

Die Übertragung von Gammaglobulinen auf das neugeborene Kalb mit dem Colostrum

Autor(en): **Steck, Franz Thomas**

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): **104 (1962)**

Heft 9

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-593019>

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.

Aus dem Veterinär-Bakteriologischen Institut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. H. Fey

Die Übertragung von Gammaglobulinen auf das neugeborene Kalb mit dem Colostrum

Von Franz Thomas Steck

Tierzüchter und tierärztliche Geburtshelfer erkannten frühzeitig die Bedeutung des Colostrums für die Überlebenschance eines Kalbes.

Durch die Untersuchungen von Ehrlich über die Immunitätsübertragung von der Mutter auf den Säugling mit der Milch konzentrierte sich das Interesse auf die Antikörper bzw. Gammaglobuline.

Der Tatsache, daß die Antikörperresorption beim Kalb im wesentlichen nur am ersten Tage erfolgt, wird in der Praxis meist Rechnung getragen.

Wir griffen die Frage der Gammaglobulinresorption durch das neugeborene Kalb und deren zeitliche Beschränkung mit Hilfe von Immunpräzipitationsmethoden erneut auf.

In den folgenden einleitenden Abschnitten sollen kurz die Colostrumeiweiße und die immunologischen Verhältnisse beim neugeborenen Kalb besprochen werden.

Die Colostrumeiweiße

Elektrophoretische Untersuchungen erlauben den quantitativen Vergleich zwischen reifer Kuhmilch und Colostrum. Angaben aus verschiedenen Arbeiten sind in der Tabelle I zusammengefaßt. Hervorheben möchte ich, daß das Colostrum 75–100-mal mehr Gammaglobuline pro Volumeneinheit aufweist als die reife Kuhmilch. Zwischen Milch- und Colostrumproteinen besteht kein qualitativer Unterschied. Gugler, Bein, v. Muralt konnten immunoelektrophoretisch Antigenverwandtschaften von 7 Kuhmilch- und 12 Colostrumproteinen mit Proteinen des Rinderserums nachweisen.

Immunologisch ist das Gammaglobulin des Colostrums und der Kuhmilch mit dem Rinderserumgammaglobulin identisch ([32], [60]). Umstritten sind einige physikalisch-chemische und chemische Unterschiede ([62], [64], [71], [74], [75]).

Als Herkunftsort der Colostrumgammaglobuline wird von der überwiegenden Mehrheit der Forscher das Blutplasma bezeichnet. Sie stützen sich dabei auf folgende Beobachtungen und Experimente.

Vor der Geburt fällt beim hochträchtigen Muttertier der Serumgammaglobulin-gehalt ab, gleichzeitig erscheint diese Fraktion im Praecolostrum, und zwar in höherer Konzentration als im Serum ([31], [45], [63]). Diese Konzentrierfähigkeit kommt nur dem trockenstehenden Euter zu.

Tabelle 1

	Gesamt- eiweiß in g%	Casein		Serumproteine		γ -globulin		Methode	Autor
		g%	in % des GE	g%	in % des GE	in % d.S.prot.	in % des GE		
Colostrum	12–15	–	25–40	8,7–10	60–75	70–80	ca. 50	A	Aschaffenburg [3]
Reife Kuhmilch .	17.57	5.0	29	11, 34	64	–	–	A	Engel, Schlag [24]
Blutserum Rind	3.5	2.8	80	0.7	20	10	2	P	Smith [72, 73]
Blutserum Kalb vor Colostrum- aufnahme	–	–	–	7–7.5 Mittel werte	–	14–34	–	P, T	Witschi [89] Chopard [15] und verschiedene Autoren, zit. nach Witschi
	–	–	–	5–5.5	–	1–2.5	–		

Bestimmungsmethode: P = Papierelektrophorese
T = Elektrophorese mit Tiseliusapparatur
A = Aussalzen

Hammer injizierte Pneumokokken-antigen ins Euter. Die entsprechenden Antikörper konnte er aber in der Folge zuerst im Blutserum nachweisen und erst später im Colostrum. Er nimmt an, daß das Antigen über das lymphatische System des Euters resorbiert wurde und daß die Antikörperproduktion in den Bildungsstätten des Körpers erfolgte.

Der Gammaglobulingehalt des Colostrums fällt mit einsetzender Milchsekretion und später mit dem Melken stark ab. Am 2. Melktag nach der Geburt ist der Gammaglobulingehalt im Colostrum schon auf 10–32% des maximalen Gehaltes (Erstgemelk) abgesunken.

Das Colostrumerstgemelk ist also für die Versorgung des neugeborenen Kalbes mit Gammaglobulinen biologisch am wertvollsten.

Immunologie des neugeborenen Kalbes

1. Hypo- oder Agammaglobulinaemie bei der Geburt

Unmittelbar nach der Geburt, aber vor der ersten Colostrumaufnahme sind im Kälberserum keine ([41], [43], [64], [76]) oder nur geringe Mengen von Gammaglobulin nachweisbar ([22], [36], [88]). Nach elektrophoretischen Untersuchungen beträgt diese Fraktion 0–1–2,5% des Gesamteiweißes ([36], [62], [63], [70], [89]).

Spezifische Antikörper ließen sich bis jetzt aber nicht nachweisen, auch nicht bei Kälbern hyperimmuner Kühe ([37], [44], [39], [69], [78], [79]).

Die neugeborenen Kälber befinden sich also im Zustand einer weitgehenden *Agammaglobulinaemie*.

Klinische, humanmedizinische Erfahrungen zeigen, daß dies einer extremen Schutzlosigkeit gegenüber bakteriellen Infekten gleichkommt, mit Neigung zu Rezidiven und septikämischer Ausbreitung.

In der Veterinärmedizin wurden ähnliche Erfahrungen vor allem in bezug auf die Coliruhr gemacht, wonach colostrumfrei aufgezogene Kälber erhöht anfällig sind ([22], [26], [49], [76], [79]).

Fey und Margadant konnten nun aber zeigen, daß ein Großteil der an Coli-sepsis eingegangenen Kälber hypogammaglobulinaemisch sind, trotzdem sie rechtzeitig mit Colostrum getränkt wurden. Die Ursachen dieser fehlenden oder ungenügenden Resorption sind noch nicht geklärt. Die Agammaglobulinaemie scheint aber eine Schlüsselstellung in der Pathogenese der Coli-sepsis einzunehmen.

2. Eigenproduktion von Gammaglobulin

Bei colostrumfrei aufgezogenen Kälbern setzt die Eigenproduktion von Gammaglobulin nach der Geburt allmählich ein und erreicht nach 8 Wochen den Normalwert von etwa 20% des Gesamteiweißes. ([36], [62], [76]) (Abb. 1).

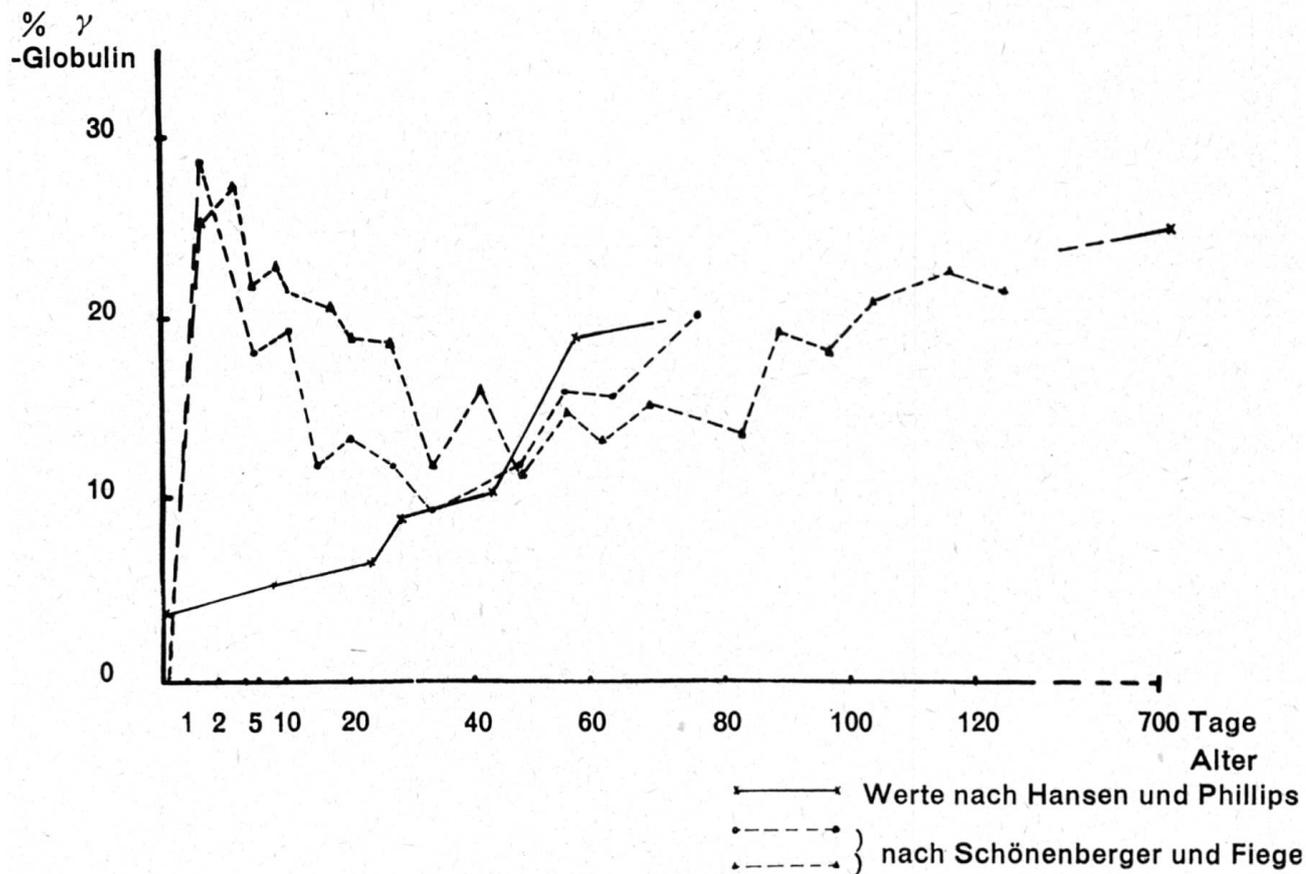


Abb. 1 zeigt den Serumgammaglobulingehalt von 3 Kälbern im Laufe der Entwicklung (von der Geburt bis zum Alter von 80 bzw. 120 und 700 Tagen), wobei 2 Kälber am 1. Lebenstag Colostrum erhielten (nach Schönenberger und Fiege), das 3. Kalb aber colostrumfrei aufgezogen wurde (nach Hansen und Phillips).

Henning gelang die aktive Immunisierung von Kälbern in den ersten Lebenswochen gegen Salmonella-Antigen, Hammer gegen Pneumokokkenantigen. Die ersten Antikörper waren ungefähr in der 3. Lebenswoche nachweisbar.

Coli-sepsis tritt aber am häufigsten in der ersten Lebenswoche und Pneumokokken-sepsis in den 3 ersten Lebenswochen [85] auf.

Nach Fey und Riehle ist daher eine aktive Immunisierung der Kälber zwecklos, da die neugeborenen Kälber nicht in nützlicher Frist mit einer genügenden AK-Produktion reagieren können. Hammer weist zudem generell auf die Gefahr hin, daß durch die sehr frühzeitige Injektion eines Antigens eine immunologische Toleranz entstehen könnte ([7], [13]).

3. Die passive Immunisierung

Schneider und Szathmary brachten als erste die Tatsache, daß einzelne Säugertierspezies mit (z. B. Mensch), andere ohne Serumgammaglobulin (z. B. Kalb) geboren werden mit den Unterschieden im histologischen Aufbau der Plazenten in Zusammenhang (vgl. Tabelle 2). Die epitheliochoriale Plazenta des Rindes mit der großen Zahl trennender Schichten verhindert offensichtlich in utero den Übertritt von Gammaglobulin vom mütterlichen in den foetalen Kreislauf.

Tabelle 2 nach Grosser [35] und Mossmann [56]

Plazentatyp	Uterines Gewebe				Foetales Gewebe			Tierart	
	Gefäßendothel	Uterus-Bindegewebe	Uterus-Epithel	Uteruslumen	Chorion-Epithel	Chorion-Bindegewebe	Gefäß-Endothel		
Plazenta epitheliochorialis	+	+	+	+	+	+	+	Pferd, Esel, Rind, Ziege, Schwein	Pferd, Schwein
P. syndesmochorialis	+	+	—	—	+	+	+	Schaf, Hirsch, Reh	Wiederkäuer
P. endotheliochorialis	+	—	—	—	+	+	+	Hund, Katze, Wolf, Fuchs, Schakal	Hund, Katze
P. haemochorialis ..	—	—	—	—	+	+	+	Mensch, Affe, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte, Maus und andere Nager	Mensch
nach Mossmann P. haemoendothelialis	—	—	—	—	—	—	+	Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen	

Grosser und Mossmann stimmen in der Zuteilung der Spezies zu den einzelnen Plazentartypen nicht vollständig überein. Mossmann läßt das Uteruslumen als Trennschicht wegfällen und führt einen fünften Plazentartyp, die Plazenta haemoendothelialis, ein.

Der Ausfall der diaplazentaren Versorgung wird beim Kalb durch das Vermögen kompensiert, immunologisch intakte Colostrumgammaglobuline in großer Menge zu resorbieren ([22], [36], [41], [43], [64], [76], [88]), im wesentlichen aber nur am ersten Lebenstag. Von verschiedenen Autoren wurde die Resorption von Antikörpern u. a. gegen *Brucella abortus* ([16], [48], [52], [53], [70], [79]), *E. coli* ([50], [78], [80], [86]), verschiedene Salmonellen ([39], [69]), Pneumokokken ([28], [37]), *Trichomonas foetus* ([44], [63]) beobachtet.

Kälberseren können 24 Stunden nach der Colostrumaufnahme einen höheren Titer an bestimmten AK aufweisen als das mütterliche Blutserum. Dieser mit der Colostrumaufnahme erreichte Gammaglobulinspiegel hält langsam abfallend über 2–3 Monate

an ([39]). Als Eiweiße derselben Tierart verweilen die Colostrumimmunglobuline länger im Organismus als Eiweiße einer fremden Spezies ([76]).

Durch die Fütterung reifer Kuhmilch kann dieser Anstieg des Gammaglobulins im Kälberserum nicht hervorgerufen werden ([41], [70]). Ebenso zeigt das Sekret von Kühen, die vor dem Abkalben schon wiederholt gemolken wurden, einen geringeren Schutzeffekt gegenüber Coliinfektionen als Colostrum ([4]).

4. Praktische Bedeutung der passiven Versorgung der Kälber mit spezifischen Antikörpern

Die Schutzimpfung der Antikörper ist typspezifisch. Die epidemiologischen Verhältnisse bei Coli-, Pneumokokkensepsis und Kälbersalmonellose lassen eine prophylaktische, passive Immunisierung a priori erfolgreich erscheinen, da alle eine gewisse, wenn auch zeitlich beschränkte Typkonstanz in einem Bestande aufweisen. Erstrebenswert wäre die polyvalente, passive Immunisierung mit dem Colostrum gegen die häufigsten kälberpathogenen Bakterien einer Gegend.

Immunprophylaxe bei den Kälberaufzuchtkrankheiten: Betreffend der *Colisepsis* verweise ich auf die zusammenfassende, kritische Darstellung von Fey im Schweiz. Arch. Tierheilk. 104, 1–12 (1962).

Pneumokokkensepsis: Trautwein und Romer konnten feststellen, daß Menschen mit chronischen Erkrankungen der Atemwege die häufigste Infektionsquelle für Kälber darstellen. Hammer diskutierte deshalb die Möglichkeit der Vakzination des Stallpersonals, er sah aber die enormen psychologischen Schwierigkeiten voraus.

Fey und Richte erreichten durch zweimalige Muttertiervakzination mit Vollvakzine im Abstand von 10 Tagen 6 Wochen vor dem Abkalben und Verabreichen des hyperimmunen Colostrums an das neugeborene Kalb einen spezifischen Antikörperspiegel im Kälberserum.

Durch die Verwendung der gereinigten typspezifischen Kapselpolysaccharide und des unspezifischen Lipoid A zur Vakzination konnte Hammer bei der trächtigen Kuh eine bei weitem genügende AK-Bildung gegen bis zu 12 verschiedene Pneumokokkentypen erzielen.

Hammer leitet aus seinen Versuchen ab, daß 10 Liter Colostrum einer hyperimmunen Kuh 100–160 Kälber gegen die spezifische Infektion mit dem entsprechenden Pneumokokkentyp zu schützen vermögen.

Nach Henning ist auch bei der in Südafrika bedeutsamen *Kälbersalmonellose* (*Salmonella dublin*) die prophylaktische Vakzination des Muttertieres und das Verabfolgen des Colostrums an das neugeborene Kalb die wirksamste Bekämpfungsmaßnahme.

Bei den 3 obgenannten Kälberaufzuchtkrankheiten erwies sich die perorale passive Immunisierung des neugeborenen Kalbes mit hyperimmunem Colostrum jeder andern Prophylaxe und Therapie als überlegen, da ihre Wirkung schon mit der ersten Nahrungsaufnahme einsetzt und darauf die gefährdeten Lebenswochen überdauert. Grenzen sind ihr durch die Spezifität der Wirkung gesetzt.

Die Resorption von Colostrum-Immunglobulinen

Die praktisch wichtige Beobachtung, daß immunologisch und serologisch unveränderte Gammaglobuline am ersten Lebenstag, und nur an diesem, aus dem Verdauungstrakt des neugeborenen Kalbes in die Blutbahn übertreten können, gab Anlaß, den Resorptionsvorgang genauer zu untersuchen. Der *Resorptionsweg* wurde durch Comline, Roberts und Titchen ([16]) beim Kalb experimentell verfolgt. Sie verwendeten ein fettfreies Colostrals Serum mit einem hohen Bangagglutinintiter und brachten es – nach chirurgischem Eingriff – direkt in einzelne ligierte Darmabschnitte.

Die Resorption der Immunlactoglobuline wiesen sie durch N-Bestimmung nach Na-Sulfit-Fraktionierung nach, die Bangagglutinine dagegen serologisch.

Die Resorption erfolgt nur im Dünndarm, wobei bei Einführung von Colostrum im

Alter von 6 bis 27 Stunden eine gute Resorption, im Alter von 63 und 65 Stunden eine geringgradige Resorption beobachtet wurde. Vom Dünndarm treten die Immunlactoglobuline nicht in den Pfortaderkreislauf, sondern in die Lymphbahnen, dann in den ductus thoracicus und in die vordere Hohlvene über. 1–2 Stunden, nachdem Colostrumserum in den Dünndarm verbracht wurde, sind im ductus thoracicus Gammaglobuline nachweisbar.

In histochemischen Untersuchungen konnten dieselben Autoren ([17]) im Darm-lumen und 9–36 Stunden nach der Geburt auch in feineren (2–6 μ y Durchmesser) und größeren Tropfen (10 μ y) in den Epithelzellen von Jejunum und Ileum und in einigen Präparaten auch in den Lymphspalten der Darmzotten Colostrumproteine nachweisen. Bei Kälbern, denen Colostrum erst 63–65 Stunden nach der Geburt verabreicht wurde, fanden sich in den Epithelzellen nur vereinzelte Tröpfchen.

Hill und Hardy ([40]) kamen zu ähnlichen Ergebnissen bei Lämmern und Zicklein. Sie bezeichnen die nachgewiesenen Globulintropfen nach den histochemischen Reaktionen als Glyco- oder als Mucoproteine.

Die Faktoren, welche die Resorption am ersten Lebenstag ermöglichen bzw. später verhindern, sind noch nicht bekannt, obschon weitgehende Untersuchungen angestellt worden sind. Mason, Dalling und Gordon ([51]) vermuteten, daß die Resorption von Gammaglobulinen im Darm Neugeborener entweder auf der Unfähigkeit zur Verdauung oder auf der erhöhten Durchlässigkeit der Darmwand des neugeborenen Kalbes beruhe oder auf beiden zusammen.

Hill und Hardy ([40]) stellten die Hypothese auf, daß die Resorption von colostralen Immunproteinen aus dem Darm Neugeborener verschiedener Species mit dem Einsetzen der Magen-Proteinverdauung abgebrochen werde.

Laskowski ([46]) stellte aus dem Colostrum einen antitryptischen Faktor kristallin her.

Mit diesem Faktor konnten Nordbring und Olson ([58]) beim Saugferkel, das ähnliche Verhältnisse zeigt wie das Kalb (Nordbring & Olson [57], Hoerlein A. B., zit. nach Schönenberger und Fiege [70]) eine Verbesserung der Resorption von Immunlactoglobulinen hervorrufen, nicht aber eine Verlängerung.

Die Ausschaltung der Magenverdauung durch Probanthine und Aluminiumhydroxydgel (Deutsch und Smith [20]) und schließlich durch direktes Einbringen von Colostrum in den Dünndarm, der vom Magen und den übrigen Darmabschnitten durch Ligaturen abgetrennt wurde, brachten beim Kalb ebenfalls keine Verlängerung der Resorbierfähigkeit (Smith und Erwin [82]).

Auch die Fütterung der neugeborenen Kälber bis zu 36 Stunden nach der Geburt mit reifer Kuhmilch an Stelle von Colostrum, ferner die Verabfolgung von Mineralöl zur Vermeidung von Verstopfung, intraperitoneale und intramuskuläre Applikation von Hormonen (Cortison, ACTH, Diaethylstilboestrol, Progesteron und die beiden letzten in Kombination) konnten die Resorbierfähigkeit nicht über den ersten Lebenstag hinaus verlängern (Deutsch und Smith [19]). Der Nachweis der Serumfraktionen erfolgte bei diesen Untersuchungen mit Hilfe der Ultrazentrifugiermethode.

Über die *zeitliche Beschränkung der Resorption* liegen aus verschiedenen Arbeiten Angaben vor:

Hansen und Phillips ([36]) konnten bei 5 Kälbern bis zum Alter von 24 Stunden papierelektrophoretisch eine Resorption von Gammaglobulin feststellen, bei 2 Kälbern im Alter von 42 Stunden und je einem Kalb im Alter von 1 und 3 Wochen keine Resorption mehr.

Th. Smith ([77]) verfütterte je einem Kalb im Alter von $2\frac{1}{4}$ bzw. 18 Tagen Immunsrum gegen *E. coli*, konnte aber zu diesem Zeitpunkt keine Vermehrung der Serumagglutinine oder Schutz-AK mehr erreichen. Andererseits führte die Verzögerung der Colostrumgabe bis zum Alter von 12 und 18 Stunden zu keinen Entwicklungsstörungen.

Henning ([39]) wies beim Kalb die Resorption von H-Agglutininen gegen S. dublin aus dem Colostrum 24 und 36 Stunden nach der Geburt mit oder ohne vorheriger Milchfütterung nach, 48 Stunden p. p. war keine Resorption mehr feststellbar.

Aschaffenburg, Lovell und Mitarbeiter ([50]) berücksichtigten in ihren Versuchen die früheren Erfahrungen und verfütterten das Colostrum in den ersten 24 Lebensstunden.

Zusammenfassung der Literaturangaben

1. Das Kalb weist bei der Geburt kein oder nur einen geringen Anteil an Gammaglobulinen im Serum auf. Dieser Befund steht in direktem Zusammenhang mit den plazentaren Verhältnissen beim Rind (Placenta epitheliochorialis). Es konnten bis jetzt auch keine spezifischen AK nachgewiesen werden.

2. Das Rindercolostrum besitzt einen hohen Immunglobulingehalt. Die Frage, ob es sich dabei um Serumgammaglobuline oder um ein spezielles Immunlactoglobulin mit Bildung oder Modifikation im Euter handelt, ist umstritten. Antigenanalytisch erweisen sich die beiden Proteine als identisch.

3. Das Kalb ist in der Lage, am ersten Lebenstag aus dem Colostrum immunologisch unverändertes Gammaglobulin in großen Mengen zu resorbieren. (Die Faktoren, die die Resorption beeinflussen, sind nicht bekannt.)

4. Das Colostrum hyperimmunisierter Kühe vermittelt einen wirksamen, spezifischen Schutz gegen die wichtigsten Aufzuchtkrankheiten der Kälber (Colisepsis, Pneumokokkensepsis, Salmonellose). Colostrumfrei aufgezogene Kälber zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegen Colisepsis.

Eigene Untersuchungen

Mit Hilfe von Immunoelktrophorese [67] und Ouchterlonytechnik [25, 61] wurde die Frage untersucht, wie lange nach der Geburt das Kalb in der Lage ist, nach Verfütterung von Colostrum oder Pferdeserum, deren Eiweiße immunologisch unverändert aus dem Darm zu resorbieren.

Der Nachweis dieser Eiweiße in Kälberserum nach erfolgter Resorption wurde mit spezifischen Kaninchen-Antiseren gegen Pferdeserum (= anti-Pferd), Kuhcolostrum (= anti-Colostrum) und gegen Rindergammaglobulin (= anti-Gamma) durchgeführt. Die Aussagen der Immunoelktrophorese sind dabei rein qualitativ, diejenigen der Ouchterlonytechnik semiquantitativ ausgewertet worden.

Bei einigen Kälbern wurde gleichzeitig untersucht, ob im Kot immunologisch unveränderte Pferdeserum- oder Colostrumeiweiße nachweisbar sind zu einem Zeitpunkt, in dem keine Resorption mehr stattfindet.

Herrn Dr. A. Hässig und Herrn Dr. E. Gugler und ihren Mitarbeiterinnen am Zentral-laboratorium des Schweizerischen Roten Kreuzes möchte ich für die Einführung in die Technik der Immunoelktrophorese bestens danken [33].

Durch Vermittlung der Veterinär-ambulatorischen Klinik der Universität Bern stellten verschiedene Landwirte aus der Umgebung von Bern neugeborene Kälber in ihrem Bestande in verdankenswerter Weise für Experimente zur Verfügung (Kälber 1-13).

Technische Angaben

1. Immunoelektrophorese

Die von Grabar und Williams ([34]) entwickelte Methode der Immunoelektrophorese wurde in der Mikro-Modifikation von Scheidegger ([67]) angewendet.

Apparatur: Gleichstromgenerator und feuchte Elektrophoresekammer der Firma Egaton (Bezeichnung Agafor I).

Die feuchte Kammer gestattet die Parallelauftrennung auf 8 Objektträgern (76×26 mm).

Spannung 40 Volt während 35–40 Minuten. Wechseln der Elektroden nach jedem Ansatz.

Elektrolytlösung: Veronal-Na-Puffer pH 8.2, Ionenstärke 0,1.

Agar: 2% Wasseragar mit Veronal-Na-Puffer (pH 8.2), 2 ccm pro Objektträger, Schichtdicke etwa 1 mm.

Vorschneiden der Löcher und Schlitze mit Stanzapparat. Ausheben mit Kapillarpipette an Wasserstrahlpumpe.

Antigenlöcher \varnothing 2 mm. Einfüllung bis zum Rand entspricht einer Antigenmenge von 0,003 ml.

Abstand vom Antiserumbassin 2,5 mm.

Antiserumbassin: 4 cm lang und 1 mm breit. Einfüllung bis zum Rand entspricht einer Antiserummenge von 0,05 ml.

Diffusion in feuchter Kammer bei Zimmertemperatur während 24 Stunden.

Beurteilung der frischen Präparate bei seitlicher Beleuchtung.

Wässern in physiologischer Kochsalzlösung während 6–7 Stunden mit mehrmaligem Wechsel der Wasserlösung.

Färben der zwischen Löschpapier getrockneten Präparate mit *Azokarmin* (1,5 g Azokarmin in 1 Liter Azetatpuffer pH 3,7. Azetatpuffer: 500 ml Essigsäure [60 ml Eisessig/1 Liter Aqua dest.], 500 ml Na-Azetatlösung [13,5 g/1 Liter Aqua dest.]. Mischen, Filtrieren durch Papier und 150 ccm Glycerin zusetzen).

Färben während etwa 30 Minuten. Entfärben mit 2% Essigsäure während 15 Minuten in einer Gefäßreihe.

Prinzip der Methode

Als Diffusionsmedium wird eine 1 mm dicke Agargelschicht auf einem Objektträger verwendet, in die Löcher für das Antigen und ein langes Bassin für das Antiserum gestanzt sind (Abb. 2).

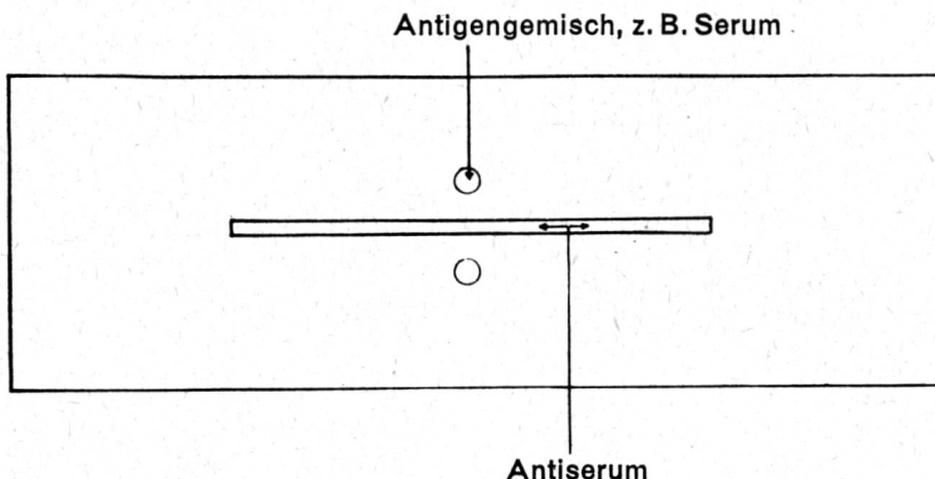


Abb. 2

In der *ersten Phase* wird das Antigengemisch elektrophoretisch aufgetrennt durch 40 Volt Gleichstromspannung während 35–40 Minuten. Die elektroendosmotische Strömung des Lösungsmittels trägt hierbei die Fraktionen in der der Elektrophorese entgegengesetzten Richtung. Dadurch wird das Antigenspektrum nach dem negativen Pol hin verschoben. In unserem Fall kommt deshalb das langsam wandernde Gamma-globulin auf die negative Seite zu liegen (Abb. 3 und 4).

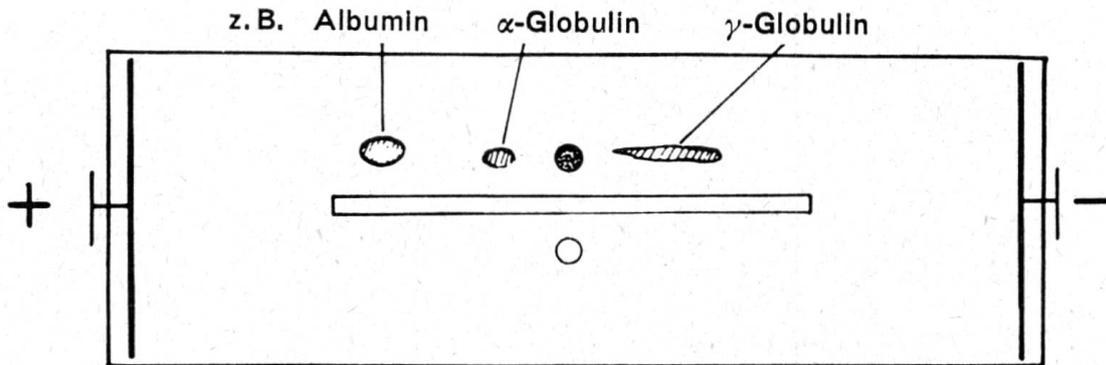


Abb. 3

Zum Vergleich: Bild der Papierelektrophorese und endosmotische Verschiebung.

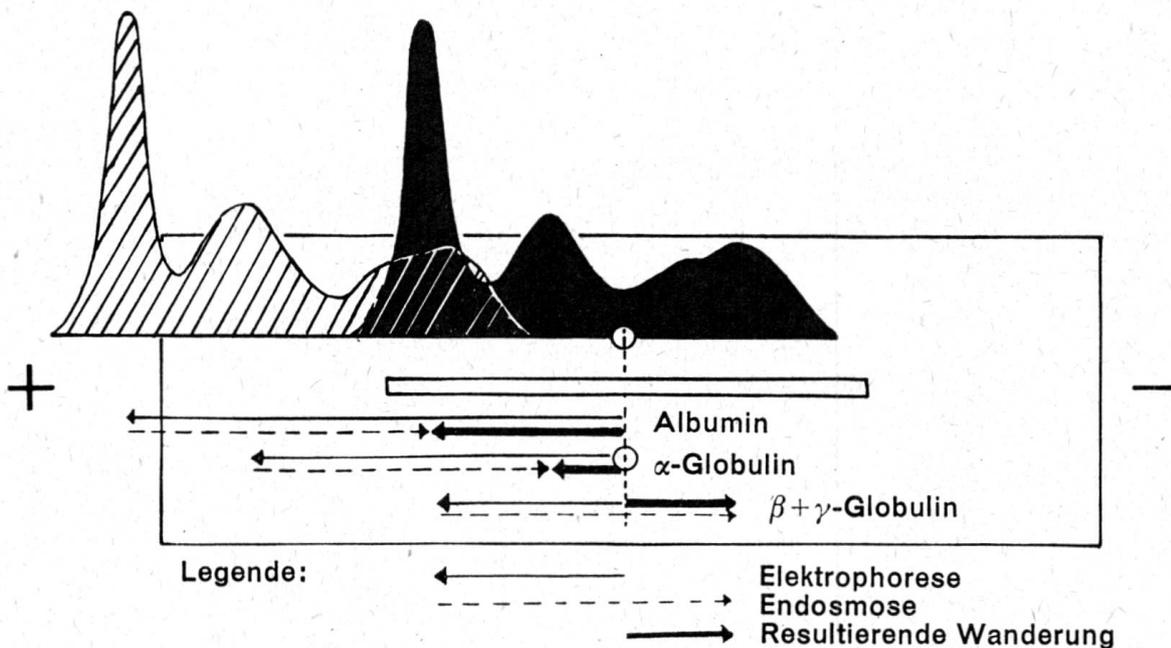


Abb. 4

In der *zweiten Phase* erfolgt die Präzipitation der Einzelantigene durch die spezifischen Antikörper:

Nach Abschluß der Elektrophorese wird das zentrale Bassin ausgehoben und das Antiserum eingefüllt. Die Antikörper diffundieren in gerader Front nach außen. Gleichzeitig diffundieren die Antigene aus ihrer Lage am Ende der Elektrophorese radiär in den Agar (Abb. 5).

Dort, wo Antigen und Antikörper in optimalem Verhältnis zusammentreffen, erfolgt die Präzipitation der Antigen-Antikörperverbindungen. Diese ist bei seitlicher Beleuchtung als scharfe, weiße, leicht gebogene Linie erkennbar. Durch Vergleich von Lage und Form der Linien und durch Absorptionen mit reinen Testantigenen lassen sich die einzelnen Komponenten des Antigengemisches identifizieren.

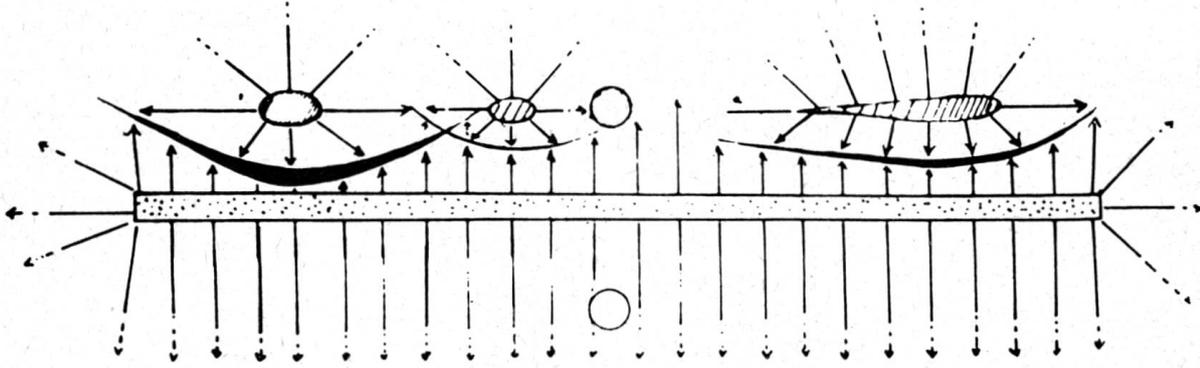


Abb. 5

2. Ouchterlony-Agargel-Diffusionsmethode

(Modifiziert nach Ouchterlony [61] und Feinberg [25]).

Bei Verwendung eines monospezifischen Antiserums gestattet diese Methode eine semiquantitative Analyse von Eiweißgemischen. Sie wurde hier angewendet zum Vergleich der Gammaglobulinmengen in Serum und Faecesproben.

Technik: 6 ccm 2% Veronal-Agar (wie für Immunelektrophorese) wird auf eine 6×6 cm Photoplatte gegossen. Ausstanzen einer Rosette von Löchern mit einem Stempel. In die äußeren 6 Löcher (\varnothing 5 mm, Abstand der Bassins unter sich 5 mm) werden je 0.02 ml Antigen in zunehmender zweischlächtiger Verdünnung (die Antigenverdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung wurde mit dreimaligem Pipettenwechsel bei den 3 ersten Verdünnungen durchgeführt), in das zentrale Loch dieselbe Menge Antiserum gegeben (vgl. Versuchsanordnung Abb. 6).

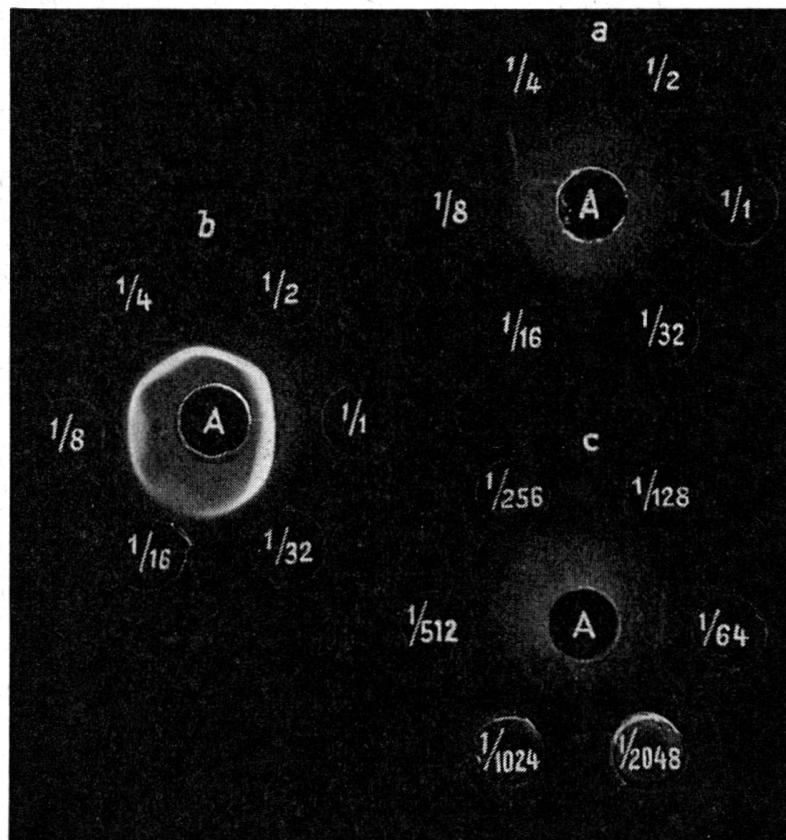


Abb. 6 Versuchsanordnung zur Bestimmung des Gammaglobulintiters. Kälberserum vor (a) und nach (b, c) Colostrumaufnahme, in fortlaufenden Verdünnungen präzipitiert durch Anti-Gammaglobulin (A). a: 1:1 keine Präzipitation, b, c: Gammaglobulintiter von 1:64

Nach 24stündiger Diffusion bei Zimmertemperatur in feuchter Kammer Beurteilung der Präzipitationslinien: nativ bei seitlicher Beleuchtung und nach Färben mit Azocarmin.

Die zehnmahlige Titration eines Serums ergab neunmal den Titer von $1/512$ und einmal einen Titer von $1/256$.

3. Antiseren

Herstellung: Immunisierung von Kaninchen mit Antigen und Freundschem Adjuvans (Freund J., McDermott [30]) durch wöchentliche subkutane Depots von 2 ccm während 3–4 Monaten.

Technik der Herstellung von Antigen mit Freundschem Adjuvans:

1. 10 ccm Antigen (z. B. Pferdeserum) werden in kleinen Portionen zu 10 ccm Aquaphil im Mörser beigemischt.
2. 20 ccm Paraffinöl, welche 40 mg hitzegetötete Tuberkelbakterien (Jamaica Nr. 22) enthalten, werden dem Gemisch unter 1) ebenfalls im Mörser zugegeben.

Präzipitationstiter der nicht konzentrierten Antiseren im *Überschichtungsverfahren* gegen fortlaufend verdünntes Antigen:

Anti-Pferd (1:10 000 ++), nach Absorption mit Rinderserum (10 ccm Anti-Pferdeserum und 0,05 g lyophilisiertes Rinderserum 24 Stunden bei 4° C unter wiederholtem Aufschütteln, gefolgt von Zentrifugation (3000 U. 20 Minuten).

Anti-Colostrum (1:16 000 ++).

Anti-Rinderserum-Gammaglobulin (1:4000 ++).

Die Antiseren von verschiedenen Kaninchen mit ergänzendem Antikörpergehalt wurden miteinander vermischt und Cellophan-Dialysierschlauch gegen Polyvinylpyrrolidon 40% (Subtosan Spezial) auf $1/4$ des ursprünglichen Volumens eingedickt¹.

Anti-Gammaglobulin wurde durch Absorption eines eingedickten Anti-Kuhcolostrum bzw. Anti-Rinderserums mit Kälberserum vor der Colostrumaufnahme (frei von Gammaglobulin) hergestellt (Absorption im Verhältnis: Antiserum 10 ml + 2 ml Kälberserum, Inkubation über Nacht bei 4° C).

In der *Immunoelktrophorese* zeigen die 3 verwendeten konzentrierten Antiseren folgende *Empfindlichkeiten* (Antigenmenge 0,003 ml, Antiserummenge 0,05 ml) (vgl. Abb. 7–10).

Anti-Pferd: Albumin bis zu einer Pferdeserumverdünnung von 1:2048, Gammaglobulin bis 1:512.

Anti-Colostrum: Albumin bis zu einer Verdünnung des Rinderserums auf 1:1024, Gammaglobulin bis 1:512.

Anti-Colostrum-Gammaglobulin weist Gammaglobulin nach bis zu einer Rinderserumverdünnung von 1:512.

In der *Ouchterlony-Technik* zeigt das *Anti-Rinderserum-Gammaglobulin*, das bei den semiquantitativen Untersuchungen der Kälberseren zur Anwendung gelangte, gegenüber dem fortlaufend verdünnten Referenz-Rinderserum eine Präzipitation bis zu einer Verdünnung von 1:1024.

Zur Titration verwendete *Referenzantigene*:

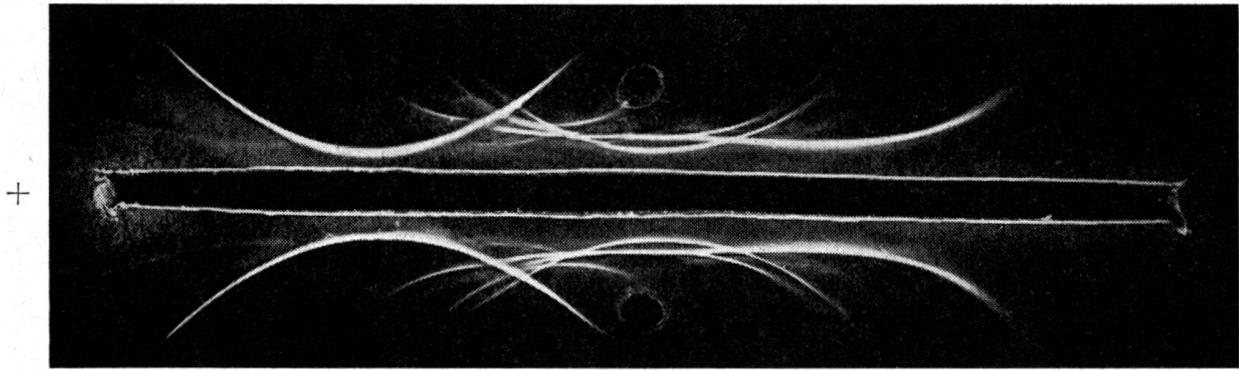
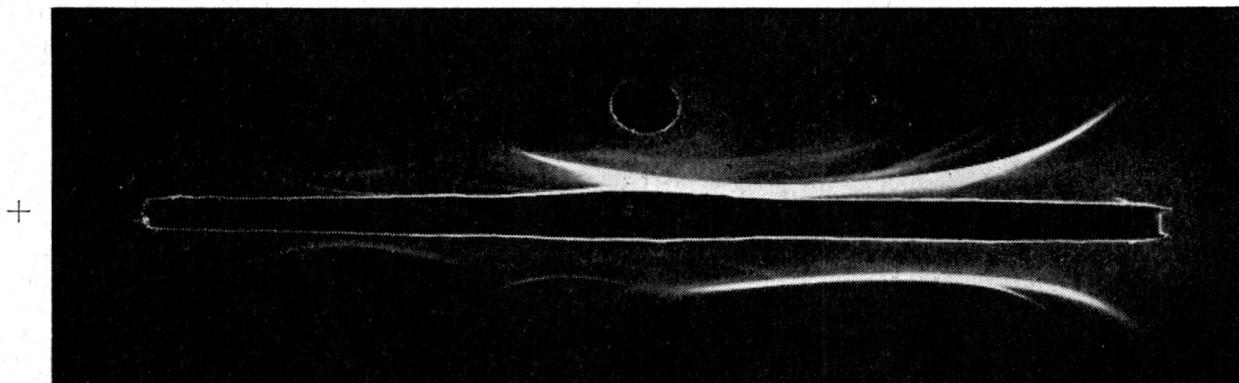
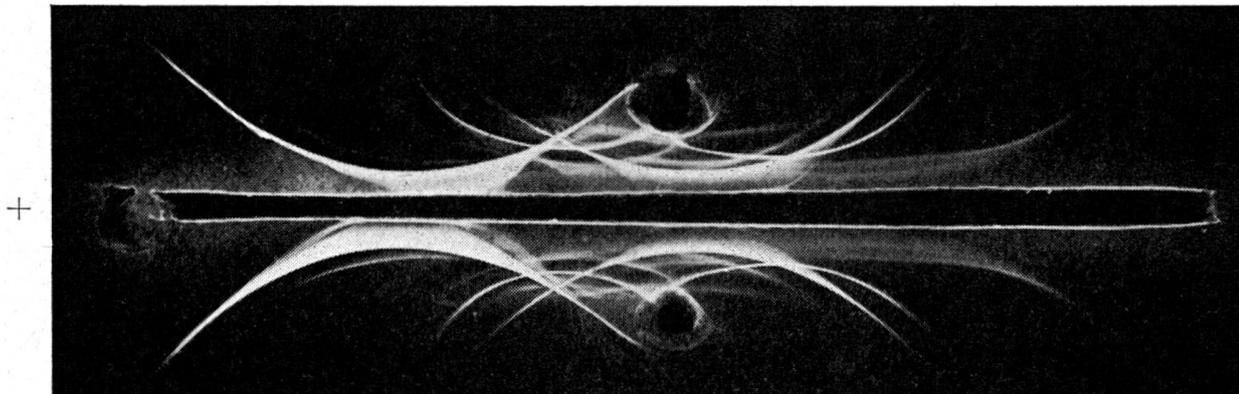
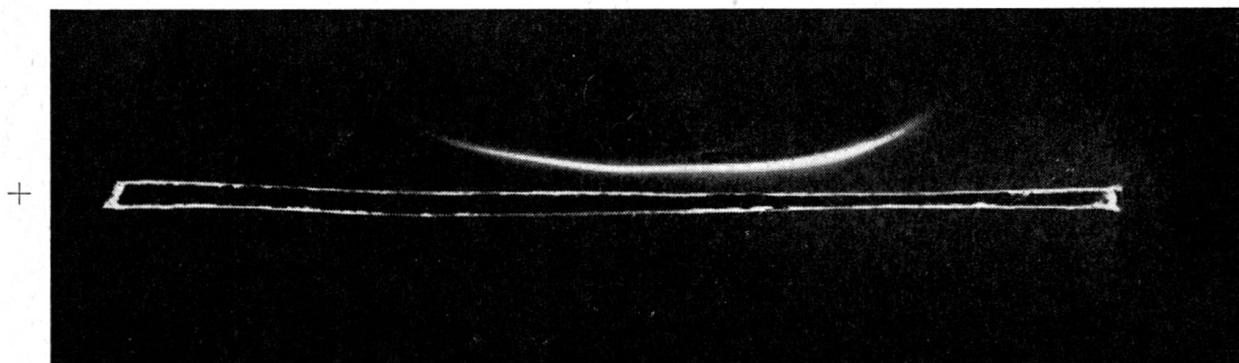
Pferdeserum mit einem Gesamteiweißgehalt von 6,3 g % (Zeiss-Refraktometer).
Papierelktrophorese: 39% Albumin, 23% α_1 -, 18% α_2 -, 9% β - und 11% γ -Globulin.

Rinderserum: GE 7,5 g % (Zeiss-Refraktometer) Papierelktrophorese: 38,2% Albumin, 16,2% α -, 10% β - und 35,6 Gammaglobulin.

¹Neuerdings gegen Carbowax (Fluka, Buchs St.Gallen).

Die Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes und die papierelktrophoretische Untersuchung der Testseren wurde freundlicherweise von Frau Moser am Institut für Tierzucht und Hygiene der Universität Bern vorgenommen.

Immunelektrophoretische Bilder der verschiedenen Antiseren:

Abb. 7¹ *Anti-Pferd*: Antigen: 2 mal PferdeserumAbb. 8 *Anti-Colostrum*: Antigene: oben Colostrum, unten RinderserumAbb. 9 *Anti-Rind*: Antigen: 2 mal RinderserumAbb. 10 *Anti-Rinderserum-Gammaglobulin*: Antigene: oben Kälberserum nach Colostrum-aufnahme, unten vor der Aufnahme

¹ Herrn Schneider am Veterinär-Pathologischen Institut der Universität Bern sei für die Mithilfe bei den photographischen Arbeiten bestens gedankt.