

Das Hämadsorptions- und Hämagglutinationsvermögen der 4 *Mycoplasma gallisepticum* (MG)-Stämme A5969, A514, S6 und S6ex336 wurde geprüft und verglichen. Bei allen Stämmen konnte die Fähigkeit Hühnererythrozyten zu hämadsorbieren und zu agglutinieren nachgewiesen werden. Unter Standardbedingungen lag der HA-Titer des Stammes A5969 mit 1:16 (nicht-konzentriertes Antigen) bzw. 1:256 (konzentriertes Antigen) regelmäßig um eine Titerstufe höher als der der anderen Stämme.

In Hämadsorptions- und Selektionsversuchen zeigten die Flüssigkulturen aller Einzelkolonien homogene HA-Titer. Daraus wurde geschlossen, daß bei den 4 getesteten MG-Stämmen keine Dissoziation in hämagglutinierende und nicht-hämagglutinierende Varianten stattfindet.

Ein Einfluß der Inkubationsdauer auf das HA-Vermögen konnte nachgewiesen werden. Nach 16-stündiger (A5969, S6ex336) bzw. 20-stündiger Bebrütungsdauer zeigte der HA-Titer eine abnehmende Tendenz. Eine 40-stündige Inkubationsdauer führte zum Verlust der HA-Aktivität. Die Verwendung einer 1%igen statt einer 5 oder 10%igen Inokulationsmenge hatte bei den Stämmen A5969 und S6 nach einer Passage den Abfall der HA-Titerhöhe um eine Titerstufe zur Folge.

Das HA-Verhalten der Stämme zeigte sich unbeeinflusst vom Ausgangs-pH-Wert der Bouillon (7,8 oder 8,2), von 10 Nährbodenpassagen sowie von der Bebrütung der Kulturen in einer 10%igen CO₂-Atmosphäre oder im Schüttelbad statt im Brutschrank.

Es wurde geprüft, ob eine Variation der Bestandteile des Frey-Mediums einen Einfluß auf die Ausbildung der Hämagglutine hat. Hierbei konnten keine HA-Titerschwankungen von mehr als einer Titerstufe beobachtet werden. Eine Ausnahme bildete die Erniedrigung des Schweineserumgehaltes von 10 auf 5% bei dem Stamm A5969, was die Reduktion des HA-Titers von 1:16 auf 1:2 zur Folge hatte. Die Verwendung eines durch Zusatz von Waymouth-Medium, Trispuffer, L-Histidin und Cystein-HCl und durch Wahl einer 0,2%igen Glukosekon-

zentration modifizierten Frey-Mediums ließ die HA-Titerhöhe und den HA-Titerverlauf unbeeinflusst. Durch Kultivierung der 4 Stämme in diesem Medium fiel der pH-Wert nicht unter 6,0 und das Wachstum, jedoch nicht der HA-Titer der Stämme A5969 und S6 wurde positiv beeinflusst.

Der zellfreie Überstand zentrifugierter Kulturen besaß bei keinem der Stämme HA-Aktivität. Die Zerreibung des konzentrierten Antigens im Glasmörser ließ den HA-Titer unbeeinflusst. Durch eine Ultraschallbehandlung konnten nur bei den Stämmen S6ex336 und A514 die Verteilung der Antigene im Suspensionsmittel verbessert, sowie die HA-Titer in etwa der Hälfte der Fälle um eine Titerstufe erhöht werden.

Die Wahl des Resuspensionsmittels hatte weder unmittelbar nach der Aufnahme der abzentrifugierten Mykoplasmen noch nach Lagerung des Antigens für 48-72 Stunden bei 4°C oder für 3 Monate bei -70°C einen Einfluß auf das HA-Vermögen. Die HA-Titer blieben innerhalb dieser Aufbewahrungszeiträume unverändert. Die Reaktionstemperatur (Zimmertemperatur, 37°C) besaß keinen Einfluß auf die HA-Titerhöhe. Bei Verwendung einer 0,5%igen statt einer 0,75%igen Erythrozytensuspension lagen die ermittelten HA-Titer regelmäßig um eine Titerstufe höher.

Elisabeth Huntenburg:

Production of a hemagglutinating *Mycoplasma gallisepticum* antigen for the hemagglutination-inhibition test

7. SUMMARY

The hemadsorption and hemagglutinating (HA) activity of the 4 *Mycoplasma gallisepticum* (MG) strains A5969, A514, S6 and S6ex336 were investigated and compared. All of the tested strains showed the ability to hemadsorb and to agglutinate chicken erythrocytes. Under standard conditions the HA titres attained by the strain A5969, as there were 1:16 (nonconcentrated antigen) and 1:256 (concentrated antigen), were regularly higher by one dilution than those attained by the other strains.

In hemadsorption experiments the liquid subcultures of selected colonies showed homogeneous HA titres. These results demonstrated that there is no dissociation in hemagglutinating and nonhemagglutinating variants within any of the tested MG strains.

The incubation period had an influence on the HA capacity. After incubating the cultures for 16h (A5969, S6ex336) or 20h (A514, S6) the HA titres tended to drop. All of the strains lost their HA ability after 40h of incubation. The inoculation amounts (1%, 5%, 10%) hardly affected the HA titres following one subculture. When using 1% instead of 5 or 10% the titres of the strains A5969 and S6 dropped by one dilution.

No change in HA titre was observed following 10 subcultures in Frey medium. The HA capacity of the strains was also not influenced by the pH value of the fresh Frey medium (7,8 or 8,2) or by growth of the organisms in an atmosphere of 10% CO₂. Likewise the agitation of the cultures in a water bath (37°C) had no effect on the HA titres.

The constituents of the Frey medium were varied in order to find out whether the nutrients had an influence on the production of hemagglutinins. The reduction of the swine serum

concentration from 10% to 5% caused the titre of the strain A5969 to drop by 3 doubling dilutions. Otherwise no changes in HA titre of more than one dilution could be observed. The development of the HA titres was unaffected by the use of a modified Frey medium containing only 0,2% glucose and enriched with Waymouth medium, tris buffer, cysteine HCl and L-histidine. When using this medium the pH value of the broth never dropped below 6,0 and the growth rate of the strains A5969 and S6 was improved.

No HA activity was found in the cell-free supernatant of the centrifuged cultures. Attempts were made to increase the dispersion of the organisms in the suspending fluid by homogenizing the concentrated antigen in a glass grinder or by submitting it to sonication. Neither of these measures resulted in HA titre differences of more than one doubling dilution. In the strains S6ex336 and A514 sonication led to an improvement of the antigen dispersion and an increase of the HA titre by one dilution was observed in about 50% of the cases.

The HA capacity of the organisms was unaffected by the use of different suspending fluids. The titres remained unchanged within a storage period of 48-72h at 4°C or of 3 months at -70°C, the longest period tested. The temperature of reaction (room temperature, 37°C) had no influence on the HA titres. By using a 0,5% instead of a 0,75% erythrocyte suspension the titre was regularly increased by one doubling dilution.