

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

Band: 124 (1982)

Artikel: Anwendung eines Micro-ELISA für die Serologie der infektiösen Agalaktie der Ziegen

Autor: Schaeren, W. / Nicolet, J.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-587997>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. 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. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

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. [Voir Informations légales.](#)

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. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 04.10.2024

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

Schweiz. Arch. Tierheilk. 124, 163–177, 1982

Aus dem Veterinär-bakteriologischen Institut
der Universität Bern

Anwendung eines Micro-ELISA für die Serologie der infektiösen Agalaktie der Ziegen

von W. Schaeren und J. Nicolet*

Bei der infektiösen Agalaktie der Schafe und Ziegen handelt es sich um eine in Europa weitverbreitete und schon seit langem bekannte Krankheit. Die erste Beschreibung stammt aus Italien (1816). Seither sind praktisch in allen ans Mittelmeer angrenzenden Ländern, sowie in neuerer Zeit auch in Indien, Iran, Pakistan, der UdSSR und Rumänien Ausbrüche beobachtet worden [3, 10, 15, 17].

Obschon die infektiöse Agalaktie laut eidgenössischem Tierseuchengesetz zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen gehört, ist die epidemiologische Situation in der Schweiz nicht klar. Gerade während der letzten Jahre war ein Ansteigen der Anzahl Seuchenfälle besonders in den Kantonen Tessin, Graubünden und Uri festzustellen (*Mitteilungen des Bundesamtes für Veterinärwesen*).

Diese Zunahme dürfte nicht zuletzt auf das Fehlen geeigneter Diagnosemöglichkeiten zurückzuführen sein. In Fällen akuter Neuinfektionen in einer Herde ist es meistens möglich, aufgrund der bekannten Symptomentrias Mastitis, Arthritis, Keratokonjunktivitis sowie des Nachweises von *Mycoplasma agalactiae* aus der Milch, eventuell aus dem Augenausfluss oder Gelenkspunktaten infizierter Tiere zu einer sicheren Diagnose zu gelangen. Demgegenüber fällt es bedeutend schwieriger, chronisch infizierte, klinisch gesunde Tiere zu erkennen. Zudem fehlte bis heute, trotz verschiedener Anstrengungen auf diesem Gebiet [1, 4, 8, 9, 12, 14, 20], eine praxisreife Serologie.

Im Rahmen einer teilepidemiologischen Abklärung der Situation im Kanton Tessin überprüften wir die Eignung eines Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) als diagnostisches Hilfsmittel.

In einem Vorversuch wurden bei 400 Ziegen mit der gleichen Methode spezifische Antikörper gegen eine der drei anderen im Zusammenhang mit dem Syndrom der infektiösen Agalaktie gefundenen Mykoplasmenpezies, *M. capricolum*, *M. mycoides subsp. mycoides*, *M. putrefaciens* [6, 10, 17, 18, 19, 23] gesucht. Da alle Untersuchungen negative Resultate ergaben und bis heute in der Schweiz noch bei keinem Krankheitsausbruch eine dieser drei Mykoplasmenpezies gefunden wurde, beschränkten wir uns in unserer Arbeit auf *M. agalactiae*.

* Adresse: Prof. Dr. J. Nicolet, Postfach 2735, CH-3001 Bern

Material und Methoden

Serumproben – Die Prüferseren stammten von 5900 Ziegen aus 252 Beständen des Kantons Tessin. Untersucht wurden vorwiegend Tiere aus Gebieten, in denen im Verlauf der letzten Jahre klinisch manifeste Krankheitsfälle beobachtet wurden, sowie zusätzlich der gesamte Ziegenbestand im Verzascatal.

Die Negativ-Kontrollseren wurden von zehn Ziegen aus einem Gebiet, in dem noch nie eine Infektion mit *M. agalactiae* festgestellt wurde, gewonnen.

Als Positiv-Kontrolle diente der Serumpool dreier Ziegen mit den typischen Symptomen der infektiösen Agalaktie. Die Sicherung der Diagnose gelang durch mehrmalige Isolierungen von *M. agalactiae* aus der Milch.

Milchproben – Die 1100 untersuchten Milchproben stammten zum grössten Teil von den gleichen Tieren wie die Blutproben. Dazu kamen mehrere Proben von klinisch verdächtigen Ziegen.

Die Milchproben, die im Milch-ELISA als Kontrollen verwendet wurden, stammten von den gleichen Ziegen wie die Kontrollseren.

Zur Bestimmung der Empfindlichkeitsgrenze des Milch-ELISA im Zusammenhang mit Mischmilchuntersuchungen diente eine künstlich hergestellte Herdenmischmilchprobe, wobei positive Milch in negativer Milch verdünnt wurde.

Stamm Verwendet wurde der *M. agalactiae*-Referenzstamm PG₂ (NCTC 10123).

Kultur Die Kultur erfolgte in einer PPLO-Bouillon (PPLO Broth Difco) ohne Hemmstoff-zusätze; angereichert mit 10% Hefeextrakt (25%) und 20% Pferdeserum [5].

Die Mykoplasmen wurden bei einem pH-Wert von ca. 6,8 entsprechend einer 3- bis 4tägigen Bebrütungsdauer bei 37 °C geerntet. Anschliessend an eine Ultrazentrifugation (20000 g, 20 Min. 4 °C) wurde das Sediment dreimal in 0,25 M NaCl gewaschen.

Protein-Bestimmung – Der Proteingehalt der Mykoplasmen wurde mit Hilfe der von Hartree [13] modifizierten Lowry-Methode bestimmt.

ELISA-Antigen – Im wesentlichen wurde das von Nicolet *et al.* [7] beschriebene Solubilisierungsverfahren mit Tween 20 angewandt. Von den gewaschenen *M. agalactiae*-Zellproteinen wurde 1 mg in 1 ml 0,0125 M Phosphat Puffer (pH 7,1) mit 1% (v/v) Tween 20 suspendiert und während 90 Min. bei 37 °C inkubiert. Nach einer Ultrazentrifugation (48 000 g, 60 Min., 4 °C) und anschliessender Membranfiltration¹ (Porengrösse 0,2 µm) diente der Überstand als Antigen für den ELISA.

KBR-Antigen – Die in 0,15 M NaCl (+ 1/20 000 Merthiolat) gewaschenen Mykoplasmenzellen wurden in Veronalpuffer gelöst und kurz vor Gebrauch einer Ultraschall-desintegration² unterzogen (maximale Leistung während einer Minute).

Mittels einer Schachbrett-titration [21] wurde die optimale Antigenverdünnung bestimmt.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Serum) – Als Grundlage diente die von Engvall und Perlman 1972 [11] beschriebene Methode in Microtiter-Platten³.

In jede Vertiefung wurden jeweils 0,2 ml der betreffenden Reagenzien eingefüllt. Die Beschichtung der Platten mit einer vorgängig austitrierten, optimalen Antigenverdünnung in einem 0,1 M Carbonat-Puffer (pH 9,6) erfolgte über Nacht bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer.

Die Waschungen der Platten zwischen den einzelnen Reaktionsschritten mit einer 0,15 M NaCl-Lösung mit 0,5% Tween 20 wurde mit Hilfe eines automatischen Waschgerätes⁴ durchgeführt.

Die Inkubationszeit für die Seren (Verdünnung 1/100 in einem 0,01 M Phosphat-Puffer (pH 7,2) mit 1% Tween 20 und 0,5 M NaCl) betrug 6 Stunden, diejenige für das Konjugat (Kaninchen-

¹ Acrodisc, Gelman Instrument Co., Ann Arbor, Michigan.

² Sonifier B₁₂, Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut.

³ Flat bottom Microelisa Plates Immulon, M 129 A, Dynatech AG, Kloten, Schweiz.

⁴ Titertek Multiwash, Flow Laboratories AG, Baar, Schweiz.

Anti-Ziegen IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase)⁵ 20 Stunden. Die optimale Konjugatverdünnung (Verdüner gleich wie für Seren) musste für jede Lieferung neu bestimmt werden. Als Substrat diente p-Nitrophenylphosphat⁶ (1 mg/1 ml eines 0,05 M Carbonat-Puffers, pH 9,8 mit 1 mM MgCl₂). Die Ablesung der Farbveränderung mit einem Microtiterplatten-Lesegerät⁷ bei 405 nm erfolgte nach genau einer Stunde Reaktionszeit.

Die erste Reihe jeder Platte, nur mit Substratlösung gefüllt, wurde zur Eichung des Photometers verwendet. Alle Seren wurden im Doppelansatz geprüft. In allen Fällen grosser Differenzen der zwei Extinktionswerte eines Serums wiederholten wir den Test.

Auf allen Platten wurden sowohl Positiv- als auch Negativ-Kontrollseren mitgeführt.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Milch) – Die vom vorher beschriebenen Vorgehen gemachten Abweichungen betrafen die Verdünnung der Milch (unverdünnt) sowie die Inkubationszeiten (Milch und Konjugat jeweils nur 3 Stunden). Im weiteren verwendeten wir für die Milchuntersuchungen andere Microtiterplatten⁸.

Komplementbindungsreaktion – Grundsätzlich hielten wir uns an die 1965 durch die «Centers for Disease Control, Atlanta» veröffentlichten Richtlinien zur Durchführung einer Microtiter-KBR-Methode [21]. Die Inaktivierung der Seren erfolgte bei 56 °C während 30 Minuten Inkubationsdauer des Antigen-Serum-Komplementgemisches: 15–18 Stunden bei 4 °C. Die Ablesung erfolgte 30 Minuten nach der Hinzugabe des haemolytischen Systems bei 37 °C.

Isolierung der Mykoplasmen aus Milchproben – Vorgängige Isolierungsversuche mit Vollmilch und Sediment haben gezeigt, dass die zweite Methode bessere Resultate ergibt. Deshalb wurden die Milchproben zentrifugiert (3800 U/Min., 15 Minuten) und anschliessend das Sediment auf 5% Schafblutagarplatten sowohl mit als auch ohne Hemmstoffzusätze (Penicillin 1000 IU/ml, Thalliumacetat 1/4000) kultiviert. Eine vorläufige Ablesung erfolgte nach sechs Tagen, die endgültige Ablesung nach zehn Tagen Bebrütung bei 37 °C und 10% CO₂. Die Zeitdauer von der Entnahme bis zur Kultivierung der Milchproben schwankte wegen der langen Transportwege zwischen 24–72 Stunden.

Identifikation der Mykoplasmen – Zur Identifizierung der Isolate hielten wir uns an das von Baas und Jasper [2] beschriebene Verfahren der indirekten Agar-Block-Immunfluoreszenz. Dabei erwiesen sich die von uns verwendeten Schafblutagarplatten wegen der geringeren unspezifischen Hintergrundfluoreszenz als besser gegenüber herkömmlichen PPLO Agarplatten.

Pro Bestand wurde mindestens ein Isolat als *M. agalactiae* identifiziert.

Resultate

Wegen der Schwierigkeit, im Rahmen einer Routinediagnostik auf jeder Platte mehrere Referenzproben mitzuführen, erwies sich die Auswertung der ELISA-Werte als recht problematisch.

Damit überhaupt eine einheitliche Interpretation der im ELISA gemessenen Extinktionswerte möglich wurde, mussten die von Platte zu Platte auftretenden Schwankungen (Tabelle 1) ausgeglichen werden. Deshalb wurde der Mittelwert der optischen Dichte der Positivkontrolle von 40 aufeinanderfolgenden Tests als Konstante benutzt. Er betrug 0,400 (Tabelle 1).

⁵ Northeast Biomedical Laboratories/Dynatech Produkte AG, Kloten, Schweiz.

⁶ E. Merck, Darmstadt, Deutschland.

⁷ Titertek Multiskan, Flow Laboratories AG, Baar, Schweiz.

⁸ Linbro E.I.A. Microtitration Plates, Flow Laboratories, Baar, Schweiz.

Tabelle 1: Ablesung des ELISA bei Verwendung von Tween 20 behandelten Zellen von *M. agalactiae*. Mittelwert und Extremwerte der Kontrollseren.

	Werte der optischen Dichte bei 405 nm		
	Mittelwert*	höchster Wert*	tiefster Wert*
Positivkontrolle	0.400 ± 0.071	0.556	0.220
Negativkontrolle	0.034 ± 0.014	0.065	0.014

* Mittelwert, Standardabweichung und Extremwerte der optischen Dichte der Kontrollseren von 40 aufeinanderfolgenden Tests

Somit ergab sich für die Umrechnung der Extinktionswerte folgende Formel:

$$\text{OD korrigiert} = \text{OD gemessen} \times \frac{0,400}{\text{OD der Positivkontrolle im betreffenden Test}}$$

OD = optische Dichte der Seren im ELISA gemessen bei 405 nm.

Die Klassifizierung der Seren aufgrund dieser korrigierten Extinktionswerte erfolgte nach dem untenstehenden Schema:

negativ	$\text{OD}_k < 0,075$
verdächtig	$\text{OD}_k = 0,075 - 0,120$
schwach positiv	$\text{OD}_k = 0,121 - 0,175$
positiv	$\text{OD}_k = 0,176 - 0,250$
stark positiv	$\text{OD}_k > 0,250$

OD_k = Grenzwerte der korrigierten optischen Dichte der Seren im ELISA gemessen bei 405 nm

Dass diese Methode eine gute Reproduzierbarkeit der Beurteilung einzelner Seren ermöglichte, zeigt das Ergebnis einer mehrmaligen Untersuchung des gleichen Serums (Tabelle 2).

In 20 nacheinander durchgeführten Tests wurde das betreffende Serum 18mal als verdächtig und 2mal als schwach positiv bewertet.

Ergebnisse der Serologie von Ziegen mit Isolierung von M. agalactiae aus der Milch

M. agalactiae konnte aus der Milch von 52 Ziegen isoliert werden. Davon erwie- sen sich 50 = 96% (Tabelle 3) als serologisch positiv.

Da es sich bei den zwei negativen Fällen um Tiere aus Herden handelte, in denen noch weitere Ausscheider zu finden waren, und zudem die Blut- beziehungsweise Milchprobenentnahme nicht zum gleichen Zeitpunkt erfolgte, ist eine Neuinfektion in der Zwischenzeit nicht auszuschliessen.

Im weiteren war eine negative Korrelation zwischen dem quantitativen Nachweis von *M. agalactiae* in der Milch und den Antikörpertitern festzustellen. Inwieweit diese Beobachtung mit einem bestimmten Infektionsstadium in Zusammenhang steht, konnte wegen der meist fehlenden Anamnesen nicht genau abgeklärt werden.

Trotz dieser Einschränkung scheint uns die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen zu sein, dass die Gruppe mit massiver Ausscheidung von Mykoplasmen vorwiegend frisch infizierte Tiere umfasste, während chronisch infizierte Ziegen hauptsächlich in der Gruppe mit geringer Ausscheidung zu finden waren.

Vergleichsuntersuchung zwischen ELISA und KBR mit Serumproben

Die Resultate sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Um die Übereinstimmung der ELISA-Serologieresultate mit der in bisherigen Arbeiten als zuverlässigste Methode [4, 14, 20] beschriebenen Komplementbindungsreaktion abzuklären, wurden 180 Seren gleichzeitig mittels dieser zwei Methoden getestet. Wegen der Antikomplementarität vieler Ziegenserumproben (bei sechs Seren wurde dadurch eine Auswertung sogar verunmöglicht) müssen die KBR-Resultate bei einer Serumverdünnung $\leq 1/20$ als bedingt zuverlässig beurteilt werden. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache kann die Übereinstimmung als sehr gut bezeichnet werden. Es konnte auch kein signifikanter Unterschied der Empfindlichkeit dieser zwei Methoden festgestellt werden.

Tabelle 2: Absorptionswerte im ELISA des Serums Nr. 1401 zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Bewertung einzelner Seren

Positivkontrolle ¹	Werte der optischen Dichte bei 405 nm		Bewertung ⁴
	OD gemessen ²	OD korrigiert ³	
0.336	0.090	0.106	verdächtig
0.349	0.079	0.099	verdächtig
0.442	0.105	0.095	verdächtig
0.384	0.086	0.090	verdächtig
0.353	0.094	0.107	verdächtig
0.477	0.105	0.088	verdächtig
0.318	0.079	0.099	verdächtig
0.325	0.065	0.080	verdächtig
0.505	0.163	0.128	schwach positiv
0.447	0.131	0.117	verdächtig
0.387	0.083	0.086	verdächtig
0.369	0.091	0.099	verdächtig
0.377	0.123	0.131	schwach positiv
0.424	0.081	0.076	verdächtig
0.365	0.099	0.108	verdächtig
0.351	0.071	0.080	verdächtig
0.384	0.106	0.110	verdächtig
0.303	0.072	0.094	verdächtig
0.331	0.085	0.103	verdächtig
0.408	0.097	0.095	verdächtig
	0.095 ± 0.023	0.099 ± 0.015	

¹ optische Dichte der Positivkontrolle im betreffenden Test

² im ELISA gemessener Wert des Serums Nr. 1401

³ aufgrund des Wertes der Positivkontrolle korrigierte optische Dichte des Serums Nr. 1401 (s. Text)

⁴ verdächtig: OD_{kor}: 0.075–0.120, schwach positiv: OD_{kor}: 0.121–0.175

Tabelle 3: Zusammenhang zwischen dem quantitativen Nachweis von *M. agalactiae* in der Milch und dem Antikörpernachweis im Serum mittels eines ELISA

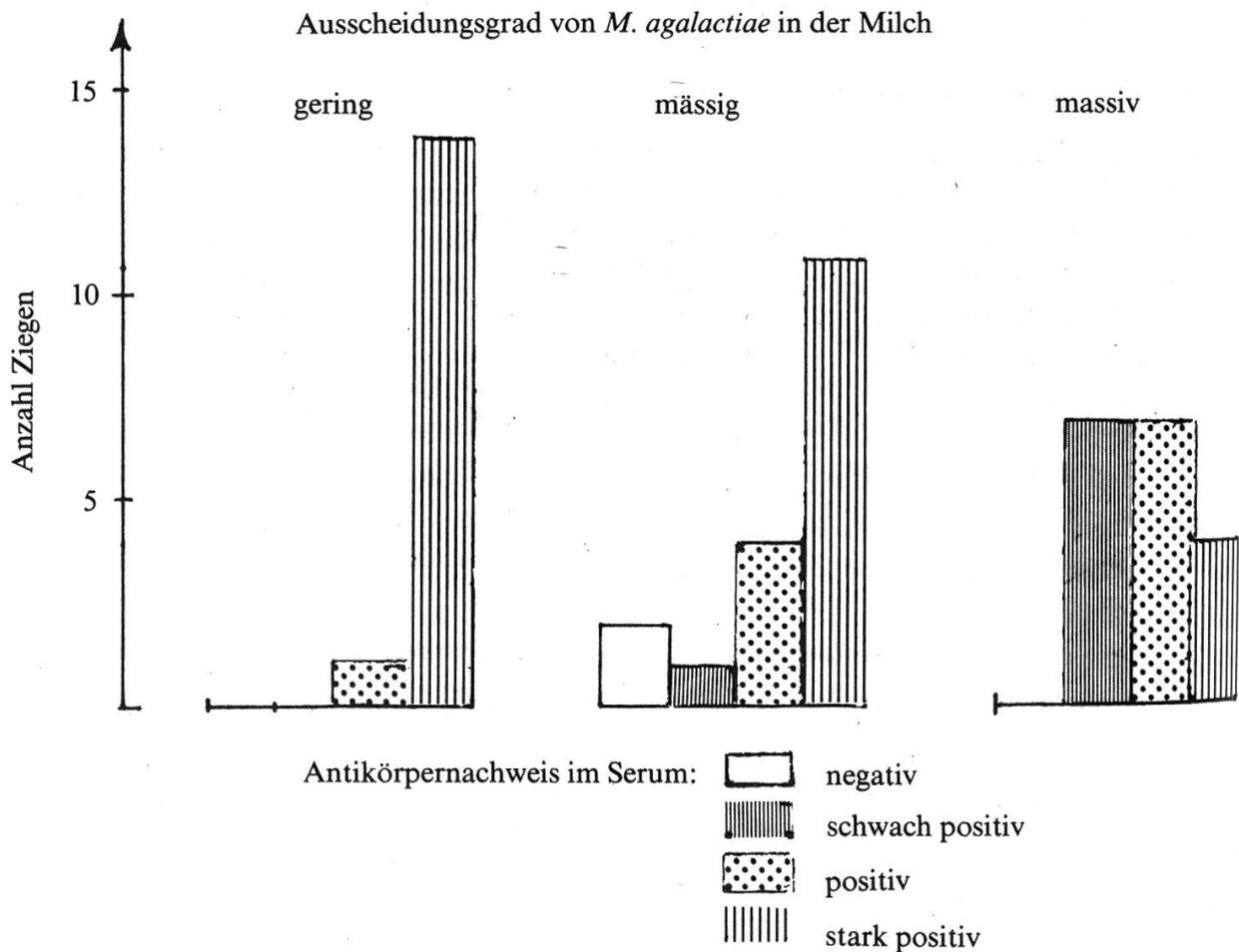


Tabelle 4: Gegenüberstellung der mittels zweier verschiedener Methoden (KBR bzw. ELISA) erhaltenen serologischen Resultate von 174 Serumproben

<i>KBR-Resultate</i>		<i>ELISA-Resultate</i>			
(Serumverdünnung) ⁺		negativ	schwach positiv	positiv	stark positiv
<i>negativ</i>	(1/10)	86*	15	—	—
<i>positiv</i>	(1/10)	—	2	6	7
	(1/20)	6	2	6	7
	(1/40)	1	—	7	4
	(1/80)	—	—	2	9
	(≥ 1/160)	—	—	—	27

* Anzahl Proben

⁺ Angabe der höchsten Serumverdünnungsstufe ohne sichtbare Hämolyse

Ergebnisse der Serologie der 5900 untersuchten Ziegen

Insgesamt wiesen 1719 = 29% der Tiere positive Antikörpertiter gegenüber *M. agalactiae* auf (Tabelle 5).

Dies deutet darauf hin, dass in den von uns untersuchten Herden recht viele Ziegen irgendwann mit dieser Krankheit in Kontakt gekommen sind.

Da wahrscheinlich auch eine durchgemachte, bakteriologisch abgeheilte Infektion dauerhafte Antikörpertiter hinterlässt, kann die Bedeutung serologisch positiver Tiere als potentielle Dauerausscheider nicht genau beurteilt werden.

Anteil der serologisch positiven Tiere pro Bestand

Neben der grossen Anzahl Herden mit serologisch positiven Tieren ist der grosse Anteil von Beständen, in denen mehr als zwei Drittel der Ziegen Antikörper gegen *M. agalactiae* aufweisen, recht auffällig (Tabelle 6).

Diese Beobachtung ist mit der bekannt hohen Kontagiosität der Krankheit und dem häufig sehr engen Kontakt mehrerer Bestände (z.B. gemeinsame Alpung, Ankauf von Tieren aus verschiedenen Betrieben) relativ leicht zu erklären.

Obschon es nicht möglich war, alle Herden, in denen serologisch positive Tiere gefunden wurden, auch milchbakteriologisch zu untersuchen, konnten in 26 dieser Bestände Ausscheider von *M. agalactiae* gefunden werden.

Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass es sich dabei häufig um Herden mit klinisch nicht erkannten Dauerausscheidern handelte.

Tabelle 5: Ergebnisse des Nachweises spezifischer Antikörper gegen *M. agalactiae* bei 5900 Ziegen aus dem Kanton Tessin mittels eines Microtiter-ELISA

OD* 405 nm	< 0.075	0.075–0.120	0.121–0.175	0.176–0.250	> 0.250
Bewertung	negativ	verdächtig	schwach positiv	positiv	stark positiv
Anzahl Ziegen (%)	4181 (71)	72 (1)	190 (3)	334 (6)	1123 (19)
Total (%)	4181 (71)		1719 (29)		

* Bereich der korrigierten optischen Dichte der Seren im ELISA gemessen bei 405 nm

Tabelle 6: Einteilung der untersuchten Bestände aufgrund des prozentualen Anteils serologisch positiver Tiere pro Bestand

Prozentsatz serologisch positiver Tiere/Bestand	0%	bis 33%	34% bis 66%	mehr als 66%
Anzahl Bestände (%)	99 (39%)	48 (19%)	50 (20%)	55 (22%)
Anzahl Bestände mit Ausscheidern (untersucht)*	0 (11)	0 (10)	6 (19)	20 (33)

* In 26 Beständen konnte bei mindestens einem Tier *M. agalactiae* in der Milch nachgewiesen werden. In Klammern: Anzahl untersuchter Herden pro Gruppe

Kasuistik

Ein anamnestisch und verlaufmässig besonders interessanter Fall soll gesondert dargestellt werden. Dabei handelt es sich um einen Bestand, aus dem 26 Ziegen auf der Alp mit erkrankten Tieren in Kontakt gekommen sind, während der andere Teil (20 Tiere) zu Hause blieb.

Die serologischen und milchbakteriologischen Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Dieser Fall zeigt sehr schön die Infektionsgefahr, die mit solchen Gemeinschaftsalpungen verbunden ist.

Milchuntersuchungen

Die mittels der ELISA erhaltenen Extinktionswerte der Milchproben von nachgewiesenermassen infizierten Ziegen (*Positivkontrolle*) und von denjenigen aus einem krankheitsfreien Gebiet (*Negativkontrolle*) sind in Tabelle 8 aufgeführt. Dabei fällt auf, dass die optische Dichte der Negativkontrollen kleiner ist als diejenige der Substratlösung. Die genaue Ursache dieses Phänomens wurde nicht abgeklärt. Als positiv wurden alle Proben bezeichnet, die im ELISA einen Extinktionswert $\leq 0,050$ erreichten.

Tabelle 7: Ergebnisse der serologischen und milchbakteriologischen Untersuchungen der Ziegen aus dem Bestand K.

	Serologie-Resultate (ELISA)			Nachweis von <i>M. agalactiae</i> aus der Milch		
	negativ	positiv	stark positiv	negativ	positiv	starke Kontamination ¹
Ziegen nach der Alpung	2	1	23	7	15	4
Ziegen ohne Alpung	19	1	–	15	–	5

¹ Trotz Blutplatten mit Penicillin und Thalliumacetat-Zusatz keine Beurteilung möglich

Tabelle 8: Ablesung des Milch-ELISA. Mittelwert und Extremwerte der Kontrollmilchproben.

	Werte der optischen Dichte bei 405 nm		
	Mittelwert*	höchster Wert*	tiefster Wert*
Positivkontrolle	0.262 ± 0.071	0.372	0.165
Negativkontrolle	– 0.017 ± 0.008	0.000	– 0.029

* Mittelwert, Standardabweichung und Extremwerte der optischen Dichte der Kontrollmilchproben in 20 aufeinanderfolgenden Tests.

Nullpunkt = reine Substratlösung

Resultate des Milch-ELISA in Fällen einer nachgewiesenen Ausscheidung von M. agalactiae in der Milch

Der Nachweis von spezifischen Antikörpern in der Milch bei Ziegen mit nachgewiesener Ausscheidung von *M. agalactiae* erwies sich gegenüber der Serologie als weniger zuverlässig.

Von den 155 Ausscheidern waren 54 Milch-ELISA negativ (Tabelle 9). Dabei muss berücksichtigt werden, dass es sich dabei recht häufig um Milchproben von akut erkrankten Ziegen handelte, das heisst von Tieren, deren Immunität noch nicht stark ausgebildet war.

Sehr auffällig ist auch die Tatsache, dass die Milch-ELISA negativen Tieren vorwiegend zur Gruppe mit der massivsten Ausscheidung von *M. agalactiae* gehörten.

Empfindlichkeit der Methode

Mittels der Untersuchung einer künstlich hergestellten «Herdenmischmilch» (Verdünnung einer positiven Milch in negativer Milch) sollte die Empfindlichkeit des Milch-ELISA abgeklärt werden. Die bei diesem Test erhaltenen Extinktionswerte sind in Graphik 1 dargestellt. Aufgrund der Tatsache, dass unsere Positivkontrolle bis zu einer Verdünnung von 1/200 als positiv zu beurteilende Extinktionswerte im ELISA ergab, kann gesagt werden, dass eine deutlich Milch-ELISA positive Ziege in einer Herde von mehr als hundert Tieren mittels einer Herdenmischmilchuntersuchung erkannt werden kann.

Gegenüberstellung der Serologie und der Milch-ELISA-Resultate

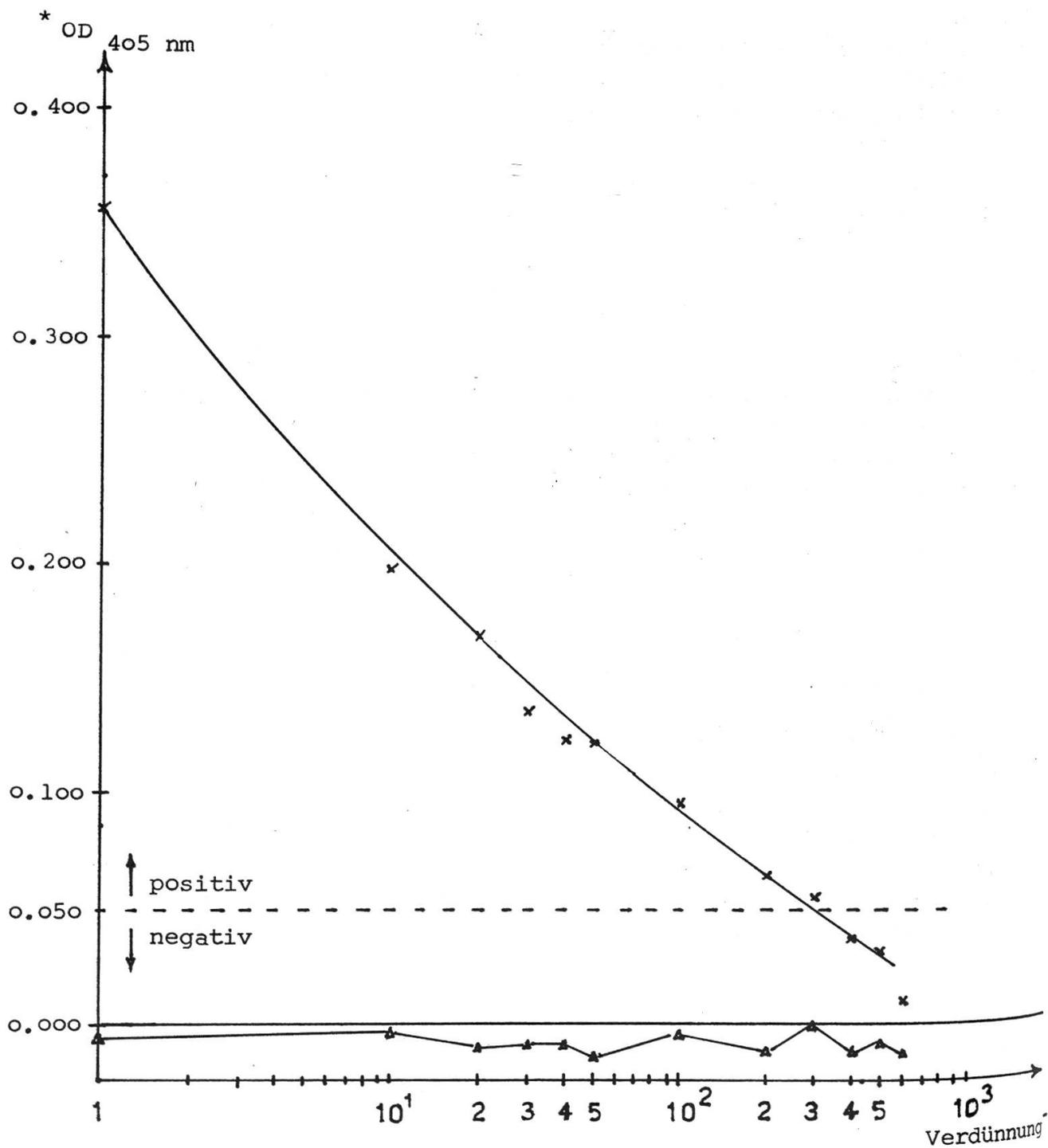
Ein Vergleich der Milch-ELISA- und der Serologieresultate ergab in 58% aller Fälle eine Übereinstimmung. Demgegenüber konnten Antikörper in 14% der Untersuchungen nur im Blut und in einem Prozent nur in der Milch gefunden werden (Tabelle 10). Bei der Interpretation dieser Gegenüberstellung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Milch- und Blutprobenentnahme häufig nicht zum gleichen Zeitpunkt erfolgte, und deshalb eine Veränderung im Immunitätsstatus der Tiere während der Zwischenzeit nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 9: Ergebnisse des Milch-ELISA bei Ziegen mit positivem Nachweis von *M. agalactiae* in der Milch

Antikörpernachweis in der Milch	Ausscheidung von <i>M. agalactiae</i> in der Milch		
	massiv	mässig	gering
positiv	52*	20	29
negativ	49	5	—

* Anzahl Ziegen

Graphik 1: Milch-ELISA-Werte der künstlich hergestellten «Herdenmischmilch» zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Methode.



* Im Milch-ELISA bei 405 nm gemessene optische Dichte der Positivkontrollmilch (x) und der Negativkontrollmilch (Δ) verdünnt mit Milch-ELISA negativer Ziegenmilch.
Nullpunkt der optischen Dichte = Substratlösung

Tabelle 10: Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *M. agalactiae* in Blut- bzw. Milchproben mittels eines ELISA

Antikörpernachweis im Serum	in der Milch	
	negativ	positiv ¹
negativ	378	5
positiv ²	141	431

¹ Optische Dichte der Milchproben im ELISA bei 405 nm > 0.050

² Optische Dichte der Seren im ELISA bei 405 nm > 0.120

Spezifität des Milch-ELISA

Inwieweit Mastitiden anderer Genese den Antikörpernachweis in der Milch beeinträchtigen, konnte im Rahmen unserer Untersuchungen nicht endgültig beurteilt werden, da einerseits keine klinischen Daten der betreffenden Ziegen zu erhalten waren und andererseits die milchbakteriologischen Resultate sehr schwierig zu interpretieren waren (häufig sehr starke Kontamination).

Trotzdem in ungefähr einem Drittel der Milchproben *S. aureus* nachgewiesen werden konnte, waren keine Anhaltspunkte für eine Beeinträchtigung des Milch-ELISA durch diesen bei der Ziege wahrscheinlich wichtigsten Mastitiserreger [22] zu finden.

Diskussion

Angesichts der in der Einleitung angetönten Schwierigkeiten bei der Erkennung von chronisch infizierten, klinisch gesunden Tieren dürfte eine erfolgreiche Bekämpfung und Kontrolle der infektiösen Agalaktie nur unter Einbezug einer geeigneten Serodiagnostik möglich sein. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse stellt die Milch- und Blutuntersuchung mittels eines Micro-ELISA-Verfahrens eine vielversprechende zusätzliche Möglichkeit in der Diagnostik dieser Krankheit dar. Die von uns angewandte Umrechnung der im ELISA gemessenen Werte der optischen Dichte aufgrund mitgeführter Kontrollseren ergab eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch bei einer routinemässigen Anwendung des Tests. Trotzdem erscheint uns eine weitere Vereinfachung der Interpretation des Tests in Form einer visuellen Ablesung der Platten, wie sie u. a. von *Bommeli* [7] für die Serologie der IBR vorgeschlagen wurde, wünschenswert. Obschon im Rahmen dieser Arbeit darauf verzichtet wurde, die erhaltenen Antikörpertiter in Zusammenhang mit einem bestimmten Infektionsstadium zu bringen, kann doch gesagt werden, dass deutlich positive Antikörpertiter (in unseren Untersuchungen Seren mit einem Extinktionswert ≥ 0.150) auf einen stattgefundenen Kontakt mit *M. agalactiae* hinweisen.

Leider fehlen bis heute Untersuchungen über den genauen Antikörper-Titerverlauf bei natürlichen Infektionen mit *M. agalactiae*.

Immerhin gelang es *Perreau et al.* [20], mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion schon 10–12 Tage nach einer künstlichen Infektion mit *M. agalactiae* spezifische Antikörper im Blut nachzuweisen. Dies zeigt, dass mit einer geeigneten Serologie-

Methode auch frisch infizierte Tiere erfasst werden können. Trotzdem dürfte der Einsatz einer Serodiagnostik im Zusammenhang mit der infektiösen Agalaktie vor allem bei der Erkennung von infizierten, klinisch nicht manifest erkrankten Tieren am wirksamsten sein.

Die Korrelation der ELISA- und der KBR-Resultate kann als sehr gut bezeichnet werden (Tabelle 4), was auf eine gute Spezifität der Methode hinweist. Das Problem der Antikomplementarität vieler Ziegenserum konnte mit der Anwendung eines Microtiter ELISA umgangen werden, was einen grossen Vorteil gegenüber der Komplementbindungsreaktion darstellt. Unterschiede in der Empfindlichkeit dieser zwei Methoden waren keine festzustellen.

Die Beeinflussung der Milch-ELISA-Ergebnisse durch andere Euterinfektionen wurde zwar nicht systematisch untersucht, scheint aber nicht sehr störend zu sein. Dass bei blutserologisch positiven Tieren relativ häufig keine Antikörper in der Milch nachzuweisen waren, ist eine Beobachtung, die unter anderem auch von der Bang-Milchserologie her bekannt ist. Ob es sich dabei vermehrt um akut oder chronisch erkrankte Tiere handelte, konnte wegen der fehlenden Anamnesen nicht erfasst werden. Es schien aber doch eher bei akuten Infektionen der Fall zu sein, da bei den betreffenden Tieren häufig eine massive Ausscheidung von *M. agalactiae* in der Milch zu finden war.

Währenddem die Serologie aufgrund der hohen Empfindlichkeit und des grösseren Aufwandes eher als Einzeltier-Diagnostik geeignet erscheint, bietet sich die Milchuntersuchung in Form einer Herdenmischmilchuntersuchung als ein guter Suchtest, analog des ABR-Tests oder des Milch-ELISA im Zusammenhang mit der IBR, an. Die meisten Ziegenherden im Kanton Tessin bestehen aus weniger als 50 Tieren. Demgegenüber kann eine Milch-ELISA positive Milch bis zu einer Verdünnung von 1/200 erfasst werden (Graphik 1). Daher dürfen von einer Herdenmischmilchuntersuchung recht zuverlässige Resultate erwartet werden. Um auch frisch infizierte Herden zu erkennen, sollte immer gleichzeitig auch eine milchbakteriologische Untersuchung durchgeführt werden.

Bei der Diskussion unserer Resultate im Hinblick auf die epidemiologische Situation der infektiösen Agalaktie der Schafe und Ziegen im Kanton Tessin muss berücksichtigt werden, dass mit Ausnahme des Verzascatal vorwiegend Herden aus endemisch verseuchten Regionen untersucht wurden. Aus diesem Grunde ist der grosse Anteil von Beständen mit serologisch positiven Tieren sicher nicht unbedingt repräsentativ für den ganzen Kanton. Dieser hohe Prozentsatz ist andererseits ein Beweis für die Richtigkeit der Beobachtung, dass in Gebieten, in denen Krankheitsausbrüche vorkommen, sehr rasch ein Grossteil der Herden erfasst wird. Dabei kommt dem Handel und der Vermischung von Ziegenherden während der Alpung eine entscheidende Bedeutung zu (siehe Kasuistik). Aus diesem Grunde dürfte eine der wichtigsten Massnahmen bei der Bekämpfung dieser Krankheit in der Überwachung des Ziegenverkehrs bestehen, wobei der vermehrte Einsatz serologischer Untersuchungen unumgänglich erscheint.

Mit unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Micro-ELISA eine geeignete Methode für die Serologie der infektiösen Agalaktie der Ziegen darstellt.

Zusammenfassung

Ein Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Mycoplasma agalactiae* im Serum und der Milch von Ziegen wird beschrieben. Als Antigen dienten mit Tween 20 behandelte *M. agalactiae*-Zellen. Im Rahmen einer teilepidemiologischen Untersuchung der infektiösen Agalaktie im Kanton Tessin wurde die Eignung des Tests unter routinemässigen Bedingungen geprüft. Dabei erwies sich die Blutuntersuchung im Vergleich mit Einzelmilchuntersuchungen als zuverlässiger.

Die Herdenmischmilchuntersuchung dürfte sich vor allem als Suchtest bei der Überwachung der epidemiologischen Situation der Krankheit eignen.

Eine gute Korrelation der ELISA- bzw. KBR-Serologie-Resultate konnte gezeigt werden, wobei kaum Unterschiede in der Empfindlichkeit festzustellen waren.

Der Test erwies sich als einfach, zuverlässig, reproduzierbar und empfindlich.

Die epidemiologischen Resultate bestätigten die relativ starke Verbreitung dieser Krankheit im Kanton Tessin.

Résumé

On décrit un test d'ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) pour la mise en évidence d'anticorps contre *Mycoplasma agalactiae* dans le sérum et le lait de chèvres. Nous avons utilisé comme antigène un extrait de *M. agalactiae* obtenu par traitement au Tween 20.

La fiabilité de la méthode a été testée dans les conditions du diagnostic de routine au cours d'une étude épidémiologique partielle de l'agalaxie infectieuse dans le Canton du Tessin. Il semble d'ailleurs que les résultats obtenus avec le sérum sont plus représentatifs que ceux du lait individuel. Par contre l'examen du lait de mélange peut offrir un test approprié pour le dépistage dans le cadre d'un programme de contrôle.

On démontre la bonne corrélation et une sensibilité comparable entre l'ELISA et l'épreuve de déviation du complément.

Le test proposé est simple, fiable, reproductible et sensible.

Les résultats obtenus confirment l'expansion de cette maladie dans le Canton du Tessin.

Riassunto

Si descrive un enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) per la dimostrazione di anticorpi specifici contro *Mycoplasma agalactiae* nel siero e nel latte di capre. Come antigene sono state usate cellule di *M. agalactiae* trattate con Tween 20. L'adattabilità del test a indagini di routine è stata messa alla prova in una indagine epidemiologica parziale sulla agalactia contagiosa nel Canton Ticino. In questa occasione l'analisi del sangue si è rivelata più attendibile della analisi del latte individuale.

L'analisi su latte misto del gregge è da usarsi soprattutto come test di ricerca nel controllo della situazione epidemiologica della malattia.

È stata dimostrata una buona correlazione dell'ELISA e della reazione di fissazione del complemento (KBR) mentre scarse differenze nella sensibilità sono state constatate.

Il test si è rivelato semplice, attendibile, riproducibile e sensibile. I risultati epidemiologici hanno confermato la diffusione relativamente alta di questa malattia nel Canton Ticino.

Summary

A description is given of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to show the presence of specific antibodies against *Mycoplasma agalactiae* in the serum and milk of goats. *M. agalactiae* cells treated with Tween 20 were used as an antigen. The suitability of the test for use under routine conditions was put to the proof in the framework of an investigation into infectious agalactia, on a partially epidemiological scale, in the canton Tessin. It was found that blood tests proved more reliable than individual milk tests.

A milk test consisting of a combined sample from all the animals in one herd would be useful primarily for exploratory testing during the supervision of the epidemiological situation of the disease.

The ELISA and the CF-test were shown to be well correlated and there was scarcely any difference as regards sensitivity.

The test proved to be simple, reliable, reproducible and sensitive.

The epidemiological results confirmed that the disease is fairly widespread in the canton Tessin.

Literaturverzeichnis

- [1] *Arisoy F., Erdag O., Etheridge J.R., Foggie A.*: Contagious agalactia. A method to demonstrate growth inhibition of *Mycoplasma agalactiae* by sera of goats and sheep. *Pendik J. vet. kont. araç., Enst. Dergisi*, 1, 90–98 (1968). – [2] *Baas E.J. and Jasper D.E.*: Agar block technique for identification of Mycoplasmas by use of fluorescent antibody. *Appl. Microbiol.* 23, 1097–1100 (1972). – [3] *Baharsefat M. and Yamini B.*: Animal mycoplasmosis in Iran. *Arch. Inst. Razi*, 20, 39–42 (1968). – [4] *Baharsefat M. and Yamini B.*: *Mycoplasma agalactiae* III. The comparison of different serological tests with *M. agalactiae* antigen. *Arch. Inst. Razi*, 20, 43–48 (1968). – [5] *Bannerman E.S.N. and Nicolet J.*: Isolation and identification of porcine mycoplasma in Switzerland. *Schweiz. Arch. Thke.* 113, 697–710 (1971). – [6] *Bar-Moshe B. and Rappaport E.*: Contagious agalactiae-like disease in goats by *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* (ovine/caprine) serogroup 8. *Refuah vet.*, 35, 75–77 (1978). – [7] *Bommeli W.R., Kihm U., Lazarowicz M. and Steck F.*: Rapid detection of antibodies to Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) virus by micro-enzyme-linked immunosorbent assay (Micro ELISA). *Proc. 2nd Internat. Symp. Vet. Lab. Diagnosticians II.*, 235–239 (1980). – [8] *Ceccarelli A. and Fontanelli E.*: La deviazione del complemento nella diagnosi della agalassia contagiosa delle pecore e delle capre. *Zooprofilassi*, 5, 409–418 (1950). – [9] *Ceccarelli A. and Fontanelli E.*: Sulla varia apparenza delle reazioni immunitarie decelabili con gli esami sierologici. Ricerche con il virus della agalassia contagiosa delle pecore e delle capre. *Zooprofilassi*, 5, 489–501 (1950). – [10] *Cottew G.S.*: Diseases of sheep and goats caused by Mycoplasmas. In: *The role of mycoplasmas and L-forms of bacteria in diseases II*. Ed.: J.T. Sharp. Charles C. Thomas, Springfield, Ill. 198–211 (1970). – [11] *Engvall E. and Perlmann P.*: ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme linked antiimmunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, 8, 83–90 (1972). – [12] *Etheridge J.R., Foggie A., Arisoy F. and Erdag O.*: Contagious agalactia of sheep and goats. A diagnostic complement fixation test. *Pendik J. vet. kont. araç., Enst. Dergisi*, 2, 101–119 (1969). – [13] *Hartree E.F.*: Determination of Protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.*, 48, 422–427 (1972). – [14] *Marozzi A., Dominici S. and Cardaras P.*: Serological studies of contagious agalactia of sheep: choice of a diagnostic method. *Atti Soc. Sci. Vet.*, 27, 628–635 (1973). – [15] *Miège R.*: Foyer d'agalaxie contagieuse des chèvres des deux Savoies. *Revue méd. vét.*, 129, 247–259 (1978). – [16] *Nicolet J., Paroz Ph. and Bruggmann S.*: Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.*, 29, 305–309 (1980). – [17] *Perreau P.*: Les mycoplasmoses de la chèvre. *Cah. méd. vét.*, 18, 71–85 (1979). – [18] *Perreau P.*: Syndrome d'agalaxie contagieuse à *Mycoplasma subsp. capri*. Nouvelles observations. *Bull. acad. vét.*, 47, 179–188 (1974). – [19] *Perreau P., Tram Cuong and Vallee A.*: Isolement d'un mycoplasme du groupe *Mycoplasma mycoides var. capri* à partir d'un lait de mammite chez la chèvre. *Bull. acad. vét.*, 45, 109–116 (1972). – [20] *Perreau P., le Goff C. and Giaufferet A.*: Le diagnostic sérologique de l'agalaxie contagieuse des petits ruminants: un test de fixation du complément. *Bull. acad. vét.*, 49, 185–192 (1976). – [21] *Public Health Monograph No. 74*: Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to micro test. US Dept. Health, Education and Welfare, Public Health Service (1965). – [22] *Smith M.C. and Roguinsky M.*: Mastitis and other diseases of the goat's udder. *JAVMA* 71, 1241–1248 (1977). – [23] *Tully J.G., Barile M.F., Edward D.G. F.F., Theodore T.S. and Ernø H.*: Characterization of some caprine mycoplasmas, with proposals for new species, *Mycoplasma capricolum* und *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Gen. Microbiol.* 85, 102–120 (1974).

Wir danken dem Bundesamt für Veterinärwesen für die finanzielle Unterstützung (Nutztierforschungsprojekt Nr. 012.81/3).

Ferner möchten wir Frl. M. Krawinkler und Frau M. Vogt für die technische Hilfe sowie Dr. R. Zwahlen und Herrn A. Baumgartner für die Entwicklungsarbeiten recht herzlich danken.

Herrn Dr. S. Postizzi, Kantonstierarzt Tessin, und den Herren Tessiner Kollegen danken wir besonders für die bereitwillige und unentbehrliche Mitarbeit bei der Entnahme der Blut- und Milchproben.

Manuskripteingang: 5.2.1982

BUCHBESPRECHUNG

Kompendium der Kleintierkrankheiten. Herausgegeben von *Wilhelm Brass* unter Mitarbeit von U. Kersten, I. Rahlfs, I. Schütt, W. Wirth. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage, 560 Seiten, DM 73.-. Verlag M. u. H. Schaper, Hannover 1981.

Die Neuherausgabe des 1975 erstmals erschienenen Kompendium der Kleintierkrankheiten (vgl. dieses Arch. Bd. 117, S. 473) ist sehr zu begrüßen. Das Kompendium ist überarbeitet und stark erweitert worden und erlaubt eine rasche Orientierung über sämtliche Gebiete (Innere Medizin, Chirurgie, Gynaekologie) der Krankheiten von Hund und Katze. Für den Studierenden ist das Kompendium als Vorlesungshilfe gedacht. Betextet sind nur die linken Seiten, die rechten stehen für zusätzliche Notizen während der Vorlesung oder beim Selbststudium zur Verfügung. Die Darstellung ist dieselbe wie in der ersten Auflage geblieben: Gliederung nach Organapparaten, stichwortartige Besprechung der Aetiologie, Symptome, Prognose und Therapie. Die zur Diagnose führenden Tests werden meistens nur erwähnt, nicht aber näher beschrieben. Dasselbe ist von den Operationstechniken zu sagen. Die Arzneimitteldosierungen sind im Anhang alphabetisch nach den internationalen Kurznamen unter Angabe von 1 bis 2 Handelspräparaten in Klammern zusammengestellt. Das Kompendium kann sowohl dem Studierenden wie den Praktikern bestens empfohlen werden. Dem Praktiker dient es zur Auffrischung des Wissens und als Nachschlagewerk in der Sprechstunde.

U. Freudiger, Bern

VERSCHIEDENES

Südafrikas zweite tierärztliche Fakultät

Im Verlauf des letzten Jahres hat die tierärztliche Fakultät an der Medizinischen Universität des südlichen Afrika (MEDUNSA) mit dem ersten Studienjahrgang den Unterricht aufgenommen.

Die Universität liegt ca. 30 km nordwestlich vom Zentrum Pretorias, nahe der Grenzstadt Ga-Rankuwa in Botswanaland. Sie ist Afrikas erstes integrales Zentrum für Gesundheitswissenschaften, in welchem medizinische, veterinär-medizinische und zahnärztliche Fakultät in enger Zusammenarbeit Ausbildungsmöglichkeiten bieten, die vor allem den Gesundheitsdiensten für die schwarze Bevölkerung zugute kommen sollen.

MEDUNSA wurde am 21. August 1976 gegründet und der erste vollamtliche Rektor, Prof. F.P. Retief nahm seine Tätigkeit am 1. Januar 1979 auf. Die ersten Medizinstudenten wurden im Januar 1978 aufgenommen und jedes Jahr erweitert sich das Spektrum paramedizinischer Fächer.