

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Beschreibung des Untersuchungsgebietes

Das Staatsgebiet der Mongolei umfaßt eine Gesamtfläche von 1.566.500 km² und erstreckt sich von 41° bis 52° nördlicher Breite über 1250 km bzw. von 87° bis 120° östlicher Länge über 2370 km (STATISTISCHES BUNDESAMT, 1993). Die Verwaltungsstruktur der Mongolei gliedert sich in 18 Bezirke (= Aimaks), davon sind drei Städte (Stadt-Aimaks). Die Aimaks werden in Somone (Kreise) untergliedert, ein Aimak umfaßt durchschnittlich 17 Somone.

Die Untersuchungen wurden im Zentral Aimak durchgeführt. Die Auswahl des Bezirks erfolgte aufgrund der dort vorhandenen höchsten Pferdedichte im Land (STATISTISCHER JAHRESBERICHT DER MONGOLEI, 1999), der Erreichbarkeit des Aimaks und aufgrund von Vorberichten einheimischer Pferdezüchter über Aborte bei Pferden.

Das Untersuchungsgebiet Zentral Aimak (mongolisch: „Töv Aimak“) grenzt im Westen an die Bulgan und Öwörchangai Aimaks, im Norden an den Selenga Aimak, im Süden an den Dundgovi Aimak und im Osten an die Chentii und Dorngovi Aimaks. Der Zentral Aimak liegt 1200 - 1500 m über dem Meeresspiegel, umfaßt eine Fläche von 77.400 km² und besteht zu 16,4% aus Wald sowie zu 36,5% aus Steppe. Der Aimak hat mit 302.700 Tieren mit Abstand den höchsten Pferdebestand aller Aimaks der Mongolei (STATISTISCHER JAHRESBERICHT DER MONGOLEI, 1999). Die Bezirkshauptstadt ist Zuunmod Chot, ihre Entfernung zur Landeshauptstadt Ulaan-Baatar beträgt 65 km. Die Hauptstadt Ulaan-Baatar befindet sich auf dem Gebiet des Zentral Aimaks, daher gibt es gute Eisenbahn- und Straßenverbindungen. Die Jahres-Durchschnittstemperatur in Zuunmod Chot liegt bei: -1,8°C; im Januar bei durchschnittlich -20,5°C, im Juli bei +15,4°C. Der jährliche Durchschnittsniederschlag liegt bei 270,8 mm; (STELLING, 1999). Die drei Hauptflüsse des Aimaks sind der Tuula, der Kerulen und der Terelj. Der Zentral Aimak ist in 26 Somone unterteilt.

Außer Viehzucht als vorrangigem Wirtschaftszweig wird im Zentral Aimak in den nördlichen und westlichen Somonen Ackerbau betrieben; der Aimak ist eines der Hauptanbaugebiete der Mongolei, wichtigster Zweig des Ackerbaus ist die Getreidewirtschaft. Infolge der langanhaltenden, kalten und schneearmen Winter werden nur Sommerkulturen angebaut.

Die Milchproduktion und die Herstellung von Milchprodukten, besonders des Kumiß aus Stutenmilch, ist im Zentral Aimak sehr bekannt und verbreitet.

3.1.2 Auswahl der untersuchten Pferde

Stichprobenplanung:

Der Gesamtpferdebestand des Zentral-Aimaks wurde nach der Schätzung 1999 mit 302.700 Tieren angenommen. Zur Erfassung einer Herden Prävalenz von 5% mit 95% Sicherheit wurde ein Stichprobenumfang von 119 Herden berechnet. Der Zentral-Aimak besteht aus 26 Kreisen (Somone). Da keine Informationen über den Herdenbestand der einzelnen Somone vorlag, wurde die Stichprobe von 119 Herden gleichmässig über alle Somone aufgeteilt, in jedem Somon wurden im Durchschnitt 4 Herden aufgesucht (Abb. 1). Die Herden sind im Anhang 1 einzeln aufgeführt. Die Auswahl der Herden innerhalb eines Somon erfolgte nur bedingt zufällig (randomisiert), da die Kooperation der Tierbesitzer Voraussetzung für eine Probenentnahme war.

Aus jeder Herde wurden 10 Pferde nach einem definierten Probenschlüssel für die Untersuchung ausgewählt.

Tierklassen:

Die zu untersuchenden Tierklassen wurden wie folgt definiert:

- ⇒ 1) Fohlen (bis zu einem Alter von einem Jahr)
- ⇒ 2) junge Stuten (tragend oder tragend gewesen, bis zu einem Fohlen)
- ⇒ 3) ältere Stuten (mehr als ein Fohlen)
- ⇒ 4) Hengste (im Deckeinsatz)

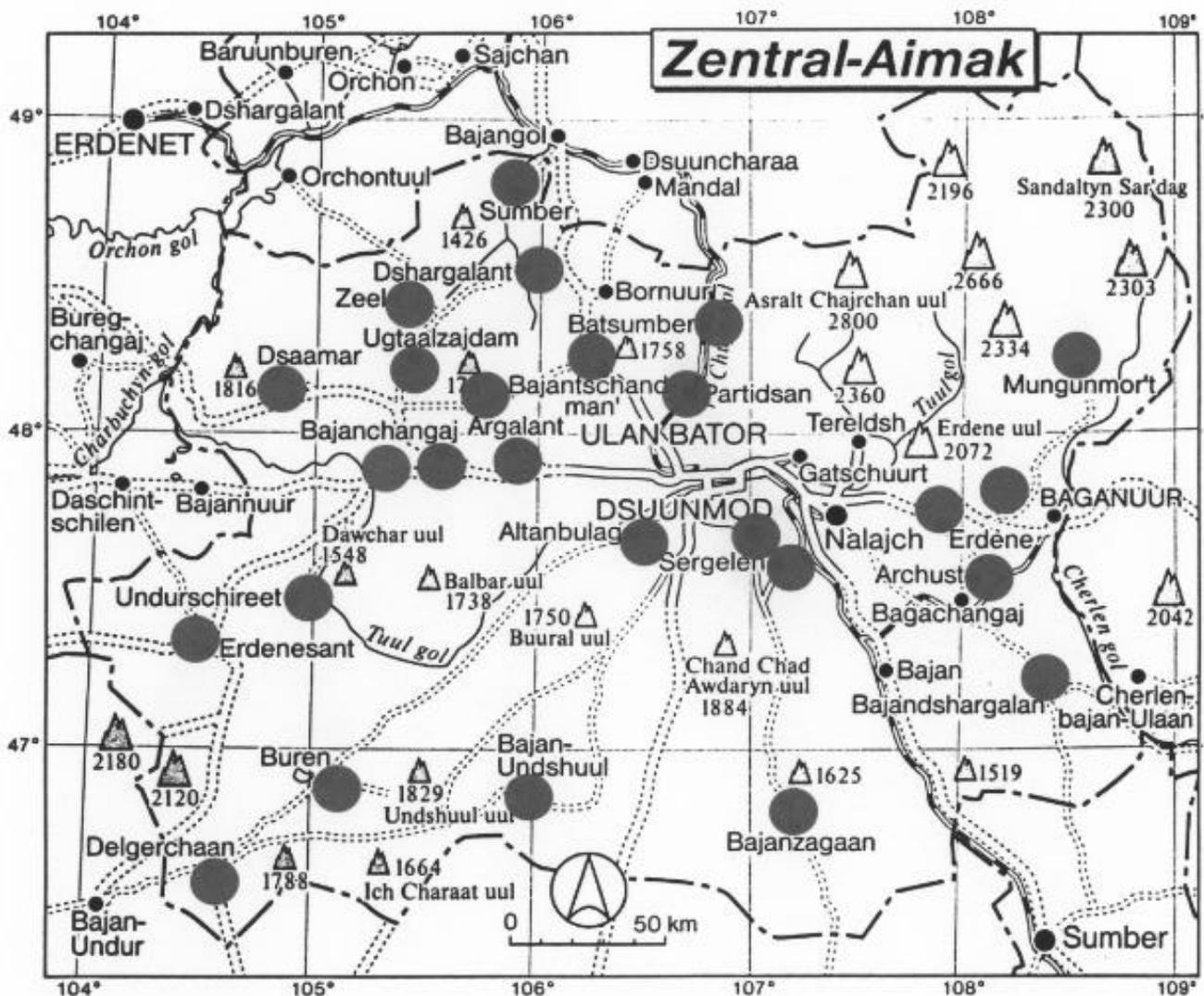


Abb. 1: Lage der Somone (●) in denen je 4 Pferdeherden untersucht wurden, Zentral Aimak der Mongolei, Mai – Juli 2000.

Auswahl der Pferde pro Herde (Probenschlüssel):

Pro Herde wurden 10 Pferde proportional zur Verteilung der Tierklassen in der Herde ausgewählt und untersucht. So wurden als Beispiel in einer Herde von 20 Pferden, in der sich 7 Fohlen (35%), 12 Stuten (60%) und 1 Hengst (5%) befanden, 35% der 10 Proben von Fohlen (= 4 Tiere), 60% von Stuten (= 5 Tiere) und 5% von Hengsten (= Tiere1) genommen.

Insgesamt wurden 1.190 Proben (119 Herden x 10 Tiere) genommen. Während des Transports wurden die Proben in Flüssigstickstoff gelagert, wobei einige Röhrchen platzten und von 2 Herden die Seren fehlten. Zur weiterführenden Untersuchungen gelangten dadurch 1.122 Proben.

Jede Herde wurde im Untersuchungszeitraum nur einmal untersucht.

3.1.3 Herdenuntersuchung

Der individuellen Untersuchung der Pferde ging eine genaue Bestands-Anamnese voraus. Es wurden gezielte Fragen zur Anzahl der Tiere, Nutzungsart, Winterweide, Sommerweide, Ankauf, Verkauf, Ernährungszustand der Herde, Anpaarung, Krankheiten, Mortalitäten, Geburten und Aborte gestellt (siehe Fragebogen über die Herden im Anhang).

3.1.4 Einzeltieruntersuchung

Auch bei der Einzeltieruntersuchung erfolgte eine Befragung (siehe Anhang). Bei Stuten wurden die Anzahl vorausgegangener Trächtigkeiten mit Angaben über Lebendgeburten und das Geburtsjahr der Fohlen, Totgeburten und Aborte, und der aktuelle Trächtigkeitsstand abgefragt. Bei Hengsten wurde der Deckeinsatz nachgefragt. Die nachfolgende spezielle klinische Untersuchung umfaßte zunächst die Beurteilung des Körperbaus und des Ernährungszustands. Das Allgemeinverhalten, die Körperhaltung und die Bewegungskoordination wurde ebenso berücksichtigt. Daraufhin wurde die Haut auf Entzündungen, Mykosen, Knötchen, Quaddeln, Bläschen, Flecken oder Ektoparasiten sowie sichtbare Schleimhäute (Konjunktiven, Nasenschleimhaut, Genitalorgane) auf Veränderungen untersucht. Insbesondere wurden die Genitalorgane einer Untersuchung unterzogen, wobei auf Farbe, Schwellungen, Ausfluß, Wunden und auf sonstige Veränderungen geachtet wurde. Auffälligkeiten wurden fotografiert. Abschließend wurden die Tierbesitzer über den Gesundheitszustand der einzelnen Tiere befragt.

3.1.5 Gewinnung von Blut- und Serumproben

Das Blut wurde mit einer Einmalkanüle aus der Vena (V.) jugularis mit Hilfe zweier Vakuümröhrchen (Venoject[®]) entnommen; ein Röhrchen enthielt kein EDTA für die nachfolgende Serumgewinnung. Das Röhrchen mit EDTA wurde für die spätere DNA Extraktion genutzt. Aus diesem EDTA Röhrchen wurde 1 ml Blut mit einer Pipette in ein vorher beschriftetes Röhrchen (NUNC[®]) überführt und dieses in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Serumgewinnung wurde das Röhrchen ohne EDTA über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde von dem Überstand 1 ml Serum in Cryoröhrchen (NUNC[®]) pipettiert. Anschließend wurde das Röhrchen mit Herden-, Tiernummer und Entnahmedatum beschriftet und ebenfalls bis zu weiteren Untersuchungen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.1.6 Blutausstriche

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurde ein Tropfen Blut auf einen Objektträger aufgetragen und ausgestrichen. Nach Lufttrocknung wurden die Ausstriche mit Methanol vor Ort fixiert. In Berlin wurden sie mit frisch verdünnter Giemsa-Lösung (5 ml Giemsa / 45 ml Puffer nach Weise) für 40 Minuten gefärbt. Anschließend wurde der Objektträger mit Wasser abgespült, an der Luft vollständig getrocknet und mikroskopisch bei einer 10x40-fachen Vergrößerung (Öbobjektiv) auf Trypanosomen untersucht.

3.1.7 Antigengewinnung

Anreicherung von Trypanosomen:

Zunächst wurden zwei Ratten aus der institutseigenen Zucht des BgVV mit einem Stabilat von *T. equiperdum* (Stamm ALFORT) mit je 0,5 ml intraperitoneal infiziert. Nach vier Tagen wurde aus der Schwanzspitze Blut gewonnen und mikroskopisch bei 250-facher Vergrößerung auf Trypanosomen untersucht. Bei ausreichender Parasitämie (> 100 Trypanosomen pro Gesichtsfeld), wurden die Ratten durch Begasung mit CO₂ getötet. Das aus ihnen gewonnene Blut wurde in 2%-iger

Natriumcitrat – NaCl – Lösung verdünnt und in 18 weitere Ratten zu je 0,5 ml intraperitoneal inokuliert. Bei diesen Ratten wurde wiederum die Entwicklung der Parasitämie beobachtet. Bei hoher Parasitämie (> 100 Trypanosomen pro Feld) wurden die Ratten wiederum unter CO_2 -Begasung getötet, die Brusthöhle eröffnet, das Sternum zurückgeklappt und das freigelegte Herz mit 0,1 ml Heparin beträufelt. Aorta und V. cava cranialis wurden durchtrennt, das Herz eröffnet und das ausgetretene Blut aus der Brusthöhle gewonnen. Das Blut wurde unmittelbar mit einer 20 ml Spritze ohne Kanüle aufgesaugt und in vorbereitete 200 ml Erlenmeyerkolben, in denen 100 ml PSG vorgelegt waren, überführt. Die Erlenmeyerkolben wurden bis zur 150 ml Markierung gefüllt (Verdünnungsfaktor 1/3) und die Verdünnung bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Herstellung von Antigenlysaten:

Voraussetzung für die Herstellung von Antigenlysaten ist die Trennung der Trypanosomen von den korpuskulären Bestandteilen des Nativblutes. Diese Trennung wurde chromatographisch nach LANHAM und GODFREY (1970) durchgeführt.

Hierzu wurden 2 Büchnertrichter von jeweils 1 l an 2 Ständer in gerader Stellung befestigt. Am Auslauf jedes Trichters wurde ein Silikonschlauch angebracht. Auf das Sieb des Trichters wurde ein passender Papierfilter (Whatman Nr.41) gelegt. Danach wurden die Trichter mit 300 ml Zellulosesuspension (Diethylaminoethyl-DEAE-52) gefüllt und die Oberfläche der sedimentierten Zellulosesuspension mit einem zweiten Papierfilter bedeckt. Die Säule wurde ausgiebig mit PSG gespült. PSG/Rattenblut wurde durch sterile Gaze in einen 1000 ml Meßzylinder gegossen, abgemessen und vorsichtig in einem 2 l Rundkolben gemischt. Auf je eine Säule wurden nachfolgend 500 ml PSG/Rattenblutgemisch vorsichtig gegossen. Waren die ersten Trypanosomen mikroskopisch im Eluat zu sehen, wurde das Eluat in einem Erlenmeyerkolben aufgefangen. Der Kolben wurde in einem Becherglas mit Eis gekühlt. Während der gesamten Trennung wurde ständig mikroskopisch das Erscheinen von Trypanosomen bzw. Erythrozyten im Eluat kontrolliert. Das Eluat wurde anschließend 20 Minuten bei 3500 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Trypanosomensediment 1 mal in PSG gewaschen. Anschließend wurde das Gewicht des Sediments bestimmt und 1:15 mit PVP-Merthiolat-NaCl-Lösung

verdünnt. Die Trypanosomensuspension wurde sorgfältig gemischt und mit einem Dispenser zu je 0,5 ml in Rollrandflaschen abgefüllt und lyophilisiert. Das lyophilisierte Antigen wurde zur Antigenauswertung in der KBR und im ELISA benutzt. In der KBR wurde eine Trypanosomensuspension eingesetzt, die aus löslichem und korpuskulärem Antigen bestand. Für die Beschichtung der ELISA platten wurde dagegen nur das lösliche (=somatische) Extraktantigen von *Trypanosoma equiperdum* verwendet (siehe 3.1.8.1 und 3.1.8.2).

3.1.8 Serologische Nachweismethoden

Die serologischen Nachweismethoden wurden am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin Berlin (BgVV) durchgeführt.

3.1.8.1 Komplementbindungsreaktion

Die KBR wurde in Mikrotiterplatten (Fa. Greiner) durchgeführt. In Vorversuchen wurden durch eine Schachbretttitration die optimale Antigenkonzentration sowie die Gebrauchsverdünnung von Komplement und Antigen, der kommerziell erworben wurde, verwendet. Als Komplementquelle diente Mehrschweinchenserum. Die Verdünnungsflüssigkeit für alle Reagenzien war Veronal-Puffer-Lösung (veronal-buffered-diluent= VBD).

Komplementauswertung:

Bei jeder KBR wurde die Komplement-Gebrauchsverdünnung in Gegenwart der Antigen-Gebrauchsdosis neu ermittelt. Es wurde eine Komplementverdünnung von 1:40 hergestellt (0,5 ml C* + 3,5 ml aqua bidest. + 12 ml VBD) und in steigender Konzentration in 3 Reihen a 9 Röhren in folgender Anordnung hergestellt und gemischt:

(*Komplement C = in Richardson A und B konserviertes, vorverdünntes Komplement: 8 ml Meerschweinchenserum + 1 ml Richardson-Lösung B → mischen + 1 ml Richardson A hinzufügen)

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
C (1:40)	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	ml
VBD	0,4	0,35	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	-	ml

In die mittlere Reihe wurden je Röhrchen 0,5 ml Antigen in Gebrauchsverdünnung (1:32) und 1 ml VBD überführt. In Reihe 1 und 3 wurden je Röhrchen 1,5 ml VBD gegeben. Alle Röhrchen wurden kräftig gemischt und eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml Ambozeptor in Gebrauchsverdünnung und 0,5 ml 2%ige Hammelerythrocyten zugegeben, wieder kräftig gemischt und weitere 30 min. im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Abgelesen wurde die geringste Komplementmenge, die eben noch eine komplette Hämolyse hervorruft (MHD = minimum haemolytic dose). Die nächsthöhere Komplement-Menge ist die einfache Komplement Dosis (FHD = full haemolytic dose), aus der sich die Komplement - Gebrauchsverdünnung nach der Formel $\frac{2 \times \text{FHD}}{\text{C}}$ berechnet.

40

Daraus ergeben sich die folgenden Komplementtiter für die einzelnen Röhrchen:

<u>FHD in Röhrchen Nr.</u>	<u>C-Titer</u>
1	1:200
2	1:133
3	1:100
4	1:80
5	1:67
6	1:57
7	1:50
8	1:44
9	1:40

Inaktivierung der Test- und Kontrollseren:

Serumproben wurden vor dem Ansatz inaktiviert, um das in der Probe vorhandene Komplement zu zerstören. Dazu wurden alle Seren, einschließlich Kontrollseren vor der Untersuchung im Wasserbad in der Vorverdünnung 1:2,5 für 30 min bei 58°C

inaktiviert. In jedem Testansatz der KBR wurde ein dem Antigen homologes positives sowie ein antikörperfreies, d.h. negatives Kontrollserum mitgeführt.

Testdurchführung:

In allen Plattenvertiefungen („Cups“) der Mikrotiter-Platte wurde zuerst 25 µl VBD gegeben. Die Platte wurde zwischen den Säulen 6 und 7 mit einer Linie markiert. 25 µl der 1:2,5 vorverdünnten Serumproben wurden in die Cups der 1. und 5., bzw. 7. und 11. Säule gegeben. Die Verdünnung der Seren erfolgte durch überpipettieren von 25 µl aus den Plattenvertiefungen von Säule 1 nach 4 und von 5 nach 6, bzw. von 7 nach 10 und von 11 nach 12.

Schema der Serumverdünnung mit Zugabe von Antigen in einer Mikrotiter-Platte

1) Serumverdünnung												
Cup	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VBD (µl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Serum (µl)	25				25		25				25	
2) Titration der Seren												
Verdünnung	1:5	1:10	1:20	1:40	1:5	1:10	1:5	1:10	1:20	1:40	1:5	1:10
3) Zugabe von Antigen												
Antigen (µl)	25	25	25	25			25	25	25	25		
VBD (µl)					25	25					25	25

Anschließend wurde in jedes Cup 50 µl Komplement in Gebrauchsverdünnung pipettiert. Die Platten wurden mit einer Deckplatte abgedeckt und in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe des Hämolytischen Systems.

Herstellung des Hämolytischen Systems:

Für das als Indikator einer stattgefundenen Antigen-Antikörperreaktion dienende hämolytische System wurden Schaferythrozyten wie folgt präpariert:

75 ml frisch gewonnenes Schafblut wurden zur Konservierung mit 125 ml Alseverlösung gemischt und mit 2 mg Penicillin versetzt. Bei +4°C gelagert kann das Blut für vier Wochen aufbewahrt werden.

10 ml dieser Lösung wurden bei 2.500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Erythrozyten mit VBD gewaschen und gut gemischt. Diese Prozedur wurde drei mal wiederholt. Vor dem letzten Absaugen des Überstandes wurde das Erythrozytenvolumen gemessen und mit VBD zu einer 2%igen Lösung aufgefüllt.

Der Ambozeptor wurde mit VBD 1:1000 in Gebrauchsverdünnung verdünnt. Anschließend wurden 25 ml von der 2%igen Hammelerythrozyten-Lösung und 25 ml Ambozeptor in Gebrauchsverdünnung in ein Gefäß gegeben und gemischt. Fünfzig µl dieses Hämolytischen Systems wurde allen Cups zugegeben. Die Platten wurden mit einem Abdeckband luftdicht und blasenfrei verschlossen, auf dem Schüttler gemischt und bei 37°C für 30 min im Wasserbad inkubiert.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Ablesespiegels. Das Ergebnis wurde wie folgt bewertet:

- 100% Hämolysehemmung = 4 (++++)
- 75% Hämolysehemmung = 3 (+++)
- 50% Hämolysehemmung = 2 (++)
- 25% Hämolysehemmung = 1 (+)
- keine Hämolysehemmung = negativ

Die Untersuchungsprobe wurde in Anlehnung an OIE (1996) als Test-positiv gewertet, wenn wenigstens eine 50%-ige Hämolysehemmung (++) bei einer Verdünnung von 1:5 vorlag. Seren die bis 1:40 positiv reagierten, wurden erneut angesetzt und bis 1:640 austitriert.

3.1.8.2 Enzyme - linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Antigenaufbereitung:

Durch Antigentitration wurde die optimale Antigenkonzentration für die Beschichtung der Platten ermittelt. 0,5 ml lyophilisiertes Antigen wurde in 5 ml Karbonatpuffer rekonstituiert und 4 mal 10 Sekunden mit dem Sonoplus-Ultraschall-Homogenisator

HD 200[®] der Firma Bandelin bei maximal zulässiger Amplitudeneinstellung (40%) ultrabeschallt. Während der Beschallung wurde die Antigenlösung in Eiswasser gekühlt. Das beschallte Antigen wurde anschließend 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Antigenauswertung eingesetzt. Das Sediment wurde verworfen.

Antigenbeschichtung:

Alle Vertiefungen (Cup) der Mikrotiterplatte (Fa. Greiner) wurden mit 100 µl Antigenlösung in einer Arbeitsverdünnung von 1:800 gefüllt. Die Platten wurden in einer feuchten Kammer für 40 Minuten im Brutschrank bei +37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten entleert und mit Aqua bidest. 4 mal gewaschen. Pro Cup der Platte wurden 200 µl Blocking-Puffer (3% FCS-Carbonatpuffer) zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Platten wurden anschließend entleert und 4 mal mit PBS-Tween gewaschen. Im Brutraum wurden die mit Antigen beschichteten und mit Blocking-Puffer behandelten Platten bei 37°C für 120 Minuten getrocknet. Anschließend wurden die Platten unter Vakuum in Vaku-Beuteln[®] eingeschweißt. Bei einer Lagerungstemperatur von +5°C ±3°C (Kühlschrank) beträgt die Mindesthaltbarkeit ohne Aktivitätsverlust ein halbes Jahr.

Testdurchführung:

Die benötigte Anzahl an Antigen-beschichteten Testplatten wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Die Cups der Säulen 1-10 waren für den Doppelansatz der Seren und die Cups der Säulen 11 und 12 für den Doppelansatz der Kontrollseren (negative, schwach-, mittelstark-, und starkpositive Kontrolle) vorgesehen. Die zu untersuchenden Serumproben und Kontrollseren wurden in einer Verdünnungsplatte 1:10 mit PBS-Tween vorverdünnt. In allen Cups der Testplatten wurden 90 µl PBS-Tween / 6% FCS vorgelegt. Von den Verdünnungsplatten wurden anschließend jeweils 10 µl der vorverdünnten Seren in alle Cups der Testplatten übertragen (Endverdünnung 1:100) und gemischt. Die Platten wurden bei 37°C für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Platten entleert und wieder 4 mal mit PBS-Tween gewaschen. Nach Ausschütten des Waschpuffers wurde in jede Vertiefung 100 µl verdünntes Konjugat gefüllt. Das Konjugat bestand aus dem mit

Meerrettichperoxidase gekoppeltem Anti-Pferd-IgG. Bei der Konjugatverdünnung von 1:1200 war die Differenz der optischen Dichte (OD) zwischen positiven und negativen Kontrollseren am größten. Nach dem Einfüllen des Konjugats wurden die Platten wieder wie vorher inkubiert. Daraufhin wurden die Platten 4 mal ausgeschüttelt, gewaschen und ausgeklopft. In allen Cups wurde 100 µl Chromogen-Substrat-Lösung (ABTS) zugegeben. Sobald die schwachpositive Kontrolle einen OD-Wert von 0.400 erreichte (nach ca. 25 bis 30 Minuten), erfolgte die Messung der Platte im Plattenphotometer bei 405 nm. Die Untersuchungsprobe wurde als Test-positiv gewertet, wenn ihr mittlerer OD-Wert (Doppelansatz) 60% oder größer des mittleren OD-Wertes der schwachpositiven Kontrolle betrug. Dieser Grenzwert (Cut-off) wurde auf Grundlage von Ergebnissen aus Voruntersuchungen gewählt (490 Serumproben von Pferden aus Deutschland, Mitteilung des BgVV).

3.1.9 DNA – Nachweismethoden

3.1.9.1 PCR – Untersuchungen

DNA – Extraktion (HIGUCHI, 1989):

In ein Eppendorfgefäß wurden 250 µl Lysispuffer nach HIGUCHI (1989) gefüllt, dazu wurden 250 µl der zu untersuchenden Blutprobe gegeben. Beides wurde gut gemischt (mind. 30 Sekunden Vortex) und bei 13.000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen (bis auf 50 µl) und das „Pellet“ in 500 µl des Lysispuffers gründlich resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Lysis- und Waschvorgang wurde insgesamt 3 mal durchgeführt. Nach dem dritten Waschen wurde das Pellet in 250 µl 1 x PCR – Puffer resuspendiert und anschließend mit 1,5 µl Proteinase K versetzt. Die Proben wurden gemischt und für 1 Stunde in einem 56°C warmen Wasserbad inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase - K wurden die Proben anschließend bei 100°C für 10 Minuten gekocht. Bis zur Amplifikation wurden die Proben bei –20°C gelagert.

Als Kontrollen liefen bei jeder Extraktion negative Vollblutproben mit (wenigstens 20% der Probenzahl). Hierbei handelte es sich um Blut aus der Pferdeklinik der Freien Universität Berlin und von Pferden aus dem Umland von Berlin.

DNA – Amplifikation:

Für die PCR wurde ein Gemisch von 10 µl vorverdünnter MgCl₂ Lösung, 5 µl Template (extrahierte DNA-Probe) und 10 µl „Mix“ hergestellt (Ansatz = 25 µl). Die MgCl₂ – Konzentration wurde so vorverdünnt, daß die Endkonzentration im 25 µl – Ansatz 3 mM betrug. In jedes Probengefäß wurden 10 µl der vorverdünnten Magnesiumchlorid-Lösung gefüllt. Danach wurden 5 µl Template und nachfolgend 10 µl „Mix“ hinzugegeben. Der „Mix“ setzte sich wie folgt zusammen:

Ausgangskonzentration:	Volumenanteil im „Mix“:	Endkonzentration im 25 µl Ansatz:
10 x PCR - Puffer	2,5 µl	1 x PCR - Puffer
NRP1 – Primer	0,2 µl	1 µM
NRP2 – Primer	0,185 µl	1 µM
d’NTPs – Stock (100 mM)	0,25 µl	250 µM für jede der 4 NTP’s
H ₂ O	6,665 µl	
TAQ-GOLD-Polymerase	0,2 µl	1 Unit
GESAMT	10 µl	

Die eingesetzten Primer (NRP1 und NRP2) werden bei ARTAMA et al. (1992) beschrieben:

NRP 1: 5´ - CGAATGAATATTAACAATGCGAGT – 3´

NRP 2: 5´ - AGAACCATTTATTAGCTTTGTTGC – 3´

Anschließend wurde auf das PCR – Gemisch ein Tropfen Mineralöl zur Vermeidung von Verdunstung aufgetragen. Danach wurden die Proben in den Thermocycler überführt. Der Thermocycler war wie folgt programmiert:

1. Denaturierung: 95°C, 10 Min.
2. Annealing: 60°C, 2 Min.
3. Extention: 72°C, 30 Sek.
4. Denaturierung: 94°C, 1 Min.
5. Annealing: 60°C, 30 Sek.
6. Extention: 72°C, 30 Sek.

7. Extention: 72°C, 10 Min.
8. Herunterkühlen und Halten auf 4°C
(Schritt 4 – 6 wurde 35 mal wiederholt = 35 Zyklen)

Bei der Amplifikation wurde eine positive Kontrolle sowie als Kontrolle auf Kontamination DNA/RNase freies Wasser und DNA von einem Pferd aus dem Einzugsbereich von Berlin eingesetzt.

Agargel – Elektrophorese:

Zur Sichtbarmachung der Nukleinsäurefragmente (PCR–Produkte) wurde eine Elektrophorese eingesetzt. Hierfür wurde ein Gel hergestellt. Zunächst wurden 3 g Agarose in 150 ml 1xTBE-Puffer überführt und in einer Mikrowelle bis zur Klarheit der Agaroselösung für ca. 5 min erhitzt. Anschließend wurden 15 µl Ethidiumbromidlösung (Stock-Lösung: 10 mg/ml) hinzugegeben. Nach kurzer Abkühlung auf ca. 80°C wurde die Flüssigkeit blasenfrei in einen Gelträger aus Plexiglas gegossen. Zur Erhaltung einer Vertiefung (= „slot“) in diesem Gel wurde ein Plexiglaskamm eingehängt. Nach einer Stunde war das Gel erstarrt und konnte für die Elektrophorese verwendet werden.

Das Gel wurde in eine mit ca. 2,5 l 1xTBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Biometra GmbH; Göttingen) hineingelegt, so daß das Gel vollständig von Pufferlösung umspült war. In jede Vertiefung wurden 15 µl der Proben pipettiert. Zuvor wurde das PCR-Produkt mit 5 µl Probenpuffer versetzt. Nach ca. jeder zehnten Probe wurden 10 µl eines kommerziell erhältlichen DNA–Markers (100 bp DNA – ladder[®], Life Technologies) in die „ slots “ aufgetragen. Anschließend wurde eine Spannung von 60 Volt angelegt. Der Lauf wurde abgebrochen, sobald das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau eine Wegstrecke von ca. 3 cm zurückgelegt hatte. Das Gel wurde aus der Kammer genommen, über eine UV – Lampe gelegt und mit einer Polaroid – Kamera fotografiert.

3.1.10 Statistische Auswertungen

Die Dateneingabe erfolgte mit dem Programm Excel, Auswertungen wurden mit dem Statistik–Programm SPSS für Windows Version 10 durchgeführt. Als Lagemaße der

Verteilungen wurden arithmetische Mittelwerte sowie Mediane bestimmt. Wegen der Schiefe der Verteilungen wurde zur Beschreibung der Ergebnisse der besser geeignete Median benutzt, mit den passenden Streuungsmaßen Quartile, Minimum, Maximum und Quartilsabstand: Die Standardabweichungen wurden nur in den Tabellen dargestellt. Histogramme und Balkendiagramme dienten insbesondere zur graphischen Darstellung von Datenreihen mit unsymmetrischer Verteilung, um Lage- und Streuungsverhältnisse von Meßwertreihen sowie Zusammenhänge von Einflußgrößen darzustellen.

Zur Beurteilung der Übereinstimmung verschiedener diagnostischer Methoden wurden die Versuchsergebnisse mittels Kontingenztafeln verglichen.

3.1.11 Verwendete Reagenzien, Puffer, Geräte und Verbrauchsmaterialien

a) Reagenzien und Puffer

KBR

Veronalpuffer (VBD) – Konzentrat (5:1), pH 7,4

Stammlösung 1

- Natriumchlorid 83,00 g
- 5,5 Diethylbarbitursäure • Natrium – Salz 10,19 g
- lösen in ca. 800 ml heißem Aqua dest.

Stammlösung 2

- Magnesiumchlorid • 6H₂O 20,30 g
- Calciumchlorid • 2H₂O 4,40 g
- Aqua bidest. ad 100,00 ml

34,58 ml 1 N HCL langsam zu Stammlösung 1 zugeben, dazu 5 ml Stammlösung 2.

Mit Aqua dest. auf 2000 ml auffüllen. Vor Gebrauch VBD – Konzentrat 1:5 mit Aqua dest. verdünnen und pH - Wert überprüfen (7,4 – 7,5)

Alsever's Lösung

- Dextrose (Glucose) 18,66 g
- Natriumchlorid 4,18 g
- Natriumcitrat 8,00 g
- Aqua bidest. ad 1000,00 ml

Sterilisieren im Dampftopf für 20 Minuten (Autoklavieren führt zur Karamelisierung!)

Komplement - Konservierung

Richardson Lösung A

- Borsäure 1,86 g
- Borax 4,58 g
- Sorbitol 22,94 g
- gesättigte NaCL - Lösung ad 200,00 ml

Richardson Lösung B

- Borax		1,14 g
- Natrium azid		1,62 g
gesättigte NaCL - Lösung	ad	200,00 ml

Stammlösung: 8 ml Meerschweinchenserum + 1 ml Richardson Lösung B, gut mischen, + 1 ml Richardson Lösung A, gut mischen. Bei +4°C lagern, haltbar bis 6 Monate,
(ad us: 7 ml Aqua dest. + 1ml Stammlösung,(entspricht einer 1:10 Verdünnung !))

Ambozeptor (5 ml ORLC 25)

Dade Behring Marburg GmbH

ELISA

Karbonatpuffer, pH 9,6

- Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	1,59 g
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	2,92 g
- Aqua bidest	1000 ml

Karbonat - Blocking – Puffer (zur Antigenbeschichtung)

- Karbonatpuffer, pH 9,6 + 3% FCS (foetales Kälberserum)

Phosphatpuffer mit Tween 20 (PBS – Tween), pH 7,4

- Natriumchlorid (NaCl)	8,0 g
- Di-Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$)	2,9 g
- Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	0,2 g
- Kaliumchlorid (KCl)	0,2 g
- Aqua bidest.	1000 ml
- Tween - 20	0,5 ml

Konjugat (RAH/IgG(H+L)/PO)

Nordic Immunology, Tilburg

Zitronensäure (zur Herstellung der Substrat – Chromogen – Lösung)

- Zitronensäure – Monohydrat	4,2 g
- Aqua bidest.	ad 200 ml

- Di – Natriumhydrogenphosphat		7,16 g
- Aqua bidest.	ad	200 ml
ABTS	160 mg → 400 ml Zitronensäure puffer	

Haltbarkeit der Substrat – Chromogen – Lösung 1 Monat im Kühlschrank bei +7°C±3°C. Unmittelbar vor Gebrauch wird der Substratlösung 1% (w/v) 1:40 vorverdünntes Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zugegeben.

Antigenherstellung

Phosphatpuffer (PS), pH 8,0:	<u>18 l</u>	<u>600 ml</u>
Na ₂ HPO ₄	242,64 g	8,09 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	14,04 g	0,47 g
NaCl	76,50 g	2,55 g
Aqua bidest. (heiß)	ad 18 l	ad 600 ml
Glucose – Lösung (1%)	12 l	400 ml
Glucose	300 g	10 g
Aqua bidest.	ad 12 l	ad 400 ml

Beide Pufferbestandteile (PS und Glucose Lösung) wurden separat autoklaviert (121°C, 15 Minuten). Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen beide zusammengewaschen und gemischt. Dieses Gemisch ist dann PSG (Phosphatpuffer Glucose – Lösung 1%). PSG frühestens 1Tag vor der Isolierung herstellen.

Natriumcitrat – NaCl – Lösung (2%)

C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O		2 g
NaCl		0,85 g
Aqua bidest.	ad	100 ml

(Steril filtrieren)

5%-ige PVP in 1:10000 Merthiolat – NaCl - Lösung

NaCl		0,85 g
1%-ige Merthiolat – NaCl – Lösung		0,1 ml
PVP (Polyvinylpyrrolidon)		5 g
aqua bidest	ad	100 ml

lösen und steril filtrieren (0,22 µm Filter).

PCR

Lysispuffer nach Higuchi pH 7,5

0,32 M Saccharose		10.600 g
0,01 M Tris		0.121 g
0,005 M Magnesiumchlorid (MgCl ₂)		0.100 g
Triton X - 100		1ml
Aqua bidest.	ad	100 ml

10 x PCR – Puffer pH 8,4

100 mM Tris		1.211 g
500 mM Kaliumchlorid (KCl)		3.728 g
Triton X - 100		1ml
Aqua bidest. (PCR – Qualität)	ad	100 ml

Proteinase - K

10 mg in 1 ml Aqua bidest.(PCR – Qualität) lösen.

10 x Elektrophorese – Puffer (TBE), pH 8

0,36 M Tris		43,61 g
0,30 M NaH ₂ PO ₄		41,39 g
0,01 M EDTA		3,72 g
Aqua dest.		1 l

b) Geräte

- Kühlzentrifuge, (Minifuge GL [®])	Heraeus – Christ GmbH, Osterode
- Wasserbad (+37°C ±1°C)	Memmert, Schwabach
- Wasserbad (+58°C ±2°C)	Köttermann, Hänigsen
- Analysewaage	Sartorius, Göttingen
- Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
- heizbarer Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
- Digital - pH – Meter 646	„Knick“ Windaus, Clausthal - Zellerfeld
- Gefrierschrank (-17°C ±3°C)	Privileg de Luxe, Bayern
- Brutschrank (+37°C ±1°C)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
- Ablesespiegel für Mikrotiterplatten	Dynatech Laboratories, Guernsey,USA
- Mikrotiterplattenschüttler (Titertek [®])	Flow Laboratories GmbH, Bonn
- Ultraschall Homogenisator (Sono Plus HD 200 [®])	Bandelin electronic
- Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech Laboratories, Guernsey,USA
- Folienschweißgerät mit Vakuum (Webomatic [®])	Werner Bonk, Bochum
- Mikrozentrifuge	Instrument Makers Aps, Denmark
- Mikroskop (Standart 20 [®])	Zeiss, Jena
- Multipipette	Eppendorf, Wetzlar
- Lyophilisationsanlage (Lyovac GT4, Finn - Aqua [®])	SohlbergGmbH
- Heizwasserbad, (Modell F10 [®])	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
- Thermocycler (Trio – block [®])	Biometra GmbH, Göttingen
- Biofuge	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau
- Elektrophoresekammer (Agagel Maxi [®])	Biometra GmbH, Göttingen

c) Verbrauchsmaterialien

- Einmalkanüle	Terumo GmbH, Frankfurt/Main
- Röhrchen mit EDTA	Terumo GmbH, Frankfurt/Main
- Röhrchen ohne EDTA	Terumo GmbH, Frankfurt/Main
- Plastikröhrchen	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich
- Plastikröhrchen	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
- Mikroplatten	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
- Pipettenspitze 0,2 – 10 µl	Rapidozym GmbH, Luckenwalde
- Pipettenspitze 10 – 100µl	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
- Pipettenspitze 100 –1000 µl	Rapidozym GmbH, Luckenwalde
- Zellulose (DEAE 52)	Whatman, Springfield, UK