



TARTU ÜLIKOOLI  
RAAMATUKOGU

289.10746

Aus der Bakteriologischen Station der Tierärztl. Fakultät der Univ. Tartu, Eesti  
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. F. Laja.

## Einiges über den Milchagglutinationstiter bei der Bang-Infektion der Kühe.

E. Vellisto.

### II. Inwieweit sind Vollmilch, Magermilch und Rahm, oder durch Lab, Essigsäure und Milchsäuregärung gewonnene Milchsera zur Bestimmung des Milchagglutinationstiters bei der Bang-Infektion der Kühe geeignet.

Vorliegende Arbeit behandelt die Frage, ob und in welchem Masse die Marktprodukte: Vollmilch, Magermilch und Rahm und ebenso die durch Lab, Essigsäure und Milchsäuregärung gewonnenen Milchsera für die Bestimmung des Milchagglutinationstiters bei der Bang-Infektion verwendbar sind. Auf andere Weise gewonnene Milchsera habe ich nicht auf diese Frage hin untersucht, ebenso

habe ich die Schnellmethoden der Agglutination nicht zur Prüfung herangezogen.

Es ist aus verschiedenen Gründen vorteilhaft mehrere Methoden zur Bestimmung des Milchagglutinationstiters zu kennen. Dabei können z. B. in Betracht gezogen werden:

1) Das Quantum der zur Untersuchung kommenden Proben. Wenn nur z. B. 1 ccm Vollmilch, Magermilch oder Rahm zur Verfügung steht, so ist es schwer und oft sogar unmöglich eine Serummethode anzuwenden, — weil zur Gewinnung des nötigen Quantums von Milchserum keine genügende Menge von Probematerial vorhanden ist.

2) Die Arbeitszeit. Eine jede Methode hat ihre Anforderungen in bezug auf die Durchführungszeit der Agglutinationsprobe.

3) Arbeitsquantum, -weise und Anforderungen an das Laboratorium sind verschieden bei jeder Methode. Deswegen kann zuweilen die eine, zuweilen die andere Methode zur Bestimmung des Agglutinationstiters der Milch geeigneter sein.

Die Bestimmung des Agglutinationswertes der Vollmilch bei der Bang-Infektion der Kühe.

Als man die serologische Methode der Milchuntersuchung bei der Bang-Infektion zur Diagnose dieser Krankheit zu gebrauchen begann, wurde zu der Agglutinationsreaktion anfangs Vollmilch verwendet. Doch die Resultate waren nicht befriedigend, weil die Flüssigkeit in den Agglutinationsgläsern starken Emulsionscharakter aufwies.

Reinhardt und Gauss (1914/15) fingen an bei der Bestimmung des Milchagglutinationstiters statt Vollmilch — Milchserum anzuwenden. Das Milchserum wurde meist durch Labgerinnung gewonnen. Es war klar und durchsichtig. Die Verfolgung der Agglutinationsreaktion sowie ihr zeitiges Auftreten wurden dabei nicht behindert.

Obwohl die Laboratoriumspraxis die Vorzüge des Milchserums im Vergleich zur Vollmilch für die Agglutinationsreaktion gezeigt hat, ist es doch wichtig, die Möglichkeiten, die die Anwendung der Vollmilch zu diesem Zweck bietet, zu kennen.

Es ist mir nicht gelungen in der Literatur Angaben über die systematische und methodische Behandlung der Anwendung der Vollmilch zur Agglutinationswertbestimmung zu finden. Um diese

Frage zu lösen, habe ich bei 60 Milchproben den Agglutinationstiter inbezug auf die Bang-Infektion bei der Vollmilch bestimmt und habe die erhaltenen Ergebnisse mit denen des Labserums der betreffenden Milchproben verglichen. Die Resultate dieser Bestimmungen des Agglutinationstiters sind in folgenden Reihen kurz dargestellt (Tabelle Nr. 1).

Tabelle Nr. 1.

Agglutinationswert des Labserums	Zahl der Milchproben	Die Agglutinationswerte der Vollmilch waren im Vergleich zu denen des betreffenden Labserums			
		übereinstimmend	abweichend höher	niedriger	unbestimmt
n/2,5 u. unbestimmt	7	3	—	—	4
n/5	2	—	—	—	2
n/10	6	2	—	—	4
n/40	1	1	—	—	—
1:2,5	1	1	—	—	—
1:5	4	—	—	—	4
1:10	5	3	1	—	1
1:20	4	3	—	1	—
1:40	8	6	—	2	—
1:40/80	4	2	2	—	—
1:80	7	5	—	—	2
1:80/160	1	1	—	—	—
1:160	3	3	—	—	—
1:160/320	2	—	1	1	—
1:320	2	2	—	—	—
1:320/640	1	—	—	1	—
1:640	1	1	—	—	—
1:640/1280	1	1	—	—	—
Zusammen	60	34	4	5	17

Erklärungen zur Tabelle Nr. 1: n/2,5; n/5; n/10 u. s. w. in der Tabelle bedeuten ein negatives Agglutinationsergebnis bei einer Verdünnung von 1:2,5; 1:5; 1:10 u. s. w. Ein Aggl.-wert von  $^{40}/_{80}$  oder  $^{160}/_{320}$  u. s. w. bedeutet, dass der Aggl.-wert nicht sicher 1:40 resp. 1:160 oder 1:80 resp. 1:320 ist, oder auch zwischen diesen beiden Werten liegen kann.

Aus diesen Daten ist es ersichtlich, dass die Ergebnisse der Agglutinationsreaktion bei der Anwendung von Vollmilch in 34 Fällen von 60 — also bei ca 57% — mit denjenigen des Milchserums übereinstimmen. Geringe Abweichungen waren zu beobachten bei 9 Milchproben, also bei 15%, von denen 4 Vollmilchproben (ca 7%) einen etwas höheren und 5 Milchproben (8%) einen niedrigeren Agglutinationswert aufwiesen, als die entsprechenden Agglutina-

tionswerte des Labserums. In 17 Fällen (bei 28%) war es nicht möglich zu bestimmen, ob die Ergebnisse übereinstimmend oder abweichend waren, und in der Tabelle sind diese Daten zu den unbestimmten Ergebnissen gezählt. 4 Labserumproben hatten unbestimmte Aggl.-ergebnisse.

Die meisten abweichenden oder unbestimmten Ergebnisse waren beim Fehlen der Milchagglutination und bei niedrigen Agglutinationswerten zu beobachten, wobei die Abweichungen der Agglutinationswerte der Vollmilch von denen des betreffenden Labserums nicht gross waren (der nächste höhere oder niedrigere Agglutinationswert des Labserums).

Ausser diesen Daten wäre es noch wichtig zu erwähnen, dass bei der Vollmilch oft eine Verzögerung der Bildung des Agglutinationsbodensatzes um ca 1 Tag oder mehr im Bereiche der Verdünnungen von 1:2,5 bis 1:160 im Vergleich zu den Agglutinationsreaktionen des Labserums konstatiert wurde (von 60 Fällen gab es 20 solcher Fälle — also 33%). Umgekehrt wurde eine Beschleunigung des Erscheinens des Agglutinationsphänomens nur in 4 Fällen — also bei 7% der Fälle beobachtet.

Die Vollmilchverdünnungen sind nach dem Verdünnungsgrad milchig, von einer stärkeren oder schwächeren Opaleszenz und endlich ungefähr bei einer Verdünnung von 1:2560 an, wasserklar. Nach einem Stehen von  $\frac{1}{2}$ —1 Tag findet in den Verdünnungen von 1:2,5 bis 1:160 durch Emporsteigen der Fettkügelchen der Milch zur Oberfläche der Flüssigkeit eine merkbare Klärung statt, wobei sich eine Rahmschicht oder ein Rahmring bildet. Danach wird die Bestimmung der Agglutinationsreaktion leichter, besonders wenn man die Gläschen vorsichtig hält und die Fettkügelchen in der Flüssigkeit nicht zerstreut. Am zweiten oder dritten Tag wird der Rahm auf der Flüssigkeit kompakter und bei geringem Schütteln der Gläschen nicht mehr leicht zerstreut. Bei einer Verdünnung von 1:2,5 ist die Beurteilung der negativen Reaktion oft erschwert. Bei jeder folgenden Verdünnung wird die Bestimmung der Reaktion leichter. Von der Verdünnung von 1:40 an bereitet sie keine Schwierigkeiten mehr und ungefähr von einer Verdünnung von 1:160 an ist die Bestimmung der Reaktion bei Verwendung von Vollmilch für die Agglutinationsreaktion ebenso leicht, wie beim Milchserum (am 3. Tage wird diese Grenze niedriger — sie verschiebt sich ungefähr bis zu einer Verdünnung von 1:20 und 1:40).

Bei der Anwendung von Vollmilch zur Agglutinationsreaktion

ist es wichtig, dass die Milch frisch und rein gemolken und gehalten ist.

Bei Inbetrachtziehung obiger Daten kann man zur Schlussfolgerung gelangen, dass die Vollmilch zur Milchagglutination anwendbar ist. Jedoch ist die Bestimmung der Agglutinationsreaktion in diesem Falle nicht so leicht und charakteristisch wie bei dem Milchserum. Ausserdem ist bei der Vollmilch oft eine Verspätung im Erscheinen des Agglutinationsphänomens zu beobachten, weshalb auch die Gefahr des Nichtgelingens der Agglutinationsreaktion grösser ist wie beim Labserum. Je konzentrierter die Vollmilch ist, desto mehr und bei desto niedrigeren Verdünnungen treten die unerwünschten Eigenschaften der Vollmilch bei der Agglutinationsreaktion zu Tage. Die Vollmilchmethode muss als eine „Notbehelfmethode“ aufgefasst werden, die in gewissen Grenzen angewendet werden kann.

Das Eutersekret trockenstehender Kühe, das halb durchsichtig, mehr oder weniger opaleszierend, öl- oder honigartig ist, ist gewöhnlich genügend, oft sogar nicht weniger zur Bestimmung des Agglutinationswertes geeignet, wie das entsprechende Labserum, wenn das letztere überhaupt gewonnen werden kann.

Die Bestimmung des Agglutinationswertes der Magermilch bei der Bang-Infektion der Kühe.

Den Agglutinationswert der Magermilch kann man auf zweierlei Art bestimmen:

- a) durch Gewinnung von Milchserum aus der Magermilch und durch Bestimmung des Agglutinationswertes in demselben;
- b) durch unmittelbare Anwendung von Magermilch zu den Verdünnungen beim Agglutinationsversuche.

Letztere Methode ist anscheinend bis jetzt noch nicht angewendet worden, wenigstens habe ich in der Literatur keine Angaben darüber gefunden.

Bei der unmittelbaren Anwendung von Magermilch zur Bestimmung des Agglutinationswertes der Milch ergibt es sich, dass Magermilch für diesen Zweck viel besser geeignet ist als Vollmilch, weil bei der letzteren die Fettkügelchen der Milch störend wirken.

Bei der Ausführung des Agglutinationsversuches muss man statt des gewöhnlich gebrauchten Milchserums von derselben Magermilch nehmen und damit ebenso verfahren wie mit dem Labserum

der Milch. Wichtig ist es, dass die Magermilch frisch und rein gewonnen ist, wie bei der Vollmilch erwähnt wurde. Halbsaure oder stark verunreinigte Milch kann oft zur Folge haben, dass das Ergebnis der Agglutinationsreaktion nicht bestimmbar ist.

Die Resultate der Agglutinationsreaktion müssen nach dem Agglutinationsbodensatz makroskopisch abgelesen werden, wenigstens bei den niedrigeren Verdünnungen, weil die Opaleszenz nicht die Klarheit der Flüssigkeit zu beurteilen gestattet. Bei höheren Verdünnungen wird die Flüssigkeit in den Agglutinationsgläsern wasserklar — bei der durch Zentrifugieren erhaltenen Magermilch von einer Verdünnung von 1:40—80 an. In diesem Falle ist es möglich beim Ablesen der Reaktion den Grad der Klarheit der Flüssigkeit in den Agglutinationsgläsern in Betracht zu ziehen.

Um eine Übersicht über die Anwendbarkeit der Magermilch zur Agglutinationsprobe bei der Bang-Infektion zu gewinnen, habe ich gleichzeitig bei 60 Milchproben den Agglutinationswert des Labserums mit dem der betreffenden Magermilch verglichen. Die Magermilch habe ich meist durch Stehenlassen in kühlem Raum und Abpipettieren des Rahmes aus dem Reagenzglaschen gewonnen. Die erhaltenen Ergebnisse sind kurz folgenderweise zusammengefasst (Tabelle Nr. 2.).

Tabelle Nr. 2.

Agglutinationswert des Labserums	Zahl der Milchproben	Die Agglutinationswerte der Magermilch waren im Vergleich zu denen des betreffenden Labserums			
		übereinstimmend	abweichend		unbestimmt
			höher	niedriger	
n/2,5	16	11 (14)	—	—	2
n/5	2	—	—	—	2
n/10	4	2 (4)	—	—	—
1:2,5	1	1	—	—	—
1:5	1	1	—	—	—
1:10	5	5	—	—	—
1:20	1	1	—	—	—
1:20/40	4	3	1	—	—
1:40	8	5	2	1	—
1:40/80	1	—	1	—	—
1:80	10	8	—	2	—
1:160	3	3	—	—	—
1:200	2	2	—	—	—
1:320	2	2	—	—	—
Zusammen	60	44 (49)	4	3	4

Bei 2 Kühen wurden die Aggl.-werte des Labserums in Strichgemelken, die entsprechenden Magermilchaggl.-werte aber in der aus dem Einkuhgemelke durch Zentrifugieren erhaltenen Magermilch bestimmt. Deshalb entsprechen in der Tabelle den 60 Labserumproben 54 Magermilchproben, von denen 44 Proben übereinstimmende Ergebnisse mit den Labserumwerten haben, umgerechnet aber auf 60 Proben würden die Ergebnisse bei 49 Magermilchproben übereinstimmend sein.

Von 60 Milchproben haben 44 (49) — oder 73% (82%) nach beiden Methoden übereinstimmende Agglutinationsergebnisse gegeben. Bei 4 Milchproben (7%) waren die Ergebnisse unbestimmt, und bei 7 Milchproben (12%) abweichend, wobei der Magermilchtiter in 4 Fällen (bei 7%) höher und in 3 (bei 5%) Fällen niedriger war als derjenige des Labserums. Die abweichenden Agglutinationswerte waren nicht grösser als der nächstliegende höhere oder niedrigere Agglutinationswert des Labserums. Die Magermilchmethode gibt befriedigende Agglutinationsresultate bei hohen wie auch bei niedrigeren Verdünnungen. Die Ergebnisse der Reaktion sind hinreichend genau und deutlich ablesbar. Beim Vergleich der Agglutinationsreaktion bei Anwendung von Labserum und Magermilch zum Agglutinationsversuch kann man eine Verspätung im Auftreten des Agglutinationsbodensatzes um ca 24 Std. bei der Magermilch beobachten (Beobachtungen jede 24 Std.), was mehr bei niedrigeren Verdünnungen der Fall ist (bei 20% der Proben). Ausserdem ist bei der Anwendung von Magermilch zur Agglutinationsprobe bei niedrigeren Verdünnungen die Bestimmung der Reaktionsergebnisse etwas schwieriger und zuweilen weniger genau als bei Anwendung von Labserum, was bei 8% der Fälle (5 von 60) zu beobachten war.

Aus den angeführten Daten ist ersichtlich, dass die Magermilch mit gutem Erfolge zu der Agglutinationswertbestimmung angewendet werden kann. Besonders bei höheren Agglutinationswerten des Blutes ist kein Grund vorhanden diese Methode vom Gebrauch auszuschliessen. Man kann die Magermilchmethode bei reinem und frischem Probematerial sogar als die normale ansehen.

Die Bestimmung des Agglutinationswertes des Rahmes bei der Bang-Infektion der Kühe.

Diese Frage ist in der Literatur anscheinend noch nicht behandelt worden und tritt infolgedessen hier als ein neues Problem auf.

Die Bestimmung des Agglutinationstiters des Rahmes kann auf dreierlei Weise geschehen.

1) Man entfernt das Fett im Rahm und bestimmt den Agglutinationswert in der erhaltenen Magermilch nach einer der Methoden, die oben betreffs der Magermilch dargestellt sind.

2) Man Säuert den Rahm und filtriert ihn und bestimmt den Agglutinationswert im Serum. Diese Methode kann man anwenden, im Falle der Fettprozent des Rahmes nicht zu hoch ist (z. B. bei Kaffeesahne). Man erhält auf diese Weise ein genügend klares Serum, während bei einem hohen Fettgehalt das Serum beim Filtrieren oft nicht abgesondert wird.

3) Man bestimmt den Agglutinationswert nicht im Serum des Rahmes, sondern in einer Flüssigkeit, die durch Verdünnung des Rahmes mit physiologischer Kochsalzlösung erhalten wurde.

Nach der letzteren Methode wird folgendermassen verfahren:

a) Man nimmt mit einer Pipette den durch Stehen oder Zentrifugieren gewonnenen Rahm und verdünnt ihn durch Zufügen von physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis von 1:2,5; 1:5 oder 1:10. Es ist ratsam diese Grundverdünnung à 10 oder 20 ccm zu bereiten. Z. B. zur Herstellung einer Verdünnung von 1:2,5 nimmt man 6 resp. 12 ccm physiologischer NaCl-Lösung in ein Zentrifugiergläschen und fügt 4 resp. 8 ccm Rahm dazu. Die Emulsion ist stark durchzuschütteln und eine kurze Zeit bei 1000—3000 Umdrehungen in der Minute zu zentrifugieren. Nach ca 5—10 Min. erhält man eine opaleszierende Flüssigkeit, die mit einer Rahmschicht bedeckt ist. Das Zentrifugierglas vorsichtig neigend nimmt man mit der Pipette von der opaleszierenden Flüssigkeit so dass sie nicht mit Fettkügelchen verunreinigt wird und aus dieser Flüssigkeit bereitet man die weiteren Verdünnungen mittels physiologischer NaCl-Lösung in den Agglutinationsgläschen. Danach wird das Antigen zugefügt und weiter wie bei einem gewöhnlichen Agglutinationsversuch verfahren.

Nach dieser Methode habe ich die Agglutinationswerte des Rahmes bestimmt und die erhaltenen Ergebnisse mit denjenigen der Serummethode verglichen (Rahm und Labserum stammen von einer und derselben Milchprobe). Die erhaltenen Ergebnisse sind wie folgt kurz zusammengefasst. (Tabelle Nr. 3.)

Übereinstimmende Ergebnisse der Agglutinationsversuche nach der Rahmmethode und der üblichen Labserummethode wiesen von 60 Milchproben 41 — also 68% auf. Bei 10 Rahmproben (17%) war das Ergebnis als mehr oder weniger unbestimmt zu verzeichnen. Ganz sicher abweichend waren die Ergebnisse bei 9 Milch-

Tabelle Nr. 3.

Agglutinationswert des Labserums	Zahl der Milchproben	Die Agglutinationswerte des Rahmes waren im Vergleich zu denen des betreffenden Labserums			
		übereinstimmend	abweichend		unbestimmt
			höher	niedriger	
n/2,5	12	8	—	—	4
n/5	4	2	—	—	2
n/10	2	2	—	—	—
n/20	1	1	—	—	—
1:2,5	3	2	—	—	1
1:5	3	1	—	—	2
1:10	7	4	1	1	1
1:20	3	1	1	1	—
1:20/40	3	3	—	—	—
1:40	8	6	2	—	—
1:40/80	2	—	1	1	—
1:80	3	3	—	—	—
1:160	2	2	—	—	—
1:160/320	1	—	—	1	—
1:200	2	2	—	—	—
1:320	2	2	—	—	—
1:1280	2	2	—	—	—
Zusammen	60	41	5	4	10

proben, wobei die Rahmmethode bei 5 Rahmproben (bei 8%) höhere und bei 4 Rahmproben (bei 7%) niedrigere Agglutinationswerte ergab als bei Labserum. Die grössten Abweichungen waren nicht mehr als der nächsthöhere oder nächstniedrigere Agglutinationstiter des Labserums.

Wenn man den Verlauf der Agglutinationsreaktion beim Rahm und Labserum vergleicht, so kann man beim Rahm eine Verzögerung des Eintretens des Agglutinationsphänomens bei 17% der Fälle bei Verdünnungen von 1:2,5 bis 1:80 bemerken. Bei niedrigeren Verdünnungen (1:2,5—10) war das Ablesen des Agglutinationstiters bei 8% der Fälle weniger genau möglich. Die Verdünnungen des Rahmes sind opaleszierend und deswegen kann man die Agglutinationsreaktion bei niedrigeren Verdünnungen nur nach dem Agglutinationsbodensatze bestimmen. Ungefähr von der Verdünnung 1:160 an und darüber kann man auch die Klarheit der Flüssigkeit in den Aggl.-gläschen in Betracht ziehen. Ungefähr von der Verdünnung 1:1280 an sind die Verdünnungen des Rahmes wasserklar.

Obengenannte Tatsachen erweisen, dass der Agglutinations-titer des Rahmes oft schwerer zu bestimmen ist, als derjenige des Labserums der betreffenden Milchprobe. Doch bereitet das Bestimmen der Reaktion bei gewisser Übung keine Schwierigkeiten und sogar eine negative Reaktion bei einer Verdünnung von 1:2,5 ist leicht ablesbar.

b) Um die Verfolgung der Agglutinationsreaktion des Rahmes zu erleichtern, ist es möglich die wasserklaren Verdünnungen des Rahmes anzuwenden, welche aus der Anfangsverdünnung des Rahmes durch Ausfällen des Kaseins durch Lab, Essigsäure oder Milchsäuregärung gewonnen werden können. Auf andere Weise habe ich nicht versucht eine klare Rahmverdünnung zu erhalten.

Anbei bringe ich zum Vergleich einige Agglutinationsergebnisse der klaren Rahmverdünnungen und des Labserums der Milch.

14. VIII 34. Milchprobe D 724 II. Zu 3 ccm der zentrifugierten 1:5 Verdünnung des Rahmes wurde 0,01 ccm Acid. acet. glac. zugefügt. Die gewonnene klare Rahmserumverdünnung sowie das Labserum der betreffenden Milchprobe hatten einen Agglutinationswert von 1:160.

14. VIII 34. Milchprobe D 708 I. Zu 2 ccm der zentrifugierten 1:5 Verdünnung des Rahmes wurde 0,01 ccm. Acid. acet. glac. zugefügt. Die gewonnene klare Rahmserumverdünnung hatte einen Agglutinationswert von 1:10, derjenige des Labserums der betreffenden Milchprobe war bei der Verdünnung von 1:20 unbestimmt.

14. VIII 34. Milchprobe D 724 II. Die zentrifugierte Rahmverdünnung (1:5) wurde mit Lab geklärt. Der Agglutinationswert der gewonnenen Flüssigkeit war 1:160, also wie bei dem Labserum der betreffenden Milchprobe.

Auch durch Milchsäuregärung ist es mir gelungen aus der Rahmverdünnung eine klare Flüssigkeit, die zur Agglutinationsreaktion brauchbar war, zu gewinnen.

Die Bestimmung des Agglutinationswertes in durch Essigsäure gewonnenem Milchserum bei der Bang-Infektion der Kühe.

H. Reeser (1922) meint, dass das Labserum der Milch besser sei als das durch die Essigsäure gewonnene Serum, weil das letztere sogar nach der Neutralisation weniger gute Ergebnisse gegeben hat, als das Labserum. Karsten (1931) nimmt an, dass man durch Zufügen von 10—20% Essigsäure zur Milch im Verhältnis von

1:25 ein brauchbares Milchserum für die Agglutinationsreaktion erhält. M. Klimmer (1932) ist der Ansicht, dass das durch die Essigsäure gewonnene saure Milchserum zur Agglutinationsreaktion anscheinend ebenso gut ist, wie das Labserum.

Die Meinungen der 2 letztgenannten Forscher werden durch meine Untersuchungen bestätigt.

Ich habe die Ergebnisse der Agglutinationsreaktion des Labserums und des durch die Essigsäure gewonnenen Serums verglichen. Die erhaltenen Ergebnisse sind folgende: (Tabelle Nr. 4.)

Tabelle Nr. 4.

Agglutinationswert des Labserums	Zahl der Milchproben	Die Agglutinationswerte des Essigsäureserums waren im Vergleich zu denen des betreffenden Labserums			
		übereinstimmend	abweichend		unbestimmt
			höher	niedriger	
n/2,5	18	16	—	—	2
—/2,5	7	7 (4)	—	—	—
n/5	1	1	—	—	—
1:2,5	3	1	—	—	2
1:5	3	2	1	—	—
1:10	6	6	—	—	—
1:20	1	1	—	—	—
1:40	4	4	—	—	—
1:40/80	1	1	—	—	—
1:80	3	3	—	—	—
1:160	6	6	—	—	—
1:200	2	2	—	—	—
1:320	3	3	—	—	—
1:400	2	1	—	1	—
Zusammen	60	54 (51)	1	1	4

(—/2,5 bedeutet eine nicht sicher negative Reaktion bei der Verdünnung 1:2,5).

Die Technik der Gewinnung des Milchserums mittels der Essigsäure war folgende. Ein Teil der Essigsäuremilchserumproben wurde auf die Weise gewonnen, dass zu 10 ccm Magermilch, die meist durch stehen der Vollmilch und durch Entfernen des Rahmes mit einer Pipette erhalten wurde, 0,2—0,3—0,4 ccm verdünnte Essigsäure zugefügt wurde, bis das Kasein koaguliert war. Bei den übrigen Proben wurden zu je 5 ccm Magermilch 0,01—0,05 und zu 5 ccm Milch einer beinahe trockenstehenden Kuh sogar 0,3 ccm, Acet. ac. glac. hinzugefügt. Danach wurden die Proben tüchtig durchgeschüttelt und die geronnene Milch durch ein Papierfilter filtriert. Meist wurde mit 5 ccm Milch gearbeitet, weil dann ein Papierfilter den Trichter genügend ersetzte.

Auch aus Vollmilch versuchte ich durch Essigsäure Milchserum zu gewinnen, doch war letzteres nicht so klar wie das aus der Magermilch gewonnene. Um ein klares Serum zu erhalten, musste es stehen, was aber Zeit erforderte.

Gewöhnlich habe ich das durch Hinzufügen von Essigsäure und Filtrieren erhaltene Milchserum gleich zum Füllen der Agglutinationsgläschen benutzt. In einzelnen Fällen stand das Serum vorher in einem kühlen Raum, wonach es gewöhnlich klarer wurde. Durch Essigsäure war es sehr schwer gleich ein so klares Milchserum zu gewinnen, wie es bei Labserum gewöhnlich der Fall ist. Klares Essigsäureserum erhält man, wenn man zentrifugierte Magermilch anwendet, oder das Serum nach dem Filtrieren in einem kühlen Raume stehen lässt.

Aus halbsaurer Milch habe ich durch Essigsäure ein sehr klares Serum erhalten.

Von den 60 Milchproben, bei denen die Agglutinationswerte nach der üblichen Labserummethode und zum Vergleich auch nach der Essigsäureserummethode bestimmt wurden, waren die Ergebnisse der Agglutination übereinstimmend bei 51 Milchproben (85%) resp. bei 54 Milchproben (90%). 3 Milchproben hatten bei der Verdünnung 1:2,5 bestimmt negative Agglutination bei dem Essigsäureserum und unbestimmt beim Labserum. Sicher abweichend waren nur 2 Proben (3%), 4 Proben (7%) aber waren mehr oder weniger unbestimmt. Bei der Essigsäureserummethode waren höhere Agglutinationswerte wie bei der Labserummethode bei 1 Probe (1,5%) und niedrigere Agglutinationswerte bei 1 Probe (1,5%) zu verzeichnen.

Man kann sagen, dass die Labserum- und Essigsäureserummethode beinahe gleiche Ergebnisse geben. Die Flüssigkeit in den Agglutinationsgläschen über dem Agglutinationsbodensatz ist oft bei der Essigsäureserummethode klarer und die Reaktion vollzieht sich auch zuweilen schneller als bei der Labserummethode.

Die Bestimmung des Agglutinationswertes im durch Milchsäuregärung gewonnenen Milchserum bei der Bang-Infektion der Kühe.

Seddon hat Milchserum durch Hinzufügen von Milchsäure zu den Milchproben gewonnen. Karsten (1931) sagt, dass das durch die Milchsäuregärung gewonnene Milchserum zur Bestim-

mung des Agglutinationswertes der Milch anwendbar sei. Die Frage selbst ist wichtig, wenn es nötig ist den Milchagglutinationswert bei der Bang-Infektion bei saurer Milch zu bestimmen. Zur Erforschung dieser Frage habe ich mit 60 Milchproben parallele Agglutinationswertbestimmungen mit Labserum und mit durch Milchsäuregärung gewonnenem Milschserum vorgenommen. (Tabelle Nr. 5.)

Tabelle Nr. 5.

Agglutinationswert des Labserums	Zahl der Milchproben	Die Agglutinationswerte des Essigsäureserums waren im Vergleich zu denen des betreffenden Labserums			
		übereinstimmend	abweichend		unbestimmt
			höher	niedriger	
n/2,5	16	15	—	—	1
-/2,5	3	2	—	—	1
n/5	4	4	—	—	—
n/10	4	3	—	—	1
1:2,5	4	2	2	—	—
1:5	3	2	1	—	—
1:10	8	7	—	1	—
1:20	2	2	—	—	—
1:40	7	6	1	—	—
1:40/80	1	—	1	—	—
1:80	3	2	—	1	—
1:160	2	2	—	—	—
1:160/320	1	1	—	—	—
1:200	2	2	—	—	—
Zusammen	60	50	5	2	3

In einzelnen Fällen wurden Milchsera von spontan saurer Milch verwendet. Meist wurde die Milchsäuregärung künstlich hervorgerufen. Dazu wurden zu ca 10 ccm Vollmilch oder 5—10 ccm Magermilch mit einer Pipette 1—2 gtt saure Milch hinzugefügt. Die letztere wurde durch Reinkultur der *Str. lactis* (aus dem Milchwirtschaftl. Kabinett der Universität u. aus der Tallinnschen Kontrollstation für Exportbutter) gewonnen. Zum Schluss habe ich auch saure Milch aus den Tartuer Milchläden dazu benutzt.

Nach Hinzufügen der sauren Milch wurden die Milchproben durchgeschüttelt und standen dann 1—2 Tage bei Zimmertemperatur, bis die Milch sauer wurde. Das Serum wurde danach mit dem Papierfilter abfiltriert und meist gleich zu den Agglutinationsversuchen angewendet oder erst in einem kühlen Raum stehen gelassen.

Das durch Milchsäuregärung gewonnene Milchserum ist ziemlich klar, oft klarer als das durch Essigsäure gewonnene Milchserum, besonders wenn letzteres vorher nicht gestanden hat oder nicht aus fettarmer Magermilch gewonnen wurde.

Bei den 60 Milchproben, bei denen ich den Agglutinationswert in durch Milchsäuregärung gewonnenem Milchserum und zum Vergleich auch in Labserum bestimmt habe, waren die Ergebnisse der beiden Methoden in 50 Fällen (83%) übereinstimmend. Bei 5 Milchproben (8%) waren im Milchsäuregärungsserum höhere und bei 2 Milchproben (3%) niedrigere Agglutinationswerte zu beobachten, wie beim Labserum. Die abweichenden Agglutinationswerte waren nicht grösser als der nächstliegende höhere oder niedrigere Agglutinationswert des Labserums. In 3 Fällen (5%) waren die Agglutinationsergebnisse des Gärungsserums mehr oder weniger unbestimmt, so dass man sie nicht sicher zu den übereinstimmenden oder abweichenden Ergebnissen zählen konnte. In 2 Fällen (3%) waren umgekehrt die Labserumergebnisse unbestimmt.

Die Agglutinationsgläserchen mit positiver Reaktion erwiesen in 7 Fällen (bei 12%) bei den Gärungssera eine klarere Flüssigkeit über dem Sediment auf, und in 2 Fällen (bei 3%) war eine Verzögerung der Agglutinationsreaktion bei den Verdünnungen von 1:5 und 1:10 zu verzeichnen.

Im allgemeinen ist das durch die Milchsäuregärung erhaltene Milchserum genügend brauchbar zur Bestimmung des Agglutinationswertes der Milch.

Vergleich der Ergebnisse der bisher untersuchten Methoden zur Bestimmung des Agglutinationstiters.

Reihenfolge	Die mit Labserum verglichenen Milchprodukte und Sera	Die Agglutinationswerte derselben verglichen mit denjenigen des Labserums			
		übereinstimmend	abweichend		unbestimmt
			höher	niedriger	
1	Vollmilch	57 %	7 %	8 %	28 %
2	Rahm	68 %	8 %	7 %	17 %
3	Magermilch	82 %	6,5 %	5 %	6,5 %
4	Milchsäuregärungsserum	83 %	8,3 %	3,3 %	5 %
5	Essigsäureserum	85 % (90 %)	1,5 %	1,5 %	12 %

Die übereinstimmenden Ergebnisse bei Essigsäure-, Gärungsmilchserum und Magermilch sind beinah gleich. Die meisten Abweichungen sind beim Rahm und besonders bei der Vollmilch zu verzeichnen.

Wenn man die obenerwähnten Milchagglutinationsergebnisse betrachtet, so kann man folgendes konstatieren.

Die Verwendung von Vollmilch zur Agglutinationsreaktion kann ohne Vorbereitung und Zeitverlust geschehen.

Die Verwendung von Magermilch zu diesem Zweck kann ebenso ohne Zeit- und Arbeitsaufwand vollzogen werden. Wenn aber die Magermilch aus der Vollmilch gewonnen werden muss, so erfordert die Entfernung des Rahmes mit der Pipette oder auf andere Weise einen gewissen Arbeitsaufwand. Wichtiger dabei ist aber der Zeitverlust durch das Aufsteigen des Rahmes. Wenn das Füllen der Agglutinationsgläschen aus anderen Gründen nicht gleich geschieht, so kann man (in diesem Fall) den Zeitverlust nicht in Betracht ziehen. Beim Zentrifugieren der Vollmilch verliert man an Arbeit und gewinnt an Zeit.

Die Bestimmung des Agglutinationswertes des Rahmes nach einer Milchserummethode erfordert Arbeit und Zeit: zur Gewinnung der Magermilch aus dem Rahm oder zur Bereitung einer Rahmverdünnung und Zentrifugieren derselben und schliesslich zur Gewinnung des Serums aus Magermilch oder Rahm, oder Bereitung einer klaren Verdünnung aus der Rahmverdünnung. Am einfachsten ist es aus Rahm durch Milchsäuregärung ein Serum zu gewinnen. Dieses ist möglich, wenn Rahm in genügendem Quantum vorhanden und er nicht zu fetthaltig ist (z. B. Kaffeesahne). Will man den Agglutinationswert des Rahmes nach der Rahmverdünnungsmethode bestimmen, so genügen ca 20 Min. zur Bereitung der Verdünnung, ihrem Zentrifugieren und zur Füllung der Agglutinationsgläschen. Diese Methode ermöglicht in kurzer Zeit die Agglutinationsgläschen zu füllen, und ist bei einer geringen Menge von Probenmaterial die einzige Möglichkeit zur Bestimmung des Agglutinationswertes des Rahmes. — Die Gewinnung einer klaren Rahms Serumverdünnung erfordert Zeit und Arbeitsaufwand, diese Methode aber ermöglicht ein deutlicheres und genaueres Ablesen des Resultates in kürzerer Zeit, als die vorhererwähnte.

Die Verwendung von Vollmilch, Rahm und zuweilen auch Magermilch zur Agglutinationsreaktion erschwert die Verfolgung der Reaktion in Grenzen niederer Verdünnungen und verlangsamt oft in denselben Grenzen der Verdünnung das Erscheinen des Agglutinationsphänomens. Deshalb muss man diese Methoden mehr oder weniger als Notbehelf ansehen und nach Möglichkeit den Agglutinationswert in klarem Milchserum bestimmen. Die Klarheit des Serums bedingt ein leichteres Hervortreten des Agglutinationsphänomens und schützt bei der Bestimmung des Agglutinationswertes beträchtlich vor Fehlern.

Die Serummethode verlangen mehr Zeit-, Arbeit und Geräte. Wenn man bei der Gewinnung des Labserums aus Vollmilch ausgeht, so ist es wünschenswert den Rahm auf irgendeine Weise zu beseitigen; danach ist es nötig der Milchprobe etwas Lab und einige gtt konz.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung hinzuzufügen und die Milchproben in warmes Wasser, oder auf einige Stunden bei  $37^\circ$  in den Brutschrank zu stellen. Zum Schluss ist es zuweilen noch erforderlich das Serum zu filtrieren. Ist die Milchprobe frisch, so kann man gutes Labserum ohne Entfernen des Rahmes gewinnen.

Die Gewinnung des Milchserums mittels Essigsäure verlangt Entrahmen der Milch, Hinzufügen von Essigsäure und Filtrieren — ist also weniger zeitraubend als die Labmethode. Essigsäureserum kann man aus Magermilch in einigen Minuten gewinnen, doch ist das Serum gleich nach dem Filtrieren meist weniger klar als das Labserum. Nach einem Stehen von  $\frac{1}{4}$ —1 Tag klärt sich das Essigsäureserum merkbar.

Bei der Sauermilch ist die Anwendung des Gärungsmilchserums zur Bestimmung des Agglutinationswertes selbstverständlich. Will man absichtlich ein Gärungsmilchserum verwenden, so muss man zum Hervorrufen der Säuerung etwas saure Milch zu der Milchprobe hinzufügen. Es ist wünschenswert die Vollmilch zuerst zu entrahmen, doch kann das auch vor dem Filtrieren geschehen. Im Notfall kann man die saure Milch auch samt dem Rahm filtrieren, da bei der sauren Milch die Fetteilchen beim Filtrieren nicht leicht ins Serum übergehen. In Ausnahmefällen kommt man ohne Filtrieren aus, wenn klares Milchserum sich in genügender Menge absondert hat. Also ist die Gewinnung von Gärungsserum verhältnismässig einfach, und das Serum ist nach dem Filtrieren meist klarer, als das Essigsäureserum gleich nach dem Filtrieren. Eine negative Eigenschaft der Methode ist, dass sie 1—2 Tage beansprucht.

Essigsäure- und Gärungssera sind oft längere Zeit klar haltbar, was beim Labserum oft nicht der Fall ist. Es hängt von den Verhältnissen und Eigenschaften der Milch ab, welche Methode die geeignetste zur Bestimmung des Agglutinationswertes der Milch ist.

### Z u s a m m e n f a s s u n g.

1) Vollmilch kann zur Bestimmung des Milchagglutinationstiter bei Brucellosis der Kühe angewendet werden. Bei niedrigen Verdünnungen (1:2,5 — 1:20) ist die Verfolgung der Agglutinationsreaktion erschwert. Ungefähr von der Verdünnung 1:40 an bereitet die Bestimmung der Reaktion keine Schwierigkeiten mehr, doch geschieht sie hauptsächlich vermittelt des Sedimentes. Ungefähr von einer Verdünnung von 1:160 an, ist die Beurteilung der Ergebnisse fast ebenso leicht, wie beim Milchserum (Beim Ablesen der Reaktion die Agglutinationsgläser nicht schütteln). Im Bereich niedrigerer Verdünnungen tritt bei der Anwendung von Vollmilch oft eine Verzögerung des Erscheinens des Agglutinationsphänomens ein.

2) Magermilch kann zur Bestimmung des Milchagglutinationstiter angewendet werden. Dabei muss die Bestimmung der Agglutinationsreaktion bei niedrigen Verdünnungen nach dem Agglutinationsbodensatz vollzogen werden, da die Flüssigkeit opaleszierend ist. Angefangen von der Verdünnung 1:40/80 kann auch die Klarheit der Flüssigkeit in Betracht gezogen werden.

3) Der Agglutinationstiter des Rahmes kann bestimmt werden:

a) durch Separieren der Magermilch vom Rahm und durch die Bestimmung des Agglutinationstiter in ersterer — nach beliebiger Methode;

b) durch Säuerung des Rahmes und Bestimmung des Agglutinationstiter in dem gewonnenen Milchserum;

c) indem man den Rahm mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, die Fettteile durch Zentrifugieren oder Stehenlassen aus der Verdünnung entfernt und den Agglutinationstiter unmittelbar in der gewonnenen fettfreien Verdünnung oder nach der Gewinnung aus derselben einer klaren Flüssigkeit durch Lab, Essigsäure, oder Milchsäuregärung bestimmt.

4) Die Bestimmung des Agglutinationswertes der Milch müsste gewöhnlich im Milchserum geschehen. Der unmittelbare Gebrauch von Vollmilch oder Rahm zu diesem Zwecke kann in gewissen Fällen

zweckmässig sein. Frische Magermilch kann mit guter zur Bestimmung des Agglutinationstiters der Milch verwendet werden. Doch eine sicherere Reaktion bei niedrigen Verdünnungen ergeben meist die Milchsera.

5) Labserum ist gewöhnlich das beste Milchserum für die Bestimmung des Agglutinationswertes.

6) Durch Milchsäuregärung gewonnenes Milchserum ist zur Bestimmung des Milchagglutinationswertes tauglich.

7) Durch Essigsäure gewonnenes Milchserum ist zur Bestimmung des Milchagglutinationswertes tauglich.

8) Zur Bestimmung des Milchagglutinationstiters kann zuweilen durch Milchsäuregärung, zuweilen aber durch Essigsäure gewonnenes Milchserum geeigneter als Labserum erscheinen, und wenn eine dieser Methoden keine befriedigenden Resultate ergibt, ist es ratsam die anderen zu versuchen.

Äratriikk: „Eesti Loomaarstlik Ringvaade“ XI aastakäik, 2. vihk, 1935.  
Sonderabdruck aus: „Estnische Tierärztliche Rundschau“ XI. Jg., 2. Heft, 1935.