

**Zeitschrift:** Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire  
ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

**Band:** 123 (1981)

**Artikel:** Entwicklung eines Salmonella ELISA geeignet für Massenserologie

**Autor:** Schiffmann-Wyttenbach, Eva / Fey, Hans

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-593606>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 07.10.2024

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

Schweiz. Arch. Tierheilk. 123, 611–627, 1981

Aus dem Veterinär-Bakteriologischen Institut der Universität Bern

## Entwicklung eines Salmonella ELISA geeignet für Massenserologie<sup>1</sup>

von Eva Schiffmann-Wytenbach und Hans Fey<sup>2</sup>

### Einleitung

Der ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) hat sich in der Bakteriologie, der Virologie und auch der Parasitologie in vielen Fällen als sehr gute serologische Diagnostikmethode erwiesen (*Voller*, 1977 und 1978).

Als Vorteile dieses Tests gelten: die einfache Ausrüstung, die Schnelligkeit und Präzision der Methode, die hohe Spezifität und Empfindlichkeit, endlich die Möglichkeit zur visuellen oder zur fotometrischen Ablesung, die eine mathematisch-statistische Evaluation der Resultate sowie Automatisierung ermöglicht.

Das ELISA System wurde bereits bei menschlichen und tierischen Salmonella-Ausbrüchen von einer Reihe von Autoren zur Serodiagnose eingesetzt (*Svenungsson* et al., 1979; *Karlsson* et al., 1980; *Robertsson* et al., 1980). Von allen Autoren wird die gute Leistungsfähigkeit des Tests hervorgehoben, der mit den Resultaten der klassischen Methoden (Widaltest, passive Hämagglutination) gut übereinstimmt. Es wird betont, dass es mit ELISA ohne grossen Aufwand möglich sei, zwischen IgG- und IgM-Antikörpern zu differenzieren, während die Bakterienagglutination hauptsächlich IgM-Antikörper nachweise.

Unsere Absicht war es, ein leicht praktikables ELISA-System aufzubauen, das sich beim Ausbruch einer Salmonellose zur Massenserologie eignen würde.

### ELISA-Antigene

Gemäss Literatur werden im Salmonella- und Brucella-ELISA vorwiegend Lipopolysaccharid-Extrakte (LPS) als Antigene verwendet (*Svenungsson* et al., 1979; *Karlsson* et al., 1980; *Robertsson* et al., 1980). Intakte Bakterienzellen in Form von verdünntem Widal-Antigen verwendeten *Ruppanner* et al. (1980) als Coat zur Bestimmung von Brucella-Antikörpern.

Der LPS-Extrakt wird am häufigsten mit der Phenol-Wasser-Methode gewonnen (*Westphal* und *Lüderitz*, zit. n. *Nowotny* 1979).

*Lamb* et al. (1979) extrahierten Brucella-LPS nach der Phenol-Wasser-Methode und erhielten empfindlichere und spezifischere Resultate als mit den serologischen Tests, bei welchen ganze Bakterien als Antigen verwendet werden. *Hernandez* et al. (1979) extrahierten mit dieser Methode LPS aus *S. typhi* als ELISA-Antigen.

<sup>1</sup> Arbeit unterstützt vom Eidg. Veterinäramt, Nutztierforschung Projekt Nr. 012.80.2

<sup>2</sup> Adresse: Prof. Dr. H. Fey, Postfach 2735, CH-3001 Bern

Zur Erhöhung der Spezifität wurde der LPS-Extrakt chemisch modifiziert (Sve-nungsson et al., 1979). Die Salmonellaspezies der Gruppen A, B und D haben das O-Antigen 12 gemeinsam, welches aufgebaut ist aus der Trisaccharid-Sequenz D-Mannose  $1\rightarrow4$ L-Rhamnose  $1\rightarrow3$ D-Galactose. Durch Perjodat-Oxydation und anschließende Borhydrid-Reduktion wird der Pyranosering der L-Rhamnose geöffnet. Dadurch wird das gemeinsame Trisaccharid in der O-Kette verändert und Kreuzreaktionen werden wesentlich verringert.

Höltje (1979) wies in einer Beschreibung des Aufbaus der Bakterienzelle darauf hin, dass mit EDTA (Ethylendiamin-Tetraacetat) den Zellen schonend LPS entzogen werden kann. Nach einer zweiminütigen Einwirkung von 0.2 mM EDTA bei 37 °C sollen die Zellen 50% der LPS verlieren, daneben aber voll lebensfähig bleiben. Diese Mitteilung basiert auf den Arbeiten von Leive (1965 und 1968) sowie von Voll und Leive (1970): Sie beschrieben die Extraktion von LPS mittels der EDTA-Methode anhand von E. coli-Zellen, die darauf eine stark erhöhte Zellwand-Permeabilität aufwiesen. Sie erwähnten, dass noch abzuklären sei, ob dieser LPS-Extrakt in der Serologie gleich gut verwendbar wäre wie Extrakte, hergestellt mit den bisher bewährten Verfahren.

Thoen et al. (1980) brauchten statt der herkömmlichen Ring-Probe zum Nachweis von Brucella Milch-Antikörpern ebenfalls den ELISA. Es wurden aber nicht LPS, sondern hitzegetötete Bakterien direkt an Polystyrol-Küvetten angetrocknet und damit gute Resultate erzielt.

Ähnlich gingen Yang und Kennedy mit Amöben vor (1979). Durch eine Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde lösliches Antigen direkt an Mikrotiterplatten angetrocknet. Dieser Coat diente zum Nachweis von Serumantikörpern gegen Entamoeba histolytica, und es resultierten hoch empfindliche und spezifische Werte.

Uns interessierte, ob sich das Antrocknen des Antigens auch für einen Salmonella-ELISA eignen würde.

In den zitierten Arbeiten wurden im Salmonella-ELISA O-Antigene verwendet. Wir stellten zusätzlich auch H-Antigene her. Dazu stand uns ein eigenes, einfaches Verfahren zur Verfügung, welches erlaubt, reines Polymer-Flagellin herzustellen (Fey und Suter, 1979 und Fey 1979).

Wir wollten ferner den Röhrchen-ELISA und den Mikrotiter-ELISA auf ihre Eignung in der Massenserologie vergleichend prüfen.

#### Material und Methoden

Wir verwendeten folgende Stämme, die in der Veterinärmedizin von besonderer Bedeutung sind:

S. typhi-murium Kop. 209	4, 5, 12:i: —
S. cholerae-suis 211	6, 7:c: —
S. dublin Kop. 65	1, 9, 12:g, p: —
S. abortus-bovis	4, 12:b:e, n, x

#### Extraktion des O-Antigens

Dichte Suspensionen der verschiedenen Stämme wurden bei 5000 Upm zentrifugiert, einmal gewaschen und in 150 ml dest. Wasser aufgenommen. Aliquote Teile wurden mit dem Phenol-Was-

serverfahren von Westphal und Lüderitz (zit. n. Nowotny, 1979) behandelt, bzw. 60 Min. bei 100 °C, bzw. 30 Min. bei 120 °C (Autoklav) erhitzt. Die Überstände wurden als O-Antigene verwendet.

LPS-Extraktion durch Einwirkung von EDTA (Leive, 1965 und 1968): Kulturen von vier Agarplatten wurden zur Solubilisierung der Geisseln zu monomerem Flagellin mit 0.05 M HCl pH 1.5 abgeschwemmt, über Nacht bei 4 °C gehalten, dann 60 Min. bei 49 000 g zentrifugiert und anschliessend dreimal mit Tris-HCl 0.12 M pH 8 gewaschen (Fey, 1979). Wir stellten die Dichte auf  $6 \times 10^9$  Zellen/ml ein, fügten Titriplex-EDTA ad 0,2 mM zu und inkubierten 5 Min. bei 37 °C. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Wir zentrifugierten die Suspension und gewannen den Überstand als O-Antigen.

#### *Direktes Antrocknen von Salmonellen an Polystyrol als ELISA-Antigen*

Die Salmonellasuspension in PBS wurde 60 Min. bei 100 °C gekocht. Anschliessend wurde zentrifugiert, das Sediment 3mal mit PBS gewaschen und danach die Suspension auf eine Dichte von  $10^9$  Bakterien/ml eingestellt. Je 100 µl wurde in die Löcher von Mikrotiterplatten eingefüllt und durch Bebrütung bei 37 °C über Nacht getrocknet.

Die Herstellung von H-Antigenen in der Form von polymerem Flagellin erfolgte nach Fey (1979).

Die Proteinkonzentration der Antigene bestimmten wir nach Lowry et al. (1951).

Zur Evaluation unserer Antigene benützten wir die Seren der Schweiz. Salmonellazentrale (in dankenswerter Weise von Frl. A. Margadant bereit gestellt).

#### *Röhrchen-ELISA*

Wir arbeiteten in allen Vorversuchen mit 1 ml Lösung pro Polystyrolröhrchen (Petra Plastik, Chur). Zur Beschichtung der Röhrchen verwendeten wir Antigen in den Konzentrationen 10, 5, 2,5 und 1 µg/ml. Nach Inkubation über Nacht bei Zimmertemperatur wurden die Röhrchen mit 0,9% NaCl + 0,5% Tween 20 dreimal gewaschen und anschliessend 30–60 Min. mit PBS + 0,05% Tween 20 + 0,5% bovinem Serumalbumin (BSA) + 0,02% NaN<sub>3</sub> abgesättigt. Die Antiseren wurden mit PBS-Tween ohne BSA verdünnt (O-Seren 1/200, H-Seren 1/400). Nach 24 Std. bei Raumtemperatur oder 3 Std. bei 37 °C wurde nach erneutem Waschen 1 ml Konjugat zugegeben.

Das SPA-PH liessen wir 1 Std. bei 37 °C reagieren, die anti Spezies Ig-Konjugate 3 Std. bei 37 °C. Danach folgte nach einem weiteren Waschvorgang die Zugabe von NPP als Substrat (4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Merck: 1 mg/ml 50 mM Na-Carbonat-Bicarbonat pH 9.8 + 1 mM MgCl<sub>2</sub>). Die Reaktion wurde nach 60 Min. mit 0,1 ml 2n NaOH gestoppt. Nur ausnahmsweise arbeiteten wir auch mit dem Peroxydase-System.

Die Ablesung der Röhrchen erfolgte bei 405 nm mit dem Vitatron DCP-Fotometer, gekoppelt über ein Kontron Interface LOG 2 mit dem programmierbaren, druckenden Rechner TI 59 von Texas Instruments (Fey und Gottstein, 1979). Es wurden je nach Evaluation verschiedene individuelle Programme eingesetzt.

#### *Mikrotiter-ELISA*

In diesem System führten wir den Vergleich des EDTA-Extraktes mit dem Antrocknen einer Bakteriensuspension durch und prüften dessen Eignung für die Massenserologie.

Wir verwendeten Dynatech MICROELISA-Platten mit flachen Böden. Vom EDTA-Extrakt wurden pro Loch 200 µl eingefüllt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei Zimmertemperatur. Zum Waschen stand uns die Multiwash-Anlage der Flow-Laboratories zur Verfügung.

Die weiteren Schritte erfolgten in gleichen Zeitabständen wie beim Röhrchen-ELISA und mit den gleichen Reagenzien.

Ohne zu stoppen wurde die Reaktion nach 60 Min. im Titertek Multiskan abgelesen.

*Enzym-Konjugate*

SPA wurde nach *Engvall* (1978) mit Phosphatase (PH) gekoppelt (alk. Phosphatase VII, 900 E/mg Protein, SIGMA Chem. Co., St. Louis, USA) und in der Verdünnung von 1/1000 eingesetzt. Zudem kauften wir von drei Firmen je anti Schwein-, anti Rind- und anti Kaninchen Ig-PH- sowie -PO-Konjugate.

Der ursprüngliche Plan, mit von uns immunisierten Rindern, Schweinen und Schafen, ein experimentelles Set von Salmonella-Antiseren aufzubauen, musste wegen allgemein ungenügender Immunantwort der meisten Tiere aufgegeben werden. Indessen prüften wir trotzdem die Handelskonjugate auf ihre Qualität. Ein gutes anti Spezies Ig-Konjugat muss sowohl die  $\gamma$ - wie die  $\mu$ -heavy chains und wenn möglich light chains der entsprechenden Spezies Immunglobuline erkennen.

Wir produzierten deshalb IgG<sub>2</sub>, IgM und light chains aus Rinderserum nach den Methoden von *Fey et al.* (1976) und *Fey* (1977).

Die erwähnten Ig-Antigene wurden in Konzentrationen von 20  $\mu$ g/ml und 1  $\mu$ g/ml, bei pH 9,6, 8 und 7,2 als Coat auf die Röhrchen gegeben. Nach 24 Std. bei Zimmertemperatur sättigten wir die Röhrchen mit PBS-BSA ab und fügten die Konjugate in der jeweiligen Gebrauchsverdünnung zu. Wir inkubierten 3 Std. bei 37 °C und gaben dann das Substrat zu. Die Ablesung erfolgte nach 1 Std. bei Zimmertemperatur.

Zur Auftrennung von Antiseren mittels Gelfiltration zum Zwecke der Differenzierung von IgG- und IgM-Antikörpern benützten wir Sephacryl S-200 (Pharmacia Uppsala) und beluden eine Säule von 3,3  $\times$  96 cm mit 3 bis 5 ml Serum, Äquilibrationspuffer PBS.

Folgende Seren wurden zur Fraktionierung ausgewählt:

Kaninchen	anti Brucella	Titer	1/400	+++
Rind	anti Brucella	Titer	1/1600	+++
Schwein	anti <i>S. cholerae-suis</i>	H-Titer	1/100	+++
	5 Tage nach Immunisierung			
Schwein	anti <i>S. cholerae-suis</i>	H-Titer	1/100	+++
	46 Tage nach Immunisierung			

Die Fraktionen wurden im Widal-Test geprüft. Anschliessend prüften wir, inwieweit sich SPA-PH und verschiedene anti Spezies Ig-Konjugate mit einem Röhrchen-ELISA zur Antikörperbestimmung von Seren unterschiedlicher Immunitätsphasen eignen.

Im Brucella-System verwendeten wir Widal-Antigen zum Coaten der Röhrchen, indem wir die Suspension bei 37 °C antrocknen liessen.

Im Salmonella-System bestand der Antigen-Coat aus 5  $\mu$ g/ml Polymer-Flagellin Hc. Die Antikörper-Fraktionen verdünnten wir 1/100 und liessen sie über Nacht bei Zimmertemperatur reagieren. Es folgte die Zugabe der anti Spezies Ig-Konjugate und des SPA-PH in den entsprechenden Gebrauchsverdünnungen. Die anti Spezies Ig-Konjugate liessen wir 3 Std. bei 37 °C einwirken, das SPA-PH 1 Std. bei 37 °C. Danach wurde das entsprechende Substrat zugefügt und die Reaktion nach 1 Std. gestoppt. Die Resultate des ELISA wurden mit denjenigen des Widal-Tests verglichen und die Qualität und die Anwendbarkeit der Konjugate ausgewertet.

**Resultate**

Die mit *S. typhi-murium* durch verschiedene Techniken gewonnenen O-Antigene wurden im Röhrchen-ELISA miteinander verglichen. Mit Einzelbestimmungen prüften wir die Antigen-Konzentrationen in zwei Verdünnungspuffern mit unterschiedlichem pH und entschieden uns für die Antigen-Konzentration 10  $\mu$ g/ml.

Danach bestimmten wir das optimale pH anhand der vier *S. typhi-murium* Extrakte (Tab. 1).

Tabelle 1 Prüfung von zwei Verdünnungspuffern mit unterschiedlichem pH, und Auswahl von zwei O-Antigen-Herstellungsmethoden

O-Antigen	Verdünnungspuffer	OD nach 30 Min. N = 5	Signifikanz der pH-Unterschiede (t-Test)
Autoklav-Extrakt	pH 9,6	$\bar{x} \pm s: 0,37 \pm 0,04$	t = 2,5
	pH 8	$0,32 \pm 0,02$	0,01 < P < 0,05
Kochextrakt	pH 9,6	$0,67 \pm 0,06$	t = 2,79
	pH 8	$0,76 \pm 0,04$	0,01 < P < 0,05
EDTA-Extrakt	pH 9,6	$0,81 \pm 0,10$	t = 0,42
	pH 8	$0,79 \pm 0,04$	P > 0,05
Phenol-Extrakt	pH 9,6	$0,83 \pm 0,01$	t = 41,01
	pH 8	$0,25 \pm 0,03$	P << 0,001

Die höchsten Titer mit homologem O-Serum konnten wir mit dem Phenol-Wasser- und dem EDTA-Extrakt messen. Ebenfalls befriedigende Resultate ergab der Kochextrakt. Wir entschieden uns für pH 9,6, da der Phenol-Extrakt in diesem Puffer signifikant besser war als in pH 8.

Der Phenol-Wasser-Extrakt hat sich in der Serologie als Antigen bereits bewährt. Unabhängig von uns hat *Nicolet* mit dem Einsatz eines EDTA-Extraktes aus *Haemophilus pleuropneumoniae* (1980) im ELISA ebenfalls gute Resultate erzielt.

Wir gaben deshalb dieser neuen und einfachen Methode den Vorzug und dehnten die Antigen-Herstellung auf die drei weiteren ausgewählten Salmonella-Stämme aus. Dabei machte es keinen Unterschied, ob wir mit 0,2 mM EDTA oder mit 5 mM EDTA extrahierten (*Leive*, 1965; 1968).

Wir überprüften jetzt diese Arbeitsvorschrift an den drei weiteren Salmonellaspezies und führten vergleichsweise den jeweiligen Kochextrakt mit. Neben dem homologen O-Antigen führten wir zum Beweis der Freiheit von Geisselantigen homologe H-Seren mit, die mit diesen Stämmen hergestellt worden waren. Die O-Titer der H-Seren waren teilweise störend hoch, es gelang uns aber, sie durch zweimalige O-Absorption zu beseitigen (Tab. 2).

Die EDTA-Extrakte aller vier Salmonellaspezies ergaben mit homologen O-Seren brauchbare Werte. Bei *S. cholerae-suis*, *S. abortus-bovis* und *S. dublin* übertrafen die EDTA-Antigene die Kochextrakte deutlich. Es ist ferner ersichtlich, dass die EDTA- und Kochextrakte mit den O-absorbierten H-Seren nicht reagierten.

#### *Vergleich der Verwendung von EDTA-Extrakt und angetrockneter Bakteriensuspension als O-Antigene im Mikrotitersystem*

Die im Röhren-ELISA gewählte Konzentration des EDTA-Extraktes (10 µg/ml) und die Serumverdünnung 1/200 erwiesen sich insbesondere beim O-Antigen 6,7 im Mikrotitersystem als ungenügend. Wir erhöhten deshalb bei allen O-Anti-

Tabelle 2 Vergleich des EDTA- und des Kochextraktes in Doppelbestimmungen  
Antigenkonzentration 10 µg/ml  
Verdünnungspuffer: 0,1 M Natriumcarbonat-Bicarbonat pH 9,6

Salmonellaspezies/ Antigen	homologes O-Antiserum 1/200	homologes H-Antiserum 1/400
	OD nach 60 Min.	OD nach 60 Min.
S. typhi-murium/EDTA-Extrakt	$\bar{x}$ : 0,81	$\bar{x}$ : 0,05
Kochextrakt	0,66	0,02
S. dublin/EDTA-Extrakt	0,72	0,03
Kochextrakt	0,39	0,07
S. abortus-bovis/EDTA-Extrakt	0,57	0,05
Kochextrakt	0,40	0,05
S. cholerae-suis/EDTA-Extrakt	0,75	0,04
Kochextrakt	0,38	0,07

genen die Konzentration zur Beschichtung der Platten auf 20 µg/ml und verdünnten die Seren in diesem System nur 1/100. EDTA-Extrakt und angetrocknete hitzebehandelte Bakteriensuspension wurden mit homologen O- und H-Seren geprüft (Tab. 3).

Tabelle 3 Vergleich der Verwendung von EDTA-Extrakt und angetrockneter Bakteriensuspension als O-Antigen im Mikrotiter-ELISA

Salmonella-Spezies	Antigen: EDTA-Extrakt 20 µg/ml		Antigen: 10 <sup>9</sup> -Suspension, 10 <sup>9</sup> Bakt./ml angetrocknet	
	homologes O-Antiserum 1/100	homologes H-Antiserum 1/100	homologes O-Antiserum 1/100	homologes H-Antiserum 1/100
	OD nach 60 Min.: N = 8		OD nach 60 Min.: N = 8	
S. typhi-murium	$\bar{x} \pm s$ : 1,22 ± 0,03	0,2 ± 0,04	$\bar{x} \pm s$ : 0,84 ± 0,06	0,06 ± 0,03
S. abortus-bovis	1,30 ± 0,05	0,1 ± 0,03	0,41 ± 0,05	0,01 ± 0,01
S. cholerae-suis	1,28 ± 0,05	0,2 ± 0,05	0,42 ± 0,04	0,09 ± 0,03
S. dublin	1,07 ± 0,04	0,04 ± 0,02	0,44 ± 0,03	0,01 ± 0,01

Mit den EDTA-Extrakten aller vier Salmonella-Stämme liessen sich kräftige O-Titer messen. Die angetrockneten Suspensionen ergaben ebenfalls brauchbare O-Titer, lagen aber trotzdem deutlich niedriger als die Werte der EDTA-Extrakte.

Die H-Titer der angetrockneten Antigene fielen sehr niedrig aus, diejenigen der EDTA-Extrakte etwas höher, aber verglichen mit den starken O-Werten immer noch befriedigend tief. Wenn wir Bakteriensuspensionen antrockneten, die mit der Säurebehandlung nach Fey (1979) deflagelliert worden waren, zeigte es sich, dass diese Art «coat» heterologe H-Antikörper in untragbarer Weise unspezifisch band.

Damit haben wir gezeigt, dass der EDTA-Extrakt in unserem ELISA-System als O-Antigen sehr geeignet ist, dass daneben aber auch angetrocknete, intakte Bakterien einen guten Antigen-Coat ergeben.

#### *Verwendung von Polymer-Flagellin als H-Antigen im ELISA*

Am günstigsten erwies sich die Beschichtung der Röhrchen mit einer Antigenkonzentration von 1–5 µg/ml (für Antigen Hc 5–10 µg/ml) (Tab. 4).

Tabelle 4 Vergleich der Verdünnungspuffer pH 9,6 und pH 8 für das coating der H-Antigene (5 µg/ml).

Homologe H-Antiseren in der Verdünnung 1/400

Salmonella-Spezies	H-Antigen	Verdünnungspuffer pH 9,6	Verdünnungspuffer pH 8
		OD nach 30 Min.: N = 5	OD nach 30 Min.: N = 5
S. dublin	H-Antigen gp	$\bar{x} \pm s: 1,30 \pm 0,03$	$\bar{x} \pm s: 0,22 \pm 0,07$
S. cholerae-suis	H-Antigen c	0,92 ± 0,12	0,11 ± 0,05
S. abortus-bovis	H-Antigen b	1,11 ± 0,08	0,18 ± 0,03
S. typhi-murium	H-Antigen i	0,72 ± 0,02	0,71 ± 0,05

Im Gegensatz zum H-Antigen i erwies sich bei den anderen drei Spezies pH 9,6 als signifikant besser als pH 8, und wir wählten fortan 0,1 M Na-Carbonat-Bicarbonat pH 9,6 als Verdünnungspuffer. Wie bei den O-Antigenen fanden wir auch bei den H-Antigenen im Mikrotiter-ELISA nicht die gleiche Aufnahme wie im Röhrchentest. Zur Erzielung einer vergleichbaren Extinktion mussten wir im Mikrotitertest die Serumverdünnung 1/100 statt 1/400 verwenden (Tab. 5).

Trotz unseres Misserfolges mit der Immunisierung von Nutztieren wollten wir auf die Organisation einer Massenserologie nicht verzichten. Wir beschlossen deshalb, diesen Teil der Arbeit mit unseren Antigenen, aber mit Kaninchenserum der Schweiz. Salmonellazentrale und SPA-PH durchzuführen und zwar sowohl im Röhrchen- als auch im Mikrotiter-ELISA. Dies diente dazu, Vergleiche zu ziehen in Bezug auf Zeitaufwand, Ausrüstung und Menge der verwendeten Substanzen.

Pro Salmonella-Spezies testeten wir 82 «verschiedene Seren» in Doppelbestimmungen auf ihre O- und H-Titer. Der ELISA wurde wie beschrieben ausgeführt und jeder Arbeitsgang bezüglich Zeitaufwand protokolliert.

Die Auswertung der Extinktionen geschah mit den von Fey und Gottstein (1979) beschriebenen statistischen Programmen unter Berücksichtigung der 99-%-Vertrauensgrenze (Tab. 6).

Aus der Tabelle 6 ist leicht ersichtlich, dass der grösste Zeitgewinn im Mikrotiter-System durch das Waschen mit der Multiwash-Anlage entstand.



Tabelle 5 Festlegung der H-Antigen-Konzentration für das Mikrotitersystem

Salmonella-Spezies/Serum-Verdünnung	Antigen-Konzentration 1 µg/ml		Antigen-Konzentration 10 µg/ml	
	homologes H-Antiserum 1/100	homologes O-Antiserum 1/100	homologes H-Antiserum 1/100	homologes O-Antiserum 1/100
	OD nach 60 Min.: N = 8		OD nach 60 Min.: N = 8	
<i>S. typhi-murium</i>				
1/100	$\bar{x} \pm s: 0,70 \pm 0,06$	$0,058 \pm 0,01$	$\bar{x} \pm s: 0,79 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,02$
1/200	$0,66 \pm 0,03$	.	$0,74 \pm 0,03$	.
1/400	$0,60 \pm 0,03$	.	$0,60 \pm 0,06$	.
<i>S. dublin</i>				
1/100	$0,81 \pm 0,05$	$0,031 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,09$	$0,01 \pm 0,02$
1/200	$0,70 \pm 0,04$	.	$0,93 \pm 0,05$	.
1/400	$0,62 \pm 0,05$	.	$0,73 \pm 0,05$	.
<i>S. cholerae-suis</i>				
1/100	$0,61 \pm 0,03$	$0,021 \pm 0,03$	$0,80 \pm 0,07$	$0,04 \pm 0,02$
1/200	$0,55 \pm 0,08$	.	$0,66 \pm 0,02$	.
1/400	$0,43 \pm 0,04$	.	$0,58 \pm 0,09$	.
<i>S. abortus-bovis</i>				
1/100	$0,99 \pm 0,03$	$0,038 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,01$
1/200	$1,01 \pm 0,04$	.	$0,95 \pm 0,08$	.
1/400	$0,93 \pm 0,05$	.	$0,91 \pm 0,05$	.

Dagegen liegt ein grosser Vorteil des Röhrchen-Systems in der Kombination Fotometer/programmierbarer, druckender Rechner TI 59. Im Gegensatz zum Röhrchen-ELISA wäre es im Mikrotiter-System möglich, dass eine Laborantin 82 Seren an einem Arbeitstag bewältigen könnte.

Wenn man aber bedenkt, dass die zu untersuchenden Seren normalerweise im Verlauf des Tages im Labor eintreffen, wäre folgende Arbeitseinteilung für Röhrchen- und Mikrotiter-ELISA zu empfehlen: Die Seren werden am Tag der Ankunft in die bereits mit Antigen beschichteten Röhrchen oder Mikrotiterplatten eingefüllt und über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Dadurch würde sich die Zahl der von einer Laborantin zu bewältigenden Seren auf mindestens 200 erhöhen. Die Untersuchungen wären im frühen Nachmittag des nächsten Tages abgeschlossen, und die Resultate könnten noch geschrieben und abgeschickt werden.

*Prüfung von anti Rind Ig-Konjugaten auf ihre Spezifität gegenüber IgG, IgM und light chains*

Zur Verfügung standen uns drei anti Rind Ig-Enzym-Konjugate: Zwei kommerzielle und ein eigenes.

Bovines IgG<sub>2</sub>, IgM und light chains wurden in den beiden Konzentrationen 20 µg/ml und 1 µg/ml an Röhrchen gekoppelt, mit den drei Konjugaten in deren Gebrauchsverdünnung inkubiert und Tripelwerte gemessen (Tab. 7).

Tabelle 6 Zeitaufwand zur Bestimmung der O- und H-Titer von 82 Seren mit dem Mikrotiter- und dem Röhrchen-ELISA.

Röhrchen und Mikrotiterplatten sind bereits mit Antigen beschichtet und mit PBS-BSA abgesättigt worden.

	Röhrchen	Mikrotiter
– Herstellung der Serumverdünnungen	60 Min.	60 Min.
– Einfüllen der Seren mit Finnpipette-Spritze	40 Min.	45 Min.
– (Brutschrank 37 °)	(3 Std.)	(3 Std.)
– Röhrchen 3 × waschen		
Mikrotiterplatten: Multiwash Stufe 3	45 Min.	10 Min.
– SPA-PH 1/800 verdünnen und mit Cornwall-Repetier-spritze einfüllen	5 Min.	5 Min.
– (Brutschrank 37 °)	(1 Std.)	(1 Std.)
– Waschvorgang wie beschrieben	45 Min.	10 Min.
– NPP auflösen und mit Cornwall-Repetierspritze einfüllen	5 Min.	5 Min.
– (Inkubation bei Zimmertemperatur)	(1 Std.)	(1 Std.)
– Röhrchen: stoppen mit 100 µl 2 n NaOH, Vortex, Vita-tron-Ablesung und Drucken von POS und NEG	65 Min.	
– Mikrotiterplatten: Ablesen mit Multiskan		15 Min.
– Eintippen der Werte und drucken von POS und NEG		35 Min.
Arbeitsbedarf exklusive Inkubation	4 Std. 25 Min.	2 Std. 45 Min.
Arbeitsbedarf inklusive Inkubation	9 Std. 25 Min.	7 Std. 45 Min.

Die Konjugate I und II waren vorwiegend anti heavy chain-Konjugate, beide, besonders aber I, von ausgezeichneter Qualität. Ihre anti IgG<sub>2</sub>- und anti IgM-Antikörper waren so kräftig vertreten, dass der geringe Anteil an anti light chains-Antikörpern kein Nachteil ist.

Unbefriedigend dagegen war die Sensitivität unseres eigenen Konjugates III. Konjugat II und III ergaben bei der Antigen-Konzentration 1 µg/ml mit den Verdünnungspuffern pH 8 und pH 7,2 bessere Resultate als mit pH 9,6.

Bei der Antigen-Konzentration von 20 µg/ml war dagegen der Puffer mit pH 9,6 den anderen zum Teil überlegen.

Das günstigste pH scheint zweifellos nicht für jede Antigen-Konzentration im gleichen Bereich zu liegen, und es gilt, dieser Feststellung in der Folge mehr Beachtung zu schenken.

#### *Prüfung von anti Spezies Ig-Konjugaten und SPA-PH-Konjugat anhand von Serumfraktionen*

Trotzdem die Seren unserer immunisierten Tiere ihren Zweck nicht erfüllt hatten, wählten wir einige mit beachtlichem Agglutinationstiter aus zwecks praktischer Er-

Tabelle 7 Prüfung der anti Rind Ig-Konjugate auf ihren Anteil an Antikörpern gegen IgG<sub>2</sub>, IgM und light chains

Konjugat/ Verdünnung	Antigen-coat: IgG <sub>2</sub>		Antigen-coat: IgM		Antigen-coat: light chains	
	20 µg/ml	1 µg/ml	20 µg/ml	1 µg/ml	20 µg/ml	1 µg/ml
	OD nach 20 Min. N = 3		OD nach 20 Min. N = 3		OD nach 60 Min. N = 3	
I 1/1200: pH 9,6	$\bar{x}$ : 1,12	1,21	1,77	1,56	0,31	0,22
8	0,90	1,01	1,62	1,17	0,22	0,14
7,2	0,50	0,74	0,92	1,32	0,22	0,13
	OD nach 60 Min.		OD nach 60 Min.		OD nach 60 Min.	
II 1/500: pH 9,6	$\bar{x}$ : 1,0	0,23	0,65	0,25	0,38	0,1
8	0,87	0,77	0,71	0,52	0,25	0,16
7,2	0,82	0,70	0,48	0,34	0,26	0,14
	OD nach 60 Min.		OD nach 60 Min.		OD nach 60 Min.	
III 1/500: pH 9,6	$\bar{x}$ : 0,37	0,06	0,51	0,10	0,16	0,06
8	0,67	0,35	0,65	0,21	0,09	0,04
7,2	0,29	0,36	0,67	0,24	0,09	0,06

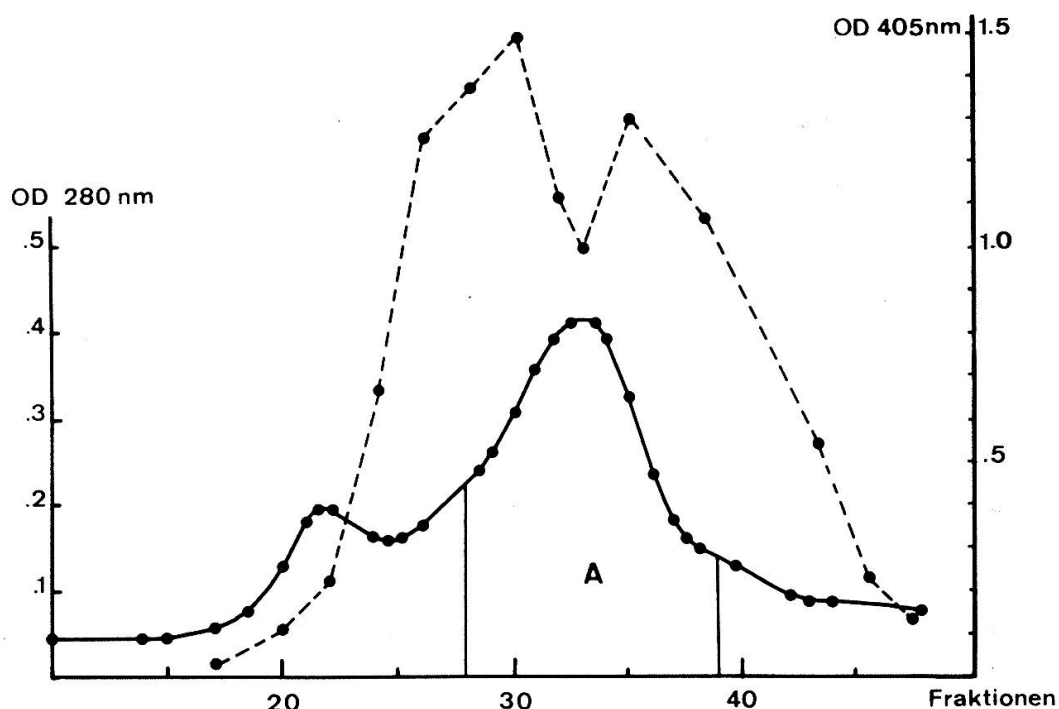


Fig. 1 Auftrennung von 3 ml Ammonsulfatglobulin von Rind anti Brucellaserum.

Gelfiltration mit Sephacryl S-200, 3,3 × 96 cm. Puffer PBS pH 6,8

A: Fraktionen 29–39 ergaben in der Verdünnung 1/2000 eine Agglutination von ++ bis ++++.

— = Extinktionen der Antikörperfraktionen bei 280 nm

- - - = ELISA Extinktionen erzielt mit dem anti Rind Ig-PH-Konjugat I 1/1200.

Coat = angetrocknete Brucellen. Endverdünnung der Fraktionen 1/3000.

probung unserer anti Spezies Ig-Konjugate. Nachdem der eine von uns (*H. F.*) zusammen mit *Bommeli et al.* (1980a) über die Verwendung von SPA-Enzym als Universallabel bei einer Reihe von Spezies ausgezeichnete Erfahrungen gemacht hatte, hielten wir dieses Konjugat als besonders geeignet für den Schweine-Salmonella ELISA. Das Resultat war aber völlig negativ! Die Erklärung suchten wir darin, dass allenfalls IgM, die Ig-Klasse, die von SPA nicht erkannt wird, den Hauptanteil an den Antikörpern bilde. Um dies abzuklären, trennten wir eine Reihe von Rinder-, Kaninchen- und Schweineseren mittels Sephacryl S-200 auf, und zwar auch *Brucella* Antiseren, da die *Salmonella* O-Seren ungeeignet waren (siehe S. 614). Wir verwendeten die gleichen anti Rind Ig-Konjugate wie in Tab. 7. Ferner die folgenden anti Spezies Ig-Konjugate:

anti Kaninchen bzw. anti Schwein Ig-Enzym-Konjugat aus dem Handel, sowie ein eigenes SPA-PH-Konjugat.

Die Fig. 1–3 zeigen eine Auswahl der Chromatogramme.

Im ELISA ausgeführt mit den Fraktionen des Rind anti *Brucella*-Serums (Fig. 1) erzielten wir mit Abstand die höchsten Werte mit dem Konjugat I. Die Titer unseres Konjugates III lagen nur wenig tiefer. Deutlicher fiel dagegen die Überlegenheit von Konjugat I gegenüber Konjugat II aus, besonders wenn man bedenkt, dass ersteres 1/1200 verdünnt werden konnte, Konjugat II dagegen nur 1/500.

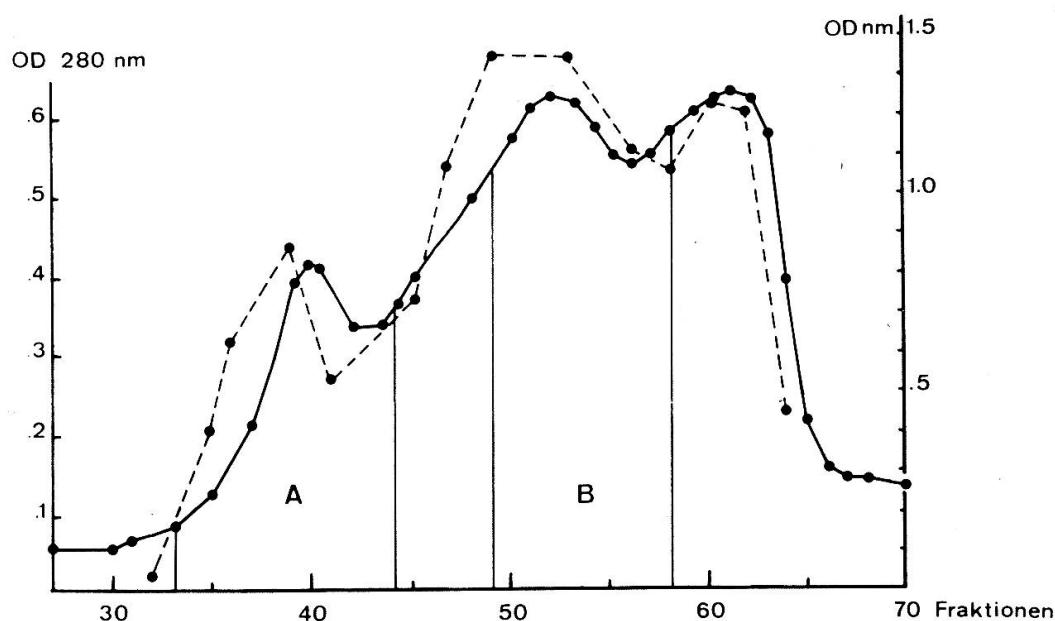


Fig. 2 Auftrennung von 5 ml Kaninchen anti *Brucella*serum.  
Gelfiltration mit Sephacryl S-200, 3,3 × 96 cm. Puffer: PBS pH 6,8  
A: Fraktionen 34–44  
B: Fraktionen 50–57

Alle Einzelfraktionen ergaben in der Verdünnung 1/100 eine Röhrchen-Agglutination von ++ bis +++.

— = Extinktion der Antikörperfraktionen bei 280 nm

- - - = ELISA Extinktionen erzielt mit dem anti Kaninchen Ig-PH-Konjugat I 1/1200.

Coat = angetrocknete *Brucellen*. Endverdünnung der Fraktionen 1/300.

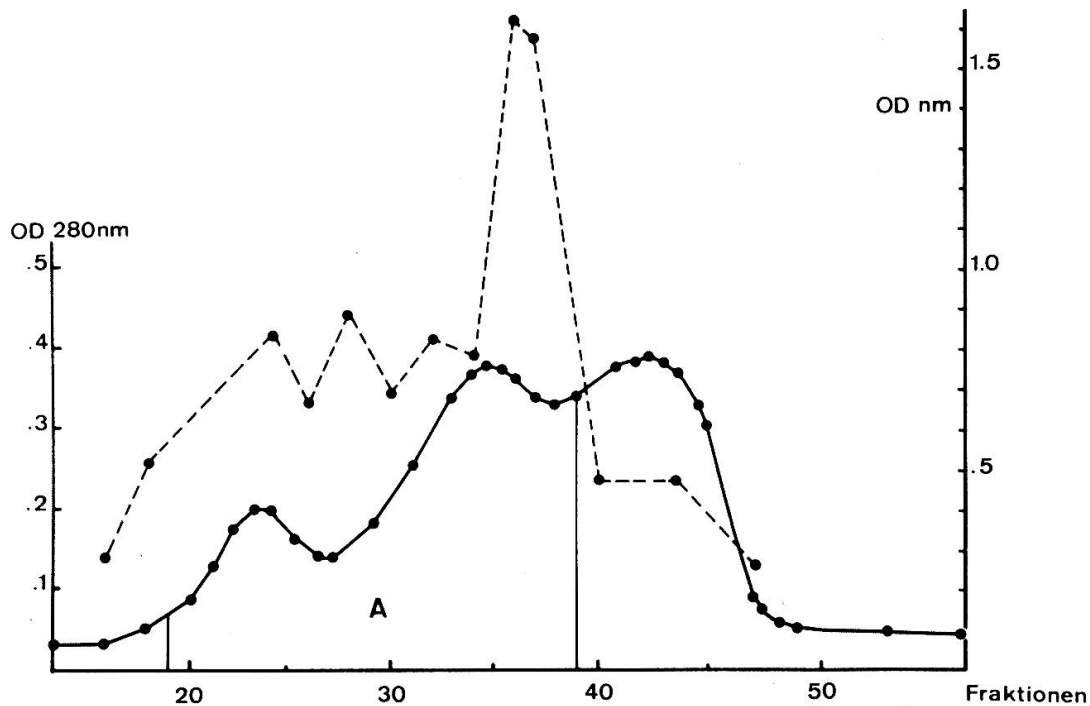


Fig. 3 Auftrennung von 3 ml Schweineserum anti *S. cholerae-suis* Hc, 46 Tage nach der Immunisierung mit einer OH-Vakzine.

Gelfiltration mit Sephacryl S-200,  $3,3 \times 96$  cm.

A: Fraktionen 20–39 ergaben in der Verdünnung 1/100 im Widaltest eine H-Agglutination von ++ bis +++.

— = Extinktionen der Antikörperfraktionen bei 280 nm

- - - = ELISA Extinktionen erzielt mit dem anti Schwein Ig-PH-Konjugat I 1/1200.

Coat = Hc Flagellin aus *S. cholerae-suis*. Endverdünnung der Fraktionen 1/100.

Während im Widal-Test nur die Fraktionen des IgG-Gipfels agglutiniert hatten, erfassten die Konjugate im ELISA auch IgM-Fraktionen.

Das Brucella-Kaninchenantiserum enthielt nur IgM-Antikörper. Damit liessen sich die negativen Werte im SPA-PH-System erklären. Zur Prüfung der Konjugate verwendeten wir ein anderes Kaninchen anti Brucellaserum mit IgG- und IgM-Anteilen (Fig. 2).

Beide kommerziellen anti Kaninchen Ig-Konjugate erfassten sowohl IgM- als auch IgG-Fraktionen. Sie zeigten bereits bei Fraktionen, die im Widal-Test noch negativ waren, kräftige Titer.

Wie erwartet erfasste das SPA-PH-Konjugat die IgM-Fraktionen nicht, war aber in der Affinität zu IgG-Antikörpern den anti Kaninchen Ig-Konjugaten ebenbürtig (Fig. 2).

Der ELISA mit den Fraktionen des Schweineserums und dem SPA-PH-Konjugat stellte uns erneut vor Probleme (Fig. 3).

Stichproben der IgM-Fraktionen fielen erwartungsgemäss negativ aus. Aber auch mit den IgG-Fraktionen resultierten nur sehr niedrige Titer. Im Rahmen dieser Arbeit gingen wir den Gründen dieser Schwierigkeiten nicht weiter nach.

Die anti Schwein Ig-Konjugate I und II erfassten sowohl IgG- und IgM-Fraktionen befriedigend und waren empfindlicher als der Widal-Test. Unbrauchbar niedrige Werte resultierten dagegen mit unserem Konjugat III.

### Diskussion

In der Reihe der nach verschiedenen Methoden hergestellten Salmonella-O-Antigene interessierte uns vor allem die Qualität des EDTA-Extraktes. Verglichen mit dem in der Serologie bewährten Phenol-Wasser-Extrakt erwies er sich in unseren Experimenten als gleichwertig.

Wir gaben aber der EDTA-Extraktion den Vorzug, weil sie eine sehr einfache und schonende Methode der LPS-Gewinnung darstellt, wie auch *Nicolet* mit *Haemophilus parahaemolyticus* zeigen konnte (1980). Verglichen mit Koch- und Autoklavextrakten erzielten wir mit den EDTA-Antigenen und homologen Kaninchen-Antisera durchwegs die höchsten O-Titer und niedrige H-Titer.

Ob sich diese Extraktion auch in der Diagnostik als Alternative zu bestehenden Techniken eignen würde, bleibt abzuklären. Sollten Kreuzreaktionen wegen des in den O-Gruppen A, B und D vorkommenden O-Antigens 12 störend auftreten, könnte man eine weitere Spezifizierung nach der Beschreibung von *Hammarström* et al. (1975) in Erwägung ziehen (siehe S. 612).

Einen weiteren guten Antigen-Coat ergab eine Suspension von intakten Bakterien, welche an Polystyrolröhrchen oder -platten angetrocknet wurden.

Es wäre zu prüfen, ob sich die Technik des Antrocknens einer Bakteriensuspension als Antigencoat noch auf weitere Systeme, vor allem auch auf Viren, ausdehnen liesse. *J. Bryans*, Lexington, (persönliche Mitteilung) macht von dieser Technik in der Herpes-Serologie Gebrauch. Jedenfalls ist das ganz allgemein eine billige, interessante Alternative, weil damit kostspielige Reinigungsschritte entfallen.

Trotzdem empfehlen wir für die klare Unterscheidung zwischen O- und H-Titer die Verwendung «reiner» O-Antigene für die O-Antikörperbestimmung und Flagellin für die H-Titer.

Die Bestimmung von H-Antikörpern begegnet zwar zunehmender Skepsis, vor allem bei nicht systemischen Salmonellosen. Wenn man sich aber zur Verwendung von H-Antigenen im ELISA entschliesst, sollte gereinigtes polymeres Flagellin ohne O-Antigen verwendet werden. Rohpolymere genügen nicht für eine saubere Aussage.

Da wir mit der Sandwichtechnik arbeiteten, konnten wir uns von der guten Qualität von käuflichen anti Spezies Ig-Konjugaten überzeugen.

Die Verwendung von Protein A-Konjugaten ist indessen problematisch und es muss im Falle von Infektionen mit Gramnegativen davon abgeraten werden. Gerade bei diesen Krankheiten ist im akuten Stadium mit einer Dominanz von IgM-Antikörpern zu rechnen, die von SPA nicht erkannt werden. Wir empfehlen also trotz den guten Erfahrungen, die wir zusammen mit *Bommeli* et al. (1980a) mit SPA-PO in der Virusserologie sammeln konnten, in der Serologie von Gramnegativen den Gebrauch von anti Spezies Ig-Konjugaten.

In unserem Vergleich zwischen Mikrotiter- und Röhren-ELISA in der Massenserologie, hat sich das Mikrotitersystem als bedeutend weniger zeitaufwendig erwiesen. Der Zeitgewinn ist vor allem der Multiwash-Anlage und dem Titertek Multiskan zuzuschreiben. Steht diese Automatisierung nicht zur Verfügung, ist das Mikrotitersystem für eine Massenserologie nicht zu empfehlen.

Das Arbeiten mit Polystyrolröhrchen ist eine vertretbare Alternative, sofern die Röhrchen in die Fotometerhalterung passen und so direkt gemessen werden können. Der Zeitaufwand ist zwar bedeutend höher. Inkubiert man die Seren über Nacht, eignen sich sowohl das Mikrotiter- als auch das Röhrchensystem, weil bei dieser Einteilung die Unterschiede im Zeitaufwand weniger ins Gewicht fallen.

Der grösste Vorteil des Röhrchen-ELISA liegt in der Kombination Lesegerät/Rechner TI 59. Messung und Auswertung erfolgen im gleichen Arbeitsgang und durch die Möglichkeit, den Rechner zu programmieren, können dem jeweiligen Test entsprechende Informationen herausgeholt werden. Es wäre sehr nützlich, wenn für das Mikrotitersystem eine analoge Kombination erarbeitet werden könnte.

Die objektive Messung der Antigen-Antikörper-Reaktion ist ein grosser Vorteil der ELISA. Davon sollte voll Gebrauch gemacht werden, indem man mit einer einzigen Serumverdünnung arbeitet, statt die Seren zu titrieren. Auf die Methodik kann hier nicht eingegangen werden. Einen möglichen Weg der Standardisierung hat Fey (1981) gewiesen.

Die Möglichkeit der rein visuellen, und damit schnellen, Ablesung, wie sie *Bom-meli* (1980b) in der Schweiz für die IBR-Serologie praktiziert, haben wir nicht geprüft.

### Zusammenfassung

Absicht unserer Arbeit war es, einen ELISA auszuarbeiten, der sich während einer Salmonella-Epidemie zur Massenserologie eignen würde.

Aus vier Salmonella-Spezies, welche in der Veterinärmedizin für Stallausbrüche bekannt sind, stellten wir O-Antigene nach verschiedenen Methoden her.

Wir waren besonders interessiert an einer einfachen und schonenden Extraktion von Lipopolysaccharid (LPS) mit EDTA.

In unseren Experimenten erwies sich dieses Antigen als sehr geeignet, wir erzielten damit gleichwertige Resultate wie mit dem bewährten Phenol-Wasser-Extrakt, und bessere O-Titer als mit Kochextrakten.

Zur Herstellung von H-Antigen stand uns eine einfache, in unserem Institut entwickelte Methode zur Gewinnung von Polymer-Flagellin zur Verfügung.

Dieses Antigen erwies sich im ELISA mit homologen Kaninchenantiseren und Protein A-Phosphatase-Konjugat (SPA-PH) als sehr geeignet.

Mit einer künstlich zusammengestellten Serenkollektion wollten wir die Eignung unseres ELISA für die Massenserologie prüfen. Positive Seren hatten wir durch Immunisieren von Rindern, Schweinen und Schafen gewonnen und entsprechende anti Spezies Ig-Konjugate hergestellt.

Im Zusammenfügen dieser Parameter ergaben sich unerwartete Schwierigkeiten, die wir der Qualität der anti Spezies IgG-Konjugate zuschreiben mussten.

Deshalb stellten wir die Anforderungen zusammen, die ein gutes anti Spezies Ig-Konjugat erfüllen muss und prüften unsere eigenen sowie einige kommerzielle Konjugate auf ihre Qualität.

Um die Eignung des Salmonella-ELISA für die Massenserologie dennoch prüfen zu können, führten wir den Test mit eigenen O- und H-Antigenen, homologen Kaninchenantiseren und SPA-PH-Konjugat durch.

Wir arbeiteten parallel mit dem Röhrchen- und Mikrotiter-ELISA und verglichen die beiden Systeme in Bezug auf Zeitaufwand, Ausrüstung und Menge der verwendeten Substanzen.

In einer Reihe von Gelfiltrations-Experimenten trennten wir Brucella- und Salmonella-Antisera von Rind, Kaninchen und Schwein auf und zeigten damit, dass ein gutes anti Spezies Ig-Enzym-Konjugat sowohl IgG als auch IgM erkennen muss. Bei akuten Infektionen mit Gramnegativen ist wegen der Dominanz von IgM-Antikörpern auch beim Schwein die Verwendung von SPA-Enzym-Konjugaten problematisch.

### Résumé

Le but de notre travail consistait à élaborer un ELISA qui se prêterait à une sérologie de masse lors d'épidémies à salmonelles. Des antigènes O de quatre espèces de salmonelles, fréquemment isolées lors d'enzooties, ont été préparés par différentes méthodes. Nous étions particulièrement intéressé par l'extraction simple et peu dommageable de lipopolysaccharides (LPS) au moyen d'EDTA. Cet antigène s'est révélé très approprié lors de nos expériences. Il a donné des résultats équivalents à ceux obtenus grâce à la méthode éprouvée d'extraction phénol-eau, et de meilleurs titres O qu'avec l'antigène préparé par cuisson.

Une méthode simple, développée dans notre institut, pour la production de polymère de flagelline était à notre disposition pour la préparation de l'antigène H.

Cet antigène se prêta fort bien à l'ELISA avec des antisérums homologues de lapin et un conjugat protéine A-phosphatase (SPA-PH). Une collection artificielle de sérums devait nous permettre de tester notre ELISA lors d'une sérologie de masse.

Nous avons préparé des sérums positifs par immunisations de bovins, porcs et moutons et produit des conjugats d'Ig anti-espèce respective. Des difficultés inattendues lors de l'assemblage de ces paramètres durent être attribuées à la qualité des conjugats IgG anti espèce. C'est pourquoi nous avons résumé les conditions que doit remplir un bon conjugat Ig anti espèce, afin de contrôler la qualité de nos propres conjugats et de quelques-uns disponibles dans le commerce. Pour contrôler l'aptitude de l'ELISA de salmonelles à une sérologie de masse, nous avons exécuté le test avec nos propres antigènes O et H, des antisérums homologues de lapin et un conjugat SPA-PH.

Nous avons travaillé parallèlement avec l'ELISA en éprouvette et en microtitre. L'équipement, la quantité des substances employées ainsi que le temps consacré aux deux systèmes ont été comparés. Des sérums anti brucelliques et anti salmonelliques de bovin, lapin et porc ont été séparés par filtration sur gel lors d'une série d'expériences qui montra qu'un bon conjugat Ig anti espèce-enzyme doit aussi bien reconnaître l'IgG que les IgM.

Lors d'infections aiguës à gram-négatifs, l'emploi de conjugats SPA-enzyme est également problématique chez le porc, en raison de la dominance des anticorps IgM.

### Riassunto

Scopo della presente ricerca è stato quello di elaborare un sistema ELISA adatto alla sierologia di massa in caso di una epidemia di Salmonellosi. Abbiamo ricavato antigene-O con diversi metodi da 4 specie di Salmonelle che sono conosciute nella Medicina Veterinaria come responsabili di fenomeni epizootici.

Noi eravamo particolarmente interessati ad una estrazione semplice e protettiva di lipopolisaccaride (LPS) con EDTA.

Questo antigene ha dato ottima prova nei nostri esperimenti, con esso si sono ottenuti risultati eguali a quelli ottenuti con il provato estratto con acqua-fenolo, e titoli migliori che con gli estratti cotti.

Per la preparazione dell'antigene H, abbiamo usato un metodo elaborato nel nostro istituto per l'ottenimento del polimero di Flagellina. Questo antigene si è rivelato molto adeguato nell'ELISA con antisiero omologo di coniglio e coniugato di proteine A-fosfatasi (SPA-PH).



Abbiamo saggiato la adattabilità della nostra ELISA per la sierologia di massa per mezzo di una collezione di sieri allestita artificialmente.

Sieri positivi sono stati da noi ottenuti attraverso immunizzazione di bovini, suini e pecore e sono stati allestiti i corrispondenti coniugati anti specie-Ig.

Nel mettere insieme questi parametri si sono rilevate inaspettate difficoltà, che abbiamo attribuito alla qualità dei coniugati anti specie-Ig. Perciò abbiamo stabilito le prerogative di un buon coniugato anti specie-Ig, e abbiamo controllato la qualità dei nostri coniugati e di quelli commerciali.

Per mettere alla prova la adattabilità della ELISA-Salmonella per la sierologia di massa, abbiamo eseguito il test con i nostri propri antigeni O e H, con sieri di coniglio omologhi e con coniugati SPA-PH.

Abbiamo lavorato parallelamente con provette e Microtiter-ELISA e abbiamo confrontato i due sistemi per quanto attiene impiego di tempo, strumentario e quantità delle sostanze impiegate.

In una serie di esperimenti di gel-filtrazione abbiamo separato antisieri anti-Brucella e anti-Salmonella da bovino, coniglio e suino e abbiamo con ciò mostrato che un buon coniugato enzima anti specie-Ig deve riconoscere IgG e IgM. In caso di infezioni acute da Gram-negativi l'uso di SPA-enzima-coniugati è problematico anche nel suino data la dominanza di anticorpi IgM.

### Summary

We developed a Salmonella ELISA suitable for mass screening. From four Salmonella species known to cause outbreaks in animals we prepared O- and H-antigens using the following methods:

Lipopolysaccharide (LPS = O-antigen) was extracted by heating the culture to 100 °C and 120 °C, respectively, and by EDTA as well. The bacterial suspension was deflagellated according to Fey (1979), i. e. it was brought to pH 1,5 with .05 M HCl, kept at 4 °C over night and centrifuged at 49 000 g. To the sediment consisting of «naked» bacteria .2 mM EDTA was added for 5 min at 37 °C and then the extraction was stopped by the addition of 10 mM MgCl<sub>2</sub>. The supernatant was the O-antigen. Furthermore we extracted LPS by the classical method of Westphal and Lüderitz. Finally we prepared bacterial suspensions (10<sup>9</sup> cells/ml), pipetted 100 µl into cups of microtiter plates and incubated at 37 °C to dryness.

For H-antigens we used purified polymeric flagellin after the procedure of Fey (1979). Polystyrene tubes and microplates were compared for their antigen uptake. One to 10 µg/ml .1 M Na-carbonate-bicarbonate pH 9,6 was the optimal coating condition. The EDTA O-antigen is recommended for its serological equivalence to the phenol-water extract and the simplicity of its preparation.

All antigens were tested using rabbit antisera of the Swiss Salmonella Center using a sandwich technique with commercial anti species Ig-enzyme conjugates and a protein A-phosphatase conjugate (SPA-PH). The first ones were of excellent quality. The usage of SPA-PH is questionable even in rabbit and swine serology because of the predominance of IgM antibodies in infections with gramnegatives. This was proved with a series of gelfiltration experiments using rabbit, bovine and porcine Salmonella antisera. ELISA as a tube test and as a microtiter version was compared with regard to expenditure of time and labour. The microtiter system was more rapid if a fully mechanized equipment was available. The tube system was good enough for the testing of some 100 samples/persons/day if the tubes could be directly measured with a photometer which was coupled to a programmable calculator/printer. This combination allowed an immediate statistical evaluation of the extinction readings.

### Literatur

Bommeli W., Kihm U., Zindel F. and Fey H.: Enzyme Linked Immunoassay and Fluorescent Antibody Techniques in the Diagnosis of Viral Diseases using Staphylococcal Protein-A instead of anti-gamma-Globulins. Vet. Immunol. Immunopathol. 1, 179–193 (1980a). – Bommeli W. R., Kihm U., Lazarowicz M. and Steck F.: Rapid detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus by micro-enzyme-linked immunosorbent assay (Micro ELISA). Proc. 2nd Internat.

Symp. Vet. Lab. Diagnosticians. II., 235–239 (1980b). – *Engvall E.*: Preparation of Enzyme-labelled Staphylococcal Protein A and its Use for Detection of Antibodies. in: *Engvall E. and A. J. Pesce*: Quantitative Enzyme Immunoassay. Blackwell Sci. Publ. Oxford, 1978. p. 25. – *Fey H., Pfister H., Messerli J., Sturzenegger N. and Grolimund F.*: Methods of Isolation, Purification and Quantitation of Bovine Immunoglobulins. Zbl. Vet. Med. B, 23, 269–300 (1976). – *Fey H.*: Light chains, Fab and F(ab')<sub>2</sub> from Bovine IgG. Immunochemistry 14, 99–106 (1977). – *Fey H. and Suter M.*: Eine neue Methode zur Herstellung von Salmonella-Flagellen-Antigen als Immunogen für die Produktion von H-Seren. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 243, 216–225 (1979). – *Fey H.*: A novel Method for the Production of Salmonella flagellar Antigen. II. Further Purification for the Preparation of H-Antisera. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A, 245, 55–66 (1979). – *Fey H. and Gottstein B.*: Ein preiswertes ELISA Lesegerät, kombiniert mit dem programmierbaren Rechner TI 59 von Texas Instruments. Schweiz. Arch. Tierheilk. 121, 387–394 (1979). – *Fey H.*: Evaluation of sigmoidal shaped Curves in Serology using a new Computer-suited Procedure. J. Immunol. Methods, 1981 in press. – *Goding J. W.*: Use of Staphylococcal Protein A as an Immunological Reagent. J. Immunol. Meth. 20, 241–253 (1978). – *Hammarström S., Engvall E., Johansson B. G., Svensson S., Sundblad J. and Goldstein J. J.*: Nature of the Tumor-Associated Determinant(s) of Carcinoembryonic Antigen. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, No 4, 1528–1532 (1975). – *Hernandez R., Munoz O., Garduno G., Gonzales S. and Gutierrez G.*: Detection of Antibodies to Salmonella O-Antigens in typhoid fever by Counterimmunoelectrophoresis. I. Description of technique. Arch. Invest. Med. (Mex.) 10, No 1, 23–31 (1979). – *Höltje J.-V.*: Die Aufnahme von Antibiotica in die Bakterienzelle. Forum Mikrobiologie 5/79, 249–255 (1979). – *Karlsson K., Carlsson H. E., Neringer R. and Lindberg A. A.*: Application and Usefulness of Enzyme Immunoassay for Diagnosis of Salmonella typhi-murium Infection. Scand. J. Infect. Dis. 12, 41–47 (1980). – *Lamb V. L., Jones L. M., Schurig G. G. and Berman D. T.*: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Bovine Immunoglobulin Subclass-Specific Response to Brucella abortus Lipopolysaccharides. Infect. Immun. 26.1, 240–247 (1979). – *Leive L.*: Release of Lipopolysaccharide by EDTA Treatment of E. coli. Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, No 4, 290–296 (1965). – *Leive L.*: Studies on the Permeability Change Produced in Coliform Bacteria by Ethylenediaminetetraacetate. J. Biol. Chem. 243, No 9, 2373–2380 (1968). – *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J.*: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275 (1951). – *Munford R. S. and Hall C. L.*: Radioimmunoassay for gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharide O-Antigens: Influence of Antigen Solubility. Infect. Immun. 26, No 1, 42–48 (1979). – *Nicolet J.*: New aspects in the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. p. 227. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Congress 1980, Copenhagen. – *Nowotny A.*: Basic Exercises in Immunochemistry. Springer Berlin, 1979. – *Robertsson J. A. and Carlsson H. E.*: ELISA for Measurement of Antibody Response to a Killed Salmonella typhi-murium Vaccine in Cattle. Zbl. Vet. Med. B, 27, 28–35 (1980). – *Ruppanner R., Meyer M. E., Willeberg P. and Behymer D. E.*: Comparison of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with other Tests for Brucellosis, Using Sera from Experimentally Infected Heifers. Am. J. Vet. Res. 41, No 8, 1329–1332 (1980). – *Svenungsson B., Jörbeck H. and Lindberg A. A.*: Diagnosis of Salmonella Infections: Specificity of indirect Immunofluorescence for Rapid Identification of Salmonella enteritidis and Usefulness of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J. Infect. Dis. 140, No 6, 927–936 (1979). – *Thoen Ch. O., Hopkins M. P. and Pietz D. E.*: Detection of Brucella Antibodies in Cows Milk using an automated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. 2nd International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Luzern 1980, Paper 228–231. – *Voll M. J. and Leive L.*: Release of Lipopolysaccharide in Escherichia coli Resistant to the Permeability Increase Induced by Ethylenediaminetetraacetate. J. Biol. Chem. 245, No 5, 1108–1114 (1970). – *Voller A.*: The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A revolution in Serologie? Diagnostic Horizons, 2, No 1, 1–7 (1978). – *Voller A., Bidwell D. E. and Bartlett A.*: The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). FLOWLINE publication, Guernsey, Europe. 3–48 (1977). – *Yang J., Kennedy M. T.*: Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Serodiagnosis of Amebiasis. J. Clin. Microbiol. 10, No 6, 778–785 (1979).