

6 ZUSAMMENFASSUNG

Uwe Jark

Etablierung eines ELISA zur Erkennung subklinischer Paratuberkulose-Infektionen beim Rind.

In der vorliegenden Arbeit wird - aufbauend auf den Ergebnissen von RINGENA (1995) - die Weiterentwicklung und Etablierung eines ELISA zur Erkennung subklinischer Infektionen des Rindes mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* beschrieben.

Die 12 Monate dauernde Massenzucht eines *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-Feldstammes wird auf ihre Reproduzierbarkeit hin überprüft. Die Präparation des Lipoarabinomannan-haltigen Antigens wird optimiert und standardisiert; die dabei erreichte Antigenausbeute beträgt 60 mg pro g Bakterienfeuchtmasse.

Für den auf diesem Antigen basierenden ELISA wird eine optimale Diskriminierungsfähigkeit beim zweistündigen Coaten von Polysorp®-Platten mit 200 ng Antigen pro Well in hypertonem Zitratpuffer (pH 6.0) bei 37°C ermittelt. Die Intra- und Interassay-Variationen betragen 20% beziehungsweise 27%.

Zur Etablierung des ELISA wird die Referenz-Standard-Methode mit computergestützter Auswertung benutzt; positiver und negativer "Cut-off-Wert" werden basierend auf den Seren von 131 Tieren berechnet, deren ileocaecallymphknoten kulturell untersucht worden sind. Es ergeben sich ein positiver prädiktiver Wert von 93,75% und ein negativer prädiktiver Wert von 99%.

13 der 131 Seren reagieren zweifelhaft. Mit Hilfe eines gleichfalls entwickelten Affinitäts-ELISA (Waschen der Platten nach Inkubation der Patientenserum mit 4 M Guanidinhydrochlorid) können 30% der zweifelhaften Reagenten (4 Tiere) als richtig positiv identifiziert werden.

Die parallel dreimal in halbjährlichem Abstand durchgeführte Untersuchung und Beratung von neun Betrieben (insgesamt ca. 700 Tiere im Alter über 12 Monate) zeigt, daß bei Beachtung der hygienischen Maßgaben und konsequenter Ausmerzungen ELISA-positiver Reagenten eine deutliche Abnahme der Seroprävalenz (50% pro Untersuchung) zu erzielen ist.

6 SUMMARY

Uwe Jark

Development of an ELISA for the detection of subclinical paratuberculosis infection of cattle.

Based on the results of RINGENA (1995) this work describes the further development and final establishment of an ELISA for the diagnosis of cattle subclinically infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

The mass culture of a clinical *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isolate lasting 12 months was tested for reproducibility. Preparation of the lipoarabinomannan containing antigen has been optimized and standardized; 60 mg of purified antigen were obtained per gram of bacterial wet weight.

The ELISA based on this antigen had the best discriminatory efficacy when ELISA Polysorp®-plates were coated with 200 ng antigen per well in hypertonic citrate buffer (pH 6.0) at 37°C for 2 hours. Intra- and interassay variations were determined to be 20% and 27%, respectively.

The ELISA was based on the reference-standard-method with computer-assisted data analysis using the sera of 131 non-randomly selected animals whose ileocaecal lymphnodes were cultured. After determination of the negative and positive cut-off-values a positive predictive value of 93,75% and a negative predictive value of 99% were calculated.

13 of the 131 sera showed an intermediate reaction. Using a simultaneously developed affinity ELISA (based on a wash with 4 M guanidine hydrochloride) 4 of the intermediate reagents could be identified as positive.

The serological examination of nine herds (approximately 700 animals older than 12 months) done 3 times in intervals of 6 months showed that a clear decrease of seroprevalence (50% per examination) was achievable, if in addition to strictly keeping to hygienic measures, all seropositive animals were taken out of the herd.