

6. SUMMARY

Serological tests for cowdriosis (*Cowdria ruminantium* infection) have been hampered by low specificity due to cross-reactions with *Ehrlichia* species. The production of recombinant DNA encoded antigens or fragments of these led to the development of two new serological tests. Recently, a competitive ELISA using a recombinant MAPI as antigen and an anti-MAPI monoclonal antibody was developed as well as an indirect ELISA based on a *Cowdria* specific region called MAP1B of the recombinant major antigenic protein of *C. ruminantium* (MAPI). Preliminary validation of both tests on a limited number of sera indicated their improved specificity.

In this thesis a classical single dilution indirect ELISA based on a crude antigen prepared from *C. ruminantium* infected caprine jugular endothelial cell cultures was furthermore developed. The three tests were validated using 3000 serum samples of ruminants from 14 islands of the Lesser Antilles as well as sequential serum samples from 10 cattle, 17 goats and 10 sheep vaccinated with inactivated *Cowdria ruminantium* in ISA 50 adjuvant and from 14 goats infected with a virulent culture supernatant. The threshold of the tests had to be adapted considering the frequency distribution of the local negative population. In this way, thresholds were fixed at 50%, 35% and 45% for cattle, goat and sheep sera in the ELISA based on crude antigen and 50% for sera of all species in both ELISA based on recombinant antigens (in percent reactivity of the positive reference serum for the indirect ELISA and in percent inhibition relative to negative reference sera for the competitive ELISA).

Sensitivities observed in sequential serum samples depended on the host species considered. For goats sensitivities of 96.5% for the CJE crag iELISA as well as the MAP1B iELISA, and 92.7% for the MAPI cELISA were found. For sheep, sensitivities of 96.3% - 96.9% were obtained for the MAPI cELISA, 92.3% - 93.2% for the CJE crag iELISA, and 91.6% - 95.4% for the MAP1B iELISA. Sensitivities for bovine sera were lower and more difficult to compare, as individuals reacted very differently. The CJE iELISA and the MAP1B iELISA appeared more sensitive than the MAPI cELISA. The former two judged 8 out of 10 cattle positive for continuous periods and the remaining two sporadically, whereas the latter judges only 7 out of 10 animals positive.

All tests detected significantly higher percentages of positives on the islands of Antigua, Guadeloupe and Marie-Galante, where *C. ruminantium* had been isolated before. Overall specificity calculated with sera from the other 11 islands was 98.1%, 98.5%, and 99.4% for the ELISA based on crude antigen, on recombinant MAPI and on recombinant MAP1B,

respectively. Even for the ELISA based on crude antigen, remaining false positives do not hinder the interpretation of results for epidemiological studies and the test can be used in the monitoring of vaccinations. However, tests based on recombinant antigens, especially the MAP1B based ELISA, showed improved specificity, which suggests their use in future epidemiological studies in regions where the distribution of cowdriosis is unknown. The MAP1 based ELISA as a competitive ELISA can be used for epidemiological studies in wildlife for which species-specific conjugates do not exist.

Furthermore, the results of a PCR assay for *C. ruminantium* specific DNA in ticks collected in Guadeloupe, from cattle of which sera were tested by the MAP1B based ELISA were discussed. A total of 18 out of 84 sera (21.4%) and 130 out of 352 ticks (36.9%) were found to be positive. 32.6% of male ticks were found to be PCR positive against 46.0% of female ticks. A significantly different number of PCR positive ticks was found on seropositive cattle (49.2%) compared to those found on seronegative cattle (34.1%).

RESUME

Ricarda MONDRY

Evaluation des méthodes diagnostiques améliorées pour la détection des infections par *Cowdria ruminantium* en considérant l'épidémiologie dans les petites Antilles

Les tests sérologiques pour la cowdriose (infection des ruminants par *Cowdria ruminantium*) ont une faible spécificité due à des réactions croisées avec certaines espèces d'*Ehrlichia*. La production d'antigènes recombinants ou de fragments de ces antigènes a conduit au développement de deux nouveaux tests sérologiques. Un test ELISA compétition utilisant la protéine antigénique majeure de *C. ruminantium* (MAP1) comme antigène et un anticorps monoclonal anti-MAP1 a récemment été développé, ainsi qu'un test ELISA indirect basé sur une région spécifique de la MAP1, appelée MAP1B. Les essais préliminaires de ces deux tests sur un nombre limité de sérums ont montré une amélioration de la spécificité par rapport aux autres tests.

Dans cette thèse nous avons utilisé un test ELISA indirect dont l'antigène est constitué de *Cowdria* produits en culture de cellule (CJE crag ELISA). Les trois tests ELISA ont été évalués en utilisant 3000 sérums de ruminants provenant de 14 îles des Petites Antilles, ainsi que des sérums expérimentaux prélevés à intervalles réguliers sur 10 vaches, 17 chèvres et 10 moutons vaccinés avec *Cowdria ruminantium* inactivée et émulsionnée dans l'adjuvant ISA 50 et des sérums de 14 chèvres vaccinées par la méthode d'infection et traitement. Les seuils de

Auswertung verbesserter diagnostischer Methoden zum Nachweis von *Cowdria ruminantium* - Infektionen unter besonderer Berücksichtigung der Epidemiologie auf den Kleinen Antillen

Cowdriosis (Herzwasser) ist eine bedeutende Krankheit der Wiederkauer, dessen Erreger, die Rickettsie *Cowdria ruminantium*, durch Zecken der Gattung *Amblyomma* übertragen wird. Die ursprüngliche Verbreitung der Infektion war im afrikanischen Kontinent südlich der Sahara. Einer der Vektoren, *A. variegatum*, wurde jedoch wahrscheinlich Mitte des 19. Jahrhunderts mit dem Erreger in die Karibik eingeschleppt und breitete sich auf mehreren Inseln aus. Der Erreger selbst wurde bisher nur auf den drei Inseln Antigua, Guadeloupe und Marie-Galante nachgewiesen. Eine weitere Ausbreitung der Krankheit würde eine ernste Bedrohung für Nutztiere in der Karibik sowie auf dem amerikanischen Festland darstellen. Hier wurden drei der auf dem Kontinent heimischen *Amblyomma*-Arten experimentell als Vektoren von Herzwasser nachgewiesen.

Die genaue Verbreitung der Krankheit kann nicht ermittelt werden ohne ausreichend sensitive und spezifische diagnostische Methoden. Der Einsatz serologischer Tests für Cowdriosis wurde bislang erschwert durch deren geringe Spezifität aufgrund von Kreuzreaktionen mit *Ehrlichia*-Arten, welche eine enge Verwandtschaft mit *C. ruminantium* aufweisen.

Verschiedene serologische Tests sind bisher entwickelt worden: (i) auf infizierten Mauseperitonealmakrophagen (DU PLESSIS, 1981a), neutrophilen Ziegengranulozyten (LOGAN et al., 1986) oder Rinderendothelzellen (MULLER-KOBOLEID et al., 1992, MARTINEZ et al., 1990) basierende IFAT, (ii) ein indirekter ELISA mit aus infizierten Rinderendothelzellen gewonnenem Antigen (MARTINEZ et al., 1993b, künftig BUECRAG-ELISA genannt), (iii) ein kompetitiver ELISA, der auf einem monoklonalen Antikörper gegen das MAP1-Protein beruht (JONGEJAN et al., 1991c), und (iv) eine Immunoblotmethode, die auf der Erkennung des MAP1-Proteins basiert (MAHAN et al., 1993). Leider wiesen alle Tests Kreuzreaktionen mit verschiedenen *Ehrlichia*-Arten auf.

Einige dieser Tests sind früher benutzt worden, um die Verbreitung der Cowdriosis auf den Kleinen Antillen zu bestimmen. Obwohl positive Seren auch auf anderen Inseln als Antigua, Guadeloupe und Marie-Galante gefunden wurden, zeigten alle Studien eine höhere Prozentzahl

an positiven Seren von diesen drei Inseln verglichen mit den restlichen Inseln. Die Abwesenheit des Erregers auf den anderen Inseln konnte zwar nicht bewiesen werden, wurde aber gefolgert. Zudem sind seither die Veterinärdienste dieser Inseln auf die Herzwasserproblematik aufmerksam gemacht worden, und bislang wurde noch kein einziger Fall dieser Krankheit außerhalb von Antigua, Guadeloupe und Marie-Galante diagnostiziert (CAMUS und BARRÉ, 1995).

Die Produktion von Antigenen oder Anteilen derselben mittels rekombinanter DNA führte kürzlich zu der Entwicklung zweier weiterer serologischer Tests. Ein kompetitiver ELISA, der auf einem rekombinanten MAP1 Protein und einem monoklonalen Antikörper gegen dieses Protein beruht, wurde von KATZ et al (1997) entwickelt (künftig MAP1 cELISA genannt). JONGEJAN et al (1993a) zeigten, daß das MAP1 auch von Antikörpern gegen verschiedene Ehrlichia-Arten erkannt wird, und VAN VLIET et al (1995) entwickelten daraufhin einen indirekten ELISA, der nur auf einem spezifischen Teil dieses Proteins beruht, dem MAP1B (künftig MAP1B iELISA genannt).

In dieser Arbeit wurden die beiden auf rekombinanten Antigenen basierenden ELISA Tests das erste Mal außerhalb ihres Ursprungslabors beurteilt und mit einem klassischen auf infizierte Ziegenjugularendothelzellen beruhenden ELISA (künftig CJE crag iELISA genannt) verglichen, der in Anlehnung an den BUE crag iELISA entwickelt wurde.

Die drei Tests wurden ausgewertet mittels 3000 Seren von Wiederkäuern 14 verschiedener Inseln der Kleinen Antillen, sowie mittels experimentell gewonnenen Seren. Die Seren von den Kleinen Antillen stammten aus der Serensammlung des CIRAD-EMVT und enthielten 1218 Rinder-, 770 Ziegen- und 1012 Schafseren, die 1992 gewonnen und schon mit dem BUE crag iELISA getestet worden waren. Es wurde daher davon ausgegangen, daß in der Karibik, zumindest zu diesem Zeitpunkt, keine Cowdriosis außerhalb von Antigua, Guadeloupe und Marie-Galante existierte, und Seren, die von den anderen 11 Inseln stammten, konnten daher als lokale negative Gruppe zur Grenzwertbestimmung für alle 3 Tests verwendet werden. Dabei wurde für jeden Test und jede Spezies ein Grenzwert anhand der Häufigkeitsverteilungen von 922 Rinder-, 553 Ziegen-, und 943 Schafseren graphisch ermittelt. Es wurden Grenzwerte von 50% für Rinder-, 35% für Ziegen und 45% für Schafseren im CJE crag iELISA, und für alle Spezies Grenzwerte von 50% für beide auf rekombinanten Antigenen beruhende ELISA festgelegt.

Die Auswirkung des so erhaltenen Grenzwertes auf die Sensitivität der Tests wurde anhand von Verlaufsseren überprüft, die nach Impfung von 10 Rindern, 17 Ziegen und 10 Schafen mit inaktivierten *C. ruminantium* in dem Adjuvans ISA50 genommen wurden. Rinder und Schafe wurden einmalig geimpft, wohingegen Ziegen nach 80 Tagen eine Wiederholungsimpfung sowie eine Belastungsinfektion nach weiteren 3,5 (N=5), 15 (N=6) oder 17 (N=6) Monaten erhielten. Zusätzlich wurden Seren von 10 Ziegen, die mit lebenden *C. ruminantium* geimpft und anschließend therapiert wurden, mit dem MAPIB iELISA getestet, um so den Antikörperververlauf von mit lebenden oder inaktivierten Erregern geimpften Tieren zu vergleichen. Die Sensitivität aller Tests zeigte sich als ausreichend bei den ermittelten Grenzwerten, da niedrigere Grenzwerte keine wesentliche Verbesserung der Sensitivität brachten.

Insgesamt erwiesen sich alle drei Tests als brauchbar, um den Verlauf der Antikörpertiter nach der Impfung zu verfolgen. Seren, die nur innerhalb einer kurzen Periode nach experimenteller Infektion gewonnen werden, sollten nicht zur Berechnung der Sensitivität eines Testes verwendet werden, weil alle als positiv bewertet wurden und sich somit eine Sensitivität von 100% ergab. Da jedoch längere Zeit nach der Impfung einige Tiere früher seronegativ werden als andere, können diese Seren mit einbezogen werden. Um die Situation einer epidemiologischen Studie zu simulieren, bei der der serologische Status der Tiere unbekannt ist, wurden von den geimpften Tieren über mehrere Monate Proben gesammelt.

Auf diese Art wurde für Ziegen eine Sensitivität von 96,5% für den CJE crag iELISA und den MAPIB iELISA, sowie 92,7% für den MAPI cELISA (370 Seren von 17 Tieren während 21 Monaten) gefunden.

Für Schafe zeigte der MAPI cELISA dagegen die höchste Sensitivität, da er die Antikörpertiter aller Tiere ab dem 10. Tag nach der Impfung bis zum Versuchsende (190. Tag) als positiv bewertete. Mit dem CJE crag iELISA dagegen wurden sämtliche Tiere zwar erst ab dem 17. Tag, aber ebenfalls bis zum Versuchsende als positiv beurteilt, während der MAPIB iELISA alle Tiere zwar schon ab dem 10. Tag, aber einige nur bis zum 130. Tag als positiv befand. Da in der Versuchsreihe anfangs mehr Proben genommen wurden als gegen Ende, wurde eine Berechnung der Sensitivität nach der gleichen Methode wie für Ziegenseren den anfangs weniger sensitiven Test benachteiligen. Es wurde daher eine hypothetische Sensitivität berechnet, indem angenommen wurde, daß jeden Tag Seren entnommen wurden, und der

Antikörperanstieg und -fall gleichmäßig sei. Somit wurde für den MAPI cELISA die höchste Sensitivität von 96,3% - 96,9% berechnet, wohingegen der CJE crag iELISA mit 92,3% - 93,2% und der MAPIB iELISA mit 91,6% - 95,4% ähnliche Sensitivitäten aufwiesen

Die Beurteilung der Sensitivitäten für Rinderseren erwies sich als problematisch, da die einzelnen Tiere in dem Impfvorsuch sehr unterschiedlich reagierten. Mit keinem Test wurden alle Tiere während mehrerer Wochen durchgehend als positiv bewertet. Alle Tests unterschieden 3 Gruppen von Tieren, die eine unterschiedliche Immunantwort hinsichtlich Antikörperbildung zeigten: 3 Rinder wiesen hohe (Rinder #5032, #2032, und besonders #1002), 3 mittlere (#36, #1010, and #2018), und die restlichen 4 niedrige oder spät ansteigende Titer auf. Größere individuelle Unterschiede für Rinder im Vergleich zu kleinen Wiederkäuern wurden auch schon von VAN VLIET et al (1995) für den MAPIB iELISA bemerkt. Andererseits wurden in dem hier erfolgten Impfvorsuch Rinder verwendet, die zwar vor Versuchsbeginn aufgrund eines in allen 3 Tests erzielten geringen Antikörpertiters ausgewählt worden waren, aber deren genauer Immunstatus nicht eindeutig bekannt war. Zusätzlich konnten Rinder, im Gegensatz zu kleinen Wiederkäuern, während des Versuchsverlaufes nicht in zeckenfreien Ställen gehalten werden, wodurch eine zusätzliche natürliche Infektion einiger Tiere nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden konnte. Selbst eine ungefähre Berechnung der Sensitivitäten erwies sich daher als schwierig, nichtsdestotrotz scheinen der CJE crag iELISA und der MAPIB iELISA eine leicht höhere Sensitivität als der MAPI cELISA aufzuweisen: die ersten beiden Tests bewerteten 8 der 10 Rinder für kontinuierliche Perioden und die restlichen 2 wenigstens sporadisch als positiv, wohingegen der letztere nur 7 Rinder kontinuierlich und die restlichen Tiere nie als positiv beurteilte.

Die Spezifität der 3 ELISA wurde anhand der 922 Rinder-, 553 Ziegen- und 943 Schafseren von den 11 Inseln der kleinen Antillen, auf denen keine Cowdriose vorkommt, berechnet. So wurde für den CJE crag iELISA eine Gesamtspezifität von 98,1% gefunden, mit 97,8% für Rinder-, 99,3% für Ziegen- und 97,6% für Schafseren. Beide auf rekombinanten Antigenen basierende ELISA zeigten eine höhere Spezifität. Der MAPI cELISA wies eine Gesamtspezifität von 98,5% auf, wieder mit einer höheren Spezifität für Ziegen- (99,8%) als für Rinder- (98,5%) und Schafseren (97,8%). Der MAPIB iELISA zeigte eine noch höhere Gesamtspezifität von 99,4%, aber hier war dagegen die Spezifität für Ziegenserum mit 98,9% geringer als für Rinder- (99,7%) oder Schafseren (99,4%).

Alle 3 Tests bewerteten eine auffallend höhere Prozentzahl an Gesamseren pro Insel positiv für Antigua, Guadeloupe und Marie-Galante als für die restlichen 11 Inseln. Die Verteilung der Herzwasserkrankheit auf den kleinen Antillen, die nach Untersuchungen mit jedem dieser Tests gefolgert wurde, stimmt somit überein mit den früher mit anderen Tests erzielten Ergebnissen. Mit dem CJE iELISA und in geringerem Maße auch dem MAPI cELISA wurden jedoch immer noch eine hohe Prozentzahl von falsch positiven Schafseren besonders aus Martinique oder Montserrat beobachtet, was bei reiner Betrachtung von Schafseren in Regionen, in denen die epidemiologische Situation von Herzwasser völlig unbekannt ist, zu Mißinterpretationen führen könnte.

Insgesamt gesehen beeinträchtigen die verbleibenden falsch positiv bewerteten Seren jedoch nicht die Interpretation von Ergebnissen epidemiologischer Studien, die mit einem der drei ELISA Tests, und insbesondere dem sehr spezifischen MAPIB iELISA, durchgeführt werden. Der CJE iELISA bietet sich weiterhin an, um den Verlauf von Antikörpertitern zu kontrollieren, und der MAPI cELISA ist besonders von Vorteil für epidemiologische Studien in Wildtieren, für die keine artspezifischen Konjugate existieren.

Weiterhin wurden die Ergebnisse einer auf der PCR beruhenden Nachweismethode von *C. rumikantium*-spezifischer DNS in Zecken der Art *A. variegatum* (PETER et al., 1995) diskutiert, welche von Rindern stammten, deren Seren mit dem MAPIB iELISA getestet wurden. Dabei wurden 18 von 84 (21,4%) Seren und 130 von 352 Zecken (36,9%) als positiv befunden. Eine signifikant größere Anzahl von Zecken, die von seropositiven Rindern kamen, waren PCR-positiv (49,2% von 65 Zecken), im Vergleich zu Zecken, die von seronegativen Tieren stammten (34,1% von 287 Zecken). Obwohl ein ähnlicher prozentualer Anteil an männlichen (18,0% von 43) und weiblichen (19,5% von 22) Zecken an seropositiven Tieren gesaugt hatte, waren insgesamt nur 32,6% der 239 männlichen gegenüber 46,0% der 113 weiblichen Zecken PCR-positiv. Korrelationen zwischen *C. rumikantium*-spezifischer DNS in Zecken und Antikörpern in Seren von Rindern von denen sie stammen, wurden kritisch diskutiert. Weitere Studien mit einer größeren Probenzahl und gleichzeitiger Berücksichtigung der Anzahl vor Ort auftretender Fälle von Herzwasser sowie dem Saugzustand der Zecken konnten eventuell bestehende Zusammenhänge aufklären.