

Immunglobulingehaltsbestimmung boviner Nativkolostrumproben mittels Refraktometer und ELISA

Elena Meininghaus, Anne Thönnissen, Susanne Döring, Andreas Rienhoff, Marc Boelhauve

Einleitung

Ein entscheidender Aspekt in der postnatalen Kälbersversorgung ist das Kolostrummanagement. Für die erfolgreiche Aufzucht von leistungsfähigen Jungtieren ist somit die frühzeitige Gabe von Kolostrum mit einem hohen IgG-Gehalt unerlässlich. Aufgrund von unterschiedlichen Einflussfaktoren, wie z.B. dem Gesundheits- und Impfstatus des Muttertieres, sind die Spannweiten der IgG-Qualität jedoch sehr groß. Im Rahmen der Erstversorgung der neugeborenen Kälber wird der IgG-Gehalt daher häufig direkt vom Landwirt bestimmt. Diese Konzentrationsbestimmung der Immunglobuline erfolgt über die Messung des Brechungsindex (Brix %) mittels eines Refraktometers, das von Landwirten in der alltäglichen Praxis gut verwendet werden kann (QUIGLEY et al. 2013). Für eine exaktere Analyse im Labor und zur Überprüfung der Messgenauigkeit des Refraktometers eignet sich z.B. die Enzyme-linked Immunosorbent Assay Methode (ELISA) (WEAVER et al. 2000). In der vorliegenden Studie wurden beide Methoden zur Überprüfung der jeweiligen Messgenauigkeit zur Kolostrumqualität gegeneinander getestet.

Material und Methoden

Für die Untersuchung wurden 92 Kolostrumproben von 19 rinderhaltenden Betrieben auf den IgG-Gehalt mittels ELISA und Refraktometer untersucht. Alle Proben wurden nach betriebsüblichen Arbeitsabläufen zur ersten Melkung nach der Abkalbung genommen und bei -20°C bis zur Bearbeitung gelagert. Das Assayprotokoll wurde in Anlehnung an Gelsing et al. (2015) übernommen. Die Microplate (Nunc-Immuno™) wurde mit dem Capture-Antikörper Anti IgG (Fa. Sigma Aldrich B5645) o/n bei 4°C beschichtet und anschließend mit 0,5% Gelatine (Fa. VWR 24360.233) geblockt. Das Kolostrum wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, nach Zentrifugation entfettet (3.000xg, 4°C, 5 Min.) und dann mit PBS-Tween20 1:10⁶ verdünnt. Jede Probe wurde in einer zweierlogarithmischen Verdünnungsreihe dupliziert auf die Assayplatte aufgetragen (100 µl/Well), so dass eine Spalte eine Probe repräsentierte. Als Standard wurde bovines IgG (Fa. Sigma Aldrich I5506) verwendet. In PBS-

Tween20 gelöst wurde eine Standardreihe mit den folgenden Konzentrationen erstellt 1.000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813 ng/ml und für jedes Assay in Doppelbestimmung gemessen. Als Negativkontrolle diente PBS-Tween20. Der Detection-Antibody (Fa. Sigma Aldrich A5295) wurde 1:50.000 verdünnt und aufgetragen. Als Substrat diente Tetramethylbenzidin und wurde nach 10 Minuten Inkubation im Dunkeln mit 1M H₂SO₄ gestoppt. Die Absorption wurde mit einem Microplate Reader (Fa. Biorad x-Mark) bei 450 nm gemessen und mit Hilfe einer Four-Parameter-Logistic (4PL)-Curve der Software my Assay ausgewertet. Die Standardkurve wurde nur dann verwendet, wenn R² > 0,9 lag und die Messwerte der Duplikate eine Abweichung von <10% hatten. Parallel dazu wurden die Nativproben mit einem digitalen und einem analogen Refraktometer (Fa. Küss Optronic DR 101-60 bzw. HRT 32) gemessen. Die Kalibration erfolgte mit destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Proben, wie in der Herstelleranleitung beschrieben, aufgetragen und in Brix gemessen. Die Datenauswertung erfolgte deskriptiv und bivariat mit Excel 2010.

Ergebnisse

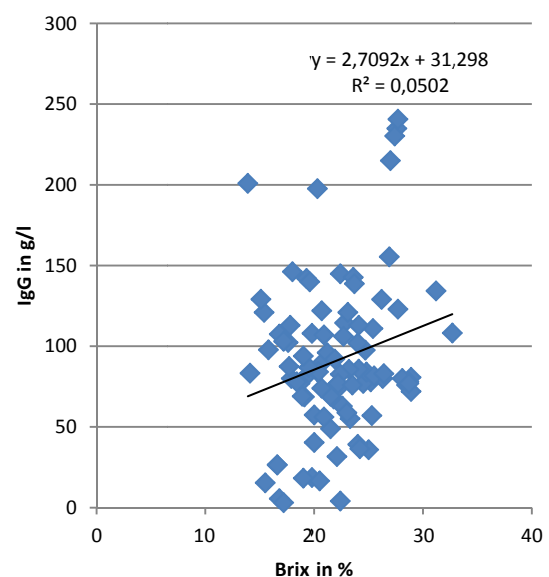


Abb. 1: IgG Gehalt der Kolostrumnativproben (N=92) mittels ELISA (in g/l) und digitalem Refraktometer (in Brix %) gemessen.

Die Ergebnisse zwischen dem analogen und digitalen Refraktometer unterscheiden sich nicht signifikant ($R^2 = 0,9778$, Tab. 1). Eine Korrelation

der Messwerte zwischen ELISA und digitalem Refraktometer wurde in dieser Versuchsreihe nicht nachgewiesen (s. Abb. 1).

Tab. 1: Statistische Kenngrößen zu Messergebnissen von IgG mittels ELISA und Refraktometer

IgG Gehalt (N=92)	ELISA (g/l)	Refraktometer digital (Brix %)	Refraktometer analog (Brix %)	Bestimmtheitsmaß (R^2)	
				ELISA – Refraktometer digital	Refraktometer digital – Refraktometer analog
Median	3,09	22.1	22.5	0,0502	0,9778
Min	83,2	13.9	14.4		
Max	240,64	32.7	33		

Diskussion

Das Refraktometer ist aufgrund von geringem Kosten- und Zeitaufwand in der Praxis ein guter Maßstab, um die Qualität von Kolostrum beurteilen zu können (BIELMANN et al. 2010). Im Gegensatz dazu erzielte durch einen hohen Kosten- und Zeitaufwand sowie das nötige geschulte Personal der ELISA-Einsatz zur IgG Gehaltsbestimmung bisher keine flächendeckende Praxistauglichkeit (HOGAN et al. 2015). Da mit dem Refraktometer jedoch lediglich eine Dichtemessung des Kolostrums anhand des Brechungsindex bestimmt wird, gibt es nur einen groben Richtwert über den tatsächlichen IgG-Gehalt wieder. Dennoch fanden HOGAN et al. (2015) bei 126 Kolostrumproben eine Genauigkeit zwischen ELISA und Refraktometer-Werten von 98%. In der vorliegenden Studie konnte jedoch nur ein sehr geringer Zusammenhang zwischen den beiden angewandten Untersuchungsmethoden digitales Refraktometer und ELISA festgestellt werden ($R^2 = 0,0502$). QUIGLEY et al. (2013) beschreiben ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,75$ zwischen den gemessenen Werten mittels Refraktometer und radial immunodiffusion (RID), einer flächendeckend angewendeten Methode, die bislang als „Goldstandard“ gilt. In einer weiteren Studie stimmen nur ca. 50-70% der Refraktometer-Ergebnisse mit denen der RID überein (MORRILL et al. 2015). Anhand dieser Literaturwerte muss also davon ausgegangen werden, dass die drei Methoden im gewissen Rahmen substituierbar sind, obwohl der direkte Vergleich der verschiedenen Methoden noch nicht publiziert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Konsistenz von ELISA und Refraktometer nicht erzielt. Zum einen ist im Vergleich zu anderen Studien der Stichprobenumfang der vorliegenden Studie deutlich geringer (N=92) und somit sind die Ergebnisse als weniger repräsentativ zu werten.

Des Weiteren können labormethodische Fehler nicht ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz kann auf Grundlage dieser Untersuchung keine Empfehlung zum Refraktometereinsatz für die Praxis gegeben werden, da viele Kolostrumproben schlechter eingestuft wurden, als sie es im Vergleich zu den ELISA-Ergebnissen waren. Aufgrund dieser Kontroversen sollten die vorliegenden Ergebnisse in einer zweiten Untersuchungsreihe mit erhöhtem Stichprobenumfang überprüfen werden.

Danksagung: Diese Arbeit wurde von der Tierseuchenkasse NRW finanziert.

Quellen

- BIELMANN V1, GILLAN J., PERKINS N.R., SKIDMORE A.L., GODDEN S., LESLIE K.E. (2010): An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle, *J Dairy Sci.* 2010 Aug; 93(8):3713-21. doi: 10.3168/jds.2009-2943
- GELSINGER S.L., SMITH A.M., JONES C.M., HEINRICHS A.J. (2015): Technical note: Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plasma, *Journal of dairy Science* 98:4084-4089
- HOGAN I., DOHERTY M., FAGAN J., KENNEDY E., CONNEELY M., BRADY P., RYAN C., LORENZ I. (2015): Comparison of rapid laboratory tests for failure of passive transfer in the bovine, *Ir Vet J.* 2015; 68(1): 18
- MORRILL, K.M., ROBERTSON K.E., SPRING M. M., ROBINSON A. L., TYLER H.D. (2015): Validating a refractometer to evaluate immunoglobulin G concentration in Jersey colostrum and the effect of multiple freeze-thaw cycles on evaluating colostrum quality, *Journal of Dairy Science* 98:595-601
- QUIGLEY, J.D, LAGO A., CHAPMAN C., ERICKSON P., POLO J. (2013): Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum, *Journal of Dairy Science* 96:1148-1155
- WEAVER, D.M., TYLER J.W., VAN METRE D.C., HOSTETLER D.E., BARRINGTON G.M. (2000): Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves, *Review J. Vet. Intern. Med.* 14, 569-577