

Der differentialdiagnostische Nachweis von Brucellen und *C. burneti* in Köster-positiven Nachgeburtsausstrichen mit fluoreszierenden Antikörpern

Autor(en): **Becht, H.**

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): **107 (1965)**

Heft 7

PDF erstellt am: **17.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-592537>

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.

which was characterized as a DNA-Lipovirus and which was identified serologically with the virus of American Equine Rhinopneumonitis. Both mares had titers of neutralizing antibodies against the American reference strain in their sera. Cowdry A nuclear inclusion bodies were demonstrated in the organs of both foals and in tissue culture cells. The patho-histologic findings of the aborted foals are discussed.

Literatur

- [1a] Andrewes C.H.: *Adv. Virus Res.* 9, 271 (1962). – [1] Bürki F.: *Zbl. Vet. Med.* 9, 748 (1962). – [2] Bürki F.: *Zbl. Vet. Med.* 9, 999 (1962). – [3] Bürki F. et al.: *Zbl. Vet. Med.* (im Druck). – [4] Cooper P.D.: *Nature* 190, 302 (1961). – [5] Corsico G.: *Clin. Vet.* 77, 321 (1954). – [6] Cowdry E.V.: *Arch. Path.* 18, 527 (1934). – [7] Darlington R.W. and Randall C.W.: *Virology* 19, 322 (1963). – [8] Dimock W. W. and Edwards P.R.: *Cornell Vet.* 26, 231 (1936). – [9] Doll E.R., McCollum W.H., Wallace M.E., Bryans J.T., Richards M.G.: *Am. J. Vet. Res.* 14, 40 (1953). – [10] Doll E.R. and Kintner J.H.: *Cornell Vet.* 44, 355 (1954). – [11] Doll E.R., Bryans J.T., McCollum W.H., Crowe E.W.: *Cornell Vet.* 47, 3 (1957). – [12] Guthäuser A.: *Diss. Bern* (1951) – [13] Hansen H.J. und Holst S.J.: *Nord. Vet. Med.* 2, 131 (1950). – [14] Kawakami Y., Kaji T., Sugimura K., Ishitani R., Shimizu T., Matumoto M.: *Jap. J. Exp. Med.* 29, 635 (1959). – [15] Manninger R. und Csontos J.: *Dtsch. Tierärztl. Wsch.* 69, 105 (1941). – [15a] Manninger R.: *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 65, 13 (1958). – [16] Matumoto M., Shimizu T., Ishizaki R.: *Compt. rend. Soc. Biol.* 154, 1685 (1960). – [17] McCollum W., Doll E.R., Wilson J.C., Johnson O.B.: *Cornell Vet.* 52, 1963 (1962). – [18] Shimizu T., Ishizaki R., Ishii S., Kawakami Y., Kaji T., Sugimura K., Matumoto M.: *Jap. E. Exp. Med.*, 29, 643 (1959).

Unser verbindlichster Dank gebührt den Herren Kantonstierarzt Dr. M. Leuenberger, Genf, und Dr. P. Egli, Avenches, für Untersuchungsmaterial und anamnestiche Angaben; Herrn PD Dr. U. Krech, St. Gallen, für die Leptospirenagglutinationen; Fräulein G. Schermer für ihre zuverlässige technische Assistenz im Viruslabor.

Aus dem Veterinär-bakteriologischen Institut der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. Emil Hess)

Der differentialdiagnostische Nachweis von Brucellen und *C. burneti* in Köster-positiven Nachgeburtsausstrichen mit fluoreszierenden Antikörpern

Von H. Becht

Die Immunfluoreszenz hat sich als schnelle und sichere Methode bei den verschiedensten Aufgaben im diagnostischen Laboratorium bewährt. Wir haben versucht, diese Technik zur differential-diagnostischen Beurteilung von Köster-positiven Cotyledonen einzusetzen mit dem Ziel, die oft massive und entsprechend gefährliche Nachgeburtinfektion (Hess und Staehli, 1961) möglichst rasch zu erfassen und zu tilgen.

Biegeleisen et al. (1962) haben gezeigt, daß sich Brucellen und ihre löslichen Antigene im Gewebe von Versuchstieren mit fluoreszierenden Antikörpern nachweisen lassen. *C. burneti* wurde in Zellkulturen von Roberts und Downs (1958) und von Amosenkova et al. (1961) in Zecken mit dieser Methode sichtbar gemacht.

Material und Methode

Für die Gewinnung von Immunsorum zur Markierung wurde einem Kaninchen gereinigtes Rickettsienantigen unseres Stammes «Andelfingen» intravenös injiziert. Ein weiteres Serum stammte von einer Kuh aus einem mit Q-Fieber infizierten Bestande. Anti-Brucellen-Serum wurde durch intravenöse Injektion von abgetöteten Bakterien bei einem weiteren Kaninchen hergestellt. Die Konjugation mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) erfolgte nach Marshall et al. (1958). Der überschüssige Farbstoff wurde durch Gefiltration mit Sephadex G-25 entfernt (Wagner, 1962). Für die Gegenfärbung wurde ein Gemisch von 10 negativen Rinderseren nach Smith et al. (1959) mit Lissamine Rhodamine B 200 (LR) markiert und ebenfalls mit Sephadex gereinigt. Für die Färbung aller Präparate wurde ein Teil des mit FITC markierten Immunsorums fünf Teilen mit LR konjugierten Normalserums zugesetzt und mit diesem Gemisch die fixierten Ausstriche bedeckt. Von den Köster-positiven Cotyledonen wurden auf einem Objektträger zwei Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet, 10 Minuten in Aceton fixiert und mit einem Paraffinring umgeben. Auf der einen Seite wurde nun das Präparat mit markiertem Anti-Rickettsien-Serum und auf der andern Seite mit dem Anti-Brucellen-Konjugat bedeckt und bei 37° Celsius inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Seren mit Phosphatpuffer sorgfältig abgewaschen und nach Entfernen des Paraffinwells in Pufferlösung gestellt und kurz geschwenkt. Anschließend wurden die Ausstriche mit Fließpapier abgetupft und mit gepuffertem Glycerin eingebettet. Die so erzielten Resultate wurden im Hemmtest kontrolliert. Die eine Seite eines mit dem gleichen Material hergestellten Ausstrichpaares wurde mit Rickettsien-, die andere mit Brucellen-Immunsorum von Rindern bedeckt und nach halbstündiger Inkubation mit Fließpapier freigesaugt. Von den gleichen Seren wurde nochmals aufgetragen. Nach weiteren 30 Minuten wurden die Ausstriche wie oben gewaschen und mit dem Konjugat überschichtet, mit welchem im direkten Färbeverfahren ein positives Ergebnis erzielt worden war. Die Präparate wurden meistens bei 200-facher Vergrößerung untersucht.

Ergebnisse

Mit dem beschriebenen Verfahren wurden 38 Nachgeburten geprüft, die im Verlaufe der letzten zwei Jahre tiefgefroren aufbewahrt worden waren. 37 Proben stammten von Kühen, eine von einer Ziege. In Häufchen gelagerte Brucellen oder Rickettsien sind als helle gelbgrüne Flecke auf rotem Hintergrund sichtbar, als feine grünliche Punkte, wenn sie diffus verstreut liegen. Auf der andern Seite des Objektträgers ist lediglich die durch das LR-markierte Normalserum bedingte rote Färbung des Gewebes erkennbar; die heterologen Antikörper hinterlassen keine Fluoreszenz.

Die Gegenfärbung mit dem LR-markierten Normalserum erwies sich als Voraussetzung für eine klare Diagnosestellung. Die unspezifische Bindung von markierten Proteinen an normales Gewebe wurde seit den Arbeiten von Coons et al. (1950) meist dadurch unterdrückt, daß die Konjugate mit Leberpulver oder mit den bei der Untersuchung verwendeten Gewebsarten vorher absorbiert wurden. Manche Autoren (Goldstein et al., 1959;

McDevitt et al., 1963) verminderten diese unspezifische Fluoreszenz durch Herabsetzung der Farbstoffkonzentration und durch chromatographische Reinigung der Konjugate. Unsere Versuche, durch Absorption des markierten Serums mit acetontrocknetem Gewebepulver aus nicht infizierten Nachgeburten oder durch Herabsetzung des Farbstoff/Eiweiß-Verhältnisses auf 1:100 die unspezifische Fluoreszenz auszuschalten, führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen. Bei der Gegenfärbung mit Kongorot nach Nichols und McComb (1962) wurde auch die spezifische Fluoreszenz durch diesen Farbstoff weitgehend überdeckt. Offensichtlich besitzt das meist nekrotische Nachgeburtmaterial eine besonders starke Affinität für die markierten Proteine und läßt das ganze Gesichtsfeld gelbgrün erscheinen. Auch Schaeffer et al. (1964) haben darauf hingewiesen, daß zerfallenes Gewebe die unspezifische Hintergrundfluoreszenz erhöht.

Die Kontrastfärbung mit LR-markiertem Normalserum verhindert diese unspezifische Fluoreszenz des Gewebes und läßt die spezifischen Antigene auf rotem Hintergrund gelbgrün aufleuchten. Eine zusätzliche Reinigung der Konjugate ist daher nicht erforderlich. Das spezifische Färbevermögen der mit FITC-markierten Seren von Rind und Kaninchen waren etwa gleichwertig.

Die Diagnosen stimmten in allen Fällen mit den durch Kultur und Tierversuch ermittelten Befunden überein. Die Intensität der Fluoreszenz war allerdings nicht in jedem Fall gleich. Es konnte stets beobachtet werden, daß die gefärbten Erreger in stark mazerierten Nachgeburten eine bedeutend schwächere Leuchtkraft besaßen als in frischen Proben. In den Köster-positiven Cotyledonen, die uns aus zwei Beständen mit den früher beschriebenen Q-Fieber-Ausbrüchen (Becht und Hess, 1964) sofort nach der Geburt überbracht wurden, war ausnahmslos eine hell leuchtende Fluoreszenz vorhanden. Die Annahme scheint daher gerechtfertigt, daß nur die intakte Oberfläche von Brucellen und Rickettsien die Fluoresceinmarkierten Antikörper in vollem Umfang zu binden vermögen. Jedoch war auch in Proben mit starken Fäulniserscheinungen stets eine deutliche, wenn auch bedeutend schwächere, eher graugrünliche Fluoreszenz zu erkennen. In der Tabelle ist diese abgestufte Intensität zahlenmäßig dargestellt.

Im Hemmtest ließen sich die Befunde der Direktfärbung bestätigen. Das homologe Serum blockierte die Fluoreszenz vollständig, während sie in dem mit dem heterologen Serum vorbehandelten Doppelausstrich in wenig veränderter Stärke vorhanden war.

Mit der Immunofluoreszenz in der beschriebenen Weise läßt sich die Diagnose innerhalb weniger Stunden mit geringem Aufwand stellen, im Gegensatz zu den 5 Tagen, welche für die Brucellenkultur, oder den mindestens 3 Wochen, die für den Rickettsien-Tierversuch erforderlich sind. Außerdem entfallen die Schwierigkeiten, die öfters dadurch entstehen, daß die Meerschweinchen nach der Injektion des meist stark kontaminierten Nachgeburtmaterials vor Ablauf der Versuchszeit sterben.

Schließlich sei noch erwähnt, daß die Methode bei der Untersuchung von Organabklatschpräparaten im Rickettsien-Tierversuch eine wertvolle Hilfe darstellt.

Tabelle 1 Köster-positive Nachgeburtspuren. Differentialdiagnose und Intensität der Fluoreszenz¹

Fluoreszenz-Intensität	Anzahl der positiven Proben	
	mit Anti-Rickettsiens Serum	mit Anti-Brucellens Serum
+	4	0
++	5	6
+++	14	9
Total	23	15

¹ Die in der Tabelle aufgeführten fluoreszenzmikroskopischen Befunde konnten in allen Fällen bestätigt werden: Durch positiven Kultur- und Tierversuch aller 15 Brucellen-Infektionen bzw. durch negativen Kultur- und positiven Tierversuch der 23 Rickettsien-Infektionen.

Zusammenfassung

Durch Anfärben von Köster-positiven Nachgeburten mit fluoresceinmarkierten Antikörpern bei gleichzeitiger Gegenfärbung mit Lissamine-Rhodamine-markiertem Normalserum ist die sofortige differentialdiagnostische Beurteilung einer Brucellen- oder Rickettsien-Infektion möglich.

Résumé

L'appréciation immédiate d'un diagnostic différentiel d'une infection par brucelles ou rickettsies peut être obtenue par coloration d'arrière-faix Köster-positives avec des anticorps fluorescents ainsi que par contre-coloration simultanée par sérum normal marqué de lissamine-rhodamine.

Riassunto

È possibile stabilire subito la diagnosi differenziale di un'infezione da brucella o da rickettsie mediante la colorazione delle secondine con anticorpi marcati alla fluoresceina e simultanea colorazione di contrasto con siero normale marcato alla rodamina di Lissamine.

Summary

Colouring Köster-positive afterbirths with fluorescein-marked antibodies, while simultaneously counter-colouring with lessamine-rhodamine-marked normal serum, makes possible the immediate differential diagnostic assessment of a brucellosis or Rickettsian infection.

Literatur

Amosenkova N.I., Goldin R.B. and Daiter A.B.: Studies of experimental rickettsioses by using fluorescent antibody. 3rd report. Examination of ticks for contamination with *R. burneti*. Zbl. Bakteriologie, I. Abt. Ref. 195, 549 (1964). – Becht H. und Hess E.: Zur Epizootologie, Diagnostik und Bekämpfung des Q-Fiebers beim Rind. Schweiz. Arch. Tier-

heilk. 106, 389 (1964). – Biegeleisen J.Z., Moody M.D., Marcus and Flynt J.W.: The use of fluorescein-labeled anti-brucella suis globulin for demonstrating brucella antigen in animal tissues. *Am. J. Vet. Res.* 23, 592 (1962). – Coons A.H. and Kaplan M.H.: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. exp. Med.* 91, 1 (1950). – Goldstein G., Slizys I.S. and Chase M.W.: Studies on fluorescent antibody staining. I. Non-specific fluorescence with fluorescein-coupled sheep anti-rabbit globulins. *J. exp. Med.* 114, 89 (1961). – Hess E. und Staehli J.: Die zentrale epizootologische Bedeutung der Brucellen-Ausscheidung durch die Geburtswege beim Rind. *Moh. Tierheilk.* 13, 14 (1961). – Marshall J.D., Eveland W.C. and Smith C.W.: Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technic with a modification of its application. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 98, 898 (1958). – McDevitt H.O., Peters J.H., Pollard L.W., Harter J.G. and Coons A.H.: Purification and analysis of fluorescein labeled antisera by column chromatography. *J. Immunol.* 90, 634 (1963). – Nichols R.L. and McComb D.E.: Immunofluorescent studies with trachoma and related antigens. *J. Immunol.* 89, 545 (1962). – Roberts A.N. and Downs C.M.: Study on the growth of *Coxiella burnetii* in the L strain mouse fibroblast and the chick fibroblast. *J. Bact.* 77, (1959). – Schaeffer M., Orsi E.V. and Widelock D.: Applications of immunofluorescence in public health virology. *Bact. Rev.* 28, 402 (1964). – Smith C.W., Marshall J.D. and Eveland W.C.: Use of contrasting fluorescent dye as counterstain in fixed tissue preparations. *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.* 102, 179 (1959). – Wagner M.: Die Verwendung von Sephadex zur schnellen Reinigung fluoreszenzmarkierter Antikörperlösungen. *Zbl. Bakteriol. I. Abt. Orig.* 185, 124 (1962).

Der Kaiserschnitt beim Rind

(Ein Beitrag aus der Praxis zu dessen Technik und Kasuistik)

Von H. Erismann, Beinwil am See

Die ersten Publikationen über den Kaiserschnitt beim Rind waren, was das Prozedere der Operation anbelangt, noch so, daß sich der Praktiker nur schwer zur Ausführung dieser Operation entschließen konnte. Und doch mußte jeder in der Geburtshilfe Tätige einsehen, daß die Schnittentbindung richtunggebend werde für die Geburtshilfe beim Rind, daß sie durch ihre Wirtschaftlichkeit für den Viehbesitzer nicht nur jegliche Parforce-Eingriffe von Laien, sondern auch die für den Praktiker oft sehr zeitraubenden und körperlich außerordentlich anstrengenden Embryotomien weitgehend ersetzen werde. Es galt nun aber, und das war die Absicht einer Anzahl Publikationen der letzten Jahre, diese Operation so zu gestalten, daß sie von jedem Praktiker und unter allen Gegebenheiten der ländlichen Praxis ausgeführt werden konnte. In dieser Hinsicht war es im weiteren durchaus notwendig, diesen geburtshilflichen Eingriff zu einer «Einmannoperation» zu gestalten. Nur so kann er dem Praktiker seine vollen Dienste leisten.

Angeregt durch zwei Artikel von Blendinger und von Glock in der