung des Vorkommens
und der Auswirkung von
infektiösen Biomolekülen in
Böden unter besonderer
Berücksichtigung ihrer
Persistenz - Literaturstudie**

von

Dr. Björn Seidel
Dr. Werner Kördel

Fraunhofer-Institut Molekularbiologie und Angewandte Oekologie
(Fh-IME), Schmallenberg

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese TEXTE-Veröffentlichung kann bezogen werden bei

Vorauszahlung von 7,50 Euro

durch Post- bzw. Banküberweisung,
Verrechnungsscheck oder Zahlkarte auf das

Konto Nummer 432 765-104 bei der
Postbank Berlin (BLZ 10010010)
Fa. Werbung und Vertrieb,
Wolframstraße 95-96,
12105 Berlin

Parallel zur Überweisung richten Sie bitte
eine schriftliche Bestellung mit Nennung
der **Texte-Nummer** sowie des **Namens**
und der **Anschrift des Bestellers** an die
Firma Werbung und Vertrieb.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr
für die Richtigkeit, die Genauigkeit und
Vollständigkeit der Angaben sowie für
die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in der Studie geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: 030/8903-0
Telex: 183 756
Telefax: 030/8903 2285
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet II 4.1
Prof. Dr. mult. Dr. h.c. Konstantin Terytze

Berlin, August 2004

1. Berichtsnummer UBA-FB 000 460	2.	3.
4. Titel des Berichts Bewertung des Vorkommens und der Auswirkung von infektiösen Biomolekülen in Böden unter besonderer Berücksichtigung ihrer Persistenz - Literaturstudie		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Seidel, Björn Kördel, Werner	8. Abschlussdatum 01.09.2003	
	9. Veröffentlichungsdatum	
6. Durchführende Institution Fraunhofer-Institut Molekularbiologie und Angewandte Oekologie Abt. Oekologie, Auf dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg	10. UFOPLAN-Nr. 201 73 241	
	11. Seitenzahl 62	
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, 14191 Berlin	12. Literaturangaben 77	
	13. Tabellen und Diagramme 10	
15. Zusätzliche Angaben	14. Abbildungen 5	
16. Kurzfassung <p>Die Fragestellung des Überdauerns infektiöser Biomoleküle in Böden ist durch das Auftreten der spongiformen Enzephalopathien - insbesondere BSE und Scrapie - von großem Interesse. Verschiedene Studien geben Anhaltspunkte dafür, dass diese Krankheitserreger in Böden Jahre überdauern können, ihre biologische Aktivität erhalten und somit infektiös bleiben. Der Eintrag der Erreger kann über verschiedene Quellen erfolgen. So ist bekannt, dass Scrapie-infizierte Schafe z. B. durch infizierte Plazenta oder Fruchtwasser zu einer Kontamination der Umwelt führen. Auch der Eintrag über Fäkalien oder nicht ausreichend sterilisierte landwirtschaftliche Dünger ist vorstellbar. Die Beobachtungen, dass sich Schafe immer wieder auf Weiden infizieren, auf denen zuvor Scrapie-Schafe weideten, geben Anlass zur Annahme für eine nachhaltige Kontamination der Umwelt.</p> <p>Das Ziel der vorliegenden Literaturstudie war die Darstellung des Sachstandes zu den Analysemethoden in der TSE-Diagnostik. Es sollten die existierenden bzw. sich in der Entwicklung befindlichen Nachweismethoden identifiziert werden, die für den Nachweis des TSE-Erregers im Boden grundsätzlich geeignet sind. Die durchgeführte Literaturstudie zeigte, dass im Prinzip die derzeit existierenden Nachweismethoden in der Lage sein sollten, Prionen im Boden nachzuweisen, wenn entsprechende Verfahren zur Verfügung stehen, die es ermöglichen, Protein aus großen Mengen Boden zu extrahieren und entsprechend anzureichern. Problematisch an der Matrix Boden ist, dass - anders als in Geweben - Proteine durch die unterschiedlichsten Wechselwirkungen sehr stark im Boden gebunden werden, so dass diese herkömmlichen, beschriebenen Extraktionsverfahren nicht zugänglich sind.</p>		
17. Schlagwörter BSE/TSE-Diagnostik, BSE-Nachweisverfahren, Boden, Persistenz, infektiöse Biomoleküle, PrP, Prionen, Scrapie, BSE/TSE-Erreger, Umwelt		
18. Preis	19.	20.

1. Report UBA-FB 000 460	2.	3.
4. Report Title Evaluating the existence and implication of infective bio molecules in soil, thereby particularly considering their persistence - Literature Study		
5. Author(s), Family Name(s), First Name(s) Seidel, Björn Kördel, Werner		8. Report Date 01.09.2003
		9. Publication Date
6. Performing Organisation Fraunhofer-Institut Molekularbiologie und Angewandte Oekologie Dept. Ecology, Auf dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg, Germany		10. UFOPLAN - Ref. No. 201 73 241
		11. No. of Pages 62
7. Sponsoring Agency Umweltbundesamt (German Federal Environmental Agency)		12. No. of References 77
		13. No. of Tables 10
15. Supplementary Notes		14. No. of Figures 5
16. Abstract <p>The question concerning the persistence of infective bio molecules in soil is vitally important, particularly with regard to the occurrence of transmissible spongiforme encephalopathies like BSE and Scrapie. Various studies offer clues that such pathogenic germs are able to outlive several years in soil without losing their biological activity. The entry of the TSE pathogen into the environment can take place due to several sources. One possibility is that infective placenta or amniotic fluid of sheep leads to a contamination of the surrounding soil. Even the contamination caused by excrements or non-sterilised agricultural organic fertiliser is conceivable. The observation that sheep will be infected by Scrapie while grazing on pastures where infected sheep have been living before, gives reason for a sustainable contamination of the environment.</p> <p>The aim of the present literature study was the demonstration of the state of the art concerning the analytical methods in the diagnostic of TSE. The existing or the currently developed methods which might be suitable for the detection of the pathogenic prion protein in soil should be identified. The conducted literature study showed that in principle existing methods should be able to detect prions in soil. However, techniques have to be available enabling the extraction and enrichment of proteins from high amounts of soil. Different from the interaction of proteins in tissues, the distinct adhesion of proteins to soil seems to be very strong and therefore the proteins not available for common used extraction methods.</p>		
17. Keywords BSE/TSE diagnostic, BSE detection methods, soil, persistence, infectious bio molecules, PrP, prions, scrapie, BSE/TSE-strain, environment		
18. Price	19.	20.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
ZUSAMMENFASSUNG.....	8
SUMMARY.....	10
1 ZIELSETZUNG	12
2 EINLEITUNG.....	13
2.1 PRION-HYPOTHESE UND PRION-PROTEIN	13
2.2 BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DES PRP	14
3 LITERATURRECHERCHE	16
3.1 LITERATURAUSWERTUNG	18
4 NACHWEISVERFAHREN	25
4.1 STAND IN DER TSE-DIAGNOSTIK.....	25
4.2 HISTOLOGIE	26
4.3 IMMUNOHISTOCHEMIE	27
4.4 LIQUORDIAGNOSTIK.....	27
4.5 BIOASSAY.....	28
4.6 PRION-PROTEIN-NACHWEIS.....	29
5 BSE-SCHNELLTESTS	32
5.1 WESTERNBLOT.....	33
5.2 ELISA-ASSAY (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY).....	35
5.3 WEITERE IMMUNOLOGISCHE NACHWEISVERFAHREN	37
6 LITERATUR.....	39
6.1 KAPILLAR-IMMUNO-ELEKTROPHORESE	39
6.2 RUTH GABIZON	39
6.3 PROTEIN MISFOLDING CYCLIC AMPLIFICATION.....	40
6.4 FILTER RETENTION ASSAY	40

6.5	WEITERE LITERATUR	41
7	BIOTECHNOLOGIEFIRMEN UND PATENTE.....	42
7.1	ABBEYMOY LTD.....	46
7.2	ABC RESEARCH CORPORATION	46
7.3	ALTEGEN INC	46
7.4	BAYER DIAGNOSTICS.....	47
7.5	BOEHRINGER INGELHEIM (VETMEDICA).....	47
7.6	CAPRION PHARMACEUTICALS INC.....	47
7.7	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	47
7.8	CENTRE SUISSE D'ELECTRONIQUE ET DE MICROTECHNIQUE SA	48
7.9	DISEASE SCIENCES INC	48
7.10	IGEN INTERNATIONAL INC (AUCH D-GEN).....	48
7.11	MICROSENS BIOPHAGE LTD.....	49
7.12	PARADIGM GENETICS INC.....	49
7.13	PRIONICS AG.....	49
7.14	PRUSINER, STANLEY B.....	50
7.15	R-BIOPHARM.....	50
7.16	SERONO PHARMACEUTICAL RESEARCH INSTITUTE.....	50
8	BEURTEILUNG DER METHODEN	51
8.1	ANWENDBARKEIT BEI BODENPROBEN.....	52
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	54

LISTE DER TABELLEN

Tabelle 2-1: Unterschiede zwischen zellulärem und pathogenem PrP	15
Tabelle 3-1: Kurzdarstellung der ausgewerteten Literatur nach Suchroutine 1	18
Tabelle 3-2: Kurzdarstellung der ausgewerteten Literatur nach Suchroutine 2	22
Tabelle 3-3: Patent-Offenlegungen bzw. -Veröffentlichungen bezüglich Prionen-Nachweisen (auszugsweise)	23
Tabelle 4-1: Übersicht über diagnostische Möglichkeiten bei der CJD-Diagnostik	28
Tabelle 4-2: Erregertiter (nach Bioassay in der Maus) in Geweben von Scrapie-infizierten Schafen bzw. Ziegen mit Scrapie-Symptomen, verglichen mit den Titern in Geweben von BSE-Kühen	30
Tabelle 4-3: Antikörper zur Prionen-Diagnostik	31
Tabelle 5-1: Von der EU-Kommission ausgewählte Testverfahren	33
Tabelle 5-2: PrP ^{Sc} –Nachweismethoden	38
Tabelle 7-1: An der Entwicklung von BSE-Tests beteiligte Firmen	44

LISTE DER ABBILDUNGEN

Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Prion-Hypothese	14
Abbildung 3-1: Suchroutine 1 zur Recherche in den entsprechenden Datenbanken	16
Abbildung 3-2: Suchroutine 2 zur Recherche in den entsprechenden Datenbanken	17
Abbildung 5-1: Testprinzip des Prionics Check, verändert nach Prionics AG, Schweiz	34
Abbildung 5-2: Darstellung des Strip-ELISA	36

Abkürzungsverzeichnis

BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CE	Kapillar Elektrophorese
CEA	Commissariat à l'Énergie Atomique
CJK/CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit/Disease
DELFLIA	Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immuno Assay
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
I.E.	Infektiöse Einheit
IEM	Immuno Electron Microscopy
mAb	monoklonaler Antikörper
mRNA	messenger RNA
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PrP	Prion-Protein
RNA	Ribonucleinsäure
SAF	Scrapie Associated Fibrils
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Spongiforme Enzephalopathie
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
vCJD/nvCJD	variant/new variant CJD
WB	Westernblot

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Literaturstudie zeigen, dass inzwischen eine Vielzahl von Methoden zum Nachweis pathogener Prionen entwickelt wurden. Die existierenden Nachweisverfahren können in *in vitro*- und *in vivo*-Verfahren unterteilt werden. In den vergangenen Jahren wurde zum einen massiv an der Entwicklung von Tests - vor allem von BSE-Tests - am lebenden Tier gearbeitet sowie zum anderen an der Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit bestehender Methoden. Von Bedeutung ist hier insbesondere die Detektion von pathogenen Prion-Proteinen in Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin. Verschiedene in der Entwicklung befindliche Nachweismethoden verfolgen den Ansatz, nicht die pathogenen PrP selbst zu identifizieren, sondern versuchen, Marker zu analysieren, die infolge einer TSE-Infektion nachweisbar sind. So soll frühzeitig eine Infektion am lebenden Tier erkennbar sein.

Die vorliegende Literaturstudie wurde durch Recherchen in den Monaten August bis November 2001 angefertigt. Die Suche erfolgte u.a. über die Datenbank PubMed des National Center for Biotechnology Information (NCBI). Besonderer Schwerpunkt wurde auch auf die Sichtung von weltweiten Patentveröffentlichungen bzw. Offenlegungsschriften gelegt, da diese in Bezug auf Nachweisverfahren den Status quo repräsentieren. Die Recherchen erfolgten hier in den Datenbanken des Deutschen Patent- und Markenamtes, des Europäischen Patentamtes sowie des United States Patent and Trademark Office (www.uspto.gov). Darüber hinaus wurden Recherchen nach „grauer Literatur“ und Anfragen an Firmen, die sogenannte „BSE-Kits“ kommerziell vertreiben, durchgeführt.

In Bezug auf den Nachweis von TSE-Erregern in Boden kann die Beurteilung von Tests am lebenden Tier, z. B. über Markerproteine oder mRNA, vollständig entfallen. Derartige Moleküle werden nur geringfügig in den Boden gelangen und aufgrund der allgemein hohen Proteinase- und Nukleaseaktivität in normalen Böden - anders als das persistente PrP^{Sc} - sehr schnell abgebaut. Die Literaturstudie zeigt, dass der einzige Nachweis, der für die Bodenanalytik erfolgreich sein kann, der direkte Nachweis des pathogenen Prion-Proteins

selbst darstellt. Hier sind die biochemischen Eigenschaften des pathogenen PrP von großer Bedeutung. Gerade die hohe Resistenz gegen Proteinasen führt dazu, dass das PrP vermutlich eine lange Verweildauer im Boden hat und aufgrund dessen mit entsprechenden Methoden isoliert und analysiert werden könnte. Grundsätzlich sind die existierenden Nachweismethoden, die sich auf den direkten Nachweis des Prion-Proteins beziehen, für die TSE-Analytik im Boden anwendbar. Die Nachweisgrenzen der zur Zeit angewandten Methoden legen jedoch dar, dass es mit diesen Verfahren momentan nicht möglich ist, eine großflächige TSE-Kontamination im Boden routinemäßig nachzuweisen, ausgenommen vielleicht direkte Kontaminationen durch bspw. Plazentarrückstände Scrapie-infizierter Schafe.

Die Literaturrecherche zeigt in diesem Zusammenhang auch eindeutig, dass das eigentliche Problem nicht der Nachweis des Prion-Proteins darstellt, sondern dass die limitierenden Faktoren die Isolation und Anreicherung sind. So müssen Möglichkeiten erarbeitet werden, die es erlauben, größere Bodenmengen im Gramm- bis Kilogramm-Bereich so aufzuarbeiten, dass enthaltene Proteine aufgereinigt, angereichert und dadurch einem Nachweis zugänglich gemacht werden.

Summary

The results of the present literature study show that in the meantime numerous methods for the detection of pathogenic prions have been developed. The existing detection procedures can be divided into *in vitro* and *in vivo* methods. Over the past years, major efforts have been made to develop new tests – especially a test for the use on the living animal and for the improvement of the detection limit. Of particular importance is the detection of pathogenic prions on samples of blood and other juices. Different detection methods follow the approach not to detect the pathogenic PrP itself, but the markers which will be formed due to a TSE infection. An early detection of a TSE infection in living animals should be possible due to such markers.

The present literature study was conducted by inquiries between August and November 2001. The database PubMed of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) has been screened during the literature search. Much attention was paid to patent applications and patent specifications published worldwide, since they represent the status quo regarding detection methods. The databases of the following institutions were searched: German Patent and Trademark Office, European Patent Office, United States Patent and Trademark Office (www.uspto.gov). In addition, "grey literature" and internet homepages of companies selling the so-called "BSE kits" have been searched.

Referring to the detection of TSE pathogens in soil, a test for the use on the living animal, e. g. by means of marker proteins or mRNA, can be omitted entirely. Only a small quantity of such molecules will reach the soil and will be degraded very quickly because of the general high protease and nuclease activity in usual soil – unlike the persistent PrP^{Sc}. The literature study shows that the only way that might be successful for analyzing soil is to directly detect the pathogenic prion proteins themselves. In this connection, the biochemical properties of the pathogenic PrP are of particular importance. It is presumed that especially the high resistance against proteases causes that PrP has a longevity in soil and that it could therefore be isolated and analyzed by way of respective methods. In principle, existing detection methods based on the direct detection of prion proteins can be used for TSE analysis in soil. However, the

detection limits of the applied methods show that they do not enable to detect a TSE contamination in large soil areas as a routine; maybe except for direct contaminations due to placenta residues of scrapie-infected sheep.

In this connection, the literature search also shows clearly that the problem itself is not the detection of prion proteins, but that the isolation and enrichment are the limiting factors. Possibilities should be developed enabling to handle large quantities of soil (ranging from gram to kilogram) in such a way that any existing proteins will be purified, enriched and then be ready for detection.

1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Literaturstudie war die Darstellung des Sachstandes zu den Analysemethoden in der TSE-Diagnostik. Es sollten anschließend die existierenden bzw. sich in der Entwicklung befindlichen Nachweismethoden identifiziert werden, die für den Nachweis des TSE-Erregers im Boden grundsätzlich geeignet sind.

Problematisch an der Matrix Boden ist, dass, anders als in Geweben, Proteine durch die unterschiedlichsten Wechselwirkungen sehr stark im Boden gebunden werden. So galt es, Methoden zu identifizieren, die in der Weise abgewandelt werden können, dass diese in der Lage sind, Prionen aus Boden zu isolieren und nachzuweisen.

Weiterhin sollte recherchiert werden, welche möglichen Methoden für eine Routineuntersuchung bzw. für eine wissenschaftliche Untersuchung in Frage kommen.

2 Einleitung

2.1 Prion-Hypothese und Prion-Protein

Ausgehend von den Beobachtungen, dass weder Kohlenhydrate, Lipide noch Nukleinsäuren als infektiöse Agenzien in Frage kamen - also keine Viren, Bakterien, Protozoen oder Parasiten die Krankheit übertragen konnten -, postulierte Prusiner die Prion-Hypothese.

Charakteristisch bei allen TSE-Erkrankungen ist die Aggregation eines Proteins in bestimmten Hirnarealen, die zur Ausbildung großer Mengen fibrillärer Komplexe (Amyloide) führen. Die Proteine, die diese Amyloidkomplexe ausbilden, wurden von Prusiner als Prion-Proteine (PrP) bezeichnet. Diese Proteine zeigen eine hohe Resistenz gegenüber Protein-abbauenden Enzymen, wodurch die Ablagerungen größerer Amyloidkomplexe möglich wird [1]. Der Proteinase-resistente Teil des Proteins weist ein Molekulargewicht von ca. 27-30 kD auf [1].

Nach der Aufklärung der Aminosäuresequenz war es möglich, das entsprechende *Prion-Protein*-Gen (*PRNP*) zu isolieren und zu klonieren. Weitere Untersuchungen zeigten überraschenderweise, dass der PrP mRNA-Level sowohl in gesunden als auch infizierten Geweben gleich war. Das Protein, das in beiden Geweben untersucht wurde, wies auch die gleiche Aminosäuresequenz auf. Das heißt, dass PrP^C sowie PrP^{Sc} von ein und demselben Gen codiert werden. Allerdings unterscheiden diese beiden Proteine sich in ihren chemischen Eigenschaften beträchtlich. Untersuchungen bestätigten, dass sowohl der tierische als auch der menschliche Organismus Prion-Proteine synthetisiert, die in nahezu allen Organen - ausgenommen der Leber - nachweisbar sind. Die größten Mengen PrP werden an den Oberflächen von Neuronen gefunden. Diese natürlichen Prion-Proteine (PrP^C für PrP-zellulär) sind im Gegensatz zu den pathogenen PrP Protease-empfindlich und werden deshalb auch als PrP^{sen} bezeichnet; dementsprechend die Protease-resistenten als PrP^{res} oder PrP^{Sc} für Scrapie Prion-Protein.

Ausgehend von diesen Befunden postulierte Prusiner die Prion-Hypothese [2, 3], die davon ausgeht, dass bei einer Prionen-Infektion PrP^{Sc} in den Körper gelangt und dies das natürliche PrP^C direkt oder indirekt dazu veranlasst, dessen pathologische Form zu übernehmen. Die Abbildung 2-1 zeigt, dass nach der Prion-Hypothese sich ein PrP^{res} mit einem PrP^C-Molekül zu einem Heterodimer verbindet, welches nach Umlagerungen zu einem PrP^{res}-PrP^{res}-Homodimer transformiert wird.

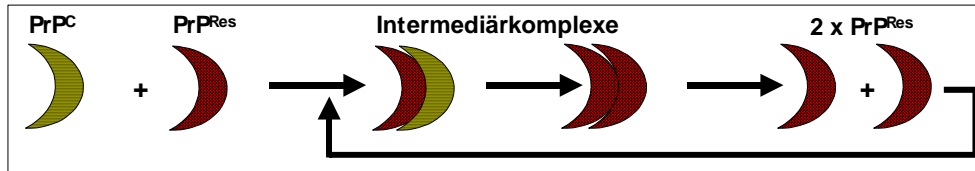


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Prion-Hypothese

Nach anschließender Dissoziation der beiden PrP^{res}-Moleküle ist eine erneute Verbindung mit einem PrP^C möglich, wodurch eine Kettenreaktion ausgelöst wird.

Die physiologische Funktion des Prion-Proteins ist noch nicht aufgeklärt. Verschiedene Beobachtungen deuten darauf hin, dass u.a. die kupferbindende Eigenschaft von PrP^C von zentraler funktioneller Bedeutung ist [4].

Das aggregierte Protein wird nur im Verlauf der Erkrankung gebildet (PrP^{Sc}) und unterscheidet sich neben der Proteinase-Resistenz von der normalen zellulären Form (PrP^C) durch hohe Anteile an β -Faltblattstrukturen.

2.2 Biochemische Eigenschaften des PrP

Für den Nachweis des PrP ist die Kenntnis der biochemischen Eigenschaften und Struktur des Proteins unabdingbar. Das PrP^C selbst ist zwischen den Säugetieren sehr konserviert, so belegen Untersuchungen eine Homologie von 90% zwischen den verschiedenen Spezies. Aufgrund dieser Homologie ist nur eine limitierende Anzahl von Epitopen ermittelt worden, trotz zahlreicher Versuche in verschiedenen Spezies mit unterschiedlichen PrP-Isoformen als Immunogen. Antikörper, für die Epitope identifiziert werden konnten, erkennen Sequenzen innerhalb des PrP, bei denen ein Unterschied zwischen Wirt- und Spender-Spezies besteht. Ungeachtet dieser Limitierungen sind inzwischen eine Vielzahl polyklonaler Antiseren und monoklonaler Antikörper erhältlich.

Das PrP^{Sc} zeichnet sich im Vergleich zu PrP^C durch eine sehr hohe Resistenz gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen aus. Dies ist insofern von Bedeutung, da gerade für die Analytik deshalb

Substanzen zur Extraktion des PrP^{Sc} eingesetzt werden können, die normalerweise Proteine teilweise bzw. vollständig zerstören würden.

Die Unterschiede zwischen den beiden PrP-Formen sind auf die unterschiedliche Proteinfaltung zurückzuführen. Während im zellulären PrP helikale Strukturen überwiegen, sind in pathogenem PrP eine große Anzahl von β -Faltblattstrukturen nachweisbar. Die Unterschiede beider Formen sind in Tabelle 2-1 dargestellt.

Tabelle 2-1: Unterschiede zwischen zellulärem und pathogenem PrP

Eigenschaften	PrP^C	PrP^{Sc}
Sekundärstruktur	42% α -Helix, 3% β -Faltblatt	α -Helix 30%; 43% β -Faltblatt
Proteinase K	sensitiv	resistent
Stabilität	thermo- und drucklabil, denaturierbar	stabil gegen chemische und physikalische Einflüsse, UV-Strahlung und γ -Strahlung
Lokalisation	Zellmembran, monomer	innerhalb der Zelle, Aggregationsbildung
Synthesezeit in der Zelle	<2h	ca. 15 h

aus [4]

Das zelluläre Prion-Protein weist ein Molekulargewicht von 33-35 KD auf und wird durch Proteinase K vollständig zerstört. Das pathogene PrP besitzt einen Proteinase K-resistenten Teil, der nach Abspaltung des N-terminalen Bereiches, ein Molekulargewicht von 27-30 KD aufweist [1]

3 Literaturrecherche

Die vorliegende Literaturstudie wurde durch Recherchen in den Monaten August bis November 2001 angefertigt. Die Suche erfolgte u.a. über die Datenbank PubMed des National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Besonderer Schwerpunkt wurde auch auf die Sichtung von weltweiten Patentveröffentlichungen bzw. Offenlegungsschriften gelegt, da diese in Bezug auf Nachweisverfahren den Status quo repräsentieren (Tabelle 3-3). Die Recherchen erfolgten hier in den Datenbanken des Deutschen Patent- und Markenamtes, des Europäischen Patentamtes sowie des United States Patent and Trademark Office (www.uspto.gov). Darüber hinaus wurden Recherchen nach „Grauer Literatur“ und Anfragen an Firmen, die sogenannte „BSE-Kits“ kommerziell vertreiben, durchgeführt.

In Abbildung 3-1 ist die Suchstrategie näher dargestellt, wobei Ziel war, Methoden zu identifizieren, die sich sowohl auf Nachweise als auch auf Isolationsmethoden von TSE-Erregern bzw. Prionen bezogen.

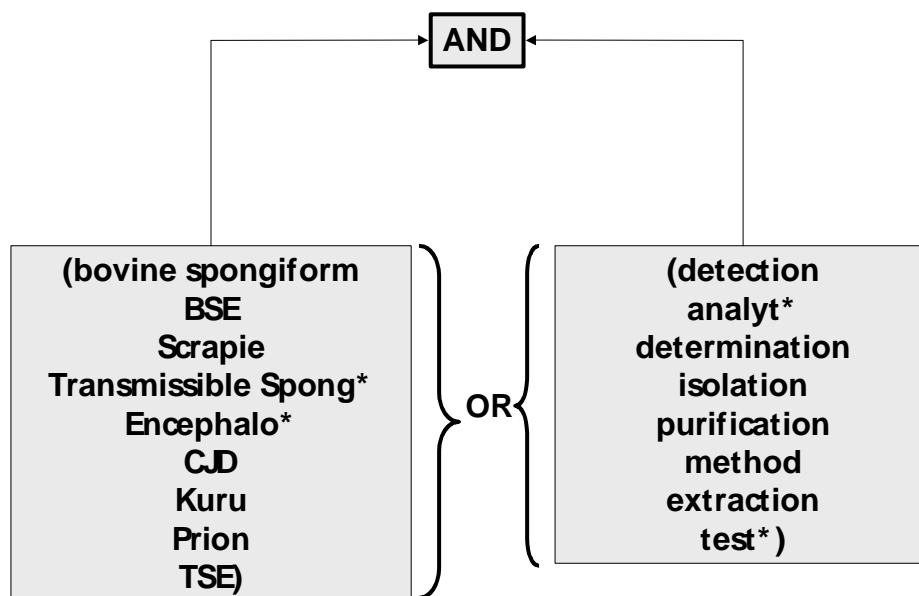


Abbildung 3-1: Suchroutine 1 zur Recherche in den entsprechenden Datenbanken

Mittels dieser Suchroutine wurden über 1500 Literaturzitate identifiziert, die sich auf Nachweismethoden des TSE-Erregers beziehen. Zur weiteren Auswertung wurden die Ergebnisse

- wenn möglich - auf Erstbeschreibungen und Review-Artikel weiter eingeschränkt, so dass ca. 50-70 Publikationen übrigbleiben, von denen die interessantesten ausgewertet wurden (Tabelle 3-1).

Die Sichtung der Literatur in Bezug auf Nachweismöglichkeiten der TSE-Erregers ergab, dass eine Vielzahl von Methoden für den Nachweis im Boden möglicherweise geeignet ist. Ein grundlegendes Problem stellt jedoch die Extraktion des Proteins aus der Matrix Boden dar. Aufgrund dessen wurde als zusätzliche Suchroutine gezielt nach Literatur gesucht, die sich mit dieser Thematik auseinandersetzt (Abbildung 3-2). Allerdings war die Literaturrecherche nur bedingt erfolgreich, da die meisten Publikationen auf Proteinisolationen aus im Boden lebenden Mikroorganismen eingehen. Der hier verfolgte Ansatz ging aber primär davon aus, dass das entsprechende Protein in isolierter Form dem Boden zugesetzt wurde, so dass auch auf Lehrbücher der Biochemie bzw. der Bodenkunde eingegangen wurde. Die Veröffentlichungen, die näher ausgewertet wurden, gehen auf die Isolierung einzelner Enzyme ein, die von Mikroorganismen in den Boden abgeben wurden.

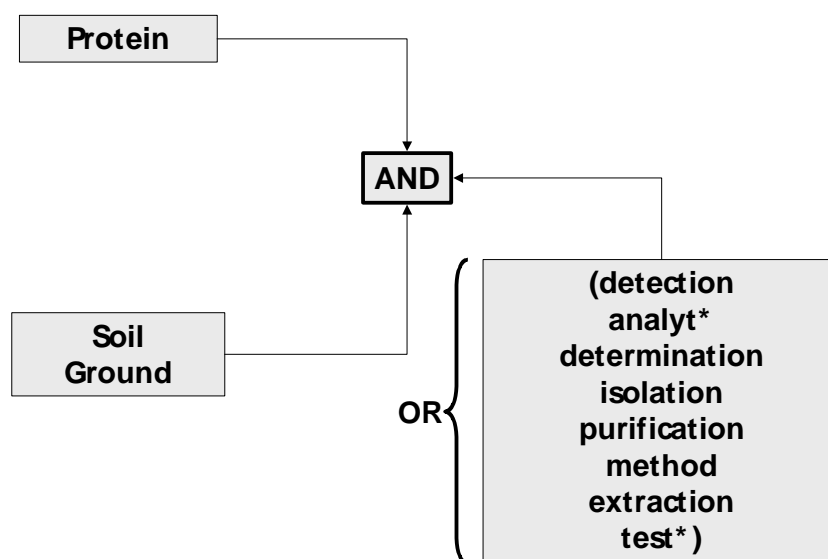


Abbildung 3-2: Suchroutine 2 zur Recherche in den entsprechenden Datenbanken

Allerdings werden hier meist Methoden beschrieben, die darauf abzielen, die Funktion des Enzyms zu erhalten, so dass also lediglich milde Extraktionsbindungen zu deren Isolierung eingesetzt wurden. Aufgrund der hohen Resistenz des pathogenen PrP ist eine derartige Verfahrensweise jedoch nicht notwendig.

3.1 Literaturlauswertung

Nachfolgend sind einige wichtige Publikationen tabellarisch aufgelistet:

Tabelle 3-1: Kurzdarstellung der ausgewerteten Literatur nach Suchroutine 1

Literatur	Titel	Nachweismethode
Barclay et al.,[5]	Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry	Flow Cytometrie
Bodemer, [6]	The use of monoclonal antibodies in human prion disease	Review-Artikel über monoklonale Antikörper
European Commission, [7]	The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines	WB, ELISA, DELFIA
Foster et al.,[8]	Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie	PrP-Antikörper
Glover et al.,[9]	Preparation of insoluble transmembrane peptides: Glycophorin-A, Prion (110-137), and FGFR (368-397)	Messung mittels Massenspektrometrie (MS)
Harmeyer et al.,[10]	Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants	PrP-Antikörper
Hornemann et al.,[11]	Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization	PrP-Aufreinigung
Kascsak et al.,[12]	Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibrils proteins	Immunoblot; 3F4-Antikörper

Literatur	Titel	Nachweismethode
Korth et al.,[13]	Monoclonal antibodies specific for the native, disease-associated isoform of the prion protein	PrP-Antikörper
Korth et al.,[14]	Prion (PrP ^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody	Immunoblot, 6H4-Antikörper, 15B3-Antikörper
Krasemann et al.,[15]	Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP (0/0) mice	Immunoblot
Mac Gregor,[16]	Prion protein and developments in its detection	Review, Nachweismethoden
Madec et al.,[17]	Sensitivity of the Western blot detection of prion protein PrPres in natural sheep scrapie	Immunoblot; RS1-Antikörper
Meyer et al.,[18]	Detection of bovine spongiform encephalopathy-specific PrP(Sc) by treatment with heat and guanidine thiocyanate	PrP-Aufreinigung und Nachweis
Müller et al.,[19]	Novel approaches in diagnosis and therapy of Creutzfeldt Jakob disease	protein fast microplate assay
Nemoto et al.,[20]	Detection methods of possible prion contaminants in collagen and gelatin	Immunoblot; B-103-Antikörper
Oesch et al.,[21]	Application of Prionics' Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs	Immunoblot, 6H4-Antikörper
Riesner et al.,[22]	Disruption of Prion Rods generates 10-nm spherical particles having high α -helical content and lacking Scrapie infectivity	Immunoblot, 3F4-Antikörper
Rubenstein et al.,[23].	Identification of a highly immunogenic site on the murine Prion Protein	Immunoblot; selbst hergestellter Antikörper

Literatur	Titel	Nachweismethode
Saborio et al.,[24]	Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding	Immunoblot; 3F4-Antikörper
Schaller et al.,[25]	Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrP ^{Sc} detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE)	Immunoblot; 6H4-Antikörper
Schmerr et al.,[26-28]	Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy	fluoreszenzmarkierte Peptide
Shaked et al.,[29]	A Protease resistant prp isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases	Immunoblot; 3F4-Antikörper; 6H4-Antikörper
Takahashi et al.,[30]	Purification of scrapie agent from infected animal brains and raising of antibodies to the purified fraction	Aufreinigung von PrP ^{Sc} und Antikörperentwicklung
Vorberg et al.,[31]	A novel epitope for the specific detection of exogenous prion proteins in transgenic mice and transfected murine cell lines	PrP-Antikörper
Wadsworth et al.,[32]	Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay	sensitiver Immunoblot; 3F4-Antikörper
Weiss et al.,[33]	RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP	RNA-Aptamer-Technologie
Will et al.,[34]	A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK	CJD-Nachweis
Winkler et al.,[35]	Confocal fluorescence coincidence analysis: an approach to ultra high-throughput screening	Nachweis mittels konfokaler Fluoreszenz

Literatur	Titel	Nachweismethode
Winklhofer et al.,[36]	A sensitive filter retention assay for the detection of PrP(Sc) and the screening of anti-prion compounds	Anreicherung von PrP auf Membranen
Yokohama et al.,[37]	Preparation and characterization of antibodies against mouse prion protein (PrP) peptides	Antikörper
Zanusso et al.,[38]	Prion Protein expression in different species: analysis with a panel of new mAbs	Immunoblot; 2F8, 5B2, 6G9, 8C6, 8H4, und 9H7-Antikörper

Tabelle 3-2: Kurzdarstellung der ausgewerteten Literatur nach Suchroutine 2

Literatur	Titel	Nachweismethode
Alef,[39]	Methodenhandbuch Mikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung	Methoden allgemein
Cherif et al.,[40]	Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by <i>Bacillus thuringiensis</i> BMG1.7, a new strain isolated from soil.	Proteinaufreinigung, Matrix Boden
Gomes et al.,[41]	Purification of a thermostable endochitinase from <i>Streptomyces</i> RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi	Proteinaufreinigung, Matrix Boden
Ishimoto et al.,[42]	Screening and characterization of trehalose-oleate hydrolyzing lipase	Proteinaufreinigung, Matrix Boden
Lottspeich et al.,[43]	Bioanalytik	Proteinbiochemische Methoden
Petinate et al.,[44]	Purification and partial characterization of an extracellular serine-proteinase of <i>Streptomyces cyaneus</i> isolated from Brazilian cerrado soil	Proteinaufreinigung, Matrix Boden
Schinner et al.,[45]	Bodenbiologische Arbeitsmethoden	Methoden allgemein
Sheedy et al.,[46]	Immunoaffinity purification of chlorimuron-ethyl from soil extracts prior to quantitation by enzyme-linked immunosorbent assay	Proteinaufreinigung, Matrix Boden
Topp et al.,[47]	Characterization of S-triazine herbicide metabolism by a <i>Nocardioides</i> sp. isolated from agricultural soils	Proteinaufreinigung, Matrix Boden

Tabelle 3-3: Patent-Offenlegungen bzw. -Veröffentlichungen bezüglich Prionen-Nachweisen (auszugsweise)

Titel	Patent-Nummer	Anmelder	Offenlegungstag/ Veröffentlichungstag
A method for the determination of transmissible spongiform encephalopathies in mammals [48]	WO 01/38880 A1	Wallac Oy, FI	(V) 31.05.2001
Assay for disease related conformation of a protein and isolating the same [49]	US 6,214,565	University of California, USA	(V) 10.04.2001
Detection of CNS disease [50]	EP 0694166 B1	Minister of Agriculture, Fisheries and food, London, GB	(V) 30.06.1999
Diagnosis of spongiform or demyelinating disease [51]	EP 1064555A2	King's College, University of London, GB	(O) 3.10.2001
Antibodies specific for native PrP ^{Sc} [52]	EP 102517A2	The Scripps Research Institute (La Jolla, CA)	(V) 18.09.2001
Method for chromatographic removal of prions [53]	USA 5,808,011,	Biopure Corporation, Massachusetes, USA	(V) 15.09.1998
Method for detection of prion diseases [Schreuder, 1997 #116]	WO 9737227	Stichting Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid (ID-DLO), Lelystad, NL	(V) 10.09.1997
Method of separating prions from biological materials [54]	WO 01/38354 A1	Bayer Corporation, Pennsylvania, USA	(V) 31.05.2001
Monoclonal antibodies and cocktail for detection of prion protein as an indication of transmissible spongiform encephalopathies [55]	US 6,261,790	Secretary of Agriculture, USA	(V) 17.07 2001

Titel	Patent-Nummer	Anmelder	Offenlegung/ Veröffentlichungstag
Optical sensor unit and procedure for the ultrasensitive detection of chemical or biochemical analytes [56]	EP 0886141 A1	C.S.E.M. Centre Suisse D'Electronique Et De Microtechnique SA, Neuchatel, CH	(V) 23.12.1998
Prion Test (Garssen, 2000)	EP 1151305	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, NL	(V) 07.11.2001
Procedure and instrumentation for the ultrasensitive detection of prions, prion binding bio molecules and other bio molecules [57]	EP 0887645 A1	C.S.E.M. Centre Suisse D'Electronique Et De Microtechnique SA, Neuchatel, CH	(V) 31.12.1998
Removal of prions from blood, plasma and other liquids [58]	US 6,221,614	The Regents of the The Regents of the University of California, USA	(V) 24-04.2001
Synthetic polypeptide for diagnosing and treating prion-related diseases [59]	WO 99/15651	Prionics AG, CH	(V) 01.04.1999
Method of concentrating prion proteins in blood samples [60]	US 6,166,187	The Regents of the University of California	(V) 26.12.2000
Method and kit for extracting prion protein [61]	US 6,150,172	The United States of America as represented by the Secretary of (Washington, DC)	(V) 21.11.2000
Method of diagnosis transmissible spongiform encephalopathies [62]	DE 19918141	Boehringer Ingelheim Vetmed (DE)	(V) 26.10.2000

4 Nachweisverfahren

4.1 Stand in der TSE-Diagnostik

Die existierenden Nachweisverfahren können in *in vitro*- und *in vivo*-Verfahren unterteilt werden. In den vergangenen Jahren wurde zum einen massiv an der Entwicklung von Tests - vor allem von BSE-Tests - am lebenden Tier gearbeitet sowie zum anderen an der Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit bestehender Methoden.

Von Bedeutung ist hier insbesondere die Detektion von pathogenen Prion-Proteinen in Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin. Verschiedene in der Entwicklung befindliche Nachweismethoden verfolgen den Ansatz, nicht die pathogenen PrP selbst zu identifizieren, sondern versuchen, Marker zu analysieren, die infolge einer TSE-Infektion nachweisbar sind. So soll frühzeitig eine Infektion am lebenden Tier erkennbar sein.

Einen derartigen Ansatz verfolgt z.B. die Gruppe um Prof. Bering, der in den Medien mitteilte (ZDF, Heute-Journal 28.11.2001, 21:45 Uhr), dass eine deutsche Forschungsinitiative ein Verfahren in den USA zum Patent angemeldet hat, das den Nachweis einer BSE-Infektion in einer sehr frühen Phase - vor Ausbruch klinischer Symptome - möglich macht. Das Verfahren beruht auf dem Nachweis spezieller mRNA, die infolge der TSE-Infektion hochreguliert wird und so im Blut betroffener Tiere nachweisbar ist. In Hinblick auf das laufende Projekt ist eine derartige Methode allerdings nicht geeignet. Die Messung von mRNA ist nur am lebenden Tier möglich. Kontaminationen im Boden durch Prionen sind auf diese Weise nicht nachweisbar, da im Boden eingetragene RNA - beispielsweise durch Urin - nur kurze Zeit stabil bleibt und schnell durch Nukleasen abgebaut wird.

Auch der von der Firma Boehringer zur Zeit entwickelte BSE-Blut-Test beruht auf der Analytik spezieller Marker, die durch Proteasen sehr schnell abgebaut werden, so dass derartige Tests zwar am lebenden Tier erfolgreich eingesetzt werden können, hinsichtlich der Bodenanalytik jedoch keine Relevanz haben. Eine Übersicht über zur Zeit verwendete Markermoleküle gibt Tabelle 4-1.

Die Literaturstudie sowie eigene Voruntersuchungen zeigen, dass der einzige Nachweis, der für die Bodenanalytik erfolgreich sein kann, der direkte Nachweis des pathogenen Prion-Proteins selbst

darstellt. Hier sind die eingangs beschriebenen biochemischen Eigenschaften des pathogenen PrP von großer Bedeutung. Gerade die hohe Resistenz gegen Proteinasen führt dazu, dass das PrP vermutlich eine lange Verweildauer im Boden hat und aufgrund dessen mit entsprechenden Methoden isoliert und analysiert werden könnte. Tabelle 5-2 zeigt u.a. die Nachweisgrenzen auf, die durch verschiedene Methoden ermittelt wurden. Mit diesen Verfahren ist es momentan nicht möglich, eine großflächige TSE-Kontamination im Boden routinemäßig nachzuweisen, ausgenommen vielleicht direkte Kontaminationen durch bspw. Plazentarrückstände Scrapie-infizierter Schafe. Die aufgeführten Methoden sind allerdings auf die Matrix Boden adaptierbar, da unabhängig der Methode die Isolation des Erregers im Vordergrund steht. Insofern ist klar, dass auch im laufenden Projekt primär Möglichkeiten identifiziert werden müssen, die eine Isolation und Aufreinigung im Boden vorkommender PrP^{Sc} erlauben. Die momentane Entwicklung zu empfindlicheren Nachweismethoden ist ebenfalls vorteilhaft für den Einsatz im Boden, da in absehbarer Zeit geringere Protein-Mengen analysierbar sind und so eventuell die Detektion von TSE-Erregern im Boden möglich ist.

Ein weiteres Testverfahren das von der Arbeitsgruppe des Züricher Prionenforschers Aguzzi entwickelt wurde, basiert auf dem Nachweis von Plasminogen, einem Protein, das spezifisch an PrP^{Sc} bindet und dadurch zur Erkennung einer TSE-Infektion eingesetzt werden kann [63-65]. Allerdings ist auch der Nachweis dieses Protein zur Detektion einer TSE-Kontaminationen im Boden nicht einsetzbar.

Im folgenden werden die Nachweismethoden aufgeführt, die zur Zeit auf dem Markt sind bzw. entwickelt werden, wobei anschließend nur die Methoden näher erörtert werden, die generell für den Einsatz im Boden geeignet sind.

4.2 Histologie

Die histologische Untersuchung des Gehirns repräsentiert nach wie vor die Basis für die Diagnostik einer TSE-Infektion. Die Histologie zeigt, dass bei allen TSE-Erkrankungen die Vakuolisierung von Nervenzellen im Vordergrund steht. Diese Schädigungen der Nervenzellen führt zu den typischen schwammartigen Degenerationserscheinungen des Gehirnparenchyms [66].

Darüber hinaus sind bei dieser Art der Erkrankungen unterschiedlich stark ausgeprägte Gliazellreaktionen zu erkennen [66, 67].

Weiterhin stellt die Isolation der sogenannten SAF (Scrapie Associated Fibrils) eine zwar aufwendige, jedoch klassische Untersuchungsmethode dar. Die im Gehirnparenchym gefundenen Amyloidfibrillen - die mit den SAF identisch sind - bestehen aus der Akkumulation eines Glycoproteins, das später als das eigentliche Prion-Protein bekannt wurde. Bei einigen TSE-Erkrankungsformen bilden diese SAF deutliche Amyloidplaques, die durch Amyloidfärbungen mit bspw. Kongorot nachweisbar sind. Allerdings sind derartige Amyloidplaques bei Scrapie und BSE relativ selten, so dass hier dieser Nachweis oftmals nicht funktioniert.

4.3 Immunohistochemie

Die immunohistochemische Analyse der Paraffinschnitte von Gehirn-Präparaten ermöglicht zuverlässig den Nachweis der Akkumulationen des Proteinase K-resistenten PrP. Zur Detektion werden entsprechende mono- bzw. polyklonale Antikörper verwendet, die gegen PrP gerichtet sind und so die Anhäufungen des Prion-Proteins im Gehirn mikroskopisch sichtbar machen.

4.4 Liquordiagnostik

Unter den existierenden TSE-Nachweisverfahren am lebenden Individuum stellt die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis (Liquor) ein relativ sensitives Verfahren dar (Tabelle 5-2). Hierbei werden im Liquor biochemische Marker untersucht, die einen Verdacht auf eine TSE-Erkrankung untermauern. Andere Marker, wie z.B. das Tau-Protein als Bestandteil der intrazellulären Neurofibrillen oder die hirnspezifische Isoform der Kreatinkinase (CK-BB) wurden bei TSE-Infektionen in veränderten Konzentrationen gefunden [68-70]. In Bezug auf die Diagnostik einer möglichen TSE-Kontamination des Bodens sind - trotz der teilweise hohen Sensitivität - derartige Methoden aufgrund der oben angegebenen Gründe nicht geeignet.

Tabelle 4-1: Übersicht über diagnostische Möglichkeiten bei der CJD-Diagnostik

Markerprotein ¹	Verfahren	Sensitivität	Spezifität
14-3-3	Westernblot	96 %	87 %
p130/131	2D-Gelelektrophorese	88%	100%
Neuronenspezifische Enolase NSE a) im Liquor b) im Serum	ELISA	a) 80 % b) 84 %	a) 92 % b) nicht angegeben
S100b a) im Liquor b) im Serum	a) ELISA b) LIA	a) 84 % b) 78 %	91 % 81 %

¹[68, 70-73]

4.5 Bioassay

Das Bioassay bezeichnet einen biologischen Funktionstest, bei dem der Nachweis von Infektiosität durch die Injektion des zu untersuchenden Materials in die Gehirne von Empfängertieren gemessen wird. Die meisten Daten, die in Bezug zur Infektiosität von TSE gewonnen wurden, sind auf Bioassays mit der Maus zurückzuführen. Erst durch diese Versuche war es möglich, schneller Daten betreffend der TSE-Erkrankungen zu erhalten. Allerdings benötigte man auch hierbei ca. 12 Monate bis die Ergebnisse der Endpunkttitration vorlagen. Außerdem wurden aus statistischen Gründen jeweils ca. 60 Mäuse analysiert, so dass diese Studien teuer und langwierig waren [3]. Inzwischen werden vermehrt syrische Goldhamster oder transgene Mäuse im Bioassay verwendet. Beim syrischen Goldhamster (SHa) reichen schon ca. 70 Tage nach intrazerebraler Inokulation zur Endpunkttitration aus, so dass sich die Untersuchungszeiträume um den Faktor 5 verkürzen. Ebenso von Bedeutung ist, dass statt 60 Tieren lediglich vier Hamster benötigt werden [3].

4.6 Prion-Protein-Nachweis

Beim lebenden Menschen bzw. Tier konnte bisher nur die zelluläre Form des Prion-Proteins (PrP^C) sowohl im Liquor als auch in Leukozyten und Thrombozyten nachgewiesen werden [4]. Tabelle 4-2 zeigt die Organe bzw. die Gewebe, in denen mittels Bioassay TSE-Infektionen nachweisbar waren. Der Bioassay-Nachweis war bis zur Entwicklung entsprechender Antikörper die einzige Möglichkeit, das Vorhandensein pathogener Prion-Proteine indirekt zu belegen. Zum Nachweis der Persistenz des Erregers im Boden wurde 1991 von Brown und Gajdusek nur dieses Bioassay angewandt. Inzwischen wurde eine Vielzahl von Antikörpern entwickelt, die zum Nachweis der Prionen direkt angewendet werden und bei entsprechender Extraktion zum Einsatz gelangen können. Derartige immunologische Methoden sind zur Zeit die Methode der Wahl bei kommerziell erhältlichen „BSE-Test-Kits“. Das Prinzip funktioniert bei allen Verfahren aufgrund der Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei die Umsetzung zum einen mittels ELISA, DELFIA oder Westernblot erfolgt.

Die Tabelle 4-2 zeigt, dass u.a. in der Niere und damit auch im Urin keine Infektiosität durch Bioassays nachweisbar war. Dem entgegen steht die Veröffentlichung von Shaked et al. [29]. Die israelische Arbeitsgruppe um Ruth Gabizon konnte zeigen, dass im Urin TSE-kranker Hamster, Rinder sowie Menschen pathogene Prion-Proteine nachweisbar sind. Die Analytik erfolgte in diesem Fall immunologisch mittels Westernblot. Die konträren Ergebnisse zeigen die Diskrepanz zwischen Bioassay und direktem Nachweis des pathogenem PrP. Die Ergebnisse von Shaked et al. bedeuten aber auch, dass durchaus eine Kontamination der Umwelt z.B. durch Fäkalien gegeben ist. Der immunologische Nachweis in dieser Veröffentlichung erfolgte mittels der Antikörper 3F4 sowie 6H4. Aufgrund der eingangs erwähnten hohen Homologie des PrP zwischen den verschiedenen Spezies sind die Antikörper geeignet, durch Kreuzreaktion Prion-Proteine in zahlreichen Spezies zu erkennen.

Tabelle 4-2: Erregertiter (nach Bioassay in der Maus) in Geweben von Scrapie-infizierten Schafen bzw. Ziegen mit Scrapie-Symptomen, verglichen mit den Titern in Geweben von BSE-Kühen

Infektionskategorie	Erregertiter Scrapie-infizierte Schafe	Erregertiter Scrapie-infizierte Ziegen	Erregertiter BSE-infizierte Rinder
Kategorie I (hohe Infektiosität)			
- Hirn	5,6	6,5	5,3
- Rückenmark	5,4	6,1	positiv
- Augen (Retina)	na	na	positiv
Kategorie II (mittlere Infektiosität)			
- Ileum	4,7	4,6	<2,0
- Lymphknoten	4,2	4,8	<2,0
- Proximales Kolon	4,5	4,7	<2,0
- Milz	4,5	4,5	<2,0
- Tonsillen	4,2	5,1	<2,0
Kategorie III (niedrige Infektiosität)			
- Nervus ischiadicus	3,1	3,6	<2,0
- Distales Kolon	<2,7	3,3	nd
- Thymus	2,2	<2,3	<2,0
- Knochenmark	<2,0	<2,0	<2,0
- Leber	<2,0	nd	<2,0
- Lunge	<2,0	<2,1	<2,0
- Pankreas	<2,1	nd	
Kategorie I (nicht messbare Infektiosität)			
- Blutleukozyten	<1,0	<1,0	<1,0
- Herzmuskel	<2,0	nd	<2,0
- Niere	<2,0	<2,0	<2,0
- Euter	<2,0	<2,0	<2,0
- Milch	nd	<1,0	<2,0
- Serum	nd	<1,0	<1,0
- Skelettmuskel	<2,0	<2,0	<2,0
- Hoden	<2,0	nd	<2,0

na = nicht angegeben; nd = nicht nachweisbar [4],

Die Palette der inzwischen zum Prionen-Nachweis verwendeten Antikörper sind im folgenden z.T. aufgeführt.

Tabelle 4-3: Antikörper zur Prionen-Diagnostik

Antikörper	Anwendungen	Referenz
3F4	IHC, WB, ELISA, FACS	[12]
FH11	IHC, WB, ELISA, FACS	[8]
KG9	IHC/WB	[34]
6H4	IHC, WB, ELISA, FACS	[14]
15B3	PrP ^{Sc} spezifisch mittels IP	[14]
L42	WB nur für PrP ^C	[10]
E31		[31]
8H4	WB, IHC, IEM	[38]

WB = Westernblotting, IHC = Immunohistochemie, ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting, IEM = Immuno Electron Microscopy, IP = Immunopräzipitation

Zwar sind, wie Tabelle 4-3 deutlich macht, zahlreiche Antikörper vorhanden, allerdings sind diese nicht in der Lage, zwischen pathogenem und zellulärem PrP zu differenzieren, so dass das zelluläre PrP zuvor durch Proteinase K-Verdau zerstört werden muss. Lediglich der von Prionics entwickelte Antikörper - 15B3 - [14] ist in der Lage, zwischen den beiden PrP-Formen zu differenzieren und kann somit zum direkten Nachweis der pathogenen Prionen eingesetzt werden. Allerdings ist dieser Antikörper zur Zeit nicht käuflich zu erwerben.

5 BSE-Schnelltests

Zur Durchführung der bisher auf dem Markt erhältlichen BSE-Schnelltests wird eine Gewebeprobe aus einem genau definierten Bereich des Gehirns entnommen und homogenisiert. Je nach Test-System erfolgt die Homogenisierung in speziellen detergenzienhaltigen Puffern, deren Zusammensetzung nach Auskunft von Prionics und Bio-Rad Firmengeheimnisse darstellen.

Insgesamt wurden 1999 Verfahren von vier Firmen/Organisationen seitens der EU validiert [7]. Die getesteten Verfahren sind in Tabelle 5-1 aufgeführt. Der große Nachteil aller bisher im Einsatz befindlichen immunologischen Nachweisverfahren ist deren Beschränkung auf die Untersuchung von toten Tieren. Aus diesem Grunde wird zur Zeit mit Hochdruck an Testsystemen gearbeitet, die den Nachweis einer Infektion z.B. in Blutproben ermöglichen. Ein positiver BSE-Befund wird derzeit an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV, Tübingen), in der das Nationale BSE-Referenzlabor integriert ist, bestätigt. Die Referenzmethode beruht auf der Isolierung und Anreicherung des pathologischen Prion-Proteins. Nach einer Proteinase K-Behandlung erfolgt die Auftrennung mittels SDS-PAGE und der Nachweis im Westernblotting durch einen monoklonalen Antikörper unter Einbeziehung verschiedener Kontrollmarker.

Tabelle 5-1: Von der EU-Kommission ausgewählte Testverfahren

Test	Entwicklung/Hersteller
A	E.G. & G. Wallac Ltd, United Kindom
B	Prionics AG, Switzerland
C	Enfer Technology Ltd, Ireland
D	Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), France (von Bio-Rad vermarktet)

Im Frühjahr 2001 durchliefen fünf weitere bzw. verbesserte BSE-Testsysteme die EU-Evaluierung, wobei nun auch die Firma Prionics ein auf einem ELISA-basierenden Schnelltest zugrunde liegendes Verfahren validieren ließ. Auf dieses Verfahren wird im folgenden noch eingegangen werden. Die Validierungsergebnisse für die fünf Untersuchungen liegen derzeit noch nicht vor.

In Deutschland werden vorwiegend der auf dem ELISA-Prinzip basierende Platelia BSE-Test der Firma Bio-Rad (entwickelt am französischen Commissariat à l’Energie Atomique/CEA) sowie der auf Westernblot-Verfahren basierende Prionics Check-Test der Firma Prionics eingesetzt. Sowohl der Test der Firma Prionics als auch der Bio-Rad-Test wurde als sehr spezifisch und sensitiv beurteilt.

5.1 Westernblot

Die PrP-Nachweismethode mittels Westernblot wird in sehr großem Maßstab europaweit angewendet. Die PrP werden aus Gewebeproben mit Detergenzien extrahiert und anschließend mit Proteinase K behandelt, um pathogenes von zellulärem PrP zu unterscheiden. Die Auftrennung und der Nachweis erfolgt anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblotting, wobei die aufgeführten Antikörper verwendet werden können (Tabelle 4-3). Die Literaturrecherche ergab, dass in den meisten Fällen die Antikörper 3F4 und 6H4 verwendet werden. Bei dem 6H4-Antikörper handelt es sich um den Antikörper, der von Prionics auch in dem kommerziellen BSE-Test-Kit „Prionics-Check“ vertrieben wird (Abbildung 5-1). Vorteilhaft an der Westernblot-Methode ist, dass die Information über die

Verkürzung von PrP^{Sc} zu PrP27-30 aufgrund der Proteinaseresistenz erhalten bleibt. Das Testschema der Firma Prionics ist im folgenden kurz aufgeführt:

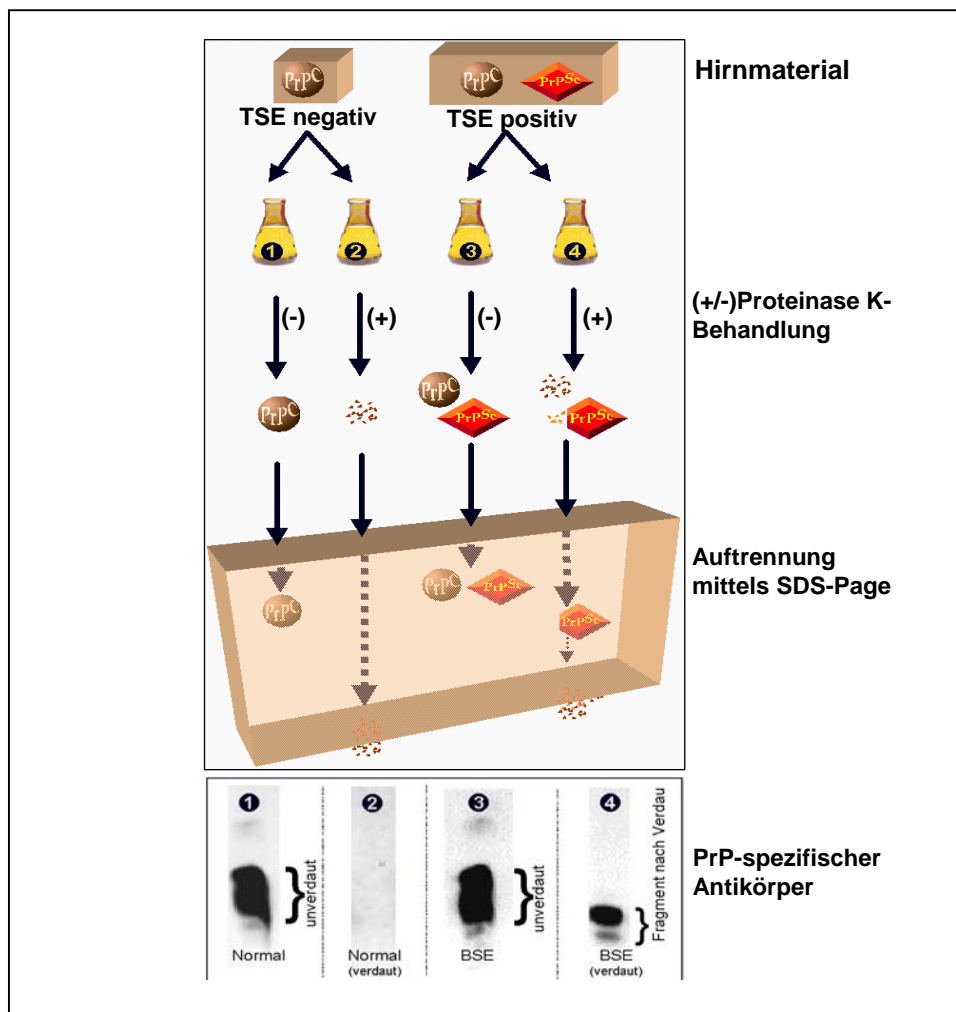


Abbildung 5-1: Testprinzip des Prionics Check, verändert nach Prionics AG, Schweiz

Die Detektion des Testsignals erfolgt mittels Horse-Raddish-Peroxidase gekoppeltem 2. anti-Maus Antikörper durch ECL-Entwicklung (Enhanced Chemiluminescence). Das Nachweisverfahren benötigt - inklusive Probenvorbereitung - ca. 6-8 Stunden. Der Prionics Check ist in der Schweiz der am häufigsten durchgeführte BSE-Test und wird europaweit von Roche Diagnostics vertrieben.

5.2 ELISA-Assay (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

In Deutschland basiert der Großteil aller Tests, die an den Chemischen Untersuchungsanstalten und Veterinäruntersuchungsämtern durchgeführt werden, auf dem ELISA-Verfahren der Firma Bio-Rad. Die Sensitivität und Spezifität ist vergleichbar mit der des Westernblot-Verfahrens.

Es gibt verschiedene ELISA-Verfahren, die zur TSE-Diagnostik angewendet werden können. Die ELISA-Methoden basieren auf einem Testverfahren, das Antigene oder Antikörper mittels eines Enzym-markierten Antikörpers (Konjugat) und einer dadurch katalysierten Farbreaktion semi-quantitativ nachweist. Prinzipiell kann zwischen vier ELISA-Verfahren unterschieden werden, wobei eine Sonderform der sogenannte „Strip ELISA“ darstellt. Dieser Strip-Test könnte, bei entsprechender Modifizierung, als BSE-Test verwendet werden.

- **Sandwich-ELISA**
- **Kompetetiver ELISA**
- **Indirekter Ab-ELISA**
- **Strip-ELISA**

Vorteilhaft an allen ELISA-Verfahren ist die schnelle Durchführung. Der ELISA-Nachweis benötigt mit 4 Stunden (der Strip-ELISA ca. 1 h) eine deutlich geringere Nachweiszeit als der entsprechende Westernblot-Nachweis. Aufgrund der Möglichkeit zur Automatisierung ist mit dem ELISA-Verfahren ein wesentlich höherer Probendurchsatz möglich.

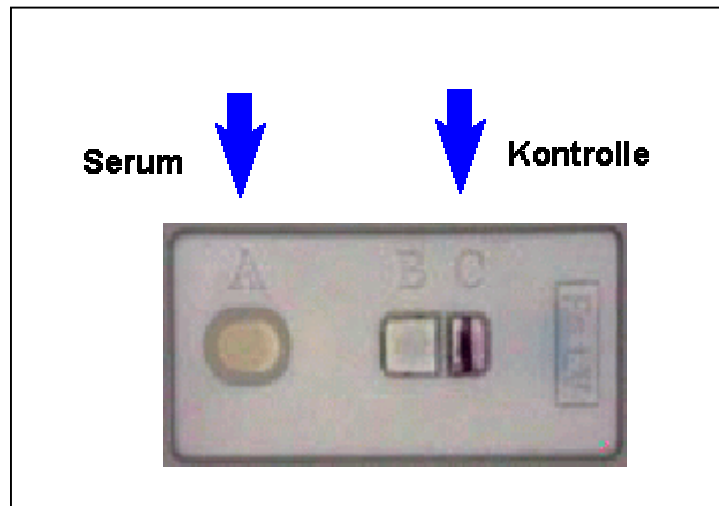


Abbildung 5-2: Darstellung des Strip-ELISA

Der Strip-ELISA funktioniert nach folgendem Prinzip: Auf eine Membran, die mit Antikörpern, Enzym und Substrat vorbeschichtet ist, wird Testserum pipettiert (Abbildung 5-2). Die Flüssigkeit läuft von A über B nach C. Ist das Serum positiv, ergibt sich eine Farblinie im Bereich B (www.vu-wien.ac.at/i123/allvir/ELISA1.html).

Beim Sandwich-ELISA wird ein Antikörper an eine feste Phase (Kunststoff oder vorbehandeltes Glas) gebunden. Anschließend werden durch einen Blockierungsschritt alle weiteren freien Bindungsstellen der festen Phase belegt und die überschüssigen Antikörper abgewaschen. Der von der Firma Bio-Rad vertriebene Platelia BSE-Test basiert auf dieser Methode. Bei diesem Sandwich-ELISA-Verfahren wird mittels monoklonalem Antikörper das Proteinase K-resistente Fragment (PrP 27-30) des pathologischen PrP^{Sc} nachgewiesen. Das normale Prion-Protein PrP^C wird zuvor durch die Proteinase K-Behandlung vollständig zerstört. Die Detektion der anschließenden immunoenzymatischen Reaktion erfolgt mit Hilfe von Absorptionsmessungen im UV-Spektrometer, meist in 48er- oder 96er-Kavitäten.

Auf einem Hochdurchsatz-Chemolumineszenz-ELISA basiert der Test der in Irland ansässigen Firma Enfer Ltd. Der Enfer-Test wird hauptsächlich in Irland angewendet und wurde 1999 von der Europäischen Kommission erfolgreich validiert [7]. Das Verfahren ermöglicht die Analyse einer BSE-Infektion in weniger als 4 Stunden und wurde zusammen mit der britischen Firma Protherics PLC entwickelt. Zur Detektion wird allerdings ein polyklonales Antiserum eingesetzt, was in Bezug auf

Standardisierung und die Garantie eines dauerhaften Qualitätsniveaus wenig vorteilhaft ist. Darüber hinaus ist es aufgrund der geringen Verbreitung kaum möglich, über diesen Test nähere Informationen zu erhalten. Auch ist die Firma Enfer Ltd im Internet nicht präsent, was die Recherche zusätzlich erschwert. Der Test soll nach Angaben von Protherics von Abbott Laboratories vertrieben werden.

Der Test der Firma E.G. & G. Wallac Ltd beruht auf einem zweiseitigen nicht-kompetitiven immunometrischen Test unter der Verwendung zweier verschiedener monoklonaler Antikörper. Die DELFIA-Technologie wird eingesetzt, um ein Signal zu generieren. Das analytische Verfahren kombiniert einen Probenaufbereitungsschritt mit einem Immunoassay. Die Validierung seitens der Europäischen Kommission [7] zeigte schlechte Werte in Bezug auf Sensitivität und Spezifität, so dass auf diesen Test nicht weiter eingegangen wird. E.G. & G. Wallac Ltd wurde mittlerweile von Perkin-Elmer übernommen und das Testverfahren nach eigenen Aussagen inzwischen stark verbessert.

5.3 Weitere immunologische Nachweisverfahren

Die Arbeitsgruppe von Stanley Prusiner veröffentlichte 1998 [74] ein Nachweisverfahren, das auf einem konformationsabhängigen Immunoassay beruht. Das Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus (Tabelle 5-2) und ermöglicht die Unterscheidung von acht verschiedenen Prionen-Stämmen, die im syrischen Goldhamster vermehrt wurden.

Tabelle 5-2: PrP^{Sc} –Nachweismethoden

Assay	Test-Prinzip	Test-Probe	Veröffentlichte Nachweisgrenze	Nachweisgrenze in ID ₅₀ ml ⁻¹
EG & G Wallac Ltd	DELFI A	BSE-Hirnhomogenat	10 ⁰ -Verdünnung	1 000 000
Prionics AG	WB	BSE-Hirnhomogenat	10 ⁰ -10 ⁻¹ Verdünnung	(1000*) 100 000-1 000 000
Enfer Ltd	ELISA	BSE-Hirnhomogenat	10 ^{-1.5} -Verdünnung	30 000
CEA (Bio-Rad)	ELISA	BSE-Hirnhomogenat	10 ^{-2.5} -Verdünnung	3 000
Conformation-dependent DELFIA [49]	DELFI A	Scrapie-infiziertes Hamster-hirnhomogenat	10 ⁻³	1 000
Capillary electrophoresis		Blut u. Hirn von Scrapie-Schafen und CWD-Elchen	135pg PrP ^{Sc} 5 pg PrP ^{Sc}	100-2500

Die Infektiosität von 1 ID₅₀ ist äquivalent zu 10⁵-Molekülen oder 5 fg PrP [15] (verändert nach [46]).

*Sensitiver mit Sedimentationsschritt

Diese aufgeführten Verfahren geben nur einen Überblick über verschiedene Verfahren, die jedoch über die bloße Entwicklung hinausgehen und validiert wurden bzw. zumindest eingehender getestet wurden. Die Ergebnisse der durchgeführten Recherche zeigen jedoch, dass eine Vielzahl weiterer Verfahren publiziert wurden und eine Vielzahl von Firmen an der Entwicklung von BSE-Tests beteiligt sind.

6 Literatur

Inzwischen sind unzählige Veröffentlichungen bezüglich der Nachweismethoden von TSE-Erkrankungen erschienen. Aufgrund des großen Umfangs kann auf diese nicht einzeln eingegangen werden. Auch die Anzahl der Firmen, die an der Entwicklung von BSE-Kits arbeiten, ist nicht mehr zu überschauen. Das gleiche gilt für Patentanmeldungen, Offenlegungen bzw. Veröffentlichungen. Insofern werden im nachfolgenden nur die Publikationen und Verfahren erwähnt, die neben den üblichen immunologischen Methoden neue Verfahren aufzeigen bzw. intensiver auf die Anreicherung bzw. Aufreinigung der Prion-Proteine eingehen.

6.1 Kapillar-Immuno-Elektrophorese

Das Kapillar Immuno-Elektrophorese-Assay (CIE, oder ICE) für PrP basiert auf den unterschiedlichen Bindungseigenschaften zwischen PrP und Fluoreszin-markiertem synthetischem PrP an spezifische Antikörper, die gegen diese Peptide gerichtet sind [26-28]. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip, dass vorkommendes PrP mit dem Fluoreszin-markierten synthetischen PrP um die Bindung an dem Antikörper konkurriert. Ist PrP im Ansatz anwesend, wird weniger Fluoreszin-gebundenes PrP angelagert, was mittels Laser-induziertem Fluoreszenz-Detektor gemessen wird. Mit diesem Verfahren können ungefähr 50 attomol analysiert werden, was ca. 1,5 pg PrP entspricht, so dass PrP-Konzentrationen im nanomolaren Bereich messbar sind. Damit ist dieses Verfahren zur Zeit eines der empfindlichsten. Zwischen normalem PrP und pathogenem PrP wird durch vorhergehendem Proteinase K-Verdau unterschieden. Mit dieser Technik wäre es u.a. möglich PrP^{Sc} im Blut Scrapie-infizierter Schafe nachzuweisen. Nach Angaben der WHO ist dieses Assay aufgrund der sehr hohen Empfindlichkeit möglicherweise geeignet, in der präklinischen Diagnostik von TSE-Erkrankungen eingesetzt zu werden [75].

6.2 Ruth Gabizon

Die Veröffentlichung der israelischen Arbeitsgruppe um Ruth Gabizon [29] verursachte im Sommer dieses Jahres einiges Aufsehen und wurde stark kritisiert. Auslöser war der Befund, dass die Arbeitsgruppe in einer relativ einfachen Art und Weise in der Lage war zu zeigen, dass eine PrP^{Sc}-Isoform im Urin TSE-kranker Hamster, Rinder und Menschen mittels Westernblot nachweisbar war.

Durch Dialyse und anschließender Zentrifugation konnte die Gruppe Urin aufreinigen und PrP sedimentieren. Die Sedimente wurden mit Natriumsarkosylat-Puffer resuspendiert und ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. Die entsprechenden Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Als Antikörper wurden die monoklonalen anti-PrP Antikörper 6H4 bzw. 3F4 eingesetzt.

Die Resultate führten aufgrund dessen zu den großen Diskussionen, da es vorher noch nie gelungen war, in Urin Prionen nachzuweisen. Die Brisanz, die sich dahinter verbirgt, ist klar: Wenn im Urin PrP^{Sc} nachweisbar ist, muss dies auch in den Nieren nachzuweisen sein, was vorher ebenfalls nie gelang. Die meisten Proteine gelangen über den Blutweg in die Niere, so dass dies bedeuten würde, dass auch im Blut PrP vorhanden ist. Die israelische Arbeitsgruppe spekulierte, dass PrP^{Sc} im Blut in nicht-aggregierter Form vorliegt und so den bisherigen Nachweismethoden entzogen war. Das Vorkommen im Blut bedeutet letztendlich aber auch, dass PrP^{Sc} z.B. im Muskelfleisch infizierter Rinder präsent sein könnte.

6.3 Protein Misfolding Cyclic Amplification

Auf den Nature-Artikel von Saborio et al., wird unter 7.16 genauer eingegangen.

6.4 Filter Retention Assay

Am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried hat die Arbeitsgruppe um Jörg Tatzelt eine Methode entwickelt, die neben der Proteinase K-Resistenz auch die Verklumpungsneigung von PrP^{Sc} nutzt [36]. In dem Verfahren wird mittels Filtration unlösliches PrP^{Sc} aus Gehirngewebe von BSE-Rindern isoliert, das dann direkt auf der Filtermembran nachgewiesen werden kann. Nach Angaben der Autoren ist - durch die Nutzung der beiden typischen biochemischen Eigenschaften von PrP^{Sc} - das Verfahren sensitiv und weniger anfällig für Messfehler; zudem ist ein großer Probendurchsatz gegeben. Ein Vorteil der neuen Methode ist weiterhin die Möglichkeit, größere Volumina von Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel Urin und Rückenmarksflüssigkeit, zu untersuchen und somit lebende Rinder auf BSE zu testen.

6.5 Weitere Literatur

In Bezug auf TSE-Nachweisverfahren sind in diesem Zusammenhang der Nachweis mittels Flow Cytometrie sowie die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) zu erwähnen. Beide Verfahren stellen interessante Möglichkeiten dar, sind aber bisher über die bloße Verfahrensbeschreibung nicht herausgelangt. Bei der FCS soll der Nachweis von fluoreszenzmarkierten Biomolekülen in Probenvolumen von Femto-Litern mittels konfokaler Laser-Illumination möglich sein [16].

7 Biotechnologiefirmen und Patente

Die Anzahl von Patenten sowie von Firmen, Organisationen und Forschungsinstituten bezüglich der Entwicklung eines Nachweisverfahren von TSE-Erkrankungen ist enorm. So sind allein in den USA über 100 Patente offengelegt bzw. veröffentlicht, die sich in irgendeiner Form mit dem Nachweis von BSE beschäftigen. Allein Stanley Prusiner hat weit mehr als 20 Patente auf diesem Gebiet angemeldet. Diese in ihrer Gesamtheit auszuwerten, ist nicht möglich, so dass nur einzelne erwähnt werden. Es zeigt sich, dass insbesondere die Entwicklung neuer Antikörper Ziel eines Schutzrechtes ist.

Die Europäische Kommission evaluiert momentan fünf weitere BSE-Tests von folgenden Firmen bzw. Organisationen¹:

- **ID-Lelystad (Niederlande)**
- **Imperial College of Science, Technology and Medicine (Großbritannien)**
- **The Institute of Neurodegenerative Diseases at the University of California, San Francisco (USA)**
- **Perkin-Elmer Life Sciences (Großbritannien)**
- **ELISA version of Prionics's test, Prionics (Schweiz)**

Detaillierte Informationen sind bezüglich dieser Tests – mit Ausnahme des ELISA-Verfahrens von Prionics - momentan nur begrenzt zu erhalten. Bei dem Test von ID-Lelystad handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein Verfahren, das zum Patent angemeldet wurde und ebenfalls auf immunologischen Methoden basiert [77]. Es ist davon auszugehen, dass diese Tests die Sensitivität der Nachweisverfahren beträchtlich erhöhen. Bei dem Test der Firma Perkin-Elmer handelt es sich vermutlich um das verbesserte Nachweisverfahren der Firma E.G & G. Wallac (Tabelle 5-1), das, wie

¹ [76]

erwähnt, von Perkin-Elmer übernommen wurde. Es ist aber kaum anzunehmen, dass es sich bei diesen Tests um *in vivo* Verfahren handelt, sondern lediglich um verbesserte Tests am toten Tier.

Inzwischen arbeiten mehr als 30 Biotechnologiefirmen an einem Test für TSE-Erkrankungen. In Tabelle 7-1 sind diejenigen aufgeführt, von denen bekannt ist, dass diese zur Zeit Methoden entwickeln. Die wirkliche Anzahl dürfte beträchtlich höher liegen.

Tabelle 7-1: An der Entwicklung von BSE-Tests beteiligte Firmen

Firma	Standort
Abbeymoy Ltd	Dublin, Ireland
ABC Research Corporation	Gainesville, FL, USA
Altegen Inc	Wilmington, DE, USA
Anonyx Inc	New York, NY, USA
Bayer Corp., Diagnostics Div.	Tarrytown, NY, USA
Bio-Rad Inc	Hercules, CA, USA
Boehringer Ingelheim Vetmedica	Ingelheim am Rhein, Germany
Caprion Pharmaceuticals	Montreal, QC, Canada
Celcus Inc	Cincinnati, OH, USA
Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique SA	Zürich, Switzerland
Commissariat à l'Energie Atomique	Cedex, France
Disease Sciences	Boca Raton, FL, USA
EG & G Wallac Ltd	Turku, Finland
Enfer Scientific Ltd	Tipperary, Ireland
Genesis Bioventures	Vancouver, BC, Canada
Haemosan	Ilz, Austria

Firma	Standort
Igen International Inc	Gaithersburg, MD, USA
Institute of Human Virology	Baltimore, MD, USA
Microsens Biophage Ltd	London, UK
National Veterinary Services Lab	Ames, IA, USA
NEN Life Science Products Inc	Boston, MA, USA
New York State Basic Research Institute for Neurological Disorders	Staten Island, NY, USA
Paradigm Genetics Inc	Research Triangle Park, NC, USA
PerkinElmer Life Sciences	Boston, MA, USA
Prion Developmental Laboratories	Buffalo Grove, IL, USA
Prionics AG	Zürich, Switzerland
Proteome Sciences	Cobham, Surrey, UK
Protherics	Cheshire, UK
Q-One Biotech	Glasgow, Scotland
Ruth Gabizon	Jerusalem, Israel
R-Biopharm	Darmstadt, Germany
Serono Pharmaceutical Research Institute	Zug, Switzerland
Svanova Biotech	Uppsala, Sweden
VI Technologies Inc	Watertown, MA, USA

Der Stand ist, dass - wie die Auflistung zeigt - eine große Anzahl von Firmen an der Entwicklung solcher Test beteiligt ist. Es sind jedoch nur vereinzelt nähere Informationen darüber erhältlich, welche Firmen diesbezüglich nun wirklich marktfähige Tests auf den Markt bringen werden.

Nachfolgend wird - wenn Informationen recherchierbar waren - auf die einzelnen Firmen eingegangen.

7.1 Abbeymoy Ltd

Abbeymoy entwickelt spezifische Methoden, um sehr geringe Mengen spezifischer Antigene zu detektieren. Die Methode soll insbesondere das „Hintergrund-Rauschen“ verringern, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Das System basiert auf einer spezifischen Trennung von PrP^C und PrP^{Sc} unter der Verwendung eines Faktors, der nur mit PrP^{Sc} interagiert. Weitere Details sind nicht veröffentlicht. Die Methode wird voraussichtlich als Teil bestehender Methoden diese verbessern.

7.2 ABC Research Corporation

ABC arbeitet nicht an einem direkten TSE-Nachweissystem, sondern an einem Nachweis von mit Hirnantteilen kontaminiertem Fleisch.

7.3 Altegen Inc

Die von Altegen entwickelte Methode die soll mit Antikörpern funktionieren, die mit einem sogenannten „Prionin“ interagieren, welches als ein Protein angesehen wird, das an der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} beteiligt ist. Altegen behauptet, dass dieses Prionin in Geweben vorkommt, an PrP^{Sc} bindet und zusammen mit diesem in das Hirn transportiert wird. Das Prionin hat ca. 50% Homologie mit dem Thyroid-Transkriptionsfaktor. Wenn der PrP^{Sc}-Prionin-Komplex in Hirnzellen gelangt ist, imitiert das Protein den Thyroid-Faktor und stimuliert die Bildung von Thyroid und Parathyroid Hormonen, welche normalerweise nicht im Körper expremiert werden und dadurch die betroffenen Zellen zerstören.

Der Altegen-Test sucht nach Antikörpern gegen dieses Prionin, welches nach deren Angaben in einem sehr frühen Stadium der Infektion expremiert wird. Der Test basiert auf einem ELISA-Verfahren. Allerdings sind bisher keine Veröffentlichungen über diesen Test vorhanden.

7.4 Bayer Diagnostics

Bayer berichtet, dass sie das bestehende Westernblot-Verfahren derart verbessert haben, dass nun der Nachweis des pathogenen Prion-Proteins in Blut- und Blutprodukten möglich ist. Der Nachweis basiert auf einer Blotting-Membran, auf der der monoklonale 3F4-Antikörper direkt gebunden ist. Die Detektion erfolgt mittels Chemilumineszenz und soll wesentlich schneller als z.B. der Prionics Westernblot-Test sein. Eine Vermarktung dieses Tests ist jedoch bisher nicht erfolgt.

7.5 Boehringer Ingelheim (Vetmedica)

Boehringer kündigte schon vor einem Jahr für den Sommer 2001 einen BSE-Bluttest an, der den Nachweis der Infektion am lebenden Tier ermöglichen sollte. Allerdings ist dieser Test bis heute nicht verfügbar. Das Verfahren soll darauf basieren, dass bestimmte Marker bei BSE-Infektionen stark erhöht sind, die im Blut nachgewiesen werden. So sollen spezielle Subpopulationen weißer Blutzellen Markerproteine exprimieren, die in gesunden Tieren nicht nachweisbar sind. Des Weiteren soll ein signifikanter Anstieg des Cytokins Interferon vorhanden sein. Einzelheiten sind im Patent von Boehringer beschrieben [62].

7.6 Caprion Pharmaceuticals Inc

Caprion hat einen Zelloberflächen-Rezeptor - das Protocadherin-2 – identifiziert, welches zur Familie der Zell/Zell-Adhäsionsproteinen gehört. Dieses Cadherin soll einen Rezeptor für PrP^C und PrP^{Sc} darstellen. Der von Caprion entwickelte Test geht davon aus, dass PrP^{Sc} in geringen Konzentration - wie z.B. im Blut - bisher nicht nachgewiesen werden konnte, weil spezifische an PrP^{Sc} starkbindende Moleküle bisher noch nicht identifiziert wurden. Das von Caprion beschriebene Protocadherin soll ein derartiges spezifisches Molekül repräsentieren. Ein solcher, auf Proteinebene ablaufender Test ist aber bisher nicht erhältlich.

7.7 Commissariat à l'Énergie Atomique

Das Commissariat hat das ELISA-Verfahren entwickelt, welches mittlerweile von Bio-Rad unter dem Namen Platelia-Test vermarktet wird.

7.8 Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique SA

C.S.E.M. hat zusammen mit Prionics AG und dem Paul-Scherr-Institut zwei Patente angemeldet, die mittels optischem Sensor den Nachweis von pathogenem PrP im pico- bis femtomolarem Bereich ermöglichen sollen [56, 57]. Das optische Element besteht aus einem entfernbaren Trägersubstrat, das mit Titandioxid beschichtet ist, auf welchem PrP^{Sc}-spezifische Antikörper fixiert sind. Die spezifischen Antikörper interagieren mit pathogenem PrP und verursachen so Änderungen im Brechungsindex. Die beiden patentierten Verfahren stellen eine sehr interessante Nachweismöglichkeit dar. Allerdings erfolgte die Veröffentlichungen beider Patente bereits 1998. Heute, drei Jahre später, ist jedoch nach wie vor ein auf einer derartigen Methode basierender Test nicht erhältlich, so dass davon auszugehen ist, dass das Verfahren zum momentanen Zeitpunkt nicht über einen Prototyp hinauskommt.

7.9 Disease Sciences Inc

Disease Sciences beabsichtigt nach eigenen Angaben, eine breite Palette von Technologien einzusetzen, um PrP^{Sc} zu identifizieren und zu quantifizieren. Ziel ist ein Test, der universell zur TSE-Diagnostik eingesetzt wird. Weitere Details sind allerdings nicht bekannt.

7.10 IGEN International Inc (auch D-Gen)

Nach eigenen Angaben hat IGEN (bzw. D-Gen) zusammen mit dem Imperial College of Science, Technology and Medicine (Großbritannien) einen BSE-Test entwickelt, der einen wesentlich genaueren BSE-Nachweis als die auf dem Markt befindlichen Test-Verfahren ermöglicht. Der Test basiert auf einem Immunoblot-Verfahren, das nach Angaben von John Collinge² den Nachweis von PrP^{Sc} in Blut und Geweben ermöglicht. Bei diesem Verfahren handelt es sich möglicherweise um den Test, der von der Europäischen Kommission validiert werden soll. Im Lancet erschien 2001 eine Publikation, die dieses Nachweisverfahren näher beschreibt [32].

² Direktor des Imperial College of Science, Technology, and Medicine (Großbritannien)

7.11 Microsens Biophage Ltd

Zur Zeit veröffentlicht Microsens keine Details zu irgendwelchen Aktivitäten bezüglich TSE-Nachweisen. Bekannt ist, dass Microsens insbesondere am Nachweis von PrP^{Sc} unterhalb des Hintergrund-Rauschens bei Immunoassays arbeitet. Aus den Forschungsergebnissen soll nun eine Screening-Methode für PrP^{Sc} im Blut entwickelt werden

7.12 Paradigm Genetics Inc

Nach eigenen Aussagen will Paradigm einen sensitiven TSE-Test verwirklichen, der in Zusammenarbeit mit Prionics entwickelt werden soll. Nähere Informationen sind nicht zu erhalten.

7.13 Prionics AG

Als einziges der momentan von der Europäischen Kommission evaluierten Verfahren, veröffentlicht Prionics Einzelheiten zu deren neuem auf ELISA-Technologie basierendem Verfahren. Die von der Homepage entnommenen Informationen sind nachfolgend wiedergegeben:

„Der Prionics®-Check LIA basiert auf einem Luminescence Immuno Assay, der den Nachweis krankhafter Prionen mit Hilfe von Licht auf bislang unerreicht einfache Art erlaubt. Der Prionics®-Check LIA eignet sich für Labors, die ein Probenvolumen von mehreren hundert Analysen täglich bearbeiten. Die Vorteile des neuen BSE-Tests der Prionics AG liegen auf der Hand. Er ist schnell und sehr einfach in der Handhabung. Seine Zuverlässigkeit hat der Prionics®-Check LIA auch bei autolytierten (verflüssigter) Hirnproben bewiesen und eignet sich damit auch für die Analyse von Proben mit einer schlechten Qualität (Prionics AG, Schweiz).“

Die Prionics Entwicklung eines ELISA-Verfahrens zeigt, dass dieser Test primär die Mängel bezüglich der Limitierung des Probendurchsatzes bei der Prionics-Westernblot Methode beseitigen soll. So steht die Automatisierung im Vordergrund und die Zuverlässigkeit der Methode auch mit älteren Hirnproben. Nach Angaben von Prionics sind 200 Proben pro Person pro 4 Stunden analysierbar.

7.14 Prusiner, Stanley B.

Stanley Prusiner hat inzwischen zahlreiche Patente auf dem Gebiet der Prionen-Diagnostik angemeldet, so dass seine Nennung zwischen den einzelnen Biotech-Firmen durchaus seine Berechtigung findet. Erst kürzlich ließ er Antikörper patentieren [49], die spezifisch gegen die pathogene PrP-Form gerichtet sind. Dies hat den Effekt, dass ein direkter Nachweis des PrP^{Sc} möglich ist - ohne vorangegangenen Proteinase K-Verdau. Dadurch kann die Empfindlichkeit von Nachweisverfahren entscheidend erhöht werden.

7.15 R-Biopharm

Wie ABC Research Corporation arbeitet R-Biopharm nicht direkt an einem BSE-Nachweisverfahren, sondern entwickelt und vermarktet ELISA-Tests, die u.a. zum Nachweis von Zentralnervensystem-Bestandteilen (ZNS) in Fleisch und Fleischerzeugnissen eingesetzt werden. Die Tests erlauben eine mögliche Kontamination mit sogenanntem BSE-Risikomaterial zu erkennen. Der ELISA-Test basiert auf dem Nachweis des GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), das als Bestandteil u.a. der Astrozyten im ZNS präsent ist.

7.16 Serono Pharmaceutical Research Institute

Am 14 Juni 2001 erschien ein Nature-Artikel der Arbeitsgruppe von Dr. Claudio Soto [24], in dem ein Verfahren beschrieben wurde, dass es ermöglichte, sehr geringe Mengen von pathogenem PrP zu amplifizieren und so entsprechenden Nachweisverfahren zugänglich zu machen. Die Methode imitiert innerhalb weniger Stunden die Vervielfältigung des pathogenen PrP im Körper. Ein Vorgang, der auf natürlichem Wege Jahre benötigen würde. Dadurch können TSE-Erkrankungen, lange bevor klinische Symptome auftreten, diagnostiziert werden. Möglich wird dies, durch einen Prozess, der als „Protein Misfolding Cyclic Amplification“ oder kurz PMCA bezeichnet wird. Dieser Prionen-Amplifikations-Prozess hat nach Aussagen Sotos ein enormes Potenzial in der Prionendiagnostik. Claudio Soto ist Leiter der Forschungsabteilung Neurodegenerative Krankheiten, der Firma Serono Pharmaceutical Research Institute, Schweiz.

8 Beurteilung der Methoden

Die Auswertung der existierenden und momentan entwickelten Nachweismethoden sowie die publizierte Literatur zeigt deutlich, dass nach wie vor große Anstrengungen unternommen werden, TSE-Tests zu entwickeln. Hier ist abzusehen, wann beispielsweise die ersten BSE-Tests am lebenden Tier möglich sind und diese validiert werden. Bisher, so zeigen insbesondere die Validierungsstudien bzw. Vorhaben der EU, sind zur Zeit lediglich die post-mortem Verfahren in der Lage, die erforderlichen Kriterien zu erfüllen. Die präklinischen Verfahren sind noch nicht so weit entwickelt, dass diese als Tests vermarktet werden können.

Allgemein muss deutlich unterschieden werden zwischen Nachweisverfahren, die kommerziell vertrieben werden sollen und zwischen solchen, die zur Forschungszwecken eingesetzt werden. Die Literaturstudie macht deutlich, dass mittlerweile unterschiedlichste Methoden beschrieben wurden, die wesentlich empfindlicher sind als die Verfahren, die von der Europäischen Kommission getestet wurden, die allerdings nicht in der Routineanalytik anwendbar sind.

Der Westernblot-Nachweis wird in den meisten Publikationen angewendet. Er ist leicht zu modifizieren, und eine große Palette von Antikörpern - je nach Spezies und Bedarf - steht inzwischen zur Verfügung. Die ELISA-Verfahren, so zeigt die Recherche, sind für Forschungszwecke weniger interessant, da diese prinzipiell für großen Probendurchsatz gedacht und nicht sehr stark modifizierbar sind. Aufgrund des fehlenden Probendurchsatzes bei der Westernblot-Methode ist nachzuvollziehen, dass der „Westernblot-Verfechter“ Prionics nun doch ein ELISA-Verfahren validieren ließ, da der Nachteil des geringen Probendurchsatzes gegenüber dem ELISA-Verfahren zu groß war.

Nachweise am lebenden Tier - wenn diese in großem Umfang angewendet werden sollen - werden wahrscheinlich über Bluttests möglich. Wahrscheinlich durch Verfahren, wie sie z.B. von der Firma Boehringer patentiert wurden. Der beschriebene Liquortest zum Nachweis einer TSE-Infektion am lebenden Individuum wird auf die CJD-Diagnostik beim Menschen beschränkt bleiben, da dieses Verfahren beim Rind nicht praktikabel ist und keinen großen Probendurchsatz ermöglicht.

Eine weitere Möglichkeit insbesondere im Hinblick auf großen Probendurchsatz, könnte die Aptamer-Technologie liefern. RNA-Aptamere bestehen aus Nukleinsäuren mit der Fähigkeit, Liganden jeglicher

Art zu erkennen und sich an diese anzulagern. Diese können aus RNA selbst oder aus Einzelstrang DNA bestehen. Inzwischen wurden derartige Aptamere hergestellt, die selektiv an PrP binden können [33].

Neben den üblichen ELISA- bzw. Westernblot Verfahren ist die ICE [26-28, 61] als sehr interessante Variante anzusehen. Zwar erfolgt im Prinzip der Nachweis von PrP auch immunologisch, allerdings wesentlich empfindlicher als bei den herkömmlichen Verfahren, so dass dieses Verfahren eine Alternative darstellen wird.

Wie sich das Verfahren PCMA entwickeln wird, bleibt abzuwarten. Auch diese Methode zeichnet sich - wie beschrieben - durch eine sehr hohe Empfindlichkeit aus und würde - wie die ICE - eine begründete Alternative zu den vorhandenen Testsystemen repräsentieren.

8.1 Anwendbarkeit bei Bodenproben

In Bezug auf den Nachweis von TSE-Erregern in Boden kann die Beurteilung von Tests am lebenden Tier z.B. über Markerproteine oder mRNA vollständig entfallen. Derartige Moleküle werden nur geringfügig in den Boden gelangen und aufgrund der allgemein hohen Proteinase- und Nukleaseaktivität in normalen Böden - anders als das persistente PrP^{Sc} - sehr schnell abgebaut. Es sind also nur die Nachweismethoden interessant, die sich auf den direkten Nachweis des pathogenen PrP beschränken. Diesbezüglich sind wie ausführlich erwähnt verschiedene Möglichkeiten denkbar.

Grundsätzlich sind die existierenden Nachweismethoden, die sich auf den direkten Nachweis des Prion-Proteins beziehen, für die TSE-Analytik im Boden anwendbar. Im Bereich der Analyse zu Forschungszwecken, um zu Überprüfen, ob das pathogene Prion-Protein überhaupt im Boden persistent bleibt, reichen die existierenden Verfahren aus. Hier sind andere Faktoren von Bedeutung, die einen Nachweis erschweren. So weist Boden aufgrund enthaltener Huminstoffe und Tonminerale hervorragende adsorbierende Eigenschaften auf und bindet dadurch Proteine, die so einem möglichen Nachweis entzogen werden. Zur Aufreinigung werden wahrscheinlich derartige Methoden zum Ziel führen, die in der Bodenkunde beschrieben sind. Beispielsweise ist die Extraktion und Fällung mittels Trichloressigsäure möglich.

Die Literaturrecherche zeigt in diesem Zusammenhang auch eindeutig, dass das eigentliche Problem nicht der Nachweis des Prion-Proteins darstellt, sondern dass die limitierenden Faktoren die Isolation und Anreicherung sind. Wie einzelne Publikationen zeigen, z.B. [29], ist diese Anreicherung für ein Nachweissystem von Bedeutung. So konnte diese Arbeitsgruppe im Urin PrP finden, nachdem Aufreinigungs- und Zentrifugationsschritte erfolgten. Als das PrP ankonzentriert war, konnte der Nachweis mittels Immunoblot einfach durchgeführt werden.

Die Ergebnisse legen dar, dass das Problem einer TSE-Diagnostik im Boden nicht so sehr die Nachweismethode selbst betrifft, sondern dass Möglichkeiten erarbeitet werden müssen, die es erlauben größere Bodenmengen im Gramm- bis Kilogramm-Bereich so aufzuarbeiten, dass enthaltene Proteine aufgereinigt, angereichert und dadurch einem Nachweis zugänglich gemacht werden.

9 Literaturverzeichnis

1. Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., et al., *A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein*. Cell, 1985. **40**: p. 735-746.
2. Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science, 1982. **216**: p. 136-144.
3. Prusiner, S.B., *Prions*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998. **95**: p. 13363-13383.
4. Hörnlimann, B., Hrsg, *Prionen und Prionenerkrankungen*. 1. Auflage ed. 2001, Berlin, New York: de Gruyter. 602.
5. Barclay, G.R., Hope, J., Birkett, C.R., Turner, M.L., *Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry*. British Journal of Haematology, 1999. **107**: p. 804-814.
6. Bodemer, W., *The use of monoclonal antibodies in human prion disease*. Naturwissenschaften, 1999. **86**: p. 212-220.
7. European Commission, *The evaluation of test for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines*. 1999.
8. Foster, J.D., Wilson, M., Hunter, N., *Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie*. Veterinary Record, 1996. **139**: p. 512-515.
9. Glover, K.J., Martini, P.M., Vold, R.R., Komives, E.A., *Preparation of insoluble transmembrane peptides: glycophorin-A, prion (110-137), and FGFR (368-397)*. Anal Biochem., 1999. **272**: p. 270-274.
10. Harmeyer, S., Pfaff, E., Groschup, M.H., *Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants*. Journal of General Virology, 1998. **79**: p. 937-945.

11. Hornemann, S., Korth, C., Oesch, B., Riek, R., Wider, G., Wuthrich, K., Glockshuber, R., *Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization*. FEBS Lett., 1997. **413**: p. 277-281.
12. Kascsak, R.J., Rubenstein, R., Merz, P.A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R.I., Wisniewski, H.M., Diringer, H., *Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins*. Journal of Virology, 1987. **61**: p. 3688-93.
13. Korth, C., Streit, P., Oesch, B., *Monoclonal antibodies specific for the native, disease-associated isoform of the prion protein*. Methods Enzymol., 1999. **309**: p. 106-122.
14. Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., and F. Ehrensperger, Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K., Oesch, B., *Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody*. Nature, 1997. **390**: p. 74-77.
15. Krasemann, S., Groschup, M.H., Harmeyer, S., Hunsmann, G., Bodemer, W., *Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP^{0/0} mice*. Mol Med., 1996. **2**: p. 725-734.
16. MacGregor, I., *Prion protein and developments in its detection*. Transfus Med., 2001. **11**: p. 3-14.
17. Madec, J.Y., Groschup, M.H., Buschmann, A., Belli, P., Calavas, D., Baron, T., *Sensitivity of the Western blot detection of prion protein PrP^{res} in natural sheep scrapie*. J Virol Methods., 1998. **75**: p. 169-177.
18. Meyer, R.K., Oesch, B., Fatzer, R., Zurbriggen, A., Vandeveld, M., *Detection of bovine spongiform encephalopathy-specific PrP(Sc) by treatment with heat and guanidine thiocyanate*. J Virol., 1999. **73**: p. 9386-9392.
19. Muller, W.E., Laplanche, J.L., Ushijima, H., Schroder, H.C., *Novel approaches in diagnosis and therapy of Creutzfeldt-Jakob disease*. Mech Ageing Dev., 2000. **116**: p. 193-218.

20. Nemoto, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., *Detection methods of possible prion contaminants in collagen and gelatin*. Arch Virol, 1999. **144**: p. 177-184.
21. Oesch, B., Doherr, M., Heim, D., Fischer, K., Egli, S., Bolliger, S., Biffiger, K., Schaller, O., Vandeveldel, M., Moser, M., *Application of Prionics Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs*. Arch Virol Suppl., 2000. **16**: p. 189-195.
22. Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M.A., Prusiner, S.B., *Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity*. J Virol, 1996. **70**: p. 1714-1722.
23. Rubenstein, R., Gray, P.C., Wehlburg, C.M., Wagner, J.S., Tisone, G.C., *Detection and discrimination of PrPSc by multi-spectral ultraviolet fluorescence*. Biochem Biophys Res Commun., 1998. **246**: p. 100-106.
24. Saborio, G., Permanne, B., Soto, C., *Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding*. Nature, 2001. **411**: p. 810-813.
25. Schaller, O., Fatzer, R., Stack, M., Clark, J., Cooley, W., Biffiger, K., Egli, S., Doherr, M., Vandeveldel, M., Heim, D., Oesch, B., Moser, M., *Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE)*. Acta Neuropathol (Berl), 1999. **98**: p. 437-443.
26. Schmerr, M.J., Cutlip, R.C., Jenny, A., *Capillary isoelectric focusing of the scrapie prion protein*. J Chromatogr A, 1998. **842**: p. 135-41.
27. Schmerr, M.J., Jenny, A., *A diagnostic test for scrapie-infected sheep using a capillary electrophoresis immunoassay with fluorescent-labeled peptides*. Electrophoresis., 1998. **19**: p. 409-14.
28. Schmerr, M.J., Jenny, A., Cutlip, R.C., *The use of capillary sds gel electrophoresis to detect the prion protein extracted from scrapie infected sheep*. J Chromatogr A., 1999. **853**: p. 207-14.

29. Shaked, G.M., Shaked, Y., Kariv-Inbal, Z., Halimi, M., Avraham, I., Gabizon, R., *A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases*. J Biol Chem., 2001. **276**: p. 31479-31482.
30. Takahashi, K., Shinagawa, M., Doi, S., Sasaki, S., Goto, H., Sato, G., *Purification of scrapie agent from infected animal brains and raising of antibodies to the purified fraction*. Microbiol Immunol., 1986. **30**: p. 123-131.
31. Vorberg, I., Buschmann, A., Harmeyer, S., Saalmuller, A., Pfaff, Groschup, M.H., *A novel epitope for the specific detection of exogenous prion proteins in transgenic mice and transfected murine cell lines*. Virology, 1999. **255**: p. 26-31.
32. Wadsworth, J.D., Joiner, S., Hill, A.F., Campbell, T.A., Desbruslais, M., Luthert, P.J., Collinge, J., *Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay*. Lancet, 2001. **358**: p. 171-80.
33. Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M.H., Kretzschmar, H.A., Famulok, M., Winnacker, E.L., *RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP*. Journal of Virology, 1997. **71**: p. 8790-8797.
34. Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., Smith, P.G., *A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK*. Lancet, 1996. **347**: p. 921-925.
35. Winkler, T., Kettling, U., Koltermann, A., Eigen, M., *Confocal fluorescence coincidence analysis: an approach to ultra high-throughput screening*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1999. **96**: p. 1375-1378.
36. Winklhofer, K.F., Hartl, F.U., Tatzelt, J., *A sensitive filter retention assay for the detection of PrP(Sc) and the screening of anti-prion compounds*. FEBS Lett, 2001. **503**: p. 41-45.
37. Yokoyama, T., Kimura, K., Tagawa, Y., Yuasa, N., *Preparation and characterization of antibodies against mouse prion protein (PrP) peptides*. Clin Diagn Lab Immunol., 1995. **2**: p. 172-176.

38. Zanusso, G., Liu, D., Ferrari, S., Hegyi, I., Yin, X., Aguzzi, A., Hornemann, S., Liemann, S., Glockshuber, R., Manson, J.C., Brown, P., Petersen, R.B., Gambetti, P., Sy, M.S., *Prion protein expression in different species: analysis with a panel of new mAbs*. Proceedings of the National Academy of Science, 1998. **95**: p. 8812-8816.
39. Alef, K., *Methodenhandbuch Mikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung*. 1. Auflage ed. 1991, Landsberg: ecomed. 284.
40. Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S., Boudabous, A., *Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by Bacillus thuringiensis BMG1.7, a new strain isolated from soil*. Lett Appl Microbiol., 2001. **43**: p. 243-7.
41. Gomes, R.C., Semedo, L.T., Soares, R.M., Linhares, L.F., Ulhoa, C.J., Alviano, C.S., Coelho, R.R., *Purification of a thermostable endochitinase from Streptomyces RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi*. J Appl Microbiol., 2001. **90**: p. 653-661.
42. Ishimoto, R., Sugimoto, M., Kawai, F., *Screening and characterization of trehalose-oleate hydrolyzing lipase*. FEMS Microbiol Lett., 2001. **195**: p. 231-235.
43. Lottspeich, F., Zorbas, H., *Bioanalytik*. 1. Auflage ed. 1998, Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl. 1035.
44. Petinate, S.D., Branquinha, M.H., Coelho, R.R., Vermelho, A.B., Giovanni-De-Simone, S., *Purification and partial characterization of an extracellular serine-proteinase of Streptomyces cyaneus isolated from Brazilian cerrado soil*. J Appl Microbiol., 1999. **87**: p. 557-63.
45. Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. 1. Auflage ed. 1991, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona: Springer-Verlag. 213.
46. Sheedy, C., Hall JC., *Immunoaffinity purification of chlorimuron-ethyl from soil extracts prior to quantitation by enzyme-linked immunosorbent assay*. J Agric Food Chem, 2001. **49**: p. 1151-1157.

47. Topp, E., Mulbry, W.M., Zhu, H., Nour, S.M., Cuppels, D., *Characterization of S-triazine herbicide metabolism by a Nocardioides sp. isolated from agricultural soils*. Appl Environ Microbiol., 2000. **66**: p. 3134-41.
48. Barnard, G., *A method for the determination of transmissible spongiform encephalopathies in mammals*, in PCT-Anmeldung, WO 01/38880 A1. 2001, Wallac Oi.
49. Prusiner, S.B., Safar, J. G., *Assay for disease related conformation of a protein and isolating same*, . 2001, The Regents of the University of California (Oakland, CA): United States Patent, 6,214,565.
50. Jackmann, R., Everest, S.J., *Detection of CNS disease*, . 1999, Minister of Agriculture, Fisheries and food, London, GB: Europäisches Patentamt.
51. Ebringer, A., *Diagnosis of spongiform or de-myelinating disease*, . 2001, King's College, University of London, GB: Europäisches Patentamt, EP 1064555 A2.
52. Prusiner, S.B., Williamson, R.A., Burton, D.R., *Antibodies specific for native PrPSc*, . 2001, The Scripps Research Institute (La Jolla, CA): United Sates Patent, 6,290,954.
53. Gawryl, M., Houtchens, R.A., Light, W.R., *Method for chromatographic removal of prions*, . 1998, Biopure Corporation: Unites States Patent, 5,808,011.
54. Bayer, *Method of separating prions from biological materials*, . 2000, Bayer Corporation, Pennsylvania, USA: PCT-Anmeldung, WO 01/38354 A1.
55. O'Rourke, K.I., *Monoclonal antibodies and cocktail for detection of prion protein as an indication of transmissible spongiform encephalopathies*, . 2001, Secretary of Agriculture, USA: United States Patent, 6,261,790.
56. Sigrist, H., Gao, H., Kunz, R., Duebendorfer, J., *Optical sensor unit and procedure for the ultrasensitive detection of biochemical analytes*, . 1998, Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique SA, Neuchatel, Prionics AG, Zürich: Europäisches Patentamt, EP 0886141A1.

57. Sigrist, H., Gao, H., Korth, C., Moser, M., Oesch, B., Kunz, R., Duebendorfer, Juerg, *Procedure and instrumentation for the ultrasensitive detection of prions, prion binding bio molecules and other bio molecules*, . 1998, Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique SA, Neuchatel, Prionics AG, Zürich, Paul-Scherrer Institut, Zürich: Europäisches Patentamt, EP 0887645A1.
58. Prusiner, S.B., Safar, J.G., *Removal of prions from blood, plasma and other liquids*, . 2001, The Regents of the The Regents of the University of California, USA: United States Patent 6,221,614.
59. Moser, M., Oesch, B., Korth, C., *Synthetic polypeptide for diagnosing and treating prion-related diseases*, . 1999, Prionics AG: PCT-Anmeldung, WO 99/15651.
60. Prusiner, S.B., *Method of concentrating prion proteins in blood samples*, . 2000, The Regents of the University of California (Oakland, CA): United States Patent 6,166,187.
61. Schmerr, M.J., Alpert, A.J., *Method and kit for extracting prion protein*, . 2000, The United States of America as represented by the Secretary of (Washington, DC): United States Patent 6,150,172.
62. Giese, M., Rogers M.S., *Method of diagnosis transmissible spongiform encephalopathies*, . 2000, Boehringer Ingelheim Vetmed (DE): DE19918141.
63. Aguzzi, A., Theuring, F., *Improved in situ beta-galactosidase staining for histological analysis of transgenic mice*. Histochemistry, 1994. **102**(6): p. 477-81.
64. Maissen, M., Roeckl, C., Glatzel, M., Goldmann, W., Aguzzi, A., *Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species*. Lancet, 2001. **357**(9273): p. 2026-8.
65. Fischer, M.B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H.P., Aguzzi, A., *Binding of disease-associated prion protein to plasminogen*. Nature, 2000. **408**: p. 479-83.
66. Ueli, B., *BSE und andere spongiforme Enzephalopathien*. 1. Auflage ed. 1998, Berlin: Parey. 151.

67. Jeffrey, M., Goodbrand, I.A., Goodsir, C.M., *Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure*. *Micron*, 1995. **26**(277-298).
68. Otto, M., Stein, H., Szudra, A., Zerr, I., Bodemer, M., Gefeller, O., Poser, S., Kretzschmar, H.A., Mader, M., Weber, T., *S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease*. *Journal of Neurology*, 1997. **244**(9): p. 566-70.
69. Otto, M.E., H., Schulz-Shaeffer, W., Neumann, M., Schroter, A., Ratzka, P., Cepek, L., Zerr, I., Steinacker, P., Windl, O., Kornhuber, J., Kretzschmar, H.A., Poser, S., Wiltfang, J., *Decreased beta-amyloid1-42 in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease*. *Neurology*, 2000. **54**(5): p. 1099-102.
70. Otto, M., Wiltfang, J., Tumani, H., Zerr, I., Lantsch, M., Kornhuber, J., Weber, T., Kretzschmar, H.A., Poser, S., *Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease*. *Neuroscience Letters*, 1997. **225**(3): p. 210-2.
71. Zerr, I., Bodemer, M., Otto, M., Poser, S., Windl, O., Kretzschmar, H.A., Gefeller, O., Weber, T., *Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid*. *Lancet*, 1996. **348**(9031): p. 846-9.
72. Zerr, I., Bodemer, M., Gefeller, O., Otto, M., Poser, S., Wiltfang, J., Windl, O., Kretzschmar, H.A., Weber, T., *Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease*. *Annals of Neurology*, 1998. **43**(1): p. 32-40.
73. Zerr, I., Pocchiari, M., Collins, S., Brandel, J.P., de Pedro-Cuesta, J., Knight, R.S., Bernheimer, H., Cardone, F., Delasnerie-Laupretre, N., Cuadrado-Corrales, N., Ladogana, A., Bodemer, M., Fletcher, A., Awan, T., Ruiz-Bremon, A., Budka, H., Laplanche, J.L., Wil, *Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease*. *Neurology*, 2000. **55**(6): p. 811-5.
74. Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., *Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations*. *Nature Medicine*, 1998. **4**: p. 1157-1165.

75. WHO, W.H.O., *WHO consultation on diagnostic Procedures for transmissible spongiform encephalopathies: need for reference reagent and reference panels*. 1999.
76. http://europa.eu.int/rapid/start/cgi/guesten.ksh?p_action.gettxt=gt&doc=IP/00/1409|0|RAPID&lg=EN, .
77. Schreuder, B., Van Keulen, L., Vromans, M., Langeveld. J.,Smits, M., *Method for detection of prion diseases*, . 1997, Stichting Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid (ID-DLO), Lelystad, NL: Europäisches Patentamt, WO9737227.