



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **215 581 A5**

3(51) C 12 Q 1/38

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 Q / 258 080 6

(22) 16.12.83

(44) 14.12.84

(31) 824348

(32) 17.12.82

(33) FI

(71) siehe (73)

(72) Sandholm, Markus, Prof., FI

(73) Labsystems OY, 81 Helsinki 81, Etlab OY, 00810 Helsinki 81; Etlab OY, 00810 Helsinki 81, FI

(54) Verfahren für die Ermittlung von Euterentzündungen

(57) Verfahren für quantitative Ermittlung von Euterentzündung so, daß die zu messende Verbindung Antitrypsin ist, das in der Milch bei Euterentzündung vorkommt. Die Ermittlung des Antitrypsins wird unter Benutzung einer Farbenreaktion ausgeführt, wobei eine normalisierte Trypsinmenge aus dem N-Bentroylarginin-p-nitroanilid eine gefärbte Verbindung, p-Nitroanilin, befreit, bei dem das α_1 -Antitrypsin als Inhibitor der Farbenentwicklung tätig ist, indem es die Aktivität des Trypsins verhindert. Alternativ wird das Antitrypsin auf Grundlage der Aufklärung des eigenen Kaseins der Milch ermittelt.

Berlin, den 18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

63 339/12

Verfahren für die Ermittlung von Euterentzündung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren für quantitative Ermittlung von Euterentzündung so, daß die das Trypsin inaktivierende Wirkung der Milch gemessen wird, welche inaktivierende Wirkung im Zusammenhang mit der Euterentzündung größer geworden ist. Die Ursache der Zunahme dieser Wirkung liegt zunächst darin, daß das α_1 -Antitrypsin der Milch bei Euterentzündung aus dem Blut in den Milchraum fließt.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die wichtigsten heute verwendeten Verfahren für die Ermittlung und Feststellung der Euterentzündung gründen sich auf Bakteriologie sowie auf die Bestimmung der Zahl der Zellen aus einer Milchprobe.

Diese Verfahren weisen u. a. folgende Nachteile auf:

- Die Apparaturen für die Bestimmung und für das Zählen der Zellen sind kostspielig, arbeitsaufwendig im Betrieb sowie verlangen reichlich an Unterhalt. Unter diesen Umständen kommen Apparaturen der heutigen Technik nur bei den allergrößten Untersuchungslaboratorien der Milchwirtschaft vor (z. B. bei Valio, Helsinki).
- Die Aufbewahrung und Lagerung der Milchproben für das Zählen und Bestimmen der Zellen ist technisch umständlich und verlangt besondere Maßnahmen.

18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

63 339/12

- 2 -

- Beruhend auf den Zeitpunkt und die Weise der Probenentnahme wird die aus einer Milchprobe zu ermittelnde Zellenanzahl auch von anderen Faktoren außer der Euterentzündung beeinflusst.

Unter anderem ist es aus den oben angegebenen Gründen bisher nicht möglich gewesen, eine zitzenbezogene Ermittlung des Vorkommens der Euterentzündung zuverlässig auszuführen. Die Feststellung einer latenten Euterentzündung ist sehr unsicher gewesen. In verschiedenen Zusammenhängen ist geschätzt worden, daß z. B. in Finnland aus dem gesamten Kuhbestand sogar 40 % an akuter oder latenter Euterentzündung erkrankt sind. Dies führt wieder zu beachtlichen wirtschaftlichen Verlusten.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens für die Ermittlung von Euterentzündung, mit dem die Nachteile des bekannten Verfahrens vermieden werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Bestimmung von Substanzen zur Verfügung zu stellen, die sich bei Vorliegen einer Euterentzündung in der Milch befinden.

Erfindungsgemäß wird die Verbindung Antitrypsin gemessen, die in der Milch bei Euterentzündung vorkommt.

Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung ist dadurch

18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

63 339/12

- 3 -

gekennzeichnet, daß die Ermittlung der Trypsininhibitorhaltigkeit ausgeführt wird entweder

- a) unter Benutzung von Farbenreaktionen, wobei eine normale Trypsinmenge aus dem N-Benzoylargin-p-nitroanilid eine gefärbte Verbindung p-Nitroanilin befreit, bei dem das α_1 -Antitrypsin als Inhibitor der Farbenentwicklung tätig ist, indem es die Aktivität des Trypsins verhindert, oder
- b) auf Grundlage der Aufklärung des eigenen Kaseins der Milch.

Das Verfahren gemäß der Erfindung ist für das Messen der Euterentzündung, im Vergleich zu den früheren Verfahren, einfach, leicht zu verwenden und kostengünstig. Außerdem weist das Verfahren eine große Kapazität auf, wobei eine systematische und individuelle und zitzenbezogene Untersuchung der Kühe und Beobachtung der Krankheit möglich sind. Beim Verfahren gemäß der Erfindung ist auch die neue Vorbehandlungsweise der Proben beträchtlich einfacher als vorher.

Das Verfahren gründet sich auf die folgende Grunderkenntnis: Wenn eine Kuh an Euterentzündung erkrankt, verändert sich die Durchdringlichkeit oder Permeabilität der Wandungszellen der Haargefäße an der Entzündungsstelle. Als Folge davon fließen bei Euterentzündung Eiweißstoffe des Blutes (vor allem kleinmolekulische) in die Milch. Es ist auch entdeckt worden, daß im Zusammenhang mit Euterentzündung in der Milch u. a. Blutalbumin und α_1 -Antitrypsin vorkommen, die zur Gruppe der kleinmolekulischen Eiweißstoffe des Blutes gehö-

18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

63 339/12

- 4 -

ren. Das Vorkommen des Antitrypsins in der Milch bei Euterentzündung ist u. a. in folgenden Literaturhinweisen beschrieben worden:

T. Honkanen-Buzalski, T. Katila and M. Sandholm: Milk anti-trypsin activity during clinical and experimental bovine mastitis, Acta Vet. Scand. 1981 22, 360-368;

T. Honkanen-Buzalski and M. Sandholm: Trypsin inhibitors in mastic milk and colostrum; Correlation between trypsin inhibitor capacity, bovine serum albumin and somatic cell contents. J. Dairy Res. 1981 48, 213-223; und

M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski and R. Kangasniemi: Milk trypsin inhibitor capacity as an indicator of bovine mastitis, a novel principle which can be automated (Manuskript). Auf Grundlage dieser Beobachtung ist das vorliegende, für Automation geeignete Verfahren entwickelt worden.

Das Vorkommen sowohl des Blotalbumins als auch des α_1 -Antitrypsins in der Milch dient grundsätzlich als Ausdruck für Euterentzündung, und die Haltigkeit weist Korrelation mit der Schwierigkeit der Entzündung auf.

In der Praxis ist die Ermittlung des Blotalbumins aus der Milch arbeitsaufwendig und verlangt u. a. immunochemische Verfahren, aber die Ermittlung des α_1 -Antitrypsins ist sehr leicht, weil sie enzymatisch durch Messen der Proteaseninhibitorkapazität der Milch ausgeführt werden kann.

Aus diesem Grunde ist das nachstehend beschriebene Verfahren für die Ermittlung von Euterentzündung entwickelt worden,

18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

63 339/12

- 5 -

das sich auf die Ermittlung des Antitrypsins aus Milchproben gerade auf Grundlage der soeben genannten Proteaseninhibitorkapazität gründet.

Bei der Entwicklung des Verfahrens hat man besonders beachtet, daß das Verfahren sich für die Behandlung von großen Zahlen von Proben eignen muß. Am einfachsten kann die Aktivität des Proteaseninhibitors dadurch gemessen werden, daß zur Probe Trypsin gemischt wird und die proteolytische Aktivität des übermäßigen Trypsins gemessen wird. Die proteolytische Aktivität kann leicht dadurch gemessen werden,

- a) daß kleinmolekuläre organische Substrate, wie z. B. BAPNA (N-Benzoylargin-p-nitroanilid) verwendet werden, oder
- b) daß die Zersetzung von Proteinen, wie z. B. von Kasein, als Maß verwendet wird (z. B. Kaseolyse).

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Beispielen näher erläutert.

In der beiliegenden Zeichnung zeigen:

Fig. 1: als von oben betrachtet eine im Verfahren gemäß der Erfindung zu verwendende sogenannte Mikrotiterscheibe;

Fig. 2: Meßergebnisse, die mittels des Verfahrens gemäß der Erfindung erhalten worden sind, graphisch dargestellt.

Die Erfindung kann auf zwei verschiedene Weisen angewendet werden:

18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

63 339/12

- 6 -

Verfahren A:

Vorbehandlung der Proben: Milchproben von je 1 ml werden mit Rennin, 0,1 ml, aufgeklärt, das vorher auf 1/50000 verdünnt worden ist unter Verwendung von 0,1 M Azetatpuffer, pH 5,0. Das Aufklären erfolgt so, daß die Milch-Rennin-Mischung 30 Minuten bei 37 °C inkubiert wird und die Proben zentrifugiert oder gefiltert werden.

Zum Messen der Trypsininhibitorhaltigkeit wird von den aufgeklärten Milchproben 0,1 ml verwendet, und die Messung wird wie folgt vorgenommen: Die aufgeklärten Milchproben werden in die Aushöhlungen der Mikrotiterscheiben dosiert. Hiernach werden in die Aushöhlungen 0,1 ml normalisierter Trypsinlösung (2,5 µg/ml, aufgelöst in 1 mM HCl) und 0,1 ml einer Substratlösung, die 1 mg N-Benzyloxycarbonyl-L-tyrosyl-L-phenylalanine-p-nitroanilid (BAPNA) in 1 mg von destilliertem Wasser enthält, hinzugesetzt.

In jeder Aushöhlung der Mikrotiterscheibe wird je eine Milchprobe behandelt. Darüber hinaus weist die Mikrotiterscheibe zum Messen der Hintergrundwerte eine leere Reihe oder sogenannte "blank row" auf, sowie eine normalisierte Verdünnungsserie (1, 1/2, 1/4, ..., 1/64) der von den Molkereien gemischten Milch, die die durchschnittliche Qualität der Milch repräsentiert, und außerdem noch eine 100 % Trypsinkontrolle.

Es ist festgestellt worden, daß die Menge des Trypsininhibitors in der Milch proportional zum Grad der Euterentzündung ist, d. h., die Menge gibt Ausdruck für den Grad der Entzündung.

18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

63 339/12

- 7 -

Unter diesen Umständen liegt die Idee bei der Verwendung der von den Molkereien gemischten Milch (die den durchschnittlichen Gesundheitsgrad der Kühe repräsentiert) als normalisierte Verdünnungsserie darin, daß die Ergebnisse für jede einzelne Kuh auch im Vergleich zur normalisierten Verdünnungsserie angegeben werden können, d. h. durch Angabe, ob die betreffende einzelne Kuh gesunder oder kranker ist im Vergleich zum Durchschnittswert. Dies erleichtert die Standardisierung des Verfahrens beachtlich.

Nach der Hinzusetzung der Reagenzien wird die Mikrotiter-scheibe oder der FP-Cuvette-Block 3,5 Stunden lang inkubiert, wonach die Menge der in den Aushöhlungen gebildeten gelben Farbe mit einem gemäß dem sogenannten Grundsatz des senkrechten Messens arbeitenden Titertek Multiskan oder FP-901 Analyzer gemessen wird, welche Geräte u. a. in folgenden Literaturhinweisen und Patenten beschrieben worden sind:

Suovaniemi, O., "Performance and properties of the Finn-pipette Analyzer System", Proceedings of the Second National Meeting on Biophysics and Biotechnology in Finland, Kairento, A. L., Riihimäki, E. and Tarkka, P., Editors., Seiten 183-187 (1976);

Suovaniemi, O., "Method for Improving the Rate and Measurement Accuracy of Chemical Analysis", US Patent Nr. 4.144.030;

Suovaniemi, O., Järnefelt, J., "Discrete Multichannel Analysis Systems", International Laboratory, April 1982, and American Laboratory, June 1982, und

Suovaniemi, O., die Patente CA 1.031.193, FR 7.442.147, GB 1.542.526, 1.392.792, US 4.144.030, 4.147.752.

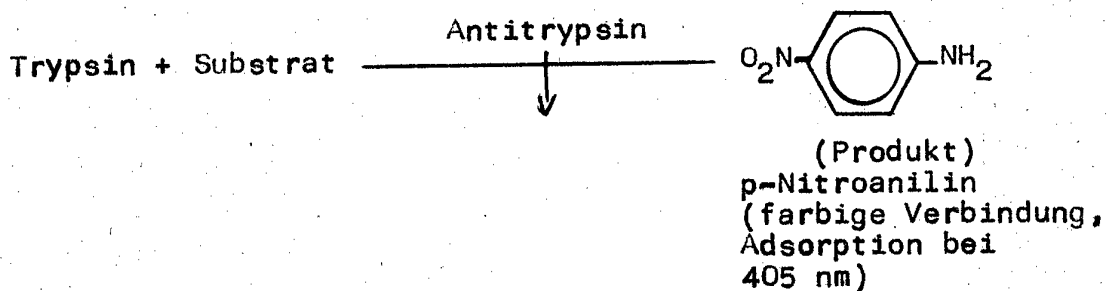
18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

- 8 -

63 339/12

Fig. 1 stellt die Ordnung der Proben in einer Mikrotiter-scheibe dar. Mit Bezugsnummer 1 werden die Proben bezeichnet, die die Nummern 1-80 haben. Die normalisierte Verdünnungsserie ($1/1$, $1/2$, $1/4$... $1/64$) wird mit Nummer 2 bezeichnet. Die Nummer 3 steht für die 100 % Trypsinkontrolle (keine Milchprobe), und die Nummer 4 die leere Reihe. Die Bestimmung des Trypsininhibitors aus einer Milchprobe gründet sich auf die folgende biologische Reaktion.



Das heißt, das in die Aushöhlung der Mikrotiterscheibe hinzugesetzte Trypsin zersetzt das BAPNA (Substrat) zu einer farbigen Verbindung. Das aus der Milch stammende Antitrypsin verhindert diese Reaktion durch Inaktivierung des Trypsins.

Je mehr Trypsininhibitor die Milchprobe enthält, um so effektiver verhindert sie die Aktivität des Trypsins und somit die Entstehung der Farbe.

Das Vorkommen des Trypsininhibitors in der Milchprobe ist also umgekehrt proportional zur Stärke der zu messenden Farbe.

Weil es früher festgestellt worden ist, daß die Haltigkeit des Trypsininhibitors in der Milch proportional zum Grad der

18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

- 9 -

63 339/12

Euterentzündung ist, kann man auf Grundlage der oben beschriebenen Versuchsanordnung sagen, daß je effektiver die Milchprobe die Bildung von Farbe auf einer Mikrotiter-scheibe verhindert, um so schwerer ist die Euterentzündung, die vorhanden ist.

Die Situation wird in Fig. 2 graphisch dargestellt. Darin zeigt die Kurve 5 Ergebnisse aus "gesunder" Milch, die Kurve 6 aus bei der Molkerei gemischter Milch, die Kurve 7 Ergebnisse aus einem auf 1/40 verdünnten Serum, und die Kurve 8 aus "Euterentzündungsmilch".

Bei der Entwicklung des Verfahrens sind die Verhältnisse derart geordnet worden, daß es für die einzelnen Milchproben genug ist, wenn nur eine Verdünnung im Bereich von 1/4 - 1/10 vorgenommen wird und das erhaltene Ergebnis mit der mit bei der Molkerei gemischter Milch erhaltenen Standardkurve (vgl. die graphische Darstellung) verglichen wird.

In den gewählten Versuchsverhältnissen werden die Unterschiede zwischen kranken und gesunden Kühen gerade mit dieser Verdünnung am besten sichtbar.

Es ist zu beachten, daß die von den Molkereien gemischte Milch (in diesem Fall von rund 5000 Kühen) auf Grund der Meßergebnisse (vgl. die graphische Darstellung) mehr Antitrypsin enthält als die aus einer gesunden Kuh erhaltene Milch. Dies ist auch verständlich in dieser Zeit, wenn man sich daran erinnert, daß rund 40 % der Kühe an Euterentzündung erkrankt sind, davon ein Teil latent, und daß in diesem Augenblick

18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

63 339/12

- 10 -

kein Mittel vorhanden ist zur systematischen zitzenbezogenen und individuellen Beobachtung der Kühe.

Verfahren B:

Das andere alternative Verfahren gründet sich auf Kaseolyse. Zu den Milchproben wird auf der Scheibe mit Aushöhlungen Käselab (Rennin) hinzugesetzt, wie im Verfahren A, wobei in Anwesenheit von Kalzium Kalziumparakaseinat geformt wird, das die Probe trübe macht. Wenn jetzt das Trypsin hinzugesetzt wird, wie im Verfahren A, wird die Probe als Folge der Kaseolyse aufgeklärt. Der Grad der Aufklärung wird nach einer Inkubation von einer Stunde gemessen. Standardisierung wie im Verfahren A. Betreffend sowohl das Verfahren A als auch das Verfahren B, können also unter den gewählten Verhältnissen auf einer Mikrotiterscheibe achtzig (80) Milchproben behandelt werden. Im Laufe eines Arbeitstages kann eine Person mit dem betreffenden Verfahren etwa 1000 Milchproben behandeln und davon die Ergebnisse herausbringen.

Die Behandlung der Ergebnisse wird besonders dadurch erleichtert, daß der Scheibenableser mit einer Datenverarbeitungsanlage verbunden ist, die im voraus für die Behandlung und für den Output der zu messenden Milchproben programmiert worden ist.

Die erste ziemlich umfangreiche Untersuchung durch Benutzung des beschriebenen Verfahrens wurde beim Messen der Milchproben von 1029 Kühen vorgenommen.

18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

63 339/12

- 11 -

Es wurde entdeckt, daß bei den beschriebenen Verfahren die Meßgenauigkeit und Wiederholbarkeit etwa 6 % vom Durchschnittswert ist. Diese Zahl enthält auch die Unterschiede, die aus Unterschieden zwischen Mikrotiterscheiben und aus Variationen von Tag zu Tag herrühren.

Die Ergebnisse, die bei den Versuchen erhalten wurden, wiesen gute Korrelation mit zwei anderen Weisen der Messung von Euterentzündung (Messung des Albumins in der Milch sowie Zählen der Zellen) auf.

Wenn das auf Messung des Antitrypsins gegründete Verfahren mit den anderen gebräuchlichen Verfahren (z. B. Albuminmessung oder Zählen von Zellen) verglichen wird, wird beim Messen des Antitrypsins ein sehr bedeutender zusätzlicher Vorteil erreicht: die Vorbehandlung der Proben ist leicht, weil sie entweder durch Hinzusetzung von Natriumazid (eine Verbindung, die durch Wachstum von Bakterien inhibiert) oder durch Gefrieren abbewahrt und gelagert werden können. Beim Antitrypsin (im Gegenteil zu den anderen Verfahren) stören die genannten Maßnahmen die Messung nicht.

Die erleichterte Vorbehandlung ist von wesentlicher Bedeutung, damit große Zahlen von Proben behandelt werden könnten. Dies ermöglicht auch eine tier- und zitzenbezogene Beobachtung.

18.4.1984

AP G 01 N/258 080/6

63 339/12

- 12 -

Erfindungsanspruch

1. Verfahren für quantitative Ermittlung von Euterentzündung so, daß der zu messende Faktor der Trypsininhibitor ist, der in der Milch im Zusammenhang mit Euterentzündung vorkommt, gekennzeichnet dadurch, daß die Ermittlung des Trypsininhibitors ausgeführt wird entweder
 - a) unter Benutzung einer Farbenreaktion, wobei eine normalisierte Trypsinmenge aus dem N-Benzoylarginin-p-nitroanilid eine gefärbte Verbindung p-Nitroanilin befreit, bei dem das Antitrypsin als Inhibitor der Farbenentwicklung tätig ist, indem es die Aktivität des Trypsins verhindert, oder
 - b) auf Grundlage der Aufklärung des eigenen Kaseins der Milch.
2. Verfahren gemäß Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Farbenreaktion oder die Aufklärung des Kaseins als Veränderung der optischen Dichte mit einem Gerät für die Messung der optischen Dichte gemessen und daß die Menge des Antitrypsins als optische Dichte ermittelt wird.
3. Verfahren gemäß Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß die Messungen ausgeführt werden unter Benutzung einer sogenannten Mikrotiterscheibe oder eines FP-Cuvette Blocks und von entsprechenden gemäß dem sogenannten Grundsatz des senkrechten Messens arbeitenden Meßgeräten (Titertek Multiskan und FP-901 Analyzer) sowie eines mit den Meßgeräten verbundenen geeigneten Kleincomputers, der im voraus für die Behandlung der Ergebnisse programmiert worden ist.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

