

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire
ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 114 (1972)

Heft: 1

Artikel: Antiprotein-Immunisierung bei der hochträchtigen Kuh

Autor: Fey, Hans / Marti, Fritz

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-589654>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 11.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Aus dem Veterinär-bakteriologischen Institut der Universität Bern

Antiprotein-Immunisierung bei der hochträchtigen Kuh

Von Hans Fey und Fritz Marti¹

1. Einleitung

Bei der Prophylaxe von Aufzuchtkrankheiten (Infektionen mit *E. coli* und Pneumokokken) wird die Vakzination des hochträchtigen Muttertieres seit Jahrzehnten praktiziert. Wir haben uns dabei immer einer Suspension des fraglichen Keimes in Puffer bedient und die Vakzine sukutan appliziert. Im allgemeinen verwenden wir eine Bakteriendichte von ca. 10^9 Bakterien/ml und injizieren im Abstand von 1 bis 2 Wochen je 30 ml. In der experimentellen Immunologie wird seit langer Zeit das Antigen nicht in wässriger Lösung oder Suspension verwendet, sondern emulgiert in Freundschem Adjuvans, einem Gemisch von Aquaphil, Paraffinöl und Tuberkelbakterien für das komplette Adjuvans. Das inkomplette Adjuvans enthält keine Tuberkelbakterien.

Die Antigenität wird dadurch beträchtlich gesteigert. Unseres Wissens verwendeten Gay, McKay und Barnum (1964) als erste eine Colivakzine zusammen mit inkomplettem Freundschem Adjuvans zur Vakzination von trächtigen Kühen. Die dabei erzielten O- und K-Antikörpertiter waren durchaus vergleichbar denjenigen, die bei hoch immunisierten Kaninchen zu erreichen sind. Bei Kühen muß das inkomplette Freundsche Adjuvans verwendet werden, weil die Tiere mit dem tuberkelhaltigen kompletten Adjuvans tuberkulinpositiv werden. Angeregt durch diese Arbeit von Gay, McKay und Barnum, immunisierte der eine von uns (H.F.) trächtige Kuh mit *Salmonella*-H-Antigenen und mit Pferdeferritin, inkorporiert in inkomplettem Freundschem Adjuvans und erzielte hohe bis sehr hohe H-Agglutinationstiter, bzw. ein sehr kräftig präzipitierendes Antiferritin-Antiserum.

Die Tatsache, daß die im Blut zirkulierenden Antikörper im 1. und 2. Ge-
melk nach der Geburt in hoher Konzentration vorliegen, wirkt sich für die Serumgewinnung besonders günstig aus. Diese vorläufigen Resultate veranlaßten uns, die Möglichkeit der Produktion von Antiproteinseren in der trächtigen Kuh einer systematischen Untersuchung zu unterziehen, um so mehr als Hammer, Kickhöfen und Henning (1968) über ähnlich gute Erfahrungen berichteten. Alle kolostralen Antikörper der Kuh stammen aus dem Blutserum und werden nicht lokal im Euter gebildet, wo nur wenige Plasmazellen nachgewiesen werden können. Der Gehalt an Immunoglobulin G (IgG) fällt im Blutserum 2 bis 3 Wochen vor der Geburt langsam ab. Gleichzeitig inkorporiert das Euter IgG aus dem Blutserum, so daß die IgG-Konzentration im Colostrum bei der Geburt ca. 5mal höher ist als im

¹ Nach der gleichnamigen Dissertation von Fritz Marti, Bern 1971.

Blutserum. Es findet ein selektiver Transport von IgG aus dem Blutserum statt (Dixon, Weigle und Vazquez, 1961).

Nach Kickhöfen, Hammer und Scheel (1968) besteht die selektiv transportierte Immunglobulinfraktion hauptsächlich aus IgGs. IgGs oder Sekret-Gammaglobulin besitzt ein Molekulargewicht von 163 000. IgGs ist ein elektrophoretisch schnell wanderndes Protein mit einer Sedimentationskonstante von 7 S. Es besitzt gemeinsame determinante Gruppen mit dem schnellen Serum IgG₁ und dem langsamen Serum IgG₂. Das bovine Colostrum enthält nur sehr wenig Immunoglobulin A, welches die Hauptkomponente der menschlichen Colostrumglobuline darstellt. Im Gegensatz zum IgG zeichnet sich das IgA durch einen hohen Hexosegehalt aus (6–8%), außerdem erscheint es im Sekret zusammen mit einem Transportstück als Dimer und weist dann eine Sedimentationskonstante von 11 S auf. Das IgGs des bovinen Colostrums hat ebenfalls einen hohen Kohlehydratgehalt, aber ein dem IgA analoges Transportstück wurde bisher nicht gefunden, und die Frage, auf welche Weise IgGs selektiv in das Euter und von da in das Colostrum transportiert wird, ist noch offen.

2. Material und Methoden

Als Antigene verwendeten wir ausschließlich Proteine, deren Antiseren in der Diagnostik oder in der Forschung häufig gebraucht werden.

2.1. *Salmonella H-Antigene*

H-Antigene wichtiger Phasen wurden mit Teststämmen aus der Schweizerischen Salmonellazentrale nach den gebräuchlichen Methoden über Schwärmläppchen gewonnen, denen Antiserum der unerwünschten Phase hinzugegeben worden war. Die Dichte der H-Antigene wurde auf 8×10^7 bzw. 8×10^8 Keime/ml eingestellt.

2.2. *Ferritin*

Dies ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 900 000. Wir verwendeten Ferritin zweimal kristallisiert, gewonnen aus Pferdemilz (Pentex, Biochemicals Kanakee, Illinois, USA) mit einem Proteingehalt von 106 mg/ml. Anti-Ferritin-Colostrumserum wurde von Fey für den Nachweis der Antikörperresorption aus dem Dünndarm des neugeborenen Kalbes verwendet (1971).

2.3. *Kaninchen-Immunglobulin (IgG)*

Dieses Protein verwendeten wir, weil anti-Kaninchen IgG für die indirekte Immuno-fluoreszenz Verwendung findet. Das IgG wurde mit 50% gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt, danach zweimal mit 40% gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen, in wenig NaCl gelöst und sulfatfrei dialysiert. Das IgG wurde gereinigt durch Ionenaustauschan DEAE-Zellulose (Whatman DE 52, microgranular), äquilibriert mit einem Phosphatpuffer 0,01 M, pH 7,6. Das so gewonnene IgG war immuno-elektrophoretisch rein.

2.4. *Human O-Serum*

Anti-Human O-Serum und anti-Human IgG-Seren werden gebraucht zum Nachweis inkompletter Antikörper mit dem Coombs-Test. Unser Human O-Serum (freundlicherweise überlassen von Herrn PD Dr. R. Bütler, Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes vom Schweiz. Roten Kreuz, Bern) wies einen Gesamteiweißgehalt auf von 7,3 g% mit folgenden Fraktionen: Albumin 56%; α_1 -Globulin 4%; α_2 -Globulin 12%; β -Globulin 11%; γ -Globulin 17%.

2.5. Human IgG

Das Präparat stammte ebenfalls vom Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweiz. Roten Kreuzes. Der Proteingehalt betrug 16 g%, das Verhältnis von IgG: IgM:IgA = 1220:12:1.

2.6. Hitzeaggregiertes Human IgG

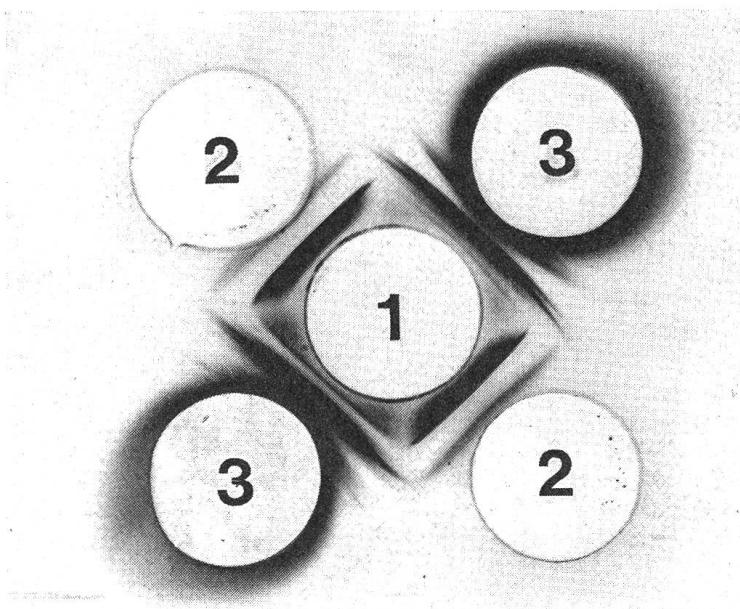
Da die Immunisierung von Kühen mit Human O-Serum und mit Human IgG schlechte präzipitierende Antiseren ergab, aggregierten wir das IgG nach Ishizaka und Ishizaka (1959) mit Hitze. Es wird angenommen, daß ein Antigen zur Stimulierung von Antikörperproduktion phagozytiert werden muß, die Phagozytose wird gesteigert durch Aggregation der Moleküle.

Zur Aggregation wurde Human IgG auf eine Konzentration von 2% eingestellt, auf 63° während 10 Min. erwärmt, anschließend mit Brunnenwasser rasch abgekühlt und mit einer gleichen Menge einer 1,24 M Na₂SO₄-Lösung versetzt (Endkonzentration 0,62 M), danach wird die IgG-Lösung bei Zimmertemperatur 1 Std. gerührt und dann 30 Min. scharf zentrifugiert, in PBS bei pH 7,5 aufgenommen und dialysiert. Das in PBS pH 7,5 unlösliche Aggregat wird auf einen Proteingehalt von 100 mg/ml eingestellt.

Hitzeaggregiertes IgG zeigt gegenüber nativem IgG ein stark gesteigertes Komplementbindungsvermögen. Das hitzeaggregierte IgG weist gegenüber dem nativen IgG einen Antigenverlust auf (Nachweis durch Ouchterlony-Präzipitation), aber die übrigbleibende Linie zeigt Identitätsreaktion zwischen beiden Antigenen (Abb. 1).

Abb. 1

- 1 = Kaninchen
anti-Human IgG
- 2 = Human IgG
hitzeaggregiert
- 3 = Human IgG nativ



2.7. Vakzineherstellung und Applikation

Die gewünschte Menge des jeweiligen Antigens in 3 ml NaCl wurde mit 3 ml inkomplettem Freund-Adjuvans emulgiert. Diese 6 ml Vakzine wurden den Kühen intramuskulär 5 bis 6 cm tief in den M. glutaeus und M. semimembranaceus und in die Halsmuskulatur injiziert.

Von den 78 immunisierten Kühen zeigten 60 keine Impfreaktionen, 13 reagierten mit einer leichten schmerzhaften Schwellung und mit einer nuß- bis eigroßen Ver-

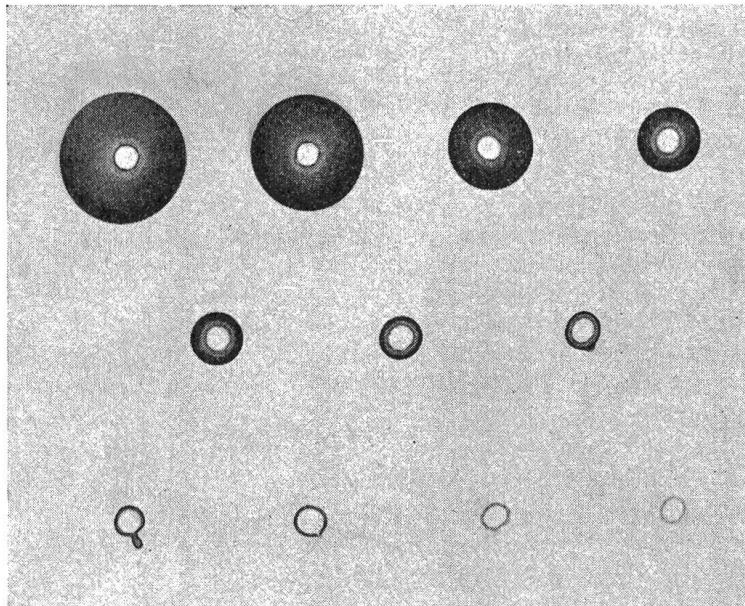
dicke. Fünf Kühe entwickelten schwere schmerzhafte Entzündungen und kindskopfgroße Geschwülste, die sich bei zwei Tieren zu einem Abszeß mit ca. 3 l Eiter entwickelten (*Sph. necrophorus* und *C. pyogenes*). Nach einem Jahr persistierten bei allen Kühen nußgroße Verdickungen, die Vakzination hatte zu keiner Zeit Einfluß auf die Milchleistung.

2.8. Auswertung der Colostrum- und Blut-Antiseren

Die Auswertung der anti *Salmonella* H-Seren beschränkte sich auf die Röhrchen- und Objektträgeragglutination. Die Auswertung von Antiproteinseren (Ferritin u.a.) erfolgte mit der Mikro-Immunoelktrophorese nach Scheidegger (1955), wie beschrieben von Fey, Nicolet, von Fellenberg und Margadant (1964), ferner mit der Agargelpräzipitation nach Ouchterlony (1958, 1962). Diese qualitativen und semiquantitativen Tests wurden ergänzt durch die Antikörpermessung mit Hilfe der quantitativen Immunodiffusion nach Mancini, Carbonara und Heremans (1965) in der Modifikation von Lopez und Golder (1968): 2% Noble-Agar wird bei 50° mit der gleichen Menge Antiserumverdünnung in NaCl gemischt und mit Hilfe einer Form auf einer Glasplatte zu einer 1 mm dicken Agar-Antiserumschicht gegossen. In den Agar werden Bassins mit einem Durchmesser von 2 mm gebohrt, in die mit einer Hamilton-Mikrospritze 1,5 μ l der Antigenverdünnung eingefüllt werden. Nach einer Diffusionszeit von 48 Std. entstehen ringförmige Präzipitationshöfe, deren Durchmesser mit einer Meßlupe WILD bei 20facher Vergrößerung gemessen werden. Die Quadrate der Durchmesser der Präzipitationshöfe eines Antigens werden mit denjenigen eines Standardantigens auf einer Eichkurve verglichen. Abb. 2 zeigt eine Antiserumauswertung nach Mancini.

Abb. 2:

Quantitative Immuno-diffusion mit Colostrum-anti-Ferritinserum, 1/50 verdünnt und mit Antigenverdünnungen von Ferritin 106 mg/ml.



Oberste Bassinreihe, von links: Antigenverdünnungen 1/20 1/40 1/80 1/160.

Mittlere Bassinreihe, von links: 1/320 1/640 1/1280

Unterste Bassinreihe, von links: 1/2560 1/5120 1/10240 1/20480

Präzipitierende Antiseren wurden ferner mit der photometrischen Trübmessung von Antigen-Antikörperreaktionen nach Schulze und Schwick (1959) ausgewertet, die allerdings definitionsgemäß für die Messung inkompletter Antikörper

ungeeignet ist. Da die Sensitivität dieser Methode beträchtlich geringer ist als diejenige des Mancini-Testes, wurde sie nur bei einigen anti-Ferritinseren verwendet, aber im übrigen nicht weiter verfolgt. Zur weiteren Charakterisierung unserer anti-Proteinseren bedienten wir uns der indirekten Hämagglutinationstechnik nach Avrameas, Taudou und Chuilon (1969), bei der das Proteinantigen mit Hilfe von Glutardialdehyd an Erythrozyten fixiert wird: zu 10 ml Phosphatpuffer 0,15 M, pH 7,5, wird die gewünschte Menge Protein zugegeben (50 mg Ferritin, 12 mg Human- bzw. Kaninchen IgG). Zu dieser Antigenverdünnung werden bei Zimmertemperatur unter leichtem Rühren 0,4 ml frische, 3mal gewaschene Schaferythrozyten gegeben. Nicht alle Schafe sind als Spender brauchbar. 1 ml einer 2,5%igen Glutardialdehydlösung wird unter Rühren tropfenweise zugegeben und 2 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Die also sensibilisierten Erythrozyten werden in 20 ml PBS (pH 7,2) aufgenommen, welches 1% Kaninchenserum enthält.

Sowohl die auszuwertenden Antiseren wie das Kaninchenserum werden vor der Reaktion mit Glutardialdehyd-fixierten Erythrozyten absorbiert (5 ml Serum + 0,5 ml Glutardialdehyd-fixierte Erythrozyten, 2 Std. rühren bei Zimmertemperatur). Das Antiserum wird mit PBS, pH 7,5, enthaltend 1% absorbiertes Kaninchenserum, in Mengen von 0,5 ml verdünnt (Pipettenwechsel!). Zu den Antiserumverdünnungen werden 0,1 ml sensibilisierte Erythrozyten gegeben, leicht geschüttelt, und nach 12 Std. bei 4° wird die Reaktion abgelesen.

2.9. Herstellung von fluoreszierenden Antikörpern

Zur Fluochromierung unserer anti-Proteinseren benutzten wir die an unserem Institut übliche Technik, die eine Modifikation der Methode von Wood et al. (1965) darstellt.

Zur mikroskopischen Auswertung der Konjugate bedienten wir uns der neuen Einrichtung von WILD mit einer Quarzjodlampe und einem Kanten-Interferenzfilter, wie sie von Fey und Braun (1971) beschrieben wurde. Die Auswertung von Konjugaten gegen partikuläre Antigene (z.B. Salmonellen) bietet mit einem Objektträgerausstrich keine Schwierigkeiten. Das Problem der Auswertung eines fluoreszierenden Antiserums gegen gelöste Antigene (z.B. Polysaccharide oder Proteine) lösten wir mit folgender, von uns entwickelter Technik: Wir präzipitierten das lösliche Antigen mit dem spezifischen Antiserum ungefähr im Äquivalenzpunkt von Antigen und Antiserum und inkubierten bei 37°. Das Präzipitat wird 3mal gewaschen, anschließend kann es als jetzt insolubles partikuläres Antigen auf einem Objektträger wie ein Blutausstrich ausgestrichen und nach Fixation mit dem fluoreszierenden Antikörper markiert werden.

Für die immunohistologische Verwendung der Konjugate wurden diese mit Hilfe von Anionenaustausch an DEAE-Zellulose (DE 52 Whatman) fraktioniert: das fluoreszierende Antiserum wird gegen Phosphatpuffer, pH 8,0, 0,02 M, dialysiert und anschließend auf eine Chromatographiesäule mit DEAE-Zellulose aufgetragen, welche mit dem gleichen Phosphatpuffer äquilibriert ist. Die Elution erfolgt schrittweise mit folgenden Puffern:

1. Phosphatpuffer 0,02 M
2. Phosphatpuffer 0,02 M + NaCl 0,03 M
3. Phosphatpuffer 0,02 M + NaCl 0,14 M
4. Phosphatpuffer 0,02 M + NaCl 0,28 M

Meistens enthält die Fraktion Nr. 3 das optimal gekoppelte Konjugat.

2.10. Die immunohistologische Technik

entsprach im wesentlichen derjenigen von Coons et al. (1951, 1955) und Leduc et al. (1955). Meerschweinchen wurden mit Ferritin in komplettem Freund-Adjuvans

im Abstand von einem Monat zweimal immunisiert und 10 Tage nach dem Sekundär-Stimulus die Popliteallymphknoten entnommen. Diese wurden in 4%iger Formaldehydlösung fixiert, während mindestens 24 Std., dann in PBS entformalinisiert, ca. 1 bis 3 Std. lang, und anschließend Kryostatschnitte hergestellt. Die 10 μ dicken Gewebeschnitte wurden 30 Min. bei minus 20°C getrocknet, dann 15 Min. in gesättigte Ammonsulfatlösung eingelegt, damit sie besser auf dem Objektträger haften (auf gereinigten Objektträgern haften die Schnitte schlecht). Nach dreimaligem Waschen (je 5 Min.) in PBS pH 8,0 wurden sie mit Ferritin (1 mg/ml) überschichtet und 30 Min. inkubiert, darauf mit PBS gewaschen und mit dem Antiferritin-Konjugat gefärbt.

3. Resultate

3.1. *Salmonella H-Antigene*

Mit jedem H-Antigen wurden 4 Kühe immunisiert, 2 mit total 8×10^8 und 2 mit 8×10^7 Keimen. Die Vakzination erfolgte 3 Wochen vor der Geburt. Jeder Kuh wurde vor der Vakzination sowie nach der Geburt Blut entnommen, ferner das 1. und 2. Colostrum. Bei der Auswertung der Colostrumseren zeigte es sich, daß Pipettenwechsel unerlässlich ist. Wegen der Viskosität des Colostrumserums entsteht ohne Pipettenwechsel eine Titersteigerung von 2 bis 4 Stufen gegenüber der Agglutinationsreihe mit Pipettenwechsel. Die zur Immunisierung verwendeten H-Antigene sind in der Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1 *Salmonella H-Antigene, die zur Immunisierung der Kühe verwendet wurden.*

H-Antigen	Species	Antigenformel
H 1, 2	<i>S. paratyphi B</i>	1, 4, 5, 12 : b : 1, 2
H 1, 5	<i>S. thompson</i>	6, 7 : - : 1, 5
H 1, 6	<i>S. london</i>	3, 10 : 1, v : 1, 6
H 1, 7	<i>S. bredeney</i>	1, 4, 12, 27 : 1, v : 1, 7
H b	<i>S. minnesota</i>	21 : b : -
H d	<i>S. typhi</i>	9, 12 : d : -
H e, n, x	<i>S. abortus equi</i>	4, 12 : - : e, n, x
H g, m	<i>S. enteritidis</i>	9, 12 : g, m : -
H i	<i>S. typhi murium</i>	1, 4, 5, 12 : i : (1, 2)
H 1, v	<i>S. panama</i>	1, 9, 12 : 1, v : 1, 5

Insgesamt wurden 40 Kühe immunisiert mit 10 verschiedenen H-Antigenen. Nur 6 dieser Kühe wiesen im Probeblut vor der Immunisierung einen Titer zwischen 1/20 und 1/40 auf. In der Tab. 2 ist die Häufigkeit der H-Agglutinationstiter sämtlicher geprüfter Seren aufgeführt.

Die Titer des 1. und 2. Colostrums bewegen sich in der Regel zwischen 2560 bis 10 240 (ausnahmsweise 20 480), die Blutserumtitre im Bereich von 320 bis 2560. Die Titer des 1. Colostrumserums sind oft, aber nicht regelmäßig eine bis zwei Stufen höher als die Titer des 2. Colostrumserums. Es ist kein eindeutiger Titerunterschied festzustellen zwischen den Colostrum- und Blutseren von Kühen, die mit 8×10^7 bzw. 8×10^8 Keimen immunisiert

Tab. 2 Zusammenstellung der Resultate der Salmonellen H-Antiseren.

Art des Antiserums	Anzahl Antiseren mit Titer von							
	20 480	10 240	5 120	2 560	1 280	640	320	160 und weniger
Colostrum-serum I	2	4	13	9	3	3	2	1
Colostrum-serum II	1	0	7	13	3	5	0	2
Blutserum	0	0	2	4	14	6	3	6

wurden. Ebensowenig ergaben sich regelmäßige Zusammenhänge zwischen Titerhöhe und Intervall zwischen Impfung und Geburt: die kürzeste Immunisierungsdauer betrug 10 Tage und führte zu einem Colostrumtiter von 2560, die längste Dauer war 55 Tage, mit einem Titer von 2560. Dazwischen liegen längere und kürzere Immunisierungszeiten mit hohen und niedrigen Titern und umgekehrt. Es ist auch keine Abhängigkeit des Impftiters von der Art des Antigens erkennbar.

Summarisch kann festgehalten werden, daß die erzielten Titer ebenso hoch oder höher liegen als diejenigen sehr guter Kaninchen-Immunseren, die in der Schweizerischen Salmonellazentrale zur Anwendung gelangen, wobei zu berücksichtigen ist, daß jene Impftiter mit einer einzigen Injektion 10 bis 55 Tage vor der Geburt erreicht wurden. Die Brauchbarkeit dieser Antiseren geht auch daraus hervor, daß sie in der Objektträger-Agglutination in den Verdünnungen von 1:100 bis 1:400 starke Reaktionen ergaben.

Zur Überprüfung der Spezifität dieser H-Seren, bzw. deren Brauchbarkeit für die diagnostische Salmonellatypisierung, wurden die homologen O-Titer – und unter Verwendung von 17 weiteren H-Antigenen auch die heterologen H-Titer – der jeweiligen 1. Colostrumseren bestimmt. Die homologen O-Titer aller geprüften H-Seren bewegten sich zwischen 1/20 und 1/640 und waren in der Gebrauchsverdünnung der Objektträger-Agglutination nicht störend. Die heterologen H-Titer der geprüften Seren waren zumeist unbedeutend. Hingegen waren offenbar die Immunisierungsstämme H 1, 2; H 1, v und H 1, 6 nicht ganz monophasisch gewesen, weil die entsprechenden H-Seren heterologe Titer gegen die andere Phase bis 1/640 aufwiesen. Es zeigte sich somit auch hier, daß zur Herstellung von *Salmonella* H-Seren mit Vorteil monophasische Stämme verwendet werden sollten, sofern solche zur Verfügung stehen.

Die H-Seren waren auch hochtitrig genug für die Herstellung von Faktorenseren.

3.2. *Anti-Ferritin, anti-Kaninchen IgG und anti-Human IgG*

Mit Ferritin und Kaninchen-IgG wurden je 4 Kühe immunisiert, und zwar je 2 mit 3×300 mg (total 900 mg) und je 2 mit 3×30 mg (total 90 mg) Ferritin bzw. 3×100 mg (total 300 mg) Kaninchen-IgG. Das Zeitintervall

3.2.1. Tab. 3 Immunoelektrophorese und Agargelpräzipitation der Antiseren anti-Ferritin, anti-Kaninchchen IgG und anti-Human IgG.

Nr. der Kuh	Applizierte Antigenmenge in mg	Vakzinationen 1. 2. 3. Tage vor der Geburt	Immunoelektrophorese			Agargelpräzipitation: Antigenverdünnungen bei Verwen- dung von unverdünnten Antiseren gegen		
			Colostrum- serum I	Colostrum- serum II	Blutserum	Colostrum- serum I	Colostrum- serum II	Blutserum
<i>Ferritin</i>								
43	3 mal 300	54 49 21	+++	+++	+++	1280	1280	640
44	3 mal 300	51 46 18	+++	+++	+++	2560	2560	640
45	3 mal 30	61 56 28	+++	+++	+++	1280	1280	640
46	3 mal 30	68 63 35	+++	+++	+++	1280	1280	320
<i>Kaninchchen IgG</i>								
50	3 mal 100	69 61 45	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
51	3 mal 300	45 37 7	+++	+++	+++	640	640	640
52	3 mal 300	49 41 11	+++	+++	+	320	320	320
53	3 mal 100	105* 97 77	-	-	-	-	-	-
<i>Human IgG, hitzeaggregiert</i>								
71	3 mal 300	49 42 14	+++	+++	+++	160	160	40

* Die Geburt dieser Kuh wurde nicht gemeldet. Die Blutentnahme erfolgte deshalb zu spät.

+++ sehr starke Präzipitationslinie
++ starke Präzipitationslinie
+ schwache Präzipitationslinie
- Antiserum nicht vorhanden

zwischen der 1. und 2. Vakzination betrug 5 Tage, zwischen der 2. und 3. Vakzination 28 Tage; das Intervall zwischen der 3. Impfung und der Geburt 2 bis 3 Wochen. Mit hitzeaggregiertem Human IgG wurde eine Kuh 7, 6 und 2 Wochen vor der Geburt mit je 300 mg immunisiert. In der Tab. 3 sind die Resultate der Auswertung dieser Antiseren mit Hilfe der Mikroimmunoelktrophorese nach Scheidegger (1955) und der Agargelpräzipitation nach Ouchterlony ersichtlich. Wie die Abb. 3, 4, 5 zeigen, entwickelten sämtliche Antiseren in der Immunoelektrophorese kräftige Liniens, besonders ausgeprägt bei allen 4 anti-Ferritinseren.

Abb. 3

Immunoelektrophorese mit Ferritin 10,6 mg/ml und mit Colostrum-anti-Ferritinserum Nr. 44 (Colostrumserum I).

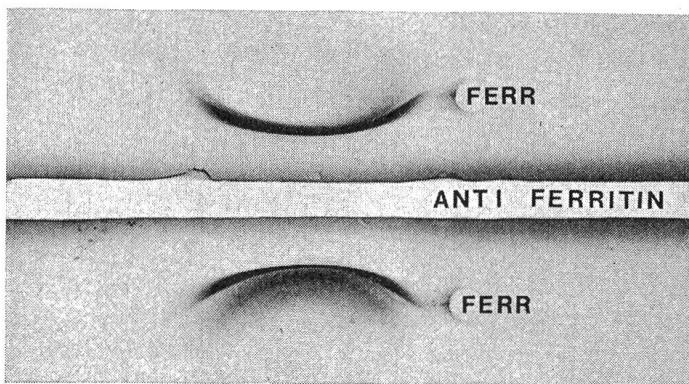
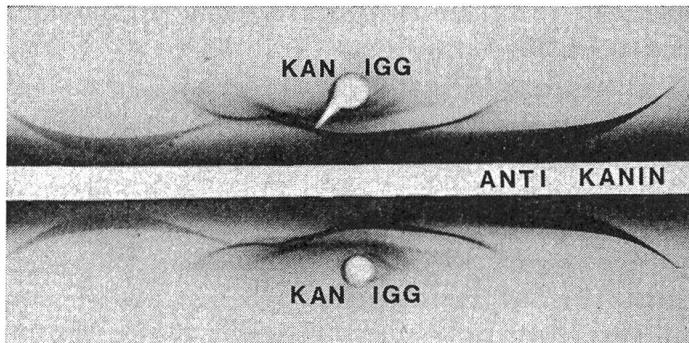


Abb. 4

Immunoelektrophorese mit Kaninchen IgG 47 mg/ml und mit Colostrum-anti-Kaninchen IgG Nr. 51 (Colostrumserum I).



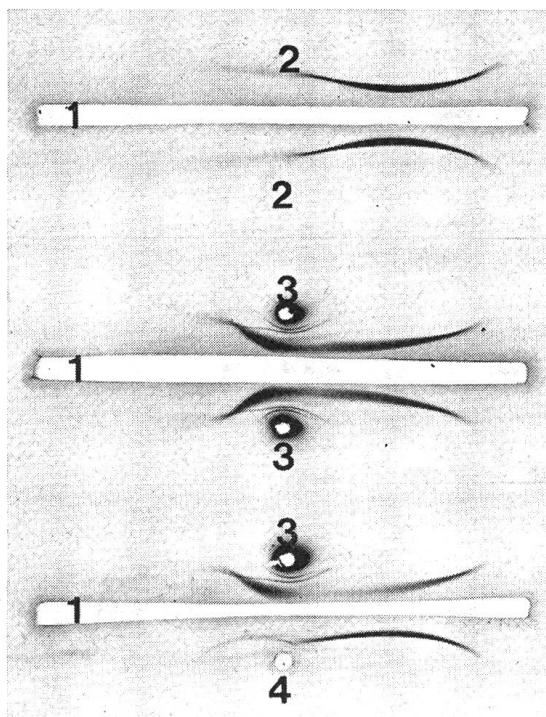
Demgegenüber verlief eine in ähnlicher Weise durchgeführte Immunisierung mit Human O-Serum (900 mg bzw. 300 mg) und Human IgG (Ammoniumsulfat gefällt, 900 mg bzw. 300 mg bzw. 3000 mg) erfolglos. Offenbar hat also die Hitzeaggregation des Human IgG wesentlich zur Verbesserung von dessen Antigenität beigetragen. Da dieses Antiserum von einer einzigen Kuh stammt, bedarf dieser Immunisierungserfolg einer weiteren Bestätigung.

Die Immunisierung von 2 Kühen mit 900 bzw. 100 mg Peroxydase verlief ebenfalls negativ. Dieses Antigen wurde deshalb gewählt, weil Peroxydase-Antikörper für Immunohistologie im Licht- und Elektronenmikroskop interessant sind (Avrameas, 1969; Krahenbühl und Campiche, 1969).

Abb. 5

Immunoelektrophorese mit Human IgG 160 mg/ml und mit Colostrum-anti-Human IgG Nr. 71 (Colostrumserum I).

1 = Colostrum-anti-Human IgG Nr. 71 (Colostrumserum I)
 2 = Human IgG gereinigt mit DEAE-Zellulose (DE52 Whatman)
 3 = Human IgG 16%, Schweiz. Rotes Kreuz
 4 = Humanes Normalserum



Auf weitere Immunisierungsversuche mit diesem Antigen wurde wegen des hohen Preises verzichtet.

Die Immunisierung von Kühen mit Thrombozyten und Thrombosthenin verlief ebenfalls enttäuschend. Sie ist der Immunisierung von Kaninchen nicht überlegen und soll deshalb hier nicht im Detail dargestellt werden.

Die Auswertung unserer anti-Ferritinseren, anti-Kaninchen IgG und anti-Human IgG (aggregiert) mit Hilfe des Mancini-Testes bestätigte die hervorragende Empfindlichkeit dieser Methode. Üblicherweise wird der Mancini-Test für den Nachweis bzw. die Messung von Antigen gebraucht unter Verwendung einer optimalen Serumverdünnung als inneres Reagens in Agar. Wir prüften deshalb unsere Antiseren in analoger Weise, indem wir mit einem Schachbrett-Verdünnungsverfahren diejenige Serumverdünnung ermittelten, die den Nachweis der kleinsten Antigenmenge in μg gestattete. Die Antigenmenge ergab sich aus der absoluten Menge in μg , enthalten in 1,5 μl einer gegebenen Antigenverdünnung (siehe Abb. 1).

In der Tab. 4 sind die Resultate der quantitativen Immunodiffusion zusammengestellt.

Alle Antiseren weisen somit eine beachtliche, die anti-Ferritinseren eine hervorragende Sensitivität auf, die bei relativ hohen bis sehr hohen Verdünnungen des Antiserums den Nachweis von Antigen im Bereich von 0,01 bis 0,2 μg gestattet.

Tab. 4 Resultate der quantitativen Immunodiffusion von anti-Ferritin, anti-Kaninchen IgG und anti-Human IgG.

Nr. der Kuh	Antiserum	Nachgewiesene Menge Antigen ¹ in μg			Nachgewiesen bei einer Antiserumverdünnung ²		
		Colostrum- serum I	Colostrum- serum II	Blutserum	Colostrum- serum I	Colostrum- serum II	Blutserum
43	anti-Ferritin	0,016	0,016	0,008	3 200	800	800
44	anti-Ferritin	0,016	0,032	0,016	12 800	3 200	1 600
45	anti-Ferritin	0,032	0,032	—	3 200	1 600	—
46	anti-Ferritin	0,032	0,032	—	3 200	800	—
51	anti-Kaninchen IgG	0,06	0,06	0,06	200	100	100
52	anti-Kaninchen IgG	0,06	0,06	neg.	100	20	5
70	anti-Human IgG	0,22	—	—	—	—	—
71	anti-Human IgG	0,055	0,055	0,055	200	100	20

— Bestimmungen nicht ausgeführt

¹ kleinste Antigenmenge, die in Form eines deutlichen Präzipitationshofes nachweisbar war² Antiserumverdünnung im Agar (inneres Reagens)

3.2.2. Die *indirekte Hämaggglutination* mit Protein-sensibilisierten Erythrozyten, die nach der Glutardialdehydmethode von Avrameas, Taudou und Chuilon (1969) behandelt waren, bestätigte die guten Ergebnisse der Immunopräzipitation und des Mancini-Testes. Es wurden sehr hohe Titer erzielt, vergleichbar denjenigen, die Avrameas et al. gefunden haben (Tab. 5).

Tab. 5 Resultate der indirekten Hämaggglutination.

Nr. der Kuh	Antiserum	Hämaggglutinationstiter		
		Colostrum-serum I	Colostrum-serum II	Blutserum
43	anti-Ferritin	200 000	100 000	25 000
44	anti-Ferritin	800 000	400 000	12 000
45	anti-Ferritin	400 000	200 000	—
46	anti-Ferritin	200 000	50 000	—
51	anti-Kaninchen IgG	12 800	6 400	1 000
52	anti-Kaninchen IgG	6 400	3 200	neg.
70	anti-Human IgG	100 000	25 000	neg.
71	anti-Human IgG	400 000	100 000	25 000

— Blutserum nicht mehr vorhanden

3.2.3. Die *immunohistologische Auswertung* von anti-Ferritin-FITC-Konjugaten an Kryostatschnitten von Popliteallymphknoten von Kaninchen, die mit Ferritin immunisiert waren, ergab eine gute bis brillante Darstellung von anti-Ferritin-Antikörpern in lymphoiden und Plasmazellen. In den Kontrollpräparaten, die mit absorbiertem Konjugat gefärbt wurden, zeigten die Plasmazellen keine Fluoreszenz.

3.2.4. Über die *Auswertung unseres anti-Human IgG-Serums durch das Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizer Roten Kreuzes* (Herr PD Dr. R. Bütler) soll an anderer Stelle berichtet werden. Es sei nur erwähnt, daß unser Colostrum-anti-Human IgG-Serum den besten Standardantiseren, die in der Humanmedizin verwendet werden, bei einer Reihe von Testsystemen (direkter Coombs-Test, anti-Gammaglobulintest, anti-D, anti-Fy^a, anti-Kell, anti-Le^a) in bezug auf Avidität, Agglutinationsstärke und Titer ebenbürtig oder überlegen ist. Es eignet sich deshalb sehr gut zur Verwendung als Coombs-Serum. Eine Abklärung über dessen Verwendungsmöglichkeit in der Immunohämatologie ist im Gang.

4. Revakzination von immunisierten Kühen

Bei 9 Kühen, die zur Herstellung von Colostrum-anti-Salmonella H- und Colostrum-anti-Ferritin-Serum verwendet wurden, wurde bei der nächstfolgenden Trächtigkeit eine *Injection de rappel* appliziert. Die Vakzination wurde genau gleich durchgeführt wie die Erstvakzination. Die vergleichende

Auswertung der Seren von der ersten Vakzination mit derjenigen der zweiten erfolgte jeweils am gleichen Tag. Tab. 6 zeigt, daß in 6 von 7 Salmonella H-Seren ein Titeranstieg von 1 bis 3 Stufen nachweisbar war. In den Seren der beiden revakzinierten anti-Ferritin-Kühe blieb sich der Hämagglutinationstiter gleich, auf eine tabellarische Darstellung wird deshalb verzichtet.

Tab. 6 Auswertung der Colostrum- und Blut-anti-Salmonella H-Seren, gewonnen nach einer Injection de rappel.

Nr. der Kuh	H-Antigen	1. Geburt bis Injection de rappel Tage	Injection de rappel bis 2. Geburt Tage	Röhrchenagglutination Stufendifferenz*		Blutserum
				Colostrumserum I	Colostrumserum II	
4	H 1, 2	381	20	+1	- 1	.
9	H g, m	355	10	+3	.	+1
12	H g, m	372	15	+2	- 1	.
18	H 1, v	393	19	+3	.	+3
20	H 1, v	361	22	+2	+3	.
22	H 1, 6	388	7	+3	+2	+3
23	H 1, 6	379	24	1	- 1	.

* Stufendifferenz der Antiserumtitler: Vergleich der Titer nach der 1. Geburt und nach der 2. Geburt (Injection de rappel)

. keine Vergleichswerte vorhanden

5. Diskussion

Unsere Versuche zeigten, daß sich die trächtige Kuh hervorragend eignet für die Immunisierung mit bestimmten Proteinen, und die Tatsache, daß die Blutserumantikörper der Kuh im Colostrum konzentriert werden, kann somit sehr leicht ausgenutzt werden. Die Salmonella H-Seren, die anti-Ferritinseren und das anti-Human IgG-Serum (Coombs-Serum) sind von hervorragender Qualität und vergleichbar den besten Kaninchen-Hochimmunseren, die zu unserer Verfügung stehen. Die Immunisierungen erfolgten mit einer einzigen intramuskulären Injektion des Antigens zusammen mit inkomplettem Freund-Adjuvans und wurden in der großen Mehrheit ohne jede Störung vertragen¹. Gelegentlich auftretende Impfreaktionen sind kein Hinderungsgrund für die Vakzination, aber es ist ratsam, den Besitzer vorgängig auf diese möglichen Reaktionen aufmerksam zu machen.

Vor allem für die Gewinnung von diagnostischen Salmonella H-Seren ist somit eine ökonomische Methode gefunden, da die Impftiere, nämlich die trächtige Kuh, nicht speziell für Immunisierungszwecke gehalten werden müssen, sondern im Rahmen der landwirtschaftlichen Nutzung beim Besitzer bleiben können. Es sei auch darauf hingewiesen, daß die von uns

¹ Herr Prof. Gerber teilt uns mit, daß inkomplettes Freundsches Adjuvans beim Pferd sehr häufig schwere Granulombildung an der Injektionsstelle verursache, und zwar bei der 2., spätestens bei der 3. Injektion.

geprüften Tiere den Antikörpertiter während der Dauer der Laktation bei-behielten, so daß eine Injection de rappel einige Wochen vor der nächsten Geburt wiederum die Gewinnung von gleichwertigem Colostrumantiserum gestattet.

Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, abzuklären, ob sich noch andere Proteinantigene für die Immunisierung von trächtigen Kühen verwenden lassen, nach unserer Erfahrung ist jedenfalls nicht jedes Protein von vornherein dazu geeignet.

Zusammenfassung

Die Herstellung von Proteinantiseren aus Colostralmilch von Kühen, die kurz vor der Geburt immunisiert werden, wurde untersucht. Alle Antigene wurden in Form einer Öl-Adjuvans-Vakzine intramuskulär appliziert. Mit dieser Methode konnten mit *Salmonella* H-Antigenen, mit Ferritin, mit Kaninchen IgG und mit hitzeaggregiertem Human IgG gute Antiseren gewonnen werden. Natives Human IgG ergibt nur bei großer applizierter Menge Antigen-Colostrumseren, die immunoelektrophoretisch spezifische Präzipitationslinien aufweisen. Die Immunisierung der Kühe mit Thrombozyten und mit Thrombosthenin ergibt wohl Antiseren, die spezifische Antikörper enthalten, aber der Gehalt ist zu gering, als daß sie von Interesse wären.

Die Vakzination der Kuh mit Human O-Serum ergab negative Resultate. Bei der angegebenen Immunisierungsdosis wurden keine anti-IgG-Antikörper gebildet. Keine spezifischen Antikörper können in den Antiseren der Kuh nachgewiesen werden, die mit Peroxydase immunisiert wurden.

Somit eignet sich die trächtige Kuh sehr gut zur Antikörperproduktion gegen gewisse proteinische Antigene, was um so interessanter ist, als im ersten und zweiten Colostrumserum, von dem 2-6 l zu gewinnen sind, die aus dem Blute stammenden Antikörper angereichert werden.

Résumé

Les auteurs ont analysé les antisérum protéiniques obtenus à partir du colostrum de vaches qui avaient été immunisées juste avant la mise-bas. Tous les antigènes ont été appliqués sous forme d'un vaccin en suspension huileuse par voie intramusculaire. Par cette méthode il a été possible d'obtenir de bons antisérum avec les antigènes H de salmonelles additionnés de ferritine, avec les gamma-globulines immunisantes G (IgG) de lapin et avec les gamma-globulines immunisantes G de l'homme. Une gamma-globuline immunisante G humaine négative n'a donné des sérum du colostrum présentant une ligne électrophorétique de précipitation spécifique qu'en appliquant de grosses doses d'antigène. L'immunisation de vaches avec des thrombozytes et avec la thrombosthénine provoque bien la formation d'antisérum contenant des anticorps spécifiques, mais la teneur en est trop faible et ne présente pas d'intérêt.

La vaccination des vaches avec un sérum humain O a donné un résultat négatif. La dose immunisante indiquée n'a pas provoqué la formation d'anticorps anti-gamma-globuline G. Aucun anticorps spécifique n'a pu être mis en évidence dans les antisérum de vaches immunisées par la peroxydase.

Par conséquent, la vache gestante se prête fort bien à la production d'anticorps contre certains antigènes protéiques, ce qui est d'autant plus intéressant que dans le premier et le second sérum du colostrum dont on peut obtenir de deux à six litres, les anticorps d'origine sanguine sont enrichis.

Riassunto

Venne esaminata la preparazione di antisieri proteici dal colostro di vacche che furono immunizzate poco tempo prima del parto. Tutti gli antigeni vennero applicati in forma di vaccini oleosi per via intramuscolare. Con questo metodo poterono esser ottenuti buoni antisieri con H-antigeni da *Salmonella*, con Ferritin, con conigli IgG e con IgG umano aggregato al calore. IgG umano naturale dà solo con l'applicazione di grandi quantità di antigene siero da colostro, che presenta linee di precipitazione specifiche, individuabili per mezzo dell'elettroforesi. L'immunizzazione delle vacche con trombociti e con trombostenina dà si antisieri che contengono anticorpi specifici, ma il contenuto è debole, motivo per il quale è di scarso interesse.

La vaccinazione delle vacche con O-siero umano diede risultati negativi. Nella dose immunizzante indicata non vennero formati anticorpi anti-IgG. Nessun anticorpo specifico può esser individuato negli antisieri delle vacche che furono immunizzate con perossidasi.

In tal modo la vacca gravida è idonea alla produzione di anticorpi contro determinati antigeni proteici, ciò che è tanto più interessante, in quanto nel primo e secondo siero colostrale, del quale sono ottenibili 2 a 6 litri, possono esser arricchiti gli anticorpi provenienti dal sangue.

Summary

The production of protein-antisera from the colostrum of cows immunised shortly before parturition was examined. All the antigens were applied intramuscularly in the form of an oiladjuvans-vaccine. By this method good antisera could be obtained with *Salmonella* H-antigens, with Ferritin, with rabbit IgG and with heat-aggregated human IgG. Natural human IgG yields colostrum sera only when a large quantity of antigen is applied and these sera show specific precipitation lines immuno-electro-phoretically. Immunising cows with thrombocytes and with thrombosthenin does provide antisera containing specific antibodies, but the content is too small to be of interest.

Vaccinating cows with human O-serum gave negative results. With the given immunisation dosage no anti-IgG antibodies were formed. No specific antibodies can be proved in the antisera of cows immunised with peroxidase.

Thus the pregnant cow is well-suited for the production of antibodies against certain protein antigens, and this fact is the more interesting in that the antibodies coming from the blood are concentrated in the first and second colostrum serum, from which 2 to 6 litres may be obtained.

Literatur

- Avrameas S.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6, 43-52 (1969). — Avrameas S., Taudou B., Chulon S.: Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetra-azotized O-dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test. *Immunochemistry* 6, 67-76 (1969). — Coons A.H., Leduc E.H., Kaplan M.H.: Localization of antigen in tissue cells. The fate of injected foreign proteins in the mouse. *J. Exp. Med.* 93, 173-188 (1951). — Coons A.H., Leduc E.H., Connolly J.M.: Studies on antibody production. I. Method for the histochemical demonstration of hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.* 102, 49-59 (1955). — Dixon F.J., Weigle W.O., Vazquez J.J.: Metabolism and mammary secretion of serum proteins in the cow. *Laboratory Investigation*, New York 10, 216-237 (1961). — Fey H.: Immunology of the newborn calf. Its relationship to colisepticemia. *Ann. New York Acad. Sci.* 176, 49-63 (1971). — Fey H., Braun K.: Erfahrungen mit der Quarzjodlampe für Fluoreszenzmikroskopie. *Festschrift WILD*, S. 24-29 (1971). — Fey H., Nicolet J., v. Fellenberg R., Margadant A.: Immunologische, serologische und immuno-chemische Methoden zum Nachweis der Agammaglobulinämie des Kalbes. *Zbl. Vet. Med. B*.

11, 584–602 (1964). – Gay C.C., McKay K.A., Barnum D.A.: Studies on colibacillosis of calves. I. The antibody acquired by calves as the results of vaccination of the dam. *Can. Vet. Jour.* 5, 248–261 (1964). – Hammer D.K., Kickhöfen B., Henning G.: Molecular classes and properties of antibodies in cattle serum and colostrum synthesized during the primary and secondary response to protein antigens. *European J. Biochem.* 6, 443–454 (1968). – Ishizaka T., Ishizaka K.: Biological activities of aggregated gammaglobulin. I. Skin reactive and complement-fixing properties of heat denatured gammaglobulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101, 845–850 (1959). – Kickhöfen B., Hammer D.K., Scheel D.: Isolation and characterization of gamma G type immunoglobulins from bovine serum and colostrum. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 349, 1755–1773 (1968). – Kraehenbuhl I.P., Campiche M.A.: Early stages of intestinal absorption of specific antibodies in the newborn. An ultrastructural, cytochemical and immunological study in the pig, rat and rabbit. *J. Cell. Biol.* 42, 345–365 (1969). – Leduc E.H., Coons A.H., Connolly J.M.: Studies on antibody production. II. The primary and secondary responses in the popliteal lymph node of the rabbit. *J. Exp. Med.* 102, 61–72 (1955). – Lopez V., Golder S.: A new Immunodiffusion method for quantitative determination of proteins in biological fluids based on a separate application of antibody and antigen to small agar discs. *Clin. Chim. Acta* 21, 517–520 (1968). – Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J.F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235–254 (1965). – Scheidegger J.J.: Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy* 7, 103–110 (1955). – Schulze H.E., Schwick G.: Quantitative immunologische Bestimmung einzelner Plasmaproteine. *Clin. Chim. Acta* 4, 15–25 (1959). – Wood B.T., Thompson S.H., Goldstein G.: Fluorescent antibody staining. III. Preparation of fluorescein-isothiocyanate-labeled antibodies. *J. Immunol.* 95, 225–229 (1965).

Medikamentelles Niederlegen von Rindern mit Thiopentobarbital- und Chlorpromazin-

Prämedikation. Von J. Pavlica und L. Nemecek. *Acta Vet. Brno* 39, 435–445 (1970).

Bei 14 Rindern und Kühen der rotbunten Rasse wurde Thiopentobarbital (Thiopental Spofa), 4–6 mg/kg Körpergewicht intravenös zusammen mit Chlorpromazin (Plegomazin) als Prämedikation in der Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht intramuskulär für das medikamentöse Niederlegen getestet. Die Tiere waren 3 bis 8 Jahre alt, ihr Lebendgewicht betrug 330 bis 470 kg. Die Tiere wurden während der Versuche auf ihren Allgemeinzustand sowie mittels Respirometrie, EKG und biochemischen Analysen überwacht.

Die verwendete Kombination zeigte gute sedative und muskelrelaxierende Wirkung und erlaubte ein müheloses Niederlegen des Tieres auf den Operationstisch. Es bestand auch ein gewisser Grad von Analgesie, der jedoch für Eingriffe unbefriedigend war. Apnoische Phasen, Regurgitation und leichte Tympanie wurden beobachtet. Diese Komplikationen waren von kurzer Dauer und beeinflußten den Zustand der Tiere nicht ernsthaft.

Am auffälligsten wurde die Pulsfrequenz beeinflußt. Die Tachycardie erreichte ihr Maximum 5 Minuten nach Verabreichung des Thiopentobarbitals. Die niedrigste Körpertemperatur wurde 30 Minuten nach der Thiopentalinjektion festgestellt. Die Atemfrequenz ging nach Verabreichung des Chlorpromazins zurück, stieg aber wiederum nach der Thiopentalinjektion. Das Atemvolumen, welches durch Chlorpromazin nicht beeinflußt wurde, nahm nach Thiopental ab. Während Chlorpromazin das EKG nicht beeinflußte, verursachte Thiopental eine Veränderung der Amplituden und andere Abweichungen, Erhöhung oder Erniedrigung der P-Q- und S-T-Zacken und eine Verlangsamung der intraventrikulären Überleitungszeit. Die Beeinflussung von pH und pCO_2 war unbedeutend. Blutserum, Elektrolyte, Protein und Eiweißfraktionen des Serums sowie die Enzymaktivitäten wurden nicht beeinflußt. Die Kombination von Chlorpromazin und Thiopental wird als brauchbar für die Rinderchirurgie beurteilt.

R. Fankhauser, Bern