

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) in den Routinebetrieb einer Besamungsstation zum Nachweis der Bovinen Leukozyten-Adhäsions-Defizienz (BLAD) zu integrieren. Hierbei besaß die Aussagesicherheit der Analysen oberste Priorität. Ebenso waren Praktikabilität und finanzieller Aufwand wichtige Kriterien.

Von August 1992 bis Dezember 1993 wurden insgesamt 783 Analysen (Blut -und Spermaproben) durchgeführt. Von August 1992 bis Februar 1993 wurde mit einem Protokoll des Forschungsinstitutes für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dr. M. Schwerin, Dummerstorf die BLAD-Diagnose bei 263 Rindern vorgenommen. Dann traten in der elektrophoretischen Darstellung regelmäßig unscharfe Banden auf, die keine eindeutige Zuordnung des BLAD-Status ermöglichten. Da Modifikationen des Protokolls keine reproduzierbaren Besserungen mit sich brachten, wurden neue Primer und ein neues Protokoll von W. Schmidt (Institut für molekularbiologische Diagnostik, Bornheim) entwickelt, das für die Analyse von 520 Tieren eingesetzt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit war es möglich, die Sicherheit und Praktikabilität der PCR-Protokolle anhand von durchgeführten Doppelproben (Proben von Tieren, die im zeitlichem Abstand zweimal untersucht worden sind) zu bewerten. Proben heterozygoter Tiere wurden grundsätzlich zweimal untersucht. Nur die doppelt untersuchten Proben homozygot gesunder Tiere wurden zur Bewertung der Sicherheit und Praktikabilität des Protokolls herangezogen. Eine Wiederholung der Analyse fand nur statt, wenn die erste Untersuchung kein eindeutiges Ergebnis lieferte, z. B. beim Ausfall des PCR-Produktes oder undeutlicher Aufspaltung und Darstellung in der Elektrophorese.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Im Untersuchungszeitraum von August 1992 bis April 1993 mußten 23% der untersuchten homozygot gesunden Tiere zweimal analysiert werden. Diese Doppelproben reduzierten sich im folgenden Untersuchungszeitraum von April 1993 bis Dezember 1993 auf 4%. Somit ergibt sich beim Vergleich der beiden Protokolle eine deutliche Reduzierung der durchgeführten Doppelproben, d. h. der fraglichen Diagnosen bei homozygot gesunden Tieren.

2. Von August 1992 bis April 1993 konnte nach der ersten Untersuchung in 76% der Fälle eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Im folgenden Untersuchungszeitraum von April 1993 bis Dezember 1993 konnte nach der ersten Analyse in 86% der Fälle eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Alle Verdachtsdiagnosen konnten durch die zweite Untersuchung bestätigt werden.

3. In bezug auf die BLAD-Carrier-Frequenz konnte in Abhängigkeit des Untersuchungszeitpunktes eine Abnahme heterozygoter Tiere registriert werden. Im Zeitraum von August 1992 bis April 1993 wurde bei 13% der routinemäßig untersuchten Rinder die Punktmutation nachgewiesen. Das darauffolgende Untersuchungsintervall, April 1993 bis Dezember 1993, identifizierte eine BLAD-Carrier-Frequenz von 3,5%. Es wurden keine homozygot erkrankten Tiere ermittelt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die PCR in den Routinebetrieb einer Besamungsstation zum Nachweis der BLAD integriert werden kann.

Es müssen jedoch Grundvoraussetzungen räumlicher (separate Räume) und personeller (Fachpersonal) Natur erfüllt werden, um eine erfolgreiche Eingliederung eines PCR-Labors im Hinblick auf Aussagesicherheit der Analysen, Praktikabilität und Rentabilität zu schaffen.

7. Summary

Karin Duesmann

Incorporation of Polymerase-Chain-Reaction (PCR) into the daily use of an Artificial Insemination Centre with the aim to detect Bovine Leukocyte-Adhesion-Deficiency (BLAD)

The purpose of the present study was to integrate the Polymerase-Chain-Reaction (PCR) in the daily use of an Artificial Insemination Centre, to diagnose Bovine Leukocyte-Adhesion-Deficiency (BLAD). The first priority was the safety of declaration of the analysis. The practicability and the financial cost were further important criteria.

The 783 analyses (Blood samples, semen samples) were carried out from August to December 1993. From August 1992 to February 1993, 263 BLAD-diagnoses were accomplished using a protocol from the "Institute of Research for the Biology of Farm Animals", Dr. M. Schwerin, Dummerstorf. However blurred bands appeared regularly in electrophoresis, allowing no definite conclusions to BLAD-status. Since several modifications of the protocol did not result in any reproducible improvements, a new Primer and protocol were employed as developed by W. Schmidt, Institute for the Diagnosis of Molecularbiology, Bornheim, which was used for analysing samples from 520 animals.

The present study allowed via the double-sample, the evaluation of the safety and practicability of the PCR protocol. The heterozygotic samples were generally examined twice. Only samples from homozygotic healthy animals had been examined twice and evaluated for safety and practicability aspect. A second analysis had been carried out when the first examination failed to provide definite results, e. g. if there was no PCR-product or if there was an obscure breakdown and representation of electrophoresis.

The following results were obtained:

1. During the period of examination from August 1992 to April 1993, 23% of the examined homozygotic healthy animals were analysed twice. In the following period

of examination from April 1993 to December 1993, the percentage of double-samples were reduced to 4%. The comparison of the two protocols shows a clear reduction of the double-samples, e. g. questionable analyses.

2. From August 1992 to April 1993 a diagnosis could be made in 76% of the cases after the first examination. In the period of examination from April 1993 to December 1993, a suspected diagnosis could be made in 86% of the cases upon first analysis. A diagnosis could be confirmed through the first examination without exception.

3. In reference to the BLAD-Carrier-frequency, a decrease in heterozygotic animals was registered. In the period from August 1992 to April 1993, 13% of the routinely examined animals showed a point mutation. In the second period from April 1993 to December 1993, the frequency of BLAD-Carriers was 3.5%.

Collectively, these data indicate that the PCR can be integrated in the daily use of an Artificial insemination Centre to diagnose BLAD.

Basic requirements facilities (separate rooms) and staff (qualified staff) are necessary for a successful integration of a PCR-Laboratory with regard to safety of declaration, practicability and profitability.