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: 127 (1985)

Artikel: Seroepidemiologische Untersuchung über das Vorkommen von Enzootischer Boviner Leukose in der Schweiz mittels Agargel-Immundiffusion und ELISA in Blut- und Milchserum

Autor: Vincenz, E. / Wyler, R.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-589398

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: 13.07.2025

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

Schweiz. Arch. Tierheilk. *127,* 185–203, 1985

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

Seroepidemiologische Untersuchung über das Vorkommen von Enzootischer Boviner Leukose in der Schweiz mittels Agargel-Immundiffusion und ELISA in Blut- und Milchserum

E. Vincenz und R. Wyler[1]

A. Einleitung und Problemstellung

Die enzootische bovine Leukose (EBL), eine virusbedingte, ansteckende Krankheit der Tiere der Rindergattung, ist die wichtigste Tumorerkrankung der erwachsenen Rinder.

In zahlreichen Ländern gilt die Rinderleukose als anzeigepflichtige Tierseuche und wird mit staatlichen Mitteln bekämpft. So besteht auch die Absicht, die EBL im Raum der Europäischen Gemeinschaft zu tilgen [11].

Nach früher von *Klaas* [28] und *Steck et al.* [62] durchgeführten Untersuchungen ist die Schweiz frei von enzootischer boviner Leukose. Bei der weltweiten Verbreitung der EBL besteht jedoch ständig die Gefahr der Einschleppung in unser Land.

Das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit bestand darin, mittels einer seroepidemiologischen Erhebung stichprobenweise abzuklären, ob zur Zeit die EBL in den Kantonen Schaffhausen (Grenzkanton) und Zürich vorkomme. Im Verlaufe der Arbeit wurden zusätzlich noch Seren aus der Region Nordostschweiz und dem Kanton Jura untersucht, und es wurden die Ergebnisse aller bisherigen in der Schweiz durchgeführten Untersuchungen auf EBL zusammengestellt.

Weiter sollten der von der EG allein anerkannte Agar-Gel-Immundiffusionstest (AGID-Test) und die ELISA-Methodik in bezug auf Empfindlichkeit in der Blut- sowie der Milchserologie miteinander verglichen werden.

B. Kurze Übersicht über die Enzootische Bovine Leukose

Als Ingress sollen in der Folge kurz die Aetiologie, die klinischen Verlaufsformen, die wirtschaftlichen Verluste und die Übertragungswege der EBL abgehandelt werden.

1. Ätiologie

Lange bevor der Nachweis der Virusätiologie gelang, wurde vermutet, dass die enzootische bovine Leukose (EBL) durch ein Virus verursacht werde. Als Beispiel sei

[1] Korrespondenzadresse: Prof. Dr. R. Wyler, Institut für Virologie der Universität Zürich, Winterthurerstrasse 266a, CH-8057 Zürich.

Tabelle 1: Einteilung der Retroviridae [16, 37]

Familie:	Retroviridae
Subfamilie:	Oncovirinae
Genus:	C-Typ-Viren
Subgenus:	Säugetier-C-Typ-Viren
Spezies:	Baboon type C oncovirus
	Bovine leukemia virus
	Feline sarcoma and leukemia viruses
	Gibbon ape leukemia virus
	Guinea pig type C oncovirus
	Murine sarcoma and leukemia viruses
	Porcine type C oncovirus
	Rat type C oncovirus (rat leukemia)
	Woolly monkey sarcoma virus
Subgenus:	Vogel-C-Typ-Viren
Spezies:	Avian reticuloendotheliosis virus
	Avian sarcoma and leukemia viruses
	Pheasant type C oncovirus
Subgenus:	Reptilian-C-Typ-Viren
Spezies:	Viper type C oncoviruses
Genus:	B-Typ-Viren
Spezies:	Mouse mammary tumor viruses
Genus:	D-Typ-Viren
Spezies:	Mason-Pfizer monkey virus
Subfamilie:	Spumavirinae (Foamy virus group)
Spezies:	Bovine syncytial virus
	Feline syncytial virus
	Human foamy virus
	Simian foamy virus
Subfamilie:	Lentivirinae
Spezies:	Maedi virus
	Progressive pneumonia virus
	Visna virus
	Zwoegerziekte virus
	Arthritis-Enzephalitis der Ziegen

hier *Bendixen* angeführt [9,10]. 1969 gelang es *Miller et al.* [39] dann, das bovine Leukämievirus (BLV) in mit Phytohämagglutinin stimulierten Lymphozyten nachzuweisen. BLV gehört in die Familie der Retroviridae (Tabelle 1). Retroviren enthalten eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse transcriptase). Die dabei gebildete Virus-DNA (Provirus) wird in das Zellgenom eingebaut, wodurch die betroffene Zelle transformiert, d.h. in eine Tumorzelle umgewandelt wird. Beim BLV handelt es sich um ein exogenes Virus vom C-Typ. Der Durchmesser des Viruspartikels beträgt 90–120 nm. Das Virion enthält ein internes Proteinantigen (p24) und Hüll-Glykoproteinantigen (gp 51), mittels derer es sich von allen anderen Leukämieviren unterscheiden lässt. Die Freisetzung des Virus aus der Zelle erfolgt durch Sprossung. Im Gegensatz zu anderen C-Typ-Retroviren induziert BLV Synzytien in Zellkulturen [44].

2. Pathogenese

Am empfänglichsten für die Infektion scheinen Saugkälber zu sein, wobei der Verlauf der Krankheit aber von genetischen, immunologischen und anderen noch nicht bekannten Faktoren beeinflusst zu sein scheint. Die Zielzelle des BLV ist der B-Lymphozyt. In BLV-infizierten Lymphozyten werden in der Regel jedoch keine Viruspartikel und keine Virusantigene produziert und freie Virionen wurden im Blutplasma bei infizierten Tieren nicht gefunden. BLV besitzt nicht ein grosses onkogenes Potential; denn eine grosse Zahl der natürlich infizierten Tiere weisen keine persistierende Lymphozytose auf, und Tumorbildung scheint bei solchen Tieren eher rar zu sein. Obschon epidemiologische, hämatologische, virologische, serologische Hinweise dafür vorliegen, dass BLV die bovine Leukämie verursacht, war es bis jetzt nicht möglich, mit dem Virus allein die Krankheit beim Rind zu induzieren. Nur Tiere, die mit Lymphozyten von EBL-Rindern infiziert wurden (zellassoziiertes Virus), erkrankten an EBL [44].

3. Klinische Verlaufsformen

Nach einer Inkubationszeit von einigen Wochen bis Monaten (3 Wochen – 3 Monate) werden spezifische, mittels serologischer Verfahren nachzuweisende Antikörper gebildet [45]. Diese initiale inapparente Form verläuft ohne irgendwelche hämatologische und klinische Veränderungen und bleibt bei 10–20% der infizierten Tiere lebenslänglich bestehen.

Im Anschluss an die initiale Form kommt es bei infizierten Tieren nach einigen Monaten zur Ausbildung einer persistierenden, fluktuierenden Lymphozytose [18, 25, 30]. Dieses Stadium, auch Präleukose genannt, hält i. d. R. mehrere Jahre an. Während dieser Zeit sind die Tiere gesund und ihr Leistungsvermögen ist nicht beeinträchtigt [43, 55].

Die tumoröse manifeste Form tritt nur bei 10–30% der Rinder mit verändertem Blutbild ein und wird vorwiegend erst bei über 4 Jahre alten Tieren beobachtet. Sie ist durch einen akuten Krankheitsverlauf gekennzeichnet [43]. Charakteristische Symptome sind Schwellungen von Lymphknoten bzw. starke Vergrösserung von lymphatischen Gewebseinlagerungen. Als Folgeerscheinungen der Geschwulstbildung stellen sich Atemnot, Schluckbeschwerden, Exophthalmus, Paresen oder Blähungen ein. Daneben werden Allgemeinsymptome wie Apathie, Inappetenz, Verdauungsstörungen, Abfall der Milchleistung, Stauungsödeme und starke Abmagerung beobachtet. Nach Entwicklung der tumorösen Phase endet die Krankheit mit dem Tode [51, 55].

4. Wirtschaftliche Verluste

Die wirtschaftlichen Verluste, die in infizierten Beständen hervorgerufen werden, sind abhängig vom Verseuchungsgrad. Ein schwer betroffener Bestand kann über mehrere Jahre jeweils 20% seiner Kühe einbüssen, während in anderen Beständen die Verlustziffern erheblich niedriger liegen können [43, 51].

5. Übertragungswege

Das BLV kann sowohl horizontal wie vertikal übertragen werden. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass die *Kontaktübertragung* die häufigste Übertragungsform darstellt [5, 17, 19, 42, 49, 50]. So wurden BLV-freie Kälber aus BLV-freien Herden zusammen mit infizierten Rindern aufgezogen, und am Ende einer 55- bis 73monatigen Beobachtungsperiode waren mehr als 90% der exponierten Tiere infiziert.

Nicht zu unterschätzen ist die *iatrogene Übertragung.* Bereits 0,5 µl Blut bzw. ca. 2500 BLV-haltige Lymphozyten intradermal verabreicht, genügen zur sicheren Leukoseübertragung [13, 42]. Dabei sind insbesondere mit Blut kontaminierte Spritzen, Nadeln und andere chirurgische Instrumente, welche beim Tätowieren, Enthornen, Einführen von Nasenringen bei Zuchtstieren, Zitzenamputationen und Vakzinationen gebraucht werden, von grosser Bedeutung. Sogar bei der rektalen Untersuchung mit einem blutkontaminierten Handschuh, scheint eine Übertragung möglich zu sein [56].

Bei Serienblutentnahmen in Herden, in denen ein Verdacht auf eine BLV-Infektion besteht oder in denen eine solche Infektion nachgewiesen worden ist, soll deshalb für jedes Tier eine separate sterile Kanüle verwendet werden [12, 70]. Auch chirurgische Instrumente müssen nach Gebrauch gründlich gewaschen und mit Chlorhexidin und Natriumhypochlorit [56] desinfiziert werden. Hingegen kam es nach Untersuchungen von *Lucas et al.* [33] bei der Tuberkulinisierung (unblutiges Verfahren) ohne Kanülenwechsel zu keiner BLV-Übertragung. Erst durch willentlich blutverschmutzte Tuberkulinkanülen wurde das BLV auf zuvor freie Rinder übertragen. In Schweden konnte man nachweisen, dass bei einer Piroplasmose-Vakzination mit Blut BLV-infizierter Tiere das Virus in vorher Leukose-freie Gebiete eingeschleppt wurde [48].

Experimentell ist eine *Übertragung des BLV durch Vektoren* möglich [5, 26]. In gemässigten klimatischen Zonen ist diese Übertragungsform aber von untergeordneter Bedeutung und höchstens innerhalb einer infizierten Herde von gewissem Belang [12].

Die Bedeutung der *oralen Übertragung* des BLV *via Milch* auf das Kalb scheint gering zu sein [19, 30]. Wohl konnten BLV bzw. BLV-infizierte Lymphozyten im Kolostrum und in der Milch nachgewiesen werden [20, 42, 47]. Da aber im Kolostrum gleichzeitig BLV-Antikörper in hoher Konzentration ausgeschieden werden, kommt es wahrscheinlich zu einer Neutralisation der Viren, und es findet in den meisten Fällen keine Infektion statt [47].

Ungefähr 10% der Nachkommen von BLV-infizierten Kühen werden bereits *intrauterin infiziert* [30, 46, 64]. Der überwiegende Teil der Kälber solcher Mütter aber wird BLV-frei geboren und weist auch keine Antikörper gegen BLV auf. Somit ist es möglich, mit Nachkommen von positiven Müttern, unter Vermeidung anderer Infektionswege, eine BLV-freie Population aufzubauen.

Im Jahre 1980 konnten *Lucas et al.* [32] BLV im Sperma eines infizierten Stieres nachweisen. Andere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Rinder durch die intrauterine Inokulation von BLV-infizierten Lymphozyten angesteckt werden können [68]. Die Möglichkeit der *BLV-Übertragung mit dem Sperma* lässt sich deshalb nicht ignorieren [27]. Indessen dürfte die künstliche Besamung für die Leukoseverbreitung

bedeutungslos sein, denn durch die Samenverdünnung wird die Infektionsdosis pro Samenportion stark reduziert, was den Mechanismen der natürlichen Resistenz ermöglicht, die geringe Zahl eingebrachter Viren zu inaktivieren [12].

BLV kann auch auf Schafe und Ziegen übertragen werden. Bei Schafen kommt es zur Tumorbildung, bei Ziegen aber nicht [34]. Übertragungsversuche auf andere Wild-, Haus- und Labortiere bedürfen noch der Bestätigung, vor allem ist abzuklären, welche Rolle der Persistenz von BLV gp-Antikörpern zukommt [3]. Eine Übertragung auf den Mensch ist nie beschrieben worden.

Gesamthaft gesehen darf die EBL als wenig kontagiös angesehen werden, und dementsprechend leicht sollte eine Bekämpfung der Seuche bzw. die Freihaltung einer Rinderpopulation von BLV sein. *Bürki* [12] erachtet folgende 5 Punkte als Grund für die geringe Ausbreitungstendenz der Infektion: 1. Rinder weisen eine beachtliche Resistenz gegenüber dem Retrovirus als infektiösem Agens auf, und bei niedrigen Infektionsdosen wird das Virus von den natürlichen Abwehrmechanismen zerstört. 2. Das BLV seinerseits ist labil gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen und behält seine Infektiosität nicht lange ausserhalb der Zelle. 3. In BLV-kontaminierter Milch wird das Leukämievirus bereits bei 50°C inaktiviert, bei einer Temperatur also, die niedriger als diejenige bei der Pasteurisation ist. 4. Das Rind ist der einzige natürliche Wirt für BLV. 5. Der bemerkenswert protektive Effekt maternaler Antikörper erlaubt es, von seropositiven Müttern in überwiegender Zahl BLV-freie Nachkommenschaft zu gewinnen [69] (Ausnahme bereits intrauterin infizierte Feten).

C. Eigene Untersuchungen

Material und Methoden

1.1. Untersuchungsmaterial: Rinderseren

Die 22 670 untersuchten Blutproben von Rindern jeden Alters stammten aus folgenden Kantonen oder Regionen:

11 037 Kanton Zürich
4 771 Kanton Schaffhausen
1 238 Kanton Jura
4 812 Region Nordostschweiz (AR, AI, SG, TG)
812 vereinzelte aus verschiedenen Regionen (BE, LU, SZ, NW, GL, ZG, SO, BL, GR, AG, VS).

1.2. Serumgewinnung

1.2.1. Blutserum

A Die Blutproben aus den Kantonen Zürich und Schaffhausen, während des Frühlings 1983 zur serologischen Untersuchung auf IBR/IPV an das Institut für Virologie Zürich eingesandt, wurden am Tag der Einsendung bei 1800 U/min zentrifugiert, das Serum in Polystyrolröhrchen dekantiert und bei −20°C bis zum Gebrauch gelagert.

B Die Seren aus der Region Nordostschweiz und dem Kanton Jura wurden uns freundlicherweise vom Institut für Klin. Mikrobiologie und Immunologie Vet.-med. Abteilung, St. Gallen bzw. vom Laboratorium Dr. Graeub AG, Bern, zur Verfügung gestellt.

C Die positiven Serumproben verdanken wir den Herren Prof. Bürki, Wien, Prof. O. R. Kaaden, Hannover sowie Dr. Plöger, Oldenburg, die positiven Milchserumproben Prof. Toma, Maisons-Alfort, und den Behringwerken AG, Marburg, BRD.

1.2.2. Milchserum

Die Milchproben wurden 15 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert, entrahmt bzw. das Serum unter der Fettschicht abpipettiert und bei −20°C gelagert. Nach *Manz* [36] soll der Gefrier-Auftau-Prozess keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

1.3. Agar-Gel-Immundiffusionstest (AGID-Test)

Der Antikörpernachweis im Rinderserum erfolgte im zweidimensionalen Agargel-Immundiffusionstest (AGID-Test) nach Angaben von *Miller, J. M.* und *Van der Maaten, M. J.* [40, 41]. Als Agarmedium diente 0,9%ige Agarose (Agarose ohne Elektroendosmose, Fluka, Buchs, Schweiz) in 0.5 M TRIS-HCl (pH 7,2), 1,45 M NaCl-Lösung. Beim Autoklavieren löste sich die Agarose auf und es wurden je 15 ml in eine Petrischale mit 88 mm Durchmesser gegossen [22]. Die gegossenen Petrischalen

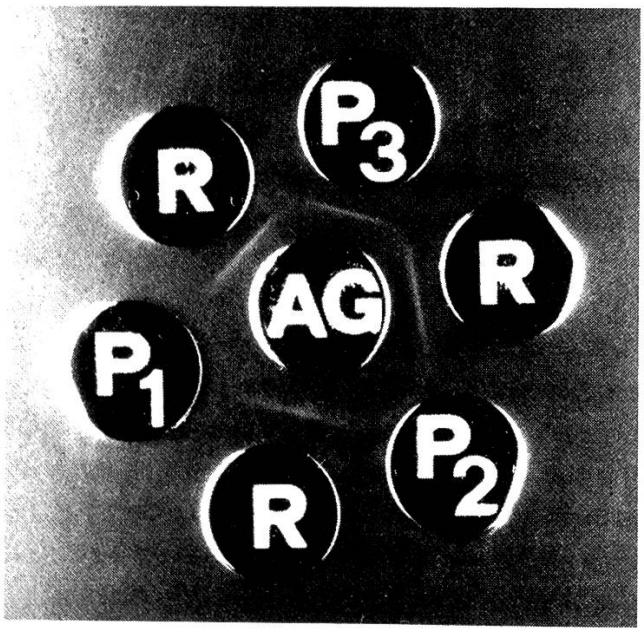

Abb. 1 Agargel-Immundiffusionstest (AGID-Test) zum Nachweis der enzootischen bovinen Leukose

Die zentrale Vertiefung wurde mit 25 µl Antigen (AG) und die peripheren Vertiefungen abwechslungsweise mit 80 µl Probandenseren (P) bzw. 25 µl positiven Kontrollseren (R) gefüllt. In jeder sechsten Petrischale wurden eine negative, schwach positive und eine positive Kontrolle mitgeführt. Die Beurteilung des Grades der Präzipitation geschah wie folgt: − = negativ, + = sehr schwach positiv, + + = schwach positiv, + + + = stark positiv.

AG Glykoproteinantigen (gp_{51})
R positive Kontrollseren (+ + +)
P_1 negatives Probandenserum
P_2 sehr schwach positives Probandenserum (+)
P_3 positives Probandenserum (+ + +)

liessen sich bis zu 10 Tagen bei 4°C lagern. Kurz vor der Verwendung wurden Vertiefungen in den Agar gestanzt und gleichzeitig abgesogen, wobei oftmals nach dem Stanzen noch hängengebliebene Agarteile mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden mussten. Mit der verwendeten Stanze (Fa. Tüscher AG, Bern) entstanden Dellen von 6 mm Durchmesser und einem Dellenabstand von 3 mm (s. Abb. 1). Um mögliche Abhebungen des Gels von der Schale im Bereich der Stanzrosette zu entfernen, wurden die Petrischalen mit den ausgestanzten Dellen für 15 Minuten unter Vakuum (80 Torr) gesetzt [22].

Blut- und Milchserum wurden unverdünnt getestet. Titrationen wurden nach der von *Behrens et al.* [6,7] beschriebenen Methode durchgeführt, indem das Serum verdünnt und die höchste Serumverdünnung, bei der noch gerade eine Präzipitationslinie auftrat, bestimmt wurde. Wir verwendeten das Leukassay-B-Set mit dem Glykoproteinantigen (gp_{51}), dem negativen, schwach positiven und positiven Referenzserum sowie dem positiven Kontrollserum der Firma Pitman-Moore, Inc. Washington Crossing, N.J. 08560 USA. Nach *Bürki* [13] und *Bannenberg* [2] soll der hier angewendete 3:3-Ansatz dem 4:2-Ansatz deutlich überlegen sein.

Die mit den Reagentien beschickten Platten wurden bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer gelagert. Nach 44–48 Stunden erfolgte die erste und nach ca. 72 Stunden die zweite Ablesung. Die sich bildenden Präzipitations-Linien wurden entsprechend ihrer Stärke als +, + +, + + + beurteilt. Bei fraglichen Resultaten wurde der AGID-Test unter Anwendung des Serumkonzentrationsverfahrens nach *Lorenz* und *Straub* [31] und *Bürki et al.* [13] wiederholt.

Um einen durch die Lagerung der Seren möglichen Titerabfall unter die Nachweisgrenze im AGID-Test ausschliessen zu können, wurden 5 verschlüsselte Serumproben, welche wir freundlicherweise von Prof. F. Bürki aus Wien erhalten haben, mehrmals im Verlauf von 6 Monaten aufgetaut, getestet und wieder eingefroren. Die Resultate waren bei allen Untersuchungen identisch, was zeigt, dass die Lagerung und der Gefrier-Auftau-Prozess keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatten.

1.4. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Der Nachweis von Antikörpern bei der EBL mittels ELISA wurde erstmals von *Ressang et al.* [52, 53] beschrieben. Wir führten Untersuchungen sowohl von Blut- als auch von Milchserum in bereits mit Antigen und Kontrollantigen beschichteten, von den Diagnostischen Laboratorien Dr. W. Bommeli, Bern, zur Verfügung gestellten Mikroelisaplatten, durch.

Die Proben wurden in Doppelansätzen geprüft, um die Ergebnisse abzusichern und ein Bild über die Reproduzierbarkeit zu erhalten.

1.4.1. ELISA mit Blutserum

Als Referenzseren verwendeten wir das gleiche positive und negative Serum von der Firma Pitman-Moore wie für den AGID-Test. Als Referenzserum für den Übergang von negativer zu schwach positiver Reaktion kam ein Serum, welches erst nach Serumkonzentration [13, 31] eine deutliche Präzipitationslinie im AGID-Test ergab, zur Anwendung.

Die Serumverdünnung von 1:40 erfolgte mit PBS-A-Tween (Tween®20, Dr. Bender + Dr. Hobein AG, Zürich). Pro Serumprobe wurden 4 Dellen mit 200 µl gefüllt (2 Dellen mit Virusantigen, 2 Dellen mit Kontrollantigen). Die Platten wurden anschliessend 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal mit PBS-A-Tween gewaschen. Als Konjugat verwendeten wir anti-bovine IgG-Peroxidase der Diagnostischen Laboratorien Dr. W. Bommeli, Bern. Pro Delle wurden 200 µl der 1:500 verdünnten Konjugatlösung eingefüllt und die Platten während 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter dreimaliger Waschung wurden je Delle 200 µl Indikator-Substrat-Lösung (1,1 g ABTS, Boehringer Mannheim, BRD; 6,9 g $NaH_2PO_4H_2O$; 240 ml 0,1 M Natriumacetat; 760 ml 0,1 M Essigsäure; 10 ml 250 mM H_2O_2) zugefügt und die Farbreaktion nach einer Stunde visuell und photometrisch (Titertek®, Multiskan, Flow Laboratories AG, Baar, Schweiz) registriert. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen Luft objektiviert (Blank). Von jedem Serum wurde die Nettoextinktion berechnet [67].

Für Titrationen wurde die Blutserumprobe verdünnt und als Titergrenze ein Nettoextinktionstest von 0,3 gewählt (sehr schwach positives Referenzserum, s. Abb. 2 und Tab. 4).

1.4.2. ELISA mit Milchserum

Als ELISA-positives Referenzserum verwendeten wir eine Milchprobe, welche uns freundlicherweise von den Behringwerken AG Marburg, BRD, zugestellt wurde. Die negative Referenz-Milchprobe stammte aus Milchproben, welche für die IBR-Diagnostik ans Institut eingesandt wurden.

Das Milchserum wurde analog den Blutseren in einer Verdünnung von 1:2 im ELISA getestet. Die Inkubationszeiten, die Konzentrationen der Konjugat- und Substratlösungen entsprachen dem ELISA mit Blutserum. Für Titrationen der Milchseren wurde wie bei Blutserum vorgegangen.

2. Ergebnisse

2.1. Seroepidemiologische Untersuchung mittels Agargel-Immundiffusionstest (AGID-Test)

2.1.1. Eigene Untersuchungen

Alle 22 670 von uns untersuchten Rinderseren aus den Kantonen Zürich, Schaffhausen, Jura und aus der Region Nordostschweiz wiesen im AGID-Test keine präzipitierenden Antikörper auf, wobei keine Schwierigkeiten bei der Beurteilung zu verzeichnen waren. Bei den wenigen fraglichen Seren kam man zu eindeutigen Ergebnissen mit Hilfe des Serumkonzentrationsverfahrens [13, 31].

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Anzahl untersuchter Seren, über die Herkunft der Tiere und den prozentualen Anteil untersuchter Tiere zur gesamten Rinderpopulation in den betreffenden Kantonen. Ungefähr 25% des Rindviehbestandes (ca. 50% des Zucht- und Milchviehs) im Kanton Schaffhausen, jedoch nur 8% im Kanton Zürich und 2% im Kanton Jura, wurden untersucht.

Tabelle 2: Übersicht über die Herkunft und Zahl der auf Antikörper gegen bovines Leukosevirus untersuchten Rinderseren

Herkunft	Rindviehbestand 1983 (61)	Anzahl untersuchte Seren	Prozentualer Anteil
Kanton Zürich	134 100	11 037	8,2%
Kanton Schaffhausen	18 500	4 771	25,8%[1]
Kanton Jura	56 800	1 238	2,2%
Region Nordostschweiz (AR, AI, SG, TG)	–	4 812	–
Verschiedene (BE, LU, SZ, NW, GL, ZG, SO, BL, GR, AG, VS)	–	812	–
Schweiz	1 933 100	22 670	1,2%

[1] ca. 50% des Zucht- und Milchviehs

2.1.2. *Untersuchungen anderer Laboratorien*

Während der letzten Jahre untersuchten auch andere Laboratorien Rinderseren auf Leukose, sei es im Rahmen von epidemiologischen Studien [28, 29, 62] oder im Rahmen von Routineuntersuchungen an Tieren, welche für den Export oder für Ausstellungen im Ausland bestimmt waren. Auch die Zuchtstiere der KB-Stationen werden in regelmässigen Abständen auf EBL-Freiheit getestet. Bei Auftreten von Verdachtsfällen untersuchte man jeweils den ganzen Bestand serologisch. Mit Ausnahme der Untersuchungen von *Klaas,* der die hämatologische Technik benützte [28], wurde stets der AGID-Test zum Nachweis von Antikörpern gegen BLV verwendet.

Von 94 685 insgesamt untersuchten Proben wies nur im Dezember 1983 das Serum einer 4jährigen Kuh präzipitierende Antikörper gegen das BLV auf. Das betreffende Tier stammte aus dem Kanton Aargau und war für den Export nach Deutschland bestimmt. Bei der umgehend vorgenommenen Schlachtung der Kuh fanden sich kindskopfgrosse Darmbeinlymphknoten.

Tabelle 3: Übersicht über die Zahl an verschiedenen Stellen untersuchter Seren in der Schweiz in den Jahren 1972 bis anfangs 1984

Jahr	Anzahl unters. Blutseren	Untersuchendes Labor
1972	5 641	*Klaas,* Dissertation Vet.-Med. Fakultät Zürich [28]. (Hämatologische Untersuchungsmethode)
1974–78	12 798	*Steck F. et al.* [62]
1981	10 000	Tiere, welche durch italienische Laboratorien vor der Einfuhr nach Italien untersucht wurden [8, 11]
1981–83	4 970	Veterinaria AG, Zürich
1982/83	2 354	Kantonales Veterinäramt, Veterinär-bakteriologisches Laboratorium, Chur
1981–82	10 084	seroepidemiologische Studie [29]
1982/83	6 708	Laboratorium Dr. Graeub AG, Bern
1982/83	339	Laboratoire vétérinaire cantonal, Fribourg
1982/83	3 167	Abteilung für Virologie, Vet.-bakt. Institut der Universität Bern
1980–83	1 684	Bestandesuntersuchung von 112 Betrieben bei Verdachtsfällen
1982/83	14 270	Institut für Klin. Mikrobiologie und Immunologie Vet.-med. Abteilung, St. Gallen
1983	22 670	Institut für Virologie, Vet.-Med. Fakultät, Zürich
	94 685	Total der bisher untersuchten Seren (4,9% des gesamten schweizerischen Rindviehbestandes)

Vereinzelte Seren, welche während dieser Zeit untersucht wurden, konnten hier nicht berücksichtigt werden.

In einem am 8. September 1980 erlassenen Aufruf des Bundesamtes für Veterinärwesen wurden alle Fleischschauer aufgefordert, ihr Augenmerk besonders bei zwei- und mehrjährigen Tieren der Rindergattung auf das Vorliegen geschwulstartiger Vergrösserungen der Lymphknoten sowie von weisslich speckiger Knotenbildung in Leber-, Milz-, Nieren-, Herz-, oder Darmgewebe zu lenken. Diese Veränderungen wurden histologisch und der Bestand, aus dem das verdächtige Tier stammte, serologisch untersucht. Am 1.1.1984 lagen folgende Ergebnisse vor: Es wurden 129 Tumoren histologisch und 1697 Tiere aus den betreffenden Beständen serologisch untersucht. Die Untersuchungen ergaben keinen Hinweis für eine BLV-Infektion.

Damit ergäbe sich eine niedrige Durchseuchungsrate in unserem Land in bezug auf die EBL. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, dass nur 4,9% des Rindviehbestandes in der Schweiz untersucht wurden (Tab. 3).

2.2. Vergleichsuntersuchungen mit AGID-Test und ELISA

2.2.1. Blutserum

Wir verglichen den AGID-Test mit dem ELISA anhand von 321 Blutproben. Es stand uns nur eine positive Blutprobe aus der Schweiz zur Verfügung. Alle anderen positiven und z.T. fraglichen Blutproben stammten aus Deutschland und Österreich.

Aus Abb. 2 ist die gute Übereinstimmung der Ergebnisse ersichtlich. Davon ausgenommen waren 6 Serumproben (⇆). 2 Seren (→) waren im AGID-Test negativ und wiesen im ELISA einen Nettoextinktionswert von 0,271 bzw. 0,347 auf, was einer schwach positiven Reaktion entspricht. 4 Seren (←) waren im AGID-Test positiv (+) und im ELISA negativ. Die Untersuchungen wurden dreimal wiederholt und die Resultate waren stets dieselben. Es ist deshalb nicht mit völliger Übereinstimmung der Ergebnisse nach Anwendung der beiden Nachweismethoden zu rechnen. Wenn wir alle 6 Serumproben mit unterschiedlichen Ergebnissen berücksichtigen, so war bei 1,9% der Proben keine Übereinstimmung festzustellen.

Bei den Proben mit negativen Nettoextinktionswerten war in den mit Kontrollantigen gecoateten Dellen ein höherer Extinktionswert als in den mit BLV-Antigen gecoateten Dellen zu beobachten.

Im ELISA bestand eine deutliche Abgrenzung zwischen positiven und negativen Proben, so dass ein Nettoextinktionswert von 0,3 bedeutete, dass eine Probe als positiv zu bewerten war (Abb. 2).

Die Titervergleiche zeigten, wie zu erwarten war, dass mit dem ELISA höhere Werte ermittelt wurden als mit dem AGID-Test. Der Titerunterschied bewegte sich im Bereich von Faktor 160–40 (Tab. 4).

Zusätzlich hatten wir Gelegenheit, in einem Screening-Test 28 uns zur Verfügung gestellte, im AGID-Test positive Seren zu untersuchen. Beide Untersuchungsverfahren zeigten völlige Übereinstimmung, wobei im AGID-Test schwach positive Proben im ELISA eine deutliche Reaktion zeigten.

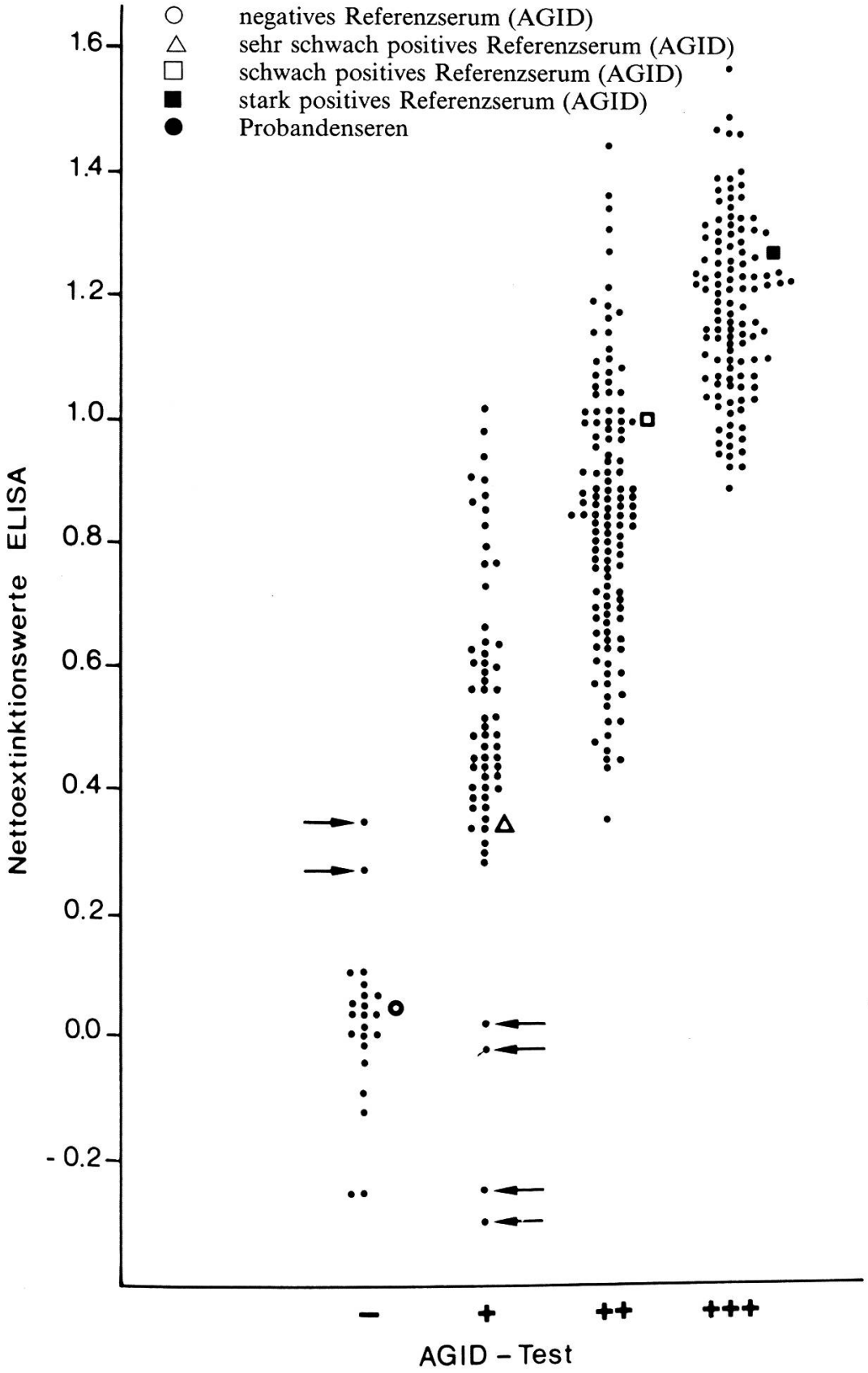

Abb. 2 321 Blutseren wurden vergleichend im ELISA und im AGID-Test untersucht (s. auch Tabelle 4).

Tabelle 4: Titervergleiche von Referenzseren im AGID-Test und im ELISA (s. auch Abb. 2)

Signatur	AGID-Referenzseren	Titer	
		AGID	ELISA
○	negatives Serum*	0	0
□	schwach positives Serum*	1:4	1: 640
■	stark positives Serum*	1:8	1:1280
△	sehr schwach positives Serum+	1:1	1: 40

* Leukassay-B®, Pitman-Moore, Washington Crossing, New Jersey 08560, USA.
+ Eine Präzipitationslinie ist nur bei «Konzentrierung» der Seren nachweisbar [13, 31].

Tabelle 5: Vergleichende Untersuchungen von Milchproben aus Deutschland, Frankreich und der Schweiz mittels AGID-Test und ELISA

Nr./Milchseren	AGID-Test	ELISA-Titer
1 positives Referenzserum (Behringwerke)	negativ	1: 16
2 negatives Referenzserum	negativ	negativ
3 (26 Tage ante partum)	negativ	1:256
4 (8 Tage post partum)	negativ	1: 32
5	negativ	1: 64
6	positiv (+)	1: 64
7	positiv (+)	1: 32
8/9/10/11/12	negativ	1: 16
13/14/15/16/17	negativ	1: 8
18/19/20	negativ	1: 4
21/22	negativ	1: 2
23/24/25/26/27/28/29/30/31/32	negativ	negativ

2.2.2. Milchserum

Wie in Tabelle 5 dargestellt, stimmten die mit den beiden Tests erzielten Resultate bei der Milchserologie nicht überein. Von den 21 positiven Proben im ELISA waren nur deren 2 auch im AGID-Test positiv. Die restlichen waren negativ oder nicht zu interpretieren, da weisse Milchbestandteile, welche in das Agargel diffundierten, die Erkennung einer Präzipitationslinie erschwerten oder gar verunmöglichten.

Die Untersuchungen zeigten, dass die im Milchserum mittels ELISA bestimmten Antikörpertiter deutlich niedriger waren als im Blutserum, wie das schon *Behrens et al.* beschrieben haben [7]. Die höheren Werte betrugen 1:64 und waren um einen Faktor 5–20 niedriger als im Blutserum. Der höchste Titer fand sich im Serum einer Kuh 26 Tage ante partum, er betrug 1:256, daneben waren auch niedrige Titer von 1:2 festzustellen.

3. Diskussion

Bekanntlich kommt die EBL weltweit und auch in unseren Nachbarländern Deutschland, Österreich, Italien und Frankreich sowie in den USA und Kanada vor [12, 13, 15, 21, 23, 51, 57, 58, 59, 60]. Durch den Import von Rindvieh, Kontakt mit ausländischen Tieren bei der Sömmerung im angrenzenden Ausland oder durch die Einfuhr von Samen könnte das BLV in unser Land eingeschleppt werden, wobei allerdings, wie Untersuchungen von *Steck et al.* [62] ergaben, die Gefahr der Einschleppung nicht allzu gross ist.

Die Ergebnisse aller bisherigen Erhebungen und Untersuchungen (Tab. 3) zeigten, dass der schweizerische Rindviehbestand, wenn überhaupt, in nur sehr geringem Grade mit EBL durchseucht ist. *Klaas* [28] und *Steck et al.* [62] haben aufgrund der damals vorliegenden Daten noch postuliert, dass die Schweiz völlig frei von EBL sei. Nach den Bestimmungen des Code zoosanitaire international des Internationalen Tierseuchenamtes in Paris kann ein Land oder ein Landesteil als leukosefrei gelten, wenn entweder:

a. 99,9% aller Bestände amtlich als frei von EBL anerkannt wurden. Ein Bestand kann als amtlich frei von EBL anerkannt werden, wenn zwei im Abstand von mindestens vier Monaten durchgeführte blutserologische Untersuchungen sämtlicher Tiere im Alter von über 2 Jahren ein negatives Resultat ergeben haben. In solche Bestände dürfen nur EBL-freie Tiere eingestellt werden. Oder wenn:

b. sämtliche bei der Fleischschau festgestellten EBL-verdächtigen Tumoren anzeigepflichtig sind und histologisch untersucht werden;
- beim Vorliegen histologisch nachgewiesener Lymphosarkome alle Tiere des Herkunftsbestandes blutserologisch kontrolliert werden;
- während fünf Jahren der Anteil der Bestände, in denen serologisch positive Tiere ermittelt wurden, unter 0,05% aller Bestände liegt.

Unter der Voraussetzung, dass die EBL in die Tierseuchenverordnung vom 15. Dezember 1967 mit entsprechenden Bekämpfungsmassnahmen aufgenommen wird, könnte sich die Schweiz wahrscheinlich in absehbarer Zeit als frei von EBL erklären. Allfällig auftretende Seuchenherde müssten durch sofortige Ausmerzungen der Reagenten getilgt werden.

Wie ist zu erklären, dass unser Land von der EBL weitgehend verschont geblieben ist? Eine gültige Antwort kann nicht gegeben werden. Unser Land importiert zwar vereinzelt Rindvieh, und mit Importsamen sind z. B. vom 1. Juli 1982 bis 30. Juni 1983 73 715 Erstbesamungen durchgeführt worden (Jahresbericht 1982/1983 KB, Mitteilungen des Schweizerischen Verbandes für künstliche Besamung). Das Bundesamt für Veterinärwesen hat jedoch für diese Fälle strenge Vorschriften erlassen: So dürfen sowohl das importierte Tier wie auch der Samenspender keine Antikörper gegen das BLV aufweisen, und der jeweilige Herkunftsbestand muss leukosefrei sein. Aber nicht nur die seuchenpolizeilichen Massnahmen sind dafür verantwortlich, dass die Krankheit nicht in die Schweiz eingeschleppt wurde und dass die Infektion in unserem Lande keine wesentliche Rolle spielt. Es ist bekannt, dass die BLV-Infektion, ganz allgemein gesprochen, eine geringe Ausbreitungstendenz hat [12]. Dies erhellt unter anderem dar-

aus, dass nach einer experimentellen Infektion nicht alle inokulierten Rinder erkranken [43]. Bei der Leukose wird zudem eine genetisch bedingte Disposition des einzelnen Tieres gegenüber einer BLV-Infektion beobachtet [13, 14, 24]. Theoretisch wäre es möglich, dass die Rinderrassen in der Schweiz gegenüber der EBL eine erhöhte genetisch verankerte Resistenz aufweisen.

Der Nachweis einer BLV-Infektion erfolgte bis in die siebziger Jahre mit Hilfe des «Leukoseschlüssels» [65]. Dieser Nachweismethode hafteten aber gravierende Mängel an, da infizierte Tiere frühestens in der präleukotischen Phase erfasst und leukoseinfizierte Tiere ohne Veränderung des weissen Blutbildes übersehen wurden. Die auf dieser Methode fussende Bekämpfung der Krankheit gestaltete sich deshalb schwierig.

Erst als das Glykoprotein-Antigen zur Verfügung stand, war eine serologische, aetiologische Diagnose möglich geworden [40, 41]. Der Agargel-Immunodiffusionstest (AGID-Test) hat sich zum Nachweis von Antikörpern gegen BLV weltweit bewährt. Er ist verlässlich, einfach in der Durchführung, und es werden keine komplizierten Apparaturen benötigt. Die Testmethode weist allerdings auch einige gravierende Nachteile auf. Auf der Präzipitation beruhend, ist der AGID-Test, im Vergleich zu anderen serologischen Nachweisverfahren, relativ unempfindlich und es verstreichen 3 Tage bis das Resultat abzulesen ist. Ausserdem kann aufgrund der mangelnden Empfindlichkeit des Tests der Antikörpernachweis im Milchserum mit seinen niedrigen Immunglobulintitern nicht durchgeführt werden; höchstens in der Kolostralphase wäre dies möglich [4, 36].

Es wurde deshalb ein ELISA für den BLV-Antikörpernachweis herangezogen [6, 25, 35, 38, 52, 53]. Dieser Test hat nicht nur den Vorteil höherer Empfindlichkeit, wodurch BLV-infizierte Tiere früher erkannt werden, sondern auch der abgekürzten Untersuchungsdauer. Denn die Ablesung kann am gleichen Tage, an dem der Test angesetzt wurde, erfolgen. Dank der Empfindlichkeit des ELISA ist es auch möglich, BLV-Antikörper im Milchserum nachzuweisen [1, 7, 35, 36, 66].

Wie andere Autoren [1, 6, 7, 25, 35, 36, 52, 53, 54, 66] konnten auch wir feststellen, dass der ELISA sich für den Nachweis der EBL bestens eignet. *Behrens et al.* [7] fanden den AGID-Test beim Blutserum dem ELISA unterlegen, indem sie mit der Immundiffusion nur 76% der im ELISA positiven Seren erfassten. Auch wir fanden in unserem Untersuchungsgut nicht völlige Übereinstimmung zwischen den beiden Tests. Allerdings waren die Voraussetzungen in der vorliegenden Studie insofern anders, als vor allem AGID-positive Seren im ELISA getestet wurden (Abb. 2) und die Möglichkeit nicht gegeben war, Seren von BLV-infizierten Tieren primär im ELISA zu prüfen. Ausserdem verwendeten *Behrens et al.* das Behring-Antigen und wahrscheinlich eine andere Stanze für die Kavitäten im Agar. Die Frage bleibt offen, wie die in nur einem Test positiv reagierenden Serumproben zu beurteilen sind. Handelt es sich um Kreuzreaktionen mit anderen Retroviren, um eine andere Klasse von nachgewiesenen Antikörpern [53] oder um eine andere Antigenzusammensetzung [53]?

Die höhere Empfindlichkeit des ELISA im Vergleich zum AGID-Test trat bei der Untersuchung der Milchserumproben deutlich zutage (Tab. 5). Es zeigte sich, dass der Antikörpernachweis mittels ELISA im Milchserum für die Diagnose der EBL herangezogen werden kann, wie das schon andere Autoren festgestellt haben [1, 7, 35, 36, 66].

In diesem Zusammenhang ist der bei einem Tier erhobene Befund interessant. In der kurz vor Laktationsende (26 Tage ante partum) entnommenen Milchprobe wurde ein Titer von 1:256 mittels ELISA ermittelt. 8 Tage post partum war der Titer bereits auf 1:32 gesunken (s. Tab. 5, Nr. 3+4). Scheinbar wurde infolge Änderung der Permeabilität der Euteralveolen die kolostrumähnliche Milch bereits mit Immunglobulinen angereichert. Nach Abschluss der Kolostralmilchproduktion scheint der Transfer von Antikörpern in das Euter abrupt abgenommen zu haben, was zum Absinken des Antikörpertiters in der Milch führte [4].

Die EG-Kommission beabsichtigt, die Einfuhrbestimmungen für Zuchttiere der Rindergattung bezüglich Leukosefreiheit erheblich zu verschärfen. Nicht nur das zu exportierende Tier, sondern auch der Herkunftsbestand soll frei von EBL sein. Das würde für unser Land bedeuten, dass z. B. pro exportiertes Zuchttier durchschnittlich 10 und mehr Tiere im Alter über 2 Jahre serologisch auf eine BLV-Infektion zu untersuchen wären. Die Schweiz exportierte in den letzten Jahren ca 16 000 Rinder und Kühe pro Jahr. Wenn in allen Herkunftsbeständen Blutproben entnommen und untersucht werden müssten, wäre dies mit hohen Kosten verbunden. Die Milchuntersuchung mittels ELISA würde in dieser Hinsicht eine wesentliche Arbeitserleichterung und zugleich eine finanzielle Einsparung bedeuten. Für die Standardisierung der Methode sind aber noch weitere Untersuchungen nötig, welche in unserem Lande mit der beschränkten Beschaffungsmöglichkeit positiver Proben nicht durchführbar sind. Insbesondere sollte die Frage abgeklärt werden, wieviel Einzelmilchproben in einer Sammelmilchprobe vereinigt sein dürfen, damit auch infizierte Einzeltiere erfasst werden. Auf diese Probleme haben *Toma et al.* [66] hingewiesen, und sie kommen zum Schluss, dass bei zweimaliger Untersuchung eines Bestandes, in dem 5–10% der Kühe mit BLV infiziert waren, mittels Sammelmilch die Infektion nachweisbar ist. In der Schweiz wäre mit einer niedrigeren Durchseuchungsrate zu rechnen, und es läge durchaus im Bereich des möglichen, dass Einzelmilchproben zu untersuchen wären.

Selbstverständlich kann der ELISA auch für die Diagnose der EBL am Einzeltier, bei der Untersuchung von Blut- und Milchserum, Verwendung finden.

Da in den diagnostisch tätigen Laboratorien dank den IBR-Untersuchungen der ELISA etabliert ist, wäre eine Umstellung von AGID auf den ELISA jederzeit möglich.

Erfreulicherweise scheinen in unserem Lande die infolge der IBR-Bekämpfung vermehrt durchgeführten Blutentnahmen die epidemiologische Lage in bezug auf die EBL nicht verändert zu haben.

Zusammenfassung

Zur Abklärung der epidemiologischen Situation in bezug auf die enzootische bovine Leukose (EBL) in der Schweiz wurden 22 670 Rinderseren aus den Kantonen Schaffhausen, Zürich, Jura und der Region Nordostschweiz auf das Vorkommen von präzipitierenden Antikörpern gegen das bovine Leukosevirus (BLV) mit dem Agargelimmundiffusionstest (AGID-Test) untersucht. Zusammen mit den Untersuchungen anderer Laboratorien wurden bis heute 94 685 Rinderseren auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen BLV geprüft, was 4,9% des gesamten Rindviehbestandes der Schweiz entspricht. Mit Ausnahme einer 4jährigen Kuh waren alle Tiere seronegativ.

349 Blutseren und 32 Milchseren aus Deutschland, Österreich, Frankreich und der Schweiz wurden vergleichend im AGID-Test und im ELISA untersucht. Nur bei 6 Blutseren stimmten die

Resultate der beiden Tests nicht überein. 21 Milchseren waren im ELISA positiv und im AGID-Test nur deren 2. Der ELISA eignet sich somit für den serologischen Nachweis einer BLV-Infektion.

Wegen der einfacheren Materialbeschaffung bedeutet der Nachweis von Antikörpern im Milchserum mittels ELISA eine erhebliche Arbeitserleichterung und eine finanzielle Einsparung.

Résumé

Une étude séroépidémiologique a été entreprise pour dépister la leucose bovine enzootique en Suisse, portant sur 22 670 bovins provenant des cantons de Schaffhouse, Zurich, Jura et des régions du nord-est du pays. La recherche des anticorps dans le serum s'effectuait par immunodiffusion en gélose. Sur un total de 94 685 serums examinés par différents laboratoires en Suisse, un seul animal s'est révélé positif.

349 serums et 32 laits provenant de la Republique Fédérale Allemande, d'Autriche, de France et de Suisse, ont été examinés en parallèle avec le test d'immunodiffusion en gélose et par l'ELISA. Seuls 6 sérums sanguins montrèrent des résultats contradictoires. 21 lacto-sérums se révélèrent positifs à l'ELISA et deux seulement au test de l'immunodiffusion. L'ELISA peut donc être considéré comme une méthode appropriée pour le dépistage sérologique d'une infection par le virus de la leucose bovine enzootique. L'aspect économique favorable du test ELISA sur lait pour le dépistage de la leucose bovine est discuté.

Riassunto

Per chiarire la situazione epidemiologica della leucosi enzootica bovina (LEB) in Svizzera, 22 670 sieri bovini provenienti dai cantoni Sciaffusa, Zurigo, Giura e dal nord della Svizzera sono stati analizzati con il test dell'agarimmunodiffusione (AGID-Test) per scoprire eventuali anticorpi contro il virus della leucosi bovina (VLB). Assieme analisi eseguite da altri laboratori, fino ad oggi, sono stati esaminati 94 685 sieri bovini sulla presenza di anticorpi contro la LEB, il che rappresenta il 4,9% della popolazione bovina svizzera. Ad eccezione di una mucca di 4 anni, tutti gli animali erano sieronegativi.

349 sieri di sangue e 32 sieri di latte provenienti dalla Germania, Austria, Francia e dalla Svizzera sono stati esaminati parallelamente con l'AGID-test e con l'ELISA. Solo in 6 sieri di sangue i risultati dei due test non erano concordanti. 21 sieri di latte erano positivi con l'ELISA; solo 2 con l'AGID-test. L'ELISA si è rivelato un test valido per la diagnosi sierologica di un'infezione da VLB. Vista la facilità di procurarsi il materiale, la ricerca di anticorpi nel siero di latte con l'ELISA semplifica notevolmente il lavoro e permette inoltre un risparmio finanziario.

Summary

To delimit the spread of enzootic leucosis in the Swiss bovine population, 22 670 bovine blood serum samples stemming from the cantons Schaffhausen, Zurich, Jura and the north-eastern regions of the country, were tested for the presence of antibodies to bovine leukaemia virus. For this seroepidemiological investigation, an agargel-immunodiffusion test was used. On the whole (including the present results) 94 685 serum samples were tested since 1972 by different laboratories and only one seropositive animal with tumors was detected in the canton of Aargau in 1983.

349 positive blood serum and 32 milk serum samples, stemming from the Federal Republic of Germany, Austria, France and Switzerland, were examined in a comparative study. With the blood serum samples, in 6 cases the ELISA and the immunodiffusion test were not concordant. In 21 out of 32 milk serum samples, antibodies against the bovine leucosis virus could be detected by using the ELISA. By using the immunodiffusion test, 2 out of 32 milk serum samples were positive. The screening in milk sera by means of an ELISA is saving labour and costs.

Verdankungen

Herzlich danken wir all jenen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere: Prof. F. Bürki, Wien, für die wertvollen Ratschläge und die zur Verfügung gestellten Serumproben sowie für die Durchsicht des Manuskriptes. Prof. Dr. O.-R. Kaaden, Hannover, Prof. Dr. B. Toma, Maisons-Alfort, Dr. Giger, St. Gallen und Dr. E. Boller, Bern, für zur Verfügung gestellte Proben. Dr. W. Bommeli, Bern, für die gecoateten Mikro-ELISA-Platten, Dr. Chr. Riggenbach vom Bundesamt für Veterinärwesen für die teilweise Übernahme der Antigenanschaffungskosten, die Beratung in seuchenpolizeilichen Fragen und das Zugänglichmachen von Daten, sowie Frau D. Leuthard für die technische Mitarbeit und Frau Ch. Gerber für die Sekretariatsarbeiten.

Literaturverzeichnis

[1] *Ban J., Zajac V., Altaner C., Cerny L.:* Early diagnosis of virus induced bovine leukosis in milk by a simple modified ELISA test. Zbl. Vet. Med. B *29,* 591–595, 1982. – [2] *Bannenberg T.:* Versuche mit einem modifizierten Ansatzschema des AGID-Tests zur Diagnose der enzootischen Rinderleukose. Zbl. Vet. Med. B *29,* 676–680, 1982. – [3] *Baumgartner L. E., Olson C.:* Host range of bovine leukosis virus: Preliminary report. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis, Bologna 1980. Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 338–347, 1982. – [4] *Bause I., Schmidt F.-W.:* Zur Persistenz präzipitierender Antikörper im Blutserum leukoseinfizierter Rinder unter besonderer Berücksichtigung des Kalbezeitpunktes. Tierärztl. Umschau *35,* 643–649, 1980. – [5] *Bech-Nielsen St., Piper C. E., Ferrer J. F.:* Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: Role of bloodsucking insects. Am. J. Vet. Res. *39,* 1089–1092, 1978. – [6] *Behrens F., Ziegelmaier R., Toth T., v. Keyserlingk M., Forschner E.:* Rinderleukose-Diagnostik: ELISA – ein neues Verfahren. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. *92,* 429–432, 1979. – [7] *Behrens F., Ziegelmaier R., Forschner E., Manz D., Wiegand D.:* Comparative studies on the enzyme linked immuno sorbent assay and immunodiffusion test in the diagnosis of enzootic bovine leukosis. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis, Bologna 1980. Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 173–181, 1982. – [8] *Bellani L., Gentile G., Vacirca G., Poli G.:* Serological investigations for BLV infection on imported cattle in Italy. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis, Bologna 1980, Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 451–455, 1982. – [9] *Bendixen H. J.:* Herd leucosis is caused by infectious agent, probably a virus, but sporadic types indicate there may be a different etiology. Mod. Vet. Pract. *42,* 33–36, 1961. – [10] *Bendixen H. J.:* Untersuchungen über die Rinderleukose in Dänemark. II. Pathogenese und Enzootologie der übertragbaren Rinderleukose. Dtsch. tierärztl. Wschr. *67,* 57–63, 1960. – [11] *Bundesamt für Veterinärwesen, Bern:* Die enzootische Rinderleukose unter dem Gesichtspunkt des Zuchtviehexports. Amtliche Mitteilung, 1983. – [12] *Bürki F.:* Kontrolle der enzootischen Rinderleukose in Österreich. Vortrag, gehalten in Budapest im November 1982 (nicht veröffentlicht). – [13] *Bürki F., Möstl K., Kasper A., Horvath E., Kuntner C.:* Virologisch-serologische Feststellung der enzootischen Rinderleukose in Österreich und ihre gezielte freiwillige Sanierung durch periodische Ermittlung und Keulung von Seroreagenten. Wien, tierärztl. Mschr. *70,* 1–14, 1/1983. – [14] *Burridge M. J., Wilcox C. J., Hennemann J. M.:* Influence of genetic factors on the susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection. Europ. J. Cancer *15,* 1395–1400, 1979. – [15] *Cavrini C., Gentile G., Vacirca G., Giordani L.:* Distribution of BLV infection in some provinces in Northern Italy. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis, Bologna 1980, Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 442–450, 1982. – [16] *Chiu J.-M., Callahan R., Tronick S. R., Schlom J., Aaronson S. A.:* Major pol gene progenitors in the evolution of oncoviruses. Science *223,* 364–370, 1984. – [17] *Ferrer J. F., Piper C. E., Abt D. A., Marshak R. R., Bhatt D. M.:* Natural mode of transmission of the bovine C-type leukemia virus (BLV). Comparative Leukemia Research 1975, Ed. J. Clemmesen and D. S. Yohn, Verlag J. Karger, Basel. Bibl. Haemat. *43,* 235–237, 1976. – [18] *Ferrer J. F., Marshak R. R., Abt D. A., Kenyon S. J.:* Persistent lymphocytosis in cattle: Its cause, nature and relation to lymphosarcoma. Ann. Rech. Vét. *9,* 851–857, 1978. – [19] *Ferrer J. F., Piper C. E.:* An evaluation of the role of milk in the natural transmission of bovine leukemia virus. Ann. Rech. Vét. *9,* 803–807, 1978. – [20] *Ferrer J. F., Piper C. E.:* Role of colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus. Cancer Res. *41,* 4906–4909, 1981. – [21] *Forschner E., Behrens F.:* About the successful eradica-

tion of bovine leucosis in a part of the GFR based on the investigation of blood-sera-samples with agar-immuno-diffusion (AGID) using monospecific BLV-antigen Gp-69. World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Proceedings to the Third International Symp. 1983 Ames, Iowa, USA. *2,* 691–697, 1983. – [22] *Forschner E., Seidler M. J., v. Keyserlingk-Eberius M.:* Methodische Erfahrungen mit dem Agargelimmunodiffusionstest (ID-Test) bei der routinemässigen Massenuntersuchung von Blutproben zur Erkennung der enzootischen Rinderleukose. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. *91,* 447–450, u. 453– 456, 1978. – [23] *Frank W., Eberle G.:* Fortschritte bei der Bekämpfung der Rinderleukose in Niedersachsen aus der Sicht der serologischen Überwachungsuntersuchungen. Dtsch. tierärztl. Wschr. *87,* 176–178, 1980. – [24] *Hofirek B.:* The development of antibodies to BLV in a leukosis cattle herd. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis Bologna 1980, Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 475–488, 1982. – [25] *Kaaden O.-R.:* Aktuelle Fragen der Rinderleukoseforschung und -bekämpfung. Dtsch. tierärztl. Wschr. *87,* 41–43, 1980. – [26] *Kaaden O.-R., Fischer W., Meermann A., Liebisch A.:* Transmission of BLV by Ixodes ricinus ticks. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis, Bologna 1980, Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 348–360, 1982. – [27] *Kahrs R. F., Gibbs E. P. J., Larsen R. E.:* The search for viruses in bovine semen, a review. Theriogenology. *14,* 151–165, 1980. – [28] *Klaas M.:* Untersuchungen über das weisse Blutbild im Zusammenhang mit der enzootischen Leukose bei schweizerischen Rinderrassen. Inaugural-Dissertation Vet.-med. Fakultät Zürich, 1972. – [29] *Kuoni E.:* Bericht zur Untersuchung auf enzootische Leukose. Mitteilung des Kantonstierarztes Graubünden an das Bundesamt für Veterinärwesen, 1981. – [30] *Liebermann H., Wittmann W., Müller M., Lehnert E.:* Zu einigen wesentlichen Erkenntnissen der ätiologischen und epizootologischen Forschungen bei der Rinderleukose und sich daraus ergebenden grundsätzlichen Anforderungen an die Bekämpfungsprinzipien. Mh. Vet.-Med. *38,* 41–47, 1983. – [31] *Lorenz R. J., Straub O. C.:* Versuche über die Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Immundiffusionstests zur Diagnose der Rinderleukose. Tierärztl. Umschau *35,* 576–592, 1980. – [32] *Lucas M. H., Dawson M., Chasey D., Wibberley G., Roberts D. H., Saunders R.:* Enzootic bovine leucosis virus in semen. Vet. Rec. *106,* 128, 1980. – [33] *Lucas M. H., Roberts D. H.:* Transmission of bovine leukosis virus. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis, Bologna 1980, Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 264–266. 1982. – [34] *Mammerickx M., Portetelle D., Burny A.:* Experimental crosstransmissions of bovine leukaemia virus (BLV) between several species. 4th Internat. Symp. Bovine Leukosis, Bologna 1980. Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 321–327, 1982. – [35] *Manz D., Wiegand D., Behrens F., Ziegelmaier R.:* Vergleichende serologische Untersuchungen an Blut und Milch zur Diagnostik der enzootischen Leukose des Rindes. Zbl. Vet. Med. B *28,* 280–291, 1981. – [36] *Manz D.:* Die Milch als Untersuchungsmaterial für die Diagnostik der enzootischen Leukose des Rindes. Dtsch. tierärztl. Wschr. *88,* 169–171, 1981. – [37] *Matthews R. E. F.:* Fourth report of the international committee on taxonomy of viruses; classification and nomenclature of viruses. Intervirology *17,* 124–128, 1982. – [38] *Meyer U., Schilow W. F., Starick E., Kluge K. H., Heim F.:* Vergleich der Empfindlichkeit des Enzymimmunoassay und des Agargel-Immundiffusionstestes für die Bestimmung von Antikörpern gegen das bovine Leukosevirus. Arch. exp. Veterinärmed. *37,* 661–666, 1983. – [39] *Miller J. M., Miller L. D., Olson C., Gillette K. G.:* Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine Lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst. *43,* 1297–1305, 1969. – [40] *Miller J. M., Van der Maaten M. J.:* Serologic detection of bovine leukemia virus infection. Vet. Microbiol. *1,* 195–202, 1976. – [41] *Miller J. M., Van der Maaten M. J.:* Use of glycoprotein antigen in the immunodiffustion test for bovine leukemia virus antibodies. Europ. J. Cancer *13,* 1369–1375, 1977. – [42] *Miller J. M., Van der Maaten M. J.:* Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. J. Natl. Cancer Inst. *62,* 425–427, 1979. [43] *Mitscherlich E.:* Rinderleukose in der Praxis. Tierärztl. Prax. *1,* 149–158, 1973. – [44] *Mohanty S. B. and Dutta S. K.:* Veterinary Virology p. 318–322, Lea and Febiger, Philadelphia, 1981. – [45] *Nakajima H., Oikawa H., Inumaru S., Sugiura T.:* Immunodiffusion studies in bovine leukosis. JARQ *16,* 136–143, 1982. – [46] *Olson C., Kaja R., Stauffacher R., Zehner E.:* Development of bovine leukosis virus in cattle. A preliminary study. Ann. Rech. Vét. *9,* 845–849, 1978. – [47] *Olson C., Kaja R. W.:* Influence of colostral antibody on susceptibility of sheep to bovine leukosis virus. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis, Bologna 1980, Current Topics In Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 101–111, 1982. [48] *Olson H.:* Studien über das Auftreten und die Verbreitung der Rinderleukose in Schweden. Acta Vet. Scand. *2,* Suppl. 1, 13–46, 1961. –

[49] *Piper C. E., Abt D. A., Ferrer J. F., Marshak R. R.:* Seroepidemiological evidence for horizontal transmission of bovine C-type-virus. Cancer Res. *35,* 2714–2716, 1975. – [50] *Piper C. E., Ferrer J. F., Abt D. A., Marshak R. R.:* Postnatal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. J. Natl. Cancer Inst. *62,* 165–168, 1979. – [51] *Reed V. I.:* Enzootic bovine leukosis. Can. vet. J. *22,* 95–102, 1981. – [52] *Ressang A. A., Ellens D. J., Mastenbroek N., Quak J., Miller J. M., Van der Maaten M. J.:* Studies on bovine leukemia. II. Hematological, serological, virological and electron microscopical diagnosis. Zbl. Vet. Med. B *23,* 566–579, 1976. – [53] *Ressang A. A., Gielkens A. L. J., Quak S., Mastenbroek N., Tuppert C., De Castro A.:* Studies on bovine leukosis. VI. Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine leukosis virus. Ann. Rech. Vét. *9,* 663–666, 1978. – [54] *Ressang A. A., Gielkens A. L. J., Quak J., Mastenbroek N.:* Studies on bovine leukosis VII. Further experience with an ELISA for the detection of antibodies to bovine leukosis virus. The Vet. Quarterly *3,* 31–33, 1981. – [55] *Rolle M. und Mayr A.:* Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler. 4. Auflage, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 529–534, 1978. – [56] *Ruppanner R., Behymer D. E., Paul S., Miller J. M., Theilen G. H.:* A strategy for control of bovine leukemia virus infection: Test and corrective management. Can. Vet. J. *24,* 192–195, 1983. – [57] *Rutili D., Severini M., Rampichini L., Titoli F.:* Epidemiologic study on enzootic bovine leukemia in Italy. Ann. Rech. Vét. *9,* 761–764, 1978. – [58] *Rutili D., Severini M., Bertorotta G., Titoli F.:* Large scale survey of bovine leukosis virus infection in Central and Southern Italy. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis, Bologna 1980. Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 431–441, 1982. – [59] *Rutili D., Severini M., Titoli F., Rampichini L., Bertorotta G.:* Epidemiology of bovine leukosis virus infection in some selected herds. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis, Bologna 1980. Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 459–474, 1982. – [60] *Schlegel H.-L.:* Die Entwicklung der wichtigsten Tierseuchen in Niedersachsen und die Kosten ihrer Bekämpfung in den Jahren 1966 bis 1979. Dtsch. tierärztl. Wschr. *87,* 163–167, 1980. – [61] Statistische Quellenwerke der Schweiz. Nutztierbestand der Schweiz 1983. Provisorische Ergebnisse. (Persönliche Mitteilung). – [62] *Steck F., Kupferschmied H., Leemann W., Kaderli F., Bommeli W., Gafner P., Spörri H. K.:* Serologische Übersichtsuntersuchungen über das Auftreten von boviner Leukose in der Schweiz. Schweiz. Arch. Tierheilk. *121,* 439–450, 1979. – [63] *Straub O. C.:* Transmission studies from leukotic cattle to sheep using secretions, excretions, breath and skin scrapings. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis, Bologna 1980. Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 299–309, 1982. – [64] *Thurmond M. C., Carter R. L., Puhr D. M., Burridge M. J., Miller J. M., Schmerr M. J. F., Van der Maaten M. J.:* An epidemiological study of natural in utero infection with bovine leukemia virus. Can. J. Comp. Med. *47,* 316–319, 1983. – [65] *Tolle A.:* Zur Beurteilung quantitativer hämatologischer Befunde im Rahmen der Leukosediagnostik beim Rind. Zbl. Vet. Med. B *12,* 281–290, 1965. – [66] *Toma B., Vuillaume A., Manet G., Duret Ch., Eloit M., Crespean F., Chappuis G., Parodi A.-L.:* Dépistage de la leucose bovine enzootique par application du test ELISA sur le lait. Rec. Méd. Vét. *160,* 53–60, 1984. – [67] *Voller A., Bidwell D. E., Bartlett A.:* The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Flowline Publications, Guernsey, Europe, ISBN 0.906036.01.1, 1979. – [68] *Van der Maaten M. J., Miller J. M., Schmerr M. J. F.:* In utero transmission of bovine leukemia virus. Am. J. Vet. Res. *42,* 1052–1054, 1981. – [69] *Van der Maaten M. J., Miller J. M., Schmerr M. J. F.:* Factors affecting the transmission of bovine leukaemia virus from cows to their offspring. 4th Internat. Symp. on Bovine Leukosis Bologna 1980, Current Topics in Vet. Med. Anim. Sc. *15,* 225–243, 1982. – [70] *Wilesmith J. W., Straub O. C., Lorenz R. J.:* Untersuchungen zur iatrogenen Übertragung des Virus der Rinderleukose. Tierärztl. Umschau *33,* 519–523, 1978.

Manuskripteingang: 29. Juni 1984