

Nachweis von präzipitierenden Antikörpern im Serum der mit Leberegel behafteten Rinder

Autor(en): **Spuhler, V. / Moosbrugger, G.A. / Meyer, K.**

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): **100 (1958)**

Heft 11

PDF erstellt am: **15.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-593254>

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.

lymphogranuloma group. J. inf. diseases. Vol. 84. 1949. – [41] Ward C. G. and Burge J. P.: Vet. Bull. 24. (Psittakose durch Fasane) 1954. – [42] Wolman M.: The nature of viral inclusion-bodies and their differentiation from non viral inclusions. Experientia Vol. XI, 1, 1955. – [43] York C. J. and Baker J. A.: A new virus of the Psittacosis-Lymphogranulomatosa group. Vet. Bull. 22, 1952.

Aus dem Eidg. Vakzine-Institut in Basel, Eidg. Veterinäramt

Nachweis von präzipitierenden Antikörpern im Serum der mit Leberegel behafteten Rinder

Von V. Spuhler, G. A. Moosbrugger und K. Meyer

Der serologische Nachweis von Antikörpern bei bakteriell infizierten Organismen ist heute in den meisten Fällen mit keinen Schwierigkeiten verbunden. Schwieriger gestaltet sich das Auffinden entsprechender Antikörper bei Metazoenbefall. Die Diagnose auf Leberegel basiert daher heute noch zur Hauptsache auf dem direkten Nachweis der Leberegeleier im Kot. Doch haften auch den koprologischen Nachweis-Verfahren etwelche Nachteile an, da sie oft mit Schwierigkeiten und Unregelmäßigkeiten verbunden sind [1]. Wir haben uns daher die Aufgabe gestellt, für die Diagnose des Leberegelbefalls (wir beschränkten uns auf *Distomum hepaticum* beim Rind) die *Agardiffusionsmethode* heranzuziehen. Gleichzeitig hofften wir einige Aufschlüsse über die Natur des Antigens zu erhalten.

Die Agardiffusionsmethode liefert heute gute und spezifische Resultate bei Influenza [2], Pocken [3] und Maul- und Klauenseuche [4, 5, 6]. Neuerdings wurde sie auch mit Erfolg zur Analyse der Antigene von Trichinen und Pflanzenpollen [7, 8] herangezogen.

Technik

Die Technik der Zubereitung der Agardiffusionsplatten ist schon von verschiedenen Seiten genau beschrieben worden [9, 10], so daß hier auf eine Wiederholung verzichtet werden kann. Als *Antigen* wurden verschiedene Leberegelextrakte verwendet. Die Leberegel (*Distomum hepaticum*) wurden kurz nach der Schlachtung der Rinder aus den Lebern gesammelt, hierauf wiederholt mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und durch Waschen in destilliertem H₂O abgetötet. Sofortiges Zerkleinern der frischen Egel in der Kolloidmühle ergab einen Extrakt, der bei der Diffusion im Agar so starke unspezifische Ausfällungen um die Stanzlöcher bewirkte, daß dadurch eine Ablesung der Resultate beeinträchtigt wurde. Auf der Suche nach Methoden zur Eliminierung dieser Ballaststoffe fanden wir, daß die Antigenfaktoren sich aus den wässrigen Leberegelextrakten durch Versetzen mit Azeton praktisch vollständig ausfällen lassen. Andererseits kann man durch kräftiges Schütteln mit Chloroform einen

Teil der interferierenden Substanzen ausfällen, ohne daß dabei auch die antigenen Stoffe eliminiert werden. Durch Kombination einer Vorreinigung mit Chloroform und anschließender Fällung mit Azeton läßt sich ein Antigenprodukt gewinnen, das, wieder in wenig Wasser aufgelöst, eine weit höhere Antigenkonzentration aufweist als die Ausgangslösung und, im Gegensatz zu dieser, weniger störende Trübungen um die Stanzlöcher in den Agarplatten hervorruft.

Heute gehen wir bei der Antigenextraktion folgendermaßen vor:

1. Die Leberegel werden durch Waschen in Aqua dest. abgetötet und hierauf in warmem Luftstrom (elektrischer Strahler) getrocknet. So lassen sie sich monatelang ohne Zugabe eines Desinfektionsmittels aufbewahren.

Etwa 6 g dieser getrockneten Leberegel werden zu feinem Pulver zerrieben (im Mörser, eventuell Broyeur), in 30 ml Aqua dest. aufgenommen, häufig umgerührt und über Nacht zur weitem Extraktion bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend erfolgt Zentrifugation während 20 Minuten bei 8000 T/min.

2. Die obenstehende Flüssigkeit wird nun mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und während einiger Stunden häufig und kräftig geschüttelt. Dann wird die gebildete Emulsion während 30 Minuten bei 8000 T/min. zentrifugiert. Die überstehende Antigenlösung ist nun wesentlich klarer als die Ausgangslösung. Jene kann nun direkt für die Antikörperreaktion auf Agarplatten verwendet werden.

3. Um zu konzentrierteren Antigenlösungen zu gelangen, wird der durch Chloroform vorgereinigte Extrakt von 2. mit dem gleichen Volumen Azeton versetzt, wiederum kräftig geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Das Überstehende wird verworfen, und der Bodensatz, der das Antigen enthält, kann in beliebigen Mengen H₂O, je nach der gewünschten Konzentration, aufgeschwemmt werden. Zur Haltbarmachung der Antigenlösungen verwenden wir Merthiolat in einer Konzentration von 1 : 10 000.

Als *Antikörper* dienten uns die Seren der zur MKS-Infektion verwendeten Schlachtrinder. Das Blut kann intra vitam gewonnen werden; in unserem Fall wurden einfachheitshalber bei der Schlachtung jeweils einige ml Blut in ein Reagensröhrchen aufgefangen und entsprechend der Tiernummer beschriftet. Bei der Fleischschau wurde der Grad des *Leberegelbefalles* genau notiert¹, und zwar bedeuten

× = mäßiger Befall
 × × = mittlerer Befall
 × × × = starker Befall
 — = keine Leberegel.

In den folgenden 3 Tabellen sind die Resultate von 3 Versuchen zusammengestellt.

Zusammenfassend ergibt sich aus dem ersten Versuch: Bei 19 mit Leberegel befallenen Tieren wies das Serum in 15 Fällen Antikörper auf. Tiere, bei welchen in der Fleischschau keine Leberegel nachgewiesen werden konnten, zeigten auch keine Antikörper gegen *Distomum hepaticum*. Eine gewisse Parallelität besteht somit zwischen dem Grad des Befalles und dem Zustandekommen der Antigen-Antikörperreaktion.

Beim zweiten und dritten Versuch kamen Schlachtrinder aus Jugoslawien, die uns als Virusspender für die MKS-Vakzinefabrikation dienten, zur Auswertung. Wie aus den beiden nachfolgenden Tabellen ersichtlich ist, sind diese Tiere zahlenmäßig stark mit Leberegeln befallen.

¹ Den Herren Tierärzten vom Städtischen Schlachthof Basel, Dr. Hagmann, Dr. Werffeli und Dr. Ernst, sei an dieser Stelle bestens gedankt für ihre Mithilfe und die genaue Notierung ihrer Befunde.

Tabelle Nr. 1 (1. Versuch)

Rind Nr.	Egelbefall	Antigen- Antikörperreaktion
1	× ×	positiv
2	× × ×	positiv
3	× × ×	positiv (schwach)
4	× × ×	positiv
5	× × ×	positiv
6	× × ×	positiv
7	× × ×	positiv
8	—	negativ
9	× × ×	positiv
10	—	negativ
11	×	negativ
12	× × ×	positiv
13	× × ×	positiv
14	× × ×	positiv (schwach)
15	×	negativ
16	× ×	positiv
17	× ×	positiv
18	× × ×	positiv
19	× ×	positiv
20	× × ×	negativ
21	× ×	negativ
22	—	negativ
23	—	negativ
24	—	negativ
25	—	negativ
26	—	negativ
27	—	negativ
28	—	negativ

Die Seren derjenigen Tiere, die trotz starken Egelbefalls (× × ×) in den Agardiffusionsplatten keine positiven Antigen-Antikörperreaktionen gaben, wurden durch Gefriertrocknung und nachheriges Aufschwemmen in einen Drittel des ursprünglichen Volumens Aqua dest. konzentriert. Bei den mit * bezeichneten Seren konnte nachträglich noch eine positive Reaktion beobachtet werden.

Aus den 3 Tabellen geht zusammenfassend hervor: Das Auffinden von Antikörpern im Blut von mit Leberegel behafteten Rindern gestaltet sich um so sicherer, je stärker der Befall der betreffenden Tiere ist. Unter 35 Rindern, die bei der Fleischschau einen starken Befall (× × ×) ergeben hatten, zeigten 27 im Plattenversuch Ausbildung von Präzipitationslinien. Wenn noch die 4 Tiere, deren Seren erst nach Konzentrieren noch positiv reagierten, berücksichtigt werden, so ergibt sich ein Total von 31, auch im Plattentest positiven Fällen, was einem Prozentsatz von 88,5% entspricht. Bei mittlerem oder schwachem Befall mit Leberegel nimmt die Treffsicher-

Tabelle Nr. 2 (2. Versuch)

Rind Nr.	Egelbefall	Antigen-Antikörperreaktion (Beobachtung der Reaktion während einer Woche)						
		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
1	×××	—	+	++	+++	+++	+++	+++
2	××	—	—	—	—	—	—	±
3	×××	—	—	±	±	±	±	+
4	×××	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—
6	×××	—	—	—	—	±	+	+
7	—	—	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—	—
9	××	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—	—
13	×××	—	—	±	±	+	++	++
14	××	+	+	++	++	++	+++	+++
15	××	—	—	—	—	—	—	—
16	—	—	—	—	—	—	—	—
17	××	—	—	—	—	—	—	—
18	×××	—	—	—	+	+	++	++
19	×××	—	—	—	—	—	±	+
20	—	—	—	—	—	—	—	—
21	×	—	—	—	—	—	—	—
22	×××	—	—	—	—	—	—	—
23	××	—	—	+	+	+	+	++
24	—	—	—	—	—	—	—	—
25	××	—	—	—	—	—	—	—
26	—	—	—	—	—	—	—	—
27	—	—	—	—	—	—	—	—
28	×××	—	—	—	±	+	+	++
29	××	—	—	±	±	+	+	+
30	—	—	—	—	—	—	—	—
31	—	—	—	—	—	—	—	—
32	×××	—	±	±	++	++	+++	+++
33	—	—	—	—	—	—	—	—
34	×	—	—	—	—	—	—	—
35	××	—	—	±	±	+	+	+

heit rasch ab. Andererseits ließ sich zeigen, daß bei den sicher egelfreien Individuen (24 Tiere) nie eine Antigen-Antikörperreaktion zustande kam.

Um die Natur des Antigens näher zu untersuchen, wurde versucht, dieses proteolytisch abzubauen.

0,02 g Pankreasprotease (berechnet auf 1 g getrocknete Leberegel) war nicht imstande, in der Extraktlösung die antigene Substanz abzubauen, so daß in den Agarplatten selbst nach einer Inkubation während 3 Wochen bei 37° immer noch Präzipitationslinien auftraten. Ebensovienig vermochte Pepsin bei einem pH von 3,5 und in einer Konzentration von 0,02 g auf

Tabelle Nr. 3 (3. Versuch)

Rind Nr.	Egelbefall	Antigen-Antikörperreaktion (Beobachtung der Reaktion während einer Woche)						
		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
1	××	—	±	±	±	±	±	±
2	×××	—	±	++	++	++	++	++
3	××	—	—	±	±	±	±	±
4	×××	—	—	—	—	—	—	—*
5	×	—	—	—	—	—	—	—
6	×	—	—	—	—	—	—	—
7	×	—	—	—	—	—	—	—
8	××	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—
10	×××	—	—	—	++	+++	+++	+++
11	×	—	—	—	—	—	—	—
12	×	—	—	—	—	±	±	±
13	×××	—	—	—	—	—	—	—*
14	—	—	—	—	—	—	—	—
15	×××	—	±	±	±	±	±	±
16	×××	—	—	—	—	—	—	—*
17	×××	—	—	—	±	+	+	+
18	×××	—	—	±	+	+	+	+
19	×××	—	—	±	+	+	+	+
20	×××	—	—	±	+	+	+	+
21	×××	—	—	—	—	—	—	—
22	×××	—	—	—	—	—	—	—
23	×××	—	++	++	+++	+++	+++	+++
24	×××	—	—	—	+	++	++	++

10 ml Egelextrakt (welcher die antigenen Substanzen von 1 g getrockneter Leberegel enthielt) zu zerstören. Dagegen konnte der enzymatische Abbau der das Antigen begleitenden Proteine durch Fällen mit Trichloressigsäure und nephelometrische Auswertung der Trübungsintensität verfolgt werden.

Die für die Präzipitation verantwortlichen Bestandteile des Antigens scheinen demzufolge nicht Eiweißcharakter zu besitzen. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich um Polysaccharide handelt.

Das Antigen scheint aus zwei verschiedenen Komponenten zu bestehen. In den Agarplatten sind meist deutlich 2 Anhäufungen von Präzipitationslinien zu sehen, wovon sich die erste in 4 unscharfe Fraktionen unterteilen läßt, die zweite Gruppe in zwei sehr scharfe Linien. Die Gruppe der scharfen Linien ist stets näher der Serumquelle zu finden, die unscharfe Gruppe näher der Antigenquelle. Die antigene Substanz verträgt während kurzer Zeit Siedetemperatur, sie wird jedoch durch längeres Autoklavieren (2 Stunden bei 125° C/1,5 Atü) zerstört. Auf Versuche, mit dem Antigen therapeutische oder prophylaktische Ziele zu verfolgen, mußten wir, als den Aufgaben des Institutes zu fern liegend, verzichten.

Zusammenfassung

Es wird über Versuche berichtet, Antikörper gegen den großen Leberegel (*Distoma hepaticum*) im Serum der damit befallenen Rinder mit Hilfe des Agardiffusionstestes (Methode nach Ouchterlony) nachzuweisen.

Die Methode liefert bei starkem Befall brauchbare Resultate (etwa 88% positiv). Die Treffsicherheit nimmt jedoch bei geringem Befall stark ab. Die chemische Natur der Antigene sowie ihr zeitliches Auftreten nach der Invasion bedürfen noch näherer Untersuchungen.

Résumé

Les auteurs ont procédé au dépistage d'anticorps précipitants dans le sérum de bovidés atteints de distomatose (*Distoma hepaticum*) à l'aide du test de diffusion à l'Agar (méthode selon Ouchterlony).

Cette méthode donne de bons résultats lors de fort parasitisme (environ 88% de cas positifs). Cette moyenne, toutefois, diminue lorsque l'invasion est faible. La nature chimique des antigènes et leur apparition passagère après l'invasion ne sont pas encore complètement élucidées.

Riassunto

Si riferiscono degli esperimenti per dimostrare la presenza di anticorpi contro il distoma epatico nel siero di bovini infestati da tale parassita; a tale scopo si usa il test di diffusione all'agar (metodo di Ouchterlony).

Il metodo dà in caso di forte infestazione dei risultati utili (circa 88% positivi). Ma se l'infestazione è minima, la sicurezza del risultato diminuisce notevolmente. La natura chimica degli antigeni nonché la data della loro comparsa dopo l'infestazione necessita ancora indagini più minuziose.

Summary

Experiments were undertaken with the aim to find antibodies against *Distomum hepaticum* in the serum of cattle infested with this parasite by agar diffusion test (method Ouchterlony).

The method is useful in cases of heavy infestation (about 88% positive), but the security decreases markedly in slight invasions. The chemical nature of the antigen and its appearance after the entrance of the parasites has to be investigated.

Herrn G. Müller danken wir bestens für die freundliche Mitwirkung bei den Versuchen.

Literatur

[1] Teuscher E.: Schweiz. Arch. Thk. 99, 523-528 (1957). – [2] Jensen K. E. and Th. Francis jr.: J. of Im. 70, 320 (1953). – [3] Gispén R.: J. of Im. 74, 134 (1955). – [4] Bodon L.: Acta Vet. Acad. scient. Hung. 5, 157 (1955). – [5] Moosbrugger G. A., V. Spuhler und K. Meyer: Comm. Réunion pour l'évaluation de l'effet des règlements de quarantaine applicables aux exportations et importations du bétail. Paris 13-14 février 1956. – [6] Brown F., J. Crick: Nature 179, 316-318 (1957). – [7] Woudhouse R. P.: Annals of Allergy 14, 121-138 (1956). – [8] Woudhouse R. P.: Int. Arch. of Allergy and applied Im. 6, 65-75 (1955). – [9] Björklund B.: Proc. Soc. for Experim. Biol. of Med. 79, 319-324 (1952). – [10] Ouchterlony O.: Acta path. microbiol. scand. 26, 507-516 (1949).

Eine gute Übersicht über die schon recht umfangreiche Literatur der Agardiffusionstechnik findet sich bei Ch. Wunderly, *Experientia* 13, 421-434 (1957).
