

6 Zusammenfassung

Actinobacillus pleuropneumoniae (A. pp.) ist ein gramnegatives Bakterium, welches zur Familie der Pasteurellaceae gehört und für das 12 anerkannte Serotypen beschrieben wurden. Infizierte Schweine entwickeln eine fibrinöse Pleuropneumonie und werden zum Träger und Verbreiter des persistierenden Erregers. Es wird eine perakute, akute und chronische Verlaufsform der Erkrankung unterschieden. Der Erreger ist weltweit in schweineproduzierenden Ländern verbreitet und verursacht erhebliche wirtschaftliche Schäden.

Die serologische Diagnostik wird in Deutschland bisher mit der Komplementbindungsreaktion (KBR) in zwei Stufen durchgeführt. Die Durchführung der KBR ist zeit- und arbeitsaufwendig. Bei guter Spezifität ergibt sich oftmals eine unbefriedigende Sensitivität. Das Ziel dieser Arbeit war es, die serologische A. pp.-Diagnostik zu verbessern. Deshalb wurde ein neuer ELISA-Test entwickelt, welcher Antikörper gegen 11 der 12 A. pp.-Serotypen nachweist und zum "Screening" von Schweinebeständen eingesetzt werden kann. Zur Antigengewinnung wurde dabei ein transformierter *E. coli*-Stamm verwendet, der das Apx II-Toxin, ein hochgradig immunogenes Exotoxin von A. pp., bei der Anzucht in Flüssigkultur in Form von Protein-Aggregaten (inclusion bodies) exprimiert. Diese machten 30 % des Gesamtproteingehaltes aus. Nach der Präparation und Aufreinigung dieser Aggregate wurde circa 40 mg gereinigtes Protein pro 1000 ml Flüssigkultur gewonnen. Bei einer Coating-Konzentration von circa 1,2 µg Protein pro ml Coatingpuffer reichte dies zum Beschichten von mehr als 3.000 ELISA-Platten.

Die Eignung des Screening-ELISA wurde durch Paralleluntersuchungen (ELISA/KBR) von 616 Serumproben aus 35 verschiedenen Betrieben, die dem Bundeshybridzuchtprogramm (BHZP) angeschlossen waren, überprüft. Es zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung zwischen KBR und ELISA. Außerdem wurde ein Tierversuch, bei dem 12 Schweine belastet wurden, serologisch überwacht. Dabei konnte eine signifikante Immunantwort der Tiere mit dem neuen ELISA-System dargestellt werden. Die Zuverlässigkeit des neuen Tests wurde unter anderem durch die hohe Reproduzierbarkeit ersichtlich. Die "Well zu Well-Variation" war mit einem Variationskoeffizienten von 7,6 % genauso wie die "Inter-Assay-Variation" mit einem Variationskoeffizienten von 25,6 % sehr niedrig.

Aufgrund der hohen Sensitivität von 96 % und Spezifität von 77 % bei einem "Cut-off-Wert" von 10 EU bzw. einer Sensitivität von 78 % und Spezifität von 96 % bei einem "Cut-off-Wert" von 25 EU in Bezug zum Western Blot, eignete sich der ELISA besser zur Bestandsdiagnose als die KBR, welche bislang als Routinemethode verwendet wurde.

Weiterhin wurde ein zweiter ELISA bzw. eine zweite ELISA-Stufe zur Differenzierung der in Deutschland vorherrschenden Serotypen 2 und 9 entwickelt. Zur Gewinnung der verschiedenen LPS-Antigene wurden die Referenzstämme der verschiedenen

Serotypen verwendet. Es wurde eine Präparationsmethode benutzt, bei der das nach mehreren Präparationsschritten in den Überständen vorhandene, gereinigte LPS durch die Zugabe von $MgCl_2$ -gesättigter, 96 %iger Ethanol-Lösung ausgefällt wurde. Aus 1000 ml Flüssigkultur resultierte eine Ausbeute von circa 12 mg LPS. Bei einer durchschnittlichen Gebrauchsverdünnung der LPS-Präparation von 0,8 μg LPS pro ml Coatingpuffer reichte dies, um 1 500 Mikrotiterplatten mit LPS-Antigen zu beschichten. Für die auf LPS-Antigen basierenden ELISAs konnte eine hohe Diskriminierungsfähigkeit zwischen positiven und negativen Seren und eine starke Übereinstimmung mit der KBR aufgezeigt werden. Anhand von experimentellen ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen die Serotypen 3, 6 oder 7 konnte gezeigt werden, daß sich diese Art von Antigen prinzipiell auch zur Unterscheidung anderer Serotypen von *A. pp.* im ELISA eignet, da kaum Kreuzreaktionen festgestellt wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die neu entwickelten Testverfahren den Anforderungen in der Laborpraxis genügen und sich für die Bestandsdiagnostik sowie die Durchführung von epidemiologischen Studien eignen. Die beiden Testsysteme könnten damit zu einem wertvollen Instrument für die Erkennung und Bekämpfung von *A. pp.*-Infektionen werden.

6 Summary

Gero Leiner

Development of an ELISA for the detection of clinical and subclinical *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infections of pigs.

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pp.*) is a gram-negative bacterium, which belongs to the family of *Pasteurellaceae*. It is possible to differentiate between 12 accepted serotypes. After infection pigs develop a fibrinous pleuropneumonia and frequently become carriers of the persisting pathogen. The clinical course of disease can be peracute, acute or chronic. The disease occurs worldwide and causes large economic losses

In Germany serology using a two-step complement fixation test (CFT) is the primary diagnostic procedure to detect *A. pp.* infected herds. The CFT has a good specificity while the sensitivity is not satisfactory. In addition, performance of the CFT is labour- and time-intensive. Therefore, the aim of this study was to improve the *A. pp.*-serology. A new ELISA-test detecting antibodies against 11 of the 12 different serotypes of *A. pp.* and suitable for screening of herds was developed. For the production of antigen a transformed *E. coli*-strain was used. This strain over-expressed the Apx II -toxin, a highly immunogenic exotoxin of *A. pp.*, in form of inclusion bodies. The amount of the inclusion bodies was 30 % of the total protein. After preparation and purification of these inclusion bodies a yield of approximately 40 mg purified protein was obtained from a 1.000 ml culture. This amount was sufficient to coat more than 3.000 ELISA-plates, using a coating-concentration of approximately 1.2 µg protein per ml coating buffer.

The suitability of this screening-ELISA was determined by examination (ELISA/CFT) of 616 serum samples obtained from 35 different herds belonging to the "Bundeshybridzuchtprogramm" (BHZP). This investigation showed a clear correlation between CFT and ELISA. In addition a challenge trial with 12 pigs was followed serologically. A significant immune response of all animals could be shown using the new ELISA-test.

The reliability of the test was primarily shown by its high reproducibility. Thus, the "well to well-variation" had a variation coefficient of 7,6 % and the "interassay-variation" had a variation coefficient of 25,6 %.

The test had a high sensitivity of 96 % and a specificity of 77 % with respect to the Western Blot using a cut-off-value of 10 EU or a sensitivity of 78 % and a specificity of 96 % using a cut-off-value of 25 EU.

A second ELISA for the differentiation of the predominantly occurring serotypes 2 and 9 was developed. For production of the different lipopolysaccharide-antigens the reference-strains of the various serotypes were used. The lipopolysaccharide (LPS)

was prepared by a method based on precipitation with magnesium chloride-saturated ethanol; the yield was approximately 12 mg LPS per 1.000 ml broth culture. Using an average coating-concentration of 0,8 µg LPS per ml coating buffer, the antigen obtained from 1.000 ml was sufficient to coat 1.500 ELISA-plates with lipopolysaccharide-antigen. The ELISAs based on these antigens were highly discriminatory and showed a strong correlation with the CFT. In addition, it was shown that, in principle, an LPS-ELISA is also suitable for the detection of specific antibodies directed against other *A. pp.* serotypes since hardly any cross-reactivity could be observed.

Thus, the results demonstrate that the newly developed assays meet diagnostic requirements and are suited for herd controls and epidemiological surveys. Therefore the two test-systems could become a valuable instrument for detection and eradication of *A. pp.*-infections