

Nachweis von IBR/IPV-Antikörpern aus der Milch

Autor(en): **Stuker, G. / Haab, P. / Giger, T.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **122 (1980)**

PDF erstellt am: **21.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-593669>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 122, 707–710, 1980

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie des Kantons St. Gallen¹
und dem Kantonalen Veterinäramt St. Gallen²

Nachweis von IBR/IPV³-Antikörpern aus der Milch

von G. Stuker¹, P. Haab² und T. Giger¹

Einleitung

Seit dem Auftreten der ersten schweizerischen IBR-Fälle im Jahr 1978 haben intensive Überwachungs- und Bekämpfungsprogramme die Untersuchung zahlreicher Tiere erfordert. Anfänglich wurden die Blutseren mit dem Virusneutralisationstest, später auch mit einem enzymimmunologischen Nachweis (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) auf das Vorliegen von IBR/IPV-Antikörpern untersucht. Aufgrund der guten praktischen Erfahrungen mit der Überprüfung von Kannenmilchproben zur seuchenpolizeilichen Brucelloseüberwachung mit dem Abortus-Bang-Ringtest und der hohen Empfindlichkeit des ELISA entschlossen wir uns, einige Versuche zur Brauchbarkeit der milchserologischen IBR/IPV-Diagnostik durchzuführen.

Material und Methode

Für die Empfindlichkeitstestung und Mischversuche standen uns 48 Blutseren und Milchproben aus einem ostschweizerischen Viehbestand zur Verfügung, der im vergangenen Winter durch Zukauf frisch infizierter Tiere verseucht worden war.

Für die praxisnahe Überprüfung der ersten Resultate beschafften wir uns 11 Kannenmilchproben aus IBR/IPV-positiven Beständen unterschiedlichen Durchseuchungsgrades und 20 zufällig ausgewählte Proben, die zur Untersuchung auf Abortus-Bang eingesandt worden waren. Für die Durchführung des ELISA verwendeten wir durch Zentrifugieren gewonnene Magermilchproben.

Mikrotiterplatten (M 129 B, Dynatech Produkte) wurden mit einer optimalen Antigenverdünnung in Carbonatpuffer, pH 9,6 [3], über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Präparation des Antigens erfolgte nach den Angaben von Payment et al. 1979 [2]. Primäre oder sekundäre embryonale Kälberlungenzellen wurden mit einer multiplicity of infection rate von 0,1 mit IBR-Virus, Stamm L.A. infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Kulturen geerntet und nach dreimaligem Gefriertauen auf eine Konzentration von 1,0 M NaCl und 8% Polyethylenglykol (MG 6000) eingestellt. Nach Zentrifugation bei 3000 g während 30 Minuten wurde das Sediment in 1/50 des Originalvolumens in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und während einer Minute mit 100 W/cm² beschallt. Dieses Material wurde auf einen zweistufigen Sucrosegradienten, bestehend aus 30 und 50 Prozent Sucrose in TN-Pufferlösung (0,15 M NaCl, 0,01 M tris [hydroxymethyl] aminomethan-hydrochlorid, pH 7,8), gebracht. Nach zweistündiger Zentrifugation in einem Beckman SW-27-Rotor bei 25000 rpm wurde die an der Interphase sichtbare Bande gesammelt und als Antigen verwendet. Als Antigenkontrolle verwendeten wir eine identisch hergestellte Präparation aus unbeimpften embryonalen bovinen Lungenzellen derselben Passage. Als diesen Reagenzien gleichwertig erwiesen sich sogenannte B-Platten des Eidgenössischen Vakzineinstitutes in Basel. Diese Platten beschickten wir pro Delle mit 0,2 ml einer Blutserum- oder Magermilchverdünnung in phosphatgepufferter Salzlö-

^{1, 2} Korrespondenzadresse: Dr. G. Stuker, c/o Veterinaria AG, Grubenstrasse 40, 8045 Zürich

³ IBR = Infektiöse bovine Rhinotracheitis, IPV = Infektiöse pustulöse Vulvovaginitis

sung mit 0,01% Tween 80 (Tween-PBS, Tween von Merck, Darmstadt, BRD) und inkubierten während einer Stunde bei Zimmertemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit Tween-PBS wurde in jede Vertiefung 0,2 ml einer optimalen Verdünnung eines peroxidasemarkierten anti-Rinderimmunglobulins (RAB/IgG [H + L]/PO, Nordic, Tilburg, Holland) pipettiert. Als Verdünnungsflüssigkeit verwendeten wir Tween-PBS mit Zusatz von 0,75% gepooltem, lyophilisiertem Meerschweinchenserum. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten wiederum dreimal gewaschen und dann mit 0,2 ml eines Substrat-Indikatorgemisches gefüllt (2 mM H₂O₂, 0,2 mM ABTS [Boehringer, Mannheim, BRD] in 0,05 M Citratpuffer, eingestellt auf pH 4,0 mit NaOH) [1]. Sobald die positiven Kontrollen die erwartete Grünfärbung aufwiesen, wurden die Platten mit dem Spektrophotometer (Multiscan, Flow Laboratories) bei 405 nm sowie von Auge abgelesen. Proben, die eine optische Dichte (O.D.) von mindestens 0,1 aufwiesen und bei denen der mit dem Virusantigen erhaltene Wert mindestens dreimal höher lag als der Kontrollwert, wurden als positiv beurteilt.

Die Durchführung des Tests geschah für Blutseren und Magermilch in derselben Weise, ausser dass sich für die Untersuchung der Milchproben eine höhere Konjugatskonzentration (mit der verwendeten Charge 1:1000 statt 1:3000) als optimal erwies.

Resultate

Von den 48 Tieren aus dem ersten Bestand reagierten sieben bei einer Blutserumverdünnung von 1:40 positiv, die restlichen Tiere negativ. Die entsprechenden Milchproben wurden in den Verdünnungen 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:40 getestet. Sechs der sieben blutserologisch positiven Tiere reagierten bei einer Verdünnung von 1:40 positiv, das siebente Tier mit einer blutserologisch schwachen Reaktion ergab erst mit der 1:10 Magermilchverdünnung eine positive Reaktion.

Die Tabelle 1 zeigt die Korrelation der bei der vergleichenden Testung von Blutserum- und Milchproben erhaltenen O.D.-Werte. Für diese Vergleiche wurden Blutserum- und Milchproben gleichentags auf denselben Mikrotiterplatten getestet. Um näheren Aufschluss über das Verhalten von Milchproben im ELISA zu erhalten, mischten wir die positiven Proben mit einem Gemisch von negativen Milchproben aus demselben Herkunftsbestand und prüften diese Mischproben in verschiedenen Verdünnungen. Dabei ergab sich gegenüber den Erstuntersuchungen mit PBS als Verdünnungsflüssigkeit keine Abweichung.

Bei der praxisnahen Anwendung der Methode an 11 Kannenmilchproben aus IBR/IPV-positiven Herkunftsbeständen reagierten bei der Verdünnung 1:2 sämtliche Proben. Eine Probe ergab nur in dieser Verdünnung ein positives Resultat, zwei Proben blieben bis zur Verdünnung 1:10 und sieben Proben bis zur Verdünnung 1:40 positiv. Von 18 zufällig ausgewählten Kannenmilchproben ergaben in der Verdünnung 1:2 alle negative Resultate.

Diskussion

Obschon die serologische Untersuchung von Milchproben zur Seuchenüberwachung mit bekannten Nachteilen behaftet ist – trockenstehende Kühe, trächtige Rinder, Kälber und männliche Tiere werden nicht erfasst – haben die praktischen Erfahrungen mit dem Abortus-Bang-Ringtest gezeigt, dass dieses Vorgehen zur Grobüber-

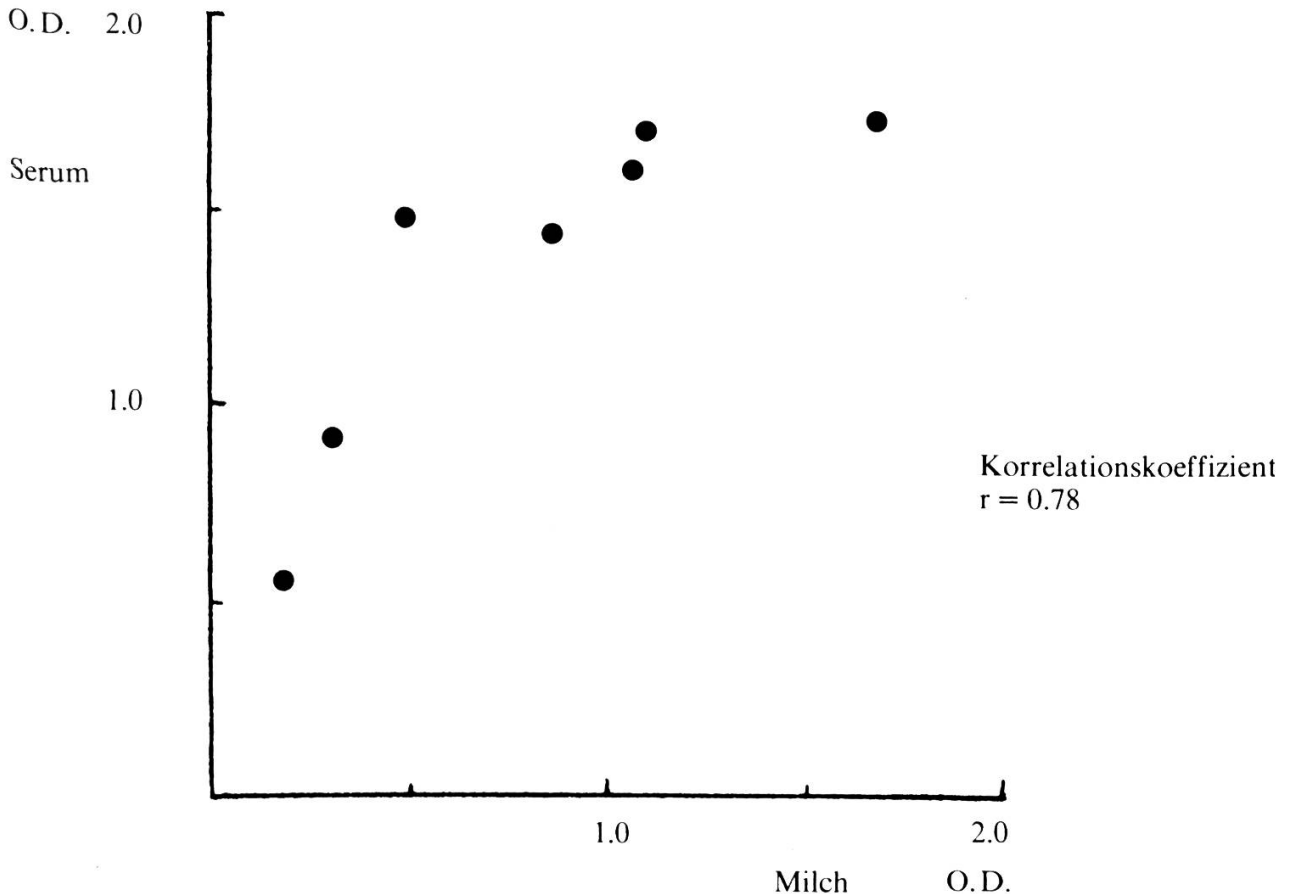


Tabelle 1 Vergleich der O.D. Werte des ELISA mit Blutserum- und Magermilchproben. Die angegebenen Werte sind die Differenzen zwischen der O.D. mit Virusantigen und Zellkontrollantigen. Die Serumverdünnung beträgt 1:40, die Magermilchverdünnung 1:10.

wachung brauchbar und kostensparend ist. Unsere ersten Ergebnisse lassen uns vermuten, dass die angewandte Methode für diesen Einsatz tauglich ist. Obwohl die Methode naturgemäss der serologischen Untersuchung von einzelnen Blutproben hinsichtlich Empfindlichkeit unterlegen ist, scheint sie derart immer noch genügend sensibel zu sein. Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, dass Magermilch, im Gegensatz zu Serum, auch in tiefen Verdünnungen keine unspezifischen Reaktionen hervorruft.

Die Sammelmilchprobe, die lediglich in der 1:2 Verdünnung reagierte, stammte aus einem Bestand, in dem vor einigen Jahren klinische Fälle von IPV aufgetreten waren und in dem blutserologisch 2 von 12 Tieren schwach positiv reagierten.

Die Resultate unserer ersten Untersuchungen wollen als Ermunterung für einen probeweisen breiteren Einsatz der Methode für Übersichtsuntersuchungen verstanden sein, zum Beispiel für Bestandesuntersuchungen in einem Kanton. Alle verdächtigen oder positiven Befunde müssten durch einzelserologische Untersuchungen verifiziert werden. Im übrigen gelten für die Interpretationen der milchserologischen Resultate dieselben Grundsätze wie für blutserologische Untersuchungen.

Für weitere Abklärungen stehen die Antikörperkinetik in Blut- und Milchserum sowie der Einfluss von Milchveränderungen auf die Spezifität der Resultate im Vordergrund.

Zusammenfassung

Ein enzymimmunologischer Nachweis von IBR/IPV Antikörpern in Magermilchproben erwies sich als spezifische und empfindliche Methode, die zur seuchenpolizeilichen Grobüberwachung eingesetzt werden könnte.

Résumé

Un test immuno-enzymologique (ELISA) s'est avéré être une méthode spécifique et sensible pour mettre en évidence des anticorps IBR/IPV dans du lait écrémé. Elle se prête très bien pour une surveillance globale de cette infection.

Riassunto

Un metodo immuno-enzimologico (ELISA) si è mostrato specifico e sensibile per evidenziare degli anticorpi IBR/IPV nel latte scremato. Può essere usato con vantaggio per un controllo globale di questa infezione.

Summary

An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies against the virus of the infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis in pooled skim milk samples is shown to be specific and sensitive. The procedure is proposed as a screening method for epizootological surveys.

Literatur

[1] *Gallati H.*: Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien sowie Optimierung der Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin sulfansäure) (ABTS). *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 1-7 (1979). – [2] *Payment P., Assaf R., Trudel M., Marois P.*: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serology of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Infections. *J. Clin. Microbiol.* 10, 633-636 (1979). – [3] *Voller A., Bidwell D., Bartlett A.*: Microplate Immunoassays for the Immunodiagnosis of Virus Infections. Im *Manual of Clinical Immunology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 506-512 (1976).

REFERAT

Kiefernverkrümmung beim Schwein (Mandibular malalignment in the pig), von M. Muirhead. *Brit. vet. J.* 136, 141-145 (1980).

Verkrümmungen der Kiefer kamen in allen 55 überprüften Beständen zur Beobachtung. Die Häufigkeit nahm mit dem Alter der Schweine zu. In 6 Beständen, deren erwachsene Tiere genau überprüft wurden, zeigten 43% mehr oder weniger deutliche Abweichungen.

Die Bedeutung dieser Deformationen ist nicht klinisch, da die Tiere nicht darunter leiden, doch können sie eine Rolle spielen für Rüsselmessungen und für die Differentialdiagnose der Rhinitis atrophicans.

R. F., B.