



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

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

E. Vellisto.

In der Literatur sind eine Menge von Fragen bezüglich der Milchagglutination bei der Bang-Infektion der Kühe behandelt worden. Viele Probleme sind durch entsprechende Versuche und Beobachtungen gelöst worden. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sind nicht immer übereinstimmend gewesen. Deswegen sind in solchen Fällen noch ergänzende Arbeiten notwendig. Da die Frage noch verhältnismässig neu ist, so ist natürlicherweise eine Anzahl von Problemen überhaupt noch nicht berührt worden.

Vorliegende Arbeit behandelt teils neue Probleme, teils schon von anderen Autoren untersuchte Fragen, deren Prüfung aus verschiedenen Gründen notwendig erschien.

Technik.

Die Technik der vorliegenden Arbeit habe ich versucht den Forderungen der massenweisen Milchagglutinationsprüfungen anzupassen.

Die Entnahme der Milchproben. Für die Proben habe ich meist à 10—15 ccm. Milch in gewöhnliche Reagenzgläschen entnommen. Die Gläschen wurden mit einem Wattepfropfen verschlos-

sen und gleich nach der Probenentnahme dem Laboratorium zugeführt.

Wenn es nötig war für den Meerschweinchenversuch oder die Plattenkultur eine grössere Milchprobe — etwa 30—60 ccm — zu entnehmen, so benutzte ich dazu Flaschen. Im letzteren Falle versuchte ich die Milchproben möglichst steril zu gewinnen, wobei doch nur das Wichtigste berücksichtigt wurde: dazu wurden die Zitzen, besonders ihre unteren Enden am Schlusse des Melkaktes mit 70° Alkohol abgerieben, ebenso die Hand des Melkers. Gemolken wurde mit der Faust wobei die Flasche schief und nahe der Strichkanalöffnung gehalten wurde, damit die Milch in der Luft nicht verunreinigt werde.

Die Aufbewahrung der Milchproben. Im Falle eine Milchprobe nicht gleich zur Agglutinationsreaktion gebraucht werden konnte, habe ich sie in der kalten Jahreszeit in einem ungeheizten kühlen Raum aufbewahrt. In wärmerer Jahreszeit stellte ich die Milchproben in kaltes Wasser.

Konservierung der Milchproben durch Karbolsäure, Borsäure und Formalin wandte ich nur in einzelnen Fällen an.

Entrahmung der Milchproben. Falls die Milchproben bald nach dem Melken zum Laben verwendet wurden, so geschah das ohne Entrahmung, man erhielt dabei meist ein genügend klares und brauchbares Milchserum. Hatten die Milchproben aber vorher gestanden, so wurden sie entrahmt. Zu diesem Zweck entfernte ich von den $\frac{1}{4}$ —1 Tag gestandenen Milchproben den Rahm mit einer Pipette. Zentrifugiert habe ich eine Milchprobe nur dann, wenn sie auch für den Meerschweinchenversuch oder die Plattenkultur verwendet werden sollte. In solchen Fällen wurde die durchs Zentrifugieren erhaltene Magermilch zum Laben gebraucht. Gewöhnlich habe ich vom Zentrifugieren der Milchproben Abstand genommen, weil es bei einer grösseren Anzahl von Milchproben sehr umständlich und zeitraubend ist.

Das Entrahmen der Milchproben begünstigt die Gewinnung von klarem Milchserum.

Gewinnung des Milchserums. Der Voll- oder Magermilch fügte ich im Reagenzgläschen etwas Labpulver (Firma Glad, Kopenhagen) hinzu, schüttelte den Inhalt tüchtig durch, damit auf dem Boden des Reagenzgläschens keine Milch ungelabt bliebe und stellte die Milchproben danach auf einige Stunden in den Brutschrank (37° C). Nachdem sich das Milchserum in genügender Menge abgesondert hatte, wurden die Reagenzgläschen aus dem Brutschrank entfernt (meist nach $1\frac{1}{2}$ —3 Stunden). Nur in einzelnen Fällen blieben die Milchproben die Nacht über — bis 14 Stunden — im Brutschrank stehen. Danach wurden die gelabten Milchproben sogleich zum Agglutinationsversuch verwendet, oder — im entgegengesetzten Fall — in einem kühlen Raum aufbewahrt.

Das Milchserum wurde meist unfiltriert zum Agglutinationsversuch benutzt. Es wurde mit einer Pipette vorsichtig neben dem Kasein-gerinnsel aus dem Reagenzgläschen entnommen. Im Falle das Serum Flocken enthielt, habe ich es oft sogar wiederholt durch ein Papier-

filter filtriert. Wenn die Trübung des Serums von den Fettkügelchen der Milch herrührte, so nützte das Filtrieren nichts, sondern es musste $\frac{1}{2}$ Tag oder länger stehen.

Ausführung der Untersuchung. In den vorliegenden Untersuchungen habe ich die Agglutinationsversuche nach Zeller's Methode durchgeführt. Ich habe eine Reihe von Verdünnungen von à 1 ccm des Serums der betreffenden Milchproben mit physiologischer NaCl-Lösung bereitet. Jedem Agglutinationsgläschen habe ich 1 gtt Antigen hinzugefügt.

Das Antigen habe ich im allgemeinen nach Klimmer's Richtlinien (B. T. W. 1932, S. 87) angefertigt und habe es im frischen Zustande oder konserviert mit Formalin (0,2%) oder Karbolsäure (0,5%) gebraucht.

Zum Agglutinationsversuch wurden meist die Verdünnungen von 1: 2,5; 1: 5, 1: 10, 1: 20 usw. verwendet.

Nach der Zugabe von Antigen habe ich die Agglutinationsgläschen geschüttelt und auf 3—4 Stunden in den Brutschrank bei 37° C gestellt, in einzelnen Fällen auch auf 2—24 Stunden. Danach wurden die Agglutinationsgläschen aus dem Brutschrank entfernt und in einen kühlen Raum gebracht.

Die Agglutinationsreaktion habe ich 24 Stunden nach dem Füllen der Agglutinationsgläschen bestimmt, und nach 48 Stunden, meist auch noch nach 72 Stunden die Ergebnisse kontrolliert. Das Ergebnis habe ich als positiv angesehen, wenn das Antigen im betreffenden Agglutinationsgläschen 80—100% verklumpt war, was ich hauptsächlich makroskopisch bestimmt habe. Nur ausnahmsweise wurden ein Agglutinoskop oder eine Lupe zur Hilfe genommen.

I. Sind in der Milch Normalagglutinine vorhanden?

Wenn es nötig ist zu bestimmen, ob eine Milchprobe von einem mit Abortus-Bang-Bakterien infizierten, oder infektionsfreien Euter stammt, so ist zu diesem Zweck die Agglutinationsreaktion eine der geeignetesten Methoden. Bei der Anwendung der letzteren Methode ist es oft von grosser Wichtigkeit, von welcher Verdünnung an eine Milchagglutination für positiv zu halten ist. Von diesem Grenztiter hängt es ab, ob im gegebenen Fall eine Milchprobe aus einem hinsichtlich der Bang-Infektion „gesunden“ oder „kranken“ Euter stammt.

Als Grenzwerte der positiven Milchserumagglutination haben verschiedene Forscher verschiedene Verdünnungen angenommen:

Reinhardt und Gauss	1:20 (1914/15)
M. Winkler	1:10 (1920)
Zeller	1:40 (1923)
Laja	1:20 (1928)
Pröscholdt	1:10 (1932)
Norton u. Pless	1:25 (nach Klimmer)
Klimmer	1:25 (1932)
Karsten	1:10 (1932)
Direktoren der bakteriolog. Institute der preussischen Landw.-Kammer	1:10 (1933)

Um zu zeigen, wie gross die normalerweise in der Milch vorhandene Menge der Agglutinine bei Kühen ist, die serologisch als banginfektionsfrei aufzufassen sind, habe ich 532 Milchproben von 140 Kühen auf ihren Gehalt an Bang-Agglutininen untersucht.

In der Tabelle Nr. 1 sind die Milchserumagglutinationstiter in Abhängigkeit von den Blutserumagglutinationstitern angeführt. Weiter sind in der Tabelle angegeben die Wirtschaften (A, B, C, D), von welchen die Milchproben stammen, das Datum der Entnahme der Milchproben und die Zahl der Milchproben, die nach dem Blutwert angeordnet sind. Alle Milchproben waren Viertelgemelkproben. Bei der Labserumagglutination der Milch habe ich mit einer Verdünnung von 1:2,5 begonnen und das negative Agglutinationsergebnis (neg.) in der Tabelle bedeutet eine negative Reaktion bei der Verdünnung von 1:2,5 und darüber. Ein positives Ergebnis (pos.) bedeutet eine positive Reaktion bei der Verdünnung von 1:2,5 und oft auch noch darüber. Als „unbestimmte“ Ergebnisse sind diejenigen Reaktionen verzeichnet, die wohl negativ sein müssten, bei denen jedoch bei der Verdünnung von 1:2,5 dieses Ergebnis nicht deutlich genug zu bestimmen war. In 7 Fällen war dieselbe Erscheinung auch bei der Verdünnung von 1:5 und in einem Falle bei der Verdünnung von 1:10 zu bemerken.

Aus der Tabelle Nr. 2 ist aus einer anderen Gruppierung derselben Daten ersichtlich, wieviele Kühe mit wievielen Strichgemelken folgendes aufwiesen:

- 1) in allen Viertelgemelken eine negative Milchserumagglutination bei der Verdünnung von 1:2,5;
- 2) in einem Teil der Viertelgemelke eine negative, in dem ande-

Tabelle Nr. 2.

Die Agglutination des Labserums der Milch bei der Bang-Infektion.

Wirtschaft. Datum der Probeent- nahme	Bei allen Viertelge- melken ei- ner Kuh ei- ne negati- ve Aggluti- nation		In einem Teil der Vier- telgemelke der Kuh eine neg. im anderen eine positive Agglutination				In allen Viertelge- melken der Kuh eine positive Agglutina- tion		Unbestimmt negative Milchaggl. bei einer Verdünnung von 1:2,5	
	Zahl der		Zahl der				Zahl der		Zahl der	
	Kühe	Vier- telge- melke	Kühe	Viertelgemelke			Kühe	Vier- telge- melke	Kühe	Vier- telge- melke
pos.				?	neg.					
B. 20. V 33	11	44	1	1	—	3	—	—	—	—
C. XI 33	29	111	1	2	—	2	1	4	5	10
B. 5. XII 33	4	15	—	—	—	—	—	—	—	—
A. 9. XII 33	6	24	1	2	2	—	—	—	1	2
D. 18. XII 33	4	16	—	—	—	—	—	—	—	—
C. I 34	8	32	—	—	—	—	—	—	2	6
D. I 34	24	76	2	5	1	2	—	—	2	2
A. 1. II 34	46	182	2	5	—	3	—	—	12	29
Zusammen	132	500	7	15	3	10	1	4	22	49

ren eine positive Milchserumagglutination bei der Verdünnung von 1:2,5.

3) in allen Viertelgemelken eine positive Milchserumagglutination bei der Verdünnung von 1:2,5;

4) eine unbestimmt negative Reaktion bei der Verdünnung von 1:2,5.

Leider war es mir nicht möglich die als unbestimmt verzeichneten Ergebnisse experimentell zu kontrollieren. Ihre Zahl beträgt von 500 Milchproben 49 also ca 10%. Jedoch eine negative Reaktion bei der Verdünnung von 1:5 der betreffenden Milchproben lässt darauf schliessen, dass auch bei der Verdünnung 1:2,5 die Agglutination negativ sein dürfte.

Nach der Tabelle Nr. 2 ergibt sich über die Kühe mit positiver Milchserumagglutination folgendes:

der Blutwert von 1 Kuh mit 4 Strichgemelken beträgt 1:160 und der Blutwert von 7 Kühen mit 15 Strichgemelken beträgt 1:80. Somit gehören diese Kühe zu der Gruppe, die auf irgend eine Weise Bang-Bakterien ausscheiden können. Deswegen müssen diese Kühe als infiziert betrachtet werden und müssen aus unseren weiteren Betrachtungen ausgeschlossen werden. Auf Grund der Tabelle Nr. 2 bleiben 132 Kühe mit 500 Strichgemelkproben nach. Sie alle haben bei einer Verdünnung von 1:2,5 und darüber eine negative Milchserumagglutination und der Agglutinationstiter ihres Blutserums reicht bis 1:40. Aus dieser Tatsache muss man folgern, dass in der Milch, die aus einem banginfektionsfreien Euter stammt, keine Normalagglutinine in solcher Quantität vorhanden sind, dass sie in einer Verdünnung von 1:2,5 eine positive Milchserumagglutination verursachen würden. Wahrscheinlich ist es, dass auch das unverdünnte Milchserum in solchen Fällen gewöhnlich nicht die Eigenschaft besitzt das Agglutinationsphänomen hervorzurufen.

Alle in der Tabelle Nr. 1 und Nr. 2 erwähnten Milchproben stammen von Kühen, die normal milchend waren, sich in der Mitte der Laktationsperiode befanden und eine normale Marktmilch lieferten. Ergebnisse der Agglutinationsversuche mit Kolostralmilch und mit der Milch trockenstehender Kühe sind in den Tabellen nicht angeführt.

Auf Grund der Ergebnisse der Tabellen Nr. 1 und Nr. 2 kann man folgendes konstatieren:

1) Eine Verdünnung von 1:2,5 (also beinahe $\bar{a}\bar{a}$) des Milchserums gibt bei einer banginfektionsfreien Kuh bei der hier angewendeten Agglutinationstechnik ein negatives Agglutinationsergebnis.

2) Somit muss jede spezifische Agglutinationserscheinung bei Versuchen mit Milchserum darauf hinweisen, dass die betreffende Milchprobe nicht dem Produkte eines sicher banginfektionsfreien Euters zuzuschreiben ist — unabhängig von der Höhe des Agglutinationstiters des Milchserums.

Eine Ausnahme dieses Gesetzes bilden das Kolostrum und das Eutersekret der trockenstehenden Kühe.

Die oben angeführten Schlussfolgerungen sind auf Grund der Ergebnisse der Milchserumagglutination von Einzelstrichproben gemacht. Desto mehr sind sie in folgedessen für die Gesamtmilch einer Kuh und für die Mischmilch mehrerer Kühe oder einer ganzen Herde geltend, wenn der Milch kein Kolostrum oder keine Milch trockenstehender Kühe zugemengt ist.

Nähme man bei der Milchserumagglutination als positiven Grenzwert bei der Bang-Infektion die Verdünnungen 1:10, 1:20 und darüber an, so wäre es oft nicht möglich die Agglutinine in dem Gesamtgemelke einer Kuh festzustellen. Noch schwerer würde man sie finden können, wenn der Milch vieler gesunder Kühe die einer banginfizierten Kuh zugemengt wäre — besonders dann, wenn letztere einen niedrigen Agglutinationstiter hat. Somit ist es wünschenswert bei genaueren Bestimmungen des Agglutinationstiters des Milchserums bei der Bang-Infektion mit Verdünnungen von 1:2,5 zu beginnen — wenigstens in den Fällen, wenn die Milch von Kühen stammt, die einen Agglutinationswert des Blutserums von unter 1:160 aufweisen. Ebenso ist dieses bei Mischmilch ratsam. Die Anwendung der Verdünnungen von 1:2,5 und 1:5 zu der Agglutinationsreaktion vergrößert die Arbeit, und die Verfolgung der Reaktion bei solchen niedrigen Verdünnungen ist schwerer, als bei Verdünnungen von 1:10, 1:20 usw.

Der oben vertretenen Ansicht über das Fehlen der Normalagglutinine in der Milch einer banginfektionsfreien Kuh nähern sich teilweise Karsten und Diernhofer, nach deren Artikeln man zu der Ansicht gelangen kann, dass der jetzige hohe positive Grenztiter der Milchserumagglutination nicht berechtigt ist.

Karsten — B. T. W. 1933, Nr. 12 schreibt: „Eine einwandfreie Agglutination in der Verdünnung von 1:5, die wir im Vorjahre als zweifelhaft bezeichneten, kann man gleichfalls schon als positiv ansehen“. Diernhofer — Wiener Tier. Mon. XX Jg. H. 4: „Molke, welche in einer Verdünnung 1:5 keine Agglutination verursacht, stammt aus einem Bangfreien Euterviertel“.

Die Genauigkeit bei der Durchführung der Agglutinationsversuche der Milch ist dann von besonderer Wichtigkeit, wenn es gilt die Ergebnisse der Agglutinationsreaktion zur Diagnose der Bang-Infektion bei einer Kuh, oder einer ganzen Herde und zur Ausmerzungen infizierter Tiere anzuwenden — um die Herde von der Bang-Infektion zu befreien.

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

1) Bei niedrigen Agglutinationswerten des Blutserums (bis 1:40) sind — nach der Agglutinationstechnik dieser Arbeit — in der Milch gewöhnlich keine Bang-Agglutinine zu finden. Diese Erscheinung kann als indirekter Beweis dafür aufgefasst werden, dass

die Milchagglutinine anscheinend lokalen Ursprunges sind (im Euter entstanden). Nur eine Änderung des Durchlässigkeitsvermögens des Euters für Blutagglutinine während der Bang-Infektion könnte noch in Betracht gezogen werden.

2) Der bisher gebräuchliche positive Grenzwert der Milchserumagglutination bei der Bang-Infektion bei einer Verdünnung von 1:10 und darüber muss als zu hoch angesehen werden, um mittels eines Agglutinationsversuches des Milchserums alle positiven Fälle zu erfassen, die durch eine Milchserumagglutinationsreaktion feststellbar wären.

3) Beim Agglutinationstiter des Blutserums von 1:160 und darunter müsste bei Milchserumuntersuchungen auf Bang-Agglutinine von einer Verdünnung von 1:2,5 angefangen und 1:2,5 als positiver Grenztiter angenommen werden.

4) Bei der Annahme einer Verdünnung von 1:2,5 als positive Titergrenze der Milchserumagglutination würde sich die Zahl der Fälle, in denen die Ergebnisse der Milchagglutination mit den Ergebnissen der übrigen serologischen Untersuchungen zur Diagnose der Bang-Infektion des Euters bis jetzt nicht übereinstimmten, merklich verringern.

