

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA**

TANJA ŠVARA

**VPLIV GENOTIPA PRIONSKEGA PROTEINA NA
CELIČNO SESTAVO LIMFATIČNIH ORGANOV
ZDRAVIH OVC IN OVC, NARAVNO OKUŽENIH S
PRASKAVCEM**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2010

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA**

UDK 636:3.09:616.831–022.1:616.42:57.083.3(043.3)

mag. Tanja Švara, dr. vet. med.

**VPLIV GENOTIPA PRIONSKEGA PROTEINA NA CELIČNO
SESTAVO LIMFATIČNIH ORGANOV ZDRAVIH OVC IN
OVC, NARAVNO OKUŽENIH S PRASKAVCEM**

Doktorska disertacija

**ROLE OF PRION PROTEIN GENOTYPE IN THE
CELLULAR COMPOSITION OF LYMPHATIC ORGANS
OF HEALTY SHEEP AND SHEEP NATURALLY
INFECTED WITH SCRAPIE**

Doctoral Thesis

Ljubljana, 2010

mag. Tanja Švara, dr. vet. med.

**VPLIV GENOTIPA PRIONSKEGA PROTEINA NA CELIČNO SESTAVO
LIMFATIČNIH ORGANOV ZDRAVIH OVC IN OVC, NARAVNO OKUŽENIH S
PRASKAVCEM**

Delo je bilo opravljeno na:

Inštitutu za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo Veterinarske fakultete
Univerze v Ljubljani

Predstojnik inštituta: prof. dr. Vojteh Cestnik, dr. vet. med.

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne _____

Mentorica: prof. dr. Polona Juntos, dr. vet. med.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

prof. dr. Mara Popović, predsednica in članica

prof. dr. Vladka Čurin Šerbec, članica

prof. dr. Jelka Zabavnik Piano, članica

prof. dr. Milan Pogačnik, član

IZJAVA O DELU

Izjavljam, da je doktorsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Švara

V Ljubljani, 14. 1. 2010

KAZALO

SEZNAM OKRAJŠAV	8
IZVLEČEK	11
ABSTRACT	13
1 UVOD	15
2 PREGLED LITERATURE	18
2.1 PRENOSLJIVE SPONGIFORMNE ENCEFALOPATIJE	18
2.1.1 Splošno o prenosljivih spongiformnih encefalopatijah	18
2.1.2 Etiologija spongiformnih encefalopatij	19
2.1.3 Celični prionski protein in njegova vloga	20
2.1.4 Celični transport PrP ^{Sc}	23
2.1.5 Mehanizem delovanja PrP ^{Sc} v gostitelju	23
2.1.6 Sevi prionov, vrstna in transmissijska bariera	24
2.1.7 Fizikalno-kemijske lastnosti PrP ^{Sc} in njegova inaktivacija	25
2.2 PRASKAVEC	26
2.2.1 Splošno o praskavcu	26
2.2.2 Načini okužbe	27
2.2.3 Klinični znaki	28
2.2.4 Faktorji, ki vplivajo na dovzetnost in patogenezo praskavca	29
2.3 PATOLOŠKE SPREMEMBE PRI PRASKAVCU	31
2.3.1 Patohistološke spremembe pri praskavcu	31
2.3.2 Imunohistokemične značilnosti praskavca	33
2.3.3 Limfocitni infiltrati v možganih pri praskavcu	36
2.4 PROFIL GLIKOZILACIJE PRI PRASKAVCU	37
2.5 PATOGENEZA PRASKAVCA	38
2.5.1 Periferna ali limforetikularna faza bolezni	38
2.5.2 Nevroinvazija	39
2.6 VLOGA LIMFATIČNIH CELIC V PATOGENEZI PRASKAVCA	40
2.6.1 Limfociti B	40
2.6.2 Limfociti T	42
2.6.3 Folikularne dendritične celice	43
2.6.4 Makrofagi	44
2.6.5 Dendritične celice	45
2.7 PRASKAVEC IN SPREMEMBE V SESTAVI LIMFATIČNIH ORGANOV	46
3 NAMEN DELA	48
3.1 Hipoteze	48
4 MATERIALI IN METODE	49
4.1 Izbor živali in oblikovanje skupin	49
4.1.1 Testne skupine	50
4.1.2 Starost, spol in pasma živali	52
4.2 Odvzem vzorcev za preiskave in potrditev praskavca	53
4.3 Obdelava tkiv za patohistološko in imunohistokemično preiskavo	53
4.4 Barvanje s hematoksilinom in eozinom	54
4.5 Imunohistokemična preiskava	54

4.5.1	Postopek imunohistokemične preiskave za ugotavljanje prionov	54
4.5.2	Postopek imunohistokemičnega označevanja limfatičnih celic	56
4.5.2.1	Testiranje protiteles za imunofenotipizacijo celic limfatičnih organov na parafinskih tkivnih rezinah	56
4.5.2.2	Postopek imunohistokemičnega označevanja limfatičnih celic	58
4.5.3	Kontrole pri imunohistokemičnem označevanju prionov in limfatičnih celic	59
4.6	Kriteriji za ocenjevanje patohistoloških sprememb in imunohistokemične reakcije na prione.....	60
4.6.1	Ocena patohistoloških sprememb v področju obeksa.....	60
4.6.2	Ocena imunohistokemične reakcije na prione v področju obeksa	61
4.6.3	Ocena imunohistokemične reakcije na prione v limfatičnih organih	64
4.6.3.1	Preliminarne meritve za določitev velikosti vzorca za oceno imunohistokemične reakcije na prione v limfatičnih organih	64
4.6.3.2	Semikvantitativna ocena imunohistokemične reakcije na prione v limfatičnih organih	65
4.7	Morfometrična analiza.....	66
4.7.1	Preliminarne morfometrične meritve.....	66
4.7.1.1	Preliminarne meritve za določitev velikosti vzorcev za meritev arealne gostote profilov germinativnih središč	67
4.7.1.2	Preliminarne meritve za določitev velikosti vzorcev za meritev povprečnih sivin imunohistokemične reakcije za limfatične celice	67
4.7.2	Določitev korelacije med specifično vrednostjo povprečne sivine imunohistokemične reakcije in številom celic.....	68
4.7.3	Primerjava rezultatov meritev povprečnih sivin med vzorci, obdelanimi z mravljično kislino in vzorci, ki niso bili obdelani z mravljično kislino	68
4.7.4	Morfometrične meritve na limfatičnih organih testnih skupin.....	69
4.7.4.1	Merjenje arealne gostote profilov germinativnih središč	69
4.7.4.2	Meritve numerične gostote profilov germinativnih središč.....	70
4.7.4.3	Meritve povprečne sivine imunohistokemične reakcije za limfocite T in B ter aktivacije folikularnih dendritičnih celic v germinativnih središčih limfatičnih organov	70
4.7.4.4	Štetje limfocitov B in T v področju obeksa.....	72
4.8	Statistična analiza rezultatov	73
5	REZULTATI.....	75
5.1	Rezultati testiranja protiteles in optimizacije postopkov imunohistokemičnih preiskav.....	75
5.1.1	Rezultati optimizacije postopka imunohistokemičnega označevanja prionov z mišjim monoklonskim protitelesom 2G11	75
5.1.2	Rezultati testiranja protiteles za imunohistokemično označevanje limfatičnih celic.....	76
5.1.2.1	Rezultati testiranja protitelesa, ki označuje limfocite T	76
5.1.2.2	Rezultati testiranja protitelesa, ki označuje limfocite B	77
5.1.2.3	Rezultati testiranja protiteles, ki označujejo folikularne dendritične celice ..	77
5.1.2.4	Rezultati testiranja protiteles, ki označujejo makrofage.....	78
5.2	Rezultati kontrol pri imunohistokemičnem označevanju prionov in limfatičnih celic	79
5.3	Rezultati preliminarnih meritev za določitev velikosti vzorcev za morfometrične analize.....	79

5.3.1	Rezultati preliminarних meritev za določitev velikosti vzorca za meritve imunohistokemične reakcije na prione v limfatičnih organih	79
5.3.2	Rezultati preliminarних meritev za določitev velikosti vzorca za meritve arealne gostote profilov germinativnih središč	80
5.3.3	Rezultati preliminarних meritev za določitev velikosti vzorca za meritve povprečnih sivin imunohistokemične reakcije za limfatične celice	81
5.4	Rezultati meritev za določitev korelacije med specifično vrednostjo povprečne sivine imunohistokemične reakcije in številom celic	81
5.5	Rezultati primerjave meritev povprečnih sivin imunohistokemične reakcije med vzorci, obdelanimi z mravljično kislino, in vzorci, ki niso bili obdelani z mravljično kislino	82
5.6	Rezultati preliminarne imunohistokemične preiskave limfatičnih organov in obeksov ovc, negativnih v hitrem testu na TSE	85
5.7	Rezultati patohistološke preiskave obeksa testnih skupin	87
5.8	Rezultati imunohistokemične preiskave obeksa testnih skupin na prione	90
5.9	Rezultati imunohistokemične preiskave limfatičnih organov ovc testnih skupin na prione	97
5.10	Rezultati morfometričnih analiz	108
5.10.1	Meritve arealne gostote profilov germinativnih središč v limfatičnih organih	108
5.10.2	Meritve numerične gostote profilov germinativnih središč v limfatičnih organih	112
5.10.3	Rezultati meritev povprečne sivine imunohistokemične reakcije za limfocite T v germinativnih središčih limfatičnih organov	116
5.10.4	Rezultati meritev povprečne sivine imunohistokemične reakcije za limfocite B v germinativnih središčih limfatičnih organov	121
5.10.5	Rezultati meritev povprečne sivine imunohistokemične reakcije za folikularne dendritične celice v germinativnih središčih limfatičnih organov	126
5.10.6	Rezultati štetja limfocitov B in T v področju obeksa	131
5.10.6.1	Število limfocitov T v obeksu	131
5.10.6.2	Število limfocitov B v obeksu	133
6	DISKUSIJA	138
7	SKLEPI	152
8	POVZETEK	154
9	SUMMARY	157
10	ZAHVALA	161
11	LITERATURA	162

SEZNAM OKRAJŠAV

AB	Alzheimerjeva bolezen
APTES	3-aminopropiltrietsilan
AVG	angl. average; povprečje
BSE	angl. bovine spongiform encephalopathy; goveja spongiformna encefalopatija
CJB	Creutzfeldt-Jakobova bolezen
CWD	angl. chronic wasting disease; bolezen kroničnega hiranja jelenjadi
CŽS	centralni živčni sistem
CD	angl. cluster of differentiation; oznaka za različne membranske molekule belih krvnih teles
CRL	Centralni referenčni laboratorij Evropske skupnosti za TSE
DAB	3-diaminobenzidin
DC	dendritične celice
d/gCJB	dedna ali genetska Creutzfeldt-Jakobova bolezen
DNVN	angl. dorsal nucleus of the the vagal nerve; dorzalno jedro vagusnega živca
EUE	angl. exotic ungulate encephalopathy; encefalopatija eksotičnih sodoprstih kopitarjev
EŽS	enterični živčni sistem
FDC	folikularne dendritične celice
FFI	angl. fatal familial insomnia; usodna družinska nespečnost
FSE	angl. feline spongiform encephalopathy; spongiformna encefalopatija mačk
FU sev	angl. »fast« strain of CJD; »hitri« sev Creutzfeldt-Jakobove bolezni
GALT	angl. gut associated lymphoid tissue; črevesju pridruženo limfatično tkivo
GPI sidro	angl. glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor; glikofosfatidilizirano sidro
GSS	Gerstmann-Sträusslerjev-Scheinkerjev sindrom
iCJB	iatrogena Creutzfeldt-Jakobova bolezen
IL-1 α	interlevkin-1 α
IL-1 β	interlevkin-1 β
IL-2	interlevkin-2
IL-6	interlevkin-6

IFN- γ	interferon- γ
IP-10	angl. interferon-inducible protein-10; z interferonom induciran protein-10
IPSUV	Inštitut za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo Veterinarske fakultete
LT α	limfotoksin α
LT β R	angl. lymphotoxin- β receptor; receptor limfotoksina β
LT β R-Ig	angl. lymphotoxin- β receptor immunoglobulin fusion protein; fuzijski protein receptorja limfotoksina β in Ig
MIP-2	ang. macrophage inflammatory protein-2; makrofagni vnetni protein 2
MIP-1 β	angl. macrophage inflammatory protein beta; makrofagni vnetni protein 1 β
mRNA	angl. messenger ribonucleic acid; sporočilna ribonukleinska kislina
NGS	angl. normal goat serum; normalni kozji serum
NSP	angl. National Scrapie Plan; Nacionalni načrt za praskavec
OIE	International Office of Epizootic Diseases; Mednarodni urad za kužne bolezni
PB	Parkinsonova bolezen
PBS	angl. phosphate buffer saline; puferirana fiziološka raztopina
PHK	poglavitni histokompatibilnostni kompleks, sin. poglavitni kompleks tkivne skladnosti
<i>PRNP</i>	angl. prion protein gene; gen za prionski protein
PrP	prionski protein
PrP ^C	angl. cellular prion protein; normalni, celični prionski protein
PrP ^{Sc}	okr. scrapie prion protein; patološka oblika prionskega proteina
PŽS	periferni živčni sistem
RAG	angl. recombinase activating gene; rekombinacijo aktivirajoči gen
RANTES	angl. regulated upon activation normal T-cells expressed and secreted; citokin, ki deluje na spominske celice T CD4 ⁺ in monocyte
RML sev	angl. Rocky Mountain Laboratory scrapie strain; sev praskavca Rocky Mountain Laboratory
RSE	angl. relative standard error; relativna standardna napaka
SAF fibrile	angl. scrapie associated fibriles; SAF fibrile
SCID	angl. severe combined immunodeficiency; hudo kombinirano pomanjkanje imunosti
sCJB	sporadična Creutzfeldt-Jakobova bolezen

SE	angl. standard error; standardna napaka
STD	standardna deviacija
TGF- β	angl. transforming growth factor beta; transformirajoči rastni faktor- β
TME	angl. transmissible mink encephalopathy; prenosljiva encefalopatija nercev
TNFR 1	angl. tumor necrosis factor receptor 1; TNF receptor 1
TNF- α	angl. tumor necrosis factor-alpha; dejavnik tumorske nekroze alfa
TSE	transmisivne ali prenosljive spongiformne encefalopatije
vCJB	varianta ali nova različica Creutzfeldt-Jakobove bolezni
$\gamma\delta$ + T limfociti	limfociti z gama-delta T-celičnim receptorjem

IZVLEČEK

VPLIV GENOTIPA PRIONSKEGA PROTEINA NA CELIČNO SESTAVO LIMFATIČNIH ORGANOV ZDRAVIH OVC IN OVC, NARAVNO OKUŽENIH S PRASKAVCEM

Ključne besede: veterinarska medicina; praskavec – patologija; limfatični sistem – patologija; genotip; prioni; imunohistokemija – metode; ovce

V nalogi smo analizirati sestavo različnih limfatičnih organov in infiltrate limfocitov v možganih zdravih ovc in ovc, naravno okuženih s praskavcem, ter jih proučili v povezavi z genotipom prionskega proteina in akumulacijo prionov.

V našo raziskavo smo vključili 42 ovc iz dveh tropov, v katerih je bil diagnosticiran praskavec. Ovce smo razdelili na tri testne skupine: 1) skupino zdravih ovc brez praskavca, 2) skupino ovc v klinični fazi bolezni in 3) skupino ovc v predklinični fazi bolezni. Skupine smo razdelili na podskupine z različnimi genotipi prionskega proteina: VRQ/VRQ (zelo dovzetne za praskavec), ARQ/ARQ (srednje dovzetne za praskavec) in heterozigoti ARR/AHQ, ARR/ARH ali ARR/ARQ (slabo dovzetne za praskavec). Na parafinskih rezinah limfatičnih organov in obeksa smo imunohistokemično označili prione, limfocite B in T ter folikularne dendritične celice (FDC). Patohistološke spremembe v obeksu in imunohistokemično reakcijo na prione v obeksu ter limfatičnih organih smo ocenili subjektivno, celično sestavo limfatičnih organov in infiltrate limfocitov v obeksu pa smo analizirali morfometrično, s programom NIS Elements BR (Nikon). V germinativnih središčih vseh limfatičnih organov zdravih ovc zelo dovzetnega genotipa (VRQ/VRQ) smo ugotovili statistično značilno manjše število limfocitov T in B, v mezenterialnih bezgavkah pa manjšo aktivacijo FDC kot pri genotipu ARQ/ARQ ($P < 0,05$), medtem ko glede numerične in arealne gostote profilov germinativnih središč nismo našli razlik ($P > 0,05$). Pri VRQ/VRQ ovcah v klinični fazi praskavca se je povečalo število germinativnih središč limfatičnih foliklov ($P < 0,05$) in število limfocitov B ter T ($P < 0,05$). Povečala se je tudi aktivacija FDC v bezgavkah ($P < 0,05$) v primerjavi z zdravimi ovcami. Pri okuženih ARQ/ARQ ovcah v predklinični fazi se je blago, vendar ne značilno pomembno, zmanjšalo število limfocitov T ($P > 0,05$), statistično značilno se je zmanjšalo število limfocitov B v bezgavkah, tonzili in vranici ($P < 0,05$), pri

ovcah v klinični fazi pa se je statistično značilno zmanjšala aktivacija FDC v mezenterialni bezgavki, tonzili in vranici ($P < 0,05$) ter površina germinativnih središč limfatičnih foliklov v mezenterialni bezgvaki ($P < 0,05$). Pri ovcah genotipa VRQ/VRQ v klinični fazi bolezni so bile numerične gostote germinativnih središč v vranici višje kot pri genotipu ARQ/ARQ ($P < 0,05$), število limfocitov B in aktivacija FDC sta bila nekoliko nižja, število limfocitov T pa nekoliko višje, vendar te razlike niso bile statistično značilne ($P > 0,05$).

Poleg tega smo pri obeh genotipih ovc v pozni, klinični, fazi bolezni v parenhimu obeksa našli povečano število limfocitov T v parenhimu dorzalnega jedra vagusnega živca (angl. dorsal nucleus of the vagus, DNVN) in olivarnih jeder, ki je bilo v visoki pozitivni korelaciji s stopnjo spongiformnih sprememb in odlaganjem prionov v obeksu ($P < 0,001$) (rho za korelacijo s spongiformnimi spremembami 0,7493, rho za korelacijo z odlaganjem prionov = 0,6571).

Dokazali smo, da se mikroarhitektura limfatičnih organov zdravih ovc razlikuje glede na polimorfizem gena *PRNP* na kodonih 136, 154 in 171, da naravna okužba s praskavcem v limfatičnih organih ovc povzroči spremembe celične sestave teh organov, ki so povezane z genotipom, in da se pri ovcah z naravnim praskavcem v možganih, poleg značilnih patohistoloških sprememb, pojavijo tudi infiltrati limfocitov T.

ABSTRACT

ROLE OF PRION PROTEIN GENOTYPE IN THE CELLULAR COMPOSITION OF LYMPHATIC ORGANS OF HEALTHY SHEEP AND SHEEP NATURALLY INFECTED WITH SCRAPIE

Key words: veterinary medicine; scrapie – pathology; lymphatic system – pathology; genotype; prion ; immunohistochemistry – methods; sheep

In our study, we researched the cellular composition of several lymphatic organs and lymphocytic infiltrates in the brains of healthy sheep and sheep, naturally infected with scrapie, in correlation with the PrP genotype and the accumulation of prions.

Forty-two sheep from two scrapie affected flocks were included in our study. Sheep were divided into three testing groups: 1) a group of healthy sheep without scrapie, 2) a group of sheep in the clinical phase of scrapie, and 3) a group in the preclinical phase of scrapie. The testing groups were divided into subgroups with different PrP genotypes: VRQ/VRQ (the most scrapie-susceptible genotype), ARQ/ARQ (medium susceptibility to scrapie) and heterozygote of allele ARR with allele ARQ (weakly susceptible to scrapie). The paraffin tissue sections of lymphatic organs and obex were immunohistochemically stained for prions, B and T lymphocytes and follicular dendritic cells. Histopathological lesions in the obex region and immunohistochemical labelling of prions in lymphatic organs and obex were evaluated semiquantitatively. The cellular composition of several lymphatic organs and lymphocytic infiltrates in obex were analyzed morphometrically by using the NIS Elements BR (Nikon) software. A statistically significant lower number of B and T lymphocytes was found in the germinal centres of all lymphatic organs and a significantly lower activation of follicular dendritic cells was observed in the mesenteric lymph nodes of the healthy sheep with the VRQ/VRQ genotype in comparison to the ARQ/ARQ genotype ($P < 0.05$); however there were no differences observed regarding the areal and numerical density of the germinal centres ($P > 0.05$). The number of germinal centres of lymph follicles of all lymphatic organs, the number of B and T lymphocytes and the activation of follicular dendritic cells in mesenteric and retropharyngeal lymph nodes were higher in the sheep in the clinical group with the

VRQ/VRQ genotype, in comparison to the group of healthy sheep ($P < 0.05$). The number of T lymphocytes in the organs of sheep with the ARQ/ARQ genotype in the preclinical phase of infection was slightly lower than in the healthy sheep ($P > 0.05$). Besides, the number of B lymphocytes in the lymph nodes, tonsil and spleen was significantly lower in the sheep in the preclinical phase ($P < 0.05$) and the activation of follicular dendritic cells was significantly lower in the clinical phase of infection ($P < 0.05$).

A comparison between the VRQ/VRQ and the ARQ/ARQ genotype in the clinical phase of infection showed a higher number of germinal centers in the spleen ($P < 0.05$), a lower number of B lymphocytes and a lower activation of follicular dendritic cells, and a higher number of lymphocytes T in the VRQ/VRQ genotype; however these differences were not statistically significant ($P > 0.05$).

In both genotypes, the number of T lymphocytes in the parenchyma of the dorsal nucleus of the vagus nerve and the olivary nuclei were higher than in the sheep in the preclinical phase of infection and in the healthy sheep, and was in a high positive correlation with spongiform lesions and the accumulation of prions in the obex ($P < 0.001$) (rho for correlation with spongiform lesions = 0.7493, rho for correlation with accumulation of prions = 0.6571).

We concluded that the microarchitecture of lymphatic organs in the healthy sheep varies according to the *PRNP* gene polymorphism at codons 136, 154 and 171. We also concluded that the natural scrapie infection causes changes in the cellular composition of lymphatic organs, which depend on the polymorphism of *PRNP* gene and that in sheep, naturally infected with scrapie, besides pathognomonic spongiform lesions, also infiltrates of T lymphocytes appear in the brain.

1 UVOD

Praskavec je bolezen ovc in koz iz skupine transmisibilnih ali prenosljivih spongiformnih encefalopatij (TSE) ali prionskih bolezni, med katere uvrščamo nevrodegenerativne bolezni ljudi ter živali, kot so praskavec, goveja spongiformna encefalopatija (angl. bovine spongiform encephalopathy, BSE), bolezen kroničnega hiranja jelenjadi (angl. chronic wasting disease, CWD) in Creutzfeldt Jakobova bolezen (CJB).

Pri ovcah poznamo tipični ali klasični praskavec (v nadaljevanju praskavec) in atipični praskavec (Benestad in sod., 2003; Benestad in sod., 2008), ovce pa so dovzetne tudi za okužbo z BSE (van Keulen in sod., 2008).

Značilne patomorfološke spremembe, ki se pojavljajo v možganih so pri vseh TSE podobne. Pojavljajo se degenerativne spremembe nevronov in zmanjšanje njihovega števila, vakuolizacija nevronov in nevitov (t. i. spongiformne spremembe), reaktivna astroglioza ter mikroglioza (Lefrancois in sod., 1994; Wood in sod., 1997). Etiologija TSE še vedno ostaja kontroverzna, čeprav številne raziskave govorijo v prid t. i. »protein-only« hipotezi, ki jo je oblikoval Prusiner (1982). Po tej hipotezi je povzročitelj TSE majhen beljakovinski delec brez nukleinske kisline, ki nastane po pretvorbi normalnega, celičnega prionskega proteina (PrP^{C}) v patološko obliko (PrP^{Sc}), ki jo je Nobelov nagrajenec za medicino poimenoval prion (Prusiner, 1982).

Dovzetnost ovc za praskavec je odvisna od več dejavnikov – genotipa prionskega proteina (genotip PrP), pasme in starosti živali, seva povzročitelja in dejavnikov okolja (Goldmann in sod., 1994; Hunter in sod., 1994; Elsen in sod., 1999). Polimorfizmi gena za prionski protein (gen *PRNP*), ki so najpomembnejši za dovzetnost ali odpornost na praskavec, so na kodonih 136, 154 in 171. Ti polimorfizmi oblikujejo pet alelov (VRQ, ARQ, AHQ, ARR in ARH), ki se lahko kombinirajo v petnajstih možnih genotipov. Glede na dovzetnost za praskavec so genotipi v National Scrapie Plan (NSP) razvrščeni v pet skupin (DEFRA, 2003) – valin (V) na položajih 136 in glutamin (Q) na položaju 171 sta pogosta v genomu pasem ovc, ki so močno dovzetne za praskavec, medtem ko je alel ARR povezan z večjo odpornostjo na praskavec (Hunter in sod., 1994; Tranulis in sod., 1999; DEFRA, 2003).

Pri ovcah se po okužbi prioni najprej pojavijo v limfatičnih organih, to je t. i. periferna patogeneza ali limforetikularna faza bolezni. V limfatičnih organih se PrP^{Sc} kopiči večinoma v germinativnih središčih limfatičnih foliklov – v citoplazmi makrofagov ali na površini FDC (van Keulen in sod., 1996; Heggebo in sod., 2002; Ersdal in sod., 2003). Na patogenezo praskavca pomembno vpliva tudi genotip PrP. Pri zelo dovzetnih genotipih sta inkubacijska doba in doba preživetja krajši (Goldmann in sod., 1994), pri heterozigotnih genotipih, ki imajo dva različna alela *PRNP*, je PrP^{Sc} v perifernih tkivih manj, hkrati pa se okužba v organizmu širi počasneje (Van Keulen in sod., 1996; Heggebo in sod., 2002; Ersdal in sod., 2003). Kljub številnim raziskavam še vedno ni povsem jasna vloga posameznih vrst limfatičnih celic v patogenezi, predvsem njihova vloga pri replikaciji in širjenju povzročitelja po organizmu (Weissmann in sod., 2001; Aguzzi in sod., 2003).

Dolgo je veljalo, da pri praskavcu v limfatičnih organih ni morfoloških sprememb, v zadnjem času pa so nekateri avtorji dokazali, da se pri miškah, okuženih s sevom praskavca ME7, in ovcah, po eksperimentalni okužbi, vendarle pojavijo morfološke spremembe, kot so povečanje števila germinativnih središč, hipertrofija ter hiperplazija podaljškov FDC, povečano število makrofagov in limfocitov B v sekundarnih limfatičnih foliklih vranice (McGovern in sod., 2004; McGovern in Jeffrey, 2007) ter povečano število CD21⁺ celic v bezgavkah (Eaton in sod., 2007).

Kopičenju in replikaciji PrP^{Sc} v limfatičnih organih sledi nevroinvazija, za katero so McBride in sodelavci (2001) dokazali, da poteka od enteričnega živčnega sistema (EŽS) preko perifernih živcev do prsnega dela hrbtenjače in možganskega debla. V možganih se po kopičenju PrP^{Sc} pojavijo patognomonične patološke spremembe (Lefrancois in sod., 1994; Wood in sod., 1997; Glatzel in sod., 2005). V nasprotju s prepričanjem, da se pri TSE ne pojavljajo infiltrati vnetnih celic v možganih, so Lewicki in sodelavci (2003) opisali infiltrate limfocitov T v parenhimu možganov mišk, eksperimentalno okuženih s praskavcem in bolnikov s CJB. V literaturi zaenkrat ni podatkov, ali se tudi pri ovcah, naravno okuženih s praskavcem, pojavijo infiltrati limfocitov v možganih.

V literaturi tudi nismo našli podatkov o morebitnih razlikah v sestavi limfatičnih organov pri zdravih ovcah različnih genotipov PrP, prav tako nismo našli tovrstnih podatkov za ovce, naravno okužene s praskavcem. Zaenkrat še ni znano, ali je sestava limfatičnih organov povezana z genotipom PrP in ali lahko vpliva na dovzetnost za okužbo s praskavcem ter na širjenje prionov iz limfatičnih organov v živčni sistem. Ni še znano, ali okužba s

povzročiteljem praskavca v limfatičnih organih ovc povzroči kakšne morfološke spremembe, in če jih, ali se te razlikujejo pri različnih genotipih, prav tako ni znano, ali se tudi pri naravnem praskavcu pojavijo infiltrati limfocitov v možganih in če je njihovo pojavljanje povezano z genotipom PrP ali fazo bolezni.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 PRENOSLJIVE SPONGIFORMNE ENCEFALOPATIJE

2.1.1 Splošno o prenosljivih spongiformnih encefalopatijah

Prenosljive spongiformne encefalopatije (ang. transmissible spongiform encephalopathy, TSE) ali prionske bolezni so skupina prenosljivih, progresivnih, nevrodegenerativnih bolezni z zelo dolgo inkubacijsko dobo, ki se pojavljajo pri ljudeh in živalih ter se vedno končajo s smrtjo. Med prionske bolezni uvrščamo klasični in atipični praskavec ovc in koz, govejo spongiformno encefalopatijo (angl. bovine spongiform encephalopathy, BSE), bolezen kroničnega hiranja jelenjadi (angl. chronic wasting disease, CWD), prenosljivo encefalopatijo nercev (angl. transmissible mink encephalopathy, TME), spongiformno encefalopatijo mačk (angl. feline spongiform encephalopathy, FSE), encefalopatijo eksotičnih sodoprstih kopitarjev (angl. exotic ungulate encephalopathy, EUE) pri živalih ter kuru, Creutzfeldt-Jakobovo bolezen (CJB), usodno družinsko nespečnost (angl. fatal familial insomnia, FFI), in Gerstmann-Sträusslerjev-Scheinkerjev sindrom (GSS) pri ljudeh (Collinge, 2001; Aguzzi, 2006; Ryou, 2007). CJB je edina prionska bolezen ljudi, ki se lahko pojavi v treh etiopatogenetskih oblikah: spontani ali sporadični, dedni oz. genetski in kužni. Sporadična CJB (sCJB) je najpogostejša in se pojavlja z incidenco 1–2/milijon prebivalcev/leto. Dedna ali genetska CJB (d/gCJB) se pojavi zaradi točkovnih mutacij ali insercij v genu *PRNP*. Kužna oblika CJB se razvije po okužbi človeka s prioni, bodisi po zaužitju hrane, kontaminirane s prioni (nova različica CJB, vCJB), ali po medicinskem posegu, pri katerem je bil uporabljen s prioni okužen material (iatrogena CJB, iCJB) (Collinge, 2001; Ryou, 2007).

Značilne patomorfološke spremembe, ki se pojavljajo v možganih, so pri vseh TSE podobne. Pojavlja se vakuolizacija nevronov in nevritov, t. i. spongiformne spremembe, propadanje in zmanjšanje števila nevronov, reaktivna astroglioza in mikroglioza (Lefrancois in sod., 1994; Wood in sod., 1997; Glatzel in sod., 2005), ki jih spremlja kopičenje patološkega prionskega proteina, PrP^{Sc} (van Keulen in sod. 1996; Ryder in sod., 2001; Gonzalez in sod., 2002). Za razliko od bakterijskih in virusnih povzročiteljev bolezni naj prioni ne bi izzvali vnetne reakcije v tkivih ter nastanka protiteles (Glatzel in sod., 2005).

2.1.2 Etiologija spongiformnih encefalopatij

Kljub dolgi zgodovini pojavljanja nekaterih TSE in številnim raziskavam na tem področju je njihova etiologija še vedno kontroverzna. V preteklosti so raziskovalci postavljali različne hipoteze o povzročiteljih. Ti naj bi bili med drugim paraziti iz rodu sarkosporidij (M'Fadyean, 1918), filtrabilen (angl. filtrable) virus (Cuille in Chelle, 1939; Cho, 1976), majhen DNA virus (Kimberlin in Hunter, 1967), replicirajoči protein (Pattison in Jones, 1967), replicirajoči abnormalni polisaharid znotraj membran (Hunter in sod., 1968), DNA subvirus (Adams in Field, 1968; Adams, 1970), provirus (Parry, 1962), gola nukleinska kislina podobna rastlinskemu viroidu (Diener, 1972), neobičajni virus (Stamp, 1967; Gajdusek, 1977), replicirajoči polisaharid (Field, 1966), nukleoproteinski kompleks (Latarjet in sod., 1970), nukleinska kislina, obdana s polisaharidnim plaščem (Narang, 1974; Siakotos in sod., 1979), organizem, podoben spiroplazmi (Bastian, 1979), sistem z več komponentami (Hunter in sod., 1973) ali na membrano vezana DNA (Hunter in sod., 1973; Marsh in sod., 1978).

Trenutno je v veljavi t. i. »protein-only« hipoteza, ki jo je postavil Prusiner in zanjo leta 1997 dobil tudi Nobelovo nagrado za medicino (Prusiner, 1982; Prusiner, 1998). Po tej hipotezi je povzročitelj prionskih bolezni prion (okr. angl. **p**roteinaceous **i**nfectious particle **only**), majhen beljakovinski delec brez nukleinske kisline. Za prion ali patološki prionski protein se v strokovni literaturi poleg okrajšave PrP^{Sc} (Sc = okr. angl. scrapie) uporabljajo še okrajšave PrP^{res} (res = okr. angl. protease resistant), PrP^d (d = okr. angl. disease-associated) (Jeffrey in Gonzalez, 2007) in PrP^{TSE} (Cardone in sod., 2009).

Znanstveniki predvidevajo, da so prioni večinoma ali izključno sestavljeni iz PrP^{Sc}, nekaj prehodnih oblik PrP^{Sc}, ki so morda združene v oligomere, in drugih proteinov ali neproteinskih sestavin, ki so lastni gostitelju, npr. glikozaminoglikani ali kratke nukleinske kisline (Aguzzi in sod., 2007).

Ključni dogodek v patogenezi prionskih bolezni naj bi bila pretvorba normalnega, celičnega prionskega proteina, PrP^C (C = okr. angl. cellular) v patološko obliko, PrP^{Sc}, pri čemer se spremeni terciarna struktura iz alfa helične v PrP^C, v beta nagubano v patološki obliki PrP^{Sc} (Prusiner, 1982). Pretvorba PrP^C v PrP^{Sc} se zgodi na celični membrani ali med procesom endocitoze s klatrinom prevlečenih jamic ali kaveol (Prusiner, 1998; Harris, 1999). PrP^{Sc} lahko

ostane vezan na celični membrani, lahko se vključi v proces polimerizacije in nastanka fibrilarnih struktur, amiloidnih plakov ali pa se kopiči v lizosomih (Caughey in sod., 1991; Fournier in Grigoriev, 2001).

Natančen način replikacije PrP^{Sc} še danes ni znan, obstajata pa najmanj dve razlagi. Po t. i. heterodimerni hipotezi naj bi ena sama molekula PrP^{Sc}, ki pride v organizem od zunaj, sprožila spremembo konformacije PrP^C. Molekula, ki nastane po interakciji eksogenega PrP^{Sc} in endogenega PrP^C naj bi služila kot šablona za nastanek novega PrP^{Sc} (Prusiner, 1998). Po drugi, nukleacijsko polimerizacijski hipotezi, naj bi bila PrP^C in PrP^{Sc} v zdravem organizmu v termodinamičnem ravnotežju, ki je v prid PrP^C. V primeru prionske bolezni naj bi kompleksno urejeni (angl. highly ordered) agregati PrP^{Sc} molekul, t. i. »kužna semena«, delovali kot dejavnik, ki bi pritegnil monomerne molekule PrP^C v infekcijske agregate. Po fragmentaciji agregatov PrP^{Sc} naj bi se povečalo število semen, ki pritegnejo dodatne monomere PrP^{Sc}. Po tej teoriji je PrP^{Sc} kužen le, če se pojavi v obliki velikih kompleksno urejenih agregatov (Jarrett in Lansbury Jr., 1993). Nobena od teh dveh hipotez še ni bila potrjena, vendar rezultati doslej izvedenih poskusov govorijo v prid drugi (King in Diaz-Avalos, 2004; Tanaka in sod., 2004).

2.1.3 Celični prionski protein in njegova vloga

Glavno vlogo v patogenezi TSE ima PrP^C. PrP^C je visoko konzerviran, 32 do 35 kDa velik sialoglikoprotein. Kodira ga gen *PRNP*, ki pri ljudeh in šimpanzih leži na kromosomu 20, pri ovcah, kozah in govedu pa na kromosomu 13 (Ryou, 2007). Gen *PRNP* je dolg približno 21 kbp in ima tri (ovca, govedo in miši) ali dva (človek, hrček) eksona (Fournier in Grigoriev, 2001; Glatzel in sod., 2005). Eksona I in II sta kratka, dolžine do 100 bp, in oblikujeta 5'UTR neprevedeno območje prepisa. Ekson III je dolžine približno 4 kbp in vsebuje celotni bralni okvir ter neprevedeno 3'UTR območje prepisa. Introna I in II sta velika približno 2,5 kbp in 14 kbp. Sporočilna RNA (angl. messenger ribonucleic acid, mRNA) prežvekovalcev je velika približno 4,6 kb. Pri ovcah in kozah se lahko kot posledica alternativne poliadenilacije v perifernih tkivih pojavijo krajše mRNA, dolžine približno 2,1 kb. Območje gena, ki deluje kot promotor, regulira nastajanje mRNA in tako v veliki meri tudi nivo izražanja PrP^C (Goldmann, 2008).

Človeški PrP^C je sestavljen iz 253 aminokislin, od tega 22 aminokislin sestavlja signalni peptid na N-koncu, 31 aminokislin pa kodira peptid na C-koncu, ki se med translacijo odcepita. Zrela oblika PrP^C ima 100 aminokislinskih ostankov dolgo N- terminalno področje in enako dolg C-terminalni segment. N-konec vsebuje področje s petimi ponavljajočimi se oktapeptidi, kjer so mesta vezave bakrovih ionov. Osrednji in C-konec oblikujejo tri alfa helične strukture in dve mali beta nagubani ravnini. Ta del je stabilizira disulfidna vez med drugo in tretjo vijačnico (Jackson in Collinge, 2001). Po translaciji se PrP^C modificira z glikozilacijo na aminokislinskih ostankih 181 in 197 ter z dodajanjem glikofosfatidiliziranega (GPI) sidra na aminokislinskem ostanku 230. PrP^C je s sidrom pritrjen v celično membrano v specializiranih, na detergente odpornih mikrodomenah, ki jih imenujemo rafti (Drisaldi in sod., 2003). Kot možne ligande PrP^C navajajo več različnih molekul, zaenkrat še ni znano, katera je glavni ligand (Lee in sod., 2005).

PrP^C se sintetizira v endoplazemskem retikulumu, nato se glikozilira v Golgijevem aparatu in se končno transportira do celične membrane, v kateri je pritrjen z GPI sidrom (Liberski in sod., 2008). V celici lahko kroži med celično membrano in endosomi, preko njih lahko pride do lizosomov, kjer se razgradi ali se vrača do celične membrane (Naslavsky in sod., 1997; Drisaldi in sod., 2003). Sintetizira in razgrajuje se zelo hitro – v manj kot eni uri po začetku sinteze najdemo molekulo že na površini celice (Caughey in Raymond, 1991; Prusiner, 1998), razpolovna doba PrP^C pa je v mišjih splenocitih in nevronih približno 1,5 do 2 uri (Parizek in sod., 2001).

Največ PrP^C je v možganih (Moudjou in sod., 2001; Diaz-San Segundo in sod., 2006). Tam ga najdemo večinoma v nevropilu, v manjši meri pa tudi na celičnih membranah nevronov. Stopnja izražanja PrP^C je odvisna od nevroanatomskega področja in živalske vrste. Na splošno velja, da je količina PrP^C signifikantno višja v sivini (Diaz-San Segundo in sod., 2006). PrP^C so v manjših količinah našli tudi v nevroendokrinih celicah črevesnega epitela vseh delov prebavnega trakta goveda in podgane (Pammer in sod., 1999; Marcos in sod., 2004), v Peyerjevih ploščah, podsluznici, mišični plasti in avtonomnem živčevju črevesa, v vranici in bezgavkah jagnjet (Austbo in sod., 2006), skeletni in srčni mišičnini (Bendheim in sod., 1992; Ning in sod., 2005), pljučih, jajčnikih in modih (Bendheim in sod., 1992) in ledvicah hrčkov (Ning in sod., 2005) ter različnih telesnih tekočinah – človeškem in ovčjem mleku, urinu, krvni plazmi, cerebrospinalni tekočini ovc in semenski plazmi ovnov (Gatti in sod., 2002;

Franscini in sod., 2006; Picard-Hagen in sod., 2006; Andrievskaia in sod., 2008). V periferni krvi so PrP^C našli na celičnih membranah limfocitov T in B, monocitov, nevtrofilnih granulocitov, trombocitov in v citoplazmi trombocitov človeka, miši (Holada in Vostal, 2000) in ovc (Herrmann in sod., 2001; Halliday in sod., 2005).

Živali, ki so dovzetne za praskavec, imajo v periferni krvi večje število celic, ki izražajo PrP^C in zato večjo možnost, da pride do spremembe v PrP^{Sc} (Thackray in sod., 2006; Eaton in sod., 2007).

Kakšna je vloga PrP^C v organizmu še ni natančno znano. Večina doslej opravljenih raziskav je bila usmerjena predvsem v proučevanje vloge PrP^C v patogenezi TSE. Bueler in sodelavci (1993) so ugotovili, da je izražanje PrP^C pogoj za okužbo s prioni ter njihovo širjenje v centrali živčni sistem (CŽS). Znano je, da so miške z izbitim genom za PrP^C odporne na periferno in intracerebralno okužbo s prioni, pri miškah, ki izražajo manjše količine PrP^C, pa se klinični znaki ter patomorfološke spremembe pojavijo kasneje in so v korelaciji s stopnjo izražanja PrP^C (Manson in sod., 1994). Z *in vitro* poskusi so dokazali, da lahko z vezavo monoklonskega protitelesa proti PrP^C na površino celic preprečimo širjenje PrP^{Sc} in celo odstranimo že prej nastalega (Peretz in sod., 2001). Deplecija nevronskega PrP^C pri miškah, okuženih s prioni, povzroči izginotje začetnih spongiformnih sprememb, prepreči izgubo nevronov in tako zaustavi napredovanje bolezni v klinično fazo (Mallucci in sod., 2003). Imunizacija, s katero so povzročili nastanek protiteles proti PrP^C je pri miškah povzročila zmanjšanje količine perifernega PrP^{Sc} in podaljšala inkubacijsko dobo (White in sod., 2003). V možganih naj bi PrP^C sicer sodeloval tudi pri razvoju CŽS in prenosu signalov, vplival na rast nevrinov, ščitil nevrone pred apoptozo in paradoksalno – deloval proapoptotično, vezal baker in ščitil pred njegovo toksičnostjo, deloval antioksidativno, sodeloval pri obnavljanju hematopoetičnih zarodnih celic in vzpostavljanju praga za krče (angl. seizure threshold), vplival na regulacijo cirkadianega ritma, nastanek spomina in pomnenje (Tobler in sod., 1996; Brown in sod., 1997; Walz in sod., 1999; Mouillet-Richard in sod., 2000; Chacon in sod., 2003; Roucou in sod., 2004; Criado in sod., 2005; Zhang in sod., 2006; Hu in sod., 2007). Natančna vloga PrP^C v limfatičnem sistemu ostaja zaenkrat še neznana. Znano je le, da PrP^C sodeluje pri aktivaciji in proliferaciji limfocitov T ter njihovi interakciji z dendritičnimi celicami (Cashman in sod., 1990; Mabbott in sod., 1997; Bainbridge in Walker, 2005; Hu in sod., 2007).

2.1.4 Celični transport PrP^{Sc}

Pri okužbi s prioni celice vežejo in internalizirajo PrP^{Sc}. Pri tem procesu v različnih celicah sodelujejo različni receptorji, kot so receptorji za heparan sulfat (Horonchik in sod., 2005), receptor laminina (Morel in sod., 2005) ali feritinski transporterji (Mishra in sod., 2004). Novi PrP^{Sc} nastaja že na celični membrani in/ali med potjo endosomov do lizosomov (Caughey in sod., 1991; Borchelt in sod., 1992), lahko pa tudi izvencelično (Chesebro in sod., 2005).

V živčnih celicah najdemo PrP^{Sc} v poznih endosomih, odkoder se nato transportira v veziklih vzdolž nevritov do mesta, kjer pride nevron v stik s sosednjim nevronom (Magalhaes in sod., 2005). PrP^{Sc} se lahko sprostí iz celice v obliki delcev, ki so podobni veziklom ali eksosomom, ti delci pa se zlijejo z membranami drugih celic in tako lahko širijo okužbo med celicami (Fevrier in sod., 2004).

2.1.5 Mehanizem delovanja PrP^{Sc} v gostitelju

Mehanizem nastanka spongiformnih sprememb in izgube nevronov zaenkrat še ni popolnoma pojasnjen. Obstaja več hipotez, ki jih lahko razdelimo na dve večji skupini. Prve poškodbe povezujejo s kopičenjem PrP^{Sc} v celicah gostitelja, ki ga ne morejo razgrajevati in se zato v njih progresivno kopiči. Druge hipoteze pa poškodbe nevronov povezujejo z zmanjšano količino PrP^C in izgubo ali zmanjšanjem njegove fiziološke funkcije.

Po eni od hipotez naj bi PrP^{Sc} na nevrone deloval toksično. Peptidni fragment, v katerem so aminokislinski ostanki 106–126 ima *in vitro* dokazano neposreden nevrotoksičen učinek (Forloni in sod., 1993). PrP^{Sc} lahko deluje nevrotoksično tudi posredno, preko aktivacije glija celic, ki izločajo citokine in druge toksične snovi (Brown in sod., 1996; Hetz in sod., 2003; Marella in sod., 2005). Nevroni, ki ne izražajo PrP^C, so odporni na toksično delovanje PrP^{Sc} (Bueler in sod., 1993; Brown in sod., 1994).

PrP^C sodeluje tudi pri apoptozi in lahko deluje pro- in antiapoptotično. Apoptoza je bila kot oblika celične smrti ugotovljena pri prionskih boleznih človeka in različnih živalskih vrstah (Fairbairn in sod., 1994; Giese in sod., 1995). Apoptoza se lahko sproži zaradi spremembe

delovanja PrP^C, delovanja peptidnih fragmentov PrP 106–126 in PrP 118–135 ali mikroglija celic, ki izločajo toksične snovi (Liberski in sod., 2008). Pogosto se z apoptozo prepleta tudi avtofagija, ki jo lahko sprožijo tudi apoptotični stimulansi (Boellaard in sod., 1991; Sikorska in sod., 2007).

Zaradi kopičenja PrP^{Sc} se lahko inhibira antioksidativno delovanje PrP^C, zmanjša aktivnost drugih antioksidativnih encimov, kar privede do povečanega oksidativnega stresa, velike količine prostih radikalov in poškodb nevronov (Forloni in sod., 1993; Brown in sod., 1997; Liberski in sod., 2008). Izguba PrP^C lahko moti tudi prenos signalov za zaščito nevronov, pri katerem sicer ta protein sodeluje in tako posredno povzroči nevrodegenerativne spremembe (Brandner in sod., 1996; Kuwahara in sod., 1999).

2.1.6 Sevi prionov, vrstna in transmissijska bariera

Ena od značilnosti TSE je obstoj več različnih sevov povzročitelja. Sev priona je izolat povzročitelja, ki po prenosu na isto vrsto gostitelja povzroči enak fenotip prionske bolezni. Med fenotipske značilnosti določenega seva priona spadajo dolžina inkubacijske dobe, profil patohistoloških sprememb in imunohistokemične reakcije (Aguzzi in sod., 2007) ter odpornost na delovanje proteinaz (Madec in sod., 1997). K celostni informaciji o določenem sevu povzročitelja spadajo podatki o njegovih biokemičnih lastnostih, kot so delež glikoziliranih molekul in velikost sredice PrP^{Sc}, odporne proti proteinazi K ter njena mobilnost na elektroforezi (Collinge, 2001; Aguzzi in sod., 2007). Te značilnosti se ohranijo tudi po več zaporednih prenosih bolezni na isti vrsti gostitelja.

Seve prionov lahko identificiramo le z biološkim poskusom, s katerim ugotavljamo značilnosti po prenosu določenega povzročitelja v novega gostitelja (Collinge, 2001; Aguzzi in sod., 2007).

Prioni, izolirani iz ene živalske vrste, se po prenosu na drugo živalsko vrsto pogosto obnašajo drugače, podaljša se inkubacijska doba in zmanjša delež osebkov, pri katerih se bolezen pojavi. Ta fenomen označujemo kot vrstno bariero (Aguzzi in sod., 2007). Pojav vrstne bariere naj bi bil posledica razlike med aminokislinskim zaporedjem PrP^C gostitelja in darovalca. Po seriji pasaž na isti vrsti gostitelja se inkubacijska doba postopoma skrajša, kar imenujemo adaptacija. V nekaterih primerih je vrstna bariera tako velika, da gostitelj po okužbi s prioni

druge živalske vrste ne kaže kliničnih znakov, vendar izolat možganov takega gostitelja vseeno lahko povzroči bolezen, če ga inokuliramo v drugega, dovzetnega gostitelja. Taka vrstna bariera je opisana med hrčkom in miško. Inokulacija hrčkovih prionov v miško pri slednji ne izzove niti prionske bolezni niti kopičenja PrP^{Sc} v možganih. Po intracerebralnemu injiciranju PrP^{Sc}- negativnih možganov mišk v druge miške, slednje ostanejo zdrave. Po inokulaciji hrčkov s PrP^{Sc}- negativnimi možgani mišk, pa se pojavi prionska bolezen (Race in sod., 2002).

Pri gostiteljih iste živalske vrste, okuženih z istim sevom povzročitelja, je lahko inkubacijska doba različno dolga. Ta fenomen, ki je posledica polimorfizma gena *PRNP*, označujemo s pojmom transmissijska bariera (Glatzel in sod., 2005; Aguzzi in sod., 2007).

2.1.7 Fizikalno-kemijske lastnosti PrP^{Sc} in njegova inaktivacija

S spremembo strukture prionskega proteina se spremenijo tudi njegove lastnosti. Za PrP^{Sc} je na značilno, da je močno odporen na različne vrste razkuževanja, ki so učinkovite pri drugih mikroorganizmih.

PrP^{Sc} je delno odporen na delovanje proteinaze K in popolnoma odporen na delovanje ionizirajočih in ultravijoličnih žarkov ter mikrovalov in je netopen v vodi (Taylor, 2000). Formalin in glutaraldehyd ga ne inaktivirata, ampak nasprotno, še povečata njegovo odpornost (Veterinary Laboratory Agency, 2003). Razkuževanje s klorovim dioksidom, vodikovim peroksidom, acetonom, etanolom, etrom, kloroformom in fenolom inaktivira le majhen delež infektivnosti (Taylor, 2000). V detergentih PrP^{Sc} precipitira v t. i. SAF-fibrile (angl. scrapie associated fibriles), kar se uporablja v diagnostiki prionskih bolezni (Fournier in Grigoriev, 2001).

Kužnost PrP^{Sc} uniči avtoklaviranje na temperaturi 134° C do 138° C, ki traja 18 minut, pri treh atmosferah pritiska (Veterinary Laboratory Agency, 2003). Učinkovito je 60-minutno razkuževanje z natrijevim hipokloridom, ki vsebuje 20000 ppm aktivnega klora ali enako dolgo razkuževanje z 1N ali 2N natrijevim hidroksidom (Veterinary Laboratory Agency, 2003). Kužnost tkiv, ki se uporabljajo za patohistološko in imunohistokemično preiskavo, močno zmanjša enourna obdelava v formalinu fiksiranih tkivnih vzorcev s 96 % mravljično kislino pred njihovim vkapljanjem v parafin (Taylor in McBride, 1987; Brown in sod., 1990).

Taka vrsta dekontaminacije v tkivu sicer povzroči določene poškodbe, vendar te niso tako hude, da bi onemogočile oceno patohistoloških sprememb (Taylor in McBride, 1987). Poleg tega predobdelava tkivnih rezin z mravljično kislino in avtoklaviranje razkrijeta epitope in povečata količino reakcijskega produkta pri imunohistokemični reakciji (Miller in sod., 1993; Haritani in sod., 1994).

2.2 PRASKAVEC

2.2.1 Splošno o praskavcu

Praskavec je TSE, ki se pojavlja pri ovcah in kozah, opisan pa je tudi pri muflonih (*Ovis musimon*), ki so vrsta divje ovce (Dickinson, 1976; Clark, 1980; Wood in sod., 1992 a; Wood in sod., 1992 b; Wood in sod., 1997). Praskavec je bolezen z dolgo zgodovino pojavljanja, prvič je bil opisan že v 18. stoletju v Veliki Britaniji, šele leta 1936 pa je bil prepoznan kot kužna bolezen (Brown in Bradley, 1998). V 18. in 19. stoletju se je razširil po Angliji in kontinentalni Evropi, po letu 1900, posebej po 2. svetovni vojni, pa v številne države po vsem svetu, z izjemo Avstralije in Nove Zelandije (Detwiler in Baylis, 2003).

Praskavec se je znašel v središču pozornosti po pojavu dveh novih oblik prionskih bolezni, BSE, ki je bila prvič odkrita leta 1986 (Wells in sod., 1987), in vCJB, ki je bila odkrita 1996 (Collinge in sod., 1996). Širjenje BSE je bilo zelo verjetno posledica krmljenja govedi s krmili, kontaminiranimi s povzročiteljem praskavca (Wilesmith in sod., 1988). Zaenkrat ni dokazov za povezavo med praskavcem in človeškimi TSE, zato praskavec ni uvrščen med bolezni, ki so nevarne za zdravje ljudi (Harries-Jones in sod., 1988; Wientjens in sod., 1996; van Duijn in sod., 1998).

Danes predstavlja praskavec model za prionske bolezni (Brown in Bradley, 1998).

Poleg t. i. tipičnega ali klasičnega praskavca poznamo tudi atipični praskavec. Prvič so nenavadno obliko praskavca opisali na Norveškem leta 1998 in jo poimenovali Nor98. Gre za bolezen, ki se v epidemioloških značilnostih, klinični sliki, patohistoloških in imunohistokemičnih ugotovitvah razlikuje od klasičnega praskavca (Benestad in sod., 2003; Benestad in sod., 2008). Kasneje so primere atipičnega praskavca opisali tudi v drugih državah (De Bosschere in sod., 2004; Fediaevsky in sod., 2009; Polak in sod., 2009; Webb in

sod., 2009). V nadaljnjem besedilu bomo izraz praskavec uporabljali za primere klasičnega praskavca.

Od leta 1993 je praskavec na seznamu prijavljivih bolezni Mednarodnega urada za kužne bolezni (OIE) (Manual of Diagnostic Tests OIE, 2009). V Sloveniji smo prvi primer praskavca diagnosticirali leta 2004.

2.2.2 Načini okužbe

Praskavec se lahko prenaša med živalmi znotraj tropa ali med tropi na različne načine. Prenos bolezni je predvsem horizontalen (Brotherston in sod., 1968; Dickinson in sod., 1974). Okužba pri živalih, naravno okuženih s praskavcem, je v veliki večini primerov peroralna (Pattison in sod., 1972). Živali se okužijo med direktnim stikom z obolelo živaljo ali med pašo na kontaminiranih pašnikih (Dickinson in sod., 1974; van Keulen in sod., 2008). Povzročitelj pride v okolje preko okuženih posteljic, amnijskih tekočin, slin, urina in fecesa. V okolju lahko preživi tudi 16 let (Brown in Gajdusek, 1991; Seidel in sod., 2007).

Čeprav je dolgo veljalo, da je možnost maternalnega prenosa malo verjetna, se je izkazalo, da se lahko jagnjeta okužijo tudi peroralno, z uživanjem mleka ovc, ki imajo praskavec (Konold in sod., 2008). Kakšna je možnost prenosa praskavca preko posteljice, zaenkrat še ni razjasnjeno. Prione so ugotovili v posteljicah ovc s praskavcem (Race in sod., 1998; Caplazi in sod., 2004) in dokazali, da je nakopičenje prionov v placenti odvisno od genotipa matere (Lacroux in sod., 2007), genotipa ploda (Andreoletti in sod., 2002 b; Tuo in sod., 2002) ter pozicije ploda glede na druge plodove (Alverson in sod., 2006), vendar pa prionov v tkivih plodov niso našli (Andreoletti in sod., 2002 b). Možnost prenosa okužbe s semenom ali zarodki je zelo majhna (Wrathall in sod., 2008).

Opisani so tudi primeri iatrogenih okužb po vakcinaciji proti virusni bolezni louping ill (Robinson, 1996) in kužni agalakciji ovc (Zanusso in sod., 2003). Povzročitelj se lahko prenese tudi s kontaminiranimi inštrumenti, ki se uporabijo pri operativnih posegih (Wrathall in sod., 2008).

Vektorji bolezni so lahko tudi ektoparaziti. Prione so ugotovili v larvah insektov in pršic (Post in sod., 1999; Carp in sod., 2000) ter potrdili, da se tudi v njih replicirajo (Raeber in sod.,

1995). Pri hrčkih je opisana peroralna eksperimentalna okužba po hranjenju z larvami, v katerih so bili prioni (Post in sod., 1999; Lupi, 2003). Poleg tega načina okužbe je možno, da se prioni prenesejo tudi z očesno ali cerebralno miazozo (zoljavost) ter miazozo ran ali ulkusov na koži (Lupi, 2003).

Pri ovcah so opisane tudi eksperimentalne okužbe s transfuzijo krvi (Hunter in sod., 2002; Houston in sod., 2008), intracerebralna, intraperitonealna in intralingvalna okužba, okužba preko očesnih veznic (Hamir in sod., 2008 a; Hamir in sod., 2008 b). Pri miškah sta bili uspešni tudi intraokularna okužba (Kimberlin in Walker, 1986) in okužba preko poškodovane kože (Taylor in sod., 1996).

2.2.3 Klinični znaki

Klinični znaki se pri večini živali pokažejo med drugim in petim letom starosti, vendar pa se lahko pojavijo tudi pri mlajših živalih (Hoinville, 1996). Prvi znaki bolezni so zelo blagi, zato se jih lahko v čredah, ki niso pod rednim veterinarskim nadzorom, tudi spregleda. Klinični znaki postopno napredujejo, to obdobje večinoma traja nekaj tednov, lahko pa tudi do sedem mesecev (Capucchio in sod., 2001). Opisani so tudi primeri praskavca pri živalih, ki pred poginom ali zakolom niso kazale kliničnih znakov (Clark in Moar, 1992).

Prvi znaki so izguba telesne mase in subtilne spremembe v obnašanju. Živali se začnejo oddaljevati od tropa, so zelo plašne, ko se jim skušamo približati, lahko postanejo zelo razdražljive in se pretirano odzivajo na zunanje dražljaje. Ko take živali pustimo na miru, so somnolentne, praznega pogleda in s spuščeno glavo, dlje časa poležavajo, pogosto škrtajo z zobmi (Healy in sod., 2003). Že v zgodnji fazi bolezni se pokažejo nenormalni vzorci pri pitju, živali pijejo pogosteje in v majhnih količinah (Beck in Daniel, 1971). Spremembe apetita, ki jih spremlja zmanjšanje števila ali prenehanje ruminacij, se navadno pojavijo šele v pozni fazi bolezni (Austin in Simmons 1993; Healy in sod., 2003). V nekaterih primerih se lahko pojavi tudi pogosto izločanje majhnih količin urina (Combrisson in sod., 1998).

Pri večini ovc s praskavcem se srbenje pojavi najprej v zadnjem delu telesa, pozneje pa se razširi na vso telo. Živali se praskajo ali drgnejo ob predmete v okolici, se ližejo ali grizejo. Med praskanjem se lahko pojavi značilno gibanje ustnic in cmokanje. Pri nekaterih primerih

klasičnega praskavca in pri atipičnem praskavcu se srbenje ne pojavi (Onodera in Saeki, 2000; Benestad in sod., 2003).

V pozni fazi bolezni se pojavijo spremembe v hoji, ki je nekoordinirana, toga, živali poskakujejo hkrati z obema zadnjima okončinama, visoko dvigujejo zadnje okončine (hipermetrija), na koncu zelo težko vstajajo in obležijo. Pojavlja se lahko tudi tremor glave ali celega telesa, krči, kolaps, povečano slinjenje (Petrie in sod., 1989), iztekanje vampovega soka iz nosnic (VLA Compendium, 2003), nepravilnosti vida in zmanjšana mlečnost ter upiranje pri molži (Capucchio in sod., 2001).

Klinični znaki praskavca so lahko v začetni fazi bolezni podobni znakom, ki se pojavljajo pri nekaterih drugih obolenjih. Diferencialno diagnostično je potrebno izključiti ektoparazitoze, bolezen Aujeszkega, steklino, živčno obliko listerioze, maedi-visno, gravidnostno toksemijo, hipomagneziemijo in nekatere zastrupitve (Detwiler in Baylis, 2003).

Bolezen se vedno konča s poginom.

2.2.4 Faktorji, ki vplivajo na dovzetnost in patogenezo praskavca

Dovzetnost za praskavec in potek bolezni sta pri ovcah odvisna od več dejavnikov, kot so genotip PrP živali, pasma in starost živali, sev povzročitelja in dejavniki okolja (Goldmann in sod., 1994; Hunter in sod., 1994; Elsen in sod., 1999).

Polimorfizmi gena *PRNP*, ki so najpomembnejši za dovzetnost ali odpornost na klasični praskavec, so na kodonu 136, ki kodira alanin (A) ali valin (V), na kodonu 154, ki kodira arginin (R) ali histidin (H) in kodonu 171, ki kodira histidin, arginin ali glutamin (Q). Znanih je 15 različnih genotipov PrP, ki so glede na dovzetnost za klasični praskavec v publikaciji National Scrapie Plan for Great Britain (NSP) razvrščene v pet skupin, od najbolj odpornih do najbolj dovzetnih (DEFRA, 2003). V skupino 1 je uvrščen genotip ARR/ARR, katerega ovce so genetsko najbolj odporne na praskavec. Ovce z genotipi ARR/ARQ, ARR/ARH in ARR/AHQ so slabo dovzetne za praskavec in uvrščene v skupino 2 NSP. V skupini 3 NSP so ovce, ki so srednje dovzetne za praskavec, v skupini 4 NSP pa ovce genotipa ARR/VRQ, ki so genetsko bolj dovzetne za praskavec. V skupini 5 NSP so ovce, genotipov AHQ/VRQ, ARH/VRQ, ARQ/VRQ in VRQ/VRQ, ki so zelo dovzetne za praskavec (DEFRA, 2003).

Podatki o dovzetnosti za praskavec temeljijo na rezultatih raziskav v Veliki Britaniji, kjer prevladujejo pasme suffolk, teksel, šarole (fr. Charollais) in nekatere pri nas manj znane pasme. Valin na položaju 136 in glutamin na položaju 171 sta pogosta v genotipu pasem ovc, ki so zelo dovzetne za praskavec in so v NSP uvrščene v skupino 5 (Hunter in sod., 1994; Tranulis in sod., 1999; DEFRA, 2003), medtem ko je histidin na položaju 154 povezan z manjšo dovzetnostjo za to bolezen (Thorgeirsdottir in sod., 1999). Dolgo je veljalo, da so ovce z genotipom ARR/ARR (skupina 1 NSP) odporne na klasični praskavec, vendar so nato ovce tega genotipa uspeli eksperimentalno okužiti (Houston in Gravenor, 2003; Houston in sod., 2003), leta 2007 pa so tudi pri homozigotih alela ARR opisali dva primera naravne okužbe s praskavcem (Groschup in sod., 2007).

Z genotipom PrP je povezana tudi patogeneza bolezni. Ligios in sodelavci (2002) so opisali povezavo med genotipom PrP in vzorcem razporeditve PrP^{Sc} v možganih ter med genotipom in amiloidozo možganskih krvnih žil. Pri heterozigotnih genotipih je PrP^{Sc} v perifernih tkivih manj, hkrati pa se okužba v organizmu širi počasneje. Pri genotipu VRQ/VRQ se kopičenje PrP^{Sc} v GALT-u (angl. gut associated lymphatic tissue; črevesju pridruženo limfatično tkivo) našli pri dva do tri mesece starih jagnjetih romanovske pasme, ki so bila naravno okužena in že tri do pet tednov po peroralni eksperimentalni okužbi jagnjet pasme cheviot (Andreoletti in sod., 2000; Heggebo in sod., 2000). Pri nekaterih ovcah z genotipom VRQ/VRQ in VRQ/ARR, kljub tipičnim kliničnim znakom praskavca in značilnim patomorfološkim spremembam in kopičenju PrP^{Sc} v obeksu, niso našli PrP^{Sc} v limfatičnih tkivih (van Keulen in sod., 1996; Andreoletti in sod., 2000; Houston in sod., 2002).

Genotip PrP vpliva tudi na dolžino inkubacijske dobe in dobo preživetja. Pri ovcah z zelo dovzetnimi genotipi je inkubacijska doba najkrajša (Goldmann in sod., 1994). Doba preživetja je najkrajša pri ovcah z genotipom VRQ/VRQ (Diaz in sod., 2005), nekoliko daljša je pri ovcah z genotipoma VRQ/ARQ in ARQ/ARQ, še daljša pa pri ostalih genotipih (Bossers in sod., 1996; Diaz in sod., 2005).

Dovzetnost nekaterih pasem ovc za praskavec se razlikuje od zgoraj navedenih vzorcev. Pri ovcah pasme suffolk se praskavec najpogosteje pojavlja pri genotipu ARQ/ARQ (Hunter in sod., 1997 a; Hunter in sod., 1997 b). Dawson in sodelavci navajajo, da je pri ovcah pasme teksel z genotipom ARQ/ARQ praskavec zelo redek (Dawson in sod., 1998), drugi avtorji pa, nasprotno, da se pri tej pasmi pogosteje pojavlja pri alelih VRQ in ARQ, alel ARH pa je

povezan z odpornostjo (Belt in sod., 1995; Baylis in sod., 2002). Pri ovcah pasme cheviot je odpornost na praskavec povezana z genotipoma ARQ/ARQ in VRQ/ARR (Hunter in sod., 1996). Ovce romanovske pasme z genotipom ARQ/ARQ so dovzetne, medtem ko je genotip VRQ/ARR odporen na praskavec (Elsen in sod., 1999).

Dovzetnost za okužbo s praskavcem je največja v prvem letu življenja in je povezana z razvojem Peyerjevih plošč (St Rose in sod., 2006). Peyerjeve plošče so največje v prvih treh mesecih, okrog 12. tedna starosti se začne njihova involucija, ki se zaključi okrog 18. meseca (Reynolds in Morris 1983; St Rose in sod., 2007).

Doslej je bilo iz možganov ovc izoliranih približno 20 različnih sevov povzročitelja, ki so jih nato prečistili z zaporednimi pasażami na inbridiranih sevih mišk (Bruce, 2003). Sevi povzročitelja se med sabo razlikujejo po dolžini inkubacijske dobe, stopnji in razporeditvi patoloških sprememb ter razporeditvi ter jakosti reakcijskega produkta imunohistokemične reakcije s PrP^{Sc} v možganih (Bruce in sod., 1989; Bruce in sod., 1991; Fraser, 1993; Bruce, 2003).

Na pojav praskavca vplivajo tudi drugi dejavniki. Elsen in sodelavci (1999) so ugotovili, da je tveganje za pojav praskavca manjše pri živalih, ki so bile hranjene z mlečnimi nadomestki, kar se ujema z nedavno dokazano kužnostjo kolostruma in mleka ovc s praskavcem (Elsen in sod., 1999). Povečano tveganje za bolezen so ugotovili tudi pri parazitozah. Pomemben naj bi bil predvsem nematod *Teladorsagia* (sin. *Ostertagia*) *circumcinta*, ki naj bi olajšal prehod povzročitelja praskavca skozi poškodovano črevesno sluznico. Avtorji so dokazali značilno regresijo med stopnjo invazije nematodov in starostjo ovc, pri katerih so se pojavili prvi klinični znaki (Gruner in sod., 2004).

2.3 PATOLOŠKE SPREMEMBE PRI PRASKAVCU

2.3.1 Patohistološke spremembe pri praskavcu

Pri klasičnem praskavcu se pojavljajo v možganih značilne patomorfološke spremembe. V sivi možganovini sta opisani dve obliki vakuolizacije, vakuolizacija podaljškov nevronov, t. i. spongioza ali vakuolizacija nevropila, in vakuolizacija teles nevronov. Spremembi označujemo kot spongiformne spremembe (Wood in sod., 1997). Spongiformne spremembe so

navadno bilateralno simetrične. Stopnja in razporeditev vakuolizacije nevropila in nevronov je močno variabilna ter odvisna od več dejavnikov. Pri ovcah s klasičnim praskavcem se najpogosteje pojavijo spongiformne spremembe v dorzalnem jedru vagusnega živca (ang. dorsal nucleus of the vagal nerve, DNVN), jedru in traktu petega možganskega živca ter v olivarnem jedru, pozneje pa se razširijo še na druga področja (Ersdal in sod., 2003). Večinoma je vakuolizacija nevropila močnejša kot vakuolizacija nevronov in je pri ovcah, ki so homozigoti genotipa ARQ/ARQ, bolj izražena kot pri homozigotih genotipa VRQ/VRQ (Begara-McGorum in sod., 2002; Ligios in sod., 2002). Na pojavljanje vakuol vplivajo genotip PrP, sev povzročitelja in pasma ovce (Ligios in sod., 2002).

Zaradi individualnih razlik, ki so lahko zelo velike (Begara-McGorum in sod., 2002) pri ovcah zgolj na osnovi stopnje vakuolizacije in razporeditve vakuol ne moremo sklepati o sevu povzročitelja, kot to lahko naredimo pri miškah. Prav tako je zaradi blagih in nejasnih prvih kliničnih znakov pri praskavcu povezavo med jakostjo patoloških sprememb v možganih ter kliničnimi znaki zelo težko dokazati.

Patološke spremembe v možganih pogosto niso v povezavi z izraženostjo kliničnih znakov. Živali, ki imajo zelo izražene spongiformne spremembe, včasih ne kažejo kliničnih znakov, in nasprotno, v nekaterih primerih, ko so klinični znaki zelo močno izraženi, s patohistološko preiskavo ne odkrijemo značilnih sprememb (Begara-McGorum in sod., 2000).

Pri interpretaciji vakuolizacije možganov je treba pri ovcah upoštevati dejstvo, da se lahko posamezne vakuole v nevronih DNVN pojavijo tudi pri zdravih ovcah brez praskavca (OIE, 2009).

Poleg spongiformnih sprememb lahko pri praskavcu ugotovimo tudi različne stopnje degenerativnih sprememb nevronov in s tem povezano zmanjšanje njihovega števila, reaktivno gliozo ter amiloidne lehe (Allsop in sod., 1988). Pri ovcah, naravno okuženih s praskavcem, sta običajno prvi dve od sprememb blagi ali celo izostaneta. Med reaktivnimi glija celicami prevladujejo astrociti, v beli možganovini pa se lahko pojavi tudi blaga reakcija mikroglije (Lefrancois in sod., 1994). Pri miškah lahko astroglizo ugotovimo zgolj na mestih, kjer je vakuolizacija, pojavi se približno dva tedna pred prvimi vakuolami (Foster in Dickinson, 1988). Astroglia pri ovcah je v pozitivni korelaciji s količino PrP^{Sc} (Jeffrey in Gonzalez, 2007) in stopnjo spongiformnih sprememb (Ersdal in sod., 2003). Amiloid se pri

praskavcu ovc relativno redko ugotovi. Imunohistokemično je bilo potrjeno, da se PrP^{Sc} kopiči v steni krvnih žil in njihovi okolici (Gilmour in sod., 1986; McBride in sod., 1988; van Keulen in sod., 1995). Kopičenje amiloida in njegova razporeditev sta odvisna od več dejavnikov, pri ovcah od genotipa živali (Ligios in sod., 2004), pri miškah pa tudi od seva povzročitelja in načina okužbe (Bruce in Fraser, 1981; Bruce in Dickinson, 1985).

V limfatičnih organih ovc s praskavcem do zdaj niso opisali patohistoloških sprememb.

2.3.2 Imunohistokemične značilnosti praskavca

Imunohistokemija je tehnika, s katero lahko s specifičnimi protitelesi proti PrP^{Sc} potrdimo kopičenje prionov v tkivu, ugotovimo, kje se kopičijo (intra ali ekstracelularno), kakšna je njihova razporeditev in količina v tkivu. Z imunohistokemijo so bili pridobljeni številni podatki, ki so pomembno prispevali k poznavanju patogeneze praskavca (Andreoletti in sod., 2000; van Keulen in sod., 2002; Ryder in sod., 2009). Danes je imunohistokemična metoda ena od referenčnih metod, ki se uporabljajo za diagnostiko praskavca (OIE, 2009). Imunohistokemična reakcija na prione se običajno izvede na parafinskih tkivnih rezinah, v katerih pred nanosom specifičnega protitelesa proti PrP^{Sc} razkrijemo epitop s 30 minutnim vlažnim avtoklaviranjem in s 5 minutno inkubacijo v 96 % mravljični kislini. S tega postopkom ob enem odstranimo PrP^C in razkrijemo epitope ter povečamo količino reakcijskega produkta pri imunohistokemični reakciji (Mohri in sod., 1992; Miller in sod., 1993; Miller in sod., 1994).

Prioni v limfatičnih organih

PrP^{Sc} se v limfatičnih organih kopiči večinoma v germinativnih središčih limfatičnih foliklov, bodisi v obliki zrn v citoplazmi makrofagov (angl. tingible body macrophages) ali v obliki drobne mreže na FDC (van Keulen in sod., 1996; Heggebo in sod., 2002; Ersdal in sod., 2003). Šibko pozitivno imunohistokemično reakcijo s PrP^{Sc} so ugotovili tudi na celični membrani posameznih limfocitov B in T (Andreoletti in sod., 2002 a).

V limfatičnih organih in tkivih najdemo PrP^{Sc} večinoma že v predklinični fazi bolezni (O'Rourke in sod., 2000; Hamir in sod., 2001). Nekateri od limfatičnih organov so relativno

zlahka dostopni za odvzem z biopsijo, kar omogoča diagnostiko praskavca tudi pri živih živalih. Pri malih prežvekovalcih je opisana predklinična diagnostika praskavca na osnovi imunohistokemičnega ugotavljanja PrP^{Sc} v biopsijskih vzorcih tonzil (Schreuder in sod., 1996; Jeffrey in sod., 2001), tretje veke (O'Rourke in sod., 2000; Thuring in sod., 2000), mandibularnih in retrofaringealnih bezgavk (Thuring in sod., 2002; Langeveld in sod., 2006) in rektuma (Gonzalez in sod., 2008). Uporaba imunohistokemične metode za predklinično diagnostiko ima svoje omejitve, ker se pogosto z biopsijo ne dobi dovolj limfatičnih foliklov, razporeditev PrP^{Sc} v limfatičnih organih in tkivih ni homogena in ker pri nekaterih genotipih ovc ni periferne faze bolezni (van Keulen in sod., 1996, Andreoletti in sod., 2000).

Kopičenje PrP^{Sc} in njegova količina v limfatičnih organih sta pri ovcah odvisna od genotipa PrP ter pasme živali in seva povzročitelja. Pri ovcah z genotipom VRQ/ARR in ovcah sardske pasme z genotipom ARQ/ARQ se PrP^{Sc} med patogenezo ne kopiči v limfatičnih tkivih (van Keulen in sod., 1996; Jeffrey in Gonzalez, 2004; Ligios in sod., 2006).

Pri drugih TSE živali in ljudi so glede kopičenja PrP^{Sc} v limfatičnih organih velike razlike. Pri atipičnem praskavcu (Benestad in sod., 2003; Nentwig in sod., 2007) in govedu, naravno okuženem z BSE, PrP^{Sc} v limfatičnih organih še ni bil ugotovljen (Terry in sod., 2003; Iwata in sod., 2006). Pri govedu, ki so ga peroralno okužili z BSE, pa so z imunohistokemijo depozite prionov našli le v makrofagih posameznih Peyerjevih plošč ileuma (Terry in sod., 2003; Wells in sod., 2005), z analizo western blot pa tudi v tonzili nebni (Espinosa in sod., 2007). Pri ovcah z BSE se PrP^{Sc} kopiči v različnih limfatičnih organih. Najprej se pojavi v retrofaringealnih bezgavkah, Peyerjevih ploščah ileuma in vranici, odkoder se hitro razširi po drugih limfatičnih organih (Foster in sod., 2001). Tudi pri CWD lahko najdemo kopičenje PrP^{Sc} na površini FDC in limfocitov B ter v makrofagih limfatičnih foliklov različnih limfatičnih organov (Williams, 2005; Fox in sod., 2006).

Pri ljudeh je kopičenje PrP^{Sc} v limfatičnih organih opisano le pri vCJB. Depozite prionov so opisali na FDC germinativnih središčih tonzil, regionalnih bezgavk, slepiča in vranice že v predklinični fazi bolezni (Ironsides in sod., 2000; Head in sod., 2004).

Prioni v možganih

V možganih ovc s praskavcem lahko PrP^{Sc} določimo v različnih področjih in različnih vzorcih razporeditve. V vseh primerih PrP^{Sc} najdemo v DNVN. Reakcija v DNVN je najmočnejša na ventralnem robu jedra, kjer se tudi najprej pojavi. Kopičenje PrP^{Sc} se pojavi že pred patohistološkimi spremembami (Bruce in sod., 1989; van Keulen in sod., 1995).

Pozitivna imunohistokemična reakcija s PrP^{Sc} v različnih nevroanatomskih področjih močno varira (Ryder in sod., 2001). Opisanih je več različnih tipov imunohistokemične reakcije na PrP^{Sc}: v telesih živčnih celic (intranevronske), v astrocitih (intraastrociti), v mikrogliji (intramikroglijske), drobno zrnate, grobo zrnate, zlivajoči oziroma združujoči (angl. coalescing), perinevronske, linearne, zvezdaste, subpialne, subependimske, perivaskularne, perivakuolarne in ependimske depoziti, psevdo lehe ter vaskularne lehe (Ryder in sod., 2001; Gonzalez in sod., 2002; Gonzalez in sod., 2003; Gonzalez in sod., 2005). Ultrastrukturne študije so pokazale, da je večina ekstracelularnih depozitov v tesnem stiku s celično membrano (Jeffrey in Gonzalez, 2007).

Navadno pri eni živali ugotovimo več tipov depozitov, vendar praviloma ne vseh. Razporeditev in pojavljanje različnih tipov depozitov močno varirata ter sta odvisna od seva povzročitelja (Foster in sod., 1996; Gonzalez in sod., 2002) in genotipa ovce (Spiropoulos in sod., 2007).

Majhno količino specifičnega reakcijskega produkta lahko z nekaterimi protitelesi najdemo tudi v možganih zdravih ovc. Pozitivna reakcija se pri teh ovcah pojavi v obliki drobnih pozitivnih delcev v citoplazmi nevronov, najmočnejša je v kuneatnem in hipoglosnem jedru, šibkejša pa v akcesornem kuneatnem jedru, retikularni formaciji, lateralnem fascikularnem jedru in arei postremi. Reakcija v področju DNVN je v takih primerih negativna ali zelo šibka. Vzorec depozitov pri zdravih ovcah se z lahkoto loči od vzorcev, ki se pojavljajo pri bolnih živalih. Tako obliko reakcije so ugotovili kar pri 29 do 62 % ovcah iz tropov s praskavcem, pa tudi iz tropov, prostih te bolezni (Ryder in sod., 2001).

Dostopnost protiteles proti različnim epitopom na molekuli PrP^{Sc} je omogočila tudi razvoj tehnik, kot sta določanje PrP^{Sc} profila in kartiranje epitopa PrP^{Sc} (angl. PrP epitope mapping). PrP^{Sc} profil je povzetek podatkov o tipu depozitov, njihovi količini in razporeditvi v različnih

nevroanatomskih področjih in omogoča razlikovanje med različnimi sevi povzročitelja praskavca in BSE (Gonzalez in sod., 2003). S tehniko kartiranja epitopa PrP^{Sc}, pri kateri uporabimo protitelesa proti različnim epitopom na PrP^{Sc}, lahko na osnovi vzorca imunohistokemične reakcije in lokacije depozitov PrP^{Sc} razlikujemo med različnimi TSE pri ovcah in kozah (Jeffrey in sod., 2006 a).

Poleg možganov in limfatičnih organov so PrP^{Sc} imunocitokemično in imunohistokemično ugotovili tudi v drugih organih ter tkivih ovc in koz s praskavcem, kot so kri (Hunter in sod., 2002; Carmona in sod., 2005), pankreas (Pattison in Millson, 1960), hipofiza, nadobistnica (Pattison in Millson, 1962), sluznica nosne votline (Hadlow in sod., 1974), posteljica (Andreoletti in sod., 2002 b; Tuo in sod., 2002; Alverson in sod., 2006; Lacroux in sod., 2007), celice mienteričnega in submukoznega pleteža črevesa (Ersdal in sod., 2003), skeletna mišičnina (Andreoletti in sod., 2004), jezik (Casalone in sod., 2005), mlečna žleza (Ligios in sod., 2005), očesna mrežnica (Hortells in sod., 2006), ledvice (Siso in sod., 2006; Ligios in sod., 2007), koža (Thomzig in sod., 2007) in slinske žleze (Vascellari in sod., 2007).

Z novimi tehnikami, ki so še bolj občutljive za detekcijo prionov, so jih dokazali tudi v mleku ovc (Lacroux in sod., 2008; Maddison in sod., 2009), medtem ko jih v slini, urinu, semenu in fecesu ovc s praskavcem zaenkrat še niso našli. Zato pa so prione že našli v fecesu (Safar in sod., 2008) in urinu hrčkov ter mišk, eksperimentalno okuženih s praskavcem (Seeger in sod., 2005; Kariv-Inbal in sod., 2006), in slini jelenov s CWD (Mathiason in sod., 2006).

PrP^{Sc} je zelo odporen na avtolizo, zato posmrtno razpadanje organov in tkiv ne vpliva na njegovo detekcijo (Race in sod., 1994; Bencsik in sod., 2001).

2.3.3 Limfocitni infiltrati v možganih pri praskavcu

Poleg patognomoničnih degenerativnih sprememb in kopičenja PrP^{Sc} v možganih se pri praskavcu pojavijo tudi infiltrati limfocitov. Betmouni in sodelavci (1996) so v možganih mišk, intracerebralno okuženih s praskavcem, ugotovili majhno število CD8⁺ T limfocitov in še manj CD4⁺ T limfocitov. Kasneje so infiltrate limfocitov T v parenhimu možganov mišk, eksperimentalno peroralno okuženih s praskavcem opisali tudi Lewicki in sodelavci (2003), kar kaže, da je kopičenje PrP^{Sc} povezano tudi s kroničnim vnetnim odzivom (Eikelenboom in sod., 2002). V literaturi zaenkrat ni podatkov ali se tudi pri ovcah, naravno okuženih s

praskavcem pojavijo infiltrati limfocitov v možganih. Prav tako ni podatkov o limfocitnih infiltratih v možganih pri TSE drugih živalskih vrst.

Zato pa so infiltrati limfocitov v možganih opisani pri sCJB in humanih nevrodegenerativnih boleznih. Pri bolnikih s sCJB so infiltrate limfocitov T ugotovili v parenhimu možganov (Lewicki in sod., 2003) in perivaskularno (Szpakova in sod., 2006). Pri Alzheimerjevi bolezni (AB) se v možganih poleg degenerativnih sprememb v obliki senilnih leh in neurofibrilarnih pentelj pojavljajo tudi infiltrati limfocitov T (Itagaki in sod., 1988; Togo in sod., 2002). Vloga teh limfocitov ni povsem jasna, možno je, da te celice neuroprotektivno (Schwartz in sod., 1999; Hohlfeld in sod., 2000) ali da spodbujajo odmiranje nevronov (Medana in sod., 2001). Pri Parkinsonovi bolezni (PB), nevrodegenerativni bolezni pri kateri propadajo dopaminergični nevroni v substanciji nigri in lokusu ceruleusu, se pojavljajo citotoksični limfociti T v velikem številu (McGeer in sod., 1988). Infiltrate limfocitov T so ugotovili tudi pri amiotropni lateralni sklerozi (Kawamata in sod., 1992) in možganski amiloidni angiopatiji (Yamada in sod., 1996).

2.4 PROFIL GLIKOZILACIJE PRI PRASKAVCU

Povzročitelj praskavca je delno odporen na razgradnjo z endoproteinazami, med katere spada tudi proteinaza K. Po obdelavi vzorcev tkiva s proteinazo K se PrP^C popolnoma razgradi, od PrP^{Sc} pa se odcepi 55 do 70 aminokislinskih ostankov dolg del N-konca, tako da v vzorcu ostanejo tri frakcije glikoproteinov: neglikozilirana, monoglikozilirana in diglikozilirana, ki imajo različne molekulske mase (Prusiner in sod., 1984).

Učinkovita tehnika za detekcijo teh oblik je analiza western blot, ki temelji na elektroforetskem ločevanju proteinov v poliakrilamidnem gelu, prenosu proteinov na membrano in označevanju teh proteinov s specifičnimi protitelesi proti PrP. Z analizo western blot, pri kateri uporabimo monoklonsko protitelo 6H4, pri praskavcu in BSE ovc določimo eno frakcijo z molekulsko maso 27 do 30 kDa, ki predstavlja diglikozilirani protein, in dve frakciji z molekulsko maso pod 27 do 30 kDa, ki predstavljata monoglikozilirani in neglikozilirani protein. Uporaba dveh monoklonskih protiteles, 6H4 in P4, omogoča tudi razlikovanje med praskavcem in BSE. Pri ovcah, okuženih z BSE je signal s protitelesom 6H4

močan, medtem ko je s protitelesom P4 zelo šibek. Pri praskavcu ovc je signal z obema protitelesom močan (Stack in sod., 2002).

2.5 PATOGENEZA PRASKAVCA

Patogeneza praskavca je razdeljena na dve fazi, periferno ali limforetikularno fazo, ki se odvija v limfatičnih organih, in fazo, ki jo imenujemo nevroinvazija, med katero se povzročitelj širi v CZS.

2.5.1 Periferna ali limforetikularna faza bolezni

Periferna ali limforetikularna faza bolezni se začne ob prvem stiku povzročitelja z limfatičnimi tkivi in organi. Ta naj bi se zgodil pri ovcah, mlajših od devet mesecev (Hourigan, 1979), v času, ko so Peyerjeve plošče v ileumu najbolj razvite (Reynolds in Morris, 1983). Zaenkrat še ni jasno, kako povzročitelj prodre skozi sluznično bariero.

Ena od možnosti je, da pri transportu prionov preko epitela sodelujejo celice M (angl. microfold ali membranous) (Heppner in sod., 2001), specializirane celice, ki imajo na površini kratke resice, s katerimi ujamejo makromolekule in jih pritegnejo na površino celice. V limfatično tkivo pod epitelijem potujejo makromolekule preko globokih bazolateralnih invaginacij celične membrane celic M, v katerih so številni limfociti in makrofagi (Gebert in sod., 1996). Pri miškah, okuženih s povzročiteljem praskavca, so ugotovili, da je pogoj za okužbo s prioni, da limfociti v invaginacijah izražajo PrP^C. Transgene miške, ki PrP^C ne izražajo, so odporne na praskavec (Bueler in sod., 1993).

Prioni se lahko v sluznico prenesejo tudi neodvisno od celic M. Prebavni encimi lahko povzročitelja razgradijo do zelo majhnih molekul, ki z drugimi proteini, npr. feritinom, tvorijo komplekse, ki se z endocitozo transportirajo preko sluznice (Mishra in sod., 2004).

Tretja možna pot vstopa prionov v sluznico je s pomočjo dendritičnih celic (DC). DC lahko razprejo tesne stičnice med epitelnimi celicami in s podaljški, ki segajo v svetlino črevesa, zajamejo povzročitelja (Rescigno in sod., 2001 a; Rescigno in sod., 2001 b). Tak način transporta je sicer znan pri prenosu bakterij, pri prionih pa zaenkrat še ni potrjen.

Po prehodu preko epitela se prioni najprej pojavijo v GALT-u, v tonzilah in Peyerjevih ploščah kavdalnega jejunuma in ileuma (Hadlow in sod., 1982; Andreoletti in sod., 2000; Beekes in McBride, 2000; Heggebo in sod., 2003 b). Pri jagnjetih genotipa VRQ/VRQ, naravno okuženih s praskavcem, so prve depozite prionov v Peyerjevih ploščah našli že v starosti dveh mesecev. Prve celice z depoziti prionov so bile DC in makrofagi, šele kasneje so se prioni pojavili na površini FDC (Andreoletti in sod., 2000; Huang in sod., 2002; van Keulen in sod., 2002).

V črevesju in tonzilah se PrP^{Sc} večinoma kopiči v germinativnih središčih limfatičnih foliklov, v makrofagih, na celični membrani FDC (van Keulen in sod., 1996; Heggebo in sod., 2002; Ersdal in sod., 2003) in v neidentificiranih celicah pod epitelom ileuma, ki so bodisi DC ali makrofagi (van Keulen in sod., 2002). Po replikaciji se povzročitelj širi v regionalne, t. j. retrofaringealne in mezenterialne bezgavke. V tej fazi lahko prione najdemo tudi v celicah selivkah kortikalnih in parakortikalnih sinusov (van Keulen in sod., 2002). Po vstopu celic selivk v limfne žile in nato v kri, se povzročitelj razširi še v druga limfatična tkiva ter organe, ki ne pripadajo GALT-u, kot so druge bezgavke, vranica, posteljica, mlečna žleza, ledvica (Race in sod., 2002; van Keulen in sod., 2002; Ligios in sod., 2005; Siso in sod., 2006; Ryder in sod., 2009).

Kopičenje PrP^{Sc} se v limfatičnih tkivih pojavi veliko prej, preden ga ugotovimo v centralnem živčnem sistemu. Limforetikularna faza bolezni se pojavi celo pri živalih, ki so jih s prioni okužili intracerebralno (Eklund in sod., 1967).

2.5.2 Nevroinvazija

Replikaciji prionov na vstopnih mestih sledi sistemsko širjenje v limfatična tkiva in širjenje v periferni živčni sistem (PŽS) ter nato v CŽS. Kako se to zgodi, še ne vemo, možna sta hematogeno širjenje povzročitelja ali širjenje po živcih (Race in sod., 2000; Glatzel in sod., 2001). PrP^{Sc} so našli tudi v endotelni celicah kapilar hipotalamusa (van Keulen in sod., 2000) in v periventrikularnih področjih možganov ovc s praskavcem (Siso in sod., 2009), kar kaže, da je možno tudi hematogeno širjenje.

Začetno mesto nevroinvazije pri praskavcu je najverjetneje enterični živčni sistem (EŽS). Povzročitelj lahko pride v stik z EŽS direktno, preko tankih živčnih vlakenc, ki se začnejo

pod epitelom črevesnih resic, lahko se prenese od FDC preko drugih celic, npr. limfocitov B in T, makrofagov ali dendritičnih celic (Glatzel in Aguzzi, 2000; Dorban in sod., 2007), preko eksosomov FDC ali s pasivno difuzijo (Nuvolone in sod., 2009).

PrP^{Sc} se kopiči v ganglijskih in satelitskih celicah mienteričnega ter submukoznega pleteža črevesa, vendar praviloma le, če je v večji količini že nakopičen v okoliškem GALT-u (Andreoletti in sod., 2000; Ersdal in sod., 2003; Heggebo in sod., 2003 a).

Nevroinvazija nato poteka od EŽS preko perifernih živcev proti CZS (McBride in sod., 2001). Natančen način prenosa preko PŽS ni znan, možna sta tako aksonalni kot neaksonalni transport (Glatzel in Aguzzi, 2000). Adaksonalna lokacija PrP^{Sc} in ocene o hitrosti transporta v PŽS kažejo, da prioni verjetno potujejo adaksonalno (Kimberlin in sod., 1983; Groschup in sod., 1999). Povzročitelj se lahko proti CZS širi po eferentnih parasimpatičnih živčnih vlaknih vagusnega živca in eferentnih simpatičnih živčnih vlaknih splanhničnih živcev. V centralni živčni sistem tako lahko povzročitelj vstopi v DNVN ali v srednjem delu prsne hrbtenjače (Th₇₋₉) (Kimberlin in Walker, 1980; Cole in Kimberlin, 1985). Iz mesta, kjer prioni dosežejo hrbtenjačo, se infekcija po hrbtenjači širi v kranialno in kaudalno smer (Beekes in McBride, 2000), tako da v terminalni fazi bolezni večina možganov in hrbtenjača vsebujejo depozite prionov (Ryder in sod., 2009). Prioni se nato širijo tudi centrifugalno, preko nodoznega ganglija po aferentnih parasimpatičnih živčnih vlaknih vagusnega živca in preko spinalnega ganglija po aferentnih simpatičnih živčnih vlaknih splanhničnih živcev na periferijo (Beekes in McBride, 2000; McBride in sod., 2001).

2.6 VLOGA LIMFATIČNIH CELIC V PATOGENEZI PRASKAVCA

Kljub številnim raziskavam še vedno ni natančno razjasnjena vloga limfatičnega sistema v patogenezi praskavca.

2.6.1 Limfociti B

Limfociti B imajo na celični membrani vezan PrP^C. Njegova količina je na limfocitih B pri ovcah približno dvakrat večja kot na limfocitih T in monocitih ter je odvisna od genotipa PrP. Količina PrP^C je največja pri ovcah z genotipom VRQ/VRQ in najnižja pri ovcah z odpornim

genotipom ARR/ARR (Halliday in sod., 2005). Okužba s prioni ne izzove sprememb v izražanju PrP^C na limfocitih B (Herrmann in sod., 2001; Choi in sod., 2009).

PrP^{Sc} so pri ovcah in miškah s praskavcem ugotovili na površini limfocitov B v različnih limfatičnih organih. V citoplazmi teh limfocitov niso določili PrP^{Sc} (Raeber in sod., 1999; Andreoletti in sod., 2002 a; McGovern in sod., 2004; McGovern in Jeffrey, 2007). PrP^{Sc} zaenkrat niso našli na limfocitih B v periferni krvi ovc (Raeber in sod., 1999).

Domneva se, da imajo limfociti B pomembno vlogo v patogenezi praskavca, čeprav so podatki nasprotujoči. Miške μ MT, ki imajo specifičen defekt v zgodnji diferenciaciji limfocitov B (Kitamura in sod., 1991), so odporne na eksperimentalno periferno okužbo s sevom praskavca z imenom RML (Rocky Mountain Laboratory). Pri teh miškah se klinična slika praskavca ne razvije (Klein in sod., 1997). Pri zelo majhnem številu teh mišk so vendarle ugotovili spongiformno encefalopatijo in kopičenje PrP^{Sc} v možganih (Klein in sod., 1997; Frigg in sod., 1999) ter zato zaključili, da B-celična pomanjkljivost v večini primerov prepreči nevroinvazijo, v primerih, ko se nevroinvazija vendarle pojavi, pa B-celična pomanjkljivost močno upočasni potek bolezni (Klein in sod., 1997). Nasprotno pa so poskusi s »hitrim« sevom povzročitelja Creutzfeldt-Jakobove bolezni (sev FU) pokazali, da so miške z B-celično pomanjkljivostjo skoraj enako dovzetne za nevroinvazijo kot miške brez pomanjkljivosti (Shlomchik in sod., 2001). Različni rezultati poskusov kažejo, da so poti nevroinvazije pri različnih sevih povzročitelja verjetno različne (Aucouturier in Carnaud, 2002).

V patogenezi prionskih bolezni naj bi limfociti B lahko sodelovali na več načinov: a) neposredno, z zajemanjem prionov in njihovim transportom preko limfe in krvi do sekundarnih limfatičnih organov ali živčnega tkiva (Aguzzi in sod., 1997; Raeber in sod., 1999; Aucouturier in Carnaud, 2002) ali b) posredno, preko citokinov ali drugih snovi, ki jih izločajo (Klein in sod., 1998; Frigg in sod., 1999). Najpomembnejši od citokinov je verjetno limfotoksin α (LT α), ki sodeluje pri diferenciaciji FDC in oblikovanju germinativnih središč. Pri miškah z B-celično pomanjkljivostjo se pojavijo močni defekti FDC in dezorganizacija limfatičnih foliklov (Klein in sod., 1997). Diferenciacija epitelnih celic v celice M, ki sodelujejo pri transepitelijskem transportu prionov, je prav tako odvisna od signalov, ki jih dobijo od intraepitelnih limfocitov B (Kerneis in sod., 1997; Heppner in sod., 2001).

Shlomchik in sodelavci (2001) navajajo, da pri miškah z B-celično pomanjkljivostjo v črevesnem epitelu niso opazili PrP^{Sc}.

V ali na limfocitih B zelo verjetno ne poteka replikacija povzročitelja, ker je zanjo nujno potrebno izražanje PrP^C (Bueler in sod., 1993), Klein in sodelavci (1998) pa so dokazali, da do nevroinvazije pride tudi, če limfociti B na površini ne izražajo PrP^C.

2.6.2 Limfociti T

Na limfocitih T v limfatičnih organih in periferni krvi so ugotovili obe obliki prionskega proteina, celičnega in patološkega (Mabbott in sod., 1997; Herrmann in sod., 2001). Količina PrP^C na limfocitih T je manjša kot na limfocitih B (Halliday in sod., 2005). PrP^C naj bi sodeloval pri aktivaciji limfocitov T in pri interakcijah med limfociti T ter DC (Cashman in sod., 1990; Mabbott in sod., 1997). Okužba s praskavcem ne povzroči značilno pomembnih razlik v izražanju PrP^C na limfocitih T (Herrmann in sod., 2001).

Znano je, da so celice T pomagalke (CD4⁺) odgovorne za razlikovanje med gostiteljevim in tujim PrP^C (Stoltze in sod., 2003).

Pri ovcah, naravno okuženih s praskavcem, so PrP^{Sc} ugotovili na površini posameznih limfocitov T v germinativnih središčih limfatičnih organov (Andreoletti in sod., 2002 a), medtem ko ga na limfocitih T v krvi ljudi s sCJB niso našli (Choi in sod., 2009). Pri ovcah, odpornih na praskavec, se v krvi po eksperimentalni okužbi značilno pomembno poveča število citotoksičnih limfocitov T in $\gamma\delta$ + T limfocitov, ki so običajno prve celice, ki pojavijo na mestu vnetja in naj bi imele pomembno vlogo pri celični imunosti (Eaton in sod., 2007). Pri miškah, eksperimentalno okuženih s praskavcem, pa so Segundo in sodelavci (2008) opisali značilno pomembno zmanjšanje števila citotoksičnih limfocitov T ter povečanje števila celic T pomagalk v mezenterialnih bezgavkah in vranici.

Limfociti T naj ne bi imeli pomembnejše vloge v patogenezi TSE in naj ne bi sodelovali pri replikaciji PrP^{Sc}. Inkubacijska doba CJB pri golih miškah, ki so brez timusa, je podobno dolga kot pri miškah divjega tipa (Mohri in sod., 1987). Različne oblike T-celične pomanjkljivosti pri miškah ne preprečijo izbruha kliničnega praskavca (Klein in sod., 1997; Klein in sod., 1998), kljub vsemu pa ni izključeno, da limfociti T sodelujejo v patogenezi posredno, preko

delovanja svojih citokinov na druge celice, ali tako, da morda ujamejo PrP^{Sc} s FDC in ga transportirajo dalje (Aucouturier in Carnaud, 2002).

2.6.3 Folikularne dendritične celice

PrP^C je na FDC izražen v velikih količinah, zato so te celice zelo dovzetne za kopičenje prionov (Brown in sod., 1999; Brown in sod., 2000). Izražanje PrP^C na FDC je tudi pogoj za replikacijo PrP^{Sc} v germinativnih središčih limfatičnih tkiv (Brown in sod., 1999).

Površina FDC v germinativnih središčih limfatičnih organov ali terciarnih limfatičnih foliklih je glavno mesto akumulacije PrP^{Sc} (van Keulen in sod., 1996; Andreoletti in sod., 2000; Montrasio in sod., 2000; Heikenwalder in sod., 2005) in njegove replikacije (Brown in sod., 1999).

O vlogi FDC v patogenezi TSE so bile opravljene številne raziskave, med katerimi so dobili več posrednih dokazov, da so FDC pomembne za nevroinvazijo. Dovzetnost za okužbo pri miškah, ki so jih obsevali z žarki gama, je ohranjena. Žarki gama vplivajo na mitotično aktivne celice, ne pa na FDC, ki so celice v mirovanju (Mabbot in Bruce, 2001). Odpornost na okužbo pri miših seva SCID (angl. severe combined immunodeficiency; hudo kombinirano pomanjkanje imunosti), miših z rekombinacijo aktivirajočim genom (okr. angl. recombinase activating gene, RAG) in μ MT knockout mišk, ki so brez zrelih FDC, prav tako kaže, da so FDC pomembne v nevroinvaziji (Klein in sod., 1997).

Za diferenciacijo FDC in ohranjanje njihove mreže v germinativnih središčih so pomembni nekateri citokini, kot so dejavnik tumorske nekroze alfa (angl. tumor necrosis factor alfa, TNF- α), limfotoksin α (LT- α , sin. angl. tumor necrosis factor beta, TNF- β) in limfotoksin β (LT- β), ki jih izločajo aktivirani limfociti B in T ter celice ubijalke (Montrasio in sod., 2000). TNF- α in LT- α signalizirata preko TNF-receptorja 1 (TNFR 1), LT α/β pa preko limfotoksin β -receptorja (LT β R) (Ware in sod., 1995). Opravljene so bile številne raziskave o vplivu teh citokinov na FDC in patogenezo TSE, vendar so bili rezultati zelo različni. Zdravljenje mišk z LT β R-Ig (angl. lymphotoxin- β receptor immunoglobulin fusion protein; fuzijski protein receptorja limfotoksina β in Ig), ki povzroči dediferenciacijo zrelih FDC, je v času pred peroralno okužbo blokiralo kopičenje PrP^{Sc} v limfatičnih organih in preprečilo nevroinvazijo (Montrasio in sod., 2000; Mabbott in sod., 2003). Zdravljenje dva tedna po eksperimentalni

okužbi ni vplivalo na potek bolezni (Mabbott in sod., 2003) ali pa je potek bolezni značilno pomembno podaljšalo (Montrasio in sod., 2000). Nekateri drugi avtorji pa menijo, da FDC pri patogenezi TSE nimajo pomembne vloge, ker se bolezen razvije tudi pri miškah, ki nimajo FDC (Klein in sod., 1997; Brandner in sod., 1999; Manuelidis in sod., 2000; Oldstone in sod., 2002).

Pri zajetju prionov na površino FDC sodeluje sistem komplementa. Miške brez nekaterih komponent sistema komplementa so delno ali popolnoma odporne na periferno okužbo (Klein in sod., 2001; Mabbott in sod., 2001). Odstranitev receptorja CD21/35, ki veže komponenti komplementa C3 in C4 na FDC, značilno pomembno upočasni proces nevroinvazije (Zabel in sod., 2007).

Na FDC se PrP^{Sc} nedvomno kopiči in replicira, vendar zaenkrat še ni popolnoma pojasnjeno, kako povzročitelj sploh pride do FDC in kako se od njih širi naprej. FDC so fiksne celice in med njimi ter simpatičnimi živčnimi vlakni ni sinaps (Raymond in Mabbott, 2007). Pri širjenju prionov do EŽS najverjetneje sodelujejo tudi druge celice, kot so limfociti B in T, makrofagi (Aucouturier in Carnaud, 2002) ter DC (Dorban in sod., 2007).

2.6.4 Makrofagi

PrP^C je izražen tako na monocitih kot makrofagih (Herrmann in sod., 2001; Nitta in sod., 2009), medtem ko PrP^{Sc} še niso dokazali v monocitih periferne krvi ovc s praskavcem (Herrmann in sod., 2002).

V limfatičnih organih se PrP^{Sc} kopiči v citoplazmi makrofagov v germinativnih središčih limfatičnih foliklov (van Keulen in sod., 1996; Heggebo in sod., 2002; Ersdal in sod., 2003), v manjši količini tudi na njihovi celični membrani (McGovern in Jeffrey, 2007). Makrofagi kopičijo PrP^{Sc} v svoji citoplazmi v vseh fazah bolezni (van Keulen in sod., 1996; Andreoletti in sod., 2000). Depozite PrP^{Sc} v makrofagih kupolasto izbočenega področja nad Peyerjevimi ploščami in Peyerjevih plošč lahko opazimo, še preden se PrP^{Sc} pojavi na površini FDC (Andreoletti in sod., 2000). V poznejši fazi bolezni, ko PrP^{Sc} kopičijo tudi FDC, makrofagi pridobijo PrP^{Sc} tudi s fagocitozo podaljškov FDC ali fagocitozo PrP^{Sc} iz ekstracelularnih prostorov (Jeffrey in sod., 2000; Herrmann in sod., 2003).

V patogenezi TSE lahko makrofagi sodelujejo na več načinov: 1) makrofagi lahko delujejo kot celice, ki prenašajo prione (Carp in sod., 1994; Aguzzi in sod., 2003); pri eksperimentalno okuženih miškah so prione ugotovili tako v fiksni kot v gibljivi celici vranice (Carp in sod., 1994); 2) makrofagi so mesto, kjer se prioni razmnožujejo (Nitta in sod., 2009); 3) makrofagi razgrajujejo PrP^{Sc} (Carp in Callahan 1981; Rubenstein in sod., 1984); v lizosomih makrofagov vranice so našli fibrile PrP^{Sc} (Jeffrey in sod., 2000), citoplazma makrofagov pa je bila vakuolizirana (Manuelidis in sod., 1997), kar dokazuje, da makrofagi fagocitirajo in razgrajujejo povzročitelja. Beringue in sodelavci (2000) so z aplikacijo diklorometilen disfosfonata (Cl₂MDP) povzročili izginjanje makrofagov iz vranice, vzporedno je prišlo do pospešenega kopičenja PrP^{Sc}, kar kaže, da makrofagi sodelujejo predvsem pri odstranjevanju PrP^{Sc} (angl. clearance) (Beringue in sod., 2000).

2.6.5 Dendritične celice

Dendritične celice so celice hematopoetičnega izvora, specializirane za lovljenje in prenos antigena ter njegovo predstavljanje celicam T pomagalkam. Na svoji površini imajo veliko PrP^C, njegova količina pa se še poveča po stiku z molekulami poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda II (PHK II) in kostimulatornimi molekulami (Burthem in sod., 2001). DC najdemo večinoma v intersticiju limfatičnih organov, kjer so v tesnem stiku z limfatičnimi folikli (Dorban in sod., 2007). V črevesu DC najdemo v lamini propriji sluznice (Maric in sod., 1996) in v Peyerjevih ploščah, tik pod sluzničnim epitelijem, kjer so v tesnem stiku s celicami M (Kelsall in Strober, 1996).

Podobno kot pri drugih imunskih celicah so tudi mnjenja o vlogi DC v patogenezi TSE deljena. DC lahko prevzamejo antigen (npr. bakterije) od celic M (Neutra in sod., 2001) ali direktno iz lumna črevesja (Rescigno in sod., 2001 a). Ker so PrP^{Sc} našli zelo kratek čas po peroralni okužbi na DC črevesa (Huang in sod., 2002), fagocitirane delce pa lahko zelo dolgo zadržijo v endoplazemskem retikulumu, ne da bi se ti začeli razgrajevati (Banchereau in sod., 2000), so prav DC lahko tiste celice, ki zajamejo PrP^{Sc} in ga preko limfnih žil prenesejo v bezgavko. Tej hipotezi pritrjujejo tudi visoki titri infektivnosti v DC vranice mišk, eksperimentalno okuženih s praskavcem (Aucouturier in sod., 2001). Po intravenozni aplikaciji takih DC v miške z izbitim genom za RAG-1, ki so brez limfocitov T in B, FDC ter limfatičnih foliklov in zato odporne na periferno okužbo, se je razvil praskavec pri vseh miškah, kar kaže, da DC lahko

širijo prione in to brez pomoči drugih limfatičnih celic (Aucouturier in sod., 2001). DC verjetno sodelujejo tudi pri procesu nevroinvazije, ker so v tesnem stiku z živčnimi vlakni limfatičnih foliklov Peyerjevih plošč in mezenterialnih bezgavk (Dorban in sod., 2007).

Nasprotno drugi avtorji poročajo, da deplecija DC nima vpliva na patogenezo eksperimentalno izzvanega praskavca pri miškah (Oldstone in sod., 2002) in da DC ne morejo uspešno prenesti povzročitelja praskavca od FDC do PŽS (Raymond in Mabbott, 2007).

2.7 PRASKAVEC IN SPREMEMBE V SESTAVI LIMFATIČNIH ORGANOV

Podatki o spremembah v limfatičnih organih pri živalih, okuženih s praskavcem, so zelo skopi. V nasprotju s splošno uveljavljenim prepričanjem, da v limfatičnih organih pri praskavcu (in drugih TSE) ni odziva imunskega sistema in patoloških sprememb, so McGovern ter sodelavci (2004) v vranici mišk, eksperimentalno okuženih s sevom praskavca ME7, ugotovili povečano število germinativnih središč, hipertrofijo in hiperplazijo podaljškov FDC, povečano zadrževanje elektronsko gostega materiala na celični membrani FDC, povečano število velikih makrofagov ter povečano dozorevanje in število limfocitov B v sekundarnih limfatičnih foliklih (McGovern in sod., 2004). Segundo in sodelavci (2008) so pri eksperimentalno okuženih miškah opisali značilno zmanjšanje števila citotoksičnih T limfocitov in povečanje števila limfocitov T pomagalk v mezenterialnih bezgavkah in vranici. Število DC v vranici in Peyerjevih ploščah se je značilno pomembno zmanjšalo, kar vse kaže, da se po okužbi s prioni spremeni populacija limfocitov. Vse spremembe v razmerjih med celicami, ki so jih najprej dokazali s pretočno citometrijo, so potrdili tudi z imunohistokemično preiskavo (Segundo in sod., 2008).

Na limfatičnih organih ovc so bile opravljene tri raziskave. Davies in sodelavci (2004) v bezgavkah ovc, eksperimentalno okuženih s praskavcem, z imunohistokemično preiskavo in pretočno citometrijo niso ugotovili sprememb v zgradbi germinativnih središč ter imunofenotipu celic v njih. Avtorji raziskave so mnenja, da je bila količina PrP^{Sc} v preiskanih limfatičnih organih ovc genotipov VRQ/VRQ in VRQ/ARQ morda premajhna, da bi povzročila značilno pomembne razlike v zgradbi bezgavk (Davies in sod., 2004). Oceniti občutljivost metode, pri kateri so ocenjevali zgradbo germinativnih središč v bezgavkah, je relativno težko, ker je občutljivost metode po eni strani odvisna od specifičnosti uporabljenega

protitelesa proti prionom, po drugi strani pa tudi od ocenjevalca, ker imunohistokemično označenih celic niso šteli, ampak njihovo število ocenili semikvantitativno.

McGovern in Jeffrey (2007) sta z elektronsko mikroskopsko preiskavo tonzil in bezgavk ovc, naravno okuženih s praskavcem, ugotovila podobne morfološke spremembe, kot sta jih že prej opisala pri miškah – hipertrofijo podaljškov FDC, povečano zadrževanje elektronsko gostega materiala na celični membrani FDC, povečano število velikih makrofagov ter povečano dozorevanje in število limfocitov B v limfatičnih foliklih (McGovern in sod., 2004). Poleg tega sta v germinativnih središčih našla številne plazmatke, v katerih pa ni bilo depozitov PrP^{Sc} (McGovern in Jeffrey, 2007).

Eaton in sodelavci (2007 in 2009) so primerjali sestavo celic v podkožni bezgavki med skupino ovc z genotipom, srednje dovzetnim za praskavec (genotip ARQ/ARQ), in skupino ovc, najbolj odpornih na praskavec (genotip ARR/ARR). Prve spremembe so ugotovili že 5 ur po inokulaciji – pri ovcah genotipa ARQ/ARQ, ki so bile inokulirane s homogenizatom praskavca je bilo število CD21⁺ B limfocitov značilno pomembno nižje kot pri neinokuliranih ovcah (Eaton in sod., 2009). V nasprotju s temi rezultati pa se je dva tedna po eksperimentalni okužbi v bezgavkah ovc z genotipom ARQ/ARQ značilno pomembno povečalo število CD21⁺ B limfocitov. Pri ovcah, najbolj odpornih na praskavec, pa so ugotovili značilno pomembno povečanje števila limfocitov T pomagalk (Eaton in sod., 2007). Zaključili so, da se v prvih 5 urah po inokulaciji homogenizata s povzročiteljem praskavca zmanjša število CD21⁺ B limfocitov v bezgavki (Eaton in sod., 2009), in da se pojavijo značilno pomembne razlike v razmerjih med podvrstami imunskih celic že v predklinični fazi bolezni (Eaton in sod., 2007).

3 NAMEN DELA

V pričujočem delu smo si zastavili dve glavni nalogi: analizirati nekatere arhitekturne značilnosti germinativnih središč limfatičnih organov zdravih ovc različnih genotipov PrP in ovc, različnih genotipov PrP, naravno okuženih s praskavcem, ter proučiti ali so v možganih teh živali limfocitni infiltrati, ki so povezani z okužbo s praskavcem.

3.1 Hipoteze

Vprašanja, ki smo jih nameravali v nalogi proučiti, smo oblikovali v naslednje hipoteze:

1. pri zdravih ovcah se mikroarhitektura limfatičnih organov razlikuje glede na polimorfizem gena *PRNP* na položajih 136, 154 in 171,
2. naravna okužba s praskavcem v limfatičnih organih ovc povzroči spremembe v številu in velikosti germinativnih središč in spremembe celične sestave teh organov, ki so povezane s polimorfizmom kodonov 136, 154 in 171 gena *PRNP* in
3. pri ovcah, naravno okuženih s praskavcem, se v možganih, poleg značilnih patohistoloških sprememb, pojavijo tudi infiltrati limfatičnih celic, njihovo pojavljanje pa je povezano s stanjem na polimorfnih kodonih gena *PRNP*.

4 MATERIALI IN METODE

4.1 Izbor živali in oblikovanje skupin

V raziskavi smo uporabili možgane in limfatične organe ovc, ki so bile evtanazirane ali zaklane v programu izkoreninjenja (eradikacije) praskavca v dveh tropih, v katerih je bila bolezen uradno potrjena. Ovce so bile žrtvovane na podlagi genotipa PrP, ki je bil predhodno določen s preiskavo vzorcev krvi (določitev nukleotidnega zaporedja *PRNP*, ki kodira aminokisline na položajih 136, 154 in 171). Postopek genotipizacije je bil narejen z metodo ločevanja alela na položajih 136, 154 in 171 (Zabavnik in sod., 2006) in sekveniranja gena *PRNP* (Zabavnik in sod., 2004). Skupaj so bile v obeh tropih evtanazirane 604 ovce z zelo in srednje dovzetnimi genotipi (skupine NSP 3, NSP 4 in NSP 5) zaklanih pa je bilo 46 ovc z manj dovzetnimi genotipi (NSP 1 in NSP2). Ovce so bile evtanazirane na osnovi odločbe Veterinarske uprave Republike Slovenije, ki je bila plačnik stroškov genotipizacij, eradikacije, in hitrih posmrtnih ter potrditvenih testov za diagnostiko praskavca.

V raziskavo smo uvrstili 12 ovc, pri katerih je bil praskavec s posmrtnim hitrim testom in imunohistokemično preiskavo možganov na prione potrjen, in 6 ovc z genotipom ARR/ARQ, negativnih na praskavec. Poleg tega smo izvedli preliminarno imunohistokemično preiskavo limfatičnih organov 32 ovc genotipa VRQ/VRQ in ARQ/ARQ, pri katerih hitri posmrtni test ni pokazal prionov v možganih. Od teh smo izbrali 12 ovc, pri katerih smo z imunohistokemično preiskavo dokazali prione v limfatičnih organih in jih uvrstili v skupino s predklinično fazo bolezni, in 12 ovc, pri katerih je imunohistokemična preiskava na prione v limfatičnih organih negativna – te smo uvrstili v skupino zdravih živali. Rezultati preliminarne imunohistokemične preiskave so v poglavju 5.6. na strani 85.

Skupno smo v raziskavo vključili 42 ovc.

Kriteriji za izbiro teh 42 živali za nadaljnje analize so bili:

- genotip PrP na položaju 136, 154 in 171 (v nadaljevanju genotip) in razvrstitev različnih genotipov ovc v NSP glede dovzetnosti za praskavec,
- rezultat hitrega postmortalnega testa za ugotavljanje prionov v možganih,
- rezultat patohistološke preiskave možganov ter
- rezultat imunohistokemične preiskave možganov in limfatičnih organov na PrP^{Sc}.

Ti kriteriji so omogočili razdelitev ovc v dve osnovni skupini: ovce, pri katerih praskavec ni bil ugotovljen in smo jih označili kot zdrave (18 ovc), in ovce, pri katerih je bil potrjen praskavec (24 ovc).

Vsako od teh skupin smo nato glede na genotip, rezultat hitrega testa, rezultat patohistološke in imunohistokemične preiskave razdelili v tri testne skupine (oznake 1, 2, 3) s po dvema ali tremi podskupinami (oznake a, b, c), kot je opisano v nadaljevanju.

4.1.1 Testne skupine

1) V 1. testno skupino smo vključili zdrave ovce brez praskavca. Ovce v tej skupini so bile brez kliničnih znakov praskavca, hitri test za diagnostiko TSE, imunohistokemična preiskava obeksa in limfatičnih organov pa so bili negativni na TSE.

Ovce iz 1. testne skupine smo glede na genotip PrP razdelili na tri podskupine s po 6 živalmi:

- a) podskupino z genotipom, ki je zelo dovzeten za praskavec (genotip VRQ/VRQ, skupina NSP 5),
- b) podskupino z genotipom, srednje dovzetnim za praskavec (genotip ARQ/ARQ, skupina NSP 3), in
- c) podskupino z genotipom, slabo dovzetnim za praskavec (križanke alela ARR z alelom ARQ, skupina NSP 2).

2) V 2. testno skupino smo vključili ovce v klinični ali pozni predklinični fazi praskavca. Nekatere ovce v tej skupini so že kazale klinične znake praskavca, diagnozo praskavca pa smo potrdili s pozitivnim rezultatom hitrega testa za diagnostiko TSE, s pozitivno imunohistokemično reakcijo na PrP^{Sc} v možganih in značilnimi patohistološkimi spremembami možganov.

Ovce iz 2. testne skupine smo glede na genotip PrP razdelili na dve podskupini s po 6 živalmi:

- a) na podskupino z genotipom, srednje dovzetnim za praskavec (skupina NSP 3) in
- b) skupino z genotipom, zelo dovzetnim za praskavec (skupina NSP 5).

3) V 3. testno skupino smo vključili ovce v zgodnji, predklinični fazi bolezni. V to skupino smo uvrstili ovce, pri katerih sta bila rezultata hitrega testa in patohistološke preiskave negativna na TSE, hkrati pa smo ugotovili blago pozitivno imunohistokemično reakcijo na PrP^{Sc} v enem ali več preiskanih limfatičnih organov in/ali obeksu .

Ovce iz 3. testne skupine smo glede na genotip PrP razdelili na dve podskupini s po 6 živalmi:

a) na podskupino z genotipom, srednje dovzetnim za praskavec (skupina NSP 3) in

b) skupino z genotipom, zelo dovzetnim za praskavec (skupina NSP 5).

Prva testna skupina je bila hkrati tudi kontrolna skupina za 2. in 3. testno skupino. Vsaka ovca v raziskavi je bila označena z zaporedno številko, od 1 do 42, in oznako, ki je bila sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ, ARQ/ARQ ali ARR/ARQ) ter faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava).

Zaporedne številke, oznake ovc, vključenih v raziskavo in protokolarne delovne številke Inštituta za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo (IPSUV) (številka patološkega protokola – PP in številka patohistološkega protokola – HP) so navedene v tabeli 1.

Tabela 1

Podatki o ovcah vključenih v raziskavo. Legenda: oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ, ARQ/ARQ, ARR/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine, ter protokolarne delovne številke IPSUV (PP – številka patološkega protokola in HP – številka patohistološkega protokola).

zaporedna številka	oznaka ovce	testna skupina	testna podskupina	HP	PP	skupina NSP	starost ovce
1	VRQ/VRQ K1	2	zelo dovzetne	HP-564-06	PP-806-06	5	18 mesecev
2	VRQ/VRQ K2	2	zelo dovzetne	HP-759-05	PP-1022-05	5	18 mesecev
3	VRQ/VRQ K3	2	zelo dovzetne	HP-391-05	PP-629-05	5	18 mesecev
4	VRQ/VRQ K4	2	zelo dovzetne	HP-1032-05	PP-1336-05	5	18 mesecev
5	VRQ/VRQ K5	2	zelo dovzetne	HP-754-05	PP-1017-05	5	2 leti
6	VRQ/VRQ K6	2	zelo dovzetne	HP-744-05	PP-1007-05	5	3 leta
7	VRQ/VRQ PK1	3	zelo dovzetne	HP-737-05	PP-1000-05	5	2 leti
8	VRQ/VRQ PK2	3	zelo dovzetne	HP-808-05	PP-1075-05	5	2 leti
9	VRQ/VRQ PK3	3	zelo dovzetne	HP-776-05	PP-1039-05	5	3 leta
10	VRQ/VRQ PK4	3	zelo dovzetne	HP-729-05	PP-992-05	5	18 mesecev
11	VRQ/VRQ PK5	3	zelo dovzetne	HP-815-05	PP-1082-05	5	2 leti
12	VRQ/VRQ PK6	3	zelo dovzetne	HP-834-05	PP-1101-05	5	2 leti
13	VRQ/VRQ Z1	1	zelo dovzetne	HP-735-05	PP-998-05	5	18 mesecev
14	VRQ/VRQ Z2	1	zelo dovzetne	HP-833-05	PP-1100-05	5	3 leta
15	VRQ/VRQ Z3	1	zelo dovzetne	HP-764-05	PP-1027-05	5	3 leta
16	VRQ/VRQ Z4	1	zelo dovzetne	HP-762-05	PP-1025-05	5	18 mesecev
17	VRQ/VRQ Z5	1	zelo dovzetne	HP-731-05	PP-994-05	5	3 leta
18	VRQ/VRQ Z6	1	zelo dovzetne	HP-773-05	PP-1036-05	5	2 leti

19	ARQ/ARQ K1	2	srednje dovzetne	HP-623-06	PP-865-06	3	2 leti
20	ARQ/ARQ K2	2	srednje dovzetne	HP-660-06	PP-904-06	3	2 leti
21	ARQ/ARQ K3	2	srednje dovzetne	HP-898-06	PP-1181-06	3	3 leta
22	ARQ/ARQ K4	2	srednje dovzetne	HP-946-06	PP-1229-06	3	2 leti
23	ARQ/ARQ K5	2	srednje dovzetne	HP-934-06	PP-1217-06	3	2 leti
24	ARQ/ARQ K6	2	srednje dovzetne	HP-842-06	PP-1115-06	3	18 mesecev
25	ARQ/ARQ PK1	3	srednje dovzetne	HP-580-06	PP-822-06	3	3 leti
26	ARQ/ARQ PK2	3	srednje dovzetne	HP-576-06	PP-818-06	3	2 leti
27	ARQ/ARQ PK3	3	srednje dovzetne	HP-618-06	PP-860-06	3	3 leta
28	ARQ/ARQ PK4	3	srednje dovzetne	HP-586-06	PP-828-06	3	2 leta
29	ARQ/ARQ PK5	3	srednje dovzetne	HP-587-06	PP-829-06	3	2 leti
30	ARQ/ARQ PK6	3	srednje dovzetne	HP-581-06	PP-823-06	3	2 leti
31	ARQ/ARQ Z1	1	srednje dovzetne	HP-572-06	PP-814-06	3	2 leti
32	ARQ/ARQ Z2	1	srednje dovzetne	HP-578-06	PP-820-06	3	2 leti
33	ARQ/ARQ Z3	1	srednje dovzetne	HP-610-06	PP-852-06	3	18 mesecev
34	ARQ/ARQ Z4	1	srednje dovzetne	HP-613-06	PP-855-06	3	2 leti
35	ARQ/ARQ Z5	1	srednje dovzetne	HP-575-06	PP-817-06	3	3 leta
36	ARQ/ARQ Z6	1	srednje dovzetne	HP-600-06	PP-842-06	3	2 leti
37	ARR/ARQ Z1	1	slabo dovzetne	HP-1028-05	PP-1332-05	2	2 leti
38	ARR/ARQ Z2	1	slabo dovzetne	HP-464-06	PP-717-06	2	3 leta
39	ARR/ARQ Z3	1	slabo dovzetne	HP-379-05	PP-617-05	2	več kot 4 leta
40	ARR/ARQ Z4	1	slabo dovzetne	HP-386-05	PP-624-05	2	4 leta
41	ARR/ARQ Z5	1	slabo dovzetne	HP-381-05	PP-619-05	2	več kot 4 leta
42	ARR/ARQ Z6	1	slabo dovzetne	HP-387-05	PP-625-05	2	več kot 4 leta

4.1.2 Starost, spol in pasma živali

Vse ovce so bile ženskega spola, stare med 18 meseci in tremi leti, izjema so bile 4 ovce iz 1. testne skupine, v kateri so bile zdrave ovce, heterozigoti ARR/ARQ. Starost ovc smo ocenili po zobovju. Ovce so bile križanke s pasmo teksel in jezersko-solčavsko ter romanovsko pasmo.

4.2 Odvzem vzorcev za preiskave in potrditev praskavca

Pri vseh ovcah smo odvzeli vzorce možganov za hitri postmortalni test za ugotavljanje prionov in vzorce možganov (področje obeksa) ter limfatičnih organov (tonzile, retrofaringealne bezgavke, ileum s Peyerjevimi ploščami, mezenterialne bezgavke in vranica) za patohistološko in imunohistokemično preiskavo.

Pri ovcah 2. testne skupine je bil praskavec potrjen z metodami, predpisanimi v Uredbi (ES) 999/2001 in navedenimi v poglavju 2. 7. 13. Scrapie, v OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (2009).

Kot hitri test za diagnostiko TSE je bil pri vseh evtanaziranih in zaklanih ovcah izveden test Enfer TSE (Enfer Scientific). Pri vseh ovcah, kjer je bil rezultat hitrega testa pozitiven, je bil ta še enkrat ponovljen, po ponovnem pozitivnem rezultatu je bil narejen še potrditveni test z metodo Prionics Check Western (Prionics, Švica). Pri vseh ovcah 2. skupine je bil rezultat obeh metod enak, pozitiven – potrjen je bil klasični praskavec. Pri vseh ovcah, ki so v hitrem testu reagirale pozitivno, je bila nato z diskriminatornim testom izključena BSE. Kot diskriminatorni test je bila uporabljena metoda VLA hibridni western blot (VLA Hyb WB).

4.3 Obdelava tkiv za patohistološko in imunohistokemično preiskavo

Vzorce limfatičnih organov in obeksa za patohistološko in imunohistokemično preiskavo smo fiksirali v 10 % puferiranem formalinu. Vzorce vseh ovc, ki so v hitrem testu na TSE reagirale pozitivno, smo pred impregnacijo s parafinom še za eno uro potopili v 96 % mravljično kislino, da smo inaktivirali prione v tkivih. Po končani inaktivaciji smo vzorce pod tekočo vodo spirali 10 do 20 minut in jih nato vsaj še 1 uro fiksirali v 10 % puferiranem formalinu. Vzorcev ovc, ki so v hitrem testu na TSE reagirale negativno, pred vklopom nismo obdelali z mravljično kislino.

Vzorce smo s pomočjo aparature HypercenterXP (Shandon®) impregnirali s parafinom in nato izdelali parafinske bloke tkiv na aparaturi Histocentre 2 (Shandon®).

4.4 Barvanje s hematoksilinom in eozinom

Iz parafinskih blokov limfatičnih organov in obeksa smo z drsnim mikrotomom (Leica®) narezali tkivne rezine debeline 4 µm. Tkivne rezine smo v aparaturi Varistain (Shandon®) deparafinizirali v ksilolu in padajoči vrsti alkoholov, jih obarvali s hematoksilinom in eozinom (HE) in končno dehidrirali v naraščajoči vrsti alkoholov ter postopek barvanja zaključili z bistrenjem v ksilolu. Pobarvane tkivne rezine smo pokrili s sintetično smolo in pokrovnim stekelcem. Barvanje smo izvedli po protokolu, ki ga uporabljamo na IPSUV.

4.5 Imunohistokemična preiskava

Vse imunohistokemične preiskave smo izvedli na parafinskih tkivnih rezinah debeline 4 µm, ki smo jih prenesli na objektna stekelca, prevlečena s 3-aminopropiltrietsilanom (APTES) in jih nato čez noč sušili v termostatu pri temperaturi 45 °C. Tkivne rezine smo pred imunohistokemičnim označevanjem deparafinizirali v aparaturi Varistain (Shandon®).

4.5.1 Postopek imunohistokemične preiskave za ugotavljanje prionov

Imunohistokemično preiskavo za ugotavljanje prionov v tkivih smo izvedli po postopku, ki ga uporabljamo na IPSUV. Za označevanje prionov smo uporabili protitelo 2G11 (Institut Pourquier), ki je mišje monoklonsko protitelo proti zaporedju 146–182 ovčjega prionskega proteina. Protitelo smo uporabili v koncentraciji 500 µg/ml (redčitev 1: 350, koncentracija 0,14 µg/ml).

Pred imunohistokemičnim označevanjem prionov v limfatičnih tkivih smo najprej optimizirali postopek razkrivanja antigena.

Za optimizacijo postopka razkrivanja antigenskih mest za imunohistokemično dokazovanje prionov v limfatičnih organih smo opravili naslednja preskušanja:

- demaskiranje z mikrovalovi, pri čemer smo uporabili različno dolge čase demaskiranja: 10 minut, 20 minut, 25 minut in 30 minut in različne pufre: citratni pufer (pH 6,0), pufer Target Retrieval Solution, Citrate pH 6 (DAKO, kataloška številka S2369) in pufer EDTA (pH 8,0),
- demaskiranje 20 minut na temperaturi 121° C v avtoklavu in v citratnem pufru (pH 6,0).

Rezultati optimizacije razkrivanja antigena so navedeni med rezultati v poglavju 5.1.1. na strani 75.

Po optimizaciji postopka razkrivanja antigena smo imunohistokemično označevanje prionov izvedli ročno z vizualizacijskim kitom Dako REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007) po naslednjem postopku:

1. Deparafinizacija tkivnih rezin do vode.
2. Demaskiranje antigena v avtoklavu (Kambič) na temperaturi 121° C, v citratnem pufru pH 6,0 20 minut.
3. Hlajenje rezin v citratnem pufru do sobne temperature.
4. Inhibicija endogene peroksidaze v 3 % vodikovem peroksidu v puferirani fiziološki raztopini (angl. phosphate buffer saline; PBS), 30 minut.
5. Kratko spiranje z destilirano vodo.
6. Inkubacija v 96 % mravljični kislini, 5 minut.
7. Spiranje pod tekočo vodo, 10 minut.
8. Kratko spiranje z destilirano vodo in prenos za 5 minut v izpiralni pufer.
9. Inkubacija z normalnim kozjim serumom (NGS, okr. angl. normal goat serum) (DAKO, kat. št. X0907), redčenem 1:50 v 5 % govejem serumskem albuminu, raztopljenem v PBS.
10. Inkubacija s primarnim protitelesom proti PrP^{Sc}, v vlažni komori na sobni temperaturi za 1 uro.
11. Kratko spiranje v izpiralnem pufru, 5 minut.
12. Inkubacija s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s polimerom, označenim s hrenovo peroksidazo, iz vizualizacijskega kita DAKO REAL™ EnVision™ Detection

System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007) (steklenička A), v vlažni komori na sobni temperaturi 20 minut.

13. Kratko spiranje v izpiralnem pufru, 5 minut.

14. Inkubacija v delovni raztopini barvnega substrata z 3-diaminobenzidinom (DAB).

Raztopino barvnega substrata smo pripravili pred uporabo, tako da smo v pufer iz kita (Substrate Buffer – steklenička B) dodali kromogen iz kita (DAB + Chromogen – steklenička C), v razmerju 1 ml pufru in 20 µl kromogena. Tkivne rezine smo inkubirali pri sobni temperaturi 7 minut.

15. Spiranje z destilirano vodo in kontrastiranje z Meyerjevim hematoksilinom 1 minuto.

16. Spiranje v izpiralnem pufru 1 minuto.

17. Spiranje v tekoči vodi 20 minut, dehidracija v naraščajoči vrsti alkoholov, bistrenje v ksilolu in pokrivanje s sintetično smolo.

Kot izpiralni pufer smo uporabili puferirano fiziološko raztopino (PBS, angl. phosphate buffer saline) s pH 7,2.

Pozitivna reakcija je pri imunohistokemičnem postopku, kjer uporabimo DAB kot barvni substrat, vidna kot rjav reakcijski produkt. Jedra celic se po kontrastiranju s hematoksilinom obarvajo nežno modro.

4.5.2 Postopek imunohistokemičnega označevanja limfatičnih celic

4.5.2.1 Testiranje protiteles za imunofenotipizacijo celic limfatičnih organov na parafinskih tkivnih rezinah

Na parafinskih rezinah limfatičnih organov smo najprej testirali uporabnost več protiteles, ki označijo limfocite B in T, FDC ter makrofage. Uporabljena protitelesa so navedena v tabeli 2. Rezultati testiranja protiteles so navedeni med rezultati v poglavju 5.1.2 na straneh 76 do 77.

Švara T.

Vpliv genotipa prionskega proteina na celično sestavo limfatičnih organov zdravih ovc in ovc, naravno okuženih s praskavcem

Tabela 2

Podatki o protitelesih, testiranih za imunofenotipizacijo limfatičnih celic. Legenda: PAb – poliklonsko protitelo, MAb – monoklonsko protitelo.

specifičnost in koncentracija komercialnih protiteles	kataloška oznaka protitelesa/ proizvajalec	fenotip označenih celic	testirane koncentracije in čas inkubacije	predobdelava z mikrovalovi	predobdelava v avtoklavu
človeški CD3 0,6 mg/ml	PAb A0452 (DAKO)	T limfociti	12, 6, 4, 3, 2 in 1,5 µg/ml, 1 ura	10, 20, 25 in 30 min	20 min, 121°C
človeški CD79αcy, klon HM57 250 µg/ml	MAb M7051 (DAKO)	B limfociti	10, 5, 2,5, 1,25 in 0,8 µg/ml, 1 ura, čez noč	10, 20, 25 in 30 min	20 min, 121°C
goveji S 100 2,3 mg/ml	PAb Z0311 (DAKO)	FDC	11,5, 5,75, 2,9, 2,3, 1,9, 1,6 in 1,4 µg/ml, 1 uro, čez noč	-	20 min, 121°C
človeške FDC, klon CNA.42 140 µg/ml	MAb M7157 (DAKO)	FDC	5,6, 2,8, 1,4, 0,7 in 0,5 µg/ml, 1 ura	10 min	20 min, 121°C
človeški lizocim 6,1 mg/ml	PAb A0099 (DAKO)	makrofagi	61 µg/ml, 1 ura	10, 20, 25 in 30 min	-
človeški CD14 25 µg/ml	MAb M0825 (DAKO)	makrofagi	2,5 µg/ml, 1 ura	10, 20, 25 in 30 min	-
človeški mieloično histiocitni antigen 275 µg/ml	MAb M0747 (DAKO)	makrofagi	5,5 µg/ml, 1 ura	10, 20, 25 in 30 min	-
človeški alfa 1-tripsin 1100 µg/ml	PAb A0012 (DAKO)	makrofagi	22 µg/ml, 1 ura	10, 20, 25 in 30 min	-
človeški CD 68 40 µg/ml	MAb M0876 (DAKO)	makrofagi	0,8 µg/ml, 30 min	20 min	-

4.5.2.2 Postopek imunohistokemičnega označevanja limfatičnih celic

Imunohistokemično označevanje limfocitov B in FD v limfatičnih organih ter obeksu živali testnih skupin smo izvedli z aparaturo DAKO Autostainer Universal Staining System, označevanje limfocitov T pa smo izvedli ročno.

Postopek:

1. Deparafinizacija tkivnih rezin do vode.
2. Demaskiranje antigenov v avtoklavu (Kambič) na temperaturi 121° C, v citratnem pufu (pH 6,0) 20 minut.
3. Hlajenje rezin v citratnem pufu do sobne temperature.
4. Kratko spiranje z destilirano vodo.
5. Inkubacija s primarnimi protitelesi, razredčenih v DAKO Cytomation Antibody Diluent (DAKO, kataloška oznaka S0805). Na osnovi predhodne optimizacije postopka smo v tej fazi uporabili naslednja protitelesa:
 - a) Kunčje protitelo proti človeškemu CD 3, za označevanje limfocitov T (DAKO, kataloška oznaka A0452), v koncentraciji 0,6 mg/ml (razredčitev 1: 150, koncentracija 4 µg/ml), inkubacija 1 uro na sobni temperaturi,
 - b) Mišje monoklonsko protitelo proti človeškemu CD79 α , klon HM57, za označevanje limfocitov B (DAKO, kataloška oznaka M7051), v koncentraciji 250 µg/ml (razredčitev 1: 25, koncentracija 10 µg/ml), inkubacija čez noč na temperaturi 4° C,
 - c) Kunčje poliklonsko protitelo proti govejemu S-100, za označevanje FDC (DAKO, kataloška oznaka Z0311), v koncentraciji 2,3 mg/ml (razredčitev 1: 800, koncentracija 2,9 µg/ml), inkubacija 1 uro na sobni temperaturi.
6. Kratko spiranje v izpiralnem pufu, 5 minut.
7. Inhibicija endogene peroksidaze v Peroxidase-Blocking Solution, Dako REAL™ (DAKO, kataloška oznaka S2023) 30 minut.
8. Inkubacija v sekundarnih protitelesih, konjugiranih s polimerom, označenim s hrenovo peroksidazo, iz vizualizacijskega kita DAKO REAL™ EnVision™ Detection System

Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007) (steklenička A), v vlažni komori na sobni temperaturi 20 minut.

9. Kratko spiranje v izpiralnem pufru, 5 minut.
10. Inkubacija v delovni raztopini barvnega substrata z 3-diaminobenzidinom (DAB). Raztopino barvnega substrata smo pripravili pred uporabo tako, da smo v pufer iz kita (Substrate Buffer – steklenička B) dodali kromogen iz kita (DAB + Chromogen – steklenička C), v razmerju 1 ml pufra in 20 µl kromogena. Tkivne rezine smo inkubirali pri sobni temperaturi 7 minut.
11. Spiranje z destilirano vodo in nato kontrastiranje z Mayerjevim hematoksilinom 1 minuto.
12. Spiranje v izpiralnem pufru PBS 1 minuto.
13. Spiranje v tekoči vodi 20 minut, dehidracija v naraščajoči vrsti alkoholov, bistrenje v ksilolu in pokrivanje s sintetično smolo.

Kot izpiralni pufer smo uporabili TRIS-HCl-NaCl s pH 7,5.

Pozitivna reakcija je pri imunohistokemičnem postopku, kjer uporabimo DAB kot barvni substrat, vidna kot rjav reakcijski produkt. Jedra celic se po kontrastiranju s hematoksilinom obarvajo nežno modro.

4.5.3 Kontrole pri imunohistokemičnem označevanju prionov in limfatičnih celic

V vsakem od imunohistokemičnih postopkov smo uporabili kontrole. Za pozitivno kontrolo pri imunohistokemičnem označevanju prionov smo uporabili parafinske tkivne rezine obeksov živali, pri katerih je bil praskavec že prej potrjen. Kot pozitivno kontrolo za limfocite B in T ter FDC smo uporabili tkivne rezine ovčjih limfatičnih organov, za katere vemo, da z določenimi protitelesi reagirajo pozitivno.

Kot negativno kontrolo smo uporabili tkivne rezine, pri katerih smo v imunohistokemičnem postopku primarno protitelo nadomestili z razredčilom za protitelesa (5 % goveji serumski albumin, raztopljen v PBS ali razredčilo za protitelesa DAKO Cytomation Antibody Diluent).

Ponovljivost imunohistokemične reakcije smo kontrolirali tako, da smo v vsako serijo barvanja vzorcev vključili tkivno rezino vzorca, ki je bil označen v prejšnjih serijah. Ponovljivost reakcije smo ocenili subjektivno. Rezultati kontrol so navedeni v poglavju 5.2 na strani 79.

4.6 Kriteriji za ocenjevanje patohistoloških sprememb in imunohistokemične reakcije na prione

Pri patohistološki preiskavi obeksa in oceni imunohistokemične reakcije na prione smo uporabili kriterije Centralnega referenčnega laboratorija Evropske skupnosti za TSE (CRL), http://www.defra.gov.uk/vla/science/sci_tse_oie.htm (4. 8. 2009), ki so opisani v poglavju 2.7.13. Scrapie, v OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.

4.6.1 Ocena patohistoloških sprememb v področju obeksa

Kriteriji za patohistološko oceno praskavca so naslednji:

1. Rezultat patohistološke preiskave je pozitiven, če v nevropilu in/ ali nevronih predilekcijskih mest ugotovimo značilno vakuolizacijo (t. i. spongiformne spremembe). Te spremembe so običajno bilateralno simetrične. Spongiformne spremembe na enem samem predilekcijskem mestu so dovolj za patohistološko potrditev praskavca. Pri presoji je treba upoštevati dejstvo, da se pri nekaterih zdravih ovcah pojavljajo posamezne vakuole v telesih nevronov. Predilekcijsko mesto za spongiformne spremembe pri ovcah je DNVN, manj pogosto se spremembe pojavljajo v olivarnem jedru.
2. Rezultat patohistološke preiskave je negativen, če v nevropilu in/ali nevronih predilekcijskih mest ne ugotovimo značilne vakuolizacije, kljub temu da ta mesta v tkivni rezini zanesljivo prepoznamo in ocenimo.
3. Rezultat patohistološke preiskave je nejasen, če vakuolizacija v nevropilu ni dovolj izražena za zanesljivo potrditev diagnoze.

4. Rezultat patohistološke preiskave zaključimo kot neprimeren za oceno v primeru, če v vzorcu ni predilekcijskih mest, ali če so v vzorcu le deli teh mest in niso jasno pozitivni ali če je vzorec močno avtolitičen ali so v njemu drugi artefakti, ki lahko zabrišejo ali prekrijejo spongiformne spremembe. Kot neprimerne ocenimo tudi vzorce, v katerih so druge nevropatološke spremembe, ki motijo oceno in zaradi njih ne moremo zanesljivo potrditi ali izključiti spongiformnih sprememb.

V primerih, ko smo s patohistološko preiskavo obeksa ugotovili značilne spongiformne spremembe, smo njihovo jakost semikvantitativno ocenili v naslednjih nevroanatomskih področjih: DNVN, hipoglosno jedro, spinalni trakt in jedro trigeminalnega živca, retikularna formacija, mediani šiv, akcesorno kuneatno jedro in olivarna jedra.

Jakost spongiformnih sprememb smo ocenili s stopnjo od 1 do 3:

- 1 – ko smo našli le posamezne vakuole,
- 2 – ko smo našli številnejše vakuole,
- 3 – ko smo ugotovili močno vakuolizacijo.

Iz ocen jakosti spongiformnih sprememb v posameznih nevroanatomskih področjih smo izračunali skupno (povprečno) oceno spongiformnih sprememb v obeksu.

4.6.2 Ocena imunohistokemične reakcije na prione v področju obeksa

Kriteriji za oceno imunohistokemične reakcije na prione za klasični praskavec so:

1. Rezultat imunohistokemične preiskave je pozitiven, če ugotovimo specifično imunohistokemično reakcijo na predilekcijskih mestih, z ali brez spremljajočih spongiformnih sprememb.
2. Rezultat imunohistokemične preiskave je negativen, če je predilekcijska mesta v tkivni rezini mogoče zanesljivo prepoznati in oceniti, vendar v njih ni specifične imunohistokemične reakcije. Pozitivna tkivna kontrola, inkubirana z istimi primarnimi protitelesi proti prionom, mora biti pozitivna.
3. Rezultat imunohistokemične preiskave je nejasen, če ni specifične imunohistokemične reakcije na mestih, kjer jo normalno določimo z izbranim protitelesom, ali če je reakcijskega produkta tako malo, da ni mogoče zanesljivo reči,

da je vzorec pozitiven ali negativen. Pozitivna tkivna kontrola, inkubirana z istimi primarnimi protitelesi proti prionom, mora biti pozitivna.

4. Rezultat imunohistokemične preiskave obravnavamo kot neuporaben za oceno v primeru, če v vzorcu ni predilekcijskih mest in ni specifične imunohistokemične reakcije, ali če je prišlo med postopkom do tehničnih napak.

V primerih, ko smo v obeksu ugotovili specifično imunohistokemično reakcijo, smo jo v sedmih nevroanatomskih področjih (DNVN, hipoglosno jedro, spinalni trakt in jedro trigeminalnega živca, retikularna formacija, mediani šiv, akcesorno kuneatno jedro in olivarna jedra) semikvantitativno ocenili s stopnjami od 1 do 3:

- 1 – šibka pozitivna reakcija,
- 2 – zmerno močna pozitivna reakcija, in
- 3 – močna pozitivna reakcija.

Kriterija za oceno sta bila jakost imunohistokemične reakcije in količina reakcijskega produkta v tkivni rezini.

Pri opisovanju oblike oz. vzorca pozitivne imunohistokemične reakcije na prione v obeksu smo povzeli terminologijo iz članka Gonzalez in sodelavcev (2002), ki jo uporablja tudi CRL (http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci_prp_dep_ovine.pdf) (4. 8. 2009).

Za navajanje oblike odlaganj prionov v obeksu smo tako uporabili naslednje izraze: intranevronska, intraastrocitna, intramikroglijska, drobno točkasta, grobo zrnata, zlivajoča, perinevronska, linearna, zvezdasta, subpialna, subependimska, perivaskularna, perivakuolarna, ependimska odlaganja, vaskularne in nepravne lehe.

V vsakem nevroanatomskem področju obeksa smo jakost in obsežnost vsakega od odlaganj (t.

i. jakost PrP^{Sc} tipa) ocenili subjektivno s stopnjami od 0 do 3:

- 0 – če take vrste odlaganja nismo našli,
- 1 – šibka pozitivna reakcija,
- 2 – zmerno močna reakcija, in
- 3 – močna reakcija.

Iz ocen reakcije za vsakega od tipov odlaganja (t. i. jakost PrP^{Sc} tipa) v šestih nevroanatomskih področjih obeksa smo nato izračunali povprečno vrednost reakcije za vsako obliko odlaganja v celém obeksu (t. i. povprečje PrP^{Sc} tipa).

Zaradi lažje obdelave podatkov in primerjave z že objavljenimi podatki smo oblike odlaganj PrP^{Sc} združili v štiri vzorce:

- intracelularni vzorec, v katerega smo vključili intranevronska, intramikroglijska in endependimska odlaganja,
- astrocitni vzorec, v katerega smo vključili zvezdasta, perivaskularna, perivakuolarna, subpialna in subependimska odlaganja,
- nevropilni vzorec, v katerega smo vključili drobno točkasta, grobo zrnata, zlivajoča, linearna in perinevronska odlaganja ter lažne lehe,
- žilni vzorec, v katerega smo uvrstili vaskularne lehe.

Povprečno vrednost reakcije za vsakega od štirih vzorcev (t. i. jakost PrP^{Sc} vzorca) smo izračunali iz povprečij PrP^{Sc} tipov.

4.6.3 Ocena imunohistokemične reakcije na prione v limfatičnih organih

4.6.3.1 Preliminarne meritve za določitev velikosti vzorca za oceno imunohistokemične reakcije na prione v limfatičnih organih

Imunohistokemično reakcijo na prione v limfatičnih organih smo najprej nameravali oceniti morfometrično, z merjenjem povprečnih sivin.

Za določitev velikosti vzorca, ki je v stereologiji definiran kot število polj, ki jih moramo analizirati pri raziskavi, smo najprej izvedli preliminarne meritve (Kališnik, 2002).

Na tkivnih rezinah tonzile, vranice, ileuma in mezenterialne bezgavke smo zajeli barvne slike petih polj pod 40-kratno povečavo. Jakost imunohistokemične reakcije smo ocenili s programom NIS-Elements (Nikon) in jo izrazili kot povprečno sivino (angl. mean grey). Povprečna sivina je statistično izračunana povprečna vrednost intenzitete svetlosti posameznih slikovnih točk (ang. pixel). Vrednosti povprečne sivine znašajo med 0 in 255, pri čemer beli barvi pripada vrednost 255, črni pa 0.

Jakost imunohistokemične reakcije za PrP^{Sc} smo izmerili v različnih področjih:

- v tonzili smo v vsakem polju izmerili vrednosti povprečnih sivin vseh germinativnih središč in 5 interfolikularnih področjih. Interfolikularna področja smo občrtali tako, da smo v njih zajeli večino interfolikularnega področja v vidnem polju.
- v vranici smo izmerili povprečne sivine v germinativnih središčih in v rdeči pulpi. V rdeči pulpi smo v vsakem polju občrtali 5 različno velikih področjih pravokotne oblike, ki smo jih v vidno polje postavili tako, da so pokrivala večino vidnega polja in hkrati v njih niso bile zajete trabekule, kapsula vranice ali večje krvne žile.
- v mezenterialni bezgavki smo zajeli 5 polj v področju skorje in v njih občrtali vsa germinativna središča in po pet različno velikih interfolikularnih področij pravokotne oblike.
- v ileumu smo občrtali vsa germinativna središča Peyerjevih plošč na 5 poljih in izmerili vrednosti povprečne sivine v njih.

Poleg tega smo na vsakem polju občrtali po manjše področje brez specifične imunohistokemične reakcije, ki je bilo obarvano zgolj s kontrastnim sredstvom, hematoksilinom. Povprečno sivino v teh področjih smo označili kot povprečno sivino kontrastnega sredstva.

Specifično vrednost povprečne sivine smo izračunali tako, da smo od vrednosti povprečnih sivin, izmerjenih v različnih področjih organov odšteli povprečno sivino kontrastnega sredstva.

Iz rezultatov teh preliminaranih meritev smo izračunali povprečje (angl. average, AVG), standardno deviacijo (STD), standardno napako (angl. standard error, SE) in relativno standardno napako (angl. relative standard error, RSE) ter na osnovi vsega naštetega izračunali velikost vzorca tako, kot v svojem delu navaja Kališnik (2002).

Rezultati preliminaranih meritev za določitev velikosti vzorca so navedeni v poglavju 5.3 na strani 79.

Po opravljenih preliminaranih meritvah, s katerimi smo zaradi neenakomerno močne pozitivne imunohistokemične reakcije med različnimi germinativnimi središči istega vzorca izračunali izredno veliko število vidnih polj, na katerih bi morali opraviti meritve, smo se odločili, da bomo imunohistokemično reakcijo na prione v limfatičnih organih ocenili semikvantitativno.

4.6.3.2 Semikvantitativna ocena imunohistokemične reakcije na prione v limfatičnih organih

Skupna ocena imunohistokemične reakcije na prione v limfatičnih organih je bila sestavljena iz ocene intenzitete jakosti imunohistokemične reakcije in ocene deleža pozitivnih limfatičnih foliklov v tkivni rezini.

Jakost imunohistokemične reakcije smo semikvantitativno ocenili s stopnjami:

- 0 negativno,
- +
- ++ zmerno močna pozitivna reakcija in
- +++ močna pozitivna reakcija.

Delež pozitivnih limfatičnih foliklov v tkivni rezini smo ocenili s stopnjami:

- 0 – negativno, nobenih pozitivnih limfatičnih foliklov,
- 1 – do 30 % limfatičnih foliklov z značilno imunohistokemično reakcijo,
- 2 – od 30 % do 60 % limfatičnih foliklov z značilno imunohistokemično reakcijo,
- 3 – nad 60 % limfatičnih foliklov z značilno imunohistokemično reakcijo.

Skupna ocena imunohistokemične reakcije na prione za limfatični organ je povprečje ocene jakosti imunohistokemične reakcije in deleža pozitivnih limfatičnih foliklov, npr. ocena imunohistokemične reakcije v organu, kjer smo ugotovili šibko imunohistokemično reakcijo (jakost imunohistokemične reakcije = +) v več kot 60 % limfatičnih foliklov (delež pozitivnih foliklov = 3) je bila 2.

4.7 Morfometrična analiza

Za morfometrično analizo smo uporabili slike tkivnih rezin, narejene z digitalno kamero DS-U2 (Nikon) in mikroskopom Microphot FXA (Nikon). Izbrane parametre smo analizirali z računalniškim programom NIS-Elements BR (Nikon).

4.7.1 Preliminarne morfometrične meritve

Preliminarne meritve smo v vseh primerih opravili na tkivnih rezinah tonzile, vranice, ileuma in mezenterialne bezgavke. Na vsaki tkivni rezini smo zajeli slike 5 polj pod 40-kratno povečavo. V tonzili, vranici in ileumu smo slike zajemali na naključnih mestih v parenhimu, v bezgavkah pa izključno v področju skorje. Na osnovi rezultatov preliminarnih meritev smo izračunali velikost vzorca za vsakega od pregledanih organov (Kališnik, 2000).

4.7.1.1 Preliminarne meritve za določitev velikosti vzorcev za meritve arealne gostote profilov germinativnih središč

Na vsakem od 5 polj smo s programom za računalniško analizo slike občrtali referenčni prostor in profile vseh germinativnih središč (Slika 1). Za referenčni prostor smo določili vse tkivo pregledanega organa, tako parenhim kot njegovo stromo. S programom za meritve površin smo izmerili površino referenčnega prostora in profilov germinativnih središč.

Arealno gostoto profilov germinativnih središč smo na posameznem polju izračunali iz razmerja med skupno površino profilov vseh germinativnih središč na polje in površino referenčnega prostora. Iz preliminarnih rezultatov arealnih gostot smo izračunali velikosti vzorca za vsakega od pregledanih organov.

Rezultati preliminarnih meritev za določitev velikosti vzorca so navedeni med rezultati na strani 80.

4.7.1.2 Preliminarne meritve za določitev velikosti vzorcev za meritve povprečnih svin imunohistokemične reakcije za limfatične celice

Preliminarne meritve za določitev velikosti vzorca za meritve povprečnih svin smo izvedli na tkivnih rezinah tonzile, vranice, ileuma in mezenterialne bezgavke, ki so bile imunohistokemično označene s protitelesi proti človeškemu CD3 (DAKO). Na vsaki od tkivnih rezin smo zajeli barvne slike 5 polj pod 40-kratno povečavo. Jakost imunohistokemične reakcije smo ocenili s pomočjo programa NIS-Elements (Nikon) in jo izrazili kot povprečno sivino. Vrednosti povprečne sivine varirajo med 0 in 255, pri čemer beli barvi pripada vrednost 255, črni pa 0.

Jakost imunohistokemične reakcije za limfocite T smo izmerili v občrtanih germinativnih središčih (Slika 2). Poleg tega smo na vsakem polju občrtali manjše področje brez specifične imunohistokemične reakcije, ki je bilo obarvano zgolj s kontrastnim sredstvom, hematoksilinom. Povprečno sivino v teh področjih smo označili kot povprečno sivino kontrastnega sredstva.

Specifično vrednost povprečne sivine smo izračunali tako, da smo od vrednosti povprečnih sivin izmerjenih v različnih področjih organov odšteli povprečno sivino kontrastnega sredstva.

Iz podatkov o povprečnih sivinah imunohistokemične reakcije smo izračunali podatke o velikosti vzorca za vsakega od pregledanih organov. Rezultati preliminarne meritve so navedeni v poglavju 5.3.3 na strani 81.

4.7.2 Določitev korelacije med specifično vrednostjo povprečne sivine imunohistokemične reakcije in številom celic

Korelacijo med specifično vrednostjo povprečne sivine in številom imunohistokemično označenih limfocitov T smo izmerili tako, da smo na 10 občrtanih področij germinativnih središč prešteli vse limfocite T in izmerili specifične vrednosti povprečne sivine. Nato smo iz rezultatov izračunali korelacijski koeficient. Rezultati so navedeni v poglavju 5.4 na strani 81.

4.7.3 Primerjava rezultatov meritve povprečnih sivin med vzorci, obdelanimi z mravljično kislino in vzorci, ki niso bili obdelani z mravljično kislino

Meritve smo izvedli na vzorcih tonzil šestih ovc, ki so bile v hitrem testu negativne. En del tonzile smo pred vklopom v parafin potopili za 1 uro v 96 % mravljično kislino, drug del tonzile pa smo vklopili v parafin brez te predobdelave. Na tkivnih rezinah smo izmerili povprečne sivine za limfocite B in T ter FDC in nato izračunali razmerje, koeficient med rezultati meritve povprečnih sivin na tkivih, obdelanih z mravljično kislino in tkivih, ki te predobdelave niso bile deležne. Izračunane koeficiente smo upoštevali pri obdelavi rezultatov meritve povprečnih sivin imunohistokemične reakcije pri testnih živali.

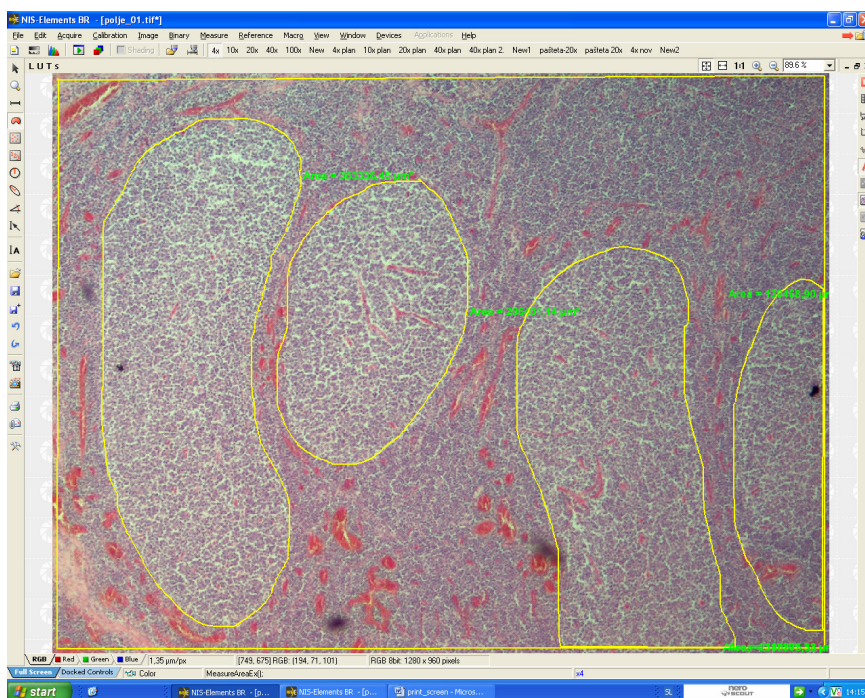
Rezultati so navedeni v poglavju 5.5 na strani 82.

4.7.4 Morfometrične meritve na limfatičnih organih testnih skupin

4.7.4.1 Merjenje arealne gostote profilov germinativnih središč

Arealno gostoto profilov germinativnih središč smo izmerili na tkivnih rezinah limfatičnih organov, označenih s protitelesom proti limfocitom T. Na 20 poljih, zajetih pri 40-kratni povečavi, smo občrtali in izmerili referenčni prostor in profile vseh germinativnih središč tako, kot smo opisali pri preliminarnih meritvah arealne gostote profilov germinativnih središč.

Arealna gostota profilov germinativnih središč je razmerje med skupno površino profilov vseh germinativnih središč in površino referenčnega prostora.



Slika 1

Slika zaslona pri merjenju arealne gostote profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov v tonzili. Na sliki so občrtani profili germinativnih središč foliklov in referenčni prostor.

4.7.4.2 Meritve numerične gostote profilov germinativnih središč

Pri izračunavanju numerične gostote profilov germinativnih središč smo uporabili podatke, ki smo jih pridobili že pri meritvah arealne gostote.

Numerično gostoto smo izrazili kot število profilov germinativnih središč na vidno polje velikosti 500.000 μm^2 .

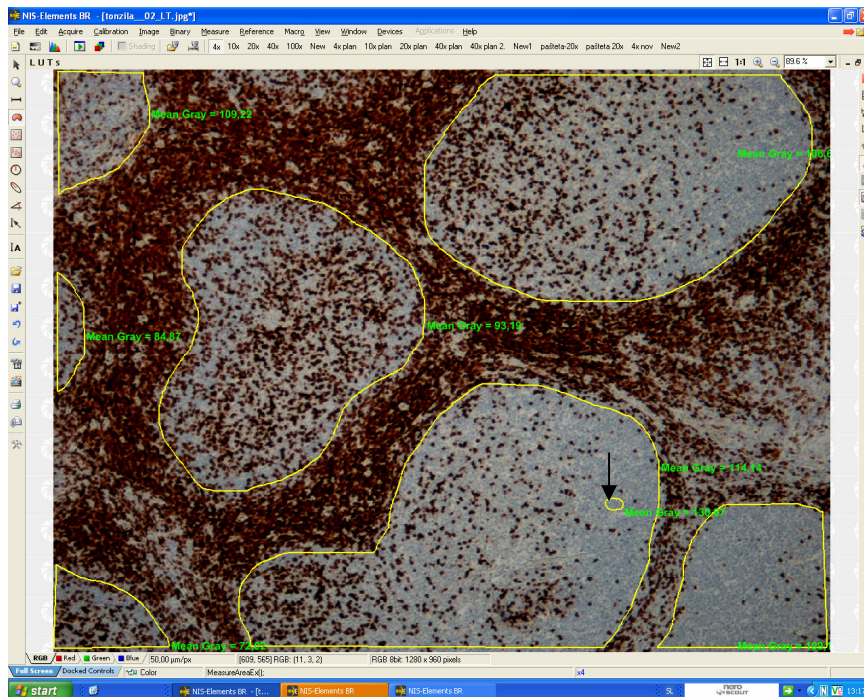
4.7.4.3 Meritve povprečne sivine imunohistokemične reakcije za limfocite T in B ter aktivacije folikularnih dendritičnih celic v germinativnih središčih limfatičnih organov

Število limfocitov T in B ter aktivacijo FDC smo ocenili na rezinah limfatičnih organov, predhodno označenih z imunohistokemično metodo (Slike 2 do 4). Število celic smo določili posredno, z merjenjem povprečne sivine (angl. mean grey). Meritve smo izvedli na 20 barvnih slikah vsakega organa, na enak način kot smo to opisali pri preliminarnih meritvah. Specifično vrednost povprečne sivine smo izračunali tako, da smo od vrednosti povprečnih svin odšteli povprečno sivino kontrastnega sredstva.

Povprečna sivina je statistično izračunana povprečna vrednost intenzitete svetlosti posameznih slikovnih točk (ang. pixel). Vrednosti povprečne sivine znašajo med 0 in 255, pri čemer beli barvi pripada vrednost 255, črni pa 0.

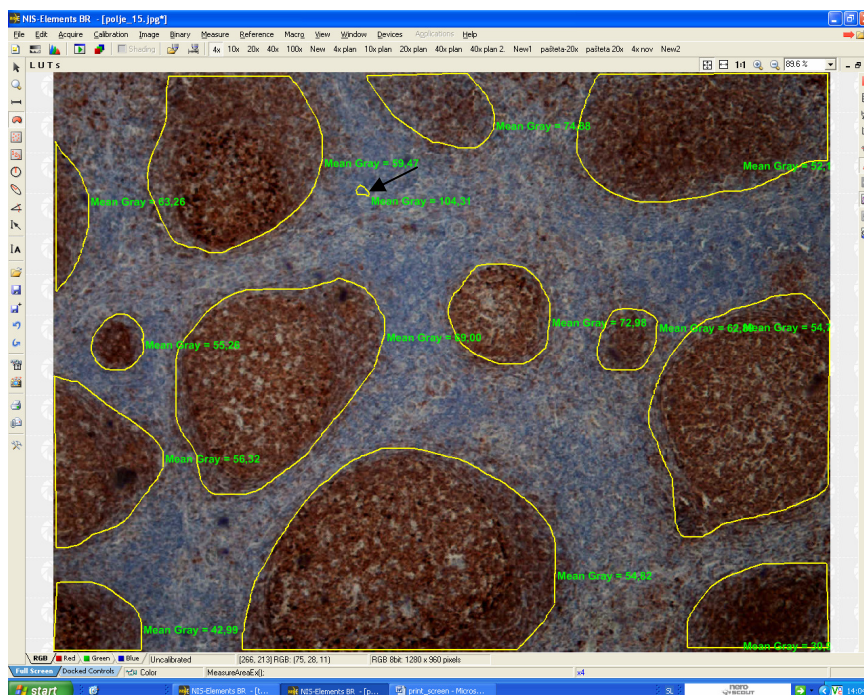
Švara T.

Vpliv genotipa prionskega proteina na celično sestavo limfatičnih organov zdravih ovc in ovc naravno okuženih s praskavcem



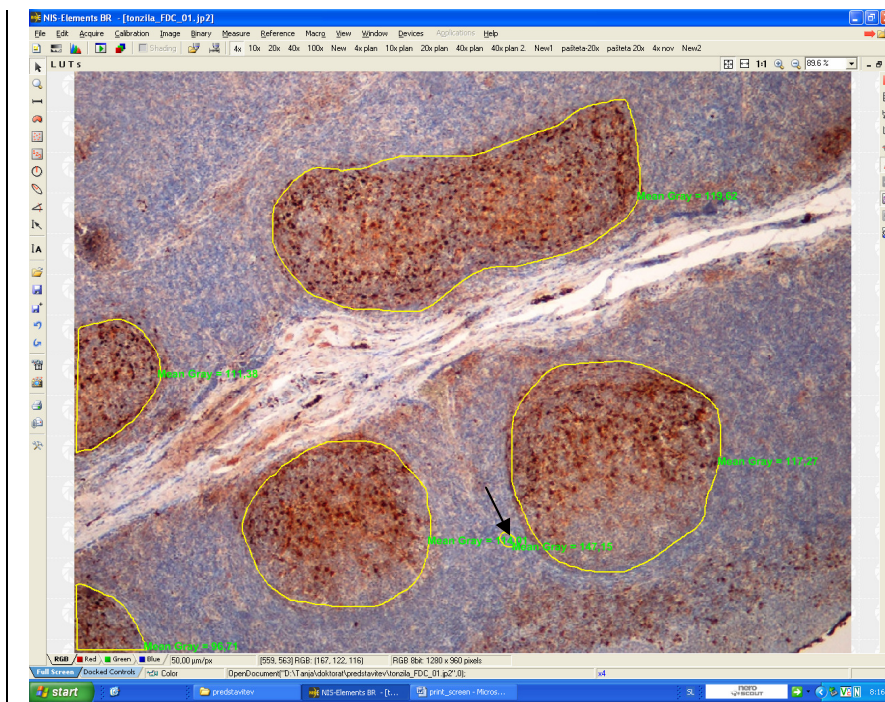
Slika 2

Slika zaslona pri merjenju povprečne sivine imunohistokemične reakcije za limfocite T v tonzili. Občrtana so germinativna središča in manjše področje brez specifične reakcije (puščica).



Slika 3

Slika zaslona pri merjenju povprečne sivine imunohistokemične reakcije za limfocite B v tonzili. Občrtana so germinativna središča in manjše področje brez specifične reakcije (puščica).

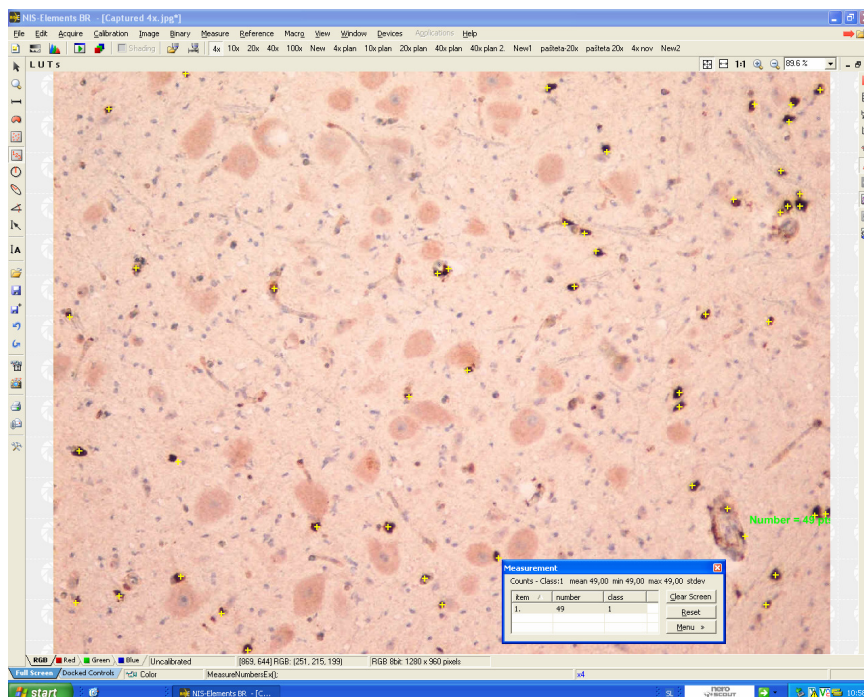


Slika 4

Slika zaslona pri merjenju povprečnih svin imunohistokemične reakcije za FDC v tonzili. Občrtana so germinativna središča in manjše področje brez specifične reakcije (puščica).

4.7.4.4 Štetje limfocitov B in T v področju obeksa

Število limfocitov B in T v obeksu smo določili v tkivnih rezinah, predhodno označenih z imunohistokemično metodo za limfocite B in T. S pomočjo programa NIS Elements (Nikon) smo prešteli limfocite B in T v 20 vidnih poljih, pod 200-kratno povečavo. Limfocite smo prešteli na področju DNVN in olivarnih jeder, ki so predilekcijska mesta za spremembe pri praskavcu. Šteli smo izključno limfocite v parenhimu in ne tistih okrog krvnih žil (Slika 5).



Slika 5

Slika zaslona pri štetju limfocitov T v možganih (področje obeksa). Z rumenimi križci so označeni limfociti T.

4.8 Statistična analiza rezultatov

Pri statistični obdelavi podatkov smo uporabili podatke o genotipu živali, številu in arealni gostoti profilov germinativnih središč v limfatičnih organih, rezultate meritev povprečne sivine imunohistokemične reakcije za limfocite B in T ter FDC v limfatičnih organih, podatke o številu limfocitov B in T v parenhimu obeksa ter o količini PrP^{Sc} v limfatičnih organih in obeksu.

Povezavo med genotipom ovc in sestavo limfatičnih organov smo ugotavljali s primerjavo rezultatov morfometrične preiskave limfatičnih organov in obeksa 3 podskupin zdravih ovc 1. testne skupne.

Vpliv okužbe s praskavcem na morfologijo limfatičnih organov smo ocenjevali s primerjavo rezultatov morfometrične preiskave limfatičnih organov zdravih ovc posameznega genotipa iz 1. testne skupine z rezultati morfometričnih preiskav organov ovc enakega genotipa 2. in 3. testne skupine. Povezavo med genotipom in celično sestavo limfatičnih organov ovc v predklinični in klinični fazi praskavca smo ugotavljali s primerjavo rezultatov med podskupinami 2. in 3. testne skupine.

Povezavo med okužbo s praskavcem in pojavljanjem limfocitov v obeksu smo testirali s primerjavo števila limfocitov B in T v parenhimu obeksa med 1. testno skupino in 2. oziroma 3. testno skupino.

Morebitno odvisnost limfocitne infiltracije obeksa pri praskavcu od genotipa pa smo ugotavljali s primerjavo med podskupinami 2. in 3. testne skupine.

Razlike med skupinama ovc v zgodnji in pozni, klinični, fazi praskavca smo ocenili s primerjavo rezultatov imunohistokemične preiskave na PrP^{Sc}, morfometrične analize limfatičnih organov ter štetja T in B limfocitov v obeksu ovc 2. in 3. testne skupine. Primerjali smo rezultate med enakima genotipoma 2. in 3. testne skupine ter rezultate med podskupinama znotraj 2. in znotraj 3. testne skupine.

Za statistično analizo smo uporabili program SPSS. Kot statistično značilno razliko smo postavili $P \leq 0,05$.

Pri analizi rezultatov morfometričnih preiskav limfatičnih organov (npr. arealna in numerična gostota profilov germinativnih središč, povprečna sivina imunohistokemične reakcije za limfocite T in B ter FDC), kjer so se pojavljale intervalne spremenljivke, smo za primerjavo med skupinami uporabili neparametrični z-test. Za računanje korelacije med intervalnimi spremenljivkami smo uporabili Pearsonov korelacijski koeficient (r).

Pri analizi rezultatov, kjer smo spremembe ocenjevali subjektivno (npr. ocena spongiformnih sprememb v obeksu, ocena imunohistokemične reakcije na PrP^{Sc} v obeksu in limfatičnih organih), kjer so se pojavljale ordinalne spremenljivke, smo za primerjavo med skupinami uporabili neparametrična testa Mann-Whitney in Wilcoxonov test. Za računanje korelacije med rezultati z ordinalnimi spremenljivkami ter med ordinalnimi in intervalnimi spremenljivkami smo uporabili Spearmanov korelacijski koeficient (ρ).

5 REZULTATI

5.1 Rezultati testiranj protiteles in optimizacije postopkov imunohistokemičnih preiskav

5.1.1 Rezultati optimizacije postopka imunohistokemičnega označevanja prionov z mišjim monoklonskim protitelesom 2G11

- Primerjava različno dolgih časov razkrivanja antigena z mikrovalovi v različnih pufrih: po 10 minutnem razkrivanju v citratnem pufru (pH 6,0) smo v bezgavki ugotovili močno specifično imunohistokemično reakcijo. S podaljševanjem časa razkrivanja specifična reakcija ni postala bolj intenzivna. Po 10 minutnem razkrivanju antigena v pufru Target Retrieval Solution, Citrate pH 6 smo ugotovili zmerno močno imunohistokemično reakcijo, po 25-minutnem razkrivanju je bila reakcija nekoliko močnejša – zmerno močna do močna, najmočnejša je bila po 30-minutnem postopku. Po razkrivanju antigena v pufru EDTA (pH 8,0) smo ugotovili zmerno močno imunohistokemično reakcijo.
- Primerjava rezultatov 10-minutnega razkrivanja antigena z mikrovalovi v citratnem pufru (pH 6,0) in 20-minutnega razkrivanja v enakem pufru v avtoklavu: po razkrivanju v avtoklavu smo ugotovili močnejšo reakcijo kot po demaskiranju z mikrovalovi.

Najbolj optimalne rezultate smo dobili po 20-minutnem razkrivanju antigena v citratnem pufru (pH 6,0), v avtoklavu.

5.1.2 Rezultati testiranja protiteles za imunohistokemično označevanje limfatičnih celic

5.1.2.1 Rezultati testiranja protitelesa, ki označuje limfocite T

- Primerjava različno dolgih časov razkrivanja antigena z mikrovalovi v različnih pufrih: po 10-minutnem, 20-minutnem, 25-minutnem in 30-minutnem postopku v citratnem pufru (pH 6,0) in Target Retrieval Solution, Citrate pH 6 smo v tkivnih rezinah določili približno enako močno specifično reakcijo. Po enakem postopku testiranja smo v tkivu, ki je bilo pred vklopom v parafin 1 uro inkubirano v 96 % mravljični kislini, ugotovili rahlo šibkejšo reakcijo (zmerno močno do močno) v primerjavi s tkivom, ki ni bilo obdelano z mravljično kislino.
- Primerjava različnih koncentracij primarnega protitelesa: različne koncentracije poliklonskega protitelesa proti CD3 smo testirali po 10 minutnem razkrivanju antigena v citratnem pufru (pH 6,0). Po inkubaciji protiteles v koncentracijah 12, 6 in 4 µg/ml smo v tkivnih rezinah, ki niso bile obdelane z mravljično kislino, ugotovili močno specifično reakcijo, v tkivu, ki je bilo prej inkubirano v mravljični kislini, pa je bila reakcija zmerno močna. Pri koncentracijah primarnega protitelesa, ki so bile višje od 4 µg/ml, je bila imunohistokemična reakcija postopoma vse šibkejša.
- Primerjava učinkovitosti razkrivanja antigena v mikrovalovni pečici in avtoklavu: po razkrivanju antigena v avtoklavu je bila imunohistokemična reakcija močnejša kot po 10 minutnem razkrivanju antigena v mikrovalovni pečici.

Najbolj optimalne rezultate smo dobili po:

- 20-minutnem razkrivanju antigena v citratnem pufru pH 6,0 v avtoklavu in
- po enourni inkubaciji v raztopini primarnega protitelesa v koncentraciji 0,6 mg/ml (razredčitev 1: 150, koncentracija 4 µg/ml).

5.1.2.2 Rezultati testiranja protitelesa, ki označuje limfocite B

- Primerjava različno dolgih časov razkrivanja antigena z mikrovalovi v različnih pufrih: najmočnejšo imunohistokemično reakcijo smo ugotovili po 10-minutnem razkrivanju tkivnih rezin v citratnem pufru (pH 6,0). Po 10-minutnem razkrivanju antigena v Target Retrieval Solution, Citrate pH 6, je bila imunohistokemična reakcija šibka do zmerno močna in tudi podaljšan čas demaskiranja ni pripomogel k boljšemu rezultatu. Pri testiranju tkiva, ki je bilo pred vklopom v parafin obdelano z mravljično kislino, smo določili nekoliko šibkejšo reakcijo, ki je bila ponovno najmočnejša po 10-minutnem demaskiranju v citratnem pufru (pH 6,0), reakcija po različno dolgih demaskiranjih v Target Retrieval Solution, Citrate pH 6 pa je bila šibka.
- Primerjava različnih koncentracij primarnega protitelesa: po inkubaciji primarnega protitelesa v koncentraciji 10 mg/l smo dobili specifično reakcijo v tkivnih rezinah, pri vseh nižjih koncentracijah primarnega protitelesa je bila imunohistokemična reakcija zelo šibko pozitivna/negativna.
- Primerjava učinkovitosti razkrivanja antigena v mikrovalovni pečici in avtoklavu: po razkrivanju antigena v avtoklavu je bila imunohistokemična reakcija močnejša kot po 10-minutnem razkrivanju antigena v mikrovalovni pečici.

Najbolj optimalne rezultate s protitelesom proti limfocitom B smo dobili:

- z 20 minut trajajočim razkrivanjem antigena v citratnem pufru s pH 6,0, v avtoklavu, in
- inkubaciji v raztopini primarnega protitelesa v koncentraciji 250 µg/ml (razredčitev 1:25, koncentracija 10 µg/ml), čez noč pri temperaturi + 4° C.

5.1.2.3 Rezultati testiranja protiteles, ki označujejo folikularne dendritične celice

- Testiranje monoklonskega protitelesa proti človeškim FDC, klon CNA.42: v tkivnih rezinah smo našli difuzno zmerno močno do močno nespecifično reakcijo.

- Testiranje poliklonskega protitelesa proti govejemu S-100: pri primerjavi različnih koncentracij primarnega protitelesa smo pri koncentraciji 2,9 µg/ml ugotovili močno specifično reakcijo z najmanj nespecifične reakcije. Pri nižjih koncentracijah protitelesa je bila imunohistokemična reakcija šibkejša, pri višjih koncentracijah je bila intenzivnejša nespecifična reakcija.

Najbolj optimalne rezultate s protitelesom proti S-100 smo dobili po 20 minutnem razkrivanju antigena v citratnem pufru pH 6,0 v avtoklavu in po inkubaciji na sobni temperaturi v raztopini primarnega protitelesa koncentracije 2,3 mg/ml (razredčitev 1: 800, koncentracija 2,9 µg/ml).

5.1.2.4 Rezultati testiranja protiteles, ki označujejo makrofage

- Testiranje poliklonskega protitelesa proti človeškemu lizocimu: po različno dolgih razkrivanjih antigena z mikrovalovi smo ugotovili močno difuzno nespecifično reakcijo.
- Testiranje monoklonskega protitelesa proti človeškemu CD14: v tkivnih rezinah nismo ugotovili specifične imunohistokemične reakcije.
- Testiranje monoklonskega protitelesa proti človeškemu mieloidno histiocitnemu antigenu (angl. Myeloid/Histiocyte Antigen): v tkivnih rezinah nismo ugotovili specifične imunohistokemične reakcije.
- Testiranje poliklonskega protitelesa proti človeškemu alfa 1-tripsinu: po različno dolgih demaskiranjih antigena z mikrovalovi smo ugotovili difuzno močno nespecifično reakcijo.
- Testiranje monoklonskega protitelesa proti človeškemu CD68: v tkivnih rezinah nismo ugotovili specifične imunohistokemične reakcije.

Na osnovi opravljenih testiranj protiteles, ki označujejo makrofage smo ugotovili, da nobeno od njih ni uporabno za imunohistokemično označevanje makrofagov v tkivih ovc, ki so bila fiksirana v formalinu in zalita v parafin.

5.2 Rezultati kontrol pri imunohistokemičnem označevanju prionov in limfatičnih celic

V vseh tkivnih rezinah pozitivnih kontrol smo za posamezne antigene ugotovili specifično reakcijo.

V negativnih kontrolah nismo ugotovili specifične ali nespecifične imunohistokemične reakcije. Imunohistokemična reakcija v seriji tkivnih rezin, namenjenih za kontrolo ponovljivosti, je bila med rezinami podobna tako po jakosti pozitivne reakcije kot tudi po njeni lokaciji.

5.3 Rezultati preliminarних meritev za določitev velikosti vzorcev za morfometrične analize

5.3.1 Rezultati preliminarних meritev za določitev velikosti vzorca za meritve imunohistokemične reakcije na prione v limfatičnih organih

S preliminarnimi meritvami za določitev velikosti vzorca smo izračunali zelo veliko število vidnih polj, na katerih bi morali izvesti meritve povprečne sivine imunohistokemične reakcije na prione. Na osnovi teh rezultatov smo se odločili, da bomo imunohistokemično reakcijo na prione v limfatičnih organih ocenili semikvantitativno.

Rezultati preliminarних meritev za določitev velikosti vzorca za merjenje povprečne sivine imunohistokemične reakcije na prione so zbrani v tabeli 3.

Tabela 3

Rezultati preliminarних meritev za določitev velikosti vzorca za ocenjevanje povprečne sivine imunohistokemične reakcije na prione v limfatičnih organih. Legenda: AVG – povprečna sivina, STD – standardna deviacija, SE – standardna napaka, RSE – relativna standardna napaka.

statistični parameter	germinativna središča tonzile	interfolikularna področja tonzile	germinativna središča vranice	rdeča pulpa vranice	germinativna središča mez. bezgavke	interfolikularna področja mez. bezgavke	germinativna središča Peyerjevih plošč ileuma
AVG	28,42	-1,68	26,12	0,21	8,71	4,54	12,93
STD	11,83	15,92	17,10	13,49	11,68	10,85	9,81
SE	5,28	7,11	7,63	6,02	5,21	4,84	4,38
RSE	0,19	-4,23	0,29	28,19	0,60	1,07	0,34
izračunana velikost vzorca	69	35982	171	1595002	720	2288	230

5.3.2 Rezultati preliminarних meritev za določitev velikosti vzorca za meritve arealne gostote profilov germinativnih središč

Rezultati preliminarних meritev za določitev velikosti vzorca za meritve arealne gostote germinativnih središč so navedeni v tabeli 4.

Na osnovi preliminarних rezultatov smo se odločili, da bomo meritve na organih testnih živali opravili na 20 vidnih poljih vsakega limfatičnega organa in za statistično obdelavo podatkov uporabili neparametrične teste (Gundersen in Osterby, 1981).

Tabela 4

Rezultati meritev za določitev velikosti vzorca za meritve arealne gostote profilov germinativnih središč limfatičnih organov. Legenda: AVG – povprečna arealna gostota profilov germinativnih središč, STD – standardna deviacija, SE – standardna napaka, RSE – relativna standardna napaka.

statistični parameter	germinativna središča tonzile	germinativna središča vranice	germinativna središča mez. bezgavke	germinativna središča Peyerjevih plošč ileuma
AVG	0,30	0,03	0,16	0,11
STD	0,09	0,01	0,06	0,04
SE	0,04	0,01	0,03	0,02
RSE	0,14	0,16	0,17	0,18
izračunana velikost vzorca	39	52	59	62

5.3.3 Rezultati preliminarnih meritev za določitev velikosti vzorca za meritve povprečnih sivin imunohistokemične reakcije za limfatične celice

Rezultati preliminarnih meritev za določitev velikosti vzorca pri merjenju povprečne sivine imunohistokemične reakcije za limfocite T so v tabeli 5.

Na osnovi preliminarnih meritev smo se odločili, da bomo meritve povprečnih sivin imunohistokemične reakcije za limfocite T in ostale limfatične celice v limfatičnih organih testnih živali opravili zgolj na 20 vidnih poljih, v področju germinativnih središč limfatičnih foliklov ter za statistično obdelavo podatkov uporabili neparametrične teste (Gundersen in Osterby, 1981).

Tabela 5

Rezultati meritev za določitev velikosti vzorca za ocenjevanje povprečne sivine imunohistokemične reakcije za limfocite T v limfatičnih organih. Legenda: AVG – povprečna sivina, STD – standardna deviacija, SE – standardna napaka, RSE – relativna standardna napaka.

statistični parameter	germinativna središča tonzile	germinativna središča vranice	germinativna središča mez. bezgavke	germinativna središča Peyerjevih plošč ileuma
AVG	38,12	76,24	46,80	19,22
STD	14,53	29,06	13,86	13,77
SE	6,50	13,00	6,19	6,15
RSE	0,17	0,17	0,13	0,32
izračunana velikost vzorca	58	58	36	205

5.4 Rezultati meritev za določitev korelacije med specifično vrednostjo povprečne sivine imunohistokemične reakcije in številom celic

S preliminarnimi meritvami na tkivnih rezinah tonzile, imunohistokemično označenih s protitelesi proti limfocitom T, smo izračunali, da obstaja močna pozitivna korelacija med številom profilov limfocitov T v germinativnih središčih in izmerjenimi specifičnimi vrednostmi povprečne sivine. Korelacijski koeficient je znašal 0,97 (Tabela 6). Preliminarnih meritev korelacije za limfocite B in FDC ni bilo mogoče opraviti zaradi zelo velikega števila

limfocitov B, ki so v germinativnih središčih in zaradi oblike FDC, katere je zaradi njihovih številnih med sabo prepletenih tankih citoplazemskih podaljškov, ki se na antigen odzovejo s hiperplazijo, nemogoče natančno prešteti.

Tabela 6

Podatki za izračun korelacije med številom profilov limfocitov T in specifično vrednostjo povprečne sivine. Meritve so bile narejene na 10 vidnih poljih (oznake vzorcev 1 do 10).

polje	število profilov limfocitov T	specifična vrednost povprečne sivine
1	45	13,96
2	48	18,23
3	79	35,62
4	113	50,82
5	54	20,4
6	11	3,06
7	13	4,53
8	69	29,99
9	67	26,82
10	96	30,75

5.5 Rezultati primerjave meritev povprečnih svin imunohistokemične reakcije med vzorci, obdelanimi z mravljično kislino, in vzorci, ki niso bili obdelani z mravljično kislino

Povprečna sivina imunohistokemične reakcije za limfocite T je bila v vzorcih, ki smo jih pred vklopom v parafin inkubirali v mravljični kislini, nižja kot v vzorcih, ki niso bili obdelani. Koeficient za limfocite T je bil 1,216 (Tabela 7).

Tabela 7

Primerjava povprečnih svin imunohistokemične reakcije za limfocite T v vzorcih, obdelanih z mravljično kislino in v vzorcih, ki so bili vklopljeni v parafin brez predobdelave. Meritve so bile narejene na 6 vzorcih (oznake vzorcev 1 do 6).

vzorec	povprečna sivina – vzorec obdelan z mravljično kislino	povprečna sivina – vzorec brez obdelave z mravljično kislino
1	14,04	16,54
2	19,98	20,24
3	18,57	28,49
4	17,14	26,05
5	15,04	15,26
6	18,09	18,54
MEDIANA	17,61	19,39

Povprečna sivina imunohistokemične reakcije za limfocite B je bila v vzorcih, ki jih nismo obdelali z mravljično kislino, precej višja kot v vzorcih, ki so bili obdelani. Izračunan korekcijski koeficient za limfocite B je bil 1,381 (Tabela 8).

Tabela 8

Primerjava povprečnih svin imunohistokemične reakcije za limfocite B v vzorcih obdelanih z mravljično kislino in v vzorcih, ki so bili vklopljeni v parafin brez predobdelave. Meritve so bile narejene na šestih vzorcih (oznake vzorcev 1 do 6).

vzorec	povprečna sivina – vzorec obdelan z mravljično kislino	povprečna sivina – vzorec brez obdelave z mravljično kislino
1	29,22	37,88
2	27,47	37,00
3	31,16	45,40
4	27,82	43,42
5	30,37	40,48
6	35,57	46,70
MEDIANA	29,79	41,95

Povprečna sivina imunohistokemične reakcije za FDC je bila v vzorcih, obdelanih z mravljično kislino, blago višja kot v vzorcih, ki niso bili obdelani. Izračunan koeficient za FDC je bil 0,960 (Tabela 9).

Tabela 9

Primerjava povprečnih svin imunohistokemične reakcije za FDC v vzorcih obdelanih z mravljično kislino in v vzorcih, ki so bili vklopljeni v parafin brez predobdelave. Meritve so bile narejene na šestih vzorcih (oznake vzorcev 1 do 6).

vzorec	povprečna sivina – vzorec obdelan z mravljično kislino	povprečna sivina – vzorec brez obdelave z mravljično kislino
1	18,41	17,47
2	14,96	13,46
3	18,75	18,99
4	25,46	23,18
5	16,07	14,91
6	18,74	19,88
MEDIANA	18,58	18,23

5.6 Rezultati preliminarne imunohistokemične preiskave limfatičnih organov in obeksov ovc, negativnih v hitrem testu na TSE

V preliminarni imunohistokemični preiskavi smo testirali limfatične organe in obeks ovc genotipa VRQ/VRQ, ARQ/ARQ in ARR/ARQ, pri katerih so bili rezultati hitrega testa na TSE negativni.

Pri genotipu VRQ/VRQ smo prione ugotovili pri 12 od 18 pregledanih ovc (66,67 %). Najpogosteje smo pozitivno imunohistokemično reakcijo ugotovili v mezenterialnih bezgavkah, pri 11 ovcah (91,67 % od vseh pozitivnih ovc), in ileumu ter reterofaringealnih bezgavkah, pri 7 ovcah (58,34 %), najredkeje, samo pri 5 ovcah, pa smo jo našli v vranici in tonzilah (41,67 % od vseh pozitivnih ovc). Pri 3 ovcah tega genotipa smo v tudi v obeksu, v področju DNVN, ugotovili blago pozitivno reakcijo (Tabela 10).

Pri genotipu ARQ/ARQ je bila prevalenca pozitivne imunohistokemične reakcije na prione nižja kot pri genotipu VRQ/VRQ. Prione smo ugotovili pri 6 od 14 pregledanih ovc (42,86 % od vseh pregledanih ovc). Pri vseh 6 ovcah smo prione ugotovili v mezenterialnih bezgavkah, pri 4 v ileumu (66,67 % vseh pozitivnih ovc), najredkeje, zgolj pri 1 ovci, pa v tonzilah in vranici (16,67 % od vseh pozitivnih ovc). Obeksi vseh ovc genotipa ARQ/ARQ so bili negativni na prione (Tabela 11).

V limfatičnih organih ovc, ki so bile genotipa ARR/ARQ, nismo ugotovili značilne imunohistokemične reakcije na prione.

Skupno smo v preliminarni preiskavi imunohistokemično s protitelesom proti prionom označili limfatične organe in možgane 38 ovc. Pozitivno imunohistokemično reakcijo na prione smo ugotovili pri 18 ovcah. Stopnja prevalence predkliničnega praskavca je bila 47,37 %.

Tabela 10

Rezultati preliminarne imunohistokemične preiskave limfatičnih organov in možganov na prione pri ovcah genotipa VRQ/VRQ. Jakost imunohistokemične reakcije na prione je ocenjena s stopnjami: 0 – negativno, 1 – šibka pozitivna reakcija, 2 – zmerno močna pozitivna reakcija, 3 – močna pozitivna reakcija. Legenda: zaporedna številka – od 1 do 18, HP – številka histološkega protokola, PP – številka patološkega protokola.

zaporedna številka	HP	PP	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica	obeks
1	HP-737-05	PP-1000-05	1	0	1	1	0	0
2	HP-729-05	PP-992-05	2	2	3	3	3	0
3	HP-833-05	PP-1100-05	0	0	0	0	0	0
4	HP-808-05	PP-1075-05	1	1	1	1	2	0
5	HP-776-05	PP-1039-05	2	1	1	2	2	1
6	HP-815-05	PP-1082-05	2	2	1	3	3	1
7	HP-834-05	PP-1101-05	2	3	2	2	3	1
8	HP-760-05	PP-1023-05	1	0	1	0	0	0
9	HP-768-05	PP-1031-05	0	0	0	1	0	0
10	HP-739-05	PP-1002-05	0	0	0	1	0	0
11	HP-806-05	PP-1073-05	0	0	0	1	0	0
12	HP-824-05	PP-1091-05	0	0	0	1	0	0
13	HP-841-05	PP-1108-05	0	0	0	1	0	0
14	HP-735-05	PP-998-05	0	0	0	0	0	0
15	HP-764-05	PP-1027-05	0	0	0	0	0	0
16	HP-762-05	PP-1025-05	0	0	0	0	0	0
17	HP-731-05	PP-994-05	0	0	0	0	0	0
18	HP-773-05	PP-1036-05	0	0	0	0	0	0

Tabela 11

Rezultati preliminarne imunohistokemične preiskave na prione limfatičnih organov in možganov pri ovcah genotipa ARQ/ARQ. Jakost imunohistokemične reakcije na prione je ocenjena s stopnjami: 0 – negativno, 1 – šibka pozitivna reakcija, 2 – zmerno močna pozitivna reakcija, 3 – močna pozitivna reakcija. Legenda: zaporedna številka – od 1 do 14, HP – številka histološkega protokola, PP – številka patološkega protokola.

zaporedna številka	HP	PP	retrof. bezgavka	tonzila	ileum	mez. bezgavke	vranica	obeks
1	HP-580-06	PP-822-06	0	0	3	2	0	0
2	HP-576-06	PP-818-06	0	0	0	1	0	0
3	HP-618-06	PP-860-06	1	0	3	1	0	0
4	HP-586-06	PP-828-06	1	0	1	2	0	0
5	HP-587-06	PP-829-06	0	0	0	1	0	0
6	HP-581-06	PP-823-06	1	1	1	1	2	0
7	HP-572-06	PP-814-06	0	0	0	0	0	0
8	HP-578-06	PP-820-06	0	0	0	0	0	0
9	HP-610-06	PP-852-06	0	0	0	0	0	0
10	HP-613-06	PP-855-06	0	0	0	0	0	0
11	HP-575-06	PP-817-06	0	0	0	0	0	0
12	HP-600-06	PP-842-06	0	0	0	0	0	0
13	HP-624-06	PP-866-06	0	0	0	0	0	0
14	HP-591-06	PP-833-06	0	0	0	0	0	0

5.7 Rezultati patohistološke preiskave obeksa testnih skupin

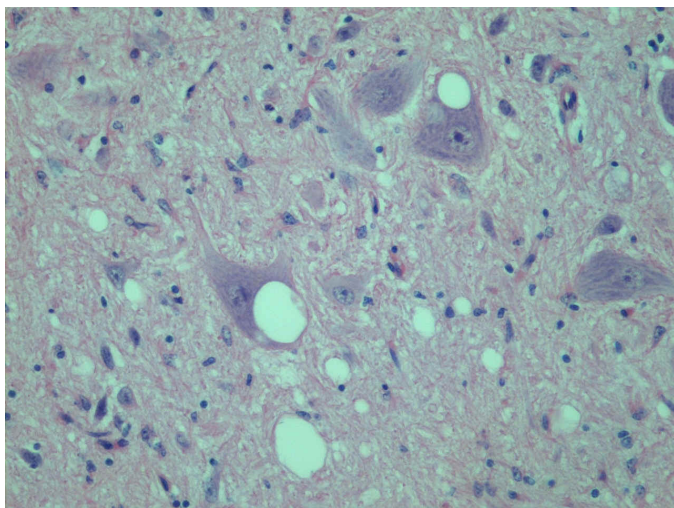
Pri patohistološki preiskavi obeksov zdravih ovc brez praskavca in ovc v predklinični fazi praskavca nismo ugotovili sprememb, značilnih za praskavec. Pri 1 zdravi ovci (oznaka ovce ARQ/ARQ Z5) in 1 ovci v predklinični fazi bolezni (oznaka ovce ARQ/ARQ PK2) smo našli 1 oziroma 2 vakuoli v telesih nevronov enega DNVN in jih ocenili kot slučajno najdbo. Rezultata hitrega testa in imunohistokemične preiskave na prione sta bila pri teh dveh ovcah negativna.

S patohistološko preiskavo obeksov ovc v klinični fazi bolezni smo pri vseh našli značilne spongiformne spremembe. Izraženost sprememb je močno varirala, od sprememb, ki smo jih ocenili kot blage, saj smo opazili le majhno število vakuol v nevropilu in telesih nevronov DNVN, do močnih sprememb, pri katerih smo ugotovili vakuolizacijo sivine celega obeksa. Pri vseh ovcah te testne skupine smo vedno ugotovili spongiformne spremembe v DNVN,

kjer so bile tudi najmočnejše izražene (Slika 6). Nekoliko blažje, vendar vedno izražene, so bile spongiformne spremembe v olivarnih jedrih. Spremembe v področju hipoglosnega jedra, spinalnega trakta in jedra trigeminalnega živca ter retikularne formacije so bile redkejše in blažje stopnje. Najredkeje smo značilne spremembe našli v področju šiva, ki združuje lateralni polovici podaljšane hrbtenjače (Tabela 12).

Srednja vrednost spongiformnih sprememb v področju obeksa pri podskupini z genotipom ARQ/ARQ (1,56) je bila nekoliko višja kot pri genotipu VRQ/VRQ (1,14). Statistična primerjava ni pokazala statistično značilne razlike v izraženosti spongiformnih sprememb med obema genotipoma ($P > 0,05$).

Rezultati hitrega testa in imunohistokemične preiskave na prione so pri vseh ovcah v klinični fazi bolezni potrdili patohistološko diagnozo praskavca.



Slika 6

Obeks ovce, z oznako ARQ/ARQ K1. Značilne spongiformne spremembe v nevronih in nevropilu DNVN. HE, x 200

Tabela 12

Jakost spongiformnih sprememb v različnih področjih obeksa pri ovcah 2. testne skupine. Jakost spongiformnih sprememb v posameznem nevronatomskem področju je semikvantitativno ocenjena s stopnjami: 0 – ni vakuolizacije, 1 – posamezne vakuole, 2 – srednje število vakuol, 3 – močna vakuolizacija. Iz ocen jakosti spongiformnih sprememb za posamezna nevranatomska področja je izračunana skupna (povprečna) ocena spongiformnih sprememb v obeksu. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ, ARQ/ARQ, ARR/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke .

zap. št.	oznaka ovce	nevroanatomsko področje							skupna ocena spong. sprememb v obeksu
		DNVN	spinalni trakt in jedro trigeminalnega živca	hipoglosno jedro	retikularna formacija	mediani šiv	akcesorno kuneatno jedro	olivarna jedra	
1	VRQ/VRQ K1	3	3	3	2	1	3	3	2,71
2	VRQ/VRQ K2	2	1	0	1	0	0	1	0,71
3	VRQ/VRQ K3	3	2	2	2	1	3	2	2,71
4	VRQ/VRQ K4	1	1	1	1	1	1	1	0,14
5	VRQ/VRQ K5	2	1	0	1	1	1	2	0,57
6	VRQ/VRQ K6	3	1	0	1	0	0	3	2,71
19	ARQ/ARQ K1	3	3	3	3	1	3	3	2,71
20	ARQ/ARQ K2	2	1	1	1	1	1	1	0,71
21	ARQ/ARQ K3	3	3	3	3	1	3	3	2,71
22	ARQ/ARQ K4	1	0	0	0	0	0	1	0,14
23	ARQ/ARQ K5	2	1	1	0	0	1	2	0,57
24	ARQ/ARQ K6	3	3	3	3	1	3	3	2,71

5.8 Rezultati imunohistokemične preiskave obeksa testnih skupin na prione

Imunohistokemična preiskava obeksov zdravih ovc brez praskavca, vseh ovc genotipa ARQ/ARQ in treh ovc genotipa VRQ/VRQ v predklinični fazi praskavca je bila negativna na prione.

Pri treh ovcah genotipa VRQ/VRQ v predklinični fazi praskavca (oznake VRQ/VRQ PK3, VRQ/VRQ PK5 in VRQ/VRQ PK6) smo v obeksu ugotovili šibko pozitivno reakcijo na prione. Imunohistokemično reakcijo v obliki drobnih zrn (angl. fine punctate) v nevropilu ventralnega dela DNVN smo našli pri ovcah z oznakama VRQ/VRQ PK3 in VRQ/VRQ PK5. Pri ovci z oznako VRQ/VRQ PK5 smo ugotovili blago pozitivno bilateralno reakcijo v področju aree postreme, reakcija v tem področju je bila celo močnejša od reakcije v DNVN. Pri ovci z oznako VRQ/VRQ PK6 smo drobna pozitivna zrnca našli difuzno v nevropilu DNVN in fokalno v področju retikularne formacije ter šiva podaljšane hrbtenjače. Rezultat hitrega testa in patohistološke preiskave obeksa je bil tako pri teh treh ovcah kot pri vseh ostalih ovcah brez praskavca in ovcah v predklinični fazi bolezni negativen na prione.

Pri vseh ovcah v klinični fazi praskavca smo v obeksu ugotovili pozitivno imunohistokemično reakcijo na prione. Pri ovcah genotipa VRQ/VRQ smo pozitivno reakcijo našli v vseh pregledanih nevroanatomskih področjih. Reakcija je bila pri tem genotipu najmočnejša v področju DNVN, najšibkejša pa v področju akcesornega kuneatnega jedra. Pri ovcah z genotipom ARQ/ARQ smo pozitivno reakcijo na prione vedno ugotovili v DNVN in v področju medianega šiva, pri treh ovcah pa v nekaterih od jeder nismo ugotovili značilnega reakcijskega produkta. Tudi v tej podskupini je bila reakcija najmočnejša v področju DNVN. Srednja vrednost jakosti imunohistokemične reakcije na prione je bila pri genotipu VRQ/VRQ (1,86) višja kot pri genotipu ARQ/ARQ (1,43) (Tabele 13 do 15). Statistična analiza ni pokazala statistično značilne razlike v jakosti imunohistokemične reakcije v obeksu med ovcami obeh genotipov v klinični fazi bolezni ($P > 0,05$), primerjava jakosti reakcije po nevroanatomskih področjih je pokazala, da je bila ta reakcija statistično značilno močnejša le v področju medianega šiva pri genotipu VRQ/VRQ ($P < 0,05$).

V področju obeksa smo ugotovili različne oblike odlaganj prionov: intranevronske, intraastrocitne, intramikroglijske, drobno točkaste, grobo zrnate, zlivajočo, perinevronske, linearno, zvezdasto, subependimsko, perivaskularno, perivakuolarno in ependimsko. Znotraj posameznega nevroanatomskega področja smo vedno ugotovili dve ali več različnih oblik odlaganj. Pri nobeni od ovc nismo našli žilnih in lažnih leh ter subpialnih odlaganj prionov. Zaradi lažjega prikaza smo oblike odlaganj združili v štiri vzorce. Pri ovcah obeh genotipov je prevladoval intracelularni vzorec, sledila sta nevropilni in astrocitni vzorec. Žilnega vzorca odlaganja prionov nismo ugotovili (Grafa 1 in 2. Slika 7).

Jakost imunohistokemične reakcije na prione je bila v pozitivni korelaciji z izraženostjo spongiformnih sprememb v obeksu (ρ 0,9204, $P < 0,001$) (Tabeli 14 in 15). Najvišjo korelacijo med jakostjo imunohistokemične reakcije in spongiformnimi spremembami smo potrdili v področju DNVN (ρ 0,9117, $P < 0,001$), najnižjo pa v medianem šivu (ρ 0,7358, $P < 0,001$).

Tabela 13

Ocena imunohistokemične reakcije na prione v različnih nevroanatomskih področjih obeksa ovc testnih skupin, pri katerih smo ugotovili pozitivno reakcijo na prione. Pozitivna imunohistokemične reakcije na prione je semikvantitativno ocenjena s stopnjami: 1 – šibka pozitivna reakcija, 2 – zmerno močna pozitivna reakcija, 3 – močna pozitivna reakcija. Iz ocen jakosti imunohistokemične reakcije za posamezna nevronatomska področja je izračunana skupna (povprečna) ocena imunohistokemične reakcije v obeksu. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce, sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ, ARQ/ARQ, ARR/ARQ) in faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava), skupna ocena ICH reakcije – skupna ocena imunohistokemične reakcije na prione v obeksu.

zap. št.	oznaka ovce	nevroanatomsko področje							skupna ocena ICH reakcije v obeksu
		DNVN	spinalni trakt in jedro trigeminalnega živca	hipoglosno jedro	retikularna formacija	mediani šiv	akcesorno kuneatno jedro	olivarna jedra	
1	VRQ/VRQ K1	3	3	3	3	3	3	3	3,00
2	VRQ/VRQ K2	3	1	1	1	2	1	1	1,43
3	VRQ/VRQ K3	3	3	3	3	3	3	3	3,00
4	VRQ/VRQ K4	2	0	1	1	1	1	1	1,00
5	VRQ/VRQ K5	2	1	1	2	2	1	1	1,43
6	VRQ/VRQ K6	2	2	3	3	2	1	2	2,29
9	VRQ/VRQ PK3	1	0	0	0	0	0	0	0,14
11	VRQ/VRQ PK5	1	0	0	0	0	0	0	0,14
12	VRQ/VRQ PK6	1	0	0	1	1	0	0	0,43
19	ARQ/ARQ K1	3	2	1	1	1	1	2	1,57
20	ARQ/ARQ K2	3	1	0	2	1	2	0	1,29
21	ARQ/ARQ K3	3	3	2	2	1	3	2	2,29
22	ARQ/ARQ K4	2	2	0	1	1	0	0	0,86
23	ARQ/ARQ K5	1	1	0	1	1	0	0	0,57
24	ARQ/ARQ K6	3	3	2	3	2	2	2	2,43

Tabela 14

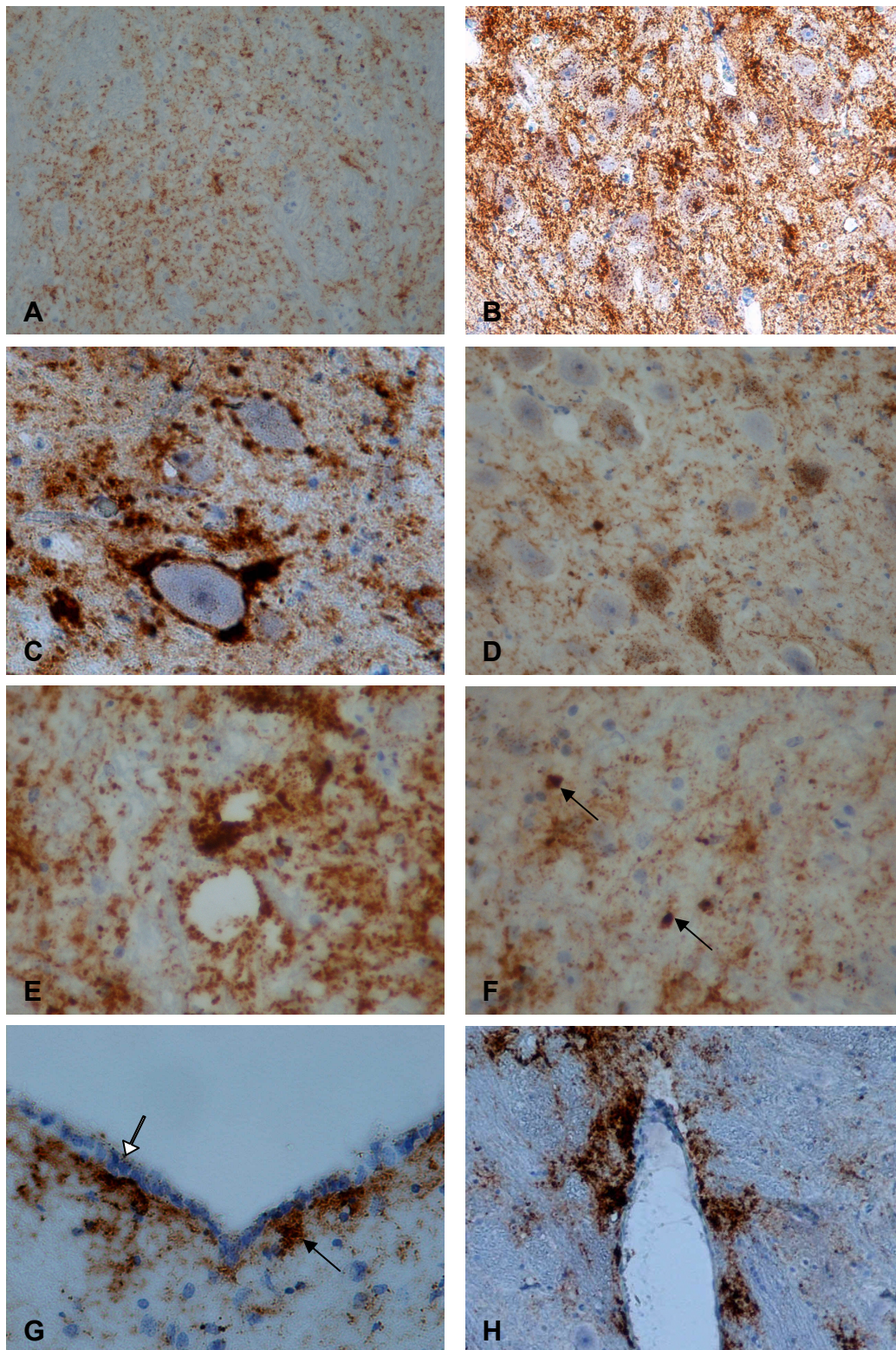
Primerjava rezultatov patohistološke in imunohistokemične preiskave na prione, opravljene na obeksih ovc genotipa VRQ/VRQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ, ARQ/ARQ, ARR/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6), skupna ocena ICH reakcije v obeksu – skupna ocena imunohistokemične reakcije na prione v obeksu.

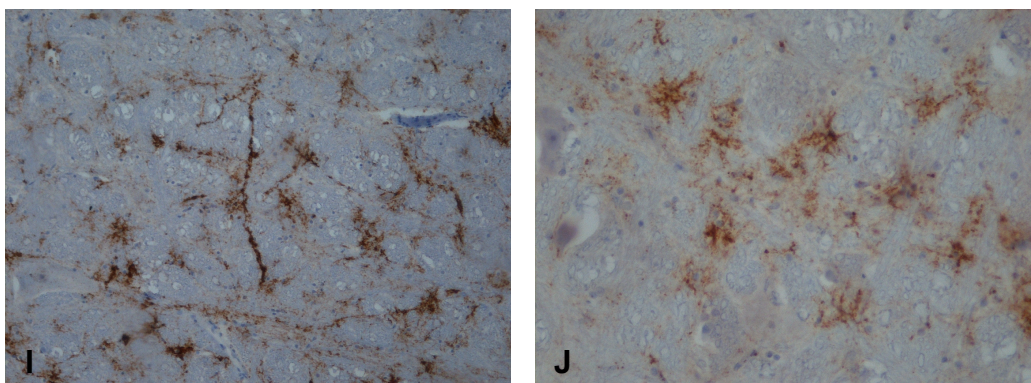
zap. št.	oznaka ovce	skupna ocena spong. sprememb v obeksu	skupna ocena ICH reakcije v obeksu
1	VRQ/VRQ K1	2,50	3,00
2	VRQ/VRQ K2	0,67	1,50
3	VRQ/VRQ K3	2,17	3,00
4	VRQ/VRQ K4	1,00	1,17
5	VRQ/VRQ K5	1,17	1,50
6	VRQ/VRQ K6	1,17	2,17
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ K		1,17	1,84
7	VRQ/VRQ PK1	0,00	0,00
8	VRQ/VRQ PK2	0,00	0,00
9	VRQ/VRQ PK3	0,00	0,17
10	VRQ/VRQ PK4	0,00	0,00
11	VRQ/VRQ PK5	0,00	0,17
12	VRQ/VRQ PK6	0,00	0,50
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ PK		0,00	0,14
13	VRQ/VRQ Z1	0,00	0,00
14	VRQ/VRQ Z2	0,00	0,00
15	VRQ/VRQ Z3	0,00	0,00
16	VRQ/VRQ Z4	0,00	0,00
17	VRQ/VRQ Z5	0,00	0,00
18	VRQ/VRQ Z6	0,00	0,00
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ Z		0,00	0,00

Tabela 15

Primerjava rezultatov patohistološke in imunohistokemične preiskave na prione, opravljene na obeksih ovc genotipa ARQ/ARQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce - oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ, ARQ/ARQ, ARR/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6), skupna ocena ICH reakcije v obeksu – skupna ocena imunohistokemične reakcije na prione v obeksu.

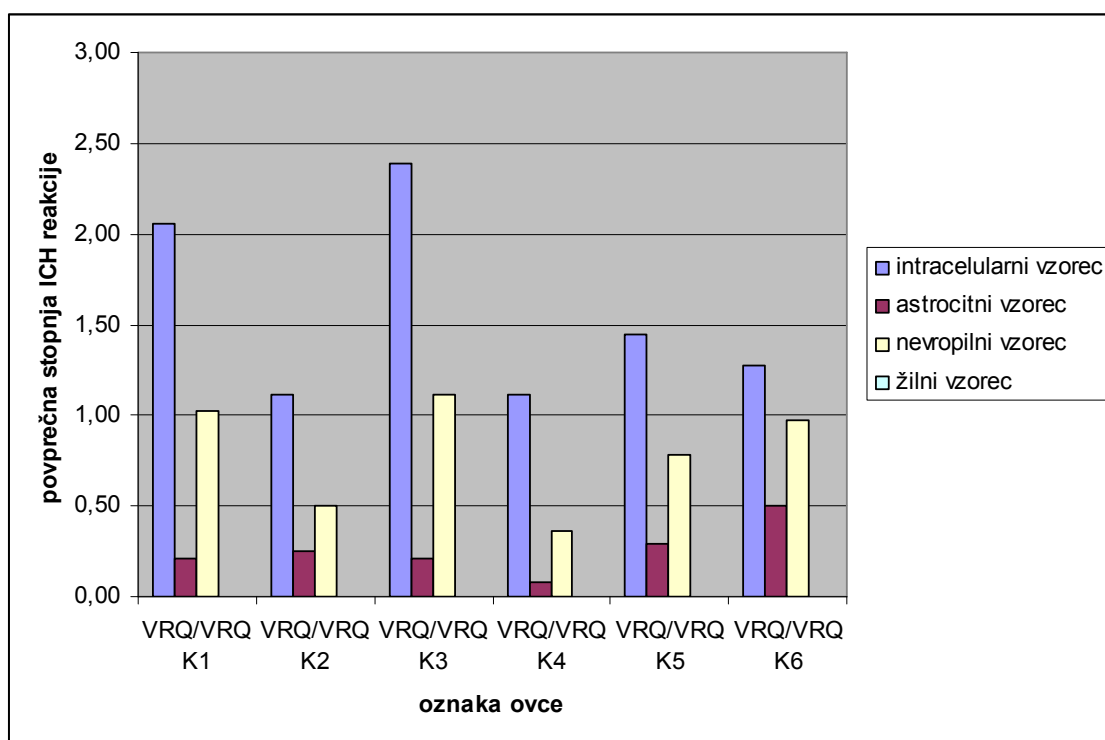
zap. št.	oznaka ovce	skupna ocena spong. sprememb v obeksu	skupna ocena ICH reakcije v obeksu
19	ARQ/ARQ K1	2,67	1,50
20	ARQ/ARQ K2	0,67	1,33
21	ARQ/ARQ K3	2,67	2,17
22	ARQ/ARQ K4	0,17	0,67
23	ARQ/ARQ K5	0,50	0,50
24	ARQ/ARQ K6	2,67	2,33
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ K		1,67	1,42
25	ARQ/ARQ PK1	0,00	0,00
26	ARQ/ARQ PK2	0,00	0,00
27	ARQ/ARQ PK3	0,00	0,00
28	ARQ/ARQ PK4	0,00	0,00
29	ARQ/ARQ PK5	0,00	0,00
30	ARQ/ARQ PK6	0,00	0,00
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ PK		0,00	0,00
31	ARQ/ARQ Z1	0,00	0,00
32	ARQ/ARQ Z2	0,00	0,00
33	ARQ/ARQ Z3	0,00	0,00
34	ARQ/ARQ Z4	0,00	0,00
35	ARQ/ARQ Z5	0,00	0,00
36	ARQ/ARQ Z6	0,00	0,00
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ Z		0,00	0,00





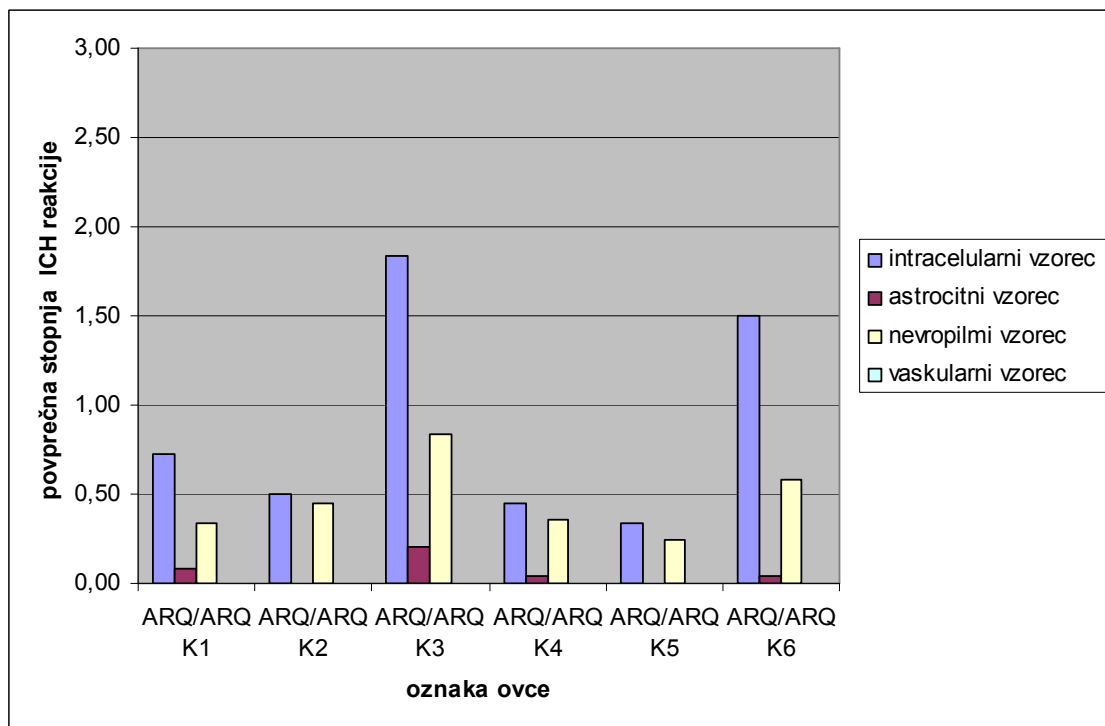
Slika 7

Obeksi, ovc. Različne oblike odlaganj prionov v obeksu. A: Drobnno točkasto odlaganje v nevropilu, x 40. B: Grobo zrnato odlaganje v nevropilu DNVN, x 40. C: Perinevronska odlaganje v DNVN, x 400. D: Intranevronska odlaganje v DNVN, x 200. E: Perivakuolarno odlaganje okrog dveh vakuol v nevropilu DNVN, x 400. F: Intramikroglijsko odlaganje v nevropilu DNVN (puščica), x 400. G: Subependimsko (puščica s črno konico) in ependimsko odlaganje (puščica z belo konico), x 100. H: Perivaskularno odlaganje, x 100. I: Linearno odlaganje, x 100. J: Zvezdasta odlaganja v retikularni formaciji, x 100. Imunohistokemično barvanje z monoklonskim protitelesom proti ovčjemu prionskemu proteinu, 2G11 (Institut Pourquier), kontrastirano s hematoksilinom.



Graf 1

Vzorci odlaganja prionov v obeksu ovc z genotipom VRQ/VRQ. Legenda: oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ), faze bolezni (K – klinična faza) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).



Graf 2

Vzorci odlaganja prionov v obeksu ovc z genotipom ARQ/ARQ. Legenda: oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARQ/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

5.9 Rezultati imunohistokemične preiskave limfatičnih organov ovc testnih skupin na prione

Pri imunohistokemični preiskavi limfatičnih organov ovc v predklinični in klinični fazi praskavca smo ugotovili značilno pozitivno reakcijo, ki je bila v limfatičnih organih locirana predvsem v germinativnih središčih limfatičnih foliklov. Reakcijski produkt smo ugotovili v obliki večjih zrn v citoplazmi celic, ki so bile po morfologiji podobne makrofagom in v obliki retikularne reakcije, ki ustreza reakciji na površini FDC (Slika 8). V organih, kjer je bila imunohistokemična reakcija šibka, smo jo ugotovili skoraj izključno v citoplazmi makrofagov, medtem, ko smo v primerih močne pozitivne reakcije našli močno izraženi obe obliki reakcijskega produkta.

V tonzilah in bezgavkah smo posamezne pozitivne celice našli še v interfolikularnih področjih, v bezgavkah tudi v subkapsularnem sinusu, v tonzilah pa tudi v področju pod epitelom in med celicami epitela kript. V vranici smo pogosto drobna zrnca reakcijskega

produkta našli v celicah marginalne cone limfatičnih foliklov in v celicah rdeče pulpe. Morfologija teh pozitivnih celic je ustrezala morfologiji makrofagov. V ileumu smo drobna zrnca reakcijskega produkta pogosto ugotovili v citoplazmi ganglijskih in satelitskih celic mienteričnega in submukoznega pleteža, predvsem tistih v bližini limfatičnih foliklov, v katerih je bila tudi pozitivna reakcija (Slika 9). Posamezne pozitivne celice smo ugotovili tudi v področju kupolasto izbočenega področja nad Peyerjevimi ploščami s pozitivno imunohistokemično reakcijo.

Pri ovcah genotipa VRQ/VRQ v klinični fazi bolezni smo reakcijski produkt našli v vseh organih, z izjemo ileuma ovce z oznako VRQ/VRQ K5, kjer v vzorcu ni bilo Peyerjevih plošč. Pri ovcah genotipa ARQ/ARQ v klinični fazi bolezni smo imunohistokemično reakcijo na prione ugotovili v vseh organih petih ovc in le v mezenterialni bezgavki ene ovce. Pri ovcah genotipa VRQ/VRQ v klinični fazi bolezni so bile skupne ocene imunohistokemične reakcije na prione višje (vrednosti od 2,75 do 3,00) kot pri ovcah genotipa ARQ/ARQ v klinični fazi (vrednosti od 1,25 do 2,50) (Tabeli 16 in 18). S statistično analizo smo potrdili statistično značilno močnejšo reakcijo na prione le v retrofaringealni bezgavki ovc genotipa VRQ/VRQ ($P < 0,05$).

Pri ovcah v predklinični fazi bolezni smo pri genotipu VRQ/VRQ reakcijski produkt našli v vseh pregledanih limfatičnih organih, z izjemo tonzile in vranice ovce z oznako VRQ/VRQ PK1, pri kateri smo tudi v ostalih organih ugotovili šibko pozitivno reakcijo. Skupna ocena imunohistokemične reakcije na prione je bila v tej podskupini ocenjena z vrednostmi od 2,00 do 2,50. Pri ovcah genotipa ARQ/ARQ v predklinični fazi bolezni smo pozitivno imunohistokemično reakcijo ugotovili le v polovici pregledanih limfatičnih organov. Pri vseh ovcah te podskupine smo reakcijski produkt našli le v mezenterialnih bezgavkah, v tonzili in vranici pa smo ga našli zgolj pri eni ovci. Skupna ocena imunohistokemične reakcije na prione je bila v tej podskupini ocenjena z vrednostmi od 0,50 do 1,25 (Tabeli 17 in 19). Statistična analiza je pokazala značilno pomembno močnejšo reakcijo na prione v retrofaringealni bezgavki, tonzili in vranici ovc genotipa VRQ/VRQ v predklinični fazi, v primerjavi z genotipom ARQ/ARQ ($P < 0,05$).

Povzamemo lahko, da je bila pri ovcah s srednje dovzetnim genotipom količina reakcijskega produkta v povprečju manjša kot pri ovcah z genotipom, ki je zelo dovzeten za praskavec in

da je so bile količine reakcijskega produkta pri ovcah v klinični fazi bolezni višje kot v predklinični fazi.

Z imunohistokemično preiskavo v nobenem od limfatičnih organov zdravih ovc nismo ugotovili v literaturi opisanih značilnih odlaganj prionov (Tabele od 16 do 20).

Poleg tega smo v epitelni celici črevesnih kript ileuma in mukoznih žlez ob tonzili ugotovili šibko do zmerno močno pozitivno neznatno reakcijo v obliki drobnih zrn v citoplazmi celic. Tako reakcijo smo ugotovili pri ovcah vseh treh genotipov, z izjemo podskupine zdravih ovc genotipa ARQ/ARQ (Tabela 21. Sliki 10 in 11).

Tabela 16

Rezultati imunohistokemične preiskave limfatičnih organov ovce genotipa VRQ/VRQ na prionski protein. Skupna ocena imunohistokemične reakcije je sestavljena iz ocene intenzitete reakcije: - - negativno, + - šibka pozitivna reakcija, ++ - zmerno močna pozitivna reakcija, +++ - močna pozitivna reakcija in deleža pozitivnih foliklov: 0 - negativno, nobenih pozitivnih foliklov, 1 – do 30 % pozitivnih limfatičnih foliklov, 2 – od 30 % do 60 % pozitivnih limfatičnih foliklov, 3 – nad 60 % pozitivnih limfatičnih foliklov. Vzorec v katerih so manjkale Peyerjeve plošče je označen z znakom *

Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka		tonzila		ileum		mez. bezgavke		vranica	
		intenziteta reakcije	delež pozitivnih foliklov	intenziteta reakcije	delež pozitivnih foliklov	intenziteta reakcije	delež pozitivnih foliklov	intenziteta reakcije	delež pozitivnih foliklov	intenziteta reakcije	delež pozitivnih foliklov
1	VRQ/VRQ K1	+++	3	+++	3	+++	2	+++	3	+	1
2	VRQ/VRQ K2	++	3	+++	3	+	3	++	2	+++	3
3	VRQ/VRQ K3	++	3	+++	3	+++	3	+++	3	++	3
4	VRQ/VRQ K4	+++	3	+++	3	+++	3	+++	3	+++	3
5	VRQ/VRQ K5	+++	3	++	3	*	*	+++	3	+++	3
6	VRQ/VRQ K6	+++	3	++	3	+++	3	++	3	++	2
7	VRQ/VRQ PK1	+	2	-	0	+	1	+	2	-	0
8	VRQ/VRQ PK2	+	1	+	2	+	1	+	2	++	2
9	VRQ/VRQ PK3	++	3	+	2	++	2	++	3	++	2
10	VRQ/VRQ PK4	++	2	++	3	+++	3	+++	3	+++	3
11	VRQ/VRQ PK5	++	2	++	3	+	3	+++	3	+++	3
12	VRQ/VRQ PK6	++	3	+++	3	++	3	++	3	+++	3

Tabela 17

Rezultati imunohistokemične preiskave limfatičnih organov ovce genotipa ARQ/ARQ na prionski protein. Skupna ocena imunohistokemične reakcije je sestavljena iz ocene intenzitete reakcije: - - negativno, + - šibka pozitivna reakcija, ++ - zmerno močna pozitivna reakcija, +++ - močna pozitivna reakcija in deleža pozitivnih foliklov: 0 - negativno, nobenih pozitivnih foliklov, 1 – do 30 % pozitivnih limfatičnih foliklov, 2 – od 30 % do 60 % pozitivnih limfatičnih foliklov, 3 – nad 60 % pozitivnih limfatičnih foliklov.

Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARQ/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zaporedna številka	oznaka ovce	retrof. bezgavka		tonzila		ileum		mez. bezgavke		vranica	
		intenziteta reakcije	delež pozitivnih foliklov	intenziteta reakcije	delež pozitivnih foliklov	intenziteta reakcije	delež pozitivnih foliklov	intenziteta reakcije	delež pozitivnih foliklov	intenziteta reakcije	delež pozitivnih foliklov
19	ARQ/ARQ K1	+	2	++	2	+	3	++	3	+	3
20	ARQ/ARQ K2	++	3	+++	3	++	3	++	3	+	3
21	ARQ/ARQ K3	++	3	+++	3	+++	3	+++	3	++	2
22	ARQ/ARQ K4	-	0	-	0	-	0	+	1	-	0
23	ARQ/ARQ K5	+	1	+	1	++	3	-	0	+	3
24	ARQ/ARQ K6	+	1	++	2	++	3	++	3	+	2
25	ARQ/ARQ PK1	-	0	-	0	+++	3	+++	3	-	0
26	ARQ/ARQ PK2	-	0	-	0	-	0	+	1	-	0
27	ARQ/ARQ PK3	++	2	-	0	+++	3	+	1	-	0
28	ARQ/ARQ PK4	+	1	-	0	+	1	+++	2	-	0
29	ARQ/ARQ PK5	-	0	-	0	-	0	+	1	-	0
30	ARQ/ARQ PK6	+	1	+	1	+	2	+	1	++	3

Tabela 18

Rezultati imunohistokemične preiskave limfatičnih organov ovc genotipa VRQ/VRQ na prione. Skupna ocena imunohistokemične reakcije na prione variira med 0 in 3. Vzorec v katerem so manjkale Peyerjeve plošče je označen z znakom *

Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzila	ileum	mez. bezgavka	vranica
1	VRQ/VRQ K1	3,00	3,00	2,50	3,00	1,00
2	VRQ/VRQ K2	2,50	3,00	2,00	2,00	3,00
3	VRQ/VRQ K3	2,50	3,00	3,00	3,00	2,50
4	VRQ/VRQ K4	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
5	VRQ/VRQ K5	3,00	2,50	*	3,00	3,00
6	VRQ/VRQ K6	3,00	2,50	3,00	2,50	2,00
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ K		3,00	3,00	3,00	3,00	2,75
7	VRQ/VRQ PK1	1,50	0,00	1,00	1,50	0,00
8	VRQ/VRQ PK2	1,00	1,50	1,00	1,50	2,00
9	VRQ/VRQ PK3	2,50	1,50	2,00	2,50	2,00
10	VRQ/VRQ PK4	2,00	2,50	3,00	3,00	3,00
11	VRQ/VRQ PK5	2,00	2,50	2,00	3,00	3,00
12	VRQ/VRQ PK6	2,50	3,00	2,50	2,50	3,00
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ PK		2,00	2,00	2,00	2,50	2,50
13	VRQ/VRQ Z1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	VRQ/VRQ Z2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	VRQ/VRQ Z3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	VRQ/VRQ Z4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	VRQ/VRQ Z5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	VRQ/VRQ Z6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ Z		0,00	0,0	0,00	0,00	0,00

Tabela 19

Rezultati imunohistokemične preiskave limfatičnih organov ovc genotipa ARQ/ARQ na prione. Skupna ocena imunohistokemične reakcije na prione variira med 0 in 3.

Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARQ/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

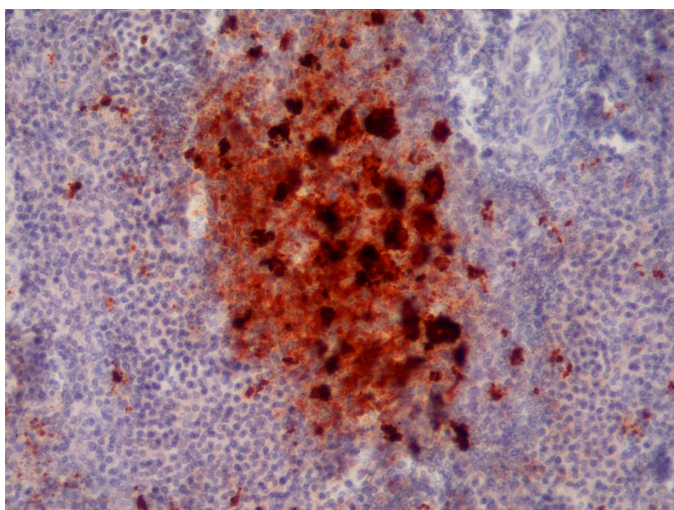
zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzila	ileum	mez. bezgavka	vranica
19	ARQ/ARQ K1	1,50	2,00	2,00	2,50	2,00
20	ARQ/ARQ K2	2,50	3,00	2,50	2,50	2,00
21	ARQ/ARQ K3	2,50	3,00	3,00	3,00	2,00
22	ARQ/ARQ K4	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
23	ARQ/ARQ K5	1,00	1,00	2,50	0,00	2,00
24	ARQ/ARQ K6	1,00	2,00	2,50	2,50	1,50
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ K		1,25	2,00	2,50	2,50	2,00
25	ARQ/ARQ PK1	0,00	0,00	3,00	3,00	0,00
26	ARQ/ARQ PK2	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
27	ARQ/ARQ PK3	2,00	0,00	3,00	1,00	0,00
28	ARQ/ARQ PK4	1,00	0,00	1,00	2,50	0,00
29	ARQ/ARQ PK5	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
30	ARQ/ARQ PK6	1,00	1,00	1,50	1,00	2,50
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ PK		0,50	0,00	1,25	1,00	0,00
31	ARQ/ARQ Z1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
32	ARQ/ARQ Z2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
33	ARQ/ARQ Z3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
34	ARQ/ARQ Z4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
35	ARQ/ARQ Z5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
36	ARQ/ARQ Z6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ Z		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 20

Rezultati imunohistokemične preiskave limfatičnih organov ovc genotipa ARR/ARQ na prione. Skupna stopnja imunohistokemične reakcije na prione variira med 0 in 3.

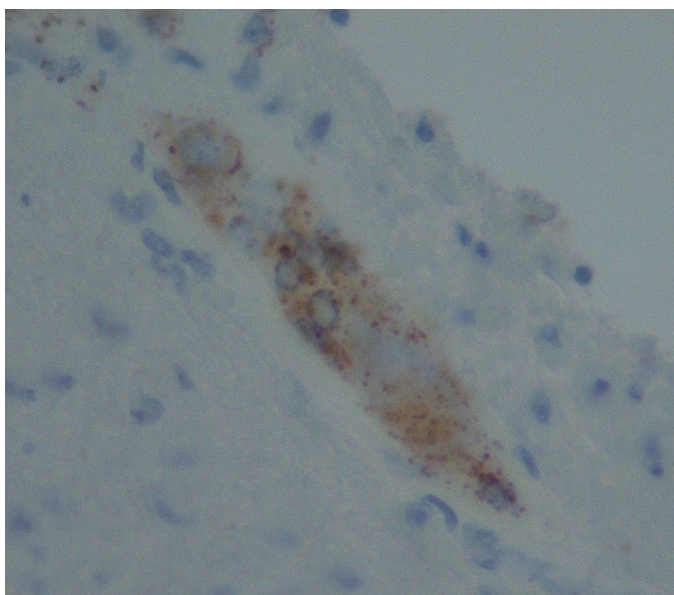
Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ), faze bolezni (Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzila	ileum	mez. bezgavka	vranica
37	ARR/ARQ Z1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
38	ARR/ARQ Z2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
39	ARR/ARQ Z3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40	ARR/ARQ Z4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
41	ARR/ARQ Z5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
42	ARR/ARQ Z6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MEDIANA podskupine ARR/ARQ Z		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



Slika 8

Vranica, limfatični folikel, ovca. Močna pozitivna reakcija na prione v limfatičnem foliklu vranice, v obliki retikularne reakcije, ki ustreza reakciji na površini FDC in v obliki večjih zrn, kar ustreza reakciji v makrofagih. Imunohistokemično barvanje z monoklonskim protitelesom proti ovčjemu prionskemu proteinu, 2G11 (Institut Pourquier), kontrastirano s hematoksilinom, x 200



Slika 9

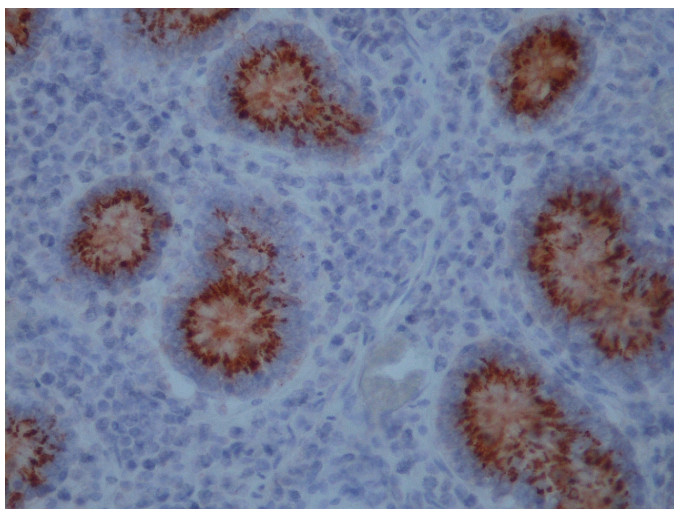
Ileum, ovca. Pozitivna reakcija na prione v mienteričnem živčnem pletežu.

Imunohistokemično barvanje z monoklonskim protitelesom proti ovčjemu prionskemu proteinu, 2G11 (Institut Pourquier), kontrastirano s hematokislinom, x 400

Tabela 21

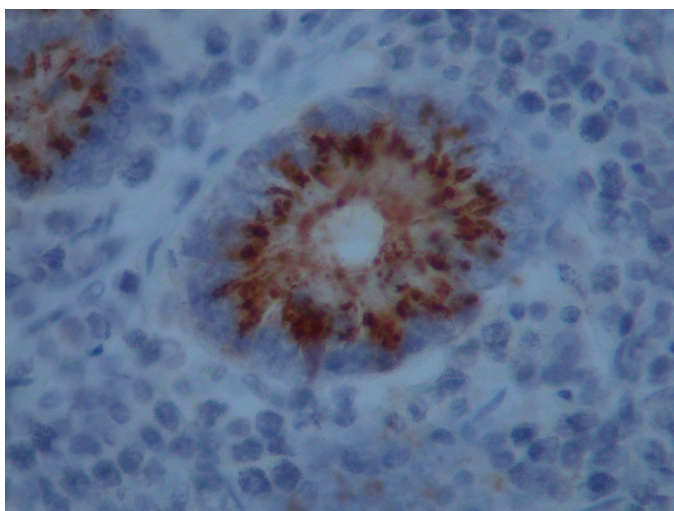
Rezultati imunohistokemične preiskave sluznice ileuma in epitela mukoznih žlez ob tonzili na prione. Izraženost neznačilne imunohistokemične reakcije smo označili z oznakama: 0 – ni reakcije, 1 – neznačilna reakcija. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ, ARQ/ARQ, ARR/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	epitelne celice ileuma	mukozne žleze ob tonzili
1	VRQ/VRQ K1	0	0
2	VRQ/VRQ K2	1	0
3	VRQ/VRQ K3	0	1
4	VRQ/VRQ K4	1	0
5	VRQ/VRQ K5	0	0
6	VRQ/VRQ K6	0	0
7	VRQ/VRQ PK1	1	1
8	VRQ/VRQ PK2	0	0
9	VRQ/VRQ PK3	0	0
10	VRQ/VRQ PK4	0	0
11	VRQ/VRQ PK5	0	0
12	VRQ/VRQ PK6	0	0
13	VRQ/VRQ Z1	0	0
14	VRQ/VRQ Z2	1	0
15	VRQ/VRQ Z3	0	1
16	VRQ/VRQ Z4	1	1
17	VRQ/VRQ Z5	1	1
18	VRQ/VRQ Z6	1	1
19	ARQ/ARQ K1	1	1
20	ARQ/ARQ K2	1	1
21	ARQ/ARQ K3	0	1
22	ARQ/ARQ K4	0	0
23	ARQ/ARQ K5	0	0
24	ARQ/ARQ K6	1	0
25	ARQ/ARQ PK1	1	1
26	ARQ/ARQ PK2	0	0
27	ARQ/ARQ PK3	1	1
28	ARQ/ARQ PK4	1	1
29	ARQ/ARQ PK5	0	0
30	ARQ/ARQ PK6	0	0
31	ARQ/ARQ Z1	0	0
32	ARQ/ARQ Z2	0	0
33	ARQ/ARQ Z3	0	0
34	ARQ/ARQ Z4	0	0
35	ARQ/ARQ Z5	0	0
36	ARQ/ARQ Z6	0	0
37	ARR/ARQ Z1	1	1
38	ARR/ARQ Z2	0	0
39	ARR/ARQ Z3	1	1
40	ARR/ARQ Z4	0	0
41	ARR/ARQ Z5	0	0
42	ARR/ARQ Z6	1	1



Slika 10

Ileum ovce, oznaka VRQ/VRQ PK1. Močna neznačilna reakcija v citoplazmi epitelnih celic kript ileuma. Imunohistokemično barvanje z monoklonskim protitelesom proti ovčjemu prionskemu proteinu, 2G11 (Institut Pourquier), kontrastirano s hematokislinom, x 100



Slika 11

Ileum ovce, oznaka VRQ/VRQ PK1. Močna neznačilna supranuklearna reakcija v citoplazmi epitelnih celic kript ileuma. Imunohistokemično barvanje z monoklonskim protitelesom proti ovčjemu prionskemu proteinu, 2G11 (Institut Pourquier), kontrastirano s hematokislinom, x 400

5.10 Rezultati morfometričnih analiz

5.10.1 Meritve arealne gostote profilov germinativnih središč v limfatičnih organih

Arealna gostota profilov germinativnih središč se je razlikovala med različnimi limfatičnimi organi. Največjo arealno gostoto profilov germinativnih središč smo pri zdravih ovcah izmerili v tonzili ovc genotipa ARQ/ARQ (0,37007), najmanjša pa je bila v vranici ovc genotipa ARR/ARQ (0,03139).

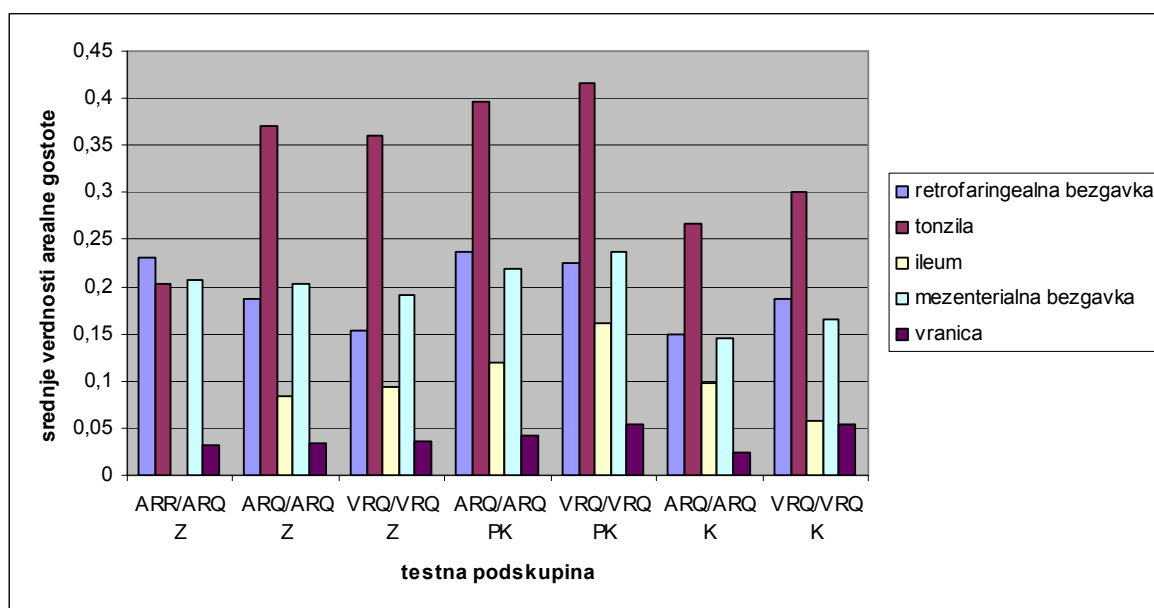
Rezultati meritev arealne gostote so v tabelah 22 do 24.

Statistična analiza ni pokazala statistično značilnih razlik med zdravimi ovcah različnih genotipov, prav tako ni bilo razlik med ovcah različnih genotipov v predklinični fazi in ovcah različnih genotipov v klinični fazi bolezni ($P > 0,05$).

Arealna gostota germinativnih središč v večini organov ovc genotipov VRQ/VRQ v predklinični fazi je bila na splošno višja kot pri zdravih ovcah. Statistično značilno višje vrednosti smo dokazali le v mezenterialni bezgavki ($P < 0,05$).

Arealne gostote germinativnih središč ovc genotipa VRQ/VRQ v klinični fazi bolezni so bile večinoma nižje kot v predklinični fazi, vendar analiza ni pokazala statistično značilnih razlik ($P > 0,05$).

Vrednosti arealne gostote so pri ovcah genotipa ARQ/ARQ ovcah v predklinični fazi bolezni nekoliko višje kot pri zdravih ovcah, v klinični fazi pa so bile vrednosti nižje kot pri zdravih ovcah in ovcah v predklinični fazi istega genotipa. S statistično analizo pa smo pri ovcah tega genotipa v klinični fazi bolezni dokazali nižje vrednosti arealne gostote germinativnih središč mezenterialne bezgavke v primerjavi z zdravimi ovcah ($P < 0,05$) in nižje vrednosti tega parametra v retrofaringealni in mezenterialni bezgavki, tonzili in vranici pri ovcah v klinični fazi v primerjavi z ovcah v predklinični fazi bolezni ($P < 0,05$) (Graf 3).



Graf 3

Primerjava srednjih vrednosti arealnih gostot profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov v limfatičnih organih ovc testnih podskupin. Legenda: oznaka testne podskupine – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ, ARQ/ARQ, VRQ/VRQ) in faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava).

Tabela 22

Rezultati meritev arealne gostote profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov v limfatičnih organih ovc genotipa VRQ/VRQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
1	VRQ/VRQ K1	0,08692	0,24657	0,07938	0,16727	0,07959
2	VRQ/VRQ K2	0,18684	0,31298	0,01102	0,14555	0,08111
3	VRQ/VRQ K3	0,33883	0,46193	0,03495	0,15275	0,02632
4	VRQ/VRQ K4	0,22032	0,28870	0,10573	0,28817	0,06440
5	VRQ/VRQ K5	0,18787	0,37910	0,00000	0,28349	0,04253
6	VRQ/VRQ K6	0,13534	0,28654	0,18446	0,16176	0,02892
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ K		0,18735	0,30084	0,05716	0,16452	0,05347
7	VRQ/VRQ PK1	0,31518	0,47567	0,08508	0,31696	0,05458
8	VRQ/VRQ PK2	0,29080	0,44979	0,28846	0,24336	0,05316
9	VRQ/VRQ PK3	0,26735	0,38375	0,23580	0,27410	0,02031
10	VRQ/VRQ PK4	0,17742	0,46609	0,25650	0,18820	0,06721
11	VRQ/VRQ PK5	0,18458	0,31523	0,06490	0,22923	0,04059
12	VRQ/VRQ PK6	0,11339	0,30118	0,08486	0,17854	0,06431
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ PK		0,22597	0,41677	0,16044	0,23629	0,05387
13	VRQ/VRQ Z1	0,13589	0,37714	0,15036	0,16361	0,02210
14	VRQ/VRQ Z2	0,15081	0,30347	0,12699	0,21199	0,04627
14	VRQ/VRQ Z3	0,26756	0,36583	0,00000	0,21438	0,04315
16	VRQ/VRQ Z4	0,14311	0,28306	0,06213	0,16874	0,02910
17	VRQ/VRQ Z5	0,15417	0,35428	0,23067	0,22155	0,02953
18	VRQ/VRQ Z6	0,19266	0,46630	0,00000	0,16970	0,04517
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ Z		0,15249	0,36005	0,09456	0,19085	0,03634

Tabela 23

Rezultati meritev arealne gostote profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov v limfatičnih organih ovc genotipa ARQ/ARQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARQ/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
19	ARQ/ARQ K1	0,19059	0,23498	0,09314	0,16072	0,06134
20	ARQ/ARQ K2	0,10219	0,33069	0,01835	0,09879	0,01395
21	ARQ/ARQ K3	0,14581	0,41183	0,02830	0,20848	0,03271
22	ARQ/ARQ K4	0,17182	0,18475	0,10104	0,16211	0,01113
23	ARQ/ARQ K5	0,15160	0,29527	0,20413	0,12825	0,03274
24	ARQ/ARQ K6	0,08393	0,23892	0,13604	0,12081	0,01158
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ K		0,14871	0,26710	0,09709	0,14449	0,02333
25	ARQ/ARQ PK1	0,28988	0,39457	0,12931	0,24801	0,03800
26	ARQ/ARQ PK2	0,22966	0,43733	0,07978	0,19056	0,06899
27	ARQ/ARQ PK3	0,27172	0,31590	0,22620	0,21350	0,03747
28	ARQ/ARQ PK4	0,24479	0,45052	0,16385	0,22429	0,04083
29	ARQ/ARQ PK5	0,14054	0,29616	0,01083	0,19962	0,04196
30	ARQ/ARQ PK6	0,20972	0,39824	0,11079	0,29134	0,04953
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ PK		0,23723	0,39641	0,12005	0,21890	0,04140
31	ARQ/ARQ Z1	0,17977	0,37872	0,06527	0,17833	0,03160
32	ARQ/ARQ Z2	0,19520	0,47313	0,08992	0,18858	0,01847
33	ARQ/ARQ Z3	0,21869	0,35096	0,12673	0,22937	0,03674
34	ARQ/ARQ Z4	0,14288	0,36141	0,07881	0,20285	0,05363
35	ARQ/ARQ Z5	0,25749	0,32728	0,10699	0,27869	0,05486
36	ARQ/ARQ Z6	0,12580	0,38660	0,02080	0,20330	0,02783
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ Z		0,18749	0,37007	0,08437	0,20308	0,03417

Tabela 24

Rezultati meritev arealne gostote profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov v limfatičnih organih ovc genotipa ARR/ARQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ ARQ), faze bolezni (Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
37	ARR/ARQ Z1	0,25159	0,35960	0,21600	0,18734	0,07209
38	ARR/ARQ Z2	0,38208	0,48742	0,05217	0,14789	0,03246
39	ARR/ARQ Z3	0,11753	0,02142	0,00000	0,22513	0,00055
40	ARR/ARQ Z4	0,07517	0,21376	0,00000	0,11789	0,00660
41	ARR/ARQ Z5	0,24344	0,19293	0,00000	0,24804	0,03031
42	ARR/ARQ Z6	0,21960	0,17817	0,00000	0,26651	0,04791
MEDIANA podskupine ARR/ARQ Z		0,23152	0,20335	0,00000	0,20624	0,03139

5.10.2 Meritve numerične gostote profilov germinativnih središč v limfatičnih organih

Numerična gostota profilov germinativnih središč je bila v različnih limfatičnih organih različna. Največjo numerično gostoto profilov germinativnih središč smo pri zdravih ovcah ugotovili v tonzili ovc genotipa VRQ/VRQ (6,14343), najmanjša je bila v vranici ovc istega genotipa (0,68623).

Rezultati meritev numerične gostote so v tabelah 25 do 27.

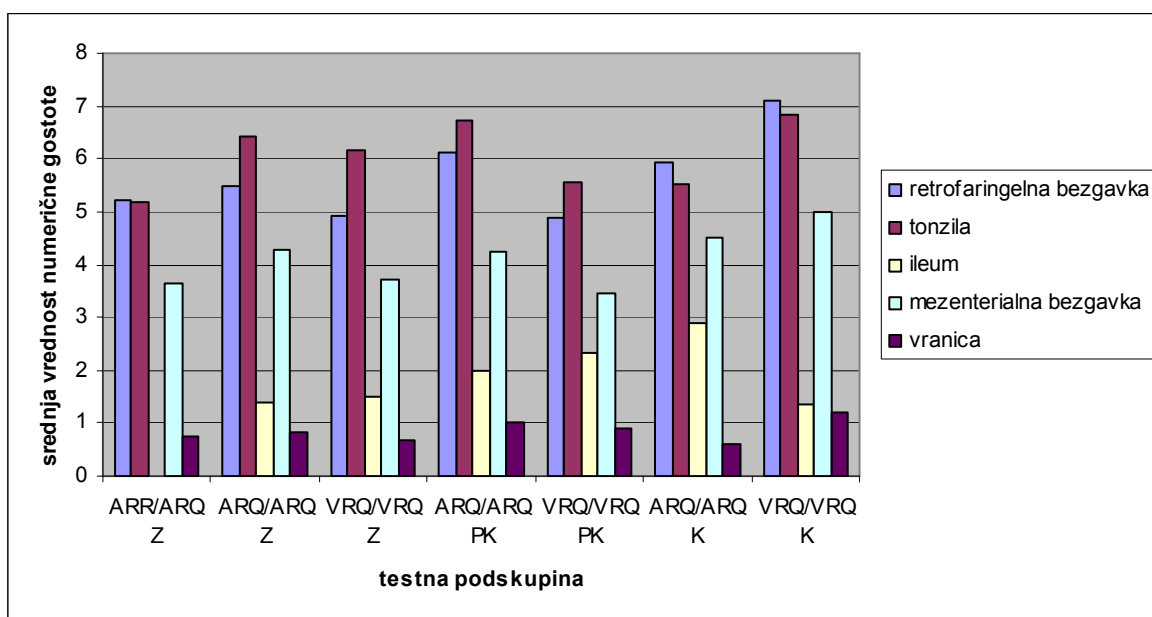
Statistična analiza ni pokazala statistično značilnih razlik v numerični gostoti profilov germinativnih središč med zdravimi ovci različnih genotipov ($P > 0,05$).

Numerične gostote profilov germinativnih središč so bile pri ovcah v predklinični fazi praskavca pri genotipu ARQ/ARQ višje kot pri genotipu VRQ/VRQ. S statistično analizo smo značilno razliko dokazali v tonzili in retrofaringealni bezgavki ($P < 0,05$).

Numerične gostote profilov germinativnih središč so bile pri ovcah v klinični fazi praskavca pri genotipu VRQ/VRQ višje kot pri genotipu ARQ/ARQ, vendar smo s statistično analizo značilno razliko dokazali le pri vranici ($P < 0,05$).

Numerične gostote profilov germinativnih središč ovc genotipa VRQ/VRQ v klinični fazi so bile višje kot pri zdravih ovcah in ovcah v predklinični fazi bolezni (Graf 6). Razlika je bila statistično značilno pomembna pri primerjavi retrofaringealne in mezenterialne bezgavke ter vranice ovc v klinični fazi bolezni in zdravih ovc ter pri primerjavi prej omenjenih organov in tonzile ovc v klinični in predklinični fazi bolezni ($P < 0,05$).

Numerična gostota profilov germinativnih središč ovc pri ovcah genotipa ARQ/ARQ v različnih fazah bolezni se ni statistično značilno razlikovala ($P > 0,05$) (Graf 4).



Graf 4

Primerjava srednjih vrednosti numeričnih gostot profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov v limfatičnih organih ovc različnih testnih podskupin. Legenda: oznaka testne podskupine – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ, ARQ/ARQ, VRQ/VRQ) in faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava).

Tabela 25

Rezultati meritev numerične gostote profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov v limfatičnih organih ovc genotipa VRQ/VRQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
1	VRQ/VRQ K1	6,69362	6,58624	1,80986	4,66610	1,75749
2	VRQ/VRQ K2	7,02888	6,27776	0,92388	4,55067	1,53693
3	VRQ/VRQ K3	7,17355	8,40285	0,90593	5,54775	1,04549
4	VRQ/VRQ K4	9,47798	8,51066	3,99579	5,34605	1,10101
5	VRQ/VRQ K5	8,09919	5,86667	0,00000	6,31073	1,31789
6	VRQ/VRQ K6	4,60188	7,08445	3,02648	3,45574	0,86487
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ K		7,10122	6,83535	1,36687	5,00608	1,20945
7	VRQ/VRQ PK1	5,56800	5,45916	2,08704	4,17115	1,03713
8	VRQ/VRQ PK2	5,52997	5,19022	2,93824	3,68279	1,03814
9	VRQ/VRQ PK3	3,93031	5,58563	3,11675	2,97126	0,51066
10	VRQ/VRQ PK4	4,70708	5,55217	2,56595	3,26201	0,76855
11	VRQ/VRQ PK5	4,69086	5,53912	0,77114	3,25369	0,79639
12	VRQ/VRQ PK6	5,03385	6,01180	1,62817	3,76371	1,26860
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ PK		4,87047	5,54565	2,32650	3,47240	0,91676
13	VRQ/VRQ Z1	4,94635	6,06797	1,52757	4,33921	0,54638
14	VRQ/VRQ Z2	5,81538	4,82628	1,45290	3,63956	0,86648
15	VRQ/VRQ Z3	3,88277	5,52590	0,00000	3,56028	0,63024
16	VRQ/VRQ Z4	6,34287	6,91929	1,59139	3,78486	0,88422
17	VRQ/VRQ Z5	4,35705	7,97944	3,73011	4,55434	0,74222
18	VRQ/VRQ Z6	4,90000	6,21889	0,00000	3,13082	0,60243
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ Z		4,92318	6,14343	1,49024	3,71221	0,68623

Tabela 26

Rezultati meritev numerične gostote profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov v limfatičnih organih ovc genotipa ARQ/ARQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARQ/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
19	ARQ/ARQ K1	6,90155	5,07764	3,11331	4,38042	1,41451
20	ARQ/ARQ K2	4,29079	7,15509	1,12490	3,31741	0,38154
21	ARQ/ARQ K3	4,75235	6,62358	1,88015	6,76692	0,81196
22	ARQ/ARQ K4	8,07356	4,80702	2,68254	5,01075	0,41733
23	ARQ/ARQ K5	7,10184	5,95429	3,78150	3,71985	0,91547
24	ARQ/ARQ K6	4,96175	4,44103	4,42360	4,61739	0,36237
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ K		5,93165	5,51597	2,89793	4,49891	0,61465
25	ARQ/ARQ PK1	7,02983	6,53184	2,19579	3,80517	1,03701
26	ARQ/ARQ PK2	5,32425	6,15618	1,64643	4,17531	1,19277
27	ARQ/ARQ PK3	6,84169	6,99638	2,95652	4,26649	0,97046
28	ARQ/ARQ PK4	5,65634	8,24847	2,39462	4,23437	0,90613
29	ARQ/ARQ PK5	4,51786	6,34508	0,34861	4,88660	0,77059
30	ARQ/ARQ PK6	6,60490	6,88807	1,80886	4,74975	1,36804
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ PK		6,13062	6,70996	2,00233	4,25043	1,00374
31	ARQ/ARQ Z1	5,76972	7,47741	1,82396	4,04391	0,86376
32	ARQ/ARQ Z2	5,77167	6,42545	1,50952	4,60246	0,37168
33	ARQ/ARQ Z3	5,23456	6,10098	2,33246	4,54000	0,77506
34	ARQ/ARQ Z4	4,95577	6,77420	1,26727	2,85914	1,36341
35	ARQ/ARQ Z5	6,31342	5,42264	1,26929	3,34950	0,86026
36	ARQ/ARQ Z6	4,66388	6,38845	0,84574	4,96028	0,54757
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ Z		5,50214	6,40695	1,38941	4,29196	0,81766

Tabela 27

Rezultati meritev numerične gostote profilov germinativnih središč limfatičnih foliklov v limfatičnih organih ovc genotipa ARR/ARQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ), faze bolezni (Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
37	ARR/ARQ Z1	5,82155	5,61774	4,49834	3,68174	1,20131
38	ARR/ARQ Z2	5,41439	6,59192	1,90934	2,51904	0,73016
39	ARR/ARQ Z3	4,49524	0,85073	0,00000	3,89039	0,04573
40	ARR/ARQ Z4	2,04321	5,00839	0,00000	2,95916	0,27283
41	ARR/ARQ Z5	5,03174	5,34831	0,00000	5,86345	0,77552
42	ARR/ARQ Z6	6,40377	3,03113	0,00000	3,57655	0,98071
MEDIANA podskupine ARR/ARQ Z		5,22307	5,17835	0,00000	3,62915	0,75284

5.10.3 Rezultati meritev povprečne sivine imunohistokemične reakcije za limfocite T v germinativnih središčih limfatičnih organov

Limfocite T, označene s protitelesom proti antigenu CD3 (DAKO), smo ugotovili v vseh limfatičnih organih. V bezgavkah smo največ limfocitov T opazili v področju parakorteksa, nekoliko manj pa v področju sredice. V korteksu bezgavk in v limfatičnih foliklih je bilo število limfocitov T manjše.

V vranici je bilo limfocitov T največ v periarterijskem omotu, manj pa v rdeči pulpi in v limfatičnih foliklih.

V tonzilah so limfociti T prevladovali v interfolikularnih področjih, v limfatičnih foliklih in v epitelu kript jih bilo manj.

V ileumu so bili limfociti T najbolj skoncentrirani v interfolikularnih področjih Peyerjevih plošč, manj jih je bilo v lamini propriji sluznice, v sluzničnem epiteliju in v foliklih Peyerjevih ploščah.

Rezultati meritev povprečne sivine za imunohistokemično reakcijo na limfocite T so v tabelah od 28 do 30.

Pri statistični analizi rezultatov smo ugotovili značilno pomembne manjše vrednosti povprečnih svin za limfocite T v vseh limfatičnih organih zdravih ovc genotipa VRQ/VRQ v primerjavi z genotipom ARQ/ARQ ($P < 0,05$).

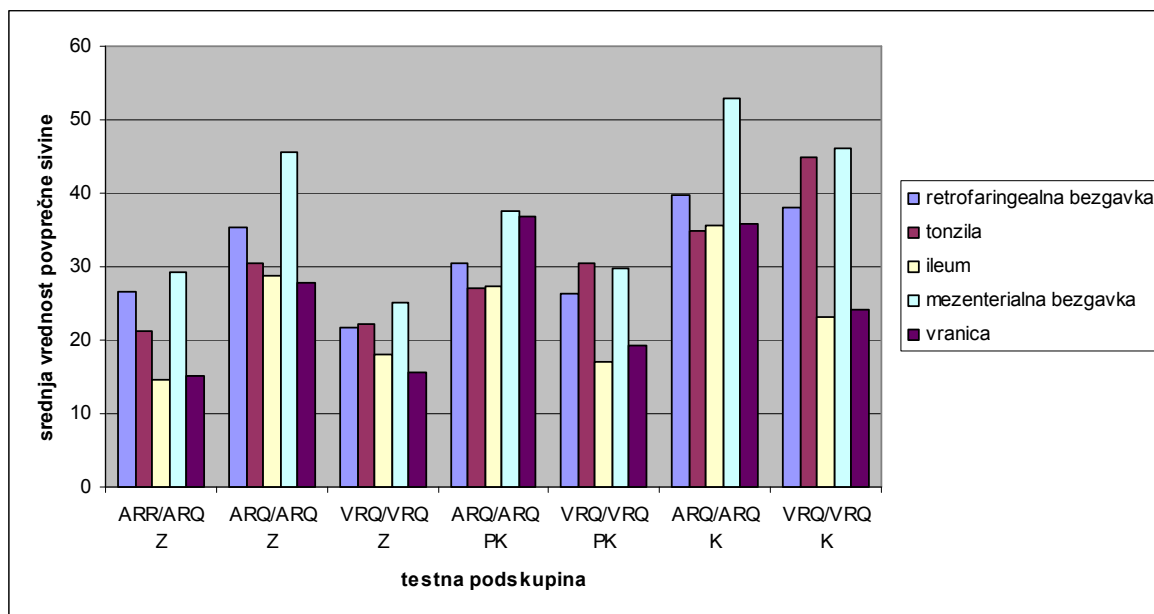
Vrednosti povprečnih sivin za limfocite T so bile pri genotipu ARR/ARQ manjše kot pri genotipu ARQ/ARQ, vendar je bila razlika statistično značilna le pri mezenterialni bezgavki ($P < 0,05$).

Tudi v predklinični fazi bolezni so bile vrednosti povprečnih sivin za limfocite T pri genotipu VRQ/VRQ nižje kot pri genotipu ARQ/ARQ, vendar je bila razlika statistično značilno pomembna le v vranici in ileumu ($P < 0,05$).

V klinični fazi bolezni so se razlike v vrednosti povprečnih sivin med genotipoma VRQ/VRQ in ARQ/ARQ zmanjšale, statistično značilno pomembno nižjo vrednost smo ugotovili v ileumu genotipa VRQ/VRQ v primerjavi z genotipom ARQ/ARQ ($P < 0,05$).

Pri ovcah genotipa VRQ/VRQ v klinični fazi bolezni smo v retrofaringealni in mezenterialni bezgavki, tonzili ter vranici izmerili višje vrednosti kot pri zdravih ovcah ($P < 0,05$). Vrednosti pri ovcah v predklinični fazi bolezni so bile v primerjavi z zdravimi ovcami nekoliko višje, vendar ne statistično značilne, prav tako ni bilo statistično značilnih razlik med ovcami klinične in predklinične faze ($P > 0,05$).

Pri genotipu ARQ/ARQ so bile vrednosti povprečnih sivin za limfocite T pri ovcah v predklinični fazi nekoliko nižje kot pri zdravih ovcah, pri ovcah v klinični fazi bolezni pa so bile vrednosti povprečnih sivin za limfocite T nekoliko višje v primerjavi z zdravimi ovcami. Statistična analiza je potrdila statistično značilno pomembno višjo vrednost povprečne sivine za limfocite T v mezenterialni bezgavki ovc v klinični fazi v primerjavi z ovcami v predklinični fazi ($P < 0,05$) (Graf 5).



Graf 5

Srednjih vrednosti povprečnih svin imunohistokemične reakcije za limfocite T v germinativnih središč limfatičnih foliklov v limfatičnih organih ovc testnih podskupin. Legenda: oznaka testne podskupine – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ, ARQ/ARQ, VRQ/VRQ) in faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava).

Tabela 28

Rezultati meritev povprečnih svin imunohistokemične reakcije za limfocite T v germinativnih središč v limfatičnih organih ovc genotipa VRQ/VRQ. Vzorci v katerih so manjkale Peyerjeve plošče so označeni z znakom *. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
1	VRQ/VRQ K1	36,39099	23,06581	43,93308	32,54572	27,61965
2	VRQ/VRQ K2	39,4507	54,34711	21,23307	55,27908	20,20716
3	VRQ/VRQ K3	15,37076	41,47342	23,1123	22,00051	20,69557
4	VRQ/VRQ K4	44,68472	28,28033	9,28668	36,73733	17,32814
5	VRQ/VRQ K5	36,78729	53,28078	*	67,59163	30,67752
6	VRQ/VRQ K6	51,03572	48,27316	57,00371	67,0544	41,18923
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ K		38,11900	44,87329	23,11230	46,00821	24,15761
7	VRQ/VRQ PK1	20,98227	19,59884	6,98333	18,44475	15,66524
8	VRQ/VRQ PK2	28,16806	37,26088	15,85854	42,75548	31,42870
9	VRQ/VRQ PK3	24,72406	20,18160	14,86818	21,94510	17,23545
10	VRQ/VRQ PK4	22,94756	25,41538	23,33125	24,89421	16,69000
11	VRQ/VRQ PK5	34,85310	35,40484	18,17429	34,38481	21,13765
12	VRQ/VRQ PK6	40,82487	36,43810	25,00583	47,63632	32,88269
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ PK		26,44606	30,41011	17,01642	29,63951	19,18655
13	VRQ/VRQ Z1	27,20162	21,17381	11,96211	32,77627	9,70600
14	VRQ/VRQ Z2	19,06162	26,72931	15,85000	24,04429	19,25263
14	VRQ/VRQ Z3	28,79905	24,90354	*	27,53243	12,37385
16	VRQ/VRQ Z4	25,38259	22,37636	20,38462	26,29900	23,90526
17	VRQ/VRQ Z5	24,32553	21,91818	23,35667	23,72309	18,43500
18	VRQ/VRQ Z6	14,29865	17,67732	*	18,64929	12,64462
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ Z		21,75604	22,14727	18,11731	25,17165	15,53981

Tabela 29

Rezultati meritev povprečnih svin imunohistokemične reakcije za limfocite T v germinativnih središč limfatičnih foliklov v limfatičnih organih ovc genotipa ARQ/ARQ. Vzorec v katerem so manjkale Peyerjeve plošče je označen z znakom * Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARQ/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
19	ARQ/ARQ K1	22,56022	25,12587	33,29448	40,50683	30,55892
20	ARQ/ARQ K2	37,79808	46,39083	15,55686	63,45815	52,12126
21	ARQ/ARQ K3	41,69892	27,31785	37,99262	37,14720	40,14497
22	ARQ/ARQ K4	52,79500	36,89433	23,11128	65,90030	37,83444
23	ARQ/ARQ K5	44,81702	34,60091	58,34510	57,51887	31,69209
24	ARQ/ARQ K6	32,48156	35,39520	42,54208	48,30544	33,99186
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ K		39,74850	34,99806	35,64355	52,91216	35,91315
25	ARQ/ARQ PK1	34,24738	27,47837	38,06375	46,32193	36,98682
26	ARQ/ARQ PK2	34,59767	30,30553	20,49308	45,32946	36,72600
27	ARQ/ARQ PK3	25,84400	25,07750	27,23200	38,31298	39,31500
28	ARQ/ARQ PK4	27,13780	20,24278	28,78074	31,44814	30,24100
29	ARQ/ARQ PK5	33,62196	41,88674	*	36,97127	39,42438
30	ARQ/ARQ PK6	25,24379	26,80407	18,42063	26,84907	21,15179
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ PK		30,37988	27,14122	27,23200	37,64213	36,85641
31	ARQ/ARQ Z1	34,35076	30,04471	30,82364	47,89154	30,65000
32	ARQ/ARQ Z2	34,44583	31,06314	41,02353	44,03772	43,88750
33	ARQ/ARQ Z3	36,82579	29,89286	26,78077	45,25210	23,20471
34	ARQ/ARQ Z4	36,96329	35,10305	26,77750	47,03978	23,33429
35	ARQ/ARQ Z5	36,30897	40,81677	32,37778	45,90500	33,54056
36	ARQ/ARQ Z6	32,96258	26,26845	23,01286	33,96058	24,99000
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ Z		35,37740	30,55393	28,80221	45,57855	27,82000

Tabela 30

Rezultati meritev povprečnih svin imunohistokemične reakcije za limfocite T v germinativnih središčih limfatičnih organov ovc genotipa ARR/ARQ. Vzorci v katerih so manjkale Peyerjeve plošče so označeni z znakom *. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ), faze bolezni (Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
37	ARR/ARQ Z1	23,42574	15,99000	13,18295	22,05956	24,39840
38	ARR/ARQ Z2	21,37190	17,36707	16,29875	30,60625	16,56400
39	ARR/ARQ Z3	29,82692	24,18800	*	34,14878	8,49333
40	ARR/ARQ Z4	29,58500	28,41027	*	23,32577	13,62333
41	ARR/ARQ Z5	46,48382	52,86660	*	38,41630	35,32786
42	ARR/ARQ Z6	23,48826	18,31457	*	27,82103	11,51684
MEDIANA podskupine ARR/ARQ Z		26,53663	21,25129	14,74085	29,21364	15,09367

5.10.4 Rezultati meritev povprečne svinne imunohistokemične reakcije za limfocite B v germinativnih središčih limfatičnih organov

Limfocite B, ki smo jih označili s protitelesom proti markerju CD79 α cy (DAKO), smo v vseh limfatičnih organih napogosteje našli v germinativnih središčih limfatičnih foliklov. Limfociti B so bili manj številni v področju korteksa in parakorteksa ter sredice bezgavk, periarterijskem limfatičnem obroču in rdeči pulpi vranice, interfolikularnih področjih tonzile in lamini propriji ileuma.

Rezultati meritev povprečne svinne imunohistokemične reakcije za limfocite B so v tabelah od 31 do 33.

Pri statistični analizi rezultatov smo ugotovili značilno pomembno manjše vrednosti povprečnih svin v vseh limfatičnih organih zdravih ovc genotipa VRQ/VRQ v primerjavi z genotipom ARQ/ARQ ($P < 0,05$). Vrednosti povprečnih svin so bile tudi pri genotipu ARR/ARQ manjše kot pri zdravih ovcah genotipa ARQ/ARQ, vendar je bila razlika statistično značilna le pri mezenterialni bezgavki ($P < 0,05$).

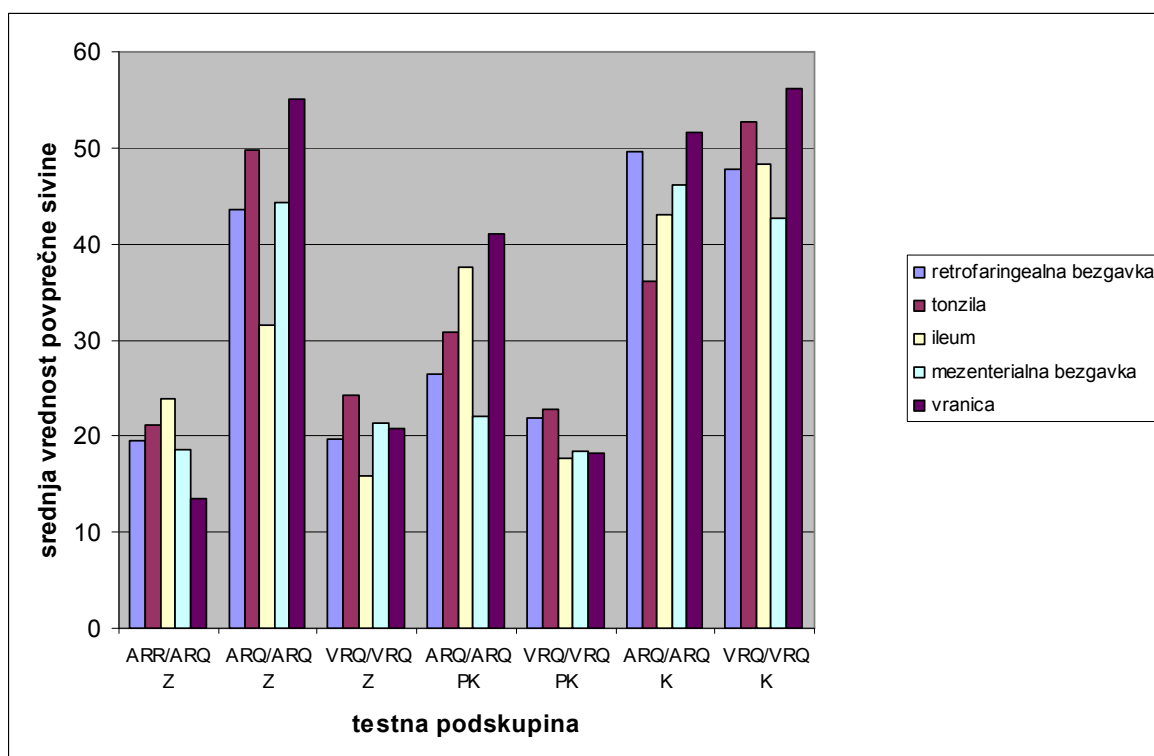
V predklinični fazi so se razlike med genotipoma VRQ/VRQ in ARQ/ARQ zmanjšale v primerjavi z zdravimi ovci, vendar so bile vrednosti pri genotipu ARQ/ARQ še vedno

višje. S statistično analizo smo dokazali višjo vrednost povprečnih sivin v vranici ovc genotipa ARQ/ARQ v primerjavi z genotipom VRQ/VRQ ($P < 0,05$).

Primerjava vrednosti povprečnih sivin med ovci obeh genotipov v klinični fazi ni pokazala statistično značilno pomembnih razlik ($P > 0,05$).

Povprečne sivine so bile pri ovci genotipa VRQ/VRQ v klinični fazi statistično značilno pomembno višje kot v predklinični fazi bolezni in zdravih ovci ($P < 0,05$). Med zdravimi ovci in ovci v predklinični fazi pri genotipu VRQ/VRQ nismo ugotovili statistično značilno pomembnih razlik ($P > 0,05$).

Pri ovci genotipa ARQ/ARQ v predklinični fazi bolezni so bile vrednosti povprečnih sivin večinoma nižje kot pri zdravih ovci in ovci v klinični fazi. Statistična analiza je potrdila nižje vrednosti povprečne sivine v retrofaringealni bezgavki ovc v predklinični fazi v primerjavi s klinično fazo ($P < 0,05$) in nižje vrednosti v retrofaringealni ter mezenterialni bezgavki, tonzili in vranici v primerjavi z zdravimi ovci ($P < 0,05$). V tonzili in vranici ovc v klinični fazi smo dokazali značilno pomembno nižje vrednosti ter v retrofaringealni bezgavki značilno pomembno višjo vrednost kot pri zdravih ovci ($P < 0,05$) (Graf 6).



Graf 6

Srednje vrednosti povprečnih svin imunohistokemične reakcije za limfocite B v germinativnih središč limfatičnih foliklov v limfatičnih organih zdravih ovc testnih podskupin. Legenda: oznaka testne podskupine – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ, ARQ/ARQ, VRQ/VRQ) in faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava).

Tabela 31

Rezultati meritev povprečnih sivin imunohistokemične reakcije za limfocite B v germinativnih središč v limfatičnih organih ovc genotipa VRQ/VRQ. Vzorci v katerih so manjkale Peyerjeve plošče so označeni z znakom *. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
1	VRQ/VRQ K1	24,06962	19,85912	49,11197	27,25166	48,16895
2	VRQ/VRQ K2	67,91954	54,70228	47,43445	49,23934	46,65177
3	VRQ/VRQ K3	47,74928	50,71992	*	43,35288	65,02213
4	VRQ/VRQ K4	34,74226	50,40737	53,48784	41,87867	39,81838
5	VRQ/VRQ K5	58,75145	55,03420	*	47,93441	64,14679
6	VRQ/VRQ K6	47,94613	57,29601	44,02321	31,99399	70,15436
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ K		47,84771	52,71110	48,27321	42,61578	56,15787
7	VRQ/VRQ PK1	28,84232	22,38966	*	25,51136	14,03615
8	VRQ/VRQ PK2	21,62917	23,37299	17,31833	17,94857	16,54588
9	VRQ/VRQ PK3	16,95434	33,19767	23,10500	15,46237	25,16188
10	VRQ/VRQ PK4	17,22034	22,27554	18,35762	16,30042	18,52273
11	VRQ/VRQ PK5	29,58439	35,78044	9,89500	22,59605	31,77000
12	VRQ/VRQ PK6	22,01218	18,53452	17,73529	18,93333	18,07667
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ PK		21,82068	22,88133	17,73529	18,44095	18,29970
13	VRQ/VRQ Z1	21,62140	25,75141	10,21333	25,28855	25,43533
14	VRQ/VRQ Z2	14,23667	22,72838	14,30000	21,50182	13,87857
14	VRQ/VRQ Z3	17,92038	19,95266	*	18,08975	23,13727
16	VRQ/VRQ Z4	22,37571	18,61130	22,60467	21,78546	18,44100
17	VRQ/VRQ Z5	16,40841	38,09821	17,30600	21,33786	15,56400
18	VRQ/VRQ Z6	24,73484	26,90947	*	19,17267	30,13842
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ Z		19,77089	24,23990	15,80300	21,41984	20,78914

Tabela 32

Rezultati meritev povprečnih svin imunohistokemične reakcije za limfocite B v germinativnih središč v limfatičnih organih ovc genotipa ARQ/ARQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARQ/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
19	ARQ/ARQ K1	33,50038	22,29289	42,05117	23,00215	24,15163
20	ARQ/ARQ K2	52,81206	49,47544	61,48091	51,57060	52,61635
21	ARQ/ARQ K3	47,85294	32,56448	31,43995	43,48854	46,65955
22	ARQ/ARQ K4	41,11591	31,07385	43,94908	33,06585	50,52003
23	ARQ/ARQ K5	55,26475	39,71087	52,63650	54,90564	60,76977
24	ARQ/ARQ K6	51,36242	46,67876	36,94104	48,86434	54,31927
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ K		49,60768	36,13768	43,00013	46,17644	51,56819
25	ARQ/ARQ PK1	12,31407	20,80811	17,30095	13,35355	27,93091
26	ARQ/ARQ PK2	28,86239	35,34099	49,50600	25,69586	44,08650
27	ARQ/ARQ PK3	21,52338	26,46333	11,24917	13,80793	27,57933
28	ARQ/ARQ PK4	27,35367	36,99900	35,12053	33,39820	46,09063
29	ARQ/ARQ PK5	47,39430	46,29987	40,15500	44,76947	56,84278
30	ARQ/ARQ PK6	25,70079	26,12789	41,16667	18,37265	38,00211
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ PK		26,52723	30,90216	37,63777	22,03426	41,04431
31	ARQ/ARQ Z1	50,87566	53,55266	43,85850	50,82038	58,76625
32	ARQ/ARQ Z2	44,00380	46,09986	28,85688	43,26984	56,72500
33	ARQ/ARQ Z3	77,01458	65,73203	34,06684	57,04016	53,48167
34	ARQ/ARQ Z4	43,17846	57,46259	24,84222	45,49574	78,97000
35	ARQ/ARQ Z5	28,85304	44,89574	23,10500	19,87556	47,13500
36	ARQ/ARQ Z6	36,91575	40,39623	46,94556	42,54500	46,19929
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ Z		43,59113	49,82626	31,46186	44,38279	55,10334

Tabela 33

Rezultati meritev povprečnih svin imunohistokemične reakcije za limfocite B v germinativnih središč v limfatičnih organih ovc genotipa ARR/ARQ. Vzorci v katerih so manjkale Peyerjeve plošče so označeni z znakom *. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ), faze bolezni (Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
37	ARR/ARQ Z1	33,54269	32,62205	35,24226	34,08582	46,90250
38	ARR/ARQ Z2	18,27522	19,72500	12,50250	11,07424	15,57667
39	ARR/ARQ Z3	20,82176	22,45612	*	18,6705	11,22500
40	ARR/ARQ Z4	12,94684	18,09145	*	18,60821	11,27615
41	ARR/ARQ Z5	40,22868	46,08865	*	20,11000	24,72154
42	ARR/ARQ Z6	17,78344	12,96829	*	14,59000	4,27417
MEDIANA podskupine ARR/ARQ Z		19,54849	21,09056	23,87238	18,63936	13,42641

5.10.5 Rezultati meritev povprečne svinine imunohistokemične reakcije za folikularne dendritične celice v germinativnih središčih limfatičnih organov

FDC, označene s protitelesom proti antigenu S-100, smo ugotovili v germinativnih središčih limfatičnih foliklov vseh limfatičnih organov. Poleg tega je protitelo označilo tudi intersticijske DC, zato smo pozitivno imunohistokemično reakcijo ugotovili tudi v celicah zunaj germinativnih središč.

Rezultati meritev povprečne svinine imunohistokemične reakcije za FDC so v tabelah od 34 do 36.

Pri statistični analizi rezultatov smo ugotovili značilno pomembno manjše vrednosti povprečnih svin v vseh limfatičnih organih zdravih ovc genotipa VRQ/VRQ v primerjavi z genotipom ARQ/ARQ ($P < 0,05$). Povprečne svinine v organih ovc genotipa VRQ/VRQ so bile nižje tudi od vrednosti, izmerjenih pri genotipu ARR/ARQ, vendar je bila razlika značilno pomembna le pri mezenterialni bezgavki ($P < 0,05$).

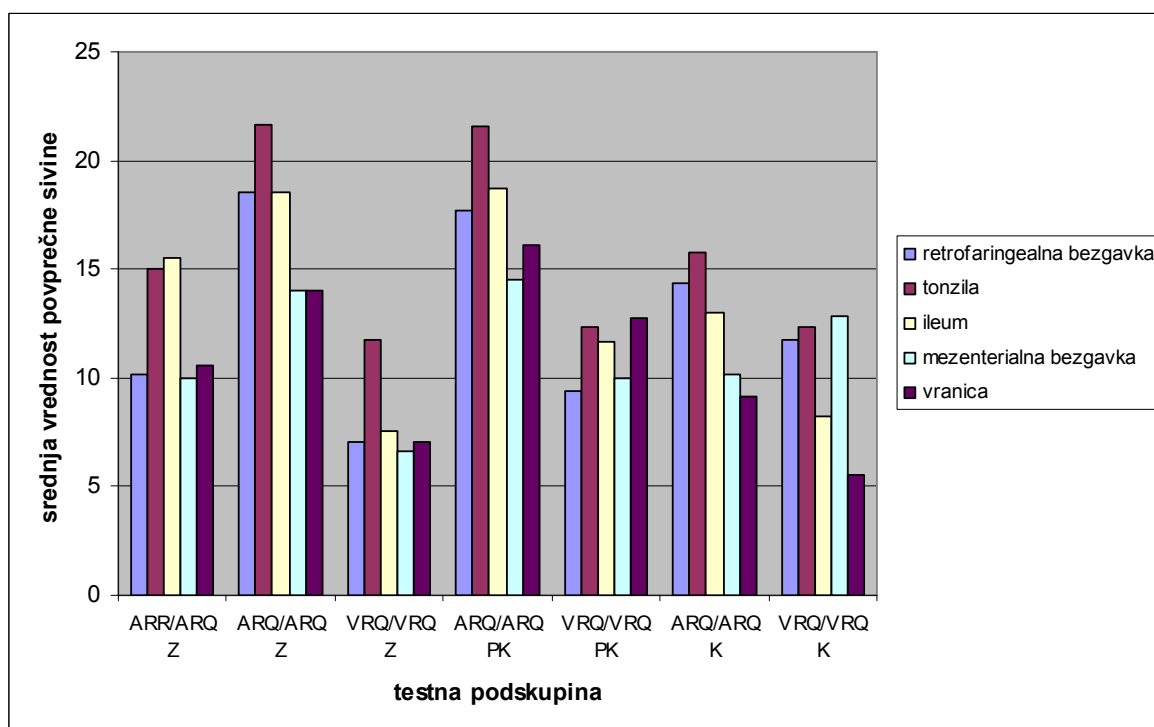
Vrednosti povprečnih svin so bile pri genotipu ARR/ARQ manjše kot pri genotipu ARQ/ARQ, vendar je bila razlika statistično značilna le v mezenterialni bezgavki ($P < 0,05$).

V predklinični fazi bolezni so bile vrednosti povprečnih sivin pri genotipu ARQ/ARQ še vedno višje kot pri genotipu VRQ/VRQ, razlika je bila statistično značilna v tonzili, retrofaringealni in mezenterialni bezgavki ter vranici ($P < 0,05$).

Vrednosti povprečnih sivin pri ovcah genotipa ARQ/ARQ so bile v klinični fazi nekoliko višje kot pri genotipu VRQ/VRQ, vendar razlike niso bile statistično potrjene ($P > 0,05$).

Pri ovcah genotipa VRQ/VRQ v klinični in predklinični fazi bolezni smo večinoma izmerili višje vrednosti povprečnih sivin kot pri zdravih ovcah. Statistično značilno pomembno višje vrednosti smo potrdili v retrofaringealnih in mezenterialnih bezgavkah ovc v klinični fazi ter v vranici in ileumu ovc v predklinični fazi v primerjavi z zdravimi ovcami ($P < 0,05$).

Pri ovcah genotipa ARQ/ARQ v predklinični fazi bolezni in pri zdravih ovcah smo izmerili podobne vrednosti povprečnih sivin. Pri primerjavi ovc v klinični fazi bolezni pa so bile vrednosti povprečnih sivin nižje kot pri zdravih ovcah in ovcah v predklinični fazi. Statistično značilno nižje vrednosti povprečnih sivin smo dokazali v mezenterialni bezgavki, tonzili in vranici ovc v klinični fazi v primerjavi z zdravimi ovcami ter v tonzili in vranici ovc v klinični fazi v primerjavi z ovcami v predklinični fazi ($P < 0,05$) (Graf 7).



Graf 7

Primerjava srednjih vrednosti povprečnih svin imunohistokemične reakcije za FDC v germinativnih središčih limfatičnih foliklov v limfatičnih organih ovc testnih podskupin. Legenda: oznaka testne podskupine – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ, ARQ/ARQ, VRQ/VRQ) in faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava).

Tabela 34

Rezultati meritev povprečnih sivin imunohistokemične reakcije za FDC v germinativnih središč limfatičnih organov ovc genotipa VRQ/VRQ. Vzorci v katerih so manjkale Peyerjeve plošče so označeni z znakom *

Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
1	VRQ/VRQ K1	11,90892	11,50012	8,23236	7,66584	17,66646
2	VRQ/VRQ K2	9,64108	14,84424	6,48124	14,59383	5,07637
3	VRQ/VRQ K3	12,13127	10,53098	5,57388	17,36375	3,74023
4	VRQ/VRQ K4	14,30004	20,11179	18,74601	14,04547	2,95262
5	VRQ/VRQ K5	10,03947	10,52652	*	11,56920	14,89217
6	VRQ/VRQ K6	11,56736	13,20384	9,85419	11,28633	6,01161
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ K		11,73814	12,35198	8,23236	12,80734	5,54399
7	VRQ/VRQ PK1	12,15069	12,20935	11,23333	12,02920	14,25250
8	VRQ/VRQ PK2	7,44875	17,89667	12,04389	11,95048	13,10350
9	VRQ/VRQ PK3	9,68864	11,60500	8,70000	8,32524	12,36273
10	VRQ/VRQ PK4	9,04700	14,19875	13,38500	5,98824	9,42053
11	VRQ/VRQ PK5	7,61227	12,06208	*	4,25150	14,76636
12	VRQ/VRQ PK6	10,83889	12,46179	*	11,69533	5,96895
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ PK		9,36782	12,33557	11,63861	10,01029	12,73312
13	VRQ/VRQ Z1	5,76278	16,24278	9,19538	5,34750	7,25850
14	VRQ/VRQ Z2	7,77450	12,28424	7,63333	9,84500	10,37000
14	VRQ/VRQ Z3	6,30500	11,20250	*	6,22250	3,04286
16	VRQ/VRQ Z4	7,07955	10,00200	6,61571	5,72944	4,98091
17	VRQ/VRQ Z5	16,74207	12,56576	7,50500	6,98263	6,88846
18	VRQ/VRQ Z6	7,08438	11,19458	*	8,71150	10,90250
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ Z		7,08197	11,74337	7,56917	6,60257	7,07348

Tabela 35

Rezultati meritev povprečnih svin imunohistokemične reakcije za FDC v germinativnih središčih limfatičnih organov ovc genotipa ARQ/ARQ. Vzorec v katerem so manjkale Peyerjeve plošče je označen z znakom *

Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARQ/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
19	ARQ/ARQ K1	10,43114	14,64100	16,47806	10,69226	8,90587
20	ARQ/ARQ K2	15,57819	16,01027	11,62536	15,63458	11,18115
21	ARQ/ARQ K3	17,69837	20,17167	18,33274	10,98313	14,66108
22	ARQ/ARQ K4	13,07234	15,47671	14,44690	9,15293	8,66926
23	ARQ/ARQ K5	11,89271	10,24555	7,50567	9,58204	9,35261
24	ARQ/ARQ K6	18,21682	21,48435	10,38938	9,51676	6,55758
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ K		14,32527	15,74349	13,03613	10,13715	9,12924
25	ARQ/ARQ PK1	16,40348	15,60224	*	16,70583	14,44526
26	ARQ/ARQ PK2	19,59577	27,20000	21,71143	29,12269	22,65700
27	ARQ/ARQ PK3	17,78700	26,49219	21,46900	11,28286	18,83850
28	ARQ/ARQ PK4	17,72850	22,63226	18,74833	17,50667	14,58900
29	ARQ/ARQ PK5	14,66652	20,41419	12,88833	12,25095	12,25500
30	ARQ/ARQ PK6	17,6037037	17,20333	11,58273	9,32526	17,55400
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ PK		17,66610	21,52323	18,74833	14,47839	16,07150
31	ARQ/ARQ Z1	12,55381	22,33794	17,40200	12,12650	12,73714
32	ARQ/ARQ Z2	20,14348	24,53681	22,50900	15,22783	18,23150
33	ARQ/ARQ Z3	19,11048	17,51919	22,98857	21,19318	11,23182
34	ARQ/ARQ Z4	18,62348	20,89750	19,69833	15,36250	12,39571
35	ARQ/ARQ Z5	18,44900	27,47174	9,92182	12,80150	15,31700
36	ARQ/ARQ Z6	15,07591	18,95387	13,77286	11,58727	19,63250
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ Z		18,53624	21,61772	18,55017	14,01467	14,02707

Tabela 36

Rezultati meritev povprečnih sivin imunohistokemične reakcije za FDC v germinativnih središčih limfatičnih organov ovc genotipa ARR/ARQ. Vzorci v katerih so manjkale Peyerjeve plošče so označeni z znakom *
 Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce - oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ), faze bolezni (Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	retrof. bezgavka	tonzile	ileum	mez. bezgavke	vranica
37	ARR/ARQ Z1	13,38048	11,13238	16,88500	11,85333	10,09100
38	ARR/ARQ Z2	9,65200	14,61045	14,20286	9,85300	19,17000
39	ARR/ARQ Z3	8,65000	8,52263	*	9,65265	2,43667
40	ARR/ARQ Z4	10,69188	25,37971	*	8,50650	19,97000
41	ARR/ARQ Z5	21,51381	15,63652	*	11,90100	11,03800
42	ARR/ARQ Z6	6,58800	15,46450	*	10,18923	5,41167
MEDIANA podskupine ARR/ARQ Z		10,17194	15,03748	15,54393	10,02112	10,56450

5.10.6 Rezultati štetja limfocitov B in T v področju obeksa

5.10.6.1 Število limfocitov T v obeksu

Število limfocitov T smo določili s štetjem limfocitov T v področju DNVN in olivarnih jeder. V skupini zdravih ovc genotipa VRQ/VRQ je bila srednja vrednost 0,68 limfocita T na vidno polje, pri genotipu ARQ/ARQ 0,48 in pri genotipu ARR/ARQ 0,63 limfocita T na vidno polje.

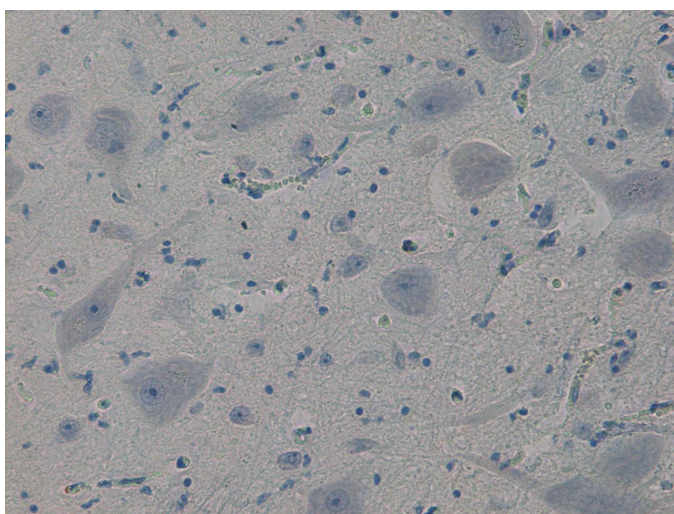
V skupini ovc s predkliničnim praskavcem je bilo povprečno število limfocitov T podobno kot pri zdravih ovcah brez praskavca. Srednja vrednost je bila pri ovcah genotipa VRQ/VRQ 0,60 limfocita T na vidno polje in pri genotipu ARQ/ARQ 0,53 limfocita T na vidno polje.

Srednja vrednost za število limfocitov T v obeksih ovc s kliničnim praskavcem je bila višja kot pri zdravih ovcah in ovcah v predklinični fazi bolezni: pri genotipu VRQ/VRQ je bila 5,60 limfocita T na vidno polje, pri genotipu ARQ/ARQ pa 4,53 limfocita T na vidno polje (Tabeli 37 in 38. Sliki 12 in 13).

Statistična analiza ni pokazala značilno pomembnih razlik v številu limfocitov T pri zdravih ovcah različnih genotipov ($P > 0,05$). Prav tako nismo ugotovili statistično značilne razlike v številu limfocitov T pri ovcah različnih genotipov v predklinični fazi bolezni ($P > 0,05$).

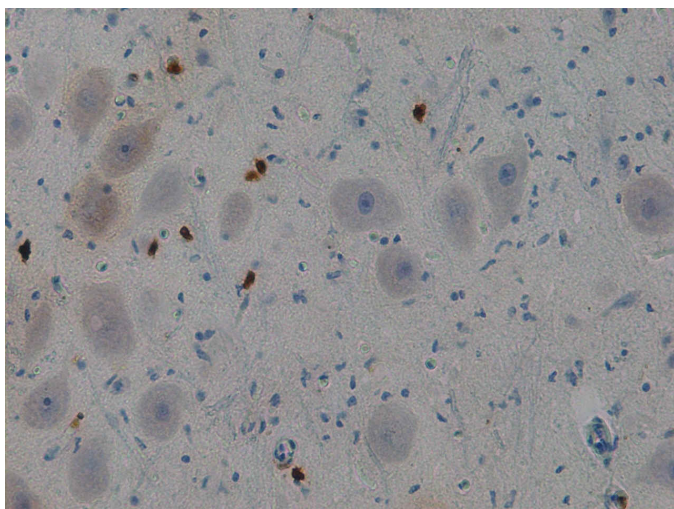
Povprečno število limfocitov T je bilo v obeksih ovc v klinični fazi bolezni statistično značilno višje kot pri zdravih ovcah in ovcah v predklinični fazi bolezni ($P < 0,05$). Pri ovcah v klinični fazi bolezni nismo dokazali statistično značilne razlike v številu limfocitov T med genotipoma VRQ/VRQ in ARQ/ARQ ($P > 0,05$).

Število limfocitov T v obeksu je bilo v pozitivni korelaciji s stopnjo spongiformnih sprememb ($\rho = 0,7493$, $P < 0,001$) in jakostjo imunohistokemične reakcije na prione v obeksu ($\rho = 0,6571$, $P < 0,001$) (Graf 8).



Slika 12

Obeks, ovca z oznako ARQ/ARQ PK5. V nevropilu DNVN ovce v predklinični fazi ni limfocitov T. Imunohistokemično barvanje s poliklonskim protitelesom proti človeškemu CD3 (DAKO), kontrastirano s hematokislinom, x 200



Slika 13

Obeks, ovca z oznako VRQ/VRQ K5. Številni limfociti T v nevropilu DNVN. Imunohistokemično barvanje s poliklonskim protitelesom proti človeškemu CD3 (DAKO), kontrastirano s hematokislinom, x 200

5.10.6.2 Število limfocitov B v obeksu

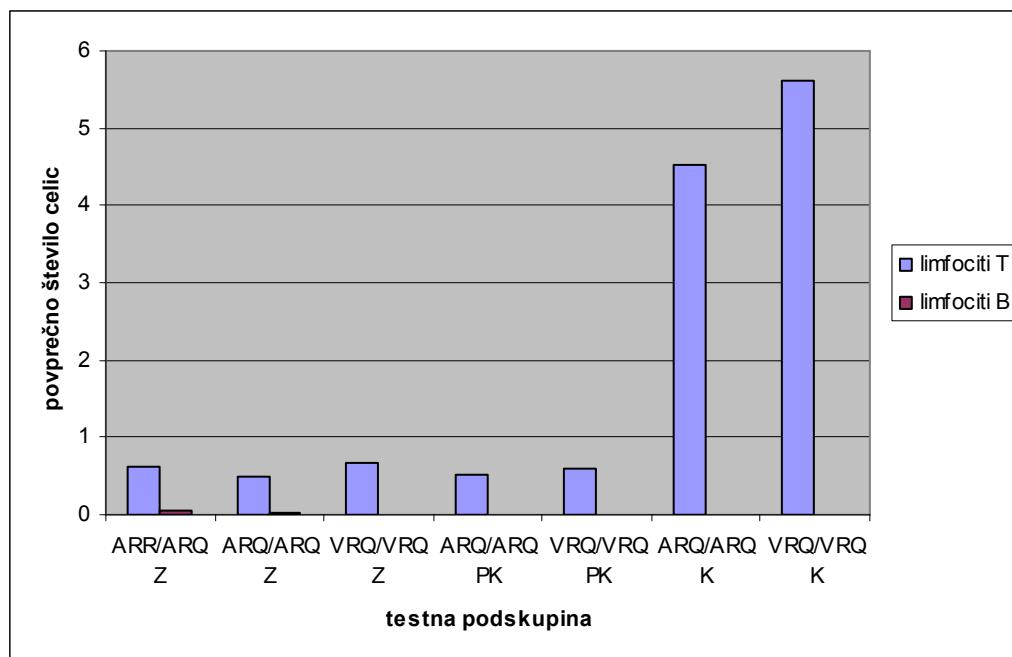
Število limfocitov B smo določili s štetjem limfocitov B v področju DNVN in olivarnih jeder. Število limfocitov B je bilo pri vseh skupinah in podskupinah nizko: pri zdravih ovcah genotipa ARQ/ARQ in genotipu ARR/ARQ je bila srednja vrednost 0,05 limfocita B na vidno polje, pri ovcah genotipa VRQ/VRQ v parenhimu obeksa nismo našli limfocitov B.

Pri ovcah v klinični in predklinični fazi praskavca so bile srednje vrednosti pri genotipu VRQ/VRQ in ARQ/ARQ 0,00 limfocita B na vidno polje.

Pri ovcah genotipu VRQ/VRQ s kliničnim praskavcem smo v obeksu našli 0,05 limfocita B na vidno polje in pri genotipu ARQ/ARQ 0,04 limfocita B na vidno polje (Tabeli 37 in 38).

S statistično analizo smo ugotovili, da ni značilno pomembnih razlik v številu limfocitov B v obeksu zdravih ovc različnih genotipov ($P > 0,05$).

Prav tako statistična analiza ni pokazala statistično značilnih razlik v številu limfocitov B pri primerjavi ovc različnih genotipov v predklinični fazi in ovc različnih genotipov v klinični fazi praskavca ($P > 0,05$) (Graf 8).



Graf 8

Primerjava povprečnega števila limfocitov T in B na vidno polje 200-kratne povečave v obeksih ovc testnih podskupin. Legenda: oznaka testne podskupine – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ, ARQ/ARQ, VRQ/VRQ) in faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava).

Tabela 37

Povprečno število limfocitov T in B na vidno polje v obeksih ovc genotipa VRQ/VRQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (VRQ/VRQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	povprečno število limfocitov T/ vidno polje	povprečno število limfocitov B/ vidno polje
1	VRQ/VRQ K1	6,00	0,00
2	VRQ/VRQ K2	5,20	0,00
3	VRQ/VRQ K3	6,00	0,00
4	VRQ/VRQ K4	1,55	0,05
5	VRQ/VRQ K5	10,40	0,25
6	VRQ/VRQ K6	4,80	0,00
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ K		5,60	0,00
7	VRQ/VRQ PK1	0,55	0,05
8	VRQ/VRQ PK2	0,65	0,00
9	VRQ/VRQ PK3	0,25	0,00
10	VRQ/VRQ PK4	1,60	0,00
11	VRQ/VRQ PK5	0,70	0,00
12	VRQ/VRQ PK6	0,40	0,00
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ PK		0,60	0,00
13	VRQ/VRQ Z1	0,60	0,00
14	VRQ/VRQ Z2	1,10	0,00
15	VRQ/VRQ Z3	0,35	0,00
16	VRQ/VRQ Z4	1,15	0,00
17	VRQ/VRQ Z5	0,75	0,00
18	VRQ/VRQ Z6	0,35	0,00
MEDIANA podskupine VRQ/VRQ Z		0,68	0,00

Tabela 38

Povprečno število limfocitov T in B na vidno polje v obeksih ovc genotipa ARQ/ARQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARQ/ARQ), faze bolezni (K – klinična faza, PK – zgodnja, predklinična faza in Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	povprečno število limfocitov T/ vidno polje	povprečno število limfocitov B/ vidno polje
19	ARQ/ARQ K1	8,20	0,00
20	ARQ/ARQ K2	5,75	0,05
21	ARQ/ARQ K3	5,00	0,00
22	ARQ/ARQ K4	3,75	0,20
23	ARQ/ARQ K5	4,05	0,00
24	ARQ/ARQ K6	1,20	0,00
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ K		4,53	0,00
25	ARQ/ARQ PK1	0,65	0,00
26	ARQ/ARQ PK2	0,35	0,00
27	ARQ/ARQ PK3	0,65	0,00
28	ARQ/ARQ PK4	0,50	0,05
29	ARQ/ARQ PK5	0,55	0,00
30	ARQ/ARQ PK6	0,40	0,05
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ PK		0,53	0,00
31	ARQ/ARQ Z1	0,45	0,00
32	ARQ/ARQ Z2	0,75	0,05
33	ARQ/ARQ Z3	0,25	0,20
34	ARQ/ARQ Z4	0,40	0,00
35	ARQ/ARQ Z5	0,75	0,00
36	ARQ/ARQ Z6	0,50	0,05
MEDIANA podskupine ARQ/ARQ Z		0,48	0,03

Tabela 39

Povprečno število limfocitov T in B v obeksih zdravih ovc genotipa ARR/ARQ. Legenda: zap. št. – zaporedna številka ovce v raziskavi, oznaka ovce – oznaka sestavljena iz genotipa (ARR/ARQ), faze bolezni (Z – zdrava) in zaporedne številke znotraj podskupine (od 1 do 6).

zap. št.	oznaka ovce	povprečno število limfocitov T/ vidno polje	povprečno število limfocitov B/ vidno polje
37	ARR/ARQ Z1	0,70	0,00
38	ARR/ARQ Z2	0,55	0,05
39	ARR/ARQ Z3	0,30	0,10
40	ARR/ARQ Z4	0,20	0,10
41	ARR/ARQ Z5	2,45	0,05
42	ARR/ARQ Z6	2,90	0,00
MEDIANA podskupine ARR/ARQ Z		0,63	0,05

6 DISKUSIJA

Dovzetnost za praskavec in njegova patogeneza sta močno odvisni od genotipa PrP. Glavni polimorfizmi gena *PRNP* so na kodonih 136, 154 in 171, zato je možnih 15 kombinacij genotipa, ki so na dovzetnost za praskavec razdeljene na pet skupin (DEFRA, 2003).

Odkar je prepoznana povezava med PrP genotipom in dovzetnostjo za praskavec, je bilo narejenih zelo veliko raziskav, vendar še vedno ni jasno, zakaj so različni genotipi ovc različno dovzetni za praskavec in zakaj povzročitelj praskavca v ovcah z različnimi genotipi napreduje različno hitro. Eden od faktorjev, ki verjetno vpliva na razvoj bolezni, je število celic, ki izražajo PrP^C in količina PrP^C, ki ga te celice izražajo. Količina PrP^C na krvnih celicah ovc zelo dovzetnega genotipa VRQ/VRQ je značilno pomembno višja kot pri genotipu ARR/ARR (Halliday in sod., 2005). Tudi število CD4⁺, CD8⁺ in CD14⁺ celic je večje v krvi ovc, ki so bolj dovzetne za praskavec (Eaton in sod., 2007). Dokazano je bilo tudi, da se po inokulaciji homogenizata možganov ovce s praskavcem v črevesno zanko pri ovcah različnih genotipov prioni pojavijo v mezgovnicah črevesnih resic in podsluznice na enak način ter v enaki količini, kar kaže, da genotip ne vpliva na transport prionov iz črevesne svetline v sluznico in črevesne bezgavke (Jeffrey in sod., 2006 b). *In vitro* je bilo ugotovljeno, da se pri ovcah z dovzetnim genotipom PrP^C bolj uspešno pretvarja v PrP^{Sc} kot pri ovcah odpornih genotipov (Bossers in sod., 1997).

Prva od naših hipotez je bila, da genotip ovc vpliva na sestavo limfatičnih organov in tako posredno prispeva k dovzetnosti za okužbo ter hitrosti širjenja povzročitelja po organizmu. To vprašanje pa ni zanimivo samo z vidika patogeneze praskavca, ampak tudi z vidika posledic, ki jo lahko ima selekcija ovc, ki poteka v okviru programov za izkoreninjanje praskavca (Direktiva Komisije 2003/100/ES). Selekcija na večjo zastopanost alela ARR ima lahko tudi negativne posledice, vodi v zmanjšanje selekcijskega pritiska na druge pomembne proizvodne lastnosti in poveča dovzetnost za druge bolezni (Sweeney in Hanrahan, 2008). V bližini gena *PRNP* so pri ovcah (Castiglioni in sod., 1998) številni geni, ki sodelujejo pri signalni transdukciji citokina interlevkina-2 (IL-2), apoptozi, fagocitozi in vplivajo na delovanje monocitov, makrofagov ter limfocitov T (Sweeney in Hanrahan, 2008). Povezave med genotipom in temi imunskimi lastnostmi še niso raziskane.

V raziskavi smo ugotovili, da obstajajo razlike v sestavi limfatičnih organov zdravih ovc različno dovzetnih genotipov. Število limfocitov T in B ter FDC je v germinativnih središčih limfatičnih organov zdravih ovc, starih med 18 meseci in tremi leti, pri genotipu ARQ/ARQ, ki je razvrščen v NSP 3, značilno pomembno večje kot pri približno enako starih ovcah genotipa VRQ/VRQ, ki so zelo dovzetne (NSP 5) ($P < 0,05$). Pri genotipu ARR/ARQ so bile vrednosti nižje kot pri genotipu ARQ/ARQ, statistično značilne razlike smo potrdili le pri mezenterialnih bezgavkah ($P < 0,05$).

V literaturi zaenkrat nismo našli podatkov o celični sestavi limfatičnih organov zdravih ovc različnih genotipov. Naše rezultate v nekaterih elementih lahko deloma primerjamo le s podatki, ki jih Eaton in sodelavci navajajo za bezgavke ovc, starih eno leto, ki so bile v njihovi raziskavi vključene v kontrolno skupino (Eaton in sod., 2007). Ti so v bezgavkah ovc z zelo slabo dovzetnim genotipom ARR/ARR ugotovili večje število limfocitov T $CD4^+$ kot pri ovcah z srednje dovzetnim, ARQ/ARQ genotipom. Število limfocitov T $CD8^+$ se v bezgavkah različno dovzetnih ovc ni razlikovalo (Eaton in sod., 2007). Isti avtorji so označili tudi $CD21^+$ celice, vendar ne navajajo razlik v številu teh celic med različno dovzetnima genotipoma (Eaton in sod., 2007). $CD21$ je molekula, izražena na membrani zrelih limfocitih B in FDC, ki deluje kot receptor za komponento komplemента C3d pri aktivaciji komplemента (Carroll, 1998; Gonzalez in sod., 2001; Herrmann in sod., 2003).

Pri slabo dovzetnem genotipu smo ugotovili nizko število limfatičnih celic, vendar menimo, da zaradi višje starosti ovc genotipa ARR/ARQ, rezultatov te skupine ne moremo popolnoma realno primerjati z ostalima dvema genotipoma. V to skupino smo vključili tri ovce, starejše od štirih let, ker med žrtvovanimi ovcah nismo našli živali ustrezne starosti, vzorci limfatičnih organov, ki smo jih odvzeli pri poginulih ovcah pa zaradi posmrtnih sprememb niso bili primerni za imunohistokemično označevanje limfatičnih celic in morfometrično preiskavo. Opisano je, da se med staranjem pri ljudeh pojavijo spremembe v številu germinativnih središč, številu celic v limfatičnih organih in periferni krvi, njihovem razmerju in v odzivnosti (Yamanaka in sod., 1992; Ferguson in sod., 1995; Hawkley in Cacioppo, 2004). V literaturi ni primerljivih podatkov glede sprememb limfatičnega sistema pri ovcah.

Zaključimo lahko, da obstajajo značilne razlike v celični sestavi germinativnih središč limfatičnih organov zdravih ovc različnih genotipov in je število imunskih celic v germinativnih središčih ovc zelo dovzetnega genotipa znatno manjše kot pri ovcah srednje dovzetnega genotipa. Ob upoštevanju manjšega števila limfocitov B in T ter FDC pri

genotipu, ki je zelo dovzeten za praskavec, in dejstvu, da naj bi FDC igrale pomembno vlogo pri replikaciji povzročitelja praskavca (Brown in sod., 1999; Nuvolone in sod., 2009) ter ob upoštevanju sprememb, ki smo jih ugotovili pri okuženih ovcah, menimo, da sama sestava limfatičnih organov verjetno ni tako odločilna za dovzetnost za bolezen, ampak je pomembna predvsem sposobnost oziroma oblika odziva teh organov na okužbo s prioni.

V drugi hipotezi smo proučevali, ali okužba s povzročiteljem praskavca v limfatičnih organih ovc povzroči spremembe in ali so te spremembe povezane z genotipom. Raziskav o spremembah limfatičnih organov mišk in ovc po okužbi s praskavcem je le nekaj, verjetno zato, ker je dolgo časa veljalo prepričanje, da prioni ne izzovejo imunskega odgovora (Stoltze in sod., 2003).

Ugotovili smo, da se pri ovcah, naravno okuženih s praskavcem, pojavijo spremembe celične sestave limfatičnih organov, in da so te odvisne od faze bolezni ter od genotipa.

Pri ovcah zelo dovzetnega genotipa VRQ/VRQ smo dokazali, da se pri praskavcu povečata arealna in numerična gostota profilov germinativnih središč ter število limfocitov B in T ter aktivirajo FDC v germinativnih središčih. Podobne spremembe glede števila profilov germinativnih središč, števila limfocitov B in aktivacije FDC, so pri miškah opisali McGovern in sodelavci (2004). V vranici mišk, ki so jih eksperimentalno okužili s sevom praskavca ME7, so ugotovili povečano število germinativnih središč, kar ustreza našemu podatku o povečani numerični gostoti germinativnih središč. Poleg tega so opisali hipertrofijo in razvejičenje podaljškov FDC ter povečano dozorevanje in število limfocitov B (McGovern in sod., 2004). McGovern in Jeffrey (2007) sta kasneje opisala podobne ultrastrukturne spremembe tudi v tonzilah in podčeljustnih bezgavkah ovc, naravno okuženih s praskavcem. Za razliko od navedenih avtorjev, ki so spremembe opisali pri ovcah s kliničnimi znaki praskavca, smo v naši raziskavi statistično značilne spremembe arealne gostote germinativnih središč in aktivacije FDC v mezenterialni bezgavki ugotovili tudi že pri ovcah v predklinični fazi bolezni.

Spremembe v sestavi bezgavke ovc v predklinični fazi praskavca, 14 dni po eksperimentalni okužbi, so opisali le Eaton in sodelavci (2007). V raziskavi so ugotovili povečano število CD21⁺ celic, ki predstavljajo populacijo limfocitov B (Eaton in sod., 2007). Nekoliko višje število limfocitov B smo v predklinični fazi bolezni ugotovili tudi sami, vendar razlika ni bila statistično značilna ($P < 0,05$).

V limfatičnih organih ovc zelo dovzetnega genotipa VRQ/VRQ v klinični fazi bolezni smo ugotovili tudi povečanje števila limfocitov T. V nasprotju z našimi ugotovitvami Eaton in sodelavci (2007) niso ugotovili razlik v številu limfocitov T CD4⁺ pri dovzetnih ovcah, pri najbolj odpornih ovcah pa se je število teh celic po eksperimentalni okužbi statistično značilno povečalo. McGovern in sodelavci (2004 in 2007) prav tako ne navajajo sprememb glede števila limfocitov T v limfatičnih organih mišk ter ovc s praskavcem. Segundo in sodelavci (2008) pa so v limfatičnih organih mišk, ki so jih okužili s homogenizatom možganov goveda okuženega z BSE, opisali značilno pomembno povečanje števila limfocitov T CD4⁺ in zmanjšanje števila limfocitov T CD8⁺.

Na osnovi naših rezultatov lahko sklepamo, da se v limfatičnih organih ovc s praskavcem, ki so zelo dovzetnega genotipa za to bolezen, pojavi imunski odziv, pri katerem sodelujejo limfociti B in T ter FDC. Rezultati raziskave kažejo, da se nekateri elementi imunskega odziva pojavijo že v predklinični fazi, do izraza pa pridejo v klinični fazi bolezni.

Limfociti B naj bi imeli v patogenezi TSE pomembno vlogo, ker izločajo citokine, kot sta TNF- α in limfotoksin $\alpha_1\beta_2$, ki sodelujeta pri dozorevanju FDC v germinativnih središčih limfatičnih organov (Chaplin in Fu, 1998; Fu in sod., 1998). Povečanje števila limfocitov B lahko vpliva na aktivacijo FDC in pospeši kopičenje prionov (Maignien in sod., 1999).

V nasprotju z našimi zaključki in ugotovitvami prej omenjenih avtorjev raziskav na limfatičnih organih ovc (Eaton in sod., 2007; McGovern in sod., 2007), avtorji nam edine še znane raziskave o zgradbi germinativnih središč limfatičnih organov pri ovcah v klinični fazi praskavca v njih niso ugotovili sprememb (Davies in sod., 2004). Po njihovem mnenju je bila vzrok (pre)majhna količina PrP^{Sc} v teh limfatičnih organih.

Pri ovcah genotipa ARQ/ARQ, okuženih s praskavcem, smo prav tako ugotovili spremembe celične sestave germinativnih središč, vendar so se te razlikovale od tistih pri ovcah genotipa VRQ/VRQ. Pri genotipu ARQ/ARQ smo v predklinični fazi bolezni ugotovili manjše število limfocitov B in T v primerjavi z zdravimi ovcami, razlike so bile statistično značilne pri limfocitih B v bezgavkah, tonzili ter vranici ($P < 0,05$). Omenjene spremembe lahko interpretiramo tudi kot supresijo imunskega celičnega odziva. V predklinični fazi bolezni je bila arealna gostota germinativnih središč in aktivacija FDC še primerljiva z zdravimi ovcami. V klinični fazi bolezni pa smo pri teh ovcah ugotovili, da se je zmanjšala tudi aktivacija FDC in arealna površina germinativnih središč.

Če povečanje števila limfocitov B vpliva na aktivacijo FDC in pospeši kopičenje prionov (Maignien in sod., 1999), je verjetno možno tudi obratno delovanje, da zmanjšanje števila celic vpliva na zmanjšano aktivacijo FDC ter zmanjšano kopičenje prionov. Zmanjšano število limfocitov B in T, ki smo ga zaznali v predklinični fazi bolezni pri ovcah genotipa ARQ/ARQ, je verjetno vplivalo na zmanjšano aktivacijo FDC in zmanjšanje površine germinativnih središč v klinični fazi bolezni. Tudi jakost imunohistokemične reakcije na prione je bila pri tem genotipu v predklinični fazi manjša kot pri genotipu VRQ/VRQ.

Pri ovcah genotipa ARQ/ARQ smo v klinični fazi bolezni ugotovili povečanje števila limfocitov B in T v primerjavi s predklinično skupino ter povečanje števila limfocitov T v primerjavi z zdravimi ovci, kar kaže na to, da je v germinativnih središčih verjetno v tej fazi potekala aktivacija teh celic. Odziv lahko primerjamo z odzivom, ki smo ga opazili tudi pri genotipu VRQ/VRQ, kjer pa je bil podoben odziv v nekaterih elementih opazen že v predklinični fazi bolezni. Na osnovi tega lahko ugibamo, ali je morda za aktivacijo limfocitov potrebna določena kritična masa prionov v germinativnih središčih.

Na osnovi naših rezultatov lahko sklepamo, da se v limfatičnih organih ovc srednje dovzetnega PrP genotipa v predklinični fazi pojavi prehodna supresija imunskega celičnega odziva, ki ji kasneje v klinični fazi sledi aktivacija limfocitov B in T.

Žal v raziskavi nismo mogli oceniti tudi števila makrofagov v limfatičnih organih in ali se njihovo število v spremeni pri ovcah okuženih s praskavcem. Testirali smo kar pet protiteles, ki so usmerjena proti različnim antigenom: lizocimu, CD14, mieloično histiocitnemu antigenu, alfa 1-tripsinu in CD68, in ki, se v humani medicini uporabljajo za označevanje makrofagov. Z nobenim od testiranih protiteles nismo ugotovili specifične imunohistokemične reakcije, zato smo zaključili, da niso uporabna za imunohistokemično označevanje makrofagov v ovčjih tkivih, fiksiranih v parafinu in zalitih v parafin. Podobne težave pri imunohistokemičnem označevanju makrofagov so opisali tudi Andreoletti in sodelavci, ki so testirali osem protiteles za označevanje makrofagov, vendar so izredno šibko pozitivno reakcijo in v manjšem številu celic ugotovili le z dvema protitelesoma, monoklonskim protitelesom proti človeškemu CD68 (Serotec), ki ga ni več na tržišču, in z monoklonskim protitelesom proti človeškemu lizocimu (DAKO) (Andreoletti in sod., 2002 a). Vzroke za nereaktivnost testiranih protiteles za označevanje makrofagov lahko iščemo bodisi v razlikah med človeškimi in ovčjimi antigeni bodisi v fiksaciji in vklopu v parafin.

Ob testiranju smo opazili tudi zanimiv pojav, da je bila imunohistokemična reakcija s protitelesom za označevanje FDC močnejša v tkivih, obdelanih z mravljično kislino. Na splošno velja, da obdelava z mravljično kislino slabo vpliva na ohranitev celičnih antigenov in jakost imunohistokemične reakcije (Andreoletti in sod., 2002). Pozitivni učinki obdelave tkiv z mravljično kislino v kombinaciji z vlažnim avtoklaviranjem so znani pri imunohistokemičnem označevanju prionov, kjer taka predobdelava hkrati zmanjša kužnost tkiva in razkrije epitope ter tako poveča količino reakcijskega produkta pri imunohistokemični reakciji (Miller in sod., 1993; Haritani in sod., 1994). V literaturi nismo našli podatka o pozitivnem vplivu obdelave ovčjega tkiva z mravljično kislino na jakost imunohistokemične reakcije s protitelesom S-100, smo pa našli navedbe o večji jakosti imunohistokemične reakcije pri označevanju makrofagov in mikroglija celic po obdelavi tkiv z mravljično kislino (Mühleisen in sod., 1995; Andreoletti in sod., 2002 a).

Zaključimo lahko, da se po okužbi s povzročiteljem praskavca v limfatičnih organih pri ovcah pojavi celični imunski odziv in da se ta odziv razlikuje pri različnih genotipih PrP. Možno je, da je razlika v celičnem imunskem odzivu v limfatičnih organih eden od razlogov za razlike v patogenezi praskavca med obema genotipoma.

V okviru tretje hipoteze smo proučevali infiltrate limfocitov B in T v parenhimu možganov. Dolgo je veljalo mnenje, da okužba s povzročiteljem praskavca v možganih ne sproži imunskega odziva (Berg, 1994; Aucouturier in Carnaud, 2002), potem pa so Betmouni in sodelavci (1996) ter Lewicki in sodelavci (2003) opisali infiltrate limfocitov T v možganih mišk, ki so jih intracerebralno, intraperitonealno in peroralno okužili s praskavcem in bolnikov s sCJB.

Tako kot smo predvidevali, smo v možganih ovc s praskavcem ugotovili infiltrate limfocitov T. Povečano število limfocitov T smo ugotovili šele v pozni, klinični fazi bolezni. Nasprotno pa so prej navedeni avtorji infiltrate limfocitov T ugotovili že osem tednov (Betmouni in sod., 1996) oziroma 12 tednov (Lewicki in sod., 2003) po eksperimentalni okužbi, kar je veliko pred pojavom kliničnih znakov (Betmouni in sod., 1996; Lewicki in sod., 2003). Razliko v času pojavljanja infiltratov limfocitov T med podatki drugih avtorjev in našimi ugotovitvami lahko pripišemo različnim sevom povzročitelja praskavca in razlikam v patogenezi praskavca med živalskimi vrstami. V prid prvi možnosti govori podatek, da sta bili obe prej omenjeni raziskavi izvedeni na miškah, uporabljena pa sta bila sev praskavca RML Chandler (Betmouni

in sod., 1996) in sev ME7 (Lewicki in sod., 2003), med pojavljanjem infiltratov limfocitov T pa je bilo štiri tedne razlike. V prid drugi možnosti, da je čas pojavljanja povezan z živalsko vrsto, pa govori primerjava patogeneze praskavca in z njim povezanih patomorfoloških sprememb pri teh dveh živalskih vrstah. Okužba s povzročiteljem praskavca pri miškah izzove močno reakcijo mikroglija celic in astrocitov (Williams in sod., 1994). Infiltrate limfocitov T so ugotovili približno v istem času, kot se je pojavila aktivacija mikroglija celic (Betmouni in sod., 1996). Pri praskavcu ovc prevladuje reakcija astrocitov, ki proliferirajo kot odgovor na poškodbo in propad nevronov. Reakcija mikroglije je pri praskavcu ovc manj izrazita (Georgsson in sod., 1993; Lefrancois in sod., 1994).

V infiltratih so po navedbah avtorjev prevladovali limfociti T $CD8^+$, teh je bilo kar 92 % (Betmouni in sod., 1996). V naši raziskavi smo za označevanje limfocitov T uporabili protitelo proti CD3 antigenu, protiteles proti limfocitov T $CD4^+$ in $CD8^+$ namreč nismo mogli uporabiti, ker delujejo samo na kriostatskih tkivnih rezinah ovc (Andreoletti in sod., 2002), zato nismo mogli oceniti razmerja med podskupinami limfocitov T, kar bi nam omogočalo sklepati o vlogi teh celic.

Število limfocitov T v možganih ovc genotipa VRQ/VRQ v klinični fazi bolezni je bilo nekoliko višje kot pri genotipu ARQ/ARQ, vendar statistična analiza ni pokazala značilnih razlik ($P > 0,05$). S Spearmanovo korelacijo smo dokazali, da sta ocena imunohistokemične reakcije na prione in ocena spongiformnih sprememb ter število limfocitov T v močni pozitivni korelaciji ($P < 0,001$).

Statistična analiza ni pokazala značilnih razlik v številu limfocitov T med zdravimi ovcami različnih genotipov ($P > 0,05$). Zanimiv je podatek, da smo relativno veliko število limfocitov T našli v možganih zdravih ovc slabo dovzetnega genotipa ARR/ARQ. K takemu rezultatu sta velik delež prispevala rezultata dveh ovc, starejših od štirih let, pri katerih smo v povprečju našli 2,45 in 2,90 limfocita T na vidno polje. Glede na to, da pri teh ovcah nismo ugotovili vnetnega procesa v možganih, infiltrate teh celic pojasnujemo s starostjo živali. Znano je, da se v imunskem sistemu med staranjem dogajajo spremembe v številu limfatičnih celic, nastanku in sproščanju citokinov (Hawkley in Cacioppo, 2004). V nasprotju z limfatičnim sistemom, kjer z leti pride do zmanjšanja imunskega odziva, se imunsko sposobne celice v možganih s staranjem aktivirajo. V možganih mišk so med procesom staranja ugotovili povečano izražanje več genov, ki so odgovorni za aktivacijo limfocitov T (Terao in sod.,

2002) ter povečano število limfocitov T, ki se je med procesom staranja še povečevalo (Stichel in Luebbert, 2007).

Mnenja o infiltraciji limfocitov T v normalnem živčnem tkivu so različna. Po mnenju nekaterih jih je v njem praktično nemogoče ugotoviti, po mnenju drugih naj bi majhno število aktiviranih limfocitov T normalno vstopilo v CŽS (Summers, 1995). Vstopijo lahko limfociti, senzibilizirani na antigene zunaj CŽS, limfociti, ki so reaktivni na antigene v CŽS ali naivni limfociti T. Limfociti T, senzibilizirani na antigene zunaj CŽS, naj bi iz njega izginili v enem do dveh dnevih (Hickey in sod., 1991), limfociti T, ki so reaktivni na antigene v CŽS, pa ostanejo v živčnem tkivu daljši čas in sproščajo faktorje, ki zvišajo raven izražanja endotelijskih ligandov ter pritegnejo druge imunsko kompetentne celice (Summers, 1995).

Infiltrate limfocitov T v možganih mišk in ovc s praskavcem lahko pojasnimo na dva načina. Prvi je ta, da je verjetno okužba s povzročiteljem praskavca odgovorna za aktivacijo limfocitov T in njihov vstop v CŽS. Field in Shenton (1975) sta opisala senzibilizacijo perifernih limfocitov po okužbi s TSE. Drugi možen način je, da se po okužbi s povzročiteljem praskavca v povečani količini izražajo citokini in kemokini, ki pritegnejo in zadržijo aktivirane limfocite (Lewicki in sod., 2003). Po okužbi s povzročiteljem praskavca se v možganih mišk poveča izražanje PHK razreda I in II, kemokinov, ki vplivajo na T limfocite – makrofagnega vnetnega proteina 1 β (okr. angl. macrophage inflammatory protein, MIP-1 β), IP-10 (okr. angl. interferon-inducible protein-10), RANTES (okr. angl. regulated upon activation normal T-cells expressed and secreted), C10 in makrofagnega vnetnega proteina 2 (MIP-2) (Lewicki in sod., 2003; Lee in sod., 2005), fraktalkina (CX3CL1) (Hughes in sod., 2002), in nekaterih citokinov - TNF- α (Campbell in sod., 1994; Williams in sod., 1997; Kim in sod., 1999), interleukina-1 α (IL-1 α) (Campbell in sod., 1994; Kim in sod., 1999), interleukina- 1 β (IL-1 β) (Campbell in sod., 1994; Williams in sod., 1997; Peyrin in sod., 1999; Kim in sod., 1999), interleukina-6 (IL-6)(Kim in sod., 1999; Peyrin in sod., 1999) in transformirajočega rastnega faktorja- β (TGF- β) (Cunningham in sod., 2002).

Glede na izvedbo raziskave lahko samo potrdimo našo hipotezo, da se v klinični fazi praskavca ovc pojavijo infiltrati limfocitov T, ne moremo pa oceniti, kakšen je njihov vpliv na razvoj patoloških sprememb v možganih. Glede tega je v literaturi naveden en sam podatek, da so z efektorskimi študijami limfocitov T CD4⁺ in CD8⁺ dokazali, da ti limfociti ne sintetizirajo intracelularnega interferona (IFN- γ) ali TNF- α in da nimajo litične aktivnosti (Lewicki in sod., 2003). Zato imajo verjetno le majhen vpliv na razvoj bolezenskega procesa

(Betmouni in sod., 1996; Lewicki in sod., 2003). Infiltrati limfocitov T so opisani tudi pri humanih TSE. Lewicki in sodelavci (2003) so jih ugotovili v možganih bolnikov s sCJB, vendar šele po imunohistokemičnem označevanju CD 3 antigena. Szpak in sodelavci (2006) so infiltrate limfocitov T v možganih bolnikov s sCJB opazili le občasno. Podatkov o limfocitnih infiltratih v možganih pri vCJB nismo našli. Pri AB se v možganih pojavljajo infiltrati limfocitov T $CD4^+$ in $CD8^+$ (Rogers in sod., 1988). Pri PB pa se pojavljajo predvsem infiltrati $CD4^+$ limfocitov T, ki naj bi odigrali pomembno vlogo pri nevrodegenerativnih spremembah (Brochard in sod., 2009).

Limfocite B najdemo v možganih izredno redko, ker možganska bariera dovoljuje vstop v parenhim le aktiviranim limfocitom B (Anthony in sod., 2004). V literaturi nismo zasledili podatkov o infiltratih limfocitov B v možganih ovc s praskavcem, prav tako smo te celice našli v možganih zdravih ovc in ovc s praskavcem zelo redko, kar kaže, da verjetno v patogenezi sprememb v možganih ne igrajo pomembnejše vloge. V nasprotju z limfociti T, ki se pojavljajo pri TSE živali in ljudi ter humanih nevrodegenerativnih boleznih, pa v literaturi nismo našli podatkov o njihovem pojavljanju pri teh boleznih.

V zvezi z rezultati preliminarne imunohistokemične preiskave limfatičnih organov in možganov na prione velja izpostaviti dokaj visoko prevalenco okužbe s povzročiteljem praskavca. Z imunohistokemično preiskavo smo ugotovili zelo visoko število primerov pozitivne reakcije na prione v limfatičnih organih ovc, pri katerih je bil rezultat hitrega posmortalnega testa na TSE negativen. V literaturi je opisano, da je lahko prevalenca subkliničnega praskavca relativno visoka in da s hitrimi testi lahko močno podcenimo prevalenco bolezni v tropu (Reckzeh in sod., 2007). Večina avtorjev navaja, da je prevalenca ovc v predklinični fazi bolezni med 5 % (Vascellari in sod., 2005) do 35 % (Ersdal in sod., 2003), pri čemer moramo opozoriti, da ti rezultati niso popolnoma primerljivi z našo raziskavo. Avtorji so pri računanju prevalence predkliničnega praskavca vključili ovce, ki so v hitrem testu na TSE pozitivne, poleg tega so bile imunohistokemične preiskave na prione narejene na manjšem izboru limfatičnih organov - avtorji so imunohistokemično na prisotnost prionov pregledali le tonzile in retrofaringealne bezgavke (Ligios in sod., 2006), samo retrofaringealne bezgavke (Ersdal in sod., 2003; Vascellari in sod., 2005), iliačne bezgavke in vranico (Muramatsu in sod., 1994).

Glede na metodologijo računanja prevalence in število pregledanih limfatičnih organov lahko naše rezultate primerjamo s podatki Reckzehove in sodelavcev (2007) ter Georgssona in sodelavcev (2008), ki so pri izračunu prevalence uporabili podatke o številu ovc, pri katerih so določili depozite prionov v limfatičnih organih, rezultati hitrega testa pa so bili negativni. Na občutljivost imunohistokemične metode vplivajo različni dejavniki, med drugim tudi specifičnost primarnega protitelesa. Prej omenjeni avtorji so za označevanje prionov uporabili različna protitelesa proti ovčjemu prionskemu proteinu: F89/160.1.5 (VMRD, Inc., Pulmann, USA) (Georgsson in sod., 2008), L42 in 2G11 (Reckzeh in sod., 2007), slednje protitelo, ki je zelo specifično, smo za določitev prionov uporabili tudi v naši raziskavi. Za natančno opredelitev občutljivosti imunohistokemične metode, bi bil potreben postopek validacije metode.

Reckzeh in sodelavci (2007) so depozite prionov v limfatičnih organih našli pri 13 od 129 ovc (10,08 %), negativnih v hitrem testu. Georgsson in sodelavci (2008) pa so v dveh tropih opisali zelo visoko prevalenco, 58,3 % in 42,5 %, ki je podobne stopnje kot prevalenca v našem primeru. Ti avtorji tako visoko prevalenco pojasnjujejo s tem, da je večina ovc imela srednje dovzeten genotip in da se reja ovc v njihovem okolju razlikuje od drugih držav po tem, da so uhlevljene dlje, približno osem mesecev.

Ovce, ki smo jih vključili v raziskavo, smo v testne skupine razdelili glede na fazo bolezni, ki smo jo določili s patohistološko preiskavo obeksa, hitrim testom na TSE in imunohistokemično preiskavo limfatičnih organov ter možganov na prione.

S patohistološko preiskavo obeksa smo pri vseh ovcah 2. testne skupine, torej ovc v klinični fazi bolezni, našli značilne spongiformne spremembe, kot so jih opisali tudi drugi (Wood in sod., 1997; Ligios in sod., 2002). Stopnja vakuolizacije in mesto, kjer se je ta pojavljala, je bila pri različnih živalih različna, vendar smo vakuole, tako kot je opisano (Ersdal in sod., 2003), vedno našli v DNVN. Pri miškah (Fraser in Dickinson, 1968; Bruce in Fraser, 1991) je opisano, da na razporeditev in stopnjo vakuolizacije možganov, t. i. profil lezij (angl. lesion profile), vplivata sev povzročitelja praskavca in genotip. Pri ovcah pa so ugotovili, da na profil patohistoloških sprememb poleg teh dveh faktorjev (Begara-McGorum in sod., 2002; Ligios in sod., 2002) vplivajo tudi drugi faktorji, kot so pasma živali, starost ob okužbi, trajanje klinične faze bolezni in individualne razlike, zato naj bi določanje profila lezij pri ovcah imelo omejeno vrednost pri razlikovanju sevov praskavca (Begara-McGorum in sod., 2002).

Pri eni zdravi ovci in eni ovci v predklinični fazi bolezni smo našli vakuolo v enem nevronu enega DNVN. Spremembi smo glede na kriterije OIE, ki navajajo, da se lahko posamezne vakuole v nevronih DNVN pojavijo tudi pri zdravih ovcah brez praskavca, in glede na negativen rezultat imunohistokemične reakcije na prione, ocenili kot slučajno najdbo (Zlotnik, 1957; OIE, 2009).

V vseh nevroanatomskih področjih obeksov ovc 2. testne skupine, kjer smo ugotovili značilne spongiformne spremembe, smo z imunohistokemično preiskavo ugotovili tudi pozitivno reakcijo na prione. Hkrati pa to ni veljalo v obratni smeri – v več področjih, kjer smo našli depozite prionov, nismo opazili vakuol. Pri miškah in ovcah, okuženih s praskavcem, je opisano, da se depoziti prionov pojavijo več tednov pred vakuolizacijo (Bruce in sod., 1989; Williams in sod., 1997). Jakost imunohistokemične reakcije je bila močnejša pri ovcah genotipa VRQ/VRQ in je bila v pozitivni korelaciji s stopnjo izraženosti spongiformnih sprememb (ρ 0,9204). Begara-McGorum in sodelavci (2002) so ugotovili le šibko pozitivno korelacijo med jakostjo imunohistokemične reakcije na prione ter stopnjo vakuolizacije nevropila.

Podobno kot navajajo tudi drugi avtorji, smo pozitivno imunohistokemično reakcijo ugotovili v vseh primerih, ko smo v področju DNVN našli spongiformne spremembe (van Keulen in sod., 1995; Ryder in sod., 2001; Ersdal in sod., 2003).

Z imunohistokemijo smo v področju obeksa našli različne oblike depozitov prionov, ki so jih opisali tudi drugi avtorji (van Keulen in sod., 1995; Ryder in sod., 2001; Gonzalez in sod., 2002; Spiropoulos in sod., 2007). Izjema so bila le subpialna odlaganja, žilne in lažne lehe. Vzrok, da teh oblik odlaganja prionov nismo našli, je verjetno v tem, da smo imunohistokemično označili le obeke in da so nekateri od teh tipov odlaganja prionov zelo redki. Subpialna odlaganja so opisana pod mehko možgansko ovojnico, predvsem v področju skorje velikih in malih možganov (Gonzalez in sod., 2002). Odlaganja prionov v stene krvnih žil se pojavljajo predvsem v področju talamusa in hipotalamusa ter v skorji velikih in malih možganov, ne pa tudi obeksa (van Keulen in sod., 1995; Gonzalez in sod., 2002; Ersdal in sod., 2005). Tako obliko odlaganja so Gonzalez in sodelavci (2002) opisali zgolj pri ovcah z genotipom VRQ/VRQ. Spiropoulos in sodelavci (2007) so lažne lehe našli v obeksu le pri dveh od 163 ovc, Ryder in sodelavci (2001) pa le pri eni od 646 pregledanih ovc.

Že Ryder in sodelavci (2001) so na osnovi razporeditve različnih tipov depozitov PrP^{Sc} in njihove jakosti oblikovali štiri različne vzorce. Prve raziskave so kazale, da je mogoče seve

povzročiteljev praskavca razlikovati s pomočjo imunohistokemične analize (Gonzalez in sod., 2002), izsledki zadnjih raziskav pa kažejo, da so različni vzorci odlaganj prionov povezani z genotipom (Spiropoulos in sod., 2007). V naši raziskavi smo ocenili tipe odlaganja prionov zgolj pri majhnem številu ovc, zato ne moremo zagotovo sklepati ali tudi pri naših ovcah obstaja povezava med vzorci imunohistokemične reakcije in genotipi. Kljub majhnemu vzorcu pa smo opazili, da se je zvezdasti tip odlaganja pojavljal izključno pri ovcah genotipa VRQ/VRQ. Spiropoulos in sodelavci (2007) navajajo, da je najbolj zanesljiv kriterij za razlikovanje genotipov, da se pri ARQ/ARQ genotipu v DNVN pojavljajo skoraj izključno drobno točkasta odlaganja, pri genotipu VRQ/VRQ pa zlivajoča odlaganja, ki prevladujejo predvsem na ventralnem robu DNVN, na meji z retikularno formacijo. V našem, sicer majhnem, vzorcu teh, za posamezni genotip značilnih odlaganj, nismo opazili.

Ryder in sod. (2001) so opisali majhna nakopičenja prionov v obeksu pri ovcah, ki niso kazale kliničnih znakov in niso imele značilnih spongiformnih sprememb v obeksu. Primerljiva, majhna, odlaganja prionov v DNVN, brez patohistoloških sprememb, smo našli pri treh ovcah z genotipom VRQ/VRQ in jih zato uvrstili v skupino ovc v predklinični fazi bolezni. Odlaganja v področju DNVN potrjujejo, da po peroralni okužbi povzročitelj praskavca vstopi v možgane preko vagusnega živca (Beekes in sod., 1998; van Keulen in sod., 2000; McBride in sod., 2001). Pri ovci z oznako VRQ/VRQ PK5 smo pozitivno reakcijo na prione našli tudi v področju aree postreme, ki nima možganske bariere (Price in sod., 2008), kar pomeni, da je morda v tem primeru povzročitelj praskavca prispel do možganov hematogeno (Siso in sod., 2009).

Ugotovitev pozitivne imunohistokemične reakcije na prione pri teh treh ovcah, pri katerih je bil rezultat hitrega testa negativen na prisotnost prionov, hkrati potrjuje že znano dejstvo, da je imunohistokemična preiskava obeksa zelo občutljiva metoda za diagnostiko praskavca kot hitri testi (Bolea in sod., 2005; Monleon in sod., 2005).

Pri ovcah genotipov VRQ/VRQ in ARQ/ARQ smo v predklinični in klinični fazi bolezni v limfatičnih organih našli depozite prionov. Podobno kot navajajo tudi drugi avtorji, smo pozitivno reakcijo na prione najpogosteje ugotovili v mezenterialnih bezgavkah in/ali Peyerjevih ploščah ileuma (Heggebo in sod., 2000; van Keulen in sod., 2002; Reckzeh in sod., 2007), kar potrjuje, da je črevesje glavno vstopno mesto za prione (Andreoletti in sod., 2000; Beekes in McBride 2000; Heggebo in sod., 2000).

Pozitivna reakcija na prione je bila najmočnejša v germinativnih središčih limfatičnih foliklov, šibkejša pa tudi v drugih področjih limfatičnih organov. V germinativnih središčih smo ugotovili drobno retikularno reakcijo, ki po obliki ustreza reakciji na FDC in zrnato reakcijo v citoplazmi celic, ki smo jih prepoznali kot makrofage. Tako obliko reakcije v germinativnih središčih limfatičnih foliklov in v limfatičnih organih so opisali tudi drugi avtorji (van Keulen in sod., 1996; Andreoletti in sod., 2000; Ersdal in sod., 2003; Georgsson in sod., 2008). Pri ovcah, eksperimentalno okuženih s praskavcem, pri katerih so kartirali širjenje PrP^{Sc}, so ugotovili, da se pozitivna reakcija v makrofagih zelo pogosto ugotovi v začetnih fazah bolezni, retikularna reakcija pa je povezana s kasnejšo fazo bolezni (Ersdal in sod., 2005; Ryder in sod., 2009). Ryder in sodelavci (2009) so poleg depozitov prionov v makrofagih in na FDC opisali še posamezne celice v področju kupolasto izbočenega področja nad Peyerjevimi ploščami, subkapsularnih sinusov bezgavk in interfolikularnih področij, ki bi naj bi po obliki in lokaciji lahko bile DC.

Imunohistokemična reakcija na prione je bila pri genotipu VRQ/VRQ močnejša kot pri genotipu ARQ/ARQ, kar so v svoji raziskavi ugotovili tudi Ersdal in sodelavci (2005). Po njihovem mnenju je raznos prionov iz GALT-a do drugih tkiv pri genotipu ARQ/ARQ počasnejši ali manj učinkovit.

Pri vseh ovcah, kjer smo prione našli v obeksu, smo jih hkrati ugotovili tudi v limfatičnih organih. V literaturi je opisanih nekaj izjem, kjer so prione pri posameznih ovcah genotipa VRQ/ARR in VRQ/VRQ (Andreoletti in sod., 2000; Jeffrey in sod., 2002), genotipa ARQ/ARQ Sardske pasme (Ligios in sod., 2006) in genotipa ARQ/ARR (van Keulen in sod., 1996) našli v podaljšani hrbtenjači, ne pa tudi v limfatičnih tkivih.

Poleg značilne imunohistokemične reakcije smo v tonzilah in ileumu našli še reakcijo v obliki drobnih zrn v citoplazmi epitelnih celic sluznice ileuma in mukoznih žlez ob tonzili. Drobna zrnca v citoplazmi lahko interpretiramo kot nespecifično reakcijo ali specifično reakcijo na PrP^{Sc}. O nespecifičnih reakcijah pri označevanju PrP^{Sc} so poročali Ersdal in sodelavci (2003), ki so šibko pozitivno reakcijo ugotovili v posameznih vrčastih celicah, limfatičnih celicah in ganglijskih celicah ileuma pri uporabi monoklonskega protitelesa proti prionskemu proteinu L42. Šibka in difuzna reakcija je po obdelavi vzorcev s proteinazo K izginila (Ersdal in sod., 2003). Za označevanje prionov smo uporabili protitelo 2G11, ki je specifično za ta antigen in po izkušnjah drugih avtorjev ne povzroča nespecifične reakcije v ozadju, niti ne reagira s PrP^C (Andreoletti in sod., 2000; Ligios in sod., 2007; Vascellari in sod., 2007). Tudi sami smo

opazili, da v možganih, kljub temu da je tam PrP^C največ (Moudjou in sod., 2001; Diaz-San Segundo in sod., 2006), ni bilo značilnih reakcij. PrP^C sicer lahko najdemo v večini tkiv, tudi v slinskih žlezah (Herrmann in sod., 2000) in ileumu, vendar je tam njegova količina v primerjavi z možgani izredno majhna (Moudjou in sod., 2001). Z imunohistokemično preiskavo črevesa goveda so PrP^C ugotovili v nevroendokrinih celicah kript duodenuma, število pozitivnih celic se je v smeri ileuma zmanjševalo in v ileumu so našli pozitivne celice mieloidne vrste tik pod sluzničnim epitelijem (Marcos in sod., 2005; Miyazawa in sod., 2007). Za tanko črevo ovc ni tako natančnih podatkov – pri raziskavi PrP^C v Peyerjevih ploščah avtorji navajajo, da so pozitivno reakcijo ugotovili v limfatičnih foliklih in v ganglijskih celicah submukoznega in mienteričnega pleteža, ne omenjajo pa reakcije v sluzničnem epitelu (Austbo in sod., 2006). Reakcija, ki smo jo ugotovili v naši raziskavi, je bila drobno zrnata in po videzu zelo podobna reakciji, ki jo navajajo Vascellari in sodelavci (2007) v slinskih žlezah ter v epitelu izvodil slinskih žlez pri ovcah s praskavcem. Nenavadno je le, da noben od avtorjev, ki so proučevali patogenezo praskavca, ne omenja podobne reakcije (Andreoletti in sod., 2000; van Keulen in sod., 2002; Ersdal in sod., 2005; Ryder in sod., 2009). V literaturi so po lokaciji podobno reakcijo opisali v citoplazmi epitelnih celic črevesnih resic in kript novorojenih mišk, eksperimentalno okuženih s praskavcem (Okamoto in sod., 2003). Za razliko od reakcije, ki so jo avtorji opisali, je bila reakcija v našem primeru zelo enakomerno razporejena po epitelu. Za dokončno ovrednotenje te reakcije bi bilo potrebno opraviti analizo western blot teh vzorcev.

Zaključimo lahko, da se sestava limfatičnih organov zdravih ovc razlikuje do neke mere glede na polimorfizem gena *PRNP* na položajih 136, 154 in 171, da se po okužbi s praskavcem v limfatičnih organih ovc pojavijo spremembe celične sestave, ki so prav tako povezane z genotipom, ter da se v možganih ovc s praskavcem, poleg značilnih patohistoloških sprememb, v pozni fazi bolezni pojavijo tudi blagi infiltrati limfocitov T.

7 SKLEPI

1. Med zdravimi ovcami genotipa VRQ/VRQ in ARQ/ARQ ni statistično značilnih razlik v numerični ter arealni gostoti profilov germinativnih središč limfatičnih organov.
2. Celična sestava germinativnih središč limfatičnih organov zdravih ovc genotipa VRQ/VRQ se značilno razlikuje od sestave pri genotipu ARQ/ARQ po manjšem številu limfocitov T in B in manjši aktivaciji FDC.
3. V limfatičnih organih ovc, naravno okuženih s praskavcem, se pojavijo spremembe v celični sestavi in številu ter površini germinativnih središč. Spremembe so odvisne od faze bolezni in od genotipa PrP živali.
4. Pri praskavcu se v limfatičnih organih ovc, ki so zelo dovzetne za praskavec (t. j. VRQ/VRQ genotip) pojavi imunski odziv, pri katerem se poveča število limfocitov B in T, aktivacija FDC ter poveča število germinativnih središč limfatičnih foliklov.
5. V limfatičnih organih ovc zelo dovzetnega VRQ/VRQ genotipa se prvi znaki aktivacije imunskega odziva pojavijo že v predklinični fazi bolezni, med katero je rezultat hitrega testa za diagnostiko TSE negativen, pozitivno imunohistokemično reakcijo na prione pa ugotovimo v enem ali več preiskanih limfatičnih organov in/ali obeksu.
6. V limfatičnih organih ovc srednje dovzetnega genotipa ARQ/ARQ pride do supresije imunskega celičnega odziva, ki se kaže z zmanjšanim številom limfocitov B in T v predklinični fazi ter z zmanjšano aktivacijo FDC in zmanjšano površino germinativnih središč limfatičnih foliklov v klinični fazi.

7. V obeksu zdravih ovc lahko ugotovimo majhno število limfocitov T, povprečno od 0,48 do 0,68 limfocita T/ vidno polje 200-kratne povečave, limfocitov B ni ali so izjemno redki.
8. Pri ovcah, naravno okuženih s praskavcem se med pozno, klinično fazo bolezni v parenhimu obeksa pojavijo limfociti T. Njihovo prisotnost lahko zanesljivo ocenimo na tkivnih rezinah ob uporabi protiteles proti limfocitom T.
9. Infiltracija limfocitov T v parenhimu obeksa je pri ovcah s praskavcem v visoki pozitivni korelaciji s stopnjo spongiformnih sprememb (ρ 0,7493, $Z < 0,001$) in odlaganja prionov v obeksu (ρ 0,6571, $Z < 0,001$).
10. Pri ovcah, naravno okuženih s praskavcem, se v parenhimu obeksa ne pojavijo infiltrati limfocitov B.

8 POVZETEK

Namen naše raziskave je bil preveriti naslednje hipoteze: 1) pri zdravih ovcah se histološka zgradba limfatičnih organov razlikuje glede na polimorfizem *PRNP* na položajih 136, 154 in 171; 2) naravna okužba s praskavcem v limfatičnih organih ovc povzroči spremembe v številu in velikosti germinativnih središč ter spremembe celične sestave teh organov, ki so povezane z genotipom in 3) pri ovcah z naravnim praskavcem se v možganih, poleg značilnih patohistoloških sprememb, pojavijo tudi infiltrati limfatičnih celic, njihovo pojavljanje pa je povezano z genotipom.

V našo raziskavo smo vključili 42 ovc iz dveh tropov, v katerih je bil diagnosticiran praskavec. Ovce smo razdelili v tri testne skupine: 1. skupino zdravih ovc brez praskavca, 2. skupino ovc v klinični fazi bolezni in 3. skupino ovc v predklinični fazi bolezni. Skupine smo razdelili na podskupine z različnimi genotipi PrP: VRQ/VRQ (zelo dovzetne za praskavec), ARQ/ARQ (srednje dovzetne za praskavec) in heterozigoti ARR/ARQ (slabo dovzetne za praskavec). Na parafinskih rezinah limfatičnih organov in obeksa smo imunohistokemično označili prione (mišje monoklonsko protitelo proti zaporedju 146–182 ovčjega prionskega proteina, 2G11, Institut Pourquier), limfocite B (mišje monoklonsko protitelo proti človeškemu CD79 α , DAKO), limfocite T (kunčje poliklonsko protitelo proti človeškemu CD3, DAKO) ter FDC (kunčje poliklonsko protitelo proti govejemu S-100, DAKO). Patohistološke spremembe v obeksu ter imunohistokemično reakcijo na prione v obeksu in limfatičnih organih smo ocenili semikvantitativno. S programom NIS Elements BR (Nikon) smo z merjenjem povprečnih sivin morfometrično analizirali celično sestavo limfatičnih organov in prešteli limfocite T in B v obeksu.

Med zdravimi ovcami različnih genotipov ni bilo statistično značilnih razlik v arealnih in numeričnih gostotah germinativnih središč limfatičnih foliklov ($P > 0,05$). Pri genotipu VRQ/VRQ smo ugotovili statistično značilne nižje vrednosti povprečnih sivin imunohistokemične reakcije za limfocite T in B ter za FDC v primerjavi z genotipom ARQ/ARQ ($P < 0,05$). Pri genotipu ARR/ARQ so bile vrednosti nižje kot pri genotipu ARQ/ARQ, statistično značilne razlike smo potrdili le pri mezenterialnih bezgavkah ($P < 0,05$).

Pri ovcah s praskavcem smo ugotovili nekatere spremembe v sestavi limfatičnih organov. Spremembe so bile odvisne od genotipa in faze bolezni.

Pri ovcah genotipa VRQ/VRQ v predklinični fazi praskavca so bile vrednosti arealne gostote germinativnih središč višje kot pri zdravih ovcah istega genotipa, statistično značilno višjo vrednost smo dokazali v mezenterialni bezgavki ($P < 0,05$). Pri ovcah v klinični fazi so bile arealne gostote sicer višje kot v predklinični fazi, vendar ne statistično značilne ($P > 0,05$). Numerične gostote germinativnih središč v mezenterialnih in retrofaringelanih bezgavkah ter vranici so bile pri ovcah v klinični fazi bolezni višje kot pri zdravih ovcah in ovcah v predklinični fazi bolezni ($P < 0,05$). Vrednosti povprečnih sivin za limfocite T so bile pri ovcah v predklinični fazi bolezni nekoliko višje v primerjavi z zdravimi ovcami, vendar ne statistično značilne ($P > 0,05$). V klinični fazi praskavca so bile vrednosti povprečnih sivin za limfocite T še višje kot v predklinični fazi. S statistično analizo smo potrdili višje vrednosti v retrofaringelani in mezenterialni bezgavki, tonzili in vranici ovc v klinični fazi v primerjavi z zdravimi ovcami ($P < 0,05$). Povprečne sivine imunohistokemične reakcije za limfocite B so bile pri zdravih ovcah in ovcah v predklinični fazi podobne, pri ovcah v klinični fazi pa značilno pomembno višje kot pri ostalih dveh skupinah ($P < 0,05$). Pri ovcah v predklinični in klinični fazi smo izmerili višje vrednosti povprečnih sivin za FDC. Statistično značilno višja je bila vrednost v vranici in ileumu predklinične skupine v primerjavi z zdravimi ter vrednost v retrofaringealnih in mezenterialnih bezgavkah ovc v klinični fazi bolezni v primerjavi z zdravimi ovcami ($P < 0,05$).

Pri ovcah genotipa ARQ/ARQ v predklinični fazi praskavca smo ugotovili nekoliko višje vrednosti arealne gostote kot pri zdravih ovcah istega genotipa, vendar statistično neznačilne ($P > 0,05$). V klinični fazi praskavca smo ugotovili nižje vrednosti arealne gostote kot pri ovcah istega genotipa v predklinični fazi in pri zdravih ovcah. Razlike so bile statistično značilne v primerjavi z vrednostmi za mezenterialne bezgavke zdravih ovc ($P < 0,05$) in vrednostmi za retrofaringealne ter mezenterialne bezgavke, tonzile in vranice ovc v predklinični fazi bolezni ($P < 0,05$). Glede vrednosti numeričnih gostot germinativnih središč med zdravimi ovcami in ovcami v različnih fazah bolezni ni bilo statistično značilnih razlik ($P > 0,05$). Vrednosti povprečnih sivin za limfocite T so bile pri ovcah v predklinični fazi bolezni nekoliko nižje kot pri zdravih ovcah, pri ovcah v klinični fazi pa višje kot pri ovcah v predklinični fazi in zdravih ovcah. Statistično značilno višjo vrednost smo izmerili v

mezenterialni bezgavki ovc v klinični fazi v primerjavi z ovcami v predklinični fazi ($P < 0,05$). Vrednosti povprečnih sivin za limfocite B v bezgavkah, vranici in tonzili so bile pri predklinični skupini nižje kot pri zdravih ovcah in hkrati nižje tudi kot pri skupini v klinični fazi bolezni – razlika med njima je bila statistično značilna le pri retrofaringealni bezgavki ($P < 0,05$). Vrednosti za limfocite B so bile pri zdravih ovcah višje kot pri ovcah v klinični fazi, razlika je bila statistično značilna v tonzili in vranici ($P < 0,05$). Med zdravimi ovcami in ovcami v predklinični fazi bolezni nismo ugotovili razlik glede povprečnih sivin za FDC ($P > 0,05$). V tonzili in vranici ovc v klinični fazi bolezni smo izmerili statistično značilno nižje vrednosti povprečnih sivin za FDC kot pri ovcah v predklinični fazi. Vrednosti povprečnih sivin za FDC so bile teh v dveh organih in mezenterialni bezgavki statistično značilno

nižje tudi od tistih pri zdravih ovcah ($P < 0,05$).

Med različnimi genotipi zdravih ovc ni značilno pomembnih razlik v številu limfocitov T v področju obeksa ($P > 0,05$). V obeksih ovc v klinični fazi bolezni smo ugotovili statistično značilno pomembno višje število limfocitov T kot pri zdravih ovcah in ovcah v predklinični fazi bolezni ($P < 0,05$). Število limfocitov T v obeksu je v pozitivni korelaciji s stopnjo spongiformnih sprememb ($\rho 0,7493$, $P < 0,001$) in jakostjo imunohistokemične reakcije na prione v obeksu ($\rho 0,6571$, $P < 0,001$).

Število limfocitov B v parenhimu obeksa zdravih ovc in v različnih fazah praskavca je zelo nizko. S statistično analizo smo ugotovili, da ni značilno pomembnih razlik v številu limfocitov B v obeksu zdravih ovc različnih genotipov ($P > 0,05$).

Prav tako statistična analiza ni pokazala statistično značilnih razlik v številu limfocitov B pri primerjavi ovc različnih genotipov v predklinični fazi in ovc različnih genotipov v klinični fazi praskavca ($P > 0,05$).

Na osnovi ugotovljenega lahko zaključimo, da se mikroarhitektura limfatičnih organov zdravih ovc razlikuje glede na polimorfizem gena *PRNP* na položajih 136, 154 in 171, da naravna okužba s praskavcem v limfatičnih organih ovc povzroči spremembe celične sestave teh organov, ki so povezane z genotipom, in da se pri ovcah z naravnim praskavcem, v možganih, poleg značilnih patohistoloških sprememb, v pozni fazi bolezni pojavijo tudi infiltrati limfocitov T.

9 SUMMARY

The aim of our study was to test the following hypotheses: 1) the microarchitecture of lymphatic organs of healthy sheep varies according to the polymorphism of the *PRNP* gene at codons 136, 154 and 171, 2) the natural scrapie infection causes changes in the number and size of germinal centres of the lymph follicles in lymphatic organs and changes of the cellular composition of lymphatic organs which are connected with the polymorphism of the *PRNP* gene at codons 136, 154 and 171, 3) in the natural scrapie infection, in addition to pathognomonic histopathological brain lesions, lymphoid infiltrates appear also in the brain, and their occurrence is linked to the polymorphism of the *PRNP* gene.

Forty-two sheep from two scrapie affected flocks were included in our study. Sheep were divided into three testing groups: 1) a group of healthy sheep without scrapie, 2) a group of sheep in the clinical phase of scrapie infection, and 3) a group in the preclinical phase of scrapie infection. The testing groups were divided into subgroups with different PrP genotypes: VRQ/VRQ (the most scrapie-susceptible genotype), ARQ/ARQ (medium susceptibility to scrapie) and the heterozygote of allele ARR and allele ARQ (weakly susceptible to scrapie). The paraffin tissue sections of lymphatic organs (retropharyngeal and mesenteric lymph node, tonsil, ileum with Peyer's pathes and spleen) and obex were immunohistochemically stained for prions (the mouse monoclonal antibody against the sequence 146-182 of the ovine prion protein, Institut Pourquier), B lymphocytes (the mouse monoclonal antibody against the human CD79 α cy, DAKO), T lymphocytes (the rabbit polyclonal antibody against the human CD 3, DAKO) and follicular dendritic cells (the rabbit polyclonal antibody against the bovine S-100, DAKO). Histopathological lesions in the obex region and immunohistochemical labelling of prions in lymphatic organs and obex were evaluated semiquantitatively. The cellular composition of several lymphatic organs and the lymphocytic infiltrate in the obex were analyzed morphometrically by using the NIS Elements BR (Nikon) software.

A comparison between healthy sheep with different PrP genotypes did not show any statistically significant differences in the areal and numerical density of germinative centres of lymph follicles ($P > 0.05$). In the VRQ/VRQ genotype, statistically significant lower mean

grey values for T and B lymphocytes and follicular dendritic cells were found in comparison with the ARQ/ARQ genotype ($P < 0.05$). In the ARR/ARQ genotype the mean grey values were lower than in the ARQ/ARQ genotype, however, statistically significant differences were confirmed in the mesenteric lymph nodes only ($P < 0.05$).

In sheep, naturally infected with scrapie, changes in the cellular composition of several lymphatic organs were detected. These changes depend on the PrP genotype and the phase of the disease.

The values of areal density of germinative centres of the VRQ/VRQ genotype in the preclinical phase of the disease were higher than in the healthy sheep of the same PrP genotype; statistically higher values were confirmed in the mesenteric lymph node ($P < 0.05$). The values of the areal density of germinative centres in the sheep in the clinical phase of the disease were higher than in the healthy sheep and the sheep in the preclinical phase of the disease; however, they are not statistically significant ($P > 0.05$). Numerical densities of germinative centres in the retropharyngeal and the mesenteric lymph nodes of the sheep in the clinical phase of scrapie were higher in comparison to the healthy sheep and the sheep in the preclinical phase of the disease ($P < 0.05$). The mean grey values for the T lymphocytes in the preclinical phase were slightly higher than in the healthy sheep, but not statistically significant ($P > 0.05$). In the clinical phase of the disease, the mean grey values for T lymphocytes were even higher than in the preclinical phase. A statistical analysis showed statistically significant higher mean grey values for the T lymphocytes in the retropharyngeal and the mesenteric lymph node, tonsil and spleen of the sheep in the clinical phase of the disease, in comparison to the healthy sheep ($P < 0.05$). The mean grey values for B lymphocytes vary similarly in the group of healthy sheep and the scrapie-affected sheep in the preclinical phase of the disease, but in the group in the clinical phase of the disease these values were significantly higher than in the other two groups ($P < 0.05$). Mean grey values in follicular dendritic cells of the sheep in the preclinical and the clinical phase of the disease were higher in comparison to the healthy sheep. The values were statistically significantly higher in the spleen and the ileum of the sheep in the preclinical phase, in comparison to the healthy sheep, and also in the retropharyngeal and mesenteric lymph node of sheep in the clinical phase of scrapie, in comparison to the healthy sheep ($P < 0.05$).

In the ARQ/ARQ genotype in the preclinical phase of the disease, slightly higher, however not statistically significant values of the areal density of germinative centres were observed, in

comparison to the group of healthy sheep ($P > 0.05$). Lower values of areal densities were observed in the clinical phase of scrapie in comparison to the healthy sheep and the sheep in the preclinical phase of the disease. The differences were statistically significant in comparison to the mesenteric lymph node of the healthy sheep, and in comparison to the retropharyngeal and the mesenteric lymph node, tonsil and spleen of the sheep in the clinical phase of scrapie ($P < 0.05$).

There were no statistically significant differences in the numeric density of germinative centres between subgroups of the ARQ/ARQ genotype ($P > 0.05$). The mean grey values for the T lymphocytes were slightly lower in the sheep in the preclinical phase of scrapie than in the healthy sheep, and at the same time these values were higher in the group of sheep in the clinical phase of scrapie in comparison to the group of preclinical scrapie-infected sheep and the group of healthy sheep. A statistically significant higher value was confirmed in the mesenteric lymph node of the sheep in the clinical phase than in the sheep in the preclinical phase of scrapie ($P < 0.05$).

Mean grey values for B lymphocytes in the lymph nodes, tonsils and spleen were lower in the preclinical group than in the clinical group, but the difference was statistically significant for retropharyngeal lymph node only ($P < 0.05$). Values for B lymphocytes were higher in the healthy sheep than in the sheep in the clinical phase of scrapie. The differences were statistically significant for tonsil and spleen ($P < 0.05$).

There were no significant differences in the mean grey values for follicular dendritic cells among the healthy sheep and the sheep in the preclinical phase of scrapie ($P > 0.05$). Statistically significant lower values were observed for tonsil and spleen of the sheep in the clinical phase of the disease in comparison to the sheep in the preclinical phase. Besides, the mean grey values for follicular dendritic cells for these two organs and the mesenteric lymph node were significantly lower in comparison to the healthy sheep ($P < 0.05$).

There were no statistically significant differences in the T lymphocytes number in the obex region between healthy sheep of different PrP genotypes ($P > 0.05$). The T lymphocytes number was significantly higher in the clinical group than in the healthy sheep and the preclinical group ($P < 0.05$). The T lymphocytes number was in positive correlation with the level of spongiform lesions ($\rho 0.7493$, $P < 0.001$) and the intensity of immunohistochemical reaction for prions in the obex region ($\rho 0.6571$, $P < 0.001$).

The number of B lymphocytes in the obex of the healthy sheep and the scrapie-affected sheep was very low. The statistical analysis did not show any significant differences in the number of B lymphocytes in the obex of the healthy sheep with different PrP genotypes ($P > 0.05$).

The statistical analysis also did not show any statistically significant differences in the number of B lymphocytes in sheep with different genotypes in the preclinical phase and the clinical phase of scrapie ($P > 0.05$).

On the basis of these research findings, we can conclude that the microarchitecture of lymphatic organs of healthy sheep varies according to the polymorphisms of the *PRNP* gene at codons 136, 154 and 171. The natural scrapie infection causes changes in the cellular composition of lymphatic organs, which are linked to the polymorphism of the *PRNP* gene. Besides, in the clinical phase of scrapie, in addition to pathognomonic histopathological lesions, also T lymphocyte infiltrates occur in the brain.

10 ZAHVALA

Mentorici, prof. dr. Poloni Juntas, se zahvaljujem za dobro idejo za nalogo in za mentorstvo. Članicam in članu komisije za oceno naloge, prof. dr. Mari Popović, prof. dr. Vladki Čurin Šerbec, prof. Jelki Zabavnik Piano in prof. Milanu Pogačniku, za zahvaljujem za vse nasvete in predloge, ki so izboljšali nalogo.

Prof. dr. Milanu Pogačniku se zahvaljujem za vso skrb in podporo med pripravo naloge.

Najlepša hvala sodelavcem Inštituta za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo Veterinarske fakultete in mag. Tomislavu Pallerju z Nacionalnega veterinarskega inštituta za pomoč pri odvzemu vzorcev med eradikacijami ter za vzpodbudo pri delu.

Dr. Idi Eržen najlepša hvala za vse nasvete glede morfometričnih analiz.

Dr. Mateju Makaroviču hvala za statistično obdelavo podatkov.

Eriki Božič in Ireni Sbil Novak hvala za lektoriranje slovenskega in angleškega besedila.

Hvala mag. Brigiti Grecs- Smole za pomoč pri urejanju literature.

Mojim in Tomaževim staršem najlepša hvala za vzpodbudo in za pomoč, da sem imela čas za svoje delo.

Veroniki in Tomažu hvala za veliko mero potrpežljivosti in razumevanja med mojimi odsotnostmi od doma.

Veterinarski upravi Republike Slovenije, ki je bila plačnik stroškov genotipizacije, eradikacije, hitrih posmrtnih testov in potrditvenih testov za diagnostiko praskavca, se lepo zahvaljujem za dovoljenje za objavo podatkov.

Naloga je bila financirana iz sredstev programske skupine P4–0092.

11 LITERATURA

1. Adams DH (1970). The nature of the scrapie agent: a review of recent progress. *Pathol Biol (Paris)* 18: 559– 77.
2. Adams DH, Field EJ (1968). The infective process in scrapie. *Lancet* 2: 714– 6.
3. Aguzzi A (2006). Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. *J Neurochem* 97: 1726– 39.
4. Aguzzi A, Heikenwalder M, Polymenidou M (2007). Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 552– 61.
5. Aguzzi A, Heppner FL, Heikenwalder M et al. (2003). Immune system and peripheral nerves in propagation of prions to CNS. *Br Med Bull* 66: 141– 59.
6. Aguzzi A, Maddalena A, Brandner S, Klein M (1997). Molecular pathogenesis of spongiform encephalopathy. *Pathologica* 89: 481– 90.
7. Allsop D, Ikeda S, Bruce M, Glenner GG (1988). Cerebrovascular amyloid in scrapie-affected sheep reacts with antibodies to prion protein. *Neurosci Lett* 92: 234– 9.
8. Alverson J, O'Rourke KI, Baszler TV (2006). PrP^{Sc} accumulation in fetal cotyledons of scrapie-resistant lambs is influenced by fetus location in the uterus. *J Gen Virol* 87: 1035– 41.
9. Andreoletti O, Berthon P, Levavasseur E et al. (2002 a). Phenotyping of protein-prion (PrP^{Sc})-accumulating cells in lymphoid and neural tissues of naturally scrapie-affected sheep by double-labeling immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 50: 1357– 70.
10. Andreoletti O, Berthon P, Marc D et al. (2000). Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* 81: 3115– 26.
11. Andreoletti O, Lacroux C, Chabert A et al. (2002 b). PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol* 83: 2607– 16.
12. Andreoletti O, Simon S, Lacroux C et al. (2004). PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med* 10: 591– 3.
13. Andrievskaia O, Algire J, Balachandran A, Nielsen K (2008). Prion protein in sheep urine. *J Vet Diagn Invest* 20: 141– 6.

14. Anthony IC, Crawford DH, Bell JE (2004). Effects of human immunodeficiency virus encephalitis and drug abuse on the B lymphocyte population of the brain. *J Neurovirol* 10: 181– 8.
15. Aucouturier P, Carnaud C (2002). The immune system and prion diseases: a relationship of complicity and blindness. *J Leukoc Biol* 72: 1075– 83.
16. Aucouturier P, Geissmann F, Damotte D et al. (2001). Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest* 108: 703– 8.
17. Austbo L, Espenes A, Olsaker I, Press CM, Skretting G (2006). Lymphoid follicles of the ileal Peyer's patch of lambs express low levels of PrP, as demonstrated by quantitative real-time RT-PCR on microdissected tissue compartments, in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Gen Virol* 87: 3463– 71.
18. Austin AR, Simmons MM (1993). Reduced rumination in bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Vet Rec* 132: 324– 5.
19. Bainbridge J, Walker KB (2005). The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses. *Immunol Lett* 96: 147– 50.
20. Banchereau J, Briere F, Caux C et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767– 811.
21. Bastian FO (1979). Spiroplasma-like inclusions in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Pathol Lab Med* 103: 665– 9.
22. Baylis M, Goldmann W, Houston F et al. (2002). Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock. *J Gen Virol* 83: 2907– 14.
23. Beck E, Daniel PM (1971). Drinking behaviour in scrapie. *Lancet* 1: 757.
24. Beekes M, McBride PA (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* 278: 181– 4.
25. Beekes M, McBride PA, Baldauf E (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol* 79: 601– 7.
26. Begara-McGorum I, Clark AM, Martin S, Jeffrey M (2000). Prevalence of vacuolar lesions consistent with scrapie in the brains of healthy cull sheep of the Shetland Islands. *Vet Rec* 147: 439– 41.
27. Begara-McGorum I, Gonzalez L, Simmons M et al. (2002). Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *J Comp Pathol* 127: 59– 68.

28. Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE et al. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol* 76: 509– 17.
29. Bencsik A, Lezmi S, Hunsmann G, Baron T (2001). Close vicinity of PrP expressing cells (FDC) with noradrenergic fibers in healthy sheep spleen. *Dev Immunol* 8: 235– 41.
30. Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD et al. (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 42: 149– 56.
31. Benestad SL, Arsac JN, Goldmann W, Noremark M (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res* 39: 19.
32. Benestad SL, Sarradin P, Thu B et al. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* 153: 202– 8.
33. Berg LJ (1994). Insights into the role of the immune system in prion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 429– 32.
34. Beringue V, Demoy M, Lasmezas CI et al. (2000). Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol* 190: 495– 502.
35. Betmouni S, Perry VH, Gordon JL (1996). Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience* 74: 1–5.
36. Boellaard JW, Kao M, Schlote W, Diringer H (1991). Neuronal autophagy in experimental scrapie. *Acta Neuropathol* 82: 225– 8.
37. Bolea R, Monleon E, Schiller I et al. (2005). Comparison of immunohistochemistry and two rapid tests for detection of abnormal prion protein in different brain regions of sheep with typical scrapie. *J Vet Diagn Invest* 17: 467– 9.
38. Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* 267: 16188– 99.
39. Bossers A, Belt PBGM, Raymond GJ et al. (1997). Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4931– 6.
40. Bossers A, Schreuder BE, Muileman IH, Belt PB, Smits MA (1996). PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol* 77: 2669– 73.
41. Brandner S, Isenmann S, Raeber A et al. (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379: 339– 43.

42. Brandner S, Klein MA, Aguzzi A (1999). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Transfus Clin Biol* 6: 17– 23.
43. Brochard V, Combadière B, Prigent A et al. (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest* 119: 182– 92.
44. Brotherston JG, Renwick CC, Stamp JT, Zlotnik I, Pattison IH (1968). Spread and scrapie by contact to goats and sheep. *J Comp Pathol* 78: 9– 17.
45. Brown DR, Herms J, Kretzschmar HA (1994). Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuro Report* 5: 2057– 60.
46. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 146: 104– 12.
47. Brown KL, Ritchie DL, McBride PA, Bruce ME (2000). Detection of PrP in extraneural tissues. *Microsc Res Tech* 50: 40– 5.
48. Brown KL, Stewart K, Ritchie DL et al. (1999). Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* 5: 1308– 12.
49. Brown P, Bradley R (1998). 1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy. *Br Med J* 317: 1688– 92.
50. Brown P, Gajdusek DC (1991). Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* 337: 269– 70.
51. Brown P, Wolff A, Gajdusek DC (1990). A simple and effective method for inactivating virus infectivity in formalin-fixed tissue samples from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 40: 887– 90.
52. Bruce ME (2003). TSE strain variation. *Br Med Bull* 66: 99– 108.
53. Bruce ME, Dickinson AG (1985). Genetic control of amyloid plaque production and incubation period in scrapie-infected mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 285– 94.
54. Bruce ME, Fraser H (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 172: 125– 38.
55. Bruce ME, Fraser H (1981). Effect of route of infection on the frequency and distribution of cerebral amyloid plaques in scrapie mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 7: 289– 98.

56. Bruce ME, McBride PA, Farquhar CF (1989). Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett* 102: 1– 6.
57. Bruce ME, McConnell I, Fraser H, Dickinson AG (1991). The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J Gen Virol* 72: 595– 603.
58. Bueler H, Aguzzi A, Sailer A et al. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339– 47.
59. Burthem J, Urban B, Pain A, Roberts DJ (2001). The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood* 98: 3733– 8.
60. Campbell IL, Eddleston M, Kemper P, Oldstone MB, Hobbs MV (1994). Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie. *J Virol* 68: 2383– 7.
61. Caplazi P, O'Rourke K, Wolf C, Shaw D, Baszler TV (2004). Biology of PrP^{Sc} accumulation in two natural scrapie-infected sheep flocks. *J Vet Diagn Invest* 16: 489– 96.
62. Capucchio MT, Guarda F, Pozzato N et al. (2001). Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: a comparative study in sheep and goats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48: 23– 31.
63. Cardone F, Thomzig A, Schulz-Schaeffer W et al. (2009). PrPTSE in muscle-associated lymphatic tissue during the preclinical stage of mice infected orally with bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 90: 2563– 8.
64. Carmona P, Monzon M, Monleon E, Badiola JJ, Monreal J (2005). In vivo detection of scrapie cases from blood by infrared spectroscopy. *J Gen Virol* 86: 3425– 31.
65. Carp RI, Callahan SM (1981). In vitro interaction of scrapie agent and mouse peritoneal macrophages. *Intervirology* 16: 8– 13.
66. Carp RI, Callahan SM, Patrick BA, Mehta PD (1994). Interaction of scrapie agent and cells of the lymphoreticular system. *Arch Virol* 136: 255– 68.
67. Carp RI, Meeker HC, Rubenstein R et al. (2000). Characteristics of scrapie isolates derived from hay mites. *J Neurovirol* 6: 137– 44.
68. Carp RI, Ye X, Kascsak RJ, Rubenstein R (1994). The nature of the scrapie agent. Biological characteristics of scrapie in different scrapie strain-host combinations. *Ann N Y Acad Sci* 724: 221– 34.
69. Carroll MC (1998). CD21/CD35 in B cell activation. *Semin Immunol* 10: 279– 86.

70. Casalone C, Corona C, Crescio MI et al. (2005). Pathological prion protein in the tongues of sheep infected with naturally occurring scrapie. *J Virol* 79: 5847– 9.
71. Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J et al. (1990). Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 61: 185– 92.
72. Castiglioni B, Comincini S, Drisaldi B, Motta T, Ferretti L (1998). Comparative mapping of the prion gene (*PRNP*) locus in cattle, sheep and human with PCR-generated probes. *Mamm Genome* 9: 853– 5.
73. Caughey B, Raymond GJ (1991 a). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* 266: 18217– 23.
74. Caughey B, Raymond GJ, Ernst D, Race RE (1991 b). N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J Virol* 65: 6597– 603.
75. Chacon MA, Barria MI, Lorca R, Huidobro-Toro JP, Inestrosa NC (2003). A human prion protein peptide (PrP(59-91) protects against copper neurotoxicity. *Mol Psychiatry* 8: 853– 62.
76. Chaplin DD, Fu Y (1998). Cytokine regulation of secondary lymphoid organ development. *Curr Opin Immunol* 10: 289– 97.
77. Chesebro B, Trifilo M, Race R et al. (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308: 1435– 9.
78. Cho HJ (1976). Is the scrapie agent a virus? *Nature* 262: 411– 2.
79. Choi EM, Geschwind MD, Deering C et al. (2009). Prion proteins in subpopulations of white blood cells from patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lab Invest* 89: 624– 35.
80. Clark AM, Moar JA (1992). Scrapie: a clinical assessment. *Vet Rec* 130: 377– 8.
81. Clark WW (1980). Clinical signs of scrapie in sheep and goats. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc* 84: 479– 82.
82. Collinge J (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24: 519– 50.
83. Combrisson H, Robain G, Brugere H, Brugere-Picoux J (1998). Urodynamic parameters in scrapie-affected ewes and their modifications in the course of the disease. *Neurourol Urodyn* 17: 555– 63.

84. Criado JR, Sanchez-Alavez M, Conti B et al. (2005). Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis* 19: 255– 65.
85. Cuille J, Chelle PL (1939). Experimental transmission of trembling to the goat. *C R Seances Acad Sci* 208: 1058– 160.
86. Cunningham C, Boche D, Perry VH (2002). Transforming growth factor beta1, the dominant cytokine in murine prion disease: influence on inflammatory cytokine synthesis and alteration of vascular extracellular matrix. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28: 107– 19.
87. Davies ML, Hopkins LJ, Halliday S et al. (2004). Architecture of secondary lymphoid tissue in sheep experimentally challenged with scrapie. *Immunology* 111: 230– 6.
88. Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, Hunter N (1998). Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. *Vet Rec* 142: 623– 5.
89. De Bosschere H, Roels S, Benestad SL, Vanopdenbosch E (2004). Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Vet Rec* 155:707– 8.
90. DEFRA (2003). The National Scrapie Plan for Great Britain. Department for Environment, Food and Rural Affairs.
<http://svs.mri.sari.ac.uk/NSP.htm> (14. 12. 2009)
91. Detwiler LA, Baylis M (2003). The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech OIE*: 121– 43.
92. Diaz C, Vitezica ZG, Rupp R, Andreoletti O, Elsen JM (2005). Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock. *J Gen Virol* 86: 849– 57.
93. Diaz-San Segundo F, Salguero FJ, de Avila A et al. (2006). Distribution of the cellular prion protein (PrP^c) in brains of livestock and domesticated species. *Acta Neuropathol* 112: 587– 95.
94. Dickinson AG (1976). Scrapie in sheep and goats. *Front Biol* 44: 209– 41.
95. Dickinson AG, Stamp JT, Renwick CC (1974). Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J Comp Pathol* 84: 19– 25.
96. Diener TO (1972). Is the scrapie agent a viroid? *Nat New Biol* 235: 218– 9.
97. Dorban G, Defaweux V, Demonceau C et al. (2007). Interaction between dendritic cells and nerve fibres in lymphoid organs after oral scrapie exposure. *Virchows Archiv* 451: 1057– 65.

98. Drisaldi B, Stewart RS, Adles C et al. (2003). Mutant PrP is delayed in its exit from the endoplasmic reticulum, but neither wild-type nor mutant PrP undergoes retrotranslocation prior to proteasomal degradation. *J Biol Chem* 278: 21732– 43.
99. Eaton SL, Anderson MJ, Hamilton S et al. (2009). CD21 B cell populations are altered following subcutaneous scrapie inoculation in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 131: 105– 9.
100. Eaton SL, Rocchi M, Gonzalez L et al. (2007). Immunological differences between susceptible and resistant sheep during the preclinical phase of scrapie infection. *J Gen Virol* 88: 1384– 91.
101. Eklund CM, Kennedy RC, Hadlow WJ (1967). Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *J Infect Dis* 117: 15– 22.
102. Elsen JM, Amigues Y, Schelcher F et al. (1999). Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol* 144: 431– 45.
103. Ersdal C, Ulvund MJ, Benestad SL, Tranulis MA (2003). Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Vet Pathol* 40: 164– 74.
104. Ersdal C, Ulvund MJ, Espenes A et al. (2005). Mapping PrP^{Sc} propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. *Vet Pathol* 42: 258– 74.
105. Espinosa JC, Morales M, Castilla J, Rogers M, Torres JM (2007). Progression of prion infectivity in asymptomatic cattle after oral bovine spongiform encephalopathy challenge. *J Gen Virol* 88: 1379– 83.
106. Fairbairn DW, Carnahan KG, Thwaites RN et al. (1994). Detection of apoptosis induced DNA cleavage in scrapie-infected sheep brain. *FEMS Microbiol Lett* 115: 341– 6.
107. Fediaevsky A, Gasqui P, Calavas D, Ducrot C (2009). Discrepant epidemiological patterns between classical and atypical scrapie in sheep flocks under French TSE control measures. *Vet J (v tisku)*
108. Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B (1995). Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50: B378– B82.
109. Fevrier B, Vilette D, Archer F et al. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9683– 8.

110. Field EJ, Shenton BK (1975). Cellular sensitization in kuru, Jakob-Creutzfeldt disease and multiple sclerosis: with a note on the biohazards of slow infection work. *Acta Neurol Scand* 51: 299–309.
111. Forloni G, Angeretti N, Chiesa R et al. (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362: 543– 6.
112. Foster JD, Dickinson AG (1988). The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *Vet Rec* 123: 5– 8.
113. Foster JD, Parnham DW, Hunter N, Bruce M (2001). Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol* 82: 2319– 26.
114. Foster JD, Wilson M, Hunter N (1996). Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. *Vet Rec* 139: 512– 5.
115. Fournier JG, Grigoriev B (2001). Prion diseases: contribution of high-resolution immunomorphology. *J Cell Mol Med* 5: 367– 77.
116. Fox KA, Jewell JE, Williams ES, Miller MW (2006). Patterns of PrPCWD accumulation during the course of chronic wasting disease infection in orally inoculated mule deer (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol* 87: 3451– 61.
117. Franscini N, El Gedaily A, Matthey U et al. (2006). Prion protein in milk. *PLoS ONE* 1: e71.
118. Fraser H (1993). Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *Br Med Bull* 49: 792– 809.
119. Fraser H, Dickinson AG (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol* 78: 301– 11.
120. Fraser H, Farquhar CF (1987). Ionising radiation has no influence on scrapie incubation period in mice. *Vet Microbiol* 13: 211– 23.
121. Frigg R, Klein MA, Hegyi I, Zinkernagel RM, Aguzzi A (1999). Scrapie pathogenesis in subclinically infected B-cell-deficient mice. *J Virol* 73: 9584– 8.
122. Fu YX, Huang G, Wang Y, Chaplin DD (1998). B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin alpha-dependent fashion. *J Exp Med* 187: 1009– 18.
123. Gajdusek DC (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197: 943– 60.

124. Gatti JL, Metayer S, Moudjou M et al. (2002). Prion protein is secreted in soluble forms in the epididymal fluid and proteolytically processed and transported in seminal plasma. *Biol Reprod* 67: 393–400.
125. Gebert A, Rothkotter HJ, Pabst R (1996). M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol* 167: 91–159.
126. Georgsson G, Adolfsdottir JA, Palsdottir A et al. (2008). High incidence of subclinical infection of lymphoid tissues in scrapie-affected sheep flocks. *Arch Virol* 153: 637–44.
127. Georgsson G, Gisladdottir E, Arnadottir S (1993). Quantitative assessment of the astrocytic response in natural scrapie of sheep. *J Comp Pathol* 108: 229–40.
128. Giese A, Groschup MH, Hess B, Kretzschmar HA (1995). Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol* 5: 213–21.
129. Gilmour JS, Bruce ME, MacKellar A (1986). Cerebrovascular amyloidosis in scrapie-affected sheep. *Neuropathol Appl Neurobiol* 12: 173–83.
130. Glatzel M, Aguzzi A (2000). Peripheral pathogenesis of prion diseases. *Microbes Infect* 2: 613–9.
131. Glatzel M, Heppner FL, Albers KM, Aguzzi A (2001). Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron* 31: 25–34.
132. Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Luhers T, Aguzzi A (2005). Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch Neurol* 62: 545–52.
133. Goldmann W (2008). *PrP* genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res* 39: 30.
134. Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J, Hope J (1994). PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol* 75: 989–95.
135. Gonzalez L, Anderson I, Deane D, Summers C, Buxton D (2001). Detection of immune system cells in paraffin wax-embedded ovine tissues. *J Comp Pathol* 125: 41–7.
136. Gonzalez L, Martin S, Begara-McGorum I et al. (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol* 126: 17–29.

137. Gonzalez L, Martin S, Houston FE et al. (2005). Phenotype of disease-associated PrP accumulation in the brain of bovine spongiform encephalopathy experimentally infected sheep. *J Gen Virol* 86: 827– 38.
138. Gonzalez L, Martin S, Jeffrey M (2003). Distinct profiles of PrP(d) immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J Gen Virol* 84: 1339– 50.
139. Groschup MH, Beekes M, McBride PA et al. (1999). Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathol* 98: 453– 7.
140. Groschup MH, Lacroux C, Buschmann A et al. (2007). Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerg Infect Dis* 13: 1201– 7.
141. Gruner L, Elsen JM, Vu Tien KJ et al. (2004). Nematode parasites and scrapie: experiments in sheep and mice. *Parasitol Res* 93: 493– 8.
142. Gundersen HJG, Osterby R (1981). Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology - or do more less well. *J Microsc* 121: 65– 73.
143. Hadlow WJ, Eklund CM, Kennedy RC et al. (1974). Course of experimental scrapie virus infection in the goat. *J Infect Dis* 129: 559– 67.
144. Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE (1982). Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis* 146: 657– 64.
145. Halliday S, Houston F, Hunter N (2005). Expression of PrP^c on cellular components of sheep blood. *J Gen Virol* 86: 1571– 9.
146. Hamir AN, Kunkle RA, Bulgin MS et al. (2008 a). Experimental transmission of scrapie agent to susceptible sheep by intralingual or intracerebral inoculation. *Can J Vet Res* 72: 63– 7.
147. Hamir AN, Kunkle RA, Richt JA, Miller JM, Greenlee JJ (2008 b). Experimental transmission of US scrapie agent by nasal, peritoneal, and conjunctival routes to genetically susceptible sheep. *Vet Pathol* 45: 7– 11.
148. Hamir AN, Miller JM, Schmerr MJ et al. (2001). Diagnosis of preclinical and subclinical scrapie in a naturally infected sheep flock utilizing currently available postmortem diagnostic techniques. *J Vet Diagn Invest* 13: 152– 4.
149. Haritani M, Spencer YI, Wells GA (1994). Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol* 87: 86– 90.

150. Harries-Jones R, Knight R, Will RG et al. (1988). Creutzfeldt-Jakob disease in England and Wales, 1980-1984: a case-control study of potential risk factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51: 1113– 9.
151. Harris DA (1999). Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* 12: 429– 44.
152. Hawkley LC, Cacioppo JT (2004). Stress and the aging immune system. *Brain Behav Immun* 18: 114– 9.
153. Head MW, Ritchie D, Smith N et al. Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic, and variant Creutzfeldt-Jakob disease: an immunohistochemical, quantitative, and biochemical study (2004). *Am J Pathol* 164: 143– 53.
154. Healy AM, Weavers E, McElroy M et al. (2003). The clinical neurology of scrapie in Irish sheep. *J Vet Intern Med* 17: 908– 16.
155. Heggebo R, Gonzalez L, Press CM et al. (2003 a). Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol* 84: 1327– 38.
156. Heggebo R, Press CM, Gunnes G et al. (2000). Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol* 81: 2327– 37.
157. Heggebo R, Press CM, Gunnes G et al. (2003 b). Detection of PrP^{Sc} in lymphoid tissues of lambs experimentally exposed to the scrapie agent. *J Comp Pathol* 128: 172– 81.
158. Heggebo R, Press CM, Gunnes G, Gonzalez L, Jeffrey M (2002). Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol* 83: 479– 89.
159. Heikenwalder M, Zeller N, Seeger H et al. (2005). Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions. *Science* 307: 1107– 10.
160. Heppner FL, Christ AD, Klein MA et al. (2001). Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med* 7: 976– 7.
161. Herrmann LM, Baszler TV, Knowles DP (2000). PrP(c) mRNA, but not PrP(Sc) is found in the salivary glands of scrapie-infected sheep. *Biochim Biophys Acta* 1479: 147– 54.
162. Herrmann LM, Baszler TV, Knowles DP, Cheevers WP (2002). PrP(Sc) is not detected in peripheral blood leukocytes of scrapie-infected sheep: determining the limit of sensitivity by immunohistochemistry. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 499– 502.

163. Herrmann LM, Cheevers WP, Davis WC, Knowles DP, O'Rourke KI (2003). CD21-positive follicular dendritic cells: A possible source of PrP^{Sc} in lymph node macrophages of scrapie-infected sheep. *Am J Pathol* 162: 1075– 81.
164. Herrmann LM, Davis WC, Knowles DP et al. (2001). Cellular prion protein is expressed on peripheral blood mononuclear cells but not platelets of normal and scrapie-infected sheep. *Haematologica* 86: 146– 53.
165. Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Maundrell K, Castilla J, Soto C (2003). Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J* 22: 5435– 45.
166. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28: 254– 60.
167. Hoinville LJ (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech* 15: 827– 52.
168. Holada K, Vostal JG (2000). Different levels of prion protein (PrP^C) expression on hamster, mouse and human blood cells. *Br J Haematol* 110: 472– 80.
169. Horonchik L, Tzaban S, Ben-Zaken O et al. (2005). Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions. *J Biol Chem* 280: 17062– 7.
170. Hortells P, Monzon M, Monleon E et al. (2006). Pathological findings in retina and visual pathways associated to natural Scrapie in sheep. *Brain Res* 1108: 188– 94.
171. Houston EF, Gravenor MB (2003). Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE. *Vet Rec* 152: 333– 4.
172. Houston EF, Halliday SI, Jeffrey M, Goldmann W, Hunter N (2002). New Zealand sheep with scrapie-susceptible PrP genotypes succumb to experimental challenge with a sheep-passaged scrapie isolate (SSBP/1). *J Gen Virol* 83: 1247– 50.
173. Houston F, Goldmann W, Chong A et al. (2003). Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature* 423: 498.
174. Houston F, McCutcheon S, Goldmann W et al. (2008). Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood* 112: 4739– 4745.
175. Hu W, Rosenberg RN, Stuve O (2007). Prion proteins: a biological role beyond prion diseases. *Acta Neurol Scand* 116: 75– 82.
176. Huang FP, Farquhar CF, Mabbott NA, Bruce ME, MacPherson GG (2002). Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol* 83: 267– 71.

177. Hughes PM, Botham MS, Frentzel S, Mir A, Perry VH (2002). Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. *Glia* 37: 314– 27.
178. Hunter GD, Kimberlin RH, Collis S, Millson GC (1973). Viral and non-viral properties of the scrapie agent. *Ann Clin Res* 5: 262– 7.
179. Hunter GD, Kimberlin RH, Gibbons RA (1968). Scrapie: a modified membrane hypothesis. *J Theor Biol* 20: 355– 7.
180. Hunter N, Foster J, Chong A et al. (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* 83: 2897– 905.
181. Hunter N, Foster JD, Goldmann W et al. (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol* 141: 809– 24.
182. Hunter N, Goldmann W, Foster JD, Cairns D, Smith G (1997). Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. *Vet Rec* 141: 137– 40.
183. Hunter N, Goldmann W, Smith G, Hope J (1994). The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch Virol* 137: 171– 7.
184. Hunter N, Moore L, Hosie BD, Dingwall WS, Greig A (1997). Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *Vet Rec* 140: 59– 63.
185. Ironside JW, Head MW, Bell JE, McCardle L, Will RG (2000). Laboratory diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Histopathology* 37: 1– 9.
186. Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H (1988). Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue. *Neurosci Lett* 91: 259– 64.
187. Iwata N, Sato Y, Higuchi Y, Nohtomi K et al. (2006). Distribution of PrP(Sc) in cattle with bovine spongiform encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan. *Jpn J Infect Dis* 59: 100– 7.
188. Jackson GS, Collinge J (2001). The molecular pathology of CJD: old and new variants. *Mol Pathol* 54: 393– 9.
189. Jarrett JT, Lansbury PT, Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73: 1055– 8.
190. Jeffrey M, Begara-McGorum I, Clark S et al. (2002). Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J Comp Pathol* 127: 264– 73.

191. Jeffrey M, Gonzalez L (2004). Pathology and pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Curr Top Microbiol Immunol* 284: 65– 97.
192. Jeffrey M, Gonzalez L (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 373– 94.
193. Jeffrey M, Gonzalez L, Chong A et al. (2006 a). Ovine infection with the agents of scrapie (CH1641 isolate) and bovine spongiform encephalopathy: immunochemical similarities can be resolved by immunohistochemistry. *J Comp Pathol* 134: 17– 29.
194. Jeffrey M, Gonzalez L, Espenes A et al. (2006 b). Transportation of prion protein across the intestinal mucosa of scrapie-susceptible and scrapie-resistant sheep. *J Pathol* 209: 4– 14.
195. Jeffrey M, McGovern G, Martin S, Goodsir CM, Brown KL (2000). Cellular and sub-cellular localisation of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. *Arch Virol Suppl* 23– 38.
196. Kališnik M (2002). Temelji stereometrije. Tretja, predelana izdaja. Ljubljana: Društvo za stereologijo in kvantitativno analizo slike.
197. Kariv-Inbal Z, Ben-Hur T, Grigoriadis NC, Engelstein R, Gabizon R (2006). Urine from scrapie-infected hamsters comprises low levels of prion infectivity. *Neurodegener Dis* 3: 123– 8.
198. Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140: 691– 707.
199. Kelsall BL, Strober W (1996). Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 183: 237– 47.
200. Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E (1997). Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 277: 949– 52.
201. Kim JI, Ju WK, Choi JH et al. (1999). Expression of cytokine genes and increased nuclear factor-kappa B activity in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res Mol Brain Res* 73: 17– 27.
202. Kimberlin RH, Hall SM, Walker CA (1983). Pathogenesis of mouse scrapie. Evidence for direct neural spread of infection to the CNS after injection of sciatic nerve. *J Neurol Sci* 61: 315– 25.

203. Kimberlin RH, Hunter GD (1967). DNA synthesis in scrapie-affected mouse brain. *J Gen Virol* 1: 115– 24.
204. Kimberlin RH, Walker CA (1986). Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J Gen Virol* 67: 255– 63.
205. King C, Tangye SG, Mackay CR (2008). T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol* 26: 741– 66.
206. King CY, Diaz-Avalos R (2004). Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* 428: 319– 23.
207. Kitamura D, Roes J, Kuhn R, Rajewsky K (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350: 423– 6.
208. Klein MA, Frigg R, Flechsig E et al. (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390: 687– 90.
209. Klein MA, Frigg R, Raeber AJ et al. (1998). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med* 4: 1429– 33.
210. Klein MA, Kaeser PS, Schwarz P et al. (2001). Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nature Medicine* 7: 488– 92.
211. Konold T, Moore SJ, Bellworthy SJ, Simmons HA (2008). Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Vet Res* 4: 14.
212. Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T et al. (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400: 225– 6.
213. Lacroux C, Corbiere F, Tabouret G et al. (2007). Dynamics and genetics of PrP^{Sc} placental accumulation in sheep. *J Gen Virol* 88: 1056– 61.
214. Lacroux C, Simon S, Benestad SL et al. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog* 4: e1000238.
215. Latarjet R, Muel B, Haig DA, Clarke MC, Alper T (1970). Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature* 227: 1341– 3.
216. Lee HP, Jun YC, Choi JK et al. (2005). The expression of RANTES and chemokine receptors in the brains of scrapie-infected mice. *J Neuroimmunol* 158: 26– 33.
217. Lefrancois T, Fages C, Brugere-Picoux J, Tardy M (1994). Astroglial reactivity in natural scrapie of sheep. *Microb Pathog* 17: 283– 9.

218. Lewicki H, Tishon A, Homann D et al. (2003). T cells infiltrate the brain in murine and human transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* 77: 3799– 808.
219. Liberski PP, Brown DR, Sikorska B, Caughey B, Brown P (2008). Cell death and autophagy in prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies). *Folia Neuropathol* 46: 1– 25.
220. Ligios C, Cancedda GM, Margalith I et al. (2007). Intraepithelial and interstitial deposition of pathological prion protein in kidneys of scrapie-affected sheep. *PLoS ONE* 2: e859.
221. Ligios C, Cancedda MG, Madau L et al. (2006). PrP(Sc) deposition in nervous tissues without lymphoid tissue involvement is frequently found in ARQ/ARQ Sarda breed sheep preclinically affected with natural scrapie. *Arch Virol* 151: 2007– 20.
222. Ligios C, Dexter G, Spiropoulos J et al. (2004). Distribution of vascular amyloid in scrapie-affected sheep with different genotypes. *J Comp Pathol* 131: 271– 6.
223. Ligios C, Jeffrey M, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Simmons MM (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol* 127: 45– 57.
224. Ligios C, Sigurdson CJ, Santucci C et al. (2005). PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat Med* 11: 1137– 8.
225. Lupi O (2003). Could ectoparasites act as vectors for prion diseases? *Int J Dermatol* 42: 425– 9.
226. Mabbott NA, Brown KL, Manson J, Bruce ME (1997). T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology* 92: 161– 5.
227. Mabbott NA, Bruce ME (2001). The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol* 82: 2307– 18.
228. Mabbott NA, Bruce ME, Botto M, Walport MJ, Pepys MB (2001). Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med* 7: 485– 7.
229. Mabbott NA, Williams A, Farquhar CF et al. (2000). Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie. *J Virol* 74: 3338– 44.
230. Mabbott NA, Young J, McConnell I, Bruce ME (2003). Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J Virol* 77: 6845– 54.
231. Maddison BC, Baker CA, Rees HC et al. (2009). Prions are secreted in milk from clinically normal scrapie-exposed sheep. *J Virol* 83: 8293– 6.

232. Madec JY, Vanier A, Dorier A et al. (1997). Biochemical properties of protease resistant prion protein PrP^{sc} in natural sheep scrapie. *Arch Virol* 142: 1603– 12.
233. Magalhaes AC, Baron GS, Lee KS et al. (2005). Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J Neurosci* 25: 5207– 16.
234. Maignien T, Lasmezas CI, Beringue V, Dormont D, Deslys JP (1999). Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol* 80: 3035– 42.
235. Mallucci G, Dickinson A, Linehan J et al. (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302: 871– 4.
236. Manson JC, Clarke AR, McBride PA, McConnell I, Hope J (1994). PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration* 3: 331– 40.
237. Manuelidis L, Fritch W, Xi YG (1997). Evolution of a strain of CJD that induces BSE-like plaques. *Science* 277: 94– 8.
238. Manuelidis L, Zaitsev I, Koni P et al. (2000). Follicular dendritic cells and dissemination of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 74: 8614– 22.
239. Marcos Z, Pfeifer K, Bodegas ME, Sesma MP, Guembe L (2004). Cellular prion protein is expressed in a subset of neuroendocrine cells of the rat gastrointestinal tract. *J Histochem Cytochem* 52: 1357– 65.
240. Marella M, Gaggioli C, Batoz M et al. (2005). Pathological prion protein exposure switches on neuronal mitogen-activated protein kinase pathway resulting in microglia recruitment. *J Biol Chem* 280: 1529– 34.
241. Maric I, Holt PG, Perdue MH, Bienenstock J (1996). Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine. *J Immunol* 156: 1408– 14.
242. Marsh RF, Malone TG, Semancik JS, Lancaster WD, Hanson RP (1978). Evidence for an essential DNA component in the Scrapie agent. *Nature* 275: 146– 7.
243. Mathiason CK, Powers JG, Dahmes SJ et al. (2006). Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* 314: 133– 6.
244. McBride PA, Beekes M (1999). Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neurosci Lett* 265: 135– 8.

245. McBride PA, Bruce ME, Fraser H (1988). Immunostaining of scrapie cerebral amyloid plaques with antisera raised to scrapie-associated fibrils (SAF). *Neuropathol Appl Neurobiol* 14: 325– 36.
246. McBride PA, Schulz-Schaeffer WJ, Donaldson M et al. (2001). Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* 75: 9320– 7.
247. Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H (2001). Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 159:809– 15.
248. McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG (1988). Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol* 24: 574– 6.
249. McGovern G, Brown KL, Bruce ME, Jeffrey M (2004). Murine scrapie infection causes an abnormal germinal centre reaction in the spleen. *J Comp Pathol* 130: 181– 94.
250. McGovern G, Jeffrey M (2007). Scrapie-specific pathology of sheep lymphoid tissues. *PLoS ONE* 2: e1304.
251. M'Fadyean J (1918). Scrapie. *J Comp Pathol* 31: 102– 31.
252. Miller JM, Jenny AL, Taylor WD et al. (1993). Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J Vet Diagn Invest* 5: 309– 16.
253. Mishra RS, Basu S, Gu Y et al. (2004). Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J Neurosci* 24: 11280– 90.
254. Miyazawa K, Kanaya T, Tanaka S et al. (2007). Immunohistochemical characterization of cell types expressing the cellular prion protein in the small intestine of cattle and mice. *Histochem Cell Biol* 127: 291– 301.
255. Mohri S, Handa S, Tateishi J (1987). Lack of effect of thymus and spleen on the incubation period of Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *J Gen Virol* 68: 1187– 9.
256. Monleon E, Monzon M, Hortells P et al. (2005). Approaches to Scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems. *J Virol Methods* 125: 165– 71.
257. Montrasio F, Frigg R, Glatzel M et al. (2000). Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* 288: 1257– 9.
258. Morel E, Andrieu T, Casagrande F et al. (2005). Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor. *Am J Pathol* 167: 1033– 42.

259. Moudjou M, Frobert Y, Grassi J, La Bonnardiere C (2001). Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol* 82: 2017– 24.
260. Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C et al. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* 289: 1925– 8.
261. Muramatsu Y, Onodera A, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M (1994). Detection of PrP^{Sc} in sheep at the preclinical stage of scrapie and its significance for diagnosis of insidious infection. *Arch Virol* 134: 427– 32.
262. Mühleisen H, Gehrmann J, Meyermann R (1995) Reactive microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21: 505– 17.
263. Narang HK (1974). Ruthenium red and lanthanum nitrate a possible tracer and negative stain for scrapie "particles"? *Acta Neuropathol* 29: 37– 43.
264. Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A (1997). Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* 272: 6324– 31.
265. Nentwig A, Oevermann A, Heim D et al. (2007). Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS Pathog* 3: e82.
266. Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2: 1004– 9.
267. Ning ZY, Zhao DM, Yang JM et al. (2005). Quantification of prion gene expression in brain and peripheral organs of golden hamster by real-time RT-PCR. *Anim Biotechnol* 16: 55– 5.
268. Nitta K, Sakudo A, Masuyama J et al. (2009). Role of cellular prion proteins in the function of macrophages and dendritic cells. *Protein Pept Lett* 16: 239– 46.
269. Nuvolone M, Aguzzi A, Heikenwalder M (2009). Cells and prions: A license to replicate. *FEBS Lett* 16: 2674– 84.
270. OIE (2009). Chapter 2.7.1 3. Scrapie. In: *Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals*.
http://www.oie.int/eng/Normes/mmanual/2008/pdf/2.07.13_SCRAPIE.pdf
(14.12.2009)
271. Okamoto M, Furuoka H, Horiuchi M et al. (2003). Experimental transmission of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) in the small intestinal epithelial cells of neonatal mice. *Vet Pathol* 40: 723– 7.

272. Oldstone MB, Race R, Thomas D et al. (2002). Lymphotoxin-alpha- and lymphotoxin-beta-deficient mice differ in susceptibility to scrapie: evidence against dendritic cell involvement in neuroinvasion. *J Virol* 76: 4357– 63.
273. Onodera T, Saeki K (2000). Japanese scrapie cases. *Jpn J Infect Dis* 53: 56– 61.
274. O'Rourke KI, Baszler TV, Besser TE et al. (2000). Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol* 38: 3254– 9.
275. Pammer J, Suchy A, Rendl M, Tschachler E (1999). Cellular prion protein expressed by bovine squamous epithelia of skin and upper gastrointestinal tract. *Lancet* 354: 1702– 3.
276. Parizek P, Roeckl C, Weber J et al. (2001). Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells. *J Biol Chem* 276: 44627– 32.
277. Parry HB (1962). Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep. *Heredity* 17: 75– 105.
278. Pattison IH, Hoare MN, Jebbett JN, Watson WA (1972). Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet Rec* 90: 465– 8.
279. Pattison IH, Jones KM (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec* 80: 2– 9.
280. Pattison IH, Millson GC (1960). Further observations on the experimental production of scrapie in goats and sheep. *J Comp Pathol* 70: 182– 93.
281. Peretz D, Williamson RA, Kaneko K et al. (2001). Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* 412: 739– 43.
282. Petrie L, Heath B, Harold D (1989). Scrapie: Report of an outbreak and brief review. *Can Vet J* 30: 321– 7.
283. Peyrin JM, Lasmezas CI, Haik S et al. (1999). Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. *Neuro Report* 10: 723– 9.
284. Picard-Hagen N, Gayrard V, Viguie C et al. (2006). Prion protein in the cerebrospinal fluid of healthy and naturally scrapie-affected sheep. *J Gen Virol* 87: 3723– 7.
285. Polak MP, Larska M, Langeveld JP, Buschmann A, Groschup MH, Zmudzinski JF. Diagnosis of the first cases of scrapie in Poland. *Vet J* (v tisku).

286. Post K, Riesner D, Walldorf V, Mehlhorn H (1999). Fly larvae and pupae as vectors for scrapie. *Lancet* 354: 1969– 70.
287. Price CJ, Hoyda TD, Ferguson AV (2008). The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist* 14: 182– 94.
288. Prusiner SB (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136– 44.
289. Prusiner SB (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13363– 83.
290. Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE (1984). Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38: 127– 34.
291. Race R, Jenny A, Sutton D (1998). Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. *J Infect Dis* 178: 949– 53.
292. Race R, Meade-White K, Raines A et al. (2002). Subclinical scrapie infection in a resistant species: persistence, replication, and adaptation of infectivity during four passages. *J Infect Dis* 186 (Suppl. 2): S166– S70.
293. Race R, Oldstone M, Chesebro B (2000). Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol* 74: 828– 33.
294. Race RE, Ernst D, Sutton D (1994). Severe autolysis does not prevent scrapie diagnosis in sheep. *J Vet Diagn Invest* 6: 486– 9.
295. Raeber AJ, Klein MA, Frigg R et al. (1999). PrP-dependent association of prions with splenic but not circulating lymphocytes of scrapie-infected mice. *EMBO J* 18: 2702– 6.
296. Raeber AJ, Muramoto T, Kornberg TB, Prusiner SB (1995). Expression and targeting of Syrian hamster prion protein induced by heat shock in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* 51: 317– 27.
297. Raymond CR, Mabbott NA (2007). Assessing the involvement of migratory dendritic cells in the transfer of the scrapie agent from the immune to peripheral nervous systems. *J Neuroimmunol* 187: 114– 25.
298. Reckzeh C, Hoffmann C, Buschmann A et al. (2007). Rapid testing leads to the underestimation of the scrapie prevalence in an affected sheep and goat flock. *Vet Microbiol* 123: 320– 7.
299. Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P (2001). Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204: 572– 81.

300. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B et al. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2: 361– 7.
301. Reynolds JD, Morris B (1983). The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur J Immunol* 13: 627– 35.
302. Robinson MM (1996). Transmissible encephalopathies and biopharmaceutical production. *Dev Biol Stand* 88: 237– 41.
303. Rogers J, Lubner-Narod J, Styren SD, Civin WH (1988). Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 9: 339– 49.
304. Roucou X, Gains M, LeBlanc AC (2004). Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res* 75: 153– 61.
305. Rubenstein R, Carp RI, Callahan SM (1984). In vitro replication of scrapie agent in a neuronal model: infection of PC12 cells. *J Gen Virol* 65: 2191– 8.
306. Ryder SJ, Dexter GE, Heasman L, Warner R, Moore SJ (2009). Accumulation and dissemination of prion protein in experimental sheep scrapie in the natural host. *BMC Vet Res* 5: 9.
307. Ryder SJ, Spencer YI, Bellerby PJ, March SA (2001). Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Rec* 148: 7– 13.
308. Ryou C (2007). Prions and prion diseases: fundamentals and mechanistic details. *J Microbiol Biotechnol* 17: 1059– 70.
309. Safar JG, Lessard P, Tamguney G et al. (2008). Transmission and detection of prions in feces. *J Infect Dis* 198: 81– 9.
310. Seeger H, Heikenwalder M, Zeller N et al. (2005). Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science* 310: 324– 6.
311. Segundo FD, Sevilla N, Gutierrez JP, Brun A (2008). Altered lymphocyte homeostasis after oral prion infection in mouse. *Vet Immunol Immunopathol* 122: 204– 15.
312. Seidel B, Thomzig A, Buschmann A et al. (2007). Scrapie Agent (Strain 263K) can transmit disease via the oral route after persistence in soil over years. *PLoS ONE* 2: e435.

313. Shlomchik MJ, Radebold K, Duclos N, Manuelidis L (2001). Neuroinvasion by a Creutzfeldt-Jakob disease agent in the absence of B cells and follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9289– 94.
314. Siakotos AN, Raveed D, Longa G (1979). The discovery of a particle unique to brain and spleen subcellular fractions from scrapie-infected mice. *J Gen Virol* 43: 417– 22.
315. Sikorska B, Liberski PP, Brown P (2007). Neuronal autophagy and aggresomes constitute a consistent part of neurodegeneration in experimental scrapie. *Folia Neuropathol* 45: 170– 8.
316. Siso S, Gonzalez L, Jeffrey M et al. (2006). Prion protein in kidneys of scrapie-infected sheep. *Vet Rec* 159: 327– 8.
317. Siso S, Jeffrey M, Gonzalez L (2009). Neuroinvasion in sheep transmissible spongiform encephalopathies: the role of the haematogenous route. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35: 232– 46.
318. Spiropoulos J, Casalone C, Caramelli M, Simmons MM (2007). Immunohistochemistry for PrP^{Sc} in natural scrapie reveals patterns which are associated with the PrP genotype. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 398– 409.
319. St Rose SG, Hunter N, Foster JD et al. (2007). Quantification of Peyer's patches in Cheviot sheep for future scrapie pathogenesis studies. *Vet Immunol Immunopathol* 116: 163– 71.
320. St Rose SG, Hunter N, Matthews L et al. (2006). Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Infect Dis* 6: 5.
321. Stack MJ, Chaplin MJ, Clark J (2002). Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol* 104: 279– 86.
322. Stamp JT (1967). Scrapie and its wider implications. *Br Med Bull* 23: 133– 7.
323. Stichel CC, Luebbert H (2007). Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiol Aging* 28: 1507– 21.
324. Stoltze L, Rezaei H, Jung G et al. (2003). CD4(+) T cell-mediated immunity against prion proteins. *Cell Mol Life Sci* 60: 629– 38.
325. Schwartz M, Cohen I, Lazarov-Spiegler O, Moalem G, Yoles E. The remedy may lie in ourselves: prospects for immune cell therapy in central nervous system protection and repair (1999). *J Mol Med* 77: 713– 7.

326. Summers BA, John F. Cummings JF, De Lahunta A (1995). Veterinary neuropathology. St. Louis: Mosby, 39– 42.
327. Sweeney T, Hanrahan JP (2008). The evidence of associations between prion protein genotype and production, reproduction, and health traits in sheep. *Vet Res* 39: 28.
328. Szpak GM, Lewandowska E, Lechowicz W et al. (2006). The brain immune response in human prion diseases. Microglial activation and microglial disease. I. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Folia Neuropathol* 44: 202– 13.
329. Tanaka M, Chien P, Naber N, Cooke R, Weissman JS (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* 428: 323– 8.
330. Taylor DM (2000). Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. *Vet J* 159: 10– 7.
331. Taylor DM, McBride PA (1987). Autoclaved, formol-fixed scrapie mouse brain is suitable for histopathological examination, but may still be infective. *Acta Neuropathol* 74: 194– 6.
332. Taylor DM, McConnell I, Fraser H (1996). Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice. *J Gen Virol* 77: 1595– 9.
333. Terao A, Apte-Deshpande A, Dousman L et al. (2002). Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus. *J Neuroimmunol* 132: 99– 112.
334. Terry LA, Marsh S, Ryder SJ, Hawkins SA, Wells GA, Spencer YI (2003). Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 152: 387– 92.
335. Thackray AM, Fitzmaurice TJ, Hopkins L, Bujdoso R (2006). Ovine plasma prion protein levels show genotypic variation detected by C-terminal epitopes not exposed in cell-surface PrP^c. *Biochem J* 400: 349– 58.
336. Thomzig A, Schulz-Schaeffer W, Wrede A et al. (2007). Accumulation of pathological prion protein PrP^{Sc} in the skin of animals with experimental and natural scrapie. *PLoS Pathog* 3: e66.
337. Thorbecke GJ, Amin AR, Tsiagbe VK (1994). Biology of germinal centers in lymphoid tissue. *FASEB J* 8: 832– 40.

338. Thorgeirsdottir S, Sigurdarson S, Thorisson HM, Georgsson G, Palsdottir A (1999). PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *J Gen Virol* 80: 2527– 34.
339. Tobler I, Gaus SE, Deboer T et al. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380: 639– 42.
340. Togo T, Akiyama H, Iseki E et al. (2002). Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol* 124: 83– 92.
341. Tranulis MA, Osland A, Bratberg B, Ulvund MJ (1999). Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *J Gen Virol* 80: 1073– 7.
342. Tuo W, O'Rourke KI, Zhuang D et al. (2002). Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrPSc accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6310– 5.
343. van Duijn CM, Asnerie-Laupretre N, Masullo C et al. (1998). Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Lancet* 351: 1081– 5.
344. van Keulen LJ, Bossers A, van Zijderveld F (2008). TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet Res* 39: 24.
345. van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH et al. (1995). Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet Pathol* 32: 299– 308.
346. van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH et al. (1996). Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol* 34: 1228– 31.
347. van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol* (Suppl. 16): 57– 71.
348. van Keulen LJ, Vromans M, Evan Zijderveld FG (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS* 110: 23– 32.
349. van Keulen LJ, Vromans ME, Dolstra CH, Bossers A, van Zijderveld FG (2008). Pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in sheep. *Arch Virol* 153: 445– 53.
350. Vascellari M, Aufiero GM, Nonno R et al. (2005). Diagnosis and PrP genotype target of scrapie in clinically healthy sheep of Massese breed in the framework of a scrapie eradication programme. *Arch Virol* 150: 1959– 76.

351. Vascellari M, Nonno R, Mutinelli F et al. (2007). PrP^{Sc} in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J Virol* 81: 4872– 6.
352. Veterinary Laboratory Agency (1999). BSE and scrapie: Guidelines on safe working procedures in histopathological laboratories and post-mortem rooms. Surrey: Veterinary Laboratory Agency. 14 str.
<http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/eeb/pdf/vet.pdf> (14.12.2009)
353. Vitezica ZG, Moreno CR, Bodin L et al. (2006). No associations between PrP genotypes and reproduction traits in INRA 401 sheep. *J Anim Sci* 84: 1317– 22.
354. Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC et al. (1999). Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40: 1679– 82.
355. Ware CF, VanArsdale TL, Crowe PD, Browning JL (1995). The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr Top Microbiol Immunol* 198: 175– 218.
356. Webb PR, Powell L, Denyer M et al. (2009). A retrospective immunohistochemical study reveals atypical scrapie has existed in the United Kingdom since at least 1987. *J Vet Diagn Invest* 21: 826– 9.
357. Weissmann C, Raeber AJ, Montrasio F et al. (2001). Prions and the lymphoreticular system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 177– 84.
358. White AR, Enever P, Tayebi M et al. (2003). Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* 422: 80– 3.
359. Wientjens DP, Davanipour Z, Hofman A et al. (1996). Risk factors for Creutzfeldt-Jakob disease: a reanalysis of case-control studies. *Neurology* 46: 1287– 91.
360. Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* 123: 638– 44.
361. Williams A, Lucassen PJ, Ritchie D, Bruce M (1997). PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol* 144: 433– 8.
362. Williams A, Van Dam AM, Ritchie D, Eikelenboom P, Fraser H (1997). Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. *Brain Res* 754: 171– 80.
363. Williams AE, Lawson LJ, Perry VH, Fraser H (1994). Characterization of the microglial response in murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 47– 55.
364. Williams ES. Chronic wasting disease (2005). *Vet Pathol* 42: 530– 49.

365. Wood JL, Lund LJ, Done SH (1992). The natural occurrence of scrapie in moufflon. *Vet Rec* 130: 25– 7.
366. Wood JL, McGill IS, Done SH, Bradley R (1997). Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec* 140: 167– 74.
367. Wood JN, Done SH, Pritchard GC, Wooldridge MJ (1992). Natural scrapie in goats: case histories and clinical signs. *Vet Rec* 131: 66– 8.
368. Wrathall AE, Holyoak GR, Parsonson IM, Simmons HA (2008). Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques. *Theriogenology* 70: 725– 45.
369. Yamada M, Itoh Y, Shintaku M et al. (1996). Immune reactions associated with cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 27: 1155– 62.
370. Yamanaka N, Matsuyama H, Harabuchi Y, Kataura A (1992). Distribution of lymphoid cells in tonsillar compartments in relation to infection and age. A quantitative study using image analysis. *Acta Otolaryngol* 112: 128– 37.
371. Zabavnik Piano J, Cotman M, Pogačnik M, Junes P (2004). Scrapie-susceptibility-linked polymorphisms of the prion protein gene in Istrian Pramenka sheep. *Slo Vet Res* 41: 83– 8.
372. Zabavnik Piano J, Cotman M, Pogačnik M, Ambrožič I, Junes P (2006). Določanje dovzetnosti ovac na praskavec z genotipizacijo gena za prionski protein (*PRNP*). *Vet Nov (Suppl. 3)*: 65– 6.
373. Zabel MD, Heikenwalder M, Prinz M et al. (2007). Stromal complement receptor CD21/35 facilitates lymphoid prion colonization and pathogenesis. *J Immunol* 179: 6144– 52.
374. Zanusso G, Casalone C, Acutis P et al. (2003). Molecular analysis of iatrogenic scrapie in Italy. *J Gen Virol* 84: 1047– 52.
375. Zhang CC, Steele AD, Lindquist S, Lodish HF (2006). Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2184– 9.
376. Zlotnik I (1957). Significance of vacuolated neurones in the medulla of sheep affected with scrapie. *Nature* 180: 393– 4.