

STAALNAME VAN DE HERSENSTAM VOOR TSE-ONDERZOEK BIJ HET SCHAAP SAMPLING OF THE OVINE BRAINSTEM FOR TSE-TESTING

C. Jacobs¹, A. Gabriel², P. Simoens¹

¹Vakgroep Morfologie

Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, België

²Département Pathologie et Morphologie

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster 20, 4000 Liège, Belgique

Christel.Jacobs@rug.ac.be

ABSTRACT

Since April 1, 2002 the European Union has extended the TSE testing in ruminants by including sheep and goats in the survey studies. As in the case of the bovine species, the diagnostic protocol is performed on a tissue sample of the brainstem collected at the level of the obex. Morphologic differences of the brainstem of sheep and goats (when compared to the brainstem of the bovine species) required some adjustments to the sampling method and the equipment. In this study, the technical aspects of sampling and a number of morphometrical parameters of the ovine brainstem are described. The essential differences to the bovine species concern the dimensions and the more pronounced caudal narrowing of the brainstem.

SAMENVATTING

Sinds 1 april 2002 worden in de Europese Unie naast het rund ook schapen en geiten bemonsterd in het kader van de TSE-problematiek. De diagnose gebeurt zoals bij het rund op een weefselstaal genomen ter hoogte van de obex van de hersenstam. Morfologische verschillen tussen de hersenstam van schapen en geiten enerzijds en de hersenstam het rund anderzijds, hebben echter aanleiding gegeven tot een aantal aanpassingen van de gebruikte bemonsteringstechniek en het noodzakelijke instrumentarium. In deze studie worden de techniek van staalname evenals een aantal morfometrische parameters van de hersenstam van het schaap beschreven. De voornaamste verschillpunten met het rund betreffen de absolute afmetingen en de meer uitgesproken caudale versmalling van de hersenstam.

INLEIDING

Sinds 1 april 2002 is het BSE-onderzoek bij het rund in de Europese Unie uitgebreid met TSE-onderzoek bij schapen en geiten. Jaarlijks moeten in België 3750 adulte kleine herkauwers bemonsterd worden die geslacht worden met het oog op menselijke consumptie, evenals 450 gestorven of gedode adulte dieren. Adulte dieren worden gedefinieerd als dieren ouder dan achttien maanden of waarvan minstens twee permanente snijtanden doorgebroken zijn (European Commission, 2001; 2002).

Er werd bij experimentele besmetting vastgesteld dat schapen en geiten vatbaar zijn voor BSE en dat BSE zich bij deze kleine herkauwers als scrapie gedraagt wat betreft het ziektebeeld en de verspreiding in diverse organen (Foster *et al.*, 2001; Jeffrey *et al.*, 2001). In tegenstelling tot het rund, waarbij de prio-

nen zich enkel ter hoogte van het centraal zenuwstelsel en de ganglia lokaliseren, zouden de prionen bij het schaap en de geit eveneens, zij het in mindere mate, in de lymfeknopen, de milt en delen van de darmen aanwezig zijn (Butler, 1998; Foster *et al.*, 2001). Indien ook de verspreidingswijze van BSE bij kleine herkauwers analoog aan scrapie zou zijn, moet men - in tegenstelling tot BSE bij het rund - rekening houden met een mogelijke horizontale en verticale transmissie van deze aandoening binnen de kudde (Scientific Steering Committee, 1998, 2001).

Deze bevindingen en de mogelijke blootstelling van melkschapen en geiten aan hetzelfde vlees- en beendermeel, dat verantwoordelijk was voor de BSE-epidemie bij het rund, deden de vraag rijzen of er zich ook een natuurlijke BSE-besmetting bij deze diersoorten heeft voorgedaan die in het verleden mogelijk foutief als scrapie werd gediagnosticeerd. Dit

zou grote consequenties kunnen hebben voor de volksgezondheid, aangezien er voor BSE - in tegenstelling tot scrapie - schijnbaar geen efficiënte dier-soortbarrière bestaat die besmetting van de mens verhindert (Butler, 1998). De nieuwe maatregel heeft dan ook tot doel het vóórkomen en de incidentie van TSE en in het bijzonder van BSE na te gaan in de schapen- en geitenpopulatie en hiervoor een voldoende groot aantal dieren te bemonsteren omdat de incidentie van deze aandoeningen mogelijk laag is.

De staalname en testprocedure verlopen in grote lijnen zoals bij het rund (Venturini *et al.*, 2000). Er wordt een obductie van de hersenstam uitgevoerd met een aan het schaap aangepaste spatel en techniek. Vervolgens wordt de hersenstam bemonsterd ter hoogte van de obex en het staal wordt onderworpen aan de in België voor het rund gebruikte snelle test (Plate-lia-BSE) voor het aantonen van transmissibele spongi-forme encefalopathie. Bij positief resultaat zal indien mogelijk een typering (strain-typing) van het oorzaak-elijk agens volgen waardoor differentiatie met scrapie mogelijk wordt (European Commission, 2001). Hiervoor kan beroep gedaan worden op drie categorieën van testen die door het Scientific Steering Committee (2002) geaccepteerd zijn. Een eerste mogelijk typeringsprotocol is gebaseerd op fenotypische verschillen van het ziekteverwekkend prion die vast te stellen zijn na prion immunohistochemie. Ten tweede zijn er de moleculaire methoden die gebaseerd zijn op fenotypische eigenschappen van de prionen tijdens biochemische denaturatie (bijvoorbeeld met proteïnase K). Daar deze testen echter nog volop in ontwikkeling zijn en gevalideerd moeten worden, is men heden aangewezen op het laesieprofiel na intracerebrale en intraperitoneale inoculatie van transgene muizen met verdacht positief hersenstamweefsel. Deze derde procedure is echter duur en zeer tijdrovend omwille van de incubatieperiode bij de muizen.

Bij de bemonstering van het schaap wordt ook een bloedstaal gepreleveerd, waarop genotypering gebeurt teneinde de gevoeligheid van het dier voor scrapie te kunnen nagaan. Deze vatbaarheid kan ingeschat worden aan de hand van de codons die voorkomen op plaatsen 136, 154 en 171 van het PRNP-gen dat codeert voor de aanmaak van het normale prioneiwit PrP^c (Peelman en Van Poucke, 2002). Op deze manier kan het effect van de gerichte selectie ten voordele van scrapieresistente schapenlijnen worden nagegaan.

Wat de obductie en het preleveren van het obexgebied van de hersenstam betreft, hebben morfologi-

sche verschillen tussen schaap en rund een aantal aanpassingen van de techniek opgedrongen. Deze verschillen zullen in de onderstaande tekst worden toegelicht en geïllustreerd. Tevens wordt een aantal morfometrische gegevens vermeld van de hersenstam van adulte schapen omwille van de schaarsheid van dit soort gegevens in de literatuur.

MATERIAAL EN METHODEN

Het hersenmateriaal van 15 geslachte adulte schapen en 2 runderen werd verzameld via verwijdering van het schedeldak met een oscillerende zaag. De schapen beschikten alle over vier tot acht permanente snijtanden en hadden dus met zekerheid de leeftijd van 18 maanden ruim overschreden. De leeftijd van de runderen bedroeg 6 en respectievelijk 90 maanden.

De hersenstam is gedefinieerd als het gebied dat de verbinding vormt tussen de hemisferen van de grote en kleine hersenen enerzijds, en het ruggenmerg anderzijds. De overgang naar het ruggenmerg bevindt zich onmiddellijk caudaal van de uitredeplaats van de twaalfde kopzenuw en wordt gekenmerkt door een duidelijke versmalling. Voor de resectie van de hersenstam werden de cerebellaire hemisferen verwijderd door transsectie van de pedunculi cerebellares. De cerebrale hemisferen werden verwijderd door een boogvormige incisie rostraal van beide tractus optici.

Het gewicht en de lengte van de volledige hersenen en van de hersenstam afzonderlijk werden bepaald. De breedte van de hersenstam werd gemeten ter hoogte van verschillende segmenten, namelijk op het niveau van de colliculi rostrales (A), de pedunculi cerebellares (B) en de obex (C). De breedte van het ruggenmerg werd gemeten op 1 cm afstand van de aansluiting met de hersenstam (D) (Figuur 1).

RESULTATEN EN DISCUSSIE

Obductie van de hersenstam

Omwille van de kleinere afmetingen van de hersenstam van het schaap tegenover het rund zijn een aantal aanpassingen van de obductietechniek noodzakelijk geweest. Na het slachten wordt een decapitatie uitgevoerd ter hoogte van de atlanto-occipitale gewrichten. De achterhoofdsknobbels (condyli occipitales) worden daarbij vrijgemaakt, zodat het achterhoofdsgat (foramen magnum) geëxposeerd is. De kop dient omgekeerd op een tafel gepositioneerd te worden met enkel de neusrug en voorhoofdsvlakte als

steunvlak. Vervolgens wordt een speciaal voor het schaap ontworpen obductieurette (Figuur 2) onder een hoek van ongeveer 60° ten opzichte van het tafelloppervlak, via het foramen magnum, in de subarachnoïdeale ruimte gebracht tot de spatel van de curette zich volledig in de subarachnoïdeale ruimte bevindt. In tegenstelling tot de obductietechniek bij het rund gebeurt het invoeren van de curette langs de ventrale zijde van de hersenstam, omdat de subarachnoïdeale ruimte hier groter is. Vervolgens wordt met de curette een ruime cirkelvormige beweging gemaakt, zodat het caudale hersenstamsegment losgemaakt wordt en in het holle gedeelte van de spatel naar buiten kan getrokken worden doorheen het foramen magnum.

Bij het rund daarentegen wordt een dorsale benadering van de hersenstam via het foramen magnum toegepast, en dit onder een hoek van 45°. Figuren 3a-3b illustreren de obductie bij beide diersoorten.

In de hersenstalen van beide diersoorten dienen in ieder geval de obex en de corpora restiformia aanwezig te zijn, omdat vooral deze structuren belangrijk zijn voor het BSE-onderzoek (Figuur 4). In Figuur 4 wordt tevens een aantal naburige structuren aangeduid ter oriëntatie.

Morfometrie van de hersenstam en diersoortverschillen

Bij de vijftien onderzochte schapen werden de volgende morfometrische gegevens bekomen voor de hersenstam: gewicht: $19,00 \pm 2,80$ g; lengte: $5,95 \pm 0,21$ cm; breedte ter hoogte van de colliculi rostrales: $2,59 \pm 0,08$ cm; breedte ter hoogte van de pedunculi cerebellares: $2,92 \pm 0,09$ cm en breedte op het niveau van de obex: $2,05 \pm 0,08$ cm. Het ruggenmerg had op 1 cm afstand van de aansluiting met de hersenstam een breedte van $1,09 \pm 0,09$ cm. Het totale hersengewicht bedroeg $108,80 \pm 10,26$ g en de totale lengte van de hersenen $9,16 \pm 0,46$ cm.

De hersenstam van het schaap vertegenwoordigt 17,4% van het totale hersengewicht en 65,1% van de totale hersenlengte.

Uit bovenstaande cijfers en op Figuur 5 merkt men dat zowel bij het rund als bij het schaap de hersenstam smaller wordt vanaf de pedunculi cerebellares naar caudaal toe, om tenslotte in het zeer smalle ruggenmerg uit te monden. Deze versmalling is meer uitgesproken bij het schaap dan bij het rund. De breedte van het ruggenmerg bedroeg bij het schaap slechts 37% van de breedte van de hersenstam ter hoogte van de pedunculi cerebellares, terwijl dit bij het rund 47%

was. Deze sterkere versmalling samen met de kleinere afmeting van de hersenstam van het schaap (Figuur 5) hebben een aanpassing vereist van de daaropvolgende laboratoriumbehandeling waarbij een weefselstaal wordt gepreleveerd ter hoogte van de obex.

Staalname

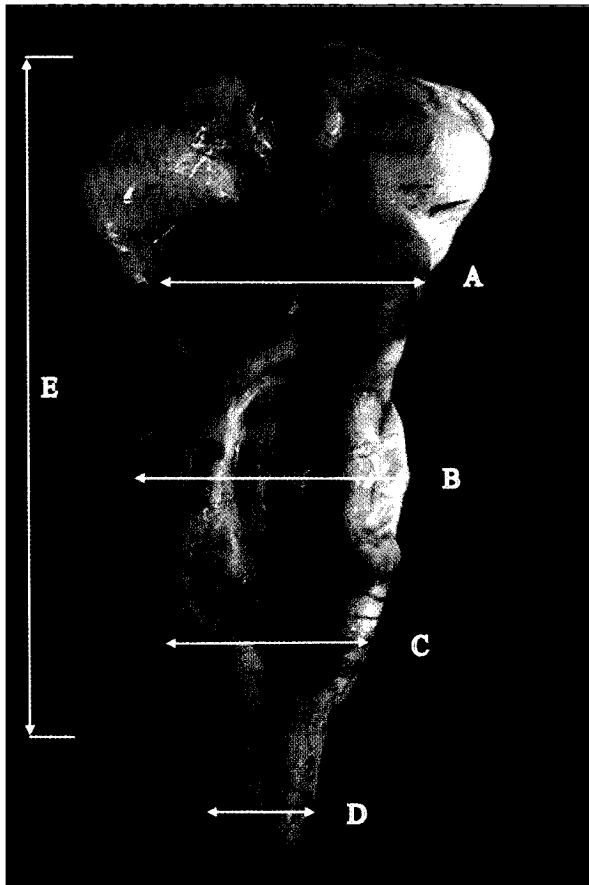
Het weefselstaal dient genomen te worden uit het corpus restiforme ter hoogte van de obex aan één zijde van de hersenstam, terwijl de andere zijde bewaard wordt voor een eventueel tegenonderzoek. De obex is een dwarse zenuwvezelstreng die zich ter hoogte van het caudale uiteinde van de vierde hersenventrikel bevindt (Figuur 4b).

Bij het rund gebeurt deze staalname met behulp van een speciaal door de firma Bio-Rad (Nazareth, België) ontwikkeld bemonsteringsspuitje (Figuur 6). Het spuitje wordt via het caudale uiteinde van het geobduceerde segment ingebracht en ver rostraal in één van beide corpora restiformia geschoven, zodat het bekomen staal met zekerheid het obexgedeelte bevat.

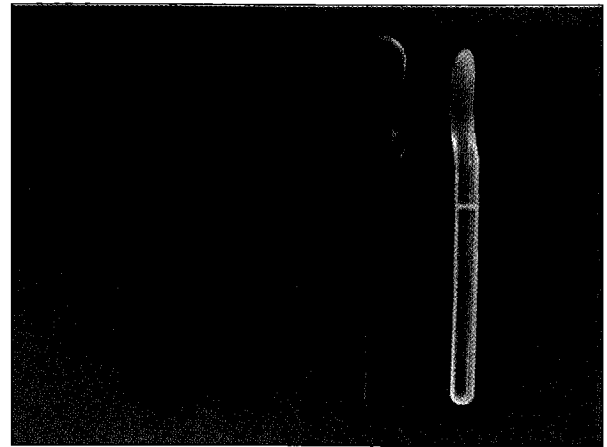
Bij het schaap daarentegen is deze techniek niet toepasbaar omwille van de eerder vermelde kleinere afmeting en de sterkere caudale versmalling van de hersenstam. Staalname met behulp van het spuitje laat bij deze diersoort niet toe voldoende weefsel te preleveren. Daarom wordt het staal bij het schaap uitgesneden met behulp van een bistouri (Figuur 7). Hierbij maakt men unilateraal in het corpus restiforme een eerste incisie onmiddellijk caudaal van de obex. Een tweede incisie wordt aangebracht ongeveer 5 mm rostraal van de eerste incisie. Tenslotte worden beide incisies met elkaar verbonden door een derde incisie in de mediaanlijn, die aldus een blokvormig staal oplevert.

Histologisch beeld ter hoogte van de obex

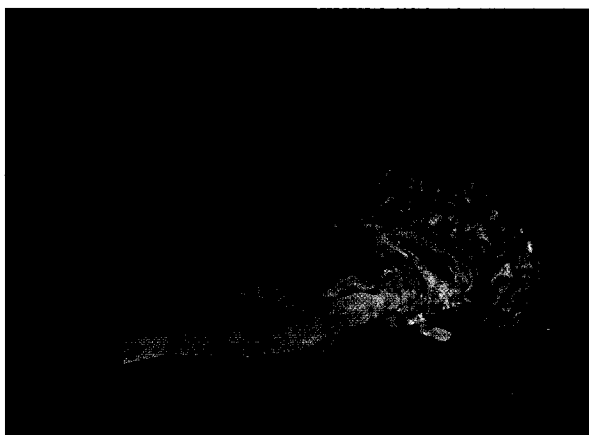
Als illustratie wordt in Figuur 8* een dwarse doorsnede ter hoogte van de obex van een adult schaap weergegeven waarop de volgende structuren herkend kunnen worden: 1. Nucleus gracilis; 2. Nucleus cuneatus; 3. Tractus solitarius; 4. Nucleus tractus solitarii; 5. Nucleus dorsalis nervi vagi; 6. Nucleus nervi hypoglossi; 7. Nucleus intercalatus; 8. Tractus spinalis nervi trigemini; 9. Nucleus tractus spinalis nervi trigemini; 10. Fasciculus longitudinalis medialis; 11. Lemniscus medialis; 12. Decussatio lemniscorum medialis; 13. Formatio reticularis; 14. Nucleus funiculi lateralis; 15. Nucleus olivaris; 16. Pyramis; 17. Decussatio pyramidum.



Figuur 1. Dorsaal aanzicht van de hersenstam van een adult schaap met de verschillende meetpunten. A = breedte t.h.v. de colliculi rostrales, B = breedte t.h.v. de pedunculi cerebellares, C = breedte t.h.v. de obex, D = breedte van het ruggenmerg op 1 cm afstand van de overgang met het verlengde merg, E = lengte van de hersenstam.



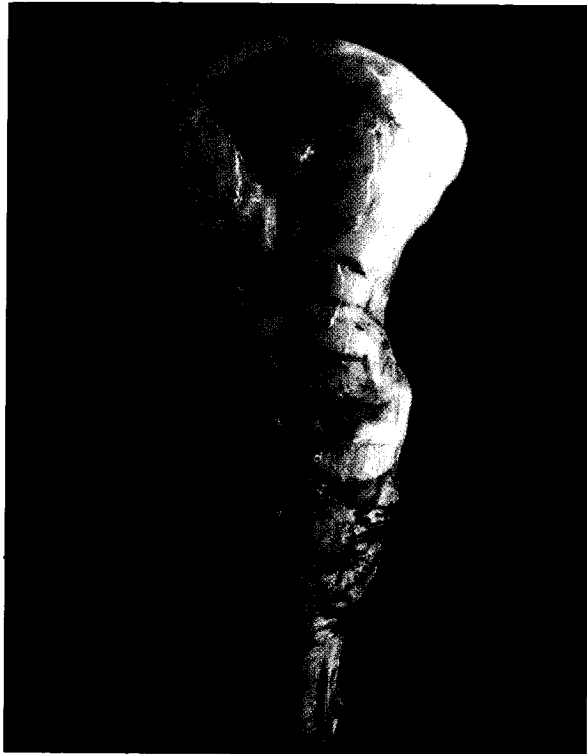
Figuur 2. Links: Oorspronkelijke obductiespatels (groen) voor het rund (groot) en het schaap (klein). Rechts: Recent ontwikkelde spatels (blauw) waarbij de verhevenheden in de holte van de spatels vervangen werden door een neerwaartse kromming van het spateloppervlak.



Figuur 3a. Obductie van de hersenstam bij het rund.

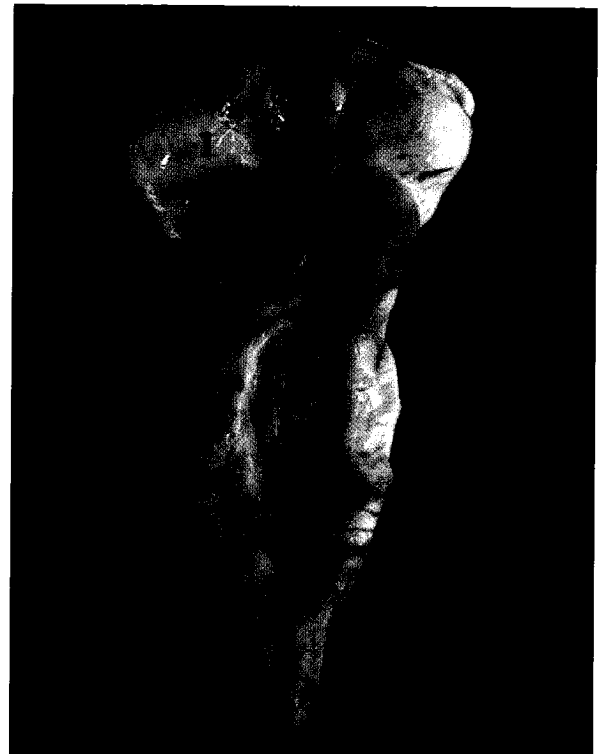


Figuur 3b. Obductie van de hersenstam bij het schaap



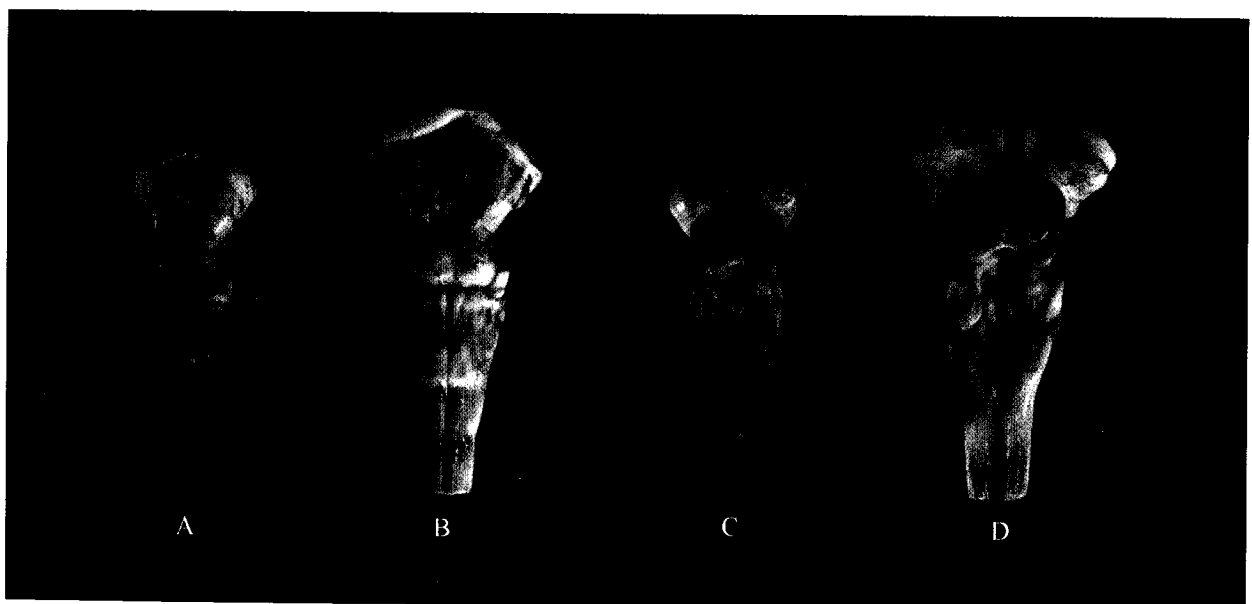
Figuur 4a. Ventraal aanzicht van de hersenstam en aansluitend ruggenmerg van een adult schaap.

1. Tractus opticus
2. Infundibulum
3. Corpus mamillare
4. Crus cerebri
5. Pons
6. Pyramis
7. Uittredeplaats van de twaalfde kopzenuw
8. Overgang van de hersenstam in het ruggenmerg
9. Ruggenmerg

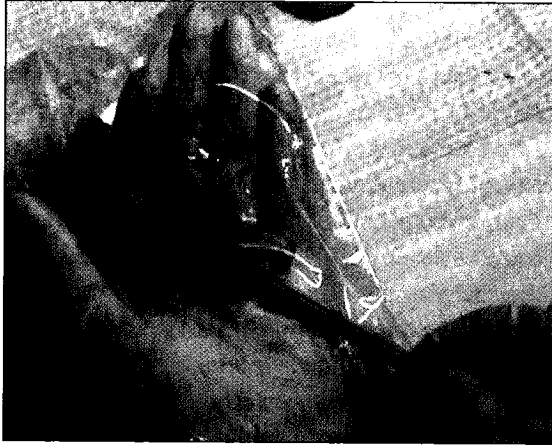


Figuur 4b. Dorsaal aanzicht van de hersenstam en aansluitend ruggenmerg van een adult schaap.

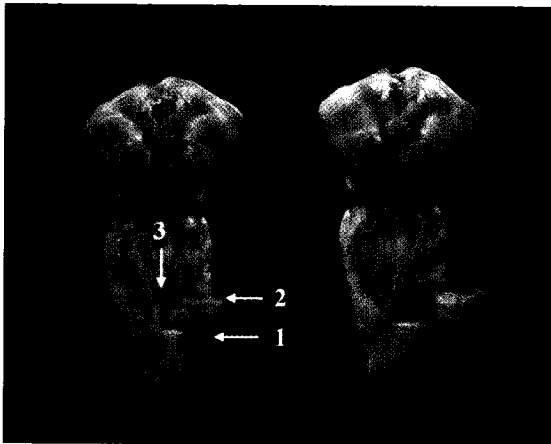
1. Thalamus
2. Epiphyse
3. Colliculus rostralis
4. Colliculus caudalis
5. Pedunculi cerebellares
6. Vierde hersenventrikel
7. Corpus restiforme
8. Obex
9. Overgang van de hersenstam in het ruggenmerg
10. Ruggenmerg.



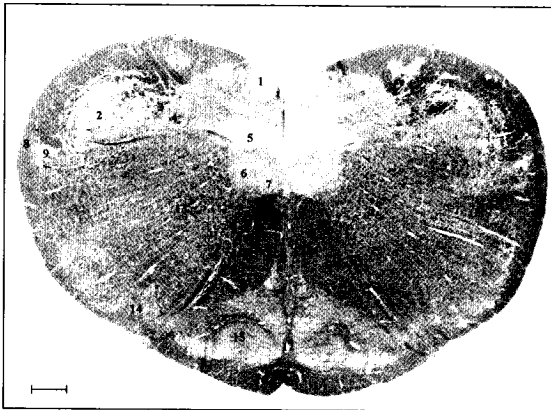
Figuur 5. Ventraal (A en B) en dorsaal (C en D) aanzicht van de hersenstam en aansluitend ruggenmerg van schaap (A en C) en rund (B en D).



Figuur 6. Staalname bij het rund.



Figuur 7. Staalname bij het schaap. De plaats van de incisies is met cijfers aangeduid.



Figuur 8. Histologisch beeld van een dwarse doorsnede doorheen de hersenstam van een adult schaap op het niveau van de obex. De gebruikte kleuring van Weil kleurt zenuwvezels donker (donkerblauw) en neuronlichamen bleek (lichtroze). (Maatstrep = 1mm)

DANKBETUIGING

Graag dank aan Ir. D. Debecker en Dr. M. Venturini van de firma Bio-Rad voor hun hulp bij de ontwikkeling van de methodiek. Eveneens willen wij aan E. Vanopdenbosch (CODA) onze dank betuigen voor het gegeven advies. Ook gaat onze dank uit naar B. De Pauw voor de fotografie en P. Vervaeet voor de technische bijstand.

LITERATUUR

- Butler D. (1998). Doubts over ability to monitor risks of BSE spread to sheep. *Nature* 395, 6-7.
- European Commission (2001). Commission Regulation (EC) no 1248/2001 of 22 June 2001.
- European Commission (2002). Extension of TSE tests in sheep and goats. Press release IP/02/255 of 14 February 2002.
- Foster J.D., Parnham D.W., Hunter N., Bruce M. (2001). Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *Journal of General Virology* 82, 2319-2326.
- Jeffrey M., Martin S., Gonzalez L., Ryder S.J., Bellworthy S.J., Jackman R. (2001). Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *Journal of Comparative Pathology* 125, 271-284.
- Peelman L.J., Van Poucke M. (2002). Genetische aspecten van scrapie bij schapen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 71, 2-10.
- Scientific Steering Committee (1998). Opinion of the Scientific Steering Committee of the European Commission on 'The risk of infection of sheep and goats with BSE agent'. Adopted on 24-25 September 1998.
- Scientific Steering Committee (2001). Opinion of the Scientific Steering Committee of the European Commission on 'Pre-emptive risk assessment should BSE in small ruminants be found under domestic conditions'. Adopted on 8-9 February 2001.
- Scientific Steering Committee (2002). Strategy to investigate the possible presence of BSE in sheep. Meeting of 4-5 April 2002.
- Venturini M., Simoens P., De Jaeger C. (2000). Obductie van runderhersen voor het BSE-onderzoek. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 69, 377-381.