

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden einfache und Biotin-Streptavidin-verstärkte ELISA-Systeme zum Nachweis von Antikörpern gegen MG und MS beim Huhn entwickelt.

Je 3 verschiedene Antigenpräparationen von MG und MS, ein gewaschenes Ganzzellantigen, ein SDS-behandeltes Antigen und ein Triton X-100-gelöstes Antigen, wurden hergestellt.

Die Spezifität dieser Antigene wurde in einem Serumadsorptionstest, in dem die Blockierung des spezifischen Antiserums durch homologe und 12 heterologe beim Geflügel vorkommende Mycoplasma- und Acholeplasma-Spezies bestimmt wurde, und durch eine vergleichende Untersuchung von homologen und 13 heterologen Antiseren vom Kaninchen ermittelt. Das Triton X-100-gelöste Antigen zeigte sowohl im Serumadsorptionstest als auch bei der Untersuchung der Antiseren vom Kaninchen eine gute Spezifität, während bei Einsatz der beiden anderen Antigenpräparationen Kreuzreaktionen auftraten.

Mittels Schachbrettiterationen wurden für die Triton X-100-gelösten Antigene optimale Beschichtungskonzentrationen von 0,5 µg/ml (MG) bzw. 0,22 µg/ml (MS), für die Seren eine optimale Verdünnung von 1:400 sowie geeignete Konjugatverdünnungen ermittelt.

Zur Gewinnung positiver Kontrollseren wurden SPF-Küken mit MG bzw. MS immunisiert. Im MG-ELISA war 2 Wochen p.i. bei allen Tieren eine spezifische Reaktion vorhanden. Im MS-ELISA waren erst 1 Woche nach einer 2. Immunisierung alle immunisierten Tiere positiv.

Die Biotin-Streptavidin-verstärkten ELISA-Systeme (Konjugat: Anti-Küken-IgG, biotinyliert, und Streptavidin-PO) zeigten in vergleichenden Untersuchungen geringfügig bessere Resultate in der Sensitivität und beim MG-ELISA auch in der Spezifität als die einfachen ELISA-Systeme (Konjugat: Anti-Küken-IgG, PO-markiert).

Die Auswertung der im ELISA erhaltenen Extinktionswerte erfolgte durch Berechnung eines ELISA-Wertes unter Einbeziehung von in jedem Test mitgeführtem negativem Kontrollserum und positivem Standardserum. Zur qualitativen Bewertung der Ergebnisse wurden Schwellenwerte so festgelegt, daß die Tests eine Spezifität von 100 % aufwiesen. Die Schwellenwerte lagen anhand der Untersuchung negativer Feldseren bei ELISA-Werten von 15 (MG-ELISA) bzw. 18 (MS-ELISA) und damit deutlich höher als auf der Basis der Ergebnisse negativer Seren aus dem Immunisierungsversuch.

Die Sensitivität der Biotin-Streptavidin-verstärkten ELISA-Systeme war bei der Untersuchung der Seren der immunisierten Tiere mit 100 % im MG-ELISA und 98,6 % im MS-ELISA sehr gut.

Die Untersuchung von Feldseren, die im SSAT und im HAHT eine übereinstimmende Reaktion gezeigt hatten, erbrachte für den MG-ELISA eine Spezifität von 96,90 % und eine Sensitivität von 100 %, für den MS-ELISA eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 97,97 %.

Alle Seren aus dem Immunisierungsversuch wurden vergleichend in SSAT, HAHT und ELISA untersucht. Dabei zeigten sich eine ungenügende Sensitivität des HAHT und des MS-SSAT sowie eine geringe Spezifität des SSAT. Die Biotin-Streptavidin-verstärkten ELISA-Systeme übertrafen mit ihrer sehr guten Spezifität und Sensitivität die beiden anderen serologischen Tests.

Bei der Untersuchung von 492 Feldseren aus 15 Beständen in SSAT, HAHT und ELISA traten insbesondere im HAHT häufig unspezifische Reaktionen auf.

Die entwickelten Biotin-Streptavidin-verstärkten ELISA-Systeme sind einfach durchführbar, spezifisch und sensitiv und besitzen eine gute Reproduzierbarkeit. Sie sind für die Routinediagnostik der MG- und MS-Infektion beim Huhn geeignet und können dort SSAT und HAHT ersetzen oder den SSAT zur Überprüfung der Spezifität ergänzen.

7. SUMMARY

Christine Dürrwald:

Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in chicken

Indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and biotin-streptavidin-enhanced ELISAs for the detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *M. synoviae* (MS) in chicken were developed.

Three different antigen preparations of MG and MS were produced: washed whole-cell antigens, SDS-treated antigens and antigens solubilised by Triton X-100.

The specificity of the antigens was proved by adsorption of reference sera with homologous and 12 heterologous antigens from different avian mycoplasmas and acholeplasmas and by testing of homologous and 13 heterologous antisera from rabbit. The Triton X-100-solubilised antigen showed a good specificity in both adsorption test and test of antisera from rabbit, whereas the use of the two other antigen preparations resulted in some cross-reactions.

Optimum concentration for Triton X-100-solubilised antigens of 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (MG) and 0,22 $\mu\text{g/ml}$ (MS), optimum serum dilution of 1:400 and optimum concentrations for conjugates were determined using checkerboard titrations.

Positive reference sera were obtained from specific-pathogen-free chickens that had been infected with MG and MS. All MG-infected birds showed a positive reaction in MG-ELISA from two weeks post infection. MS-ELISA confirmed all MS-infected birds to be positive one week after a second immunisation.

The biotin-streptavidin-enhanced ELISAs (conjugate: anti-chicken IgG, biotinylated, and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin) showed somewhat better results

in terms of sensitivity and specificity (MG-ELISA only) in comparison with the simple ELISAs (conjugate: anti-chicken IgG, HRP-conjugated).

The absorbance values obtained by ELISA were processed by calculation of an ELISA value. The calculation included absorbance of negative and positive reference sera, which was determined in each assay. Threshold values were established for qualitative interpretation of the results to get a 100 % specificity of the test. The threshold values resulting from testing negative field sera were set at ELISA values of 15 (MG-ELISA) and 18 (MS-ELISA). They were distinctly higher than the threshold values on the basis of testing the sera from experimentally infected chickens.

The biotin-streptavidin-enhanced ELISAs showed a very good sensitivity of 100 % in MG-ELISA and 98,6 % in MS-ELISA when testing sera from experimentally infected chickens.

When testing field sera, which had reacted uniformly in serum plate agglutination (SPA) and hemagglutination inhibition (HI) the MG-ELISA showed a specificity of 96,90 % and a sensitivity of 100 %, and the MS-ELISA had a specificity of 100 % and a sensitivity of 97,97 %.

All sera from the experimentally infected chickens were tested in SPA, HI and ELISA and the results were compared. The investigations showed a low sensitivity of HI and MS-SPA and a low specificity of SPA. The biotin-streptavidin-enhanced ELISAs were found to be more specific and more sensitive than the other two serological tests.

When testing 492 field sera from 15 flocks in SPA, HI and ELISA especially the HI yielded nonspecific reactions.

The developed biotin-streptavidin-enhanced ELISAs are simple, specific, sensitive and reproducible. They can be used as a practical assay for testing large numbers of serum samples for the presence of antibodies to MG and MS in chicken and could replace SPA and HI or serve to confirm specificity of the SPA.