

Aus dem Institut  
für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Anwendbarkeit von LipL32 als Antigen in einem Screening-ELISA  
zum Nachweis von Leptospira-Antikörpern beim Schwein**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Ulrike Ripp  
aus Flörsheim am Main

Leipzig, 2013

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches  
Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand, Institut für Mikrobiologie, Zentrum für  
Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 05.11.2013

*Im Andenken an meinen Großvater,  
der sich auf diesen Moment sehr gefreut hatte  
und ihn leider nicht erleben durfte*



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung / Fragestellung.....	1
2	Literaturübersicht .....	2
2.1	Leptospiren.....	2
2.1.1	historische Betrachtung .....	2
2.1.2	Taxonomie .....	2
2.1.3	Morphologie .....	4
2.1.4	Genom .....	4
2.1.5	Lipoproteine der Membran .....	5
2.1.6	Wachstumsbedingungen .....	6
2.2	Leptospirose.....	7
2.2.1	Pathogenese, Klinik, Pathologie .....	7
2.2.2	Therapie.....	9
2.2.3	Immunologie .....	9
2.2.4	Vakzine .....	10
2.3	Epidemiologie.....	10
2.4	Diagnostik der Leptospirose .....	11
2.4.1	Erregernachweis .....	11
2.4.2	serologische Methoden.....	13
2.5	Einführung in / Grundsätzliches zur ELISA Technologie .....	17
3	Material und Methoden .....	22
3.1	Verwendete Seren.....	22
3.1.1	Seren aus der Positiv-Gruppe.....	22
3.1.2	Seren aus der Negativ-Gruppe .....	27
3.1.3	Seren aus der Verdächtig-Gruppe .....	27
3.1.4	Seren aus der 1 : 50-Gruppe .....	27
3.1.5	Seren aus der Zusatz-gruppe .....	27
3.1.6	Übersicht der Seren .....	28
3.2	Mikroagglutinationstest (MAT).....	29
3.2.1	verwendete Materialien.....	29
3.2.2	verwendete Bakterienstämme.....	29
3.2.3	Kultivierung der Stämme.....	30

3.2.4	Durchführung .....	30
3.3	ELISA .....	33
3.3.1	verwendete Materialien.....	33
3.3.2	Positiv- und Negativkontrolle.....	34
3.3.3	ELISA-Entwicklung .....	35
3.3.4	ELISA-Durchführung.....	38
3.4	Validierung / Statistik.....	40
3.4.1	Reproduzierbarkeit.....	40
3.4.2	Validierung anhand der 200 Validierungsseren .....	42
4	Ergebnisse .....	47
4.1	Titrationen zur ELISA-Entwicklung .....	47
4.1.1	Antigen-Titration.....	47
4.1.2	Konjugat-Titration.....	49
4.1.3	Serum-Titration .....	50
4.2	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse .....	52
4.2.1	Intraassay-Varianz .....	52
4.2.2	Interassay-Varianz .....	53
4.3	ELISA-Ergebnisse der 200 Validierungsseren .....	55
4.4	Validierung des ELISAs anhand der 200 Validierungsseren .....	59
4.4.1	Grenzwertbestimmung nach Altersgruppen.....	62
4.5	ELISA-Ergebnisse der restlichen Seren .....	65
4.5.1	Seren aus der Negativ-Gruppe .....	65
4.5.2	Seren aus der Verdächtig-Gruppe .....	65
4.5.3	Seren aus der 1 : 50-Gruppe .....	66
4.5.4	Seren aus der Positiv-Gruppe.....	66
4.5.5	Seren aus der Zusatz-Gruppe.....	67
4.6	Vergleichende Darstellung aller untersuchten Seren.....	69
4.6.1	box plots .....	69
4.6.2	ROC-Analysen .....	75
5	Diskussion.....	79
5.1	Titrationenversuche / ELISA Entwicklung .....	79
5.2	Validierung des ELISAs / Reproduzierbarkeit.....	80

5.3	Validierung des ELISAs / Grenzwert der Validierungsseren.....	80
5.4	Anwendung des Grenzwertes auf die restlichen Seren .....	81
5.5	Bewertung der unterschiedlichen Ergebnisse in MAT und ELISA .....	83
5.6	Auswahl der (Validierungs-) Seren .....	86
5.7	Untersuchung alternativer Grenzwerte .....	87
5.8	Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen.....	90
5.9	Fazit.....	91
6	Zusammenfassung.....	93
7	Summary.....	95
8	Literaturverzeichnis .....	97
9	Anhang.....	105
9.1	Tabellenverzeichnis.....	105
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	106

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
10x PBS	10-fach konzentriertes PBS
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APP	Actinobacillus pleuropneumoniae
Aqua dest	destilliertes Wasser
AUC	Area under curve
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
ca.	circa
CI	Konfidenzintervall
cut-off	Grenzwert
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMJH	Ellinghausen McCullough Johnson Harris Medium
etc.	et cetera
FN	falsch negativ
FP	falsch positiv
g / l	Gramm pro Liter
ggr.	geringgradig
HRPO	Horseradish-Peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
i.m.	intramuskulär
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
ILS	International Leptospirosis Society
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
Lig	leptospiral immunoglobulin-like protein
LipL	Lipoprotein of Leptospira
LPS	Lipopolysaccharid
MAT	Mikroagglutinationstest
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
neg	negativ
NK	Negativkontrolle
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD-Werte	optical density Werte
OIE	office international des Epizooties, Weltorganisation für Tiergesundheit
OMP	Outer membrane protein
PBS	phosphate-buffered saline
PBS-T	PBS-Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PK	Positivkontrolle
pos	positiv
PRRS	Porcines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom
RN	richtig negativ
ROC	Receiver Operating Characteristic

RP	richtig positiv
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S/N ratio	signal-to-noise ratio / Signal-Rausch-Verhältnis
S/P	sample-to-positive
S/P%	sample-to-positive in %
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
ser.	serovar
SP1	schwach positive Probe 1
SP2	schwach positive Probe 2
TMB	Tetramethylbenzidin
usw.	und so weiter
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung / Fragestellung

Leptospirosen (lateinisch *spira*, griechisch *speira* „gewundene Linie“) sind weltweit verbreitete Infektionskrankheiten bei Menschen und Tieren, die durch pathogene Serovare der Gattung *Leptospira* hervorgerufen werden. Der zoonotische Charakter wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts definiert.

Das Schwein zählt neben Hund, Pferd und Rind zu den für eine Leptospiren-Infektion empfänglichsten Tierarten. Die Überwachung des Leptospiren-Infektionsstatus produzierender Sauen ist daher wesentlicher Bestandteil des Zuchtmonitorings und wird von Zuchtorganisationen regelmäßig durchgeführt. Die Serovare *Leptospira interrogans* serovar Pomona und Bratislava haben die größte Bedeutung unter den Leptospirosen der Schweine. Hauptsymptome der Infektion sind Aborte und die Geburt lebensschwacher Ferkel.

Da diese Symptome nicht pathognomonisch sind, ist man auf die Labordiagnostik, insbesondere serologische Untersuchungen, angewiesen. Dafür kommt hauptsächlich der Mikroagglutinationstest (MAT) zur Anwendung. Da diese Methode mit vitalen und damit auch infektiösen Lebendantigenen durchgeführt wird, hat neben der begrenzten Sensitivität das Risiko der Laborinfektion die Suche nach alternativen Methoden forciert. Dafür sind ELISA-Techniken unter Verwendung apathogener (*Leptospira biflexa*) und pathogener Leptospiren oder auch rekombinant gewonnener Proteinantigene entwickelt worden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist ein *proof of concept* zum Einsatz eines rekombinant erzeugten Antigens (LipL32) in der Anwendung als Screening-ELISA zum Nachweis von Serovar-übergreifenden Antikörpern der Leptospirose des Schweines. Dabei sollen insbesondere die Entwicklungsschritte in der Konfiguration des Systems und dessen Anwendung an definierten Seren (Tiere aus Beständen mit hohem Gesundheitsstatus, Tiere aus einem Bestand mit sicher nachgewiesenem Leptospirose-Ausbruch) demonstriert werden. Anhand von gezielt ausgewählten Seren erfolgt die Validierung des ELISAs, und seine Leistungsfähigkeit wird im Vergleich zur Referenzmethode Mikroagglutinationstest an Seren mit bekannten MAT-Ergebnissen demonstriert.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Leptospiren

#### 2.1.1 HISTORISCHE BETRACHTUNG

Die wissenschaftliche Erstbeschreibung von Leptospiren als Infektionserreger erfolgte nach deren Entdeckung in Nierengewebe eines angeblich an Gelbfieber verstorbenen Patienten mit der Bezeichnung „*Spirochaeta interrogans*“ (STIMSON 1907) aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Form mit einem Fragezeichen (LEVETT 2001). Frühere Beschreibungen von Symptomen wurden erst später mit Leptospiren-Infektionen in Zusammenhang gebracht. Leptospirosen wurden dabei in vielen Teilen der Welt unter verschiedenen Namen beschrieben, die meistens entweder einen Zusammenhang mit einer Jahreszeit (japanisches Herbstfieber), der Dauer (Sieben Tage Fieber) oder einer Tätigkeit (Schweinehüterkrankheit, Reisfeldfieber) hatten (WHO 2007). Die ersten vitalen Leptospiren wurden in Umweltproben beobachtet (WOLBACH und BINGER 1914). HÜBENER und REITER (1915) erkannten den Zusammenhang mit der von Weil bereits 1866 beschriebenen und nach ihm benannten Erkrankung. Der Erregernachweis erfolgte durch Patientenblutübertragung auf Meerschweinchen, die daraufhin klinische und letale Symptome ausbildeten und in deren Organen die Leptospiren, „*Spirochaeta nodosa*“ genannt, gefunden wurden. Zeitgleich postulierten KRUMBEIN und FRIELING (1916) bei einem gelbsüchtigen Hund die Vermutung einer dem Morbus Weil vergleichbaren Erkrankung bei Haustieren und ihren zoonotischen Charakter. Das Krankheitsbild beim Hund war zu diesem Zeitpunkt bereits unter dem Begriff der „Stuttgarter Hundeseuche“ bekannt. Die wesentlichen Erkenntnisse über die Leptospirose beim Schwein wurden überwiegend in den 1970er und 1980er Jahren gewonnen.

#### 2.1.2 TAXONOMIE

Aufgrund des morphologischen Aufbaus (spiraliges Aussehen) gehört die Gattung *Leptospira* (Familie *Leptospiraceae*) in die Ordnung der *Spirochaetales* (SELBITZ 1992) wie auch die Gattungen *Borrelia*, *Brachyspira* und *Treponema*.

Die taxonomische Klassifizierung der Leptospiren folgt derzeit unterschiedlichen Herangehensweisen und erscheint damit unübersichtlich. Neben der traditionellen Einteilung nach serologischen Gesichtspunkten gibt es mittlerweile auch eine Einteilung unter Berücksichtigung molekularbiologischer Untersuchungen. Die beiden Systeme weisen dabei zum Teil deutliche Unterschiede auf.

### 2.1.2.1 Serologische Klassifizierung

Die Grundlage der serologischen Klassifizierung der Leptospiren bildet die Serovar, welche durch einen Referenzstamm repräsentiert wird (KMETY und DIKKEN 1993, WHO 2003). Verschiedene Serovare werden aufgrund ihrer antigenetischen Ähnlichkeit (potentielle serologische Kreuzreaktionen) in Serogruppen zusammengefasst. Der Begriff Serogruppe hat dabei keinen offiziellen taxonomischen Status (WHO 2003), sondern dient allein praktischen Zwecken, um die derzeit bekannten über 250 Serovare gruppieren zu können. Die Überprüfung, ob zwei Stämme der gleichen Serovar zuzuordnen sind, erfolgt mittels sogenannter Kreuzagglutinin-Absorptionstests (DIKKEN und KMETY 1978). Die antigenetische Verwandtschaft beruht dabei auf der strukturellen Homogenität des Zuckeranteils der Lipopolysaccharide (LPS) der Membran (CERQUEIRA und PICARDEAU 2009).

Aufgrund ihrer Pathogenität werden als Grundlage der Klassifizierung nach serologischen Kriterien zwei Spezies unterschieden: *Leptospira interrogans*, in der alle pathogenen Serovare, und *Leptospira biflexa*, in der apathogene, saprophytäre Serovare zusammengefasst werden. Die Zuordnung einer Serovar zu der pathogenen Spezies erfolgt anhand der Prüfung des Wachstums bei 13 °C sowie bei der Toleranz gegenüber 8-Azaguanin (225 µg / ml). Pathogene Leptospiren wachsen zu beiden Konditionen nicht (WHO 2007).

Mittlerweile sind 25 Serogruppen mit insgesamt mehr als 250 Serovaren in der Spezies *Leptospira interrogans* beschrieben. Zu der Spezies *Leptospira biflexa* werden 38 Serogruppen mit 65 Serovaren gezählt (WHO 2007).

### 2.1.2.2 Molekulargenetische Klassifizierung

Mit der Entwicklung DNA-basierter Untersuchungsmethoden wurde die Gattung *Leptospira* umstrukturiert. Die molekulargenetische Klassifizierung beruht auf DNA-Homologie (WHO 2003). Insbesondere die Sequenz des *rrs*-Gens, welches die 16S rRNA kodiert, wird für das Aufstellen genetischer Beziehungen verwendet (WHO 2003, PEROLAT et al. 1998). Im Jahr 2007 wurde auf dem *Treffen des Subkomitees für die Taxonomie von Leptospiraceae* (Quito, Ecuador) festgelegt, dass aufgrund molekulargenetischer Unterschiede die Gattung *Leptospira* in 13 pathogene Spezies mit über 250 Serovaren (*L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii*, *L. wolffii*) und in 6 saprophytische Spezies mit mehr als 60 Serovaren (*L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* und *L. wolbachii*) eingeteilt wird (ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010).

Durch die beiden unterschiedlichen Klassifizierungssysteme sind Probleme in der taxonomischen Zuordnung entstanden. So kann eine Serovar zu mehr als einer Spezies gehören und Stämme einer genetischen Spezies müssen nicht zwingend derselben Serogruppe angehören (BHARTI et al. 2003, LEVETT 2001).

Beispielsweise gehören die 14 Serovare der Serogruppe Bataviae zu den Spezies *L. interrogans sensu stricto* (5 Serovare), *L. santarosai* (5 Serovare), *L. kirschneri* (1 Serovar), *L. noguchii* (2 Serovare) und *L. borgpetersenii* (1 Serovar) (LEVETT 2001 und CERQUEIRA und PICARDEAU 2009).

### 2.1.3 MORPHOLOGIE

Leptospiren sind spiralig gewundene Bakterien, die einen Durchmesser von ca. 0,1 µm haben und 6-20 µm lang sind (ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010). Daher können Sie 0,45 µm-Filter passieren. Ihre Enden laufen in charakteristischen Haken aus (ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010), weshalb ihre Form auch als „Kleiderbügel“ beschrieben worden ist. Die Zellwand der Leptospiren beruht auf einer Doppelmembranstruktur, bei der die Zytoplasmamembran eng mit einer Peptidoglykanschicht verbunden ist. Nach außen schließt eine äußere Zellmembran den Körper der Leptospiren ab (HAAKE 2000, LEVETT 2001).

Die äußere Membran enthält neben Lipopolysacchariden (LPS), die morphologisch denen Gram-negativer Bakterien sehr ähnlich sind, strukturelle und funktionelle Proteine. Einen Großteil dieser Proteine bilden Lipoproteine, wobei das Lipoprotein of *Leptospira* 32 (LipL32) den größten Anteil ausmacht (CULLEN et al. 2005, ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010).

Die Beweglichkeit der Leptospiren wird durch zwei Flagellen erreicht, die im periplasmatischen Bereich liegen und deren Enden an den Polen der Zelle inserieren (ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010). Ihre freien Enden weisen in Richtung Zellmitte und überlappen sich dort (HOVIND-HOUGEN 1976). Das Zytoplasma der Leptospiren ist spiralig um diesen Flagellenkörper gewunden (CHARON und GOLDSTEIN 2002). Durch die Flagellen können Leptospiren eine spiralförmige Vor- und Rückwärtsbewegung durchführen sowie sich um ihre eigene Achse drehen. Dadurch weisen sie ein ganz typisches Erscheinungsbild im Dunkelfeldmikroskop auf (LEVETT 2001).

### 2.1.4 GENOM

Bisher sind 6 Genome von Leptospiren vollständig sequenziert worden (jeweils 2 der Spezies *L. biflexa*, *L. borgpetersenii* und *L. interrogans*) (REN et al. 2003, NASCIMENTO et al. 2004, BULACH et al. 2006, PICARDEAU et al. 2008).

Etwa 40 % aller Gene codieren Proteine mit unbekanntem Funktionen. Dies sind vor allem Gene pathogener Leptospiren, so z.B. mehr als 80 % der Gene, die nur *L. interrogans* und etwa 75 % der Gene, die nur *L. borgpetersenii* besitzen.

### 2.1.5 LIPOPROTEINE DER MEMBRAN

Lipoproteine gehören zu den „Outer membrane proteins“ (OMPs) der Leptospirenmembran (LUO et al. 2009). Typisch für Lipoproteine ist, dass ein Protein durch kovalent gebundene Fettsäuren in der Membran verankert ist (HAAKE 2000). Jedes Lipoprotein hat dabei eine spezifische Lage: sie sind in der inneren oder äußeren Membran angeordnet und weisen dabei entweder nach innen oder außen. Für die Diagnostik sind die Lipoproteine von Interesse, die in der äußeren Membran liegen und nach außen auf die Oberfläche weisen und somit Kontakt zu der Umwelt (für das Bakterium zur Adhäsion / Invasion, für den Wirt als Angriffsfläche für das Immunsystem, speziell Antikörper) ermöglichen (HAAKE 2000). So liegen zum Beispiel die Lipoproteine LipL31, LipL36 und LipL48 in der inneren Membran, LipL21, LipL32 und LipL41 in der äußeren (LUO et al. 2009). LipL32 ist das auf der Zelloberfläche am häufigsten zu findende Lipoprotein, gefolgt von LipL21 und danach LipL41 (CULLEN et al. 2005). Es konnte mittlerweile gezeigt werden, dass die Expression mancher Proteine umgebungsabhängig ist. So steigt der Anteil des Proteins Loa22 *in vivo* im Vergleich zu *in vitro* stark an, während LipL36 nicht *in vivo* zu finden ist (NALLY et al. 2007, CULLEN et al. 2002). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht wichtiger Membranproteine und von wem sie zuerst beschrieben worden sind.

**Tabelle 1 Auszug beschriebener Membranproteine**

In der Tabelle ist aufgelistet, durch wen bestimmte Leptospiren-Membranproteine näher charakterisiert worden sind.

<b>Membranprotein</b>	<b>näher charakterisiert durch</b>
OmpL1	HAAKE et al. 1993
LipL41	SHANG et al. 1996
LipL36	HAAKE et al. 1998
LipL32	HAAKE et al. 2000
LipL45	MATSUNAGA et al. 2002
LipL48	HAAKE und MATSUNAGA 2002
LipL21	CULLEN et al. 2003
Loa22	KOIZUMI und WATANABE 2003
LigA	MATSUNAGA et al. 2003
LigB	MATSUNAGA et al. 2003
OmpL37	PINNE et al. 2010

#### 2.1.5.1 LipL32

Das Lipoprotein of Leptospira 32 (LipL32) stellt den größten Teil der in der äußeren Membran enthaltenen Lipoproteine dar (CULLEN et al. 2002, CULLEN et al. 2005). Das berechnete molekulare Gewicht beträgt 26,7 kDa, aber in der Elektrophorese ist es bei etwa 32 kDa zu finden (HAAKE et al. 2000). LipL32 wird nur von pathogenen Leptospiren exprimiert, wobei das Gen und die entsprechende Aminosäuresequenz

in allen Spezies stark konserviert sind (HAAKE et al. 2000). VIVIAN et al. (2009) konnten inzwischen die Kristallstruktur von LipL32 darstellen. Das LipL32 Monomer besteht aus einem „jelly-roll fold core“, aus dem verschiedene weitere Strukturen hervorstehen (HAUK et al. 2009).

LipL32 kann mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix interagieren. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es Plasma-Fibronektin, Kollagen IV und Laminin insbesondere durch sein C-terminales Ende binden kann (HAUK et al. 2008, HOKE et al. 2008). Diese Fähigkeit wurde z.B. auch für LigA und LigB, allerdings mit stärkerer Bindungskapazität, nachgewiesen (CHOY et al. 2007, LIN und CHANG 2007). Verschiedene Versuche konnten eine gewisse Redundanz in Bezug auf die Adhäsion an extrazelluläre Matrix bei Leptospiren zeigen (HOKE et al. 2008, MURRAY et al. 2009, CRODA et al. 2008).

HAUK et al. (2008) untersuchten die Bereiche von LipL32, die durch Seren infizierter Patienten erkannt werden. Er stellte fest, dass die IgM-Antikörper ausschließlich an das C-terminale Ende binden, unabhängig davon, ob der Patient sich in der akuten oder konvaleszenten Phase befindet. Die IgG-Antikörper binden zum Teil auch an dem C-terminalen Ende, der Großteil der getesteten Seren band aber insbesondere in der konvaleszenten Phase an einer zentralen Region des LipL32. HAUK et al. (2008) konnten IgGs in der akuten Phase nachweisen. Auch andere Forscher konnten zeigen, dass IgGs in der akuten Phase gegen Leptospiren-Proteine, insbesondere LipL32, gebildet werden (BOMFIM et al. 2005, BOONYOD et al. 2005, CHAPMAN et al. 1988, FLANNERY et al. 2001, GUERREIRO et al. 2001).

LOTTERSBERGER et al. (2009) konnten Epitope für humane Antikörper auf LipL32 bestimmen. Eine der beiden Regionen liegt in dem Bereich des C-terminalen Endes, welches HAUK et al. (2008) als besonders immunogen bezeichnen.

#### 2.1.6 WACHSTUMSBEDINGUNGEN

Leptospiren sind obligat aerobe Bakterien, die besondere Ansprüche an ihr Nährmedium stellen. Vitamin B1 und B12 sowie langkettige Fettsäuren sind die einzigen organischen Stoffe, die als essentielle Nährstoffe bekannt sind. Fettsäuren sind für den Energiestoffwechsel nötig und werden außerdem als Kohlenstoffquelle für den Aufbau zellulärer Lipide benötigt (WHO 2003, LEVETT 2001).

Pyruvat ist ein nicht-essentieller Nährstoff, fördert aber das Wachstum nach Isolierung. Leptospiren verwenden im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien keine externen Pyrimidin-Basen zum Aufbau ihrer DNA, wodurch sie gegen die antibakterielle Aktivität des Pyrimidin-Analogons 5-Fluorouracil resistent sind. Dies wird ausgenutzt, wenn Leptospiren von kontaminierten Medien isoliert werden sollen (WHO 2003, ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010).

Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 28-30 °C (LEVETT 2001, ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010). Momentan wird als Medium meistens EMJH

verwendet (ein Rezept von *Ellinghausen* und *McCullough*, das von *Johnson* und *Harris* verändert wurde) Es ist ein flüssiges Medium, das auf Ölsäure, bovines Serumalbumin und Polysorbat 80 (Tween) basiert (ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010). Frisch isolierte Leptospiren wachsen sehr langsam, so dass Kulturen bis zu 13 Wochen bebrütet werden, bevor die endgültige Beurteilung erfolgt. Häufiger passagierte Kulturen wachsen innerhalb von 10 Tagen (LEVETT 2001). In halbfesten Medien zeigt sich das Leptospiren-Wachstum durch eine Trübung im oberen Bereich des Mediums (LEVETT 2001).

## 2.2 Leptospirose

### 2.2.1 PATHOGENESE, KLINIK, PATHOLOGIE

#### 2.2.1.1 Pathogenese, Übertragung und Ausscheidung

Typischerweise sind Nager die primären Infektionsquellen für Leptospirosen der anderen Tierarten und des Menschen. Da die Nager klinisch nicht erkranken, sind sie ein Reservoirwirt, der den Infektionszyklus aufrecht hält (WHO 2003, BHARTI et al. 2003, ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010).

Die Infektion mit Leptospiren erfolgt hauptsächlich über direkten oder indirekten Kontakt (z.B. Trinkwasser, Futter) mit Urin infizierter Tiere. Die Ausscheidung kann vor allem bei *L. Pomona* dabei bis zu  $10^8$  Leptospiren / ml betragen (ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010). Es können sich Schweine in Gruppenhaltung gegenseitig infizieren. Die Ausscheidung von *L. Bratislava* ist im Urin vergleichsweise niedrig. Durch die Persistenz von *L. Bratislava* im weiblichen und männlichen Genitaltrakt kann eine Infektion aber über den Deckakt oder das Sperma erfolgen (ELLIS et al. 1986, BOLIN und CASSELLS 1992, MOUSING et al. 1995, STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK 2011). Auch kongenitale und neonatale Infektionen sind möglich (MITCHELL et al. 1966, WHO 2003).

Die Leptospiren gelangen in den Körper durch Verletzungen der Haut, durch intakte Schleimhäute (nasal, oral, konjunktival) (CHAUDHARY et al. 1966) und sehr wahrscheinlich auch durch von Wasser aufgeweichte Haut. In seltenen Fällen können sie durch Inhalation von Urintropfen oder durch Trinken kontaminierten Wassers in den Körper gelangen (WHO 2003). Beim Schwein können durch kontaminierte Liegeflächen und dementsprechend auf perkutanem oder mukosalem Weg Infektionen entstehen (LATELL 2008).

Die Bakteriämie-Phase dauert circa eine Woche (WHO 2003, ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010). Durch noch unbekannte Toxine oder toxische Zellkomponente entstehen Endothelschäden kleiner Gefäße, die zu Ischämien führen können. Es kommt zu lokalen Nekrosen in den Nieren, der Leber und der Lunge sowie zu Meningitiden und Myositiden. Mit dem Auftreten von ersten

Antikörpern ab der zweiten Woche post infectionem werden die Leptospiren aus dem Blut und den Geweben eliminiert (WHO 2003, XUE et al. 2009, ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010).

Es ist jedoch möglich, dass sie in den proximalen Tubuli der Niere persistieren und mit dem Urin kontinuierlich oder intermittierend über Monate ausgeschieden werden (WHO 2009). Durch die Persistenz der Leptospiren in den Nieren können Reservoirwirte lebenslang Leptospiren ausscheiden und andere Tiere sowie den Menschen infizieren.

Neben dem Rückzug von Leptospiren in die Nieren ist auch eine Persistenz in dem männlichen und weiblichen Genitaltrakt bei chronisch infizierten Tieren möglich (BOLIN und CASSELLS 1992), insbesondere durch *L. Bratislava* im nicht-graviden Uterus (ELLIS 2006).

#### *2.2.1.2 Klinik beim Schwein*

Bei der Leptospirose des Schweines werden eine akute und eine chronische Form unterschieden.

Die *akute* Form der Leptospirose wird relativ selten diagnostiziert, da nicht immer klinische Symptome auftreten. Am wahrscheinlichsten sind Symptome bei tragenden Sauen und jungen Ferkeln zu finden (STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK 2011). Als Symptome können vorübergehende Anorexie, Pyrexie und Apathie beobachtet werden (STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK 2011), doch je stärker die Leptospiren-Serovar an das Schwein adaptiert ist (dazu werden *L. Bratislava*, *L. Pomona* und *L. Tarassovi* gezählt) (NETO et al. 1997, ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010), desto unwahrscheinlicher ist es, dass eine Klinik ausgebildet wird. Infizierte Mastschweine zeigen in der Regel keine Symptome der Erkrankung und werden erst bei der Schlachtung durch interstitielle Nephritiden als erkrankte Tiere erkannt (CHAPPEL et al. 1992).

Die *chronische* Form ist die weitaus häufigere. Sie geht einher mit reduzierten Reproduktionsleistungen, Aborten, Totgeburten, Mummifikationen, Geburt lebensschwacher Ferkel (Frühgeburten) und Infertilität (OIE 2012a, NETO et al. 1997). Insbesondere eine allgemein geschwächte Herdenimmunität ist prädisponierend für die chronische Verlaufsform (STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK 2011).

Kontrovers wird in der Literatur diskutiert, inwiefern bestimmte Krankheitsverläufe typisch für eine infizierende Serovar sind. FISH et al. (1963) haben in einem Übersichtsartikel verschiedene Fallbeschreibungen von Leptospiren-Infektionen in Schweinebeständen zusammengestellt. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass eine Tendenz der Klinik zu der infizierenden Serovar vorhanden sein kann, aber kein typisches Krankheitsbild vorliegt. Auch in der Humanmedizin wird die These des Zusammenhangs Klinik und Serogruppe nicht mehr unterstützt (LEVETT 2001).

### 2.2.1.3 Pathologie

Bei Schweinen, die mit Leptospiren infiziert waren, können keine spezifischen pathologischen Befunde für die Erkrankung erhoben werden (FISH et al. 1963). Akut infizierte Tiere können eine interstitielle Nephritis aufweisen, doch chronisch infizierte Tiere haben typischerweise keine pathologischen Veränderungen (BHARTI et al. 2003).

### 2.2.2 THERAPIE

Leptospiren sind für viele Antibiotika empfindlich (WHO 2003), wie zum Beispiel  $\beta$ -Lactame, Makrolide, Tetrazykline, Fluorochinolone und Streptomycin (LEVETT 2001). Die Antibiotikawahl hängt von dem Zeitpunkt des Infektionsgeschehens ab. Sobald eine Besiedlung der Nieren stattgefunden hat, ist es essentiell, nierengängige Antibiotika zu verwenden.

Für Leptospiren werden unter Routinebedingungen keine Antibiogramme erstellt, da es abgesehen von der langen und schwierigen Kultivierung keine idealen Quantifizierungsmethoden des Leptospirenwachstums gibt. Dadurch stehen bisher keine schnellen, standardisierten Methoden zur Antibiogramm-Erstellung zur Verfügung (LEVETT 2001).

Allein durch eine antibiotische Behandlung wird ein Bestand allerdings nicht frei von Leptospiren werden. Dazu müssen weiterreichende Korrekturen der Umgebung und des Managements erfolgen, wie Nagerbekämpfung und Desinfektions-/Hygienemaßnahmen. In Fällen mit hoher Durchseuchung kann es sogar nötig sein, Bestände teilweise zu dezimieren (KINGSCOTE 1986).

### 2.2.3 IMMUNOLOGIE

Die immunologischen Abwehrmechanismen des Körpers gegen Leptospiren basieren hauptsächlich auf humoraler Abwehr. Innerhalb von 5-7 Tagen nach der Infektion mit Leptospiren kommt es zur Serokonversion (WHO 2003). Zunächst erscheinen IgM-Antikörper, die häufig in niedrigen Konzentrationen lange nachweisbar sind. Die Detektion der IgG-Antikörper ist variabel, sie schwankt zwischen nicht-nachweisbar bis zu über mehrere Jahre nachweisbar (WHO 2003, WHO 2009). Beim Schwein konnten Antikörper im MAT in der zweiten Woche nach experimenteller Infektion nachgewiesen werden. Ab dem dritten / vierten Monat nach der Infektion waren sie dann nicht mehr detektierbar (MORSE et al. 1958, NETO et al. 1997). Insbesondere Antikörper chronisch infizierter Tiere können unter dem detektierbaren Niveau liegen (OIE 2012a).

Die Antikörper werden hauptsächlich gegen die serovarspezifischen Lipopolysaccharide gebildet (ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010). In der Anfangsphase der Erkrankung können kreuzreagierende Antikörper gegen

verschiedene Serovare auftreten. Diese verschwinden mit der Zeit, so dass nur noch Antikörper gegen die infizierende Serovar nachweisbar sind (WHO 2003). Dadurch besteht nach einmal überstandener Infektion nur ein Schutz gegen die infizierende Serovar (WHO 2003). Die unspezifische zelluläre (Monozyten, Makrophagen) und humorale (Komplement) Abwehr ist ohne Anwesenheit von Antikörpern ineffizient (LEVETT 2001).

#### 2.2.4 VAKZINE

Für einen Serovar-übergreifenden Schutz vor der Leptospirose konnte bisher weder für das Tier noch für den Menschen eine geeignete Vakzine entwickelt werden. Die derzeit verfügbaren Impfstoffe basieren meist auf Ganzzell-Antigenen und können nur einen Serovar-spezifischen Schutz ermöglichen (ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA 2010).

Insbesondere die für die Anwendung beim Tier entwickelten Impfstoffe minimieren zwar nach der Immunisierung die klinische Symptomatik, aber eine Persistenz in der Niere wird nicht sicher verhindert und somit kann es weiterhin über die Ausscheidung im Urin zur Infektion anderer Tiere kommen (WHO 2003, BHARTI et al. 2003). Für Tiere gibt es kommerzielle Ganzzell-Vakzinen, in Deutschland speziell nur für den Hund und für das Rind zugelassene Impfstoffe.

Verschiedene Oberflächenproteine wurden mittlerweile in potentiellen Impfstoffen getestet, doch bisher konnte kein optimales Protein für einen Impfstoff ermittelt werden (HAAKE et al. 1999, CULLEN et al. 2004, BRANGER et al. 2001 und 2005, KÖMMLING SEIXAS et al. 2007).

### 2.3 Epidemiologie

Leptospiren werden schnell durch Desinfektionsmittel oder in Folge von Austrocknung und Hitze abgetötet, dagegen können sie aber in feuchter Erde oder Wasser mit neutralem oder leicht alkalischem pH-Wert Wochen bis Monate überleben (WHO 2003, LEVETT 2001). So können saprophytische Leptospiren in Oberflächen- und Leitungswasser, feuchter Erde und sogar in salzigem Meerwasser nachgewiesen werden (WHO 2003). *L. borgpetersenii* soll nicht in der Lage sein, längere Zeit außerhalb seines Wirtes zu überleben (XUE et al. 2009).

Die weltweit verbreitetste (und am häufigsten isolierte) Serovar beim Schwein ist *L. Pomona* (STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK 2011). *L. Bratislava* konnte serologisch in vielen Ländern Europas, in Nordamerika, Australien, Brasilien und Südafrika nachgewiesen werden (STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK 2011). Eine Isolierung aus Schweinen gelang bisher in den Niederlanden, dem Vereinigten Königreich, den USA sowie SCHÖNBERG et al. (1992) in Deutschland (STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK 2011). *L. Tarassovi* tritt vor allem in

Osteuropa und Australien beim Schwein auf (STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK 2011). Auch die Serovare Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Sejroe und Hardjo konnten beim Schwein isoliert werden (STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK 2011). Über die epidemiologische Verbreitung beim Schwein weiß man bei diesen Serovaren aber wenig.

Ein großes Problem bei der Auswertung epidemiologischer Daten auf das Vorhandensein von Leptospiren beim Schwein ist die große Variabilität der Datenlage. Abgesehen von nicht repräsentativen Untersuchungen (in Bezug auf Stichprobengröße, Betriebsstruktur, Tialter etc.), werden unterschiedliche MAT-Titer zum einen für die Untersuchungen und zum anderen als Grenzwert, sowie unterschiedliche Serovare in den MAT-Panels verwendet. Dies erschwert die Auswertung und wirft die Frage auf, ob wirklich reale Prävalenzen eines Landes festgestellt worden sind (STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK 2011).

Auch für Deutschland gibt es kaum aktuelle Zahlen zur Verbreitung der Leptospirose bei Schweinen. SCHÖNBERG et al. (1987) führte 1984 eine Untersuchung an 1835 Schweinen durch, von denen 22 (1,2 %) serologisch positiv waren. Als Grenzwert wurden Titer  $\geq 1 : 400$  verwendet. *L. Saxkoebing* und *L. Grippotyphosa* stellten mit insgesamt 15 positiven Tieren die häufigsten Serovare dar. Es wurde allerdings nicht auf *L. Bratislava* untersucht (STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK 2011). Das Labor der IVD GmbH Hannover testete in den Jahren 2003/2004 insgesamt 9116 Schweine aus ihren diagnostischen Einsendungen, von denen 9,9 % einen Titer  $\geq 1 : 400$  hatten. 51,5 % der Proben hatten einen Titer  $\geq 1 : 100$ , die deutlich häufigste Serovar war *L. Bratislava* (STRUTZBERG-MINDER 2008).

## 2.4 Diagnostik der Leptospirose

Die Leptospirose beim Schwein unterliegt in Deutschland der Meldepflicht. Der Rückzug und die Persistenz von Leptospiren in den Nieren sowie dem männlichen und weiblichen Genitaltrakt bei chronisch infizierten Tieren (BOLIN und CASSELLS 1992, ELLIS 2006) stellen besondere Herausforderungen an die Diagnostik.

### 2.4.1 ERREGERNACHWEIS

Leptospiren können in den ersten sieben Tagen nach Infektion im Blut nachgewiesen werden (WHO 2003). Danach wird als Probenmaterial Urin oder Organe (Nieren, Genitaltrakt sowie bei Feten Leber, Lunge, Gehirn) benötigt. Der Nachweis von Leptospiren in Feten bedeutet, dass die Sau ein chronischer Träger war (OIE 2012a). Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der vier Verfahren, die für den Erregernachweis verwendet werden können.

**Tabelle 2 Verfahren für den Erregernachweis**

Vier Verfahren für den Erregernachweis von Leptospiren sind näher erläutert mit den Grundlagen für ihre Durchführung sowie die Vor- und Nachteile der Verfahren.

<b>Verfahren</b>	<b>Grundlagen der Durchführung / Anforderungen</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
<b>Direktnachweis mittels Dunkelfeldmikroskopie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Material: Blut, Urin</li> <li>- Dunkelfeldmikroskop</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verwechslung von Fibrin, Serumproteinen und Zellresten mit Leptospiren</li> <li>- Leptospirenkonzentration oft zu niedrig für Nachweis (WHO 2003)</li> </ul>
<b>Immunfluoreszenz / Silberimprägnierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Material: fixiertes Gewebe</li> <li>- Immunhistochemische Färbemethoden oder Silberimprägnierung</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verwechslung von Artefakten mit Leptospiren</li> <li>- falsch negative Ergebnisse bei geringer Leptospiren-Anzahl (WHO 2003)</li> </ul>
<b>Isolierung / Anzucht</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Material: Blut, Urin, Organ</li> <li>- steril arbeiten, Kulturmedium mit Antibiotikum gegen Kontaminanten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- definitive Diagnose der Infektion</li> <li>- Verwendung des Isolates in dem MAT</li> <li>- epidemiologisch wertvolles Ergebnis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- postmortale Veränderungen, Gefrieren und pH-Wert Senkung erschweren die Isolierung vitaler Leptospiren</li> <li>- dauert mehrere Wochen</li> <li>- Zeit- und arbeitsaufwändig (WHO 2007)</li> </ul>
<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Material: Blut, Urin, Organ</li> <li>- viele PCR-Methoden</li> <li>- Zielgen z.B. das <i>rrs</i>-Gen, das die 16S rRNA kodiert, aber keine Unterscheidung a-/ pathogener Leptospiren ermöglicht</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aussage im frühen Infektionsstadium möglich</li> <li>- fast unabhängig von Erregerkonzentration im Material</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- falsch negative Ergebnisse durch intermittierende Ausscheidung</li> <li>- wenige Protokolle extensiv mit klinischem Material auf Detektionsfähigkeit getestet</li> <li>- keine Aussage der infizierenden Serovar (WHO 2003)</li> </ul>

## 2.4.2 SEROLOGISCHE METHODEN

Es gibt verschiedene serologische Methoden, um einen Antikörper-Nachweis durchzuführen. Die Ergebnisse müssen jedoch mit Rücksicht auf das verwendete Verfahren, auf die nachweisbaren Serovare, Probenanzahl (Serumpaare) und erfolgter Antibiotika-Behandlung ausgewertet werden (WHO 2003).

Da zum Teil Antikörper über lange Zeit bestehen, ist ein Antikörper-Nachweis keine Bestätigung einer apparenten Infektion. Beweisend für eine aktuelle / kürzlich erfolgte Infektion ist die Serokonversion (erste Probe negativ, zweite Probe nach etwa 10 Tagen positiv) oder ein Titeranstieg um mindestens das 4-fache eines Serumprobenpaares (WHO 2003, WHO 2009). Laut ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA (2010) ist auch ein einmalig gemessener Titer von 1 : 400 bei entsprechender Klinik ein Hinweis für eine Infektion.

Für eine Herdendiagnose sollten mindestens zehn Tiere oder 10 % der Herde untersucht werden (OIE 2012a).

### 2.4.2.1 Mikroagglutinationstest (MAT)

Der Mikroagglutinationstest ist das Verfahren, das als Goldstandard für den serologischen Nachweis einer Leptospirose-Erkrankung verwendet wird. Er beruht auf dem Prinzip, dass vitale Leptospiren mit Serum inkubiert werden, und dann die Bildung von Agglutinaten von den Antikörpern aus der Serumprobe mit den hinzugefügten Leptospirenzellen mittels Dunkelfeldmikroskop beurteilt wird. Das Verfahren beruht auf dem Agglutination-Lyse Test, der von Martin und Pettit 1918 entwickelt wurde und dann von verschiedenen Forschern weiter verbessert wurde (WHO 2003).

Der Titer einer Probe ist die Verdünnungsstufe, bei der weniger als 50 % der Leptospirenzellen im Vergleich zu einer 1 : 2 in NaCl-Lösung verdünnten Kontrollkultur frei vorliegen (LEVETT 2001, WHO 2003).

Durch die Verwendung vitaler Leptospiren ist eine wöchentliche Subkultivierung der Leptospiren nötig, wodurch der Test nicht standardisierbar ist und nicht in vielen Laboren durchgeführt werden kann. Problematisch an der häufigen Subkultivierung ist die mögliche Kreuzkontamination der Kulturen untereinander, wodurch regelmäßig die Identität der Kultur bestätigt werden muss (LEVETT 2001, AHMAD et al. 2005).

Der Umgang mit den Leptospiren bedeutet eine Gefahr für das Laborpersonal, insbesondere durch Unfälle mit Haut-Verletzungen und Spritzern ins Auge (WHO 2003, LEVETT 2001). Auch wenn im Allgemeinen angenommen wird, dass die Laborkulturen eine niedrigere Virulenz als frisch aus einem Patienten isolierte Leptospiren haben, so konnte SUGUNAN et al. (2004) von einer Infektion eines Labormitarbeiters berichten, der sich an einem zerbrochenen Kulturröhrchen verletzte, sich an der Kultur infizierte und erkrankte.

Durch Formalin abgetötete Leptospiren können verwendet werden; Auswirkungen auf die Sensitivität sind allerdings möglich (WHO 2003).

Der Vorteil des Mikroagglutinationstests besteht in seiner Spezifität und der Möglichkeit, die infizierende Serogruppe relativ genau bestimmen zu können. Die Bestimmung der infizierenden Serovar ist dagegen nur selten möglich (WHO 2003). Studien, die die Serovar-Spezifität beweisen wollten, verwendeten nur eine Serovar pro Serogruppe und kontrollierten die Ergebnisse nicht mit kulturellen Isolierungen (LEVETT 2001). Allerdings ist LEVETT (2001) der Ansicht, dass sogar bei Seren von Konvaleszenten die Serogruppe in nur etwa 40 % der Fälle korrekt über den MAT Titer bestimmt wird.

Einer der großen Nachteile ist die komplexe und subjektive Auswertung, die Erfahrung des Laborpersonals voraussetzt, sowie der hohe Zeitaufwand, der bei Verwendung großer Serovar-Panels besteht. Die Variation der Ergebnisse einer Probe ist bei einem Vergleich der verschiedenen Labore hoch (BHARTI et al. 2003).

Ein weiterer Nachteil ist, dass Serovare, die nicht in dem Panel vorhanden sind, nicht detektiert werden und somit falsch negative Ergebnisse entstehen (WHO 2003). Daher ist es wichtig, dass das Panel endemisch vorkommende Serovare enthält (dadurch erfolgt auch eine Steigerung der Sensitivität), aber auch andere Serogruppen abdeckt, da durch Tierbewegungen, landwirtschaftliche Tätigkeiten etc. neue Serovare in eine Region eingeführt werden können (WHO 2003).

Ein Problem bei der Auswertung kann die Anwesenheit kreuzreagierender Antikörper sein. Insbesondere am Anfang einer Infektion reagieren die Antikörper oft nicht nur mit der infizierenden Serovar, sondern auch mit verschiedenen Serovaren anderer Serogruppen. Dabei kann es vorkommen, dass die Reaktionen mit den anderen Serovaren stärker sind als mit der infizierenden Serovar. Generell gilt jedoch, dass nach mehreren Monaten die Reaktionen mit der infizierenden Serovar alleine bestehen bleiben und die Reaktionen mit anderen Serovaren nur noch selten auftreten. Ein seltenes Phänomen ist das Auftreten paradoxer Reaktionen: dabei ist die infizierende Serovar negativ und andere Serovare weisen deutliche Titer auf (LEVETT 2001, WHO 2003).

Der Grenzwert des Mikroagglutinationstests ist ein häufig diskutierter Faktor. Viele Labore untersuchen Proben in der Verdünnungsstufe 1 : 50 und bei positivem Ergebnis erfolgt eine Austitrierung. Dabei entsteht immer wieder das Problem, dass Proben einen Titer von nur 1 : 50 haben und es unklar ist, wie diese Reaktion gewertet werden muss. Generell gilt, dass in Gebieten mit niedriger Prävalenz ein niedriger Titer wahrscheinlich einen diagnostischen Wert hat, der allerdings immer im Zusammenhang mit der Klinik und Epidemiologie gesehen werden muss. In endemischen Gebieten ist ein höherer Titer sinnvoll, da hier die meisten Patienten durch zurückliegende Infektionen bereits Titer aufweisen. Die klinische Relevanz eines Titers sollte daher in Anbetracht möglicher Antikörper durch zurückliegende

Infektionen der Population und kreuzreagierender Antikörper anderer Krankheiten beurteilt werden.

Optimal ist ein lokal bestimmter Grenzwert, der durch kulturell bestätigte positive Seren festgelegt wurde (WHO 2003). Dies kann anhand einer ROC-Analyse erfolgen. Häufig wird aber der Titer 1 : 100 als Grenzwert ohne Beachtung der endemischen Situation der Population gewählt, wodurch zu viele positive Diagnosen und eine Überschätzung der Prävalenz entstehen können (WHO 2007).

Die Spezifität des MATs in der Schweinediagnostik ist entsprechend STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK (2011) gut, da Antikörper anderer Bakterien gewöhnlich nicht in dem MAT kreuzreagieren. In der Humanmedizin können allerdings falsch positive Ergebnisse durch kreuzreagierende Antikörper von Syphilis, Lyme-Borreliose, Dengue Fieber und Malaria entstehen (WHO 2007).

Bei der Diagnose chronisch infizierter Tiere (Abort-Diagnose und Identifizierung renaler oder genitaler Träger) ist die Sensitivität gering, da häufig bei diesen Tieren die Antikörpertiter unter der Nachweisgrenze liegen (OIE 2012a). Manche Serovare wie z.B. *L. Bratislava* scheinen weniger immunogen zu sein und rufen eine geringe Antikörperantwort hervor, wodurch Titer dieser Serovar oft relativ niedrig sind (ELLIS et al. 1986). Dies erschwert die Beurteilung von grenzwertigen Titern auf Einzeltierebene beim Schwein.

Die Sensitivität des MATs ist für an die Tierart adaptierte Serovare niedriger. Beispielsweise ist bei einem Grenzwert von 1 : 100 die Sensitivität für *L. Hardjo* beim Rind nur 41 %, und selbst bei einem Grenzwert von 1 : 10 liegt die Sensitivität nur bei 67 % (ELLIS 1986).

Entsprechend der WHO (2007) ist der MAT sehr sensitiv, wenn er mit Serumpaaren verwendet wird. LEVETT (2001) ist dagegen der Meinung, dass die MAT Serologie nicht sensitiv ist, und insbesondere bei der Bewertung eines Titers anhand eines Serumpaars kann es passieren, dass der Patient an einer fulminanten akuten Leptospirose stirbt, bevor es zu einer Serokonversion kommt.

PALANIAPPAN et al. (2007) schreiben von einer Sensitivität von 92 % und Spezifität von 95 % in der Humanmedizin. Auch ADLER und DE LA PEÑA MOCTEZUMA (2010) sind der Meinung, dass die Sensitivität und Spezifität des MATs hoch ist. MCBRIDE et al. (2005) wiederum befürchten, dass die Prävalenz der Leptospirose oft aufgrund der schlechten Sensitivität unterschätzt wird.

#### *2.4.2.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Der ELISA ist ein kostengünstiges, für das Laborpersonal sicheres und durch die Auswertung mittels eines ELISA-Readers objektives Nachweisverfahren. Durch die Verwendung einer Antigencharge, die für mehrere Platten verwendet wird, ist das Verfahren standardisierbar. In relativ kurzer Zeit kann eine hohe Probenanzahl untersucht werden, wobei das Verfahren keine besonderen Kenntnisse und Erfahrungen des Personals erfordert. Gut eingestellte ELISA-Systeme haben eine

geringe Varianz zwischen verschiedenen Laboratorien, in denen sie verwendet werden. Je nach Verwendung des Konjugates kann zwischen IgM und IgG Antikörpern und damit dem Infektionszeitpunkt (akut vs. länger zurückliegend) unterschieden werden. Insbesondere ELISA-Systeme, die IgM Antikörper detektieren, haben häufig eine höhere Sensitivität als der MAT bei Entnahme der Probe in der Anfangsphase der Erkrankung (LEVETT 2001). Je nach verwendetem Antigen kann der ELISA Serovar-übergreifend sein und sich somit gut als Screening-ELISA eignen.

Aufgrund dieser Vorzüge gegenüber dem MAT gab es bereits viele Versuche, einen sensitiven und spezifischen ELISA in der Leptospiren-Diagnostik in der Human- und Tiermedizin zu etablieren. Die Versuche begannen mit einer Leptospiren-Ganzzell-Präparation als Antigen.

Tabelle 3 zeigt Beispiele verschiedenster Antigen-Zusammenstellungen. Da *L. Biflexa* mit vielen wichtigen Serovaren aus der Humanmedizin kreuzreagiert (CUMBERLAND et al. 1999, LEVETT und BRANCH 2002), ist diese apathogene Serovar häufig in Versuchen getestet worden. Jedoch ist der Nachteil von *L. Biflexa* als Antigen, dass der ELISA Infektionen mit *L. Grippotyphosa* oft nicht detektiert und teilweise auch Probleme bei der Detektion von *L. Australis* hat (WHO 2003).

ELISA-Systeme für die Leptospiren-Diagnostik beim Schwein gibt es kommerziell erhältlich von der Firma Linnodee in Nordirland (LINNODEE ANIMAL CARE 2004). Der ELISA soll durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers *L. Bratislava* spezifisch sein, er ist aber für die Routinediagnostik zu aufwändig.

**Tabelle 3 in der Literatur verwendete Antigene**

In der oberen Zeile sind die verschiedenen Möglichkeiten eines Ganzzell-Antigens in einem ELISA aufgeführt, in den Zeilen darunter sind konkrete Beispiele mit der Veröffentlichung angegeben.

<b>Antigen:</b>	<b>Ganzzell-Präparationen einer pathogenen Serovar</b>	<b>Ganzzell-Präparationen mehrerer Serovare</b>	<b>apathogener Stamm <i>Leptospira biflexa</i> serovar Patoc Stamm Patoc I</b>
<b>Beispiele:</b>	<i>L. Hardjo</i> beim Rind (ADLER et al. 1982, GODDARD et al. 1991, SURUJBALLI et al. 1997)	<i>L. Pomona</i> , <i>L. Sejroe</i> und <i>L. Hardjo</i> in einem Rinder-ELISA (CHO et al. 1989)	kommerzieller ELISA-Kit für die Humanmedizin von PanBio (BAJANI et al. 2003, OOTEMAN et al. 2006)
	<i>L. Copenhageni</i> beim Menschen (MCBRIDE et al. 2007)	eine Mischung aus 6 Serovaren für einen Rinder-ELISA (SURUJBALLI und MALLORY 2004)	kommerzieller ELISA-Kit für die Humanmedizin von Serion (TROMBERT-PAOLANTONI et al. 2010)
	<i>L. Pomona</i> beim Hund (RIBOTTA et al. 2000)		

Mittlerweile besteht der Trend, dass Antigene, die auf rekombinant herstellbaren Proteinen beruhen, verstärkt in ELISA-Systemen getestet werden. In der Humanmedizin wurden bereits ELISA-Verfahren getestet, die auf dem Protein LipL32 (DEY et al. 2008, FLANNERY et al. 2001), LigA (SRIMANOTE et al. 2008) oder LigB (CRODA et al. 2007) basieren. AVIAT et al. (2009) hat ein Peptid des Proteins LipL32 in einem humanen ELISA getestet. Ebenfalls sind synthetisch hergestellte Fusionsantigene getestet worden. So zum Beispiel ein Fusionsprotein aus LipL32, LipL21 und OmpL1 von QIU et al. (2008) und SUN et al. (2011), sowie ein Protein, das Epitope von OmpL1, LipL21 und LipL32 enthält (LIN et al. 2008).

In der Tiermedizin wurden beim Rind bereits die Proteine LipL32 (BOMFIM et al. 2005, SRIVASTAVA et al. 2006), LipL41 (SRIVASTAVA et al. 2006, MARIYA et al. 2006, SENTHILKUMAR et al. 2010), LigB (SANKAR et al. 2010) und beim Hund die Proteine LipL32 (DEY et al. 2004), LipL41 (SENTHILKUMAR et al. 2007), LigA und B (PALANIAPPAN 2004) sowie OmpL1 (OKUDA et al. 2005) getestet. Im Bereich der Schweinediagnostik wurde 2004 ein ELISA, der auf LipL41 basiert, von THEODORIDIS (2004) entwickelt. Seine zwei getesteten rekombinante Proteine von LipL41 hatten eine Sensitivität von 79 % bzw. 90 % und eine Spezifität von 90 % bzw. 91 % im Vergleich zu Western Blot Analysen. Von der Firma Linnodee gibt es einen *L. Bratislava*-spezifischen ELISA mit einem monoklonalen Antikörper (LINNODEE ANIMAL CARE 2004).

In Japan wurde von NAITO et al. (2007) eine Prävalenzstudie durchgeführt, bei der alle Schweineseren in einem Screening-ELISA untersucht wurden, der auf LipL32 basierte. Sie bestimmten eine Sensitivität von 79 % und eine Spezifität von 63 %. Da ihre Probenahme aber unabhängig von klinischen Zusammenhängen stattfand, empfehlen sie, die Ergebnisse ihrer Studie nicht direkt mit den Studien zu LipL32 bei Rind, Hund oder Menschen zu vergleichen.

## **2.5 Einführung in / Grundsätzliches zur ELISA Technologie**

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dient zum Nachweis von Antikörpern (meist Subklasse IgG oder IgM) oder Antigenen in Proben. Probenmaterial kann je nach Testausrichtung Blut (Vollblut, Serum, Plasma), Fleischsaft, Speichel, verdünnter Kot etc. sein.

Die Ausführungen in diesem Kapitel basieren auf den beiden Büchern von John Crowther (CROWTHER 1995 und 2000). Einzelne Stellen, die aus anderer Literatur stammen, sind dementsprechend gekennzeichnet.

Die Grundreaktion eines ELISAs ist immer eine Antigen-Antikörper-Bindung. Bei einem einfachen Antikörper-Nachweis bindet zunächst ein primärer (Nachweis-) Antikörper an das auf der Mikrotiterplatte immobilisierte Antigen, dann bindet ein

markierter sekundärer (Detektions-) Antikörper an diesen Antigen-Antikörperkomplex und macht ihn über eine enzymatische Farbreaktion sicht- und messbar. Zusätzlich zu solchen nicht-kompetitiven Verfahren werden kompetitive und Sandwich-Systeme unterschieden:

In Sandwich-Systemen wird das Antigen über einen spezifischen Bindungs-Antikörper an der festen Phase (Mikrotiter-Platte) immobilisiert. In kompetitiven Systemen konkurriert das nachzuweisende Agens mit einem aus dem Testkit hinzugefügten identischen Agens (z.B. Proben-Antikörper mit monoklonalen Antikörpern oder Proben-Antigen mit vorproduziertem Antigen).

Diese drei Systeme können zusätzlich in direkte oder indirekte ELISA-Systeme eingeteilt werden. Entsprechend der in der englisch-sprachigen Literatur angewendeten Begriffsnutzung ist der Unterschied, dass in einem direkten ELISA das Antigen direkt durch das Konjugat detektiert wird, während in einem indirekten ELISA-System zunächst das Antigen durch einen primären Antikörper gebunden wird (wobei je nach Untersuchungsziel das Antigen oder der Primärantikörper aus der Probe stammen) und der Antigen-Antikörperkomplex dann durch ein Konjugat detektiert wird (CROWTHER 2008). Abbildung 1 stellt schematisch den Unterschied zwischen einem direkten und einem indirekten ELISA dar.

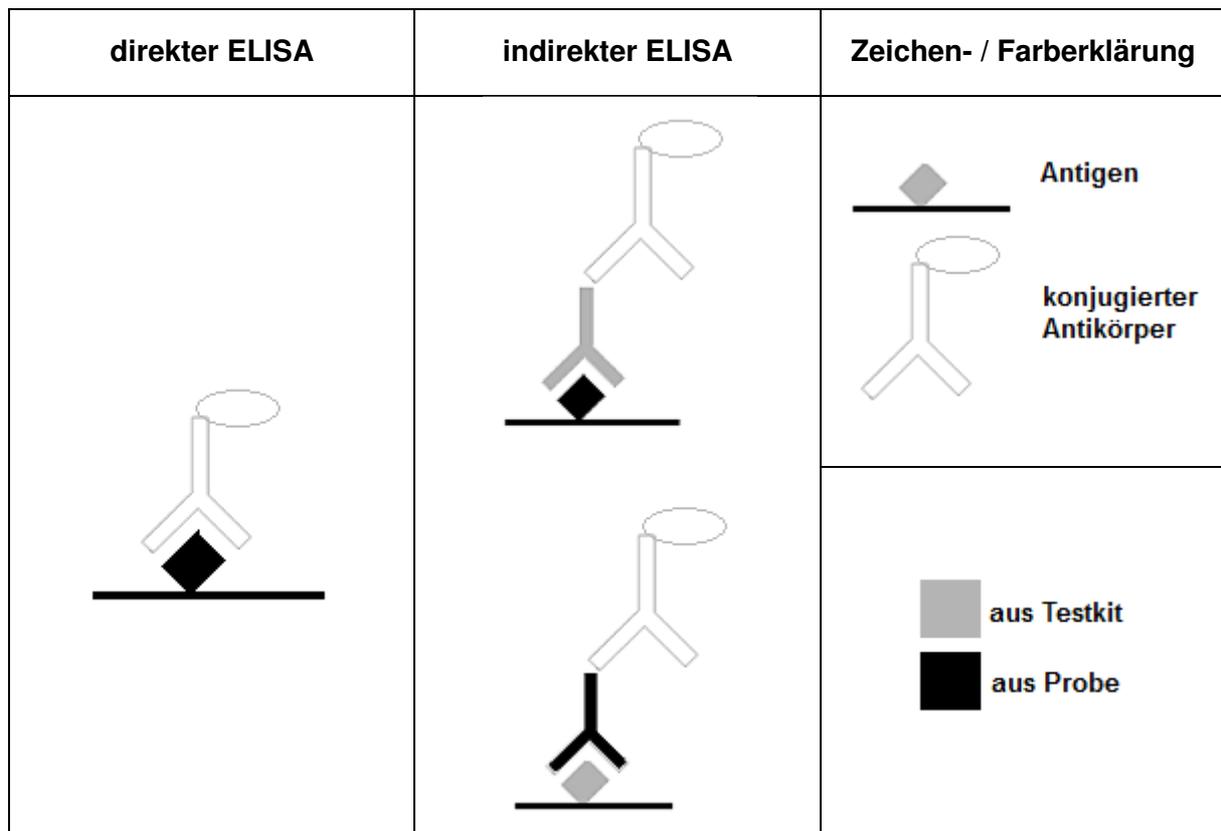


Abbildung 1 Darstellung direkter und indirekter ELISA

In der linken Spalte ist schematisch ein direkter und in der mittleren Spalte ein indirekter ELISA dargestellt. In der rechten Spalte ist die Zeichen- und Farberklärung. Die Abbildung fokussiert auf die unterschiedliche Herkunftsart des Antigens und des Primärantikörpers (entsprechend in grau oder schwarz).

Bei der Entwicklung eines ELISAs werden drei Phasen unterschieden:

- Die Machbarkeit / Umsetzbarkeit, in der gezeigt wird, dass ein Testsystem grundsätzlich funktioniert (*proof of concept*),
- die Validierung, in der gezeigt wird, dass ein Test an verschiedenen Tagen, unter unterschiedlichen Umständen und mit verschiedenen definierten Probenmaterialien stabil läuft,
- die Standardisierung, während der der Test so konfiguriert wird, dass er von unterschiedlichen Personen in verschiedenen Laboren durchgeführt werden kann und letztendlich bereit für die Markteinführung ist.

Zunächst wird ein für das Nachweisziel geeignetes Antigen, an welches die Antikörper aus der Probe binden sollen, in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Kavitätsbereiche, die nicht durch das Antigen bedeckt sind, können unspezifisch andere Proteine (z.B. Serumproteine) binden und durch an sie bindende Sekundärantikörper (Konjugat) das Signal fälschlich erhöhen. Darum wird die Mikrotiterplatte nach einem Waschschrift, in dem nicht gebundenes Antigen entfernt wird, meist mit einem Blockmittel inkubiert. Nach ausreichender Reaktionszeit des Blockmittels wird nach einem Waschschrift die Serumprobe inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift, in dem nicht gebundene Serum-Antikörper abgewaschen werden, erfolgt die Zugabe des Konjugates. Das Konjugat bindet an die gebundenen (Primär-) Antikörper aus der Serumprobe. Konjugate sind anti-Spezies-Antikörper, an die ein Enzym gekoppelt ist. Im hier beschriebenen Prinzip wird ein anti-Schwein-Antikörper, der in der Ziege erzeugt wurde, verwendet. Als Enzym wird Meerrettich-Peroxidase genutzt. Nach der Inkubationszeit wird überschüssiges Konjugat abgewaschen und das Substrat hinzugefügt, wodurch es zu einer Farbreaktion kommt. Diese wird durch das Stopp-Reagens gestoppt. Die Farbtintensität wird mit einem Photometer / ELISA-Reader bestimmt und in Form von optical density (OD)-Werten angegeben. Bei TMB, das mit Schwefelsäure gestoppt wurde, erfolgt die Messung bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm.

Die optimale Konzentration für Antigen, Konjugat und Serum wird durch eine Schachbrett-Titration ermittelt, die auch in einzelne Schritte aufgeteilt werden kann. Um bei der späteren Anwendung des ELISAs Ergebnisse unterschiedlicher Testläufe vergleichen zu können, werden die OD-Werte in Bezug zu einer stets mitgeführten standardisierten Positiv- und / oder Negativkontrolle gesetzt, um damit Tageschwankungen korrigieren zu können. Tests, die Antikörper detektieren, setzen dabei meistens die Probe in das Verhältnis zu der Positivkontrolle; der berechnete Wert wird „sample-to-positive“ (S/P)-Wert genannt.

Ein wichtiger Punkt in der Entwicklung eines ELISAs ist die Festlegung des Grenzwertes. Der Grenzwert bestimmt wesentlich die Güteparameter Sensitivität und Spezifität des ELISAs. Daher sollten zwei Populationen ausgewählt werden, die mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit gesund bzw. krank sind. Eine hohe

Wahrscheinlichkeit für ein Vorliegen der Krankheit ist bei einem positiven Ergebnis eines anderen Nachweisverfahrens gegeben. Im Schweinebereich werden Tiere aus Beständen mit einem hohen Gesundheitsstatus engmaschig auf ausgewählte Krankheiten untersucht, so dass hier eine hohe Wahrscheinlichkeit vorliegt, dass die Tiere (zumindest für diese Krankheiten) nicht krank sind.

Eine Übersicht der wichtigsten Verfahren für die Bestimmung eines Grenzwertes, der in negative und positive Ergebnisse trennt, gibt Tabelle 4.

**Tabelle 4 Verfahren zur Grenzwert-Bestimmung**

In den Zeilen sind drei verschiedene Verfahren für die Grenzwert-Bestimmung dargestellt, in den Spalten sind die Durchführung sowie Vor- und Nachteile der Verfahren erläutert. Für die ersten beiden Verfahren gibt es keinen konkreten Namen, weshalb die mathematischen Kürzel gewählt worden sind.

Verfahren	Durchführung	Vorteil	Nachteil
$\bar{x} + 3*s$ (SELBITZ 1992)	zu dem Mittelwert eines Pools von negativen Seren dreimal die Standardabweichung addieren	Einfach und schnell	bei sehr kleinen Standardabweichungen liegt der cut-off nur leicht über dem Pool der negativen Seren, dadurch hohe Gefahr, dass es zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen kommt
$2*\bar{x}$ (SELBITZ 1992)	zweimal der Mittelwert des Pools der negativen Seren	Einfach und schnell; niedrige Standardabweichungen ohne negativem Einfluss	
<b>ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristic)</b> (CROWTHER 2000)	für jeden möglichen Grenzwert wird die daraus resultierende Anzahl richtig positiver und falsch positiver Proben berechnet und als ROC-Kurve dargestellt	Elegantes Verfahren mit Angabe von Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit von dem Grenzwert; Berechnung mittels Computerprogramm möglich	

Bei bestimmten Fragestellungen kann es vorkommen, dass eine höhere Sensitivität oder Spezifität des Testes benötigt wird, als die, die bei dem entwickelten Test vorliegen. In diesem Falle kann der Grenzwert angepasst werden und der Test wird auf Kosten des anderen Parameters (z.B. Spezifität) sensitiver.

Wenn der Unterschied zwischen positiven und negativen Proben sehr klein ist, kann

im Rahmen der Grenzwertbestimmung auch ein verdächtiger / fraglicher Bereich eingerichtet werden. Dieser kann im einfachsten Fall zwischen den beiden oben beschriebenen Grenzwertfestlegungen (dreimal Standardabweichung und zweimal Mittelwert) liegen (SELBITZ 1992). Der Nachteil an einem verdächtigen / fraglichen Bereich ist immer, dass die Bewertung von Proben, die in diesem Bereich liegen, sehr schwer ist. Je größer der verdächtige / fragliche Bereich ist, desto mehr Proben kann er enthalten und desto geringer wird die Aussagekraft des ELISAs. Ein „perfekter“ ELISA darf also keinen verdächtigen / fraglichen Bereich haben.

Die Reproduzierbarkeit von Probenergebnissen schwankt von Tag zu Tag. Daher müssen im Rahmen der Validierung eines ELISAs die Intra- und Interassay-Varianz untersucht werden. Bei einem guten Test, der reproduzierbare Ergebnisse bringt, sollte der Variationskoeffizient  $\leq 10\%$  sein; 10-20 % müssen allerdings in Kauf genommen werden und sind laut OIE Manual noch im akzeptablen Bereich (OIE 2012b).

Für die Beurteilung eines Testverfahrens stehen verschiedene Parameter zur Verfügung. Die Wichtigsten sind die Sensitivität und Spezifität eines Testes. Die Grundlage für die Bestimmung der Spezifität und Sensitivität bildet die Vierfeldertafel (siehe Abbildung 7 schematische Darstellung einer Vierfeldertafel im Kapitel 3.4.2.3). Diese ist anwendbar, wenn die Ergebnisse in 2 Kategorien eingeteilt werden können: ja oder nein, bzw. im Falle eines Testsystems für Krankheiten in gesund (negativ) und krank (positiv). Dafür müssen die Ergebnisse des neuen Tests in Bezug zu einem anderen Testsystem (normalerweise dem Goldstandard) gesetzt werden, wobei davon ausgegangen wird, dass der Goldstandard korrekte Ergebnisse liefert. Die Sensitivität beschreibt die Empfindlichkeit eines Testes bzw. macht eine Aussage über die Richtig-Positiv-Rate. Bei einer medizinischen Diagnose gibt die Sensitivität den Anteil der von dem Test als krank klassifizierten Patienten wieder, die tatsächlich an der Krankheit erkrankt sind. Die Spezifität gibt eine Aussage über die Richtig-Negativ-Rate ab. Bei einer medizinischen Diagnose gibt die Spezifität den Anteil der von dem Test als gesund klassifizierten Patienten wieder, die tatsächlich gesund sind.

Die prädiktiven Werte sagen aus, mit welcher Wahrscheinlichkeit das Ergebnis des neuen Tests korrekt ist. Der positive prädiktive Wert gibt also den Anteil der richtig positiven Ergebnisse des Tests im Bezug auf alle von dem Test als positiv beurteilten Proben wieder. Der negative prädiktive Wert gibt dagegen den Anteil der richtig negativen Ergebnisse des Tests im Bezug auf alle von dem Test als negativ beurteilten Proben an. Um die prädiktiven Werte zu bestimmen, muss die Prävalenz der Krankheit in dem untersuchten Probenpool der Prävalenz der Grundpopulation entsprechen. Werden also 100 negative und 100 positive Proben einer Krankheit mit einer Prävalenz von 50 % untersucht, so ist die Bestimmung der prädiktiven Werte zulässig, bei einer Prävalenz von 0,5 % ist die Bestimmung dagegen beispielsweise nicht zulässig.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Seren

Zur Etablierung und Validierung des ELISAs wurden Serumproben von Schweinen mit möglichst bekanntem Infektionsstatus genutzt. Diese Schweineseren stammten aus dem Routineuntersuchungsaufkommen des Labors Synlab.vet Leipzig. Insgesamt wurde ein Archiv von 513 Seren aus ca. 80 Einsendungen angelegt, die bei -18 °C gelagert wurden. 200 dieser Seren wurden für die Validierung des ELISAs aufgrund folgender Kriterien ausgewählt: Gesundheitsstatus des Bestandes, Alter, MAT-Ergebnis. Die Seren wurden im MAT entsprechend dem Kapitel 3.2 untersucht.

##### 3.1.1 SEREN AUS DER POSITIV-GRUPPE

128 Schweineseren hatten in dem MAT einen Titer  $\geq 1 : 100$  und wurden damit als positiv beurteilt. Tabelle 5 stellt die Proben mit ihren MAT-Titern und der Verteilung auf die entsprechenden Serovare dar.

Von den 128 Seren stammen 89 aus einem Bestand, der durch ein akutes Abortgeschehen auffiel. In der Leber abortierter Ferkel aus diesem Bestand konnte Leptospiren-Nukleinsäure in der PCR nachgewiesen werden. Für die restlichen 39 Seren lagen keine bekannten positiven PCR-Befunde der Bestände vor.

Die 89 Proben aus dem Bestand mit gesichertem Leptospirose-Ausbruch und 11 weitere Seren wurden zur Validierung des ELISAs verwendet. Die restlichen 28 positiven Seren wurden im Anschluss an den Validierungsprozess als unabhängige positive Seren im ELISA getestet. Sie dienten zur Testung der Verwendbarkeit des Grenzwertes bei der Anwendung des ELISAs mit Feldseren.

**Tabelle 5 positive Seren mit MAT Titern und Verteilung auf die Serovare**

In der ersten Spalte ist die Kennzeichnung der Seren (keine fortlaufende Nummerierung) eingetragen. In den restlichen Spalten sind die Titer der Serovare angegeben, die mit diesem Serum reagierten.

Probenkennzeichnung	Pomona	Bratislava	Copenhageni	Grippotyphosa	Canicola	Tarasovi	Saxkoebing	Sejroe
1	800	200						
2	800			100				
3	800		100					
4	800			100				
5	200							
6	6400	100	800					
7	3200	200	100					
8	800							

- Material und Methoden -

Probenkennzeichnung	Pomona	Bratislava	Copenhageni	Grippotyphosa	Canicola	Tarasovi	Saxkoebing	Sejroe
9	200	100		200				
10	200	100		100				
11	100	400	100					
12	200	100						
13	1600	100						
14	800							
15	1600	100		100				
16	1600	800	400					
17	400	100		100				
18	200			100				
19	200							
20	400		100					
21	800							
22	400							
23	100							
24	800							
25	1600	200	100	200				
26	800		100	100				
27	800							
28	800	400	100					
29	200		100					
30	1600	200		100				
31	1600	200	400		100			
32	800							
33	100							
34	6400	100		100				
35	200	100						
36	400							
37	800	200	100					
38	1600	200	200					
39	200							
40	800	400						
41	800	200	800					
43	400							
44	800		100					
45	200							
46	1600	100						
47	800							

- Material und Methoden -

Probenkennzeichnung	Pomona	Bratislava	Copenhageni	Grippotyphosa	Canicola	Tarasovi	Saxkoebing	Sejroe
48	400	400						
49	400	100						
50	800			100				
51	800							
52	1600	100		100				
53	800			100		200		
54	1600							
55	400	100						
56	800	100						
57	800							
58	800	100	200					
59	100	100						
60	800		100					
61	1600		100					
62	1600							
63	1600	200	200					
64	6400	400		100				
65	800							
66	3200	200	100					
67	800							
68	1600	200	200	100				
69	400	100	100					
70	400							
71	6400	200	200	100				
72	800	200						
73	6400	400	200					
74	6400	400	1600					
75	400	1600		200				
76	6400	800	200					
77	1600	200	200	100				
78	800	400	100					
79	1600	200						
80	400	200						
81	6400	1600	100					
82	6400	200	100					
83	800	200	200					
84	3200	400	800	100				
85	800	200	200					

- Material und Methoden -

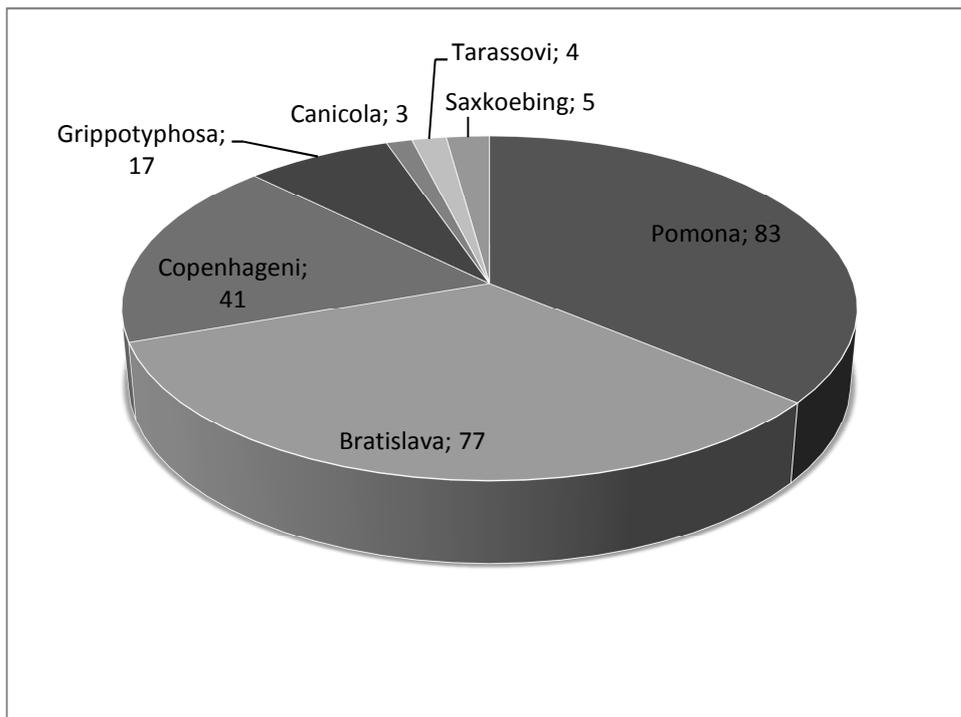
Probenkennzeichnung	Pomona	Bratislava	Copenhageni	Grippotyphosa	Canicola	Tarasovi	Saxkoebing	Sejroe
86	3200	400	100					
87	6400	200	200		100			
89	200	100						
96	100							
97	200							
98		400						
99		100						
100		100						
101							100	
102							100	
103		200						
104		100						
105	100							
106		100						
107		100						
108			200					
109		200						
110		400						
111						100		
112		100	100					
113	100		400					
114		100						
115		100						
116		100						
117		200						
118		100	200					
119							100	
120	400	100						
121		100						
122		100						
123		100					100	
124		100	100					
125			100					
126		100						
127		100						
128		100						
129		100						
130		100						

- Material und Methoden -

Probenkennzeichnung	Pomona	Bratislava	Copenhageneri	Grippotyphosa	Canicola	Tarassovi	Saxkoebing	Sejroe
131		100						
132		100	100					
133		100						
134		100						
135			100					
136						100		

Von den 128 Seren hatten 57 positive Titer für nur eine Serovar des Panels. 71 Seren hatten Titer für zwei oder mehr Serovare. 77 Proben hatten einen Titer von mindestens 1 : 400 für mindestens eine Serovar. In Bezug auf die Gesamtzahl der 513 untersuchten Seren sind 25 % aller Seren positiv, wobei 15 % aller Seren einen Titer von mindestens 1 : 400 haben.

Abbildung 2 zeigt die Verteilung der Reaktionen  $\geq 1 : 100$  auf die untersuchten Serovare.



**Abbildung 2** Verteilung der Reaktionen  $\geq 1 : 100$  der 128 Seren auf die Serovare

In dem Tortendiagramm ist dargestellt, wie sich die aufgetretenen Reaktionen mit einem Titer  $\geq 1 : 100$  von allen 128 Seren auf die jeweiligen Serovare verteilen. Es sind nicht die höchsten Titer der Proben dargestellt, sondern alle gemessenen Reaktionen.

Die Proben Nr. 9 und Nr. 29 wurden aufgrund ihrer relativ niedrigen Titer zwischen 1 : 100 und 1 : 200 als schwach positive Proben in den Titrationsversuchen für die Entwicklung des ELISAs verwendet (siehe Kapitel 3.3.3 und Kapitel 4.1).

### 3.1.2 SEREN AUS DER NEGATIV-GRUPPE

Insgesamt konnten 139 Schweineseren aus Beständen mit gesichertem hohem Gesundheitsstatus (PRRS-, APP- und *Mycoplasma hyopneumoniae*-negativ und frei von klinischer Symptomatik für Reproduktionsstörungen) detektiert werden, die in dem MAT in einer Verdünnungsstufe von 1 : 50 keine Agglutinationsbildung aufzeigten und somit als negativ beurteilt wurden. 63 Seren dieser Proben stammen von Ferkeln. Die ersten 50 Ferkelproben sowie die ersten 50 Proben älterer Tiere wurden zur Validierung des ELISAs verwendet, da sie am wahrscheinlichsten keine Leptospiren-Antikörper enthielten.

Des Weiteren wurden 109 Schweineseren aus Beständen mit unbekanntem Gesundheitsstatus bzw. mit nachgewiesenen anderen Erkrankungen als negativ im MAT beurteilt.

### 3.1.3 SEREN AUS DER VERDÄCHTIG-GRUPPE

78 Seren wiesen nur geringgradig Agglutinate in der Verdünnung 1 : 50 auf, so dass diese Proben als verdächtig in 1 : 50 eingestuft wurden. Es lagen keine weiteren Angaben bezüglich Klinik, Alter oder PCR-Ergebnissen vor.

### 3.1.4 SEREN AUS DER 1 : 50-GRUPPE

36 Schweineseren, die im Rahmen der Routinediagnostik eingesendet wurden, sind in dem MAT mit einem Titer von 1 : 50 beurteilt worden. Es lagen keine weiteren Angaben bezüglich Klinik, Alter oder PCR-Ergebnissen vor.

### 3.1.5 SEREN AUS DER ZUSATZ-GRUPPE

Im Rahmen der Routinediagnostik wurde in zwei Beständen im Rahmen der Abort-Abklärung in der PCR Leptospiren-Nukleinsäure detektiert. In einem Bestand wurde Leptospiren-Nukleinsäure in der Leber eines Abortes nachgewiesen, in dem anderen Bestand in dem Uterus einer geschlachteten Sau. Aufgrund der PCR-Ergebnisse wurden die einsendenden Praxen gebeten, Serumproben zu ziehen. Insgesamt wurden daraufhin 23 Seren der beiden Bestände eingesendet und untersucht, diese waren in dem MAT negativ.

### 3.1.6 ÜBERSICHT DER SEREN

Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über die vorgenommenen Gruppierungen:

**Tabelle 6 Übersicht Gruppierung der Seren**

Die 513 Seren sind entsprechend ihres MAT-Ergebnisses, PCR-Untersuchungen, der Bestandsgesundheit und dem Alter in insgesamt 8 Untergruppen eingeteilt worden, wobei diese in 5 Gruppen zusammengefasst wurden. Unbekannter Gesundheitsstatus oder Alter sind mit „-“ dargestellt

Gruppen-Name	Proben-Anzahl	MAT-Ergebnis	PCR-Ergebnis aus dem Bestand	Bestands-Gesundheit	Alter (falls bekannt)	Verwendung für Validierung
Positiv-Gruppe	89	≥ 1 : 100	positiv	Aborte	-	alle 89
	39	≥ 1 : 100	nicht untersucht	-	-	ersten 11
Negativ-Gruppe	63	< 1 : 50	nicht untersucht	Hoher Status	Ferkel	ersten 50
	76	< 1 : 50	nicht untersucht	Hoher Status	Adult	ersten 50
	109	< 1 : 50	nicht untersucht	-	-	nein
1 : 50-Gruppe	36	1 : 50	nicht untersucht	-	-	nein
Verdächtig - Gruppe	78	ggr. Agglutinate bei 1 : 50	nicht untersucht	-	-	nein
Zusatz-Gruppe	23	< 1 : 50	positiv	Aborte	-	nein

Die 200 Seren, die für die Validierung des ELISAs verwendet wurden, sind unter dem Namen „Validierungsseren“ zusammengefasst, die restlichen 313 Seren unter dem Namen „restliche Seren“. Die 50 Validierungsseren aus der Negativ-Gruppe mit den jüngeren Tieren / Ferkeln werden „Ferkel-Seren“, die 50 Validierungsseren der älteren Tiere „Adult-Seren“ bezeichnet.

### 3.2 Mikroagglutinationstest (MAT)

#### 3.2.1 VERWENDETE MATERIALIEN

- flüssiges Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) Medium (Dr. Felgenträger & Co. - Öko-chem. und Pharma GmbH, Dessau)

<b>Komponente</b>	<b>g / l</b>
BD Difco™ Leptospira Medium Base EMJH (Basismedium)	2,3 g
Aqua dest ad	900 ml

Autoklavieren, 15 Minuten bei 121 °C

Nach dem Abkühlen und vor dem Einsatz werden den 900 ml Medium zugegeben:

<b>Komponente</b>	<b>g / l</b>
BD Difco™ Leptospira Enrichment EMJH	100 ml
pH: 7,4 ± 0,2	

Das Enrichment enthält Albumin, Polysorbat 80 und zusätzliche Wachstumsfaktoren.

- vitale Stammkulturen verschiedener *Leptospira* Serovare (Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin)
- 8 ml Falcon Röhrchen, steril
- F-Form Mikrotiterplatte, unbeschichtet, 96 Well (Roth)
- Serumverdünnungsröhrchen (PP-Röhrchen, 1,3 ml (Greiner))
- 0,9 %ige NaCl-Lösung
- Kaninchen Hyperimmunseren zu den jeweiligen Leptospiren-Stämmen (BfR, Berlin)
- Mikroskop mit Dunkelfeldkondensator

#### 3.2.2 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME

Im Mikroagglutinationstest werden vitale Leptospirenkulturen eingesetzt. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation wurden die acht Serovare aus Tabelle 7 verwendet:

**Tabelle 7** Verwendete Serovare

**Auflistung der acht Serovare, die in dem MAT verwendet worden sind. In der rechten Spalte ist der genaue Stammname angegeben.**

<b>Serovar:</b>	<b>Stamm:</b>
<i>Leptospira interrogans</i> serovar Bratislava	Jez bratislava
<i>Leptospira interrogans</i> serovar Canicola	Hond Utrecht IV
<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni	M 20

<b>Serovar:</b>	<b>Stamm:</b>
<i>Leptospira kirschneri</i> serovar Grippotyphosa	Moskva V.
<i>Leptospira interrogans</i> serovar Pomona	Pomona
<i>Leptospira interrogans</i> serovar Saxkoebing	Mus 24
<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar Sejroe	M 84
<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar Tarassovi	Perepelitsin

Die Stämme sind zertifizierte Stammkulturen, die von dem Nationalen Referenzlabor für Leptospiren am BfR bereitgestellt wurden.

### 3.2.3 KULTIVIERUNG DER STÄMME

Die Leptospiren wurden in flüssigem Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) Medium kultiviert. 4 ml des Mediums wurden in sterile Falcon-Röhrchen abgefüllt und je nach Serovar-Bedürfnissen mit 200 - 600 µl Leptospirenkultur beimpft. Die Kulturen wurden nach dem Überimpfen in einem 29 °C Brutschrank fünf Tage aerob inkubiert und danach unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gelagert. Es wurden parallel immer zwei Kulturen angelegt: eine für die Stammarchivierung und Subkultivierung, und eine für den MAT. Mittels Universalnährboden (Columbia-Schafblutagar) wurde jede Serovar bei der wöchentlichen Subkultivierung auf Kontamination mit anderen Bakterien getestet.

Am 5. Tag nach der Subkultivierung wurden die Leptospirenkulturen mit Kaninchen-Hyperimmunseren auf ihre Agglutinationsfähigkeit überprüft. Diese Hyperimmunseren haben für jede Serovar einen Referenztitel, den es zu erreichen galt. Gleichzeitig wurde mit einem Densitometer die Kulturdichte überprüft. Die optimale Konzentration liegt bei  $1,8 \times 10^8$  Bakterienzellen/ml. Die Leptospiren wurden von dem 5. bis zum 8. Tag für den MAT genutzt.

### 3.2.4 DURCHFÜHRUNG

In Serumverdünnungsröhrchen wurde das Serum 1 : 25 in 0,9 %iger NaCl-Lösung vorverdünnt (480 µl NaCl und 20 µl Serum). 50 µl dieser Vorverdünnung wurden in acht untereinander liegende Vertiefungen einer flachen, unbeschichteten Mikrotiterplatte (12 x 8) pipettiert. Daraus wurde eine duale Verdünnungsreihe über insgesamt drei Spalten mit 0,9 %iger NaCl-Lösung angelegt, so dass das Serum in den Verdünnungen 1 : 25, 1 : 50 und 1 : 100 vorlag.

Im Anschluss wurden die Leptospiren-Serovare als Flüssigkultur dazugegeben. Alle acht unter Kapitel 3.2.2 genannten Serovare wurden für die Untersuchung verwendet. Dabei wurden je 25 µl Stammkultur zu den einzelnen Serumverdünnungen in jeweils einer Zeile pipettiert. Demzufolge wurde z.B. *L. Bratislava* in die komplette Zeile A der Mikrotiterplatte pipettiert, *L. Canicola* in die

komplette Zeile B, usw. Dadurch lagen die Seren in den Verdünnungsstufen 1 : 50, 1 : 100 und 1 : 200 vor. Abbildung 3 stellt das Pipettierschema veranschaulicht dar.

	1 1:50	2 1:100	3 1:200	4 1:50	5 1:100	6 1:200	7 usw.	8	9	10
A <i>L. Bratislava</i> je Kavität 25 µl	25 µl vor- verd. Probe	25 µl von A1 + 25 µl NaCl	25 µl von A2 + 25 µl NaCl	25 µl vor- verd. Probe	25 µl von A4 + 25 µl NaCl	25 µl von A5 + 25 µl NaCl	usw.			
B <i>L. Canicola</i>										
C <i>L. Pomona</i>										
D usw.										

**Abbildung 3 Pipettierschema MAT**

Es ist ein Ausschnitt einer Mikrotiterplatte dargestellt. Die Spalten sind von 1-10, die Zeilen von A-D gekennzeichnet. Die Titerwerte in der Spaltenkennzeichnung sind die Verdünnungen der Seren in dem Ansatz. In der Zeilenkennzeichnung stehen die hinzugefügten Serovare. Drei Spalten sind die untersuchten drei Verdünnungen eines Serums.

Die Mikrotiterplatte wurde mit einem Deckel versehen auf einem Rotationsschüttler ca. 20 Sekunden durchmischt und im Anschluss 2 Stunden in einem 29 °C-Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Platte zur Auflösung unspezifischer Zusammenballungen freier Leptospiren erneut 20 Sekunden geschüttelt und schließlich im Dunkelfeldmikroskop bei 100-facher Vergrößerung untersucht. Dabei wurde jede Verdünnungsstufe des Serums zu allen 8 Serovaren überprüft.

Eine Verdünnungsstufe wurde als negativ beurteilt, wenn mehr als 50 % der Leptospirenzellen frei vorlagen, also keine oder nur eine geringe Anzahl an Agglutinaten vorhanden waren. Lagen weniger als 50 % der Leptospiren frei vor, wurde die Verdünnungsstufe als positiv beurteilt. Die Beurteilung der Anzahl der freien Leptospiren erfolgte im Vergleich zu einer Negativkontrolle, bei der 25 µl der entsprechenden Leptospiren-Serovar und 25 µl der 0,9 %igen NaCl-Lösung in einer Vertiefung der Mikrotiterplatte gemischt vorlagen. In dieser Verdünnungsstufe sind die Leptospiren kaum einzeln differenzierbar, das Gesichtsfeld wirkt homogen grau-bläulich und scheint zu schimmern. Je mehr Leptospiren durch Antikörper der Serumprobe in Form von Agglutinaten gebunden werden, desto schwärzer wird der Hintergrund der zu beurteilen ist. Wann eine Probe weniger als 50 % grau-bläulich zu der Negativkontrolle ist, hat der Untersucher zu entscheiden.

Bei positivem Befund der letzten Verdünnungsstufe (1 : 200), wurde die Probe auf die entsprechende Serovar erneut untersucht und dabei eine Verdünnungsreihe bis 1 : 6400 angelegt. Stellte sich dabei heraus, dass die Probe in der letzten Verdünnungsstufe noch immer nicht negativ war, so wurde eine Verdünnungsreihe über eine komplette Reihe, also bis 1 : 102.400, angelegt.

Die Verdünnungsstufe einer Probe, die gerade noch als positiv beurteilt werden konnte, entsprach dem Titer der Probe. Proben mit einem Titer  $\geq 1 : 100$  wurden gemäß dem MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS der OIE (2012a) als positiv gewertet.

Die DGHM-Verfahrensrichtlinien von 1985 bewerten Titer  $\geq 1 : 400$  erst als positiv und die Titerwerte 1 : 100 und 1 : 200 werden als zweifelhaft beurteilt. Da ein zweifelhafter Bereich in der Diagnostik nicht aussagekräftig ist, wurde die Beurteilung des OIE MANUAL für diese Dissertation gewählt.

### 3.3 ELISA

Das entwickelte ELISA-System basiert auf dem Verfahren eines indirekten nicht-kompetitiven ELISAs. Das Antigen wird auf der Mikrotiterplatte gebunden, daran binden Antikörper der Probe. Die gebundenen Antikörper werden schließlich durch markierte Sekundär-Antikörper, das Konjugat, detektiert.

#### 3.3.1 VERWENDETE MATERIALIEN

Tabelle 8 und Tabelle 9 zeigen eine Zusammenfassung der verwendeten Materialien.

**Tabelle 8 Chemikalien für den ELISA**

<b>Chemikaliename</b>	<b>Hersteller</b>
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver (Skim Milk Powder)	Fluka BioChemika, Steinheim
Tetramethylbenzidin (TMB) Liquid Substrate System for ELISA	Sigma-Aldrich, München
0,5 molare Schwefelsäure	

**Tabelle 9 sonstiges Zubehör für den ELISA**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
medium binding Mikrotiterplatte (F-Form, 96 Well)	Greiner Bio-One, Solingen
Serumverdünnungsröhrchen (PP-Röhrchen; 1,3 ml)	Greiner Bio-One, Solingen
Antigen: rekombinantes LipL32, liquid protein solution	Rekom Biotech, Granada, Spanien
Konjugat: Ziege-anti-Schwein IgG (H+L) konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRPO)	Dianova, Hamburg

Material	Hersteller
ELISA-Washer	Tecan, Männedorf, Schweiz
ELISA-Reader mit dem Filter 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm	Tecan, Männedorf, Schweiz
MedCalc Software für die statistischen Auswertungen	Mariakerke, Belgien
Serum: Positiv- und Negativkontrolle	siehe Kapitel 3.3.2 Positiv- und Negativkontrolle
Serum: 2 MAT-schwach positive Seren	siehe Kapitel 3.1.1 Seren

### Rezepte:

- PBS

Herstellung eines PBS 10x Konzentrates:

für 1 Liter:

80 g Natriumchlorid

2 g Kaliumchlorid

17,8 g di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat

2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat

mit doppelt destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen, pH auf 7,4

Das 10x PBS Konzentrat 1 : 10 verdünnen:

100 ml 10x PBS Konzentrat und 900 ml ddH<sub>2</sub>O

- PBS-T

Herstellung von 0,05 % PBS-Tween 20:

500 ml PBS mit 250 µl Tween 20

- Magermilch-Blockpuffer, 10 %ig (für eine Mikrotiterplatte)

3 g Magermilchpulver

30 ml PBS-T

### 3.3.2 POSITIV- UND NEGATIVKONTROLLE

Das Serum zur Gewinnung der Negativkontrolle entstammt einem Schwein aus einem Bestand mit hohem Gesundheitsstatus. Der Bestand ist PRRS-, APP- und *Mycoplasma hyopneumoniae* frei, Leptospiren wurden in dem Bestand noch nie nachgewiesen und getestete Tiere waren serologisch in dem MAT negativ. Zu dem Zeitpunkt der Blutentnahme waren das Schwein sowie der Bestand klinisch unauffällig.

Zur Gewinnung einer Positivkontrolle für die Entwicklung des ELISAs wurde ein Schwein verwendet, welches aus demselben Bestand stammte wie jenes, das für die Gewinnung der Negativkontrolle verwendet wurde. Im Rahmen eines Tierversuches (Registrierungsnummer V11/11) wurde es mit formalin-inaktivierten *Leptospira Pomona* hyperimmunisiert. Das Serum, das bei der Tötung gewonnen wurde, hatte einen Titer von 1 : 200.

### 3.3.3 ELISA-ENTWICKLUNG

In Vorversuchen wurden vier verschiedene Mikrotiterplatten und zwei Blockmittel getestet. In der eigentlichen Entwicklungsphase wurden medium-binding Mikrotiterplatten von Greiner und als Blockmittel skim milk benutzt.

Für die Titration des Antigens, Konjugates und Serum wurde jeweils nur ein Element in einer Verdünnungsreihe aufgetragen. Die anderen Substanzen wurden in einer solchen Konzentration konstant hinzugefügt, dass sichergestellt war, dass sie nicht die limitierenden Faktoren der Reaktion darstellten.

#### 3.3.3.1 Antigen-Titration

Das LipL32 wurde in Form eines rekombinanten Proteins für den ELISA verwendet. Es lag in einer Konzentration von 1,17 mg/ml vor und wurde in Eppendorf Cups zu je 50 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Die Titration erfolgte über einen Bereich von 1170 ng bis 1,1 ng/100µl (entsprechend Verdünnungen von 1 : 100 bis 1 : 102400). Zuerst wurde eine 1 : 100 Vorverdünnung des LipL32-Konzentrates in PBS vorbereitet. Von dieser Vorverdünnung wurden 200 µl in jede Vertiefung der ersten Spalte gegeben. In alle anderen Spalten wurden 100 µl PBS pipettiert und dann eine duale Verdünnungsreihe von Spalte 1 bis zur Spalte 11 angelegt.

Die Platte wurde mit einer Folie abgeklebt und 24 Stunden bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Platte viermal mit PBS-T gewaschen und mit 10 %iger skim milk (in PBS-T) geblockt (300 µl/Kavität). Die Platte wurde daraufhin mit einer Folie abgeklebt und 12 Stunden bei 4 °C gelagert.

Nach viermaligem Waschen mit PBS-T wurde das Serum in einer Konzentration von 1 : 100 aufgetragen (100 µl/Kavität). Dazu wurde jeweils das Serum der Negativ- und Positivkontrolle sowie die zwei Seren, die in dem MAT schwach positiv waren, im Doppelansatz verwendet. Bei Raumtemperatur wurde die Platte eine Stunde lang auf einem Schüttler inkubiert.

Nach viermaligem Waschen mit PBS-T wurde das Konjugat in einer Konzentration von 1 : 30000 aufgetragen (100 µl/Kavität). Bei Raumtemperatur wurde die Platte eine Stunde lang auf einem Schüttler inkubiert.

Nach erneutem viermaligen Waschen mit PBS-T wurden 100 µl des Substrates TMB in die Vertiefungen pipettiert, die Platte dunkel gelagert und nach 10 Minuten mit 100 µl von 0,5 m Schwefelsäure gestoppt. Die Platte wurde mit den Filtern 450/630nm mittels ELISA-Reader ausgelesen.

### *3.3.3.2 Konjugat-Titration*

Die Platte wurde in den Spalten 1-10 mit 100 µl/Kavität der optimalen Verdünnung von LipL32 aus Kapitel 3.3.3.1 in PBS beschichtet. Die Platte wurde mit einer Folie abgeklebt und 24 Stunden bei 4 °C gelagert. Dann wurde die Platte viermal mit PBS-T gewaschen und mit 10 %iger skim milk (in PBS-T) geblockt (300 µl/Kavität). Die Platte wurde daraufhin mit einer Folie abgeklebt und 12 Stunden bei 4 °C gelagert. Nach viermaligem Waschen mit PBS-T wurde das Serum in einer Konzentration von 1 : 100 aufgetragen (100 µl/Kavität). Dazu wurde jeweils das Serum der Negativ- und Positivkontrolle sowie die zwei Seren, die in dem MAT schwach positiv waren, im Doppelansatz verwendet. In Spalte 9 wurde kein Serum pipettiert. Bei Raumtemperatur wurde die Platte eine Stunde lang auf einem Schüttler inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS-T wurde das Konjugat aufgetragen (100 µl/Kavität).

Dazu wurden 2 Vorverdünnungen mit 1 : 10.000 und 1 : 15.000 in PBS-T angelegt. Diese beiden Vorverdünnungen wurden so über die Spalten 1-8 titriert, dass eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 1 : 10.000, 15.000, 20.000, 30.000, 40.000, 60.000, 80.000 und 90.000 entstand. In Spalte 9 wurde ebenfalls Konjugat mit der Verdünnung 1 : 90.000 pipettiert, während in Spalte 10 nur PBS-T pipettiert wurde (also kein Konjugat).

Bei Raumtemperatur wurde die Platte eine Stunde lang auf einem Schüttler inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen mit PBS-T wurden 100 µl des Substrates TMB in die Vertiefungen pipettiert, die Platte dunkel gelagert und nach 10 Minuten mit 100 µl von 0,5 m Schwefelsäure gestoppt. Die Platte wurde mit den Filtern 450/630nm mittels ELISA-Reader ausgelesen.

### *3.3.3.3 Serum-Titration*

Die Platte wurde komplett mit 100 µl/Kavität von der optimalen Verdünnung von LipL32 aus Kapitel 3.3.3.1 in PBS beschichtet. Die Platte wurde mit einer Folie abgeklebt und 24 Stunden bei 4 °C gelagert. Dann wurde die Platte viermal mit PBS-T gewaschen und mit 10 %iger skim milk (in PBS-T) geblockt (300 µl/Kavität). Die Platte wurde daraufhin mit einer Folie abgeklebt und 12 Stunden bei 4 °C gelagert. Nach viermaligem Waschen mit PBS-T wurde das Serum aufgetragen (100 µl/Kavität). Dazu wurden von der Negativ- und Positivkontrolle, sowie von den

zwei schwach positiven Proben aus dem MAT eine duale Verdünnungsreihe von 1 : 25 bis 1 : 400 angelegt und im Doppelansatz getestet.

Bei Raumtemperatur wurde die Platte eine Stunde lang auf einem Schüttler inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS-T wurde das Konjugat in der optimalen Konzentration aus Kapitel 3.3.3.2 aufgetragen (100 µl/Kavität). Bei Raumtemperatur wurde die Platte eine Stunde lang auf einem Schüttler inkubiert.

Nach erneutem viermaligem Waschen mit PBS-T wurden 100 µl des Substrates TMB in die Vertiefungen pipettiert, die Platte dunkel gelagert und nach 10 Minuten mit 100 µl von 0,5 m Schwefelsäure gestoppt. Die Platte wurde mit den Filtern 450/630nm mittels ELISA-Reader ausgelesen.

#### 3.3.3.4 Auswertung der Titrations

Die Bestimmung der optimalen Konzentration der jeweiligen Titration basiert auf folgenden Aspekten, die am Beispiel der Antigen-Titration erläutert werden:

Zunächst wurde der Verlauf der Verdünnungsstufen graphisch für die verschiedenen Seren dargestellt und analysiert. Wenn die Kavitäten, in denen die höheren Antigen-Konzentrationen vorliegen, vergleichbar hohe OD-Werte haben, liegt ein Plateau vor. In diesen Verdünnungen ist die maximal mögliche Bindungsanzahl von Antigen an die Platte erreicht. Durch Erhöhung der Konzentration des Antigens wird nicht mehr Antigen gebunden, das Antigen liegt im Überfluss vor. Das Erreichen einer Sättigung ist wichtig für die Stabilität des ELISAs und damit einer optimalen Diskriminierung zwischen positiven und negativen Proben. Jedoch wird insbesondere bei teuren Antigenen aus Kostengründen von dieser optimalen Konzentration abgewichen und eine niedrigere Konzentration verwendet, die in dem Bereich liegt, in dem die OD-Werte beginnen von ihrem Plateauniveau zu sinken.

Außerdem wurden die Ergebnisse der Titration durch Berechnung der *signal-to-noise ratio* (S/N ratio bzw. Signal-Rausch-Verhältnis) ausgewertet. Diese stellt das Verhältnis der OD-Werte zwischen der positiven und der negativen Serumprobe für die jeweilige Antigenkonzentration dar (Division der positiven mit der negativen Probe). Durch das Verhältnis dieser OD-Werte werden starke unspezifische Bindungen der negativen Probe bei hoher Antigenkonzentration erkannt. Bei der *signal-to-noise ratio* stellen die höchsten berechneten Werte den Konzentrationsbereich dar, in dem das titrierte Antigen verwendet werden sollte, da hier das positive Serum hohe OD-Werte, aber das negative Serum parallel dazu niedrige OD-Werte liefert.

Das negative Serum ist außerdem wichtig, um potentielle unspezifische Bindungen von Serumproteinen an die Platte im Rahmen der Antigentitration beurteilen zu können. Hohe OD-Werte des negativen Serums sprechen für eine unspezifische Bindung von Serumproteinen oder einer ungenügenden Reinheit des Antigens.

Bei der Konjugattitration muss zusätzlich beachtet werden, dass die optimale Konzentration in einem Bereich liegt, in dem die negativen Serumproben möglichst niedrig liegen, die positiven Serumproben nicht zu hohe OD-Werte haben (optimal sind OD-Werte um 1,7), aber schwach positive Seren noch immer detektiert werden. Durch zu stark konzentrierte Konjugate besteht die Gefahr, insgesamt zu hohe OD-Werte zu bekommen, aber durch zu stark verdünnte Konjugate kann die Sensitivität des ELISAs sinken.

Im Rahmen der Titrationsen können Spalten pipettiert werden, die entweder kein Antigen, kein Serum oder kein Konjugat enthalten. Anhand der Höhe der OD-Werte wird beurteilt, ob es zu unspezifischen Bindungen von Serum oder Konjugat an die Platte gekommen ist und demzufolge eine niedrigere Konzentration gewählt werden muss.

### 3.3.4 ELISA-DURCHFÜHRUNG

Die 513 Schweineserumproben wurden wie folgt aufgeteilt:

- 200 Validierungsseren:  
100 MAT-positive und 100 MAT-negative Schweineseren aus gezielt ausgewählten Beständen für die Validierung des ELISAs und der Bestimmung des optimalen Grenzwertes
- Restliche Seren:  
313 weitere Seren zur Überprüfung der Verwendbarkeit des zuvor bestimmten Grenzwertes, speziell in Hinblick auf Seren aus Betrieben, die nicht einen definierten Gesundheitsstatus haben (siehe Kapitel 4.5 ELISA-Ergebnisse der restlichen Seren).

Entsprechend dem Schema in Tabelle 10, welches aufgrund der Ergebnisse der Titrationsen aus der ELISA-Entwicklung (siehe Kapitel 4.1 Titrationsen zur ELISA-Entwicklung) erstellt wurde, wurden die Seren getestet:

- Material und Methoden -

**Tabelle 10 Beschreibung der ELISA-Durchführung**

Pro Zeile ist ein neuer Arbeitsschritt eingetragen. In der linken Spalte ist diesen Schritten jeweils ein Kurzname zugeordnet.

<b>Coating</b>	Verdünnung von LipL32 mit der optimalen Konzentration in PBS, 100 µl in jede Kavität der Mikrotiterplatte pipettieren Abkleben der Platte mit Folie Inkubation für 24 Stunden bei 4 °C
	4x Waschen mit PBS-T (ca. 300 µl/Kavität)
<b>Blocken</b>	10 %ige skim milk in PBS-T 300 µl in jede Kavität der Mikrotiterplatte pipettieren Abkleben der Platte mit Folie Inkubation für 12 Stunden bei 4 °C
	4x Waschen mit PBS-T (ca. 300 µl/Kavität)
<b>Serum</b>	Vorverdünnung der Proben sowie der Negativ- und Positivkontrolle mit der optimalen Konzentration in PBS-T, Doppelansatz aller Proben und Kontrollen 100 µl in die entsprechenden Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettieren Abkleben der Platte mit Folie 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler
	4x Waschen mit PBS-T (ca. 300 µl/Kavität)
<b>Konjugat</b>	Verdünnung des Ziege-Anti-Schwein-Konjugates mit der optimalen Konzentration in PBS-T, 100 µl in die entsprechenden Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettieren, Abkleben der Platte mit Folie 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler
	4x Waschen mit PBS-T (ca. 300 µl/Kavität)
<b>Substrat</b>	100 µl TMB in die entsprechenden Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettieren, 10 Minuten Inkubation der Platte (lichtgeschützt)
<b>Stopp</b>	mit 100 µl 0,5 molarer Schwefelsäure die Farbreaktion stoppen
<b>Reader</b>	Messung der optischen Dichte (OD) im ELISA-Reader bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm
<b>Auswertung</b>	Übertragung der Reader-Messwerte (OD) in Excel Bildung des Mittelwertes der Positivkontrolle, Negativkontrolle und der Proben Der Test ist valid, wenn der OD-Wert der Negativkontrolle ≤ 0,6 und der OD-Wert der Positivkontrolle > 1,6 ist.  Berechnung des S/P%-Wertes: $S/P\% = \text{Probe} / \text{PK} * 100 \%$ Entsprechend des Grenzwertes wird die Probe anhand des S/P%-Wertes als positiv oder negativ eingestuft

### 3.4 Validierung / Statistik

#### 3.4.1 REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen anhand von drei Schweineseren getestet. Auswahlkriterium der drei Proben waren ein niedriger, mittlerer und ein hoher OD-Wert. Im Rahmen von Vorversuchen wurden die OD-Werte ermittelt und diese drei Proben als repräsentativ ausgewählt.

##### 3.4.1.1 Intraassay-Varianz

Die Bestimmung der Intraassay-Varianz dient zur Untersuchung eventueller Unterschiede der Beschichtung innerhalb einer Mikrotiterplatte. Hierfür wurden die drei Proben in jeweils acht Kavitäten pipettiert, die über die Platte verteilt wurden (siehe Abbildung 4). Um Unterschiede aufgrund von Verdünnungsfehlern der Proben zu vermeiden, wurde von den Proben jeweils eine Vorverdünnung von 1 ml angelegt. Für die Berechnung der Intraassay-Varianz wurden die Ergebnisse des ersten Tages verwendet.

Für die Intraassay-Varianz wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der OD-Werte einer Probe bestimmt. Aus diesen Werten wurde der Variationskoeffizient in Prozent bestimmt. Dieser wird durch Division der Standardabweichung der Probe mit dem Mittelwert der Probe und Multiplikation dieses Wertes mit 100 % errechnet.

Variationskoeffizient (%) = Standardabweichung / Mittelwert \* 100 %

In diesem Stadium der Validierung werden statt der S/P-Verhältnisse der Proben nur die OD-Werte verwendet, da die Stabilität der Positivkontrolle in dem ELISA noch nicht gesichert ist. Eine ausreichende / adäquate Reproduzierbarkeit der ELISA-Ergebnisse wird von verschiedenen kommerziellen Testkit-Herstellern dann angenommen, wenn der Variationskoeffizient für die OD-Werte, in Abhängigkeit von deren absoluter Höhe, unter 15-20 % liegt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	333-3						Nr. 53		Nr. 77			
B		333-3						Nr. 53		Nr. 77		
C			333-3						Nr. 53		Nr. 77	
D	Nr. 77			333-3						Nr. 53		
E		Nr. 77			333-3						Nr. 53	
F	Nr. 53		Nr. 77			333-3						
G		Nr. 53		Nr. 77			333-3					
H			Nr. 53		Nr. 77			333-3				

Abbildung 4 Pipettierschema für die Bestimmung der Intra- und Interassay-Varianz

Dargestellt ist eine Mikrotiterplatte mit den 12 Spalten und 8 Zeilen. Die Proben 333-3, Nr. 53 und Nr. 77 wurden in den angezeigten Kavitäten getestet.

### 3.4.1.2 Interassay-Varianz

Mit der Interassay-Varianz werden von einer Probe eines Probenpanels die Schwankungen der OD-Werte an aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Bewertet wird die Varianz der einzelnen Proben in den verschiedenen Testansätzen. Dabei wird der Grad der Übereinstimmung zwischen einzelnen, unabhängigen Messwerten untersucht. Auch hier werden der Mittelwert, die Standardabweichung und daraus der Variationskoeffizient bestimmt. Die Bestimmung erfolgte auf Grundlage des Pipettierschemas der Intraassay-Varianz.

Es wurden mit den drei Proben der Intraassay-Varianz-Ermittlung die Interassay-Varianzen bestimmt. Aus den OD-Werten der Kavität derselben Plattenposition wurde über die drei Messtage der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt und der daraus resultierende Variationskoeffizient wurde über alle acht Plattenpositionen gemittelt.

### 3.4.2 VALIDIERUNG ANHAND DER 200 VALIDIERUNGSSEREN

#### 3.4.2.1 Serenauswahl für die Validierung

Für die Validierung des ELISAs wurden 200 gut charakterisierte Seren verwendet. Die Anzahl wurde auf jeweils 100 Seren für die negativ- und Positiv-Gruppe festgelegt, um anhand dieser Seren die prädiktiven Werte (siehe Kapitel 3.4.2.5) berechnen zu können. Auswahlkriterium für die negativen Seren war ein negatives MAT-Ergebnis und die Information, dass das Tier aus einem Bestand mit hohem Gesundheitsstatus stammt. Die positiven Seren wurden aus einem Bestand mit bestätigtem Leptospirose-Ausbruch gewählt unter der Voraussetzung, dass sie positive MAT-Titer hatten. 11 weitere Seren, die im MAT positiv waren, aber keine nähere Informationen zu dem Bestand vorlagen, vervollständigten die 100 positiven Seren der Validierungsseren.

#### 3.4.2.2 ROC-Analyse

Der Grenzwert wurde mittels ROC-Analyse bestimmt, wobei als Bezugsgröße die MAT-Ergebnisse der insgesamt 200 Validierungsseren verwendet wurden. Für die Erstellung der ROC-Kurve wurde dann durch das Programm MedCalc für jeden möglichen Grenzwert die daraus resultierende Anzahl richtig positiver und falsch positiver Proben berechnet. Die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivität) wurde auf der Ordinate (y-Achse), die Falsch-Positiv-Rate (100-Spezifität) auf der Abszisse (x-Achse) aufgetragen. Aus den so aufgetragenen Werten resultiert üblicherweise eine gekrümmte, aufsteigende Kurve. Die ideale ROC-Kurve steigt senkrecht an und verläuft dann waagrecht nach rechts. Bei einem Test, der positive und negative Proben nicht klar trennen kann, verläuft die Kurve flacher. Abbildung 5 stellt beispielhaft eine ROC-Kurve dar.

Bei einem Test, bei dem die gleiche Anzahl falsch positiver und richtig positiver Proben pro Grenzwert ermittelt wird, bildet die ROC-Kurve eine Gerade ( $y = x$ ). Liegen also die positiven Proben des getesteten ELISAs mehr oder weniger in demselben OD-Bereich wie die negativen Proben, so verläuft die Kurve fast diagonal.

Anhand der ROC-Kurve wurde der Grenzwert bestimmt, der die höchste Sensitivität und Spezifität für den ELISA liefert. Dieser Grenzwert befindet sich an dem Punkt der ROC-Kurve, der den geringsten Abstand zu dem Koordinatenpunkt (0 | 100) bzw. den größten Abstand zu der Gerade  $y = x$  hat.

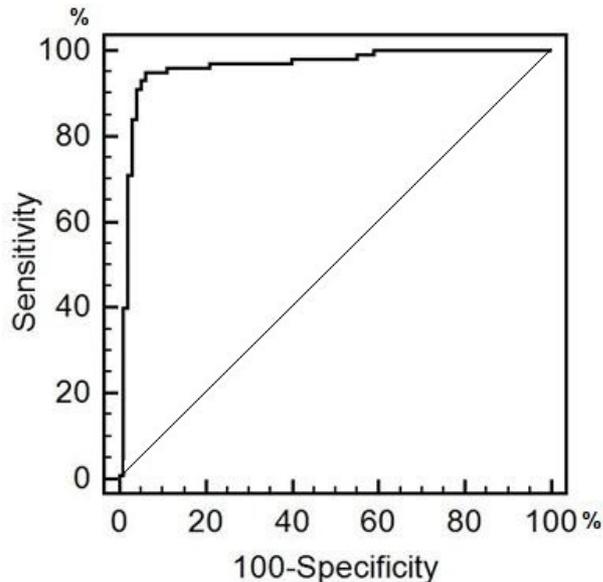
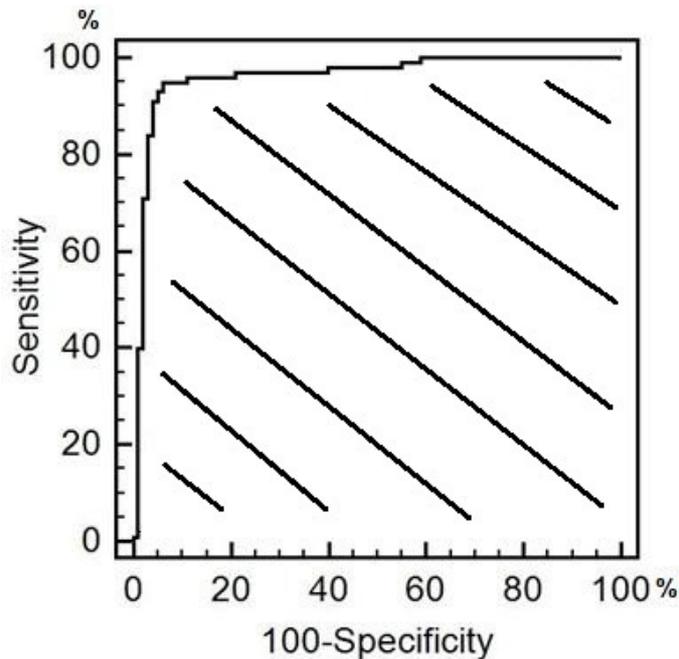


Abbildung 5 Beispiel von einer ROC-Kurve

Die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivity) wurde in Prozent auf der Ordinate (y-Achse), die Falsch-Positiv-Rate (100-Specificity) in Prozent auf der Abszisse (x-Achse) aufgetragen. Dargestellt ist eine ROC-Kurve. Zur Veranschaulichung wurde die Gerade  $y=x$  zusätzlich dargestellt.

Ein Wert, der für die Beurteilung der Exaktheit eines Testes verwendet werden kann, ist der *Area under curve*-Wert (AUC-Wert). Es handelt sich dabei um den Bereich unter der ROC-Kurve (siehe Abbildung 6). Der AUC-Wert beträgt 0,5 wenn ein Test nicht zwischen negativen und positiven Proben (bzw. kranken und gesunden Patienten) unterscheiden kann, da in diesem Fall die ROC-Kurve der Diagonale  $y = x$  entspricht. Der AUC-Wert wird dagegen 1 sein, wenn ein Test zu 100 % spezifisch und sensitiv ist. Die ROC-Kurve verläuft dann entlang der linken oberen Ecke des Quadranten.

Es wurde für alle 100 MAT-negativen und 100 MAT-positiven Proben eine ROC-Analyse mit Bestimmung der Sensitivität, der Spezifität und des AUC-Wertes mit dem Programm MedCalc erstellt. Außerdem sind einzelne cut-off-Werte, auf denen die ROC-Kurve basiert, mit den entsprechenden Sensitivitäten und Spezifitäten in einer tabellarischen Übersicht dargestellt.



**Abbildung 6** ROC-Kurve mit dem AUC-Wert

Die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivity) wurde in Prozent auf der Ordinate (y-Achse), die Falsch-Positiv-Rate (100-Specificity) in Prozent auf der Abszisse (x-Achse) aufgetragen. Zur Veranschaulichung wurde der AUC-Wert in schwarz schraffiert dargestellt.

Da die negativen Validierungsseren aus zwei Altersgruppen bestehen, wurde für die 50 MAT-negativen Ferkelsereen und den 100 MAT-positiven Proben eine ROC-Analyse durchgeführt, die dann verglichen wurde mit einer ROC-Analyse der 50 MAT-negativen Seren von Adulten und den 100 MAT-positiven Proben. Hiermit wurde überprüft, ob der Altersunterschied Konsequenzen auf die Grenzwertwahl bzw. Sensitivität / Spezifität des ELISAs hatte.

Außerdem wurden folgende drei ROC-Analysen unter Einbezug aller getesteten Seren durchgeführt:

- alle 128 MAT-positiven und alle 248 MAT-negativen Seren
- alle 128 MAT-positiven und als negative Gruppe alle 248 MAT-negative, 78 verdächtige und 36 1 : 50 Titer-Proben
- alle 248 MAT-negativen Seren und als positive Gruppe alle 128 MAT-positiv, 78 verdächtige, 36 1 : 50 Titer-Proben und 23 Zusatz-Proben

Ziel dieser drei ROC-Analysen war es zu überprüfen, ob der mit den Validierungsseren ermittelte Grenzwert auf die restlichen 313 Seren übertragbar ist bzw. ob sich die Grenzwertwahl und Sensitivität / Spezifität bei Einschluss aller Proben verändern würde.

### 3.4.2.3 Vierfeldertafel und Sensitivität / Spezifität

Es wurde eine Vierfeldertafel unter Berücksichtigung des im Rahmen der ROC-Analyse ermittelten Grenzwertes erstellt (Abbildung 7).

Die Ergebnisse des neuen Tests wurden in folgende vier Kategorien eingeteilt:

A: falsch positive Ergebnisse (FP): der Test hat Gesunde fälschlicherweise in die Kategorie krank eingeordnet

B: falsch negative Ergebnisse (FN): der Test hat Kranke fälschlicherweise in die Kategorie gesund eingeordnet

C: richtig positive Ergebnisse (RP): der Test hat Kranke korrekterweise in die Kategorie krank eingeordnet

D: richtig negative Ergebnisse (RN): der Test hat Gesunde korrekterweise in die Kategorie gesund eingeordnet

Die Ergebnisse wurden folgendermaßen eingetragen:

	<b>Goldstandard positiv</b>	<b>Goldstandard negativ</b>	
<b>Test positiv</b>	A (=RP)	B (=FP)	A+B
<b>Test negativ</b>	C (=FN)	D (=RN)	C+D
	A+C	B+D	

Abbildung 7 schematische Darstellung einer Vierfeldertafel

Entsprechend der Abkürzungen im Text werden die (qualitativen) Ergebnisse des neuen Testes in die vier Felder in der Mitte der Vierfeldertafel eingetragen. Aus diesen Feldern können die Sensitivität, Spezifität und die prädiktiven Werte berechnet werden.

Die Sensitivität wird berechnet, indem die Anzahl der richtig positiven Ergebnisse durch die Summe der richtig positiven und falsch negativen (also die Gesamtzahl der positiven Ergebnisse) dividiert wird:  $\text{Sensitivität} = \text{RP} / (\text{RP} + \text{FN})$

$$\text{bzw. in der Tafel: } A / (A + C)$$

Die Spezifität wird berechnet, indem die Anzahl der richtig negativen Ergebnisse durch die Summe der richtig negativen und falsch positiven Ergebnisse dividiert wird:

$$\text{Spezifität} = \text{RN} / (\text{RN} + \text{FP})$$

$$\text{bzw. in der Tafel: } B / (B + D)$$

### 3.4.2.4 Bestimmung der Korrelation

Da es sich bei den Proben nicht um normalverteilte Ereignisse handelt, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ( $\rho$  rho) mit der Software MedCalc bestimmt. Dieser wurde für die beiden Verfahren (ELISA / MAT) für die 200 Seren, die für die Validierung des ELISAs verwendet wurden, berechnet. Dabei wurde das

qualitative Ergebnis (negativ / positiv) und das quantitative Ergebnis (MAT-Titer / S/P%-Wert) der positiven 100 Validierungsseren bestimmt.

Ein positiver Zusammenhang (je mehr... desto mehr...) liegt zwischen den Merkmalen vor, wenn  $r_s > 0$  ist, ansonsten besteht ein negativer Zusammenhang (je mehr... desto weniger...). Als Ergebnis nimmt der Korrelationskoeffizient nur Werte zwischen -1 und +1 an. Wenn der Korrelationskoeffizient 0 ist, liegt kein Zusammenhang vor. Es gibt keine einheitlichen Richtlinien für die Bewertung der Korrelationskoeffizienten, prinzipiell gilt aber die Zusammenfassung aus Tabelle 11.

**Tabelle 11 Bewertung von Korrelationskoeffizienten**

In der Tabelle ist die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Parametern in Abhängigkeit von dem Korrelationskoeffizienten dargestellt.

Wert des Korrelationskoeffizienten	Stärke des Zusammenhangs
$0,0 \leq r_s \leq 0,2$	kein bis geringer Zusammenhang
$0,2 < r_s \leq 0,5$	schwacher bis mäßiger Zusammenhang
$0,5 < r_s \leq 0,8$	deutlicher Zusammenhang
$0,8 < r_s \leq 1,0$	hoher bis perfekter Zusammenhang

#### 3.4.2.5 Bestimmung der prädiktiven Werte:

Die prädiktiven Werte wurden nach folgenden Formeln berechnet:

positiv prädiktiver Wert =  $RP / (RP + FP)$  bzw. in der Tafel:  $A / A + B$

negativ prädiktiver Wert =  $RN / (RN + FN)$  bzw. in der Tafel:  $C / C + D$

Die Abkürzungen RP, FP, RN und FN beziehen sich auf die Vierfeldertafel (Abbildung 7).

Da nach der Studie von STRUTZBERG-MINDER (2008) von einer Prävalenz in Höhe von 51,5 % in deutschen Schweinebeständen auszugehen ist (wenn Werte im  $MAT \geq 1 : 100$  als positiv angesehen werden), ist die Bestimmung der prädiktiven Werte mit den 100 negativen und 100 positiven Seren zulässig bzw. eine Grundvoraussetzung für die Bestimmung dieser Werte.

#### 3.4.2.6 Mann-Whitney-Test

Mit dem Mann-Whitney-Test wurde untersucht, ob zwischen zwei Serumgruppen ein signifikanter Unterschied bezüglich ihrer S/P%-Werte vorlag. Die Berechnungen wurden mit dem Programm MedCalc durchgeführt. Wenn der berechnete P-Wert klein ist ( $P < 0,05$ ), dann kann von einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen ausgegangen werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Titrationsen zur ELISA-Entwicklung

#### 4.1.1 ANTIGEN-TITRATION

Die Ergebnisse der Antigen-Titration sind in den folgenden Tabellen und Abbildungen dargelegt. Tabelle 12 zeigt die gemessenen OD-Werte der Titration für die vier verwendeten Seren Positivkontrolle (PK), Negativkontrolle (NK), Schwach positive Probe 1 und 2 (SP1 und SP2). In Abbildung 8 sind diese Werte graphisch dargestellt und in Tabelle 13 sind die berechneten *signal-to-noise ratio*-Werte abgebildet.

**Tabelle 12 OD-Werte der Antigen-Titration**

Dargestellt sind die OD-Werte der Antigen-Titration. In den Zeilen befinden sich die Werte der vier Seren PK, NK, SP1 und SP2 jeweils im Doppelansatz. In den Spalten sind die Verdünnungen des Antigens (1 : 100 bis 1 : 102.400) angegeben. Die Spalte, die in grau markiert ist, stellt die Antigenverdünnung dar, die die optimalen Bedingungen hervorruft.

	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1.600	1: 3.200	1: 6.400	1: 12. 800	1: 25. 600	1: 51. 200	1: 102. 400
PK	2,917	2,804	2,788	3,022	2,845	2,827	2,650	2,312	1,925	1,487	1,119
PK	2,907	2,747	2,907	3,036	3,032	2,848	2,690	2,395	2,010	1,533	1,158
SP2	3,149	2,863	2,869	2,648	1,908	2,573	2,209	1,911	1,336	1,195	1,070
SP2	2,967	2,979	2,851	2,355	1,896	1,304	1,208	1,076	1,067	0,986	1,092
SP1	2,793	2,438	2,316	2,194	1,537	1,486	1,405	1,309	1,176	1,107	1,066
SP1	2,752	2,686	2,730	2,245	1,803	1,584	1,302	1,276	1,184	1,090	1,126
NK	0,815	0,760	0,737	0,543	0,392	0,344	0,358	0,368	0,349	0,304	0,313
NK	0,817	0,768	0,663	0,546	0,403	0,336	0,338	0,375	0,358	0,322	0,321

- Ergebnisse -

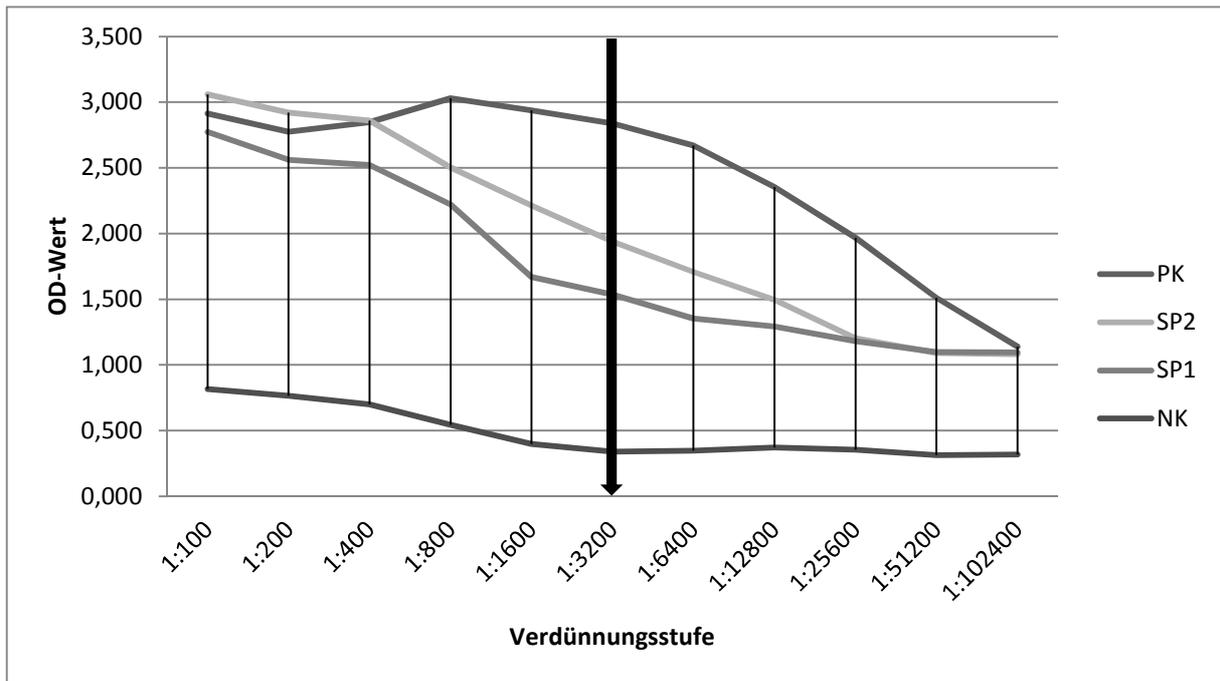


Abbildung 8 Antigen-Titration

Auf der x-Achse ist die Antigen-Verdünnungsstufe, auf der y-Achse der OD-Wert abgetragen. Die Mittelwerte der OD-Werte der vier Seren PK, NK, SP1 und SP2 aus Tabelle 12 sind graphisch dargestellt. Der senkrechte Balken entspricht der grau markierten Verdünnungsstufe aus Tabelle 12.

Die Titration des Antigens zeigt nach anfänglichem Plateau eine stetig abfallende Kurve. Das Plateau der PK reicht über das Plateau der schwach positiven Proben hinaus und die OD-Werte beginnen erst ab einer Konzentration von 1 : 1.600 zu sinken.

Die NK hat in den hohen Antigenkonzentrationen relativ hohe OD-Werte mit 0,8. Ab einer Antigenkonzentration von 1 : 3.200 erreicht sie einen relativ stabilen Wert von 0,3.

Bei der Berechnung der *signal-to-noise ratio* fällt auf, dass die höchsten Werte für alle 3 positive Seren bei einer Antigenverdünnung von 1 : 3.200 vorliegen. Die Verdünnung 1 : 3.200 entspricht einer Konzentration von 36,5 ng LipL32/Kavität.

Tabelle 13 signal-to-noise ratio für die Antigen-Titration

Tabellarische Darstellung der signal-to-noise ratio der OD-Werte aus Tabelle 12. In den Zeilen sind die Seren PK, SP1 und SP2 und in den Spalten die Antigen-Verdünnungen eingetragen. Die grau markierten Werte stellen die höchsten signal-to-noise ratio Werte dar.

	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1.600	1: 3.200	1: 6.400	1: 12. 800	1: 25. 600	1: 51. 200	1: 102. 400
PK	3,6	3,6	4,1	5,6	7,4	8,3	7,7	6,3	5,6	4,8	3,6
SP2	3,7	3,8	4,2	4,6	4,8	5,7	4,9	4,0	3,4	3,5	3,7
SP1	3,4	3,4	3,6	4,1	4,2	4,5	3,9	3,5	3,3	3,5	3,4

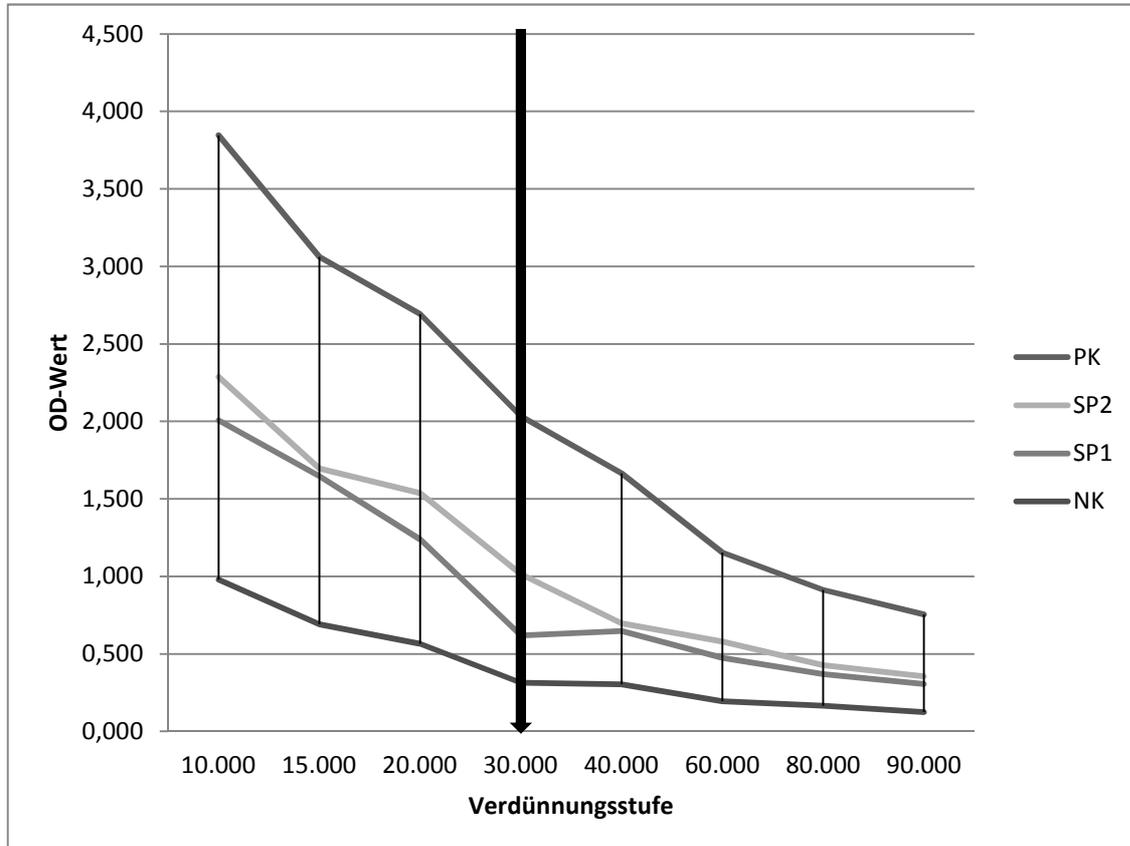
#### 4.1.2 KONJUGAT-TITRATION

Die Ergebnisse der Konjugat-Titration sind in den folgenden Tabellen und Abbildungen dargelegt. Tabelle 14 zeigt die gemessenen OD-Werte der Titration für die vier verwendeten Seren PK, NK, SP1 und SP2. In Abbildung 9 sind diese Werte graphisch dargestellt und in Tabelle 15 sind die berechneten *signal-to-noise ratio*-Werte abgebildet.

**Tabelle 14 OD-Werte der Konjugat-Titration**

Dargestellt sind die OD-Werte der Konjugat-Titration. In den Zeilen befinden sich die Werte der vier Seren PK, NK, SP1 und SP2 jeweils im Doppelansatz. In den Spalten sind die Verdünnungen des Konjugates angegeben (1 : 10.000 bis 1 : 90.000) bzw. vermerkt, wenn kein Serum oder kein Konjugat in der Spalte bei der Testdurchführung verwendet wurde. Die Spalte, die in grau markiert ist, stellt die Konjugatverdünnung dar, die die optimalen Bedingungen hervorruft.

	1: 10. 000	1: 15. 000	1: 20. 000	1: 30. 000	1: 40. 000	1: 60. 000	1: 80. 000	1: 90. 000	kein Serum	kein Kon- jugat
PK	3,718	2,836	2,710	2,032	1,676	1,135	0,922	0,752	0,049	0,035
PK	3,977	3,286	2,676	2,036	1,656	1,174	0,905	0,756	0,048	0,043
SP2	2,281	1,550	1,558	1,028	0,757	0,576	0,442	0,366	0,052	0,044
SP2	2,293	1,842	1,516	1,000	0,636	0,581	0,410	0,346	0,053	0,050
SP1	1,986	1,641	1,235	0,602	0,658	0,472	0,374	0,305	0,050	0,062
SP1	2,029	1,651	1,241	0,636	0,639	0,478	0,367	0,307	0,050	0,042
NK	0,964	0,687	0,549	0,357	0,298	0,211	0,175	0,130	0,057	0,046
NK	0,993	0,694	0,581	0,272	0,309	0,178	0,156	0,121	0,053	0,042



**Abbildung 9 Konjugat-Titration**

Auf der x-Achse ist die Konjugat-Verdünnungsstufe, auf der y-Achse der OD-Wert abgetragen.

- Ergebnisse -

Die Mittelwerte der OD-Werte der vier Seren PK, NK, SP1 und SP2 aus Tabelle 14 sind graphisch dargestellt. Der senkrechte Balken entspricht der grau markierten Verdünnungsstufe aus Tabelle 14.

Die Titration des Konjugates zeigt eine stetig abfallende Kurve. Die Steigung ist in den ersten Verdünnungsstufen stärker als in den höheren Verdünnungen. Die OD-Werte der PK beginnen bei einer Verdünnung von 1 : 10.000 mit 3,8, die schwach positiven Seren befinden sich bei OD-Werten um 2,1 und die NK liegt bei 0,9. Die NK hat erst ab einer Konjugatkonzentration von 1 : 30.000 einen OD-Wert von unter 0,3. Ab diesem Konzentrationsbereich liegen die OD-Werte der PK unter 2,0. Die OD-Werte der schwach positiven Proben liegen in dieser Verdünnungsstufe noch über 0,5. Die Berechnung der *signal-to-noise ratio* ergibt bei der Verdünnung von 1 : 30.000 die höchsten Werte für die PK und die höher liegende schwach positive Probe.

**Tabelle 15 signal-to-noise ratio für die Konjugat-Titration**

Tabellarische Darstellung der *signal-to-noise ratio* der OD-Werte aus Tabelle 14. In den Zeilen sind die Seren PK, SP1 und SP2 und in den Spalten die Konjugat-Verdünnungen eingetragen. Die grau markierten Werte stellen die höchsten *signal-to-noise ratio* Werte dar.

	1: 10.000	1: 15.000	1: 20.000	1: 30.000	1: 40.000	1: 60.000	1: 80.000	1: 90.000
PK	3,9	4,4	4,8	6,5	5,5	5,9	5,5	6,0
SP2	2,3	2,5	2,7	3,2	2,3	3,0	2,6	2,8
SP1	2,1	2,4	2,2	2,0	2,1	2,4	2,2	2,4

#### 4.1.3 SERUM-TITRATION

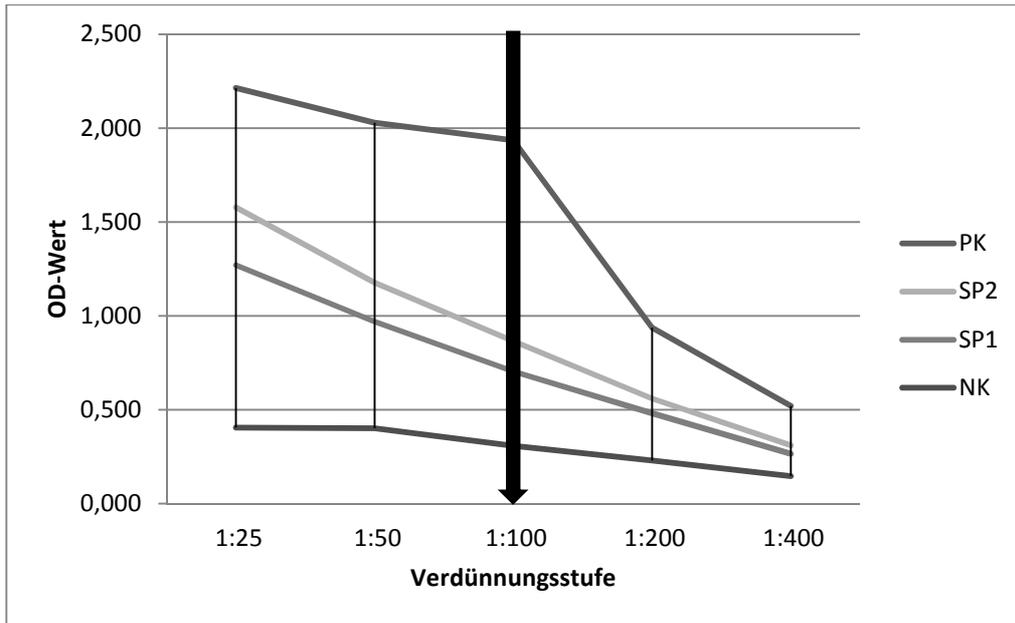
Die Ergebnisse der Antigen-Titration sind in den folgenden Tabellen und Abbildungen dargelegt. Tabelle 16 zeigt die gemessenen OD-Werte der Titration für die vier verwendeten Seren PK, NK, SP1 und SP2. In Abbildung 10 sind diese Werte graphisch dargestellt und in Tabelle 17 sind die berechneten *signal-to-noise ratio*-Werte abgebildet.

**Tabelle 16 OD-Werte der Serum-Titration**

Dargestellt sind die OD-Werte der Serum-Titration. In den Zeilen befinden sich die Werte der vier Seren PK, NK, SP1 und SP2 jeweils im Doppelansatz. In den Spalten sind die Verdünnungen des Serums angegeben (1 : 25 bis 1 : 400). Die Spalte, die in grau markiert ist, stellt die Serumverdünnung dar, die die optimalen Bedingungen hervorruft.

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400
PK	2,510	2,339	2,039	0,937	0,424
PK	1,917	1,719	1,833	0,937	0,617
SP2	1,545	1,087	0,868	0,561	0,299
SP2	1,611	1,265	0,865	0,559	0,319
SP1	1,262	0,956	0,661	0,446	0,271
SP1	1,279	0,981	0,746	0,518	0,261
NK	0,485	0,398	0,328	0,212	0,152
NK	0,324	0,406	0,287	0,248	0,141

- Ergebnisse -



**Abbildung 10 Serum-Titration**

Auf der x-Achse ist die Serum-Verdünnungsstufe, auf der y-Achse der OD-Wert abgetragen. Die Mittelwerte der OD-Werte der vier Seren PK, NK, SP1 und SP2 aus Tabelle 16 sind graphisch dargestellt. Der senkrechte Balken entspricht der grau markierten Verdünnungsstufe aus Tabelle 16.

Die Titration des Serums zeigt kein Plateau für die schwach positiven Proben. Die NK bildet in den ersten beiden Verdünnungsstufen ein Plateau bei einem OD-Wert von 0,4. Das Plateau der PK reicht bis zu der dritten Verdünnungsstufe mit einem OD-Wert von etwa 2,1, dann sinken die OD-Werte rapide auf 0,9 ab.

Die Berechnung der *signal-to-noise ratio* ergibt für die PK den höchsten Wert bei der Verdünnung von 1 : 100. Der höchste Wert für die beiden schwach positiven Seren liegt dagegen bei 1 : 25.

**Tabelle 17 signal-to-noise ratio der Serum-Titration**

Tabellarische Darstellung der signal-to-noise ratio der OD-Werte aus Tabelle 16. In den Zeilen sind die Seren PK, SP1 und SP2 und in den Spalten die Serum-Verdünnungen eingetragen. Die grau markierten Werte stellen die höchsten signal-to-noise ratio Werte dar.

	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400
<b>PK</b>	5,5	5,0	6,3	4,1	3,6
<b>SP2</b>	3,9	2,9	2,8	2,4	2,1
<b>SP1</b>	3,1	2,4	2,3	2,1	1,8

## 4.2 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

### 4.2.1 INTRAASSAY-VARIANZ

Die Intraassay-Varianz wurde anhand von 3 Seren mit unterschiedlich hohen OD-Werten (niedrig, mittel, hoch) des ersten Tages bestimmt (Tabelle 18):

Tabelle 18 Intraassay-Varianz

Darstellung der OD-Werte der drei Seren, die für die Intraassay-Varianz verwendet wurden. In den Spalten befinden sich die jeweiligen Seren. In den Zeilen sind im oberen Teil die Position auf der Mikrotiterplatte (Reihe A, B, C etc.) mit dem entsprechenden OD-Wert und im unteren Teil die berechneten Werte eingetragen.

Reihe	Serum 333-3	Serum Nr. 53	Serum Nr. 77
A	0,114	1,638	4,295
B	0,132	1,659	4,343
C	0,130	1,645	3,676
D	0,123	1,546	4,059
E	0,125	1,398	4,059
F	0,126	1,156	4,234
G	0,109	1,476	4,430
H	0,114	1,740	4,400
<b>Minimum</b>	0,109	1,156	3,676
<b>Maximum</b>	0,132	1,740	4,430
<b>Mittelwert</b>	0,122	1,532	4,187
<b>Standardabweichung</b>	0,008	0,187	0,250
<b>Variationskoeffizient (%)</b>	<b>6,56</b>	<b>12,21</b>	<b>5,97</b>

Somit liegt der Variationskoeffizient der Intraassay-Varianz je nach Höhe des OD-Wertes zwischen 5,97 % und 12,21 %.

Zur Veranschaulichung wurden die OD-Werte dieser 3 Proben in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 11).

- Ergebnisse -

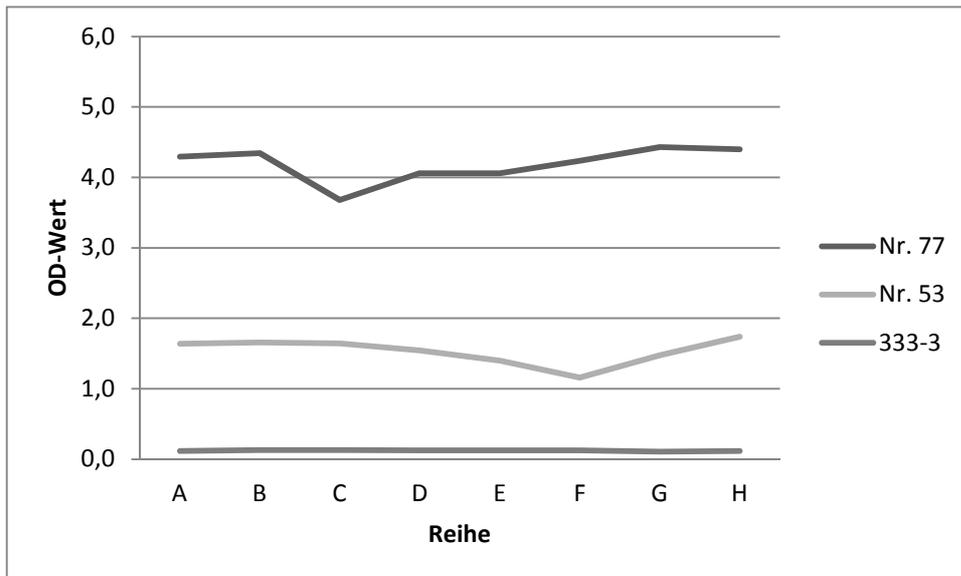


Abbildung 11 Intraassay-Varianz (OD-Werte)

Auf der x-Achse ist die Position der Probe (also die Reihe der Mikrotiterplatte), auf der y-Achse der OD-Wert abgetragen. Die OD-Werte der drei Seren der Intraassay-Varianz aus der Tabelle 18 sind graphisch dargestellt.

#### 4.2.2 INTERASSAY-VARIANZ

Die Interassay-Varianz derselben drei Seren der Intraassay-Varianz wurde in den folgenden drei Tabellen dargestellt (Tabelle 19 bis Tabelle 21):

Tabelle 19 Interassay-Varianz für Serum 333-3

Darstellung der OD-Werte des Serum 333-3, die für die Interassay-Varianz verwendet wurden. In den Spalten befinden sich die OD-Werte der drei Tage und die erfolgten Berechnungen. In den Zeilen sind die Positionen auf der Mikrotiterplatte (A1, B2, C3 etc.) eingetragen.

Kavität	Tag 1	Tag 2	Tag 3		Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient
A1	0,114	0,152	0,142		0,136	0,020	14,477
B2	0,132	0,152	0,143		0,142	0,010	7,355
C3	0,130	0,154	0,149		0,145	0,013	8,665
D4	0,123	0,158	0,150		0,144	0,018	12,796
E5	0,125	0,142	0,124		0,130	0,010	7,888
F6	0,126	0,116	0,120		0,121	0,005	4,276
G7	0,109	0,118	0,130		0,119	0,011	9,061
H8	0,114	0,131	0,124		0,123	0,008	6,752
<b>Mittelwert der Variationskoeffizienten</b>							<b>8,909</b>

- Ergebnisse -

**Tabelle 20 Interassay-Varianz für Serum Nr. 53**

Darstellung der OD-Werte des Serum Nr. 53, die für die Interassay-Varianz verwendet wurden. In den Spalten befinden sich die OD-Werte der drei Tage und die erfolgten Berechnungen. In den Zeilen sind die Positionen auf der Mikrotiterplatte (A7, B8, C9 etc.) eingetragen.

Kavität	Tag 1	Tag 2	Tag 3		Mittelwert	Standard-abweichung	Variations-koeffizient
<b>A7</b>	1,638	1,888	1,500		1,675	0,197	11,758
<b>B8</b>	1,659	1,621	1,503		1,594	0,082	5,121
<b>C9</b>	1,645	1,561	1,417		1,541	0,115	7,473
<b>D10</b>	1,546	1,479	1,246		1,424	0,157	11,043
<b>E11</b>	1,398	1,238	0,965		1,200	0,219	18,268
<b>F1</b>	1,156	1,509	1,404		1,356	0,181	13,346
<b>G2</b>	1,476	1,471	1,334		1,427	0,081	5,657
<b>H3</b>	1,740	1,389	1,442		1,524	0,189	12,412
<b>Mittelwert der Variationskoeffizienten</b>							<b>10,635</b>

**Tabelle 21 Interassay-Varianz für Serum Nr. 77**

Darstellung der OD-Werte des Serum Nr. 77, die für die Interassay-Varianz verwendet wurden. In den Spalten befinden sich die OD-Werte der drei Tage und die erfolgten Berechnungen. In den Zeilen sind die Positionen auf der Mikrotiterplatte (A9, B10, C11 etc.) eingetragen.

Kavität	Tag 1	Tag 2	Tag 3		Mittelwert	Standard-abweichung	Variations-koeffizient
<b>A9</b>	4,295	4,429	3,941		4,222	0,252	5,972
<b>B10</b>	4,343	4,428	4,073		4,281	0,186	4,341
<b>C11</b>	3,676	5,574	4,359		4,536	0,961	21,195
<b>D1</b>	4,059	4,432	4,267		4,253	0,187	4,396
<b>E2</b>	4,059	4,323	4,062		4,148	0,151	3,651
<b>F3</b>	4,234	4,536	3,943		4,238	0,296	6,993
<b>G4</b>	4,430	4,536	4,135		4,367	0,208	4,758
<b>H5</b>	4,400	4,673	4,022		4,365	0,327	7,497
<b>Mittelwert der Variationskoeffizienten</b>							<b>7,350</b>

Für drei Proben wurde der Variationskoeffizient bestimmt, indem die Proben an drei aufeinanderfolgenden Tagen untersucht wurden. Der Variationskoeffizient der Interassay-Varianz des ELISAs liegt je nach Höhe des OD-Wertes zwischen 7,35 % und 10,635 %.

### 4.3 ELISA-Ergebnisse der 200 Validierungsseren

Die 100 MAT-positiven und 100 MAT-negativen Seren (die Positiv- und Negativ-Gruppe der Validierungsseren, siehe Kapitel 3.1.6) wurden in dem ELISA getestet. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse in einem Säulendiagramm dargestellt.

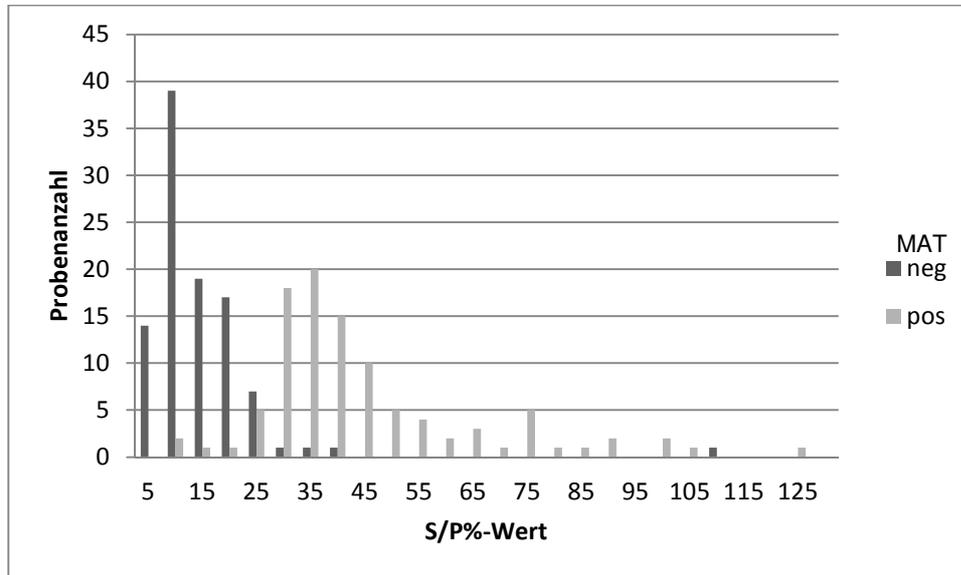


Abbildung 12 Verteilung der S/P%-Werte der Validierungsseren

Auf der x-Achse ist der S/P%-Wert, auf der y-Achse die Probenanzahl abgetragen. Die S/P%-Werte aller 200 Proben sind in dem Diagramm ausgewertet worden und in S/P%-Klassen dargestellt. Die schwarzen Säulen stellen die MAT-negativen Proben dar, die grauen Säulen die MAT-positiven Proben.

91 der 100 MAT-positiven Seren liegen im Bereich von 25 bis 125 S/P%. Der niedrigste S/P% der MAT-positiven Seren liegt bei 8,57 S/P%, der höchste bei 122,90 S/P%. Der Median liegt bei 36,07 S/P%.

96 der 100 MAT-negativen Seren liegen im Bereich von 0 bis 25 S/P%. Der niedrigste S/P% der MAT-negativen Seren liegt bei 3,22 S/P%, der höchste bei 107,57 S/P%. Der Median liegt bei 9,38 S/P%. Werden die MAT-negativen Seren nach ihrer Altersstruktur aufgesplittet, so liegt der niedrigste S/P% der Ferkel-Seren bei 3,22 S/P%, der höchste bei 20,68 S/P%. Der Median liegt bei 6,86 S/P%. Der niedrigste S/P% der Adult-Seren liegt bei 5,42 S/P%, der höchste bei 107,57 S/P%. Der Median liegt bei 14,48 S/P%.

Tabelle 22 zeigt die Verteilung der Validierungsseren auf Intervalle in 25 S/P%-Schritten, wobei die Anhäufung der MAT-negativen Seren in dem Intervall 0-25 S/P% mit 96 Seren und die Anhäufung der MAT-positiven Seren in dem Intervall 25-50 S/P% und 50-75 S/P% mit 68 bzw. 15 Seren deutlich sichtbar wird.

**Tabelle 22 Probenverteilung S/P%-Werte**

In den Spalten sind die MAT-positiven sowie -negativen Proben und in den Zeilen das S/P%-Intervall dargestellt, wodurch ersichtlich wird, in welchen Bereichen die meisten Proben liegen.

S/P% Intervall	MAT-positive Proben	MAT-negative Proben
0 – 25	9	96
25 – 50	68	3
50 – 75	15	0
75 – 100	6	0
100 – 125	2	1
125 – 150	0	0
<b>Total:</b>	100	100

Tabelle 23 stellt eine übersichtliche Zusammenfassung der Minimum-, Maximum- sowie der Medianwerte und Quartilen der Validierungsseren dar, wobei die Negativ-Gruppe zusätzlich in die beiden Altersgruppen Ferkel und Adult aufgesplittet wurde.

**Tabelle 23 Übersicht der Validierungsseren**

In den Spalten sind die berechneten Parameter (in S/P%) und in den Zeilen die Serumgruppen der Validierungsseren eingetragen, wobei zusätzlich zu der Negativ- und Positiv-Gruppe die Altersstruktur der Negativ-Gruppe dargestellt wurde.

Serum-Gruppe	Minimum	25 %	Median	75 %	Maximum	Proben-Anzahl
<b>Ferkel negativ</b>	3,22	4,75	6,86	9,97	20,68	50
<b>Adult negativ</b>	5,42	9,70	14,48	19,48	107,57	50
<b>Gesamt negativ</b>	3,22	6,25	9,83	15,57	107,57	100
<b>Gesamt positiv</b>	8,57	29,45	36,07	48,28	122,90	100

In Abbildung 13 sind die 200 Validierungsseren als box plot dargestellt, wobei die Negativ-Gruppe zusätzlich in ihre Altersgruppen aufgetrennt wurde. Demzufolge wird jeweils ein box plot für die 50 MAT-negativen Ferkel-Seren, einer für die 50 MAT-negativen Adult-Seren, einer für die gesamte Negativ-Gruppe und einer für die Positiv-Gruppe dargestellt. Die Abbildung veranschaulicht, dass ca. 75 % der Ferkel-Seren unter der Positiv-Gruppe liegen, während nur ca. 25 % der Adult-Seren unter den Seren der Positiv-Gruppe liegen.

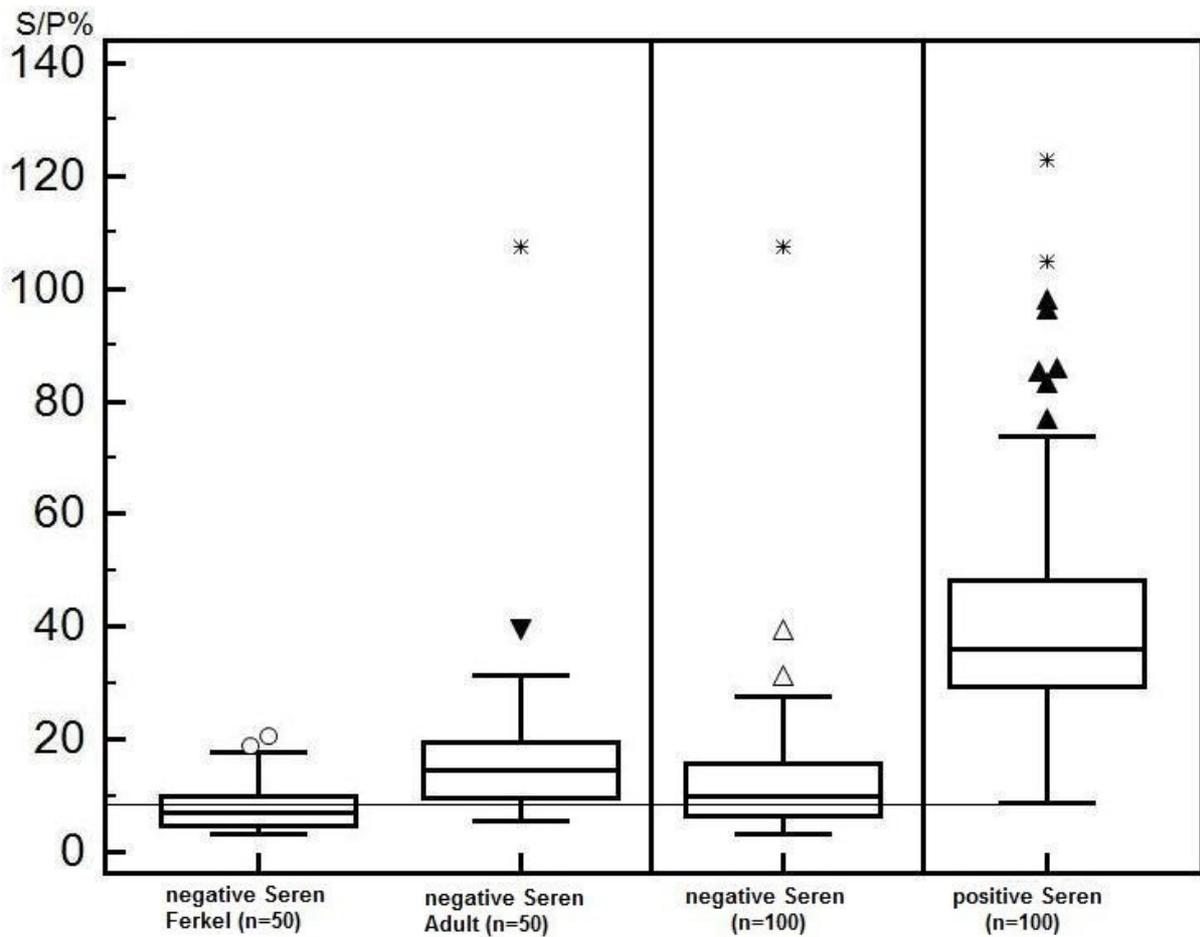


Abbildung 13 box plot Ferkel, Adult, alle negativen und positiven Seren

Auf der x-Achse sind die Serum-Gruppen, auf der y-Achse der S/P%-Wert abgetragen. Die Sterne im Bereich der hohen S/P%-Werte stellen extreme Ausreißer, die Kreise und Dreiecke direkt über den box plots milde Ausreißer dar. Es sind die S/P%-Werte der Negativ- und Positiv-Gruppe abgebildet (gekennzeichnet als negative und positive Seren), wobei die Negativ-Gruppe zusätzlich in Form der zwei Altersgruppen „Ferkel“ und „Adult“ dargestellt wurde. Der horizontale Strich stellt den niedrigsten S/P%-Wert der positiven Seren dar, die vertikalen Striche dienen zur optischen Abgrenzung der Serum-Gruppen.

In Abbildung 14 ist nur die Positiv-Gruppe als box plot dargestellt. Die Proben sind nach ihren MAT-Titern sortiert, um Zusammenhänge zwischen MAT-Titer und ELISA-S/P%-Wert sichtbar machen zu können.

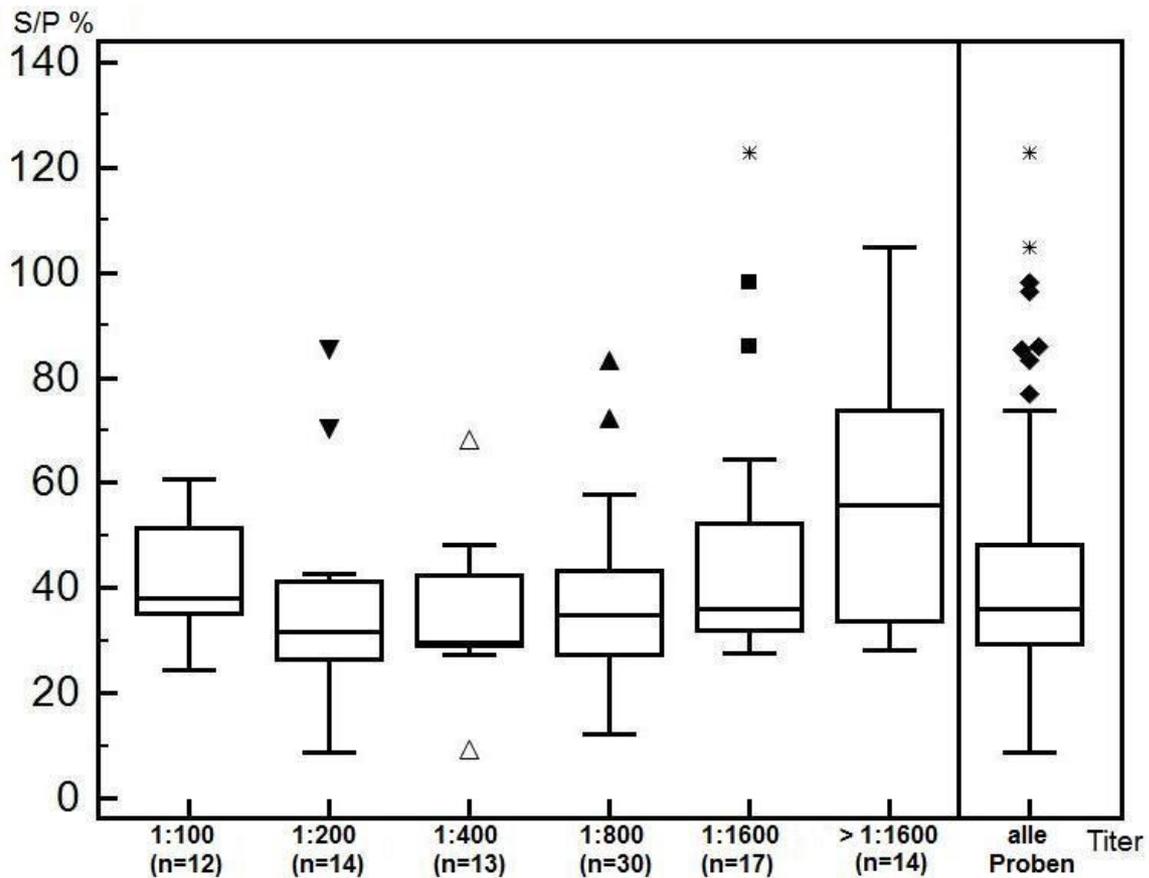


Abbildung 14 box plot MAT-Titer der positiven Seren

Auf der x-Achse sind die Titerstufen, auf der y-Achse der S/P%-Wert abgetragen. Die Sterne im Bereich der hohen S/P%-Werte stellen extreme Ausreißer, die Quadrate und Dreiecke direkt bei den box plots milde Ausreißer dar. Die vertikalen Linien dienen zur optischen Abgrenzung der Serum-Gruppen. Es sind die S/P%-Werte der einzelnen Titerstufen abgebildet (gekennzeichnet als 1 : 100; 1 : 200 etc.), wobei die komplette Positiv-Gruppe zusätzlich am rechten Rand dargestellt wurde.

Die maximalen Werte der Titerstufen ab 1 : 200 steigen kontinuierlich an. Allerdings befinden sich die minimalen Werte der Titer 1 : 100, 1 : 400, 1 : 1600 und > 1 : 1600 bei etwa demselben S/P%-Wert. Ebenso liegen die Mediane von 1 : 100, 1 : 800 und 1 : 1600 bei etwa demselben S/P%-Wert, was bedeutet, dass jeweils 50 % der Proben dieser 3 Titergruppen unter demselben S/P%-Wert liegen.

#### 4.4 Validierung des ELISAs anhand der 200 Validierungsseren

Die Abbildung 15 stellt die ROC-Kurve dar, die auf der Analyse der 200 Validierungsseren im ELISA im Vergleich zum Goldstandard MAT beruht. Der ermittelte Grenzwert von 23,01 S/P% liefert eine Sensitivität von 95 % und eine Spezifität von 94 %. Der AUC beträgt 0,962. Die Tabelle 24 stellt mögliche Grenzwerte mit den entsprechend ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten dieser ROC-Kurve dar. Eine 100 %ige Sensitivität des ELISAs wäre nur mit einem Grenzwert von 8,52 S/P% möglich, eine 100 %ige Spezifität nur mit einem Grenzwert von 107,57 S/P%. Bei diesen beiden Grenzwerten wären allerdings der entsprechend andere Parameter bei 41 % bzw. 1 %.

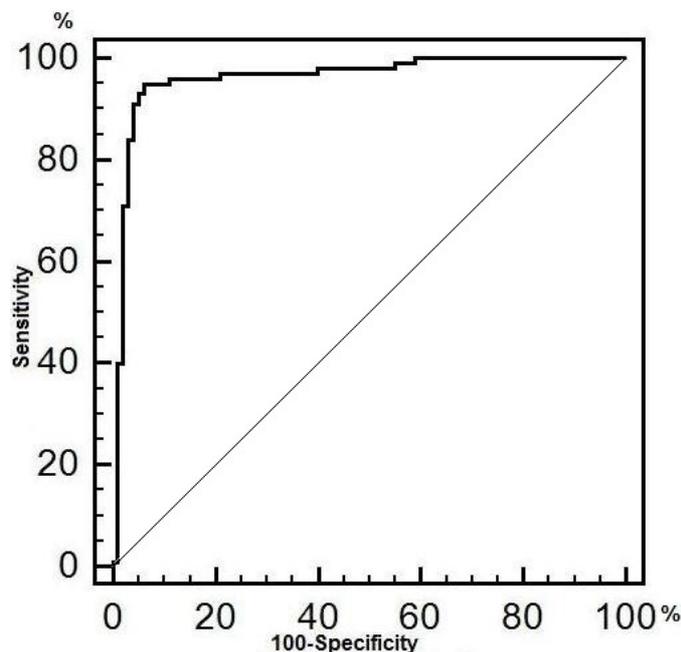


Abbildung 15 ROC-Kurve der Validierungsseren

Auf der x-Achse ist die Falsch-Positiv-Rate (100-Spezifität), auf der y-Achse die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivität) jeweils in Prozent abgetragen. Zur Veranschaulichung ist die  $y = x$  Gerade mit dargestellt. Die ROC-Kurve beruht auf den 200 Seren der Negativ- und Positiv-Gruppe, die als Validierungsseren verwendet wurden.

Tabelle 24 Übersicht der Grenzwerte zu der ROC-Kurve

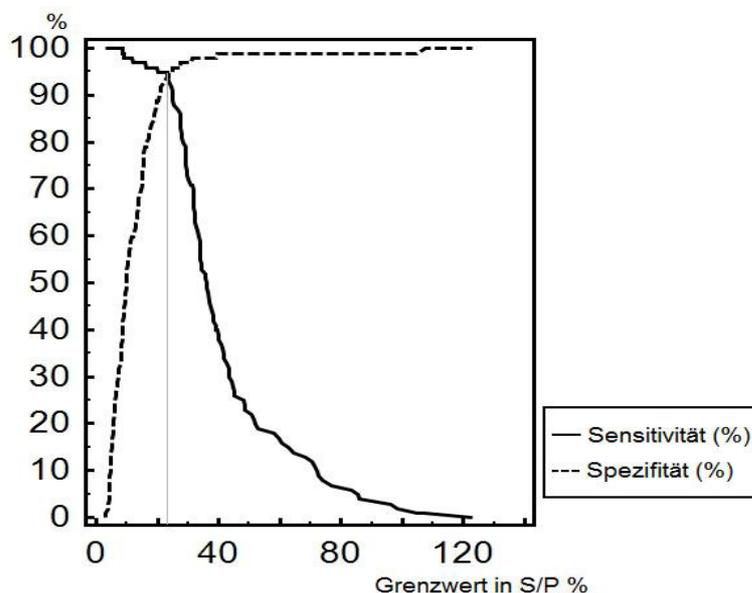
In den Spalten sind die Sensitivität und Spezifität des ELISAs in Abhängigkeit von der Grenzwertwahl mit jeweils einem 95 %igen Konfidenzintervall (95 % CI) dargestellt. In den Zeilen sind verschiedene mögliche Grenzwerte eingetragen. Im Rahmen der ROC-Analyse aus Abbildung 15 sind diese Bestimmungen durchgeführt worden. In grau markiert ist der Grenzwert, der entsprechend der ROC-Analyse der optimale Wert ist.

Grenzwert	Sensitivität	95 % CI	Spezifität	95 % CI
> 8,52 S/P%	100 %	96,4 - 100,0 %	41 %	31,3 - 51,3 %
> 8,57 S/P%	99 %	94,6 - 100,0 %	41 %	31,3 - 51,3 %
> 16,32 S/P%	96 %	90,1 - 98,9 %	79 %	69,7 - 86,5 %
> 20,09 S/P%	95 %	88,7 - 98,4 %	89 %	81,2 - 94,4 %
> 23,01 S/P%	95 %	88,7 - 98,4 %	94 %	87,4 - 97,8 %
> 23,74 S/P%	93 %	86,1 - 97,1 %	94 %	87,4 - 97,8 %

- Ergebnisse -

Grenzwert	Sensitivität	95 % CI	Spezifität	95 % CI
> 23,83 S/P%	93 %	86,1 - 97,1 %	95 %	88,7 - 98,4 %
> 24,94 S/P%	91 %	83,6 - 95,8 %	96 %	90,1 - 98,9 %
> 39,54 S/P%	40 %	30,3 - 50,3 %	99 %	94,6 - 100,0 %
> 107,57 S/P%	1 %	0,03 - 5,4 %	100 %	96,4 - 100,0 %

Die Abbildung 16 stellt die Tabelle 24 graphisch dar. Es ist die Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit von den möglichen Grenzwerten dargestellt. Der Punkt, an dem sich die beiden Graphen treffen, entspricht dem Grenzwert von ca. 23 S/P%. Aus den Kurvenverläufen ist erkennbar, dass eine hohe Sensitivität zu Lasten der Spezifität geht, und umgekehrt eine hohe Spezifität nur auf Kosten einer niedrigen Sensitivität möglich ist.

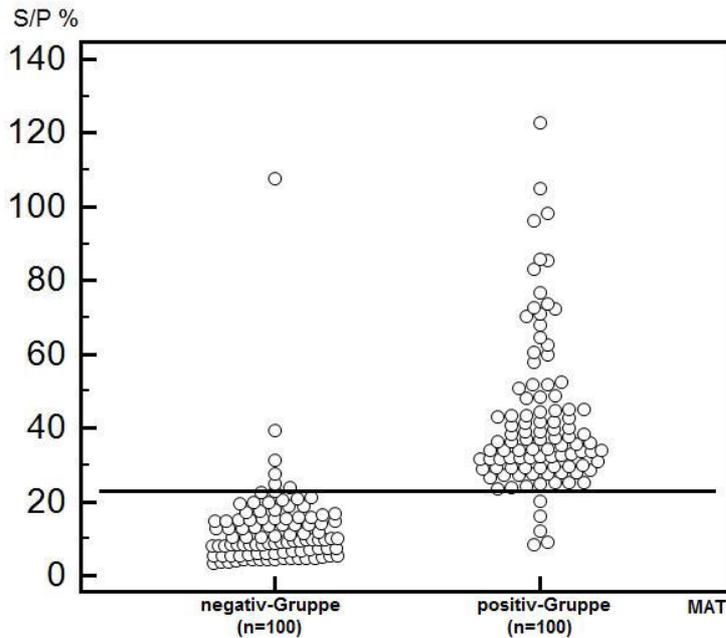


**Abbildung 16 Kurvenverlauf Sensitivität und Spezifität**

Auf der x-Achse ist der Grenzwert in S/P%, auf der y-Achse je nach Kurve die Sensitivität oder Spezifität in Prozent abgetragen. Die durchgezogene Linie stellt die Sensitivität, die gestrichelte Linie die Spezifität des ELISAs in Abhängigkeit von dem gewählten Grenzwert dar. Die senkrechte graue Linie entspricht dem optimalen Grenzwert von 23,01 S/P%.

In Abbildung 17 ist die Verteilung der Validierungsserien entsprechend der ROC-Analyse in Form eines dot plots dargestellt. Es ist gut erkennbar, dass nur wenige Proben falsch positiv bzw. falsch negativ sind.

- Ergebnisse -



**Abbildung 17** dot plot der Validierungsseren mit Grenzwert  
 Auf der x-Achse sind die Serum-Gruppen (Negativ- und Positiv-Gruppe der Validierungsseren), auf der y-Achse der S/P%-Wert abgetragen. Der waagrechte Balken entspricht dem Grenzwert von 23,01 S/P%.

In Abbildung 18 ist eine Vierfeldertafel dargestellt. Als Grenzwert für den ELISA wurde 23,01 S/P% verwendet. Von den 100 Seren aus der Positiv-Gruppe wurden im ELISA nur 95 Seren als positiv klassifiziert. 94 der 100 Seren aus der Negativ-Gruppe wurden im ELISA als negativ klassifiziert, so dass der ELISA 5 falsch negative und 6 falsch positive Ergebnisse lieferte.

	MAT positiv	MAT negativ	
ELISA positiv	95	6	101
ELISA negativ	5	94	99
	100	100	

**Abbildung 18** Vierfeldertafel ELISA und MAT  
 Darstellung der MAT-Ergebnisse (Spalten) und ELISA-Ergebnisse (Zeilen) in einer Vierfeldertafel von den 200 Validierungsseren.

Da die Seren nicht normalverteilt sind, wurde der Rangkorrelationskoeffizient berechnet. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für die Validierungsseren in Bezug auf das qualitative Ergebnis negativ / positiv des ELISAs und des MATs ist mit einem Wert von 0,890 hoch. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für die MAT-Titer und den S/P%-Werten der positiven Validierungsseren beträgt 0,213. Somit ist die Korrelation zwischen den Ergebnissen sehr schwach.

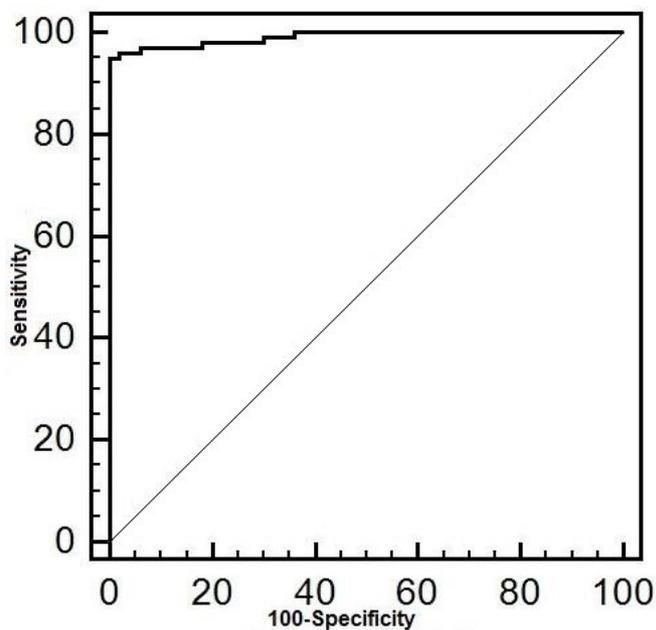
Der positiv prädiktive Wert beträgt 94,1 %. Der negativ prädiktive Wert beträgt 94,9 %.

#### 4.4.1 GRENZWERTBESTIMMUNG NACH ALTERSGRUPPEN

Um zu kontrollieren, dass der oben ermittelte Grenzwert unabhängig von dem Alter der Negativ-Gruppe ist, wurden zwei ROC-Analysen durchgeführt:

Zum einen eine ROC-Kurve, die aus den 100 Seren der Positiv-Gruppe und den 50 Ferkel-Seren aus der Negativ-Gruppe berechnet wurde (Abbildung 19). Der ermittelte optimale Grenzwert von 20,68 S/P% liefert eine Sensitivität von 95 % und eine Spezifität von 100 %. Der AUC beträgt 0,991.

Zum anderen eine ROC-Kurve, die aus den 100 Seren der Positiv-Gruppe und den 50 Adult-Seren aus der Negativ-Gruppe berechnet wurde (Abbildung 20). Der ermittelte optimale Grenzwert von 23,01 S/P% liefert eine Sensitivität von 95 % und eine Spezifität von 88 %. Der AUC beträgt 0,934.



**Abbildung 19 ROC-Kurve mit positiven Seren und 50 negativen Ferkel-Seren**

Auf der x-Achse ist die Falsch-Positiv-Rate (100-Spezifität), auf der y-Achse die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivity) jeweils in Prozent abgetragen. Zur Veranschaulichung ist die  $y = x$  Gerade mit dargestellt. Die ROC-Kurve beruht auf den 100 Seren der Positiv-Gruppe und den 50 Ferkel-Seren aus der Negativ-Gruppe.

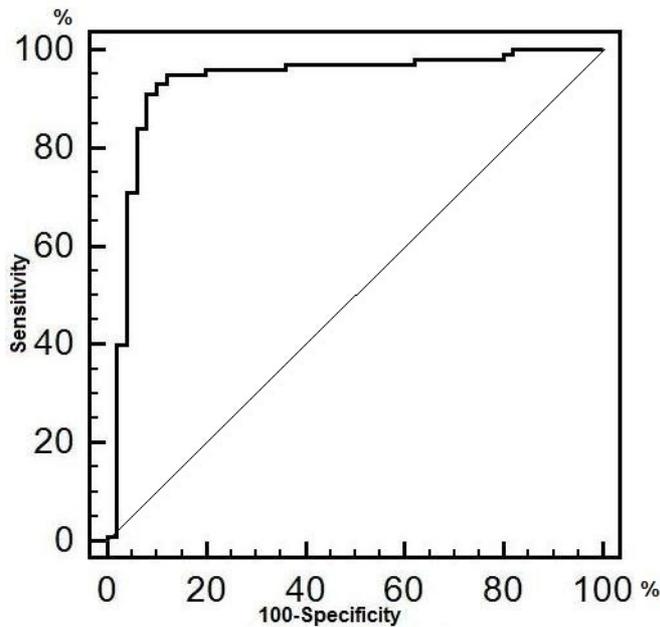


Abbildung 20 ROC-Kurve mit positiven Seren und 50 negativen Adult-Seren

Auf der x-Achse ist die Falsch-Positiv-Rate (100-Specificity), auf der y-Achse die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivity) jeweils in Prozent abgetragen. Zur Veranschaulichung ist die  $y = x$  Gerade mit dargestellt. Die ROC-Kurve beruht auf den 100 Seren der Positiv-Gruppe und den 50 Adult-Seren aus der Negativ-Gruppe.

In der folgenden Abbildung 21 sind die beiden ROC-Kurven der 50 MAT-negativen Ferkel-Seren und der 50 MAT-negativen Seren von Adulten mit den je 100 Seren aus der Positiv-Gruppe dargestellt. Es fällt auf, dass die ROC-Kurve der Adult-Seren schwächer ansteigt als die der Ferkel-Seren. Dementsprechend kleiner ist auch der AUC der Adult-Seren.

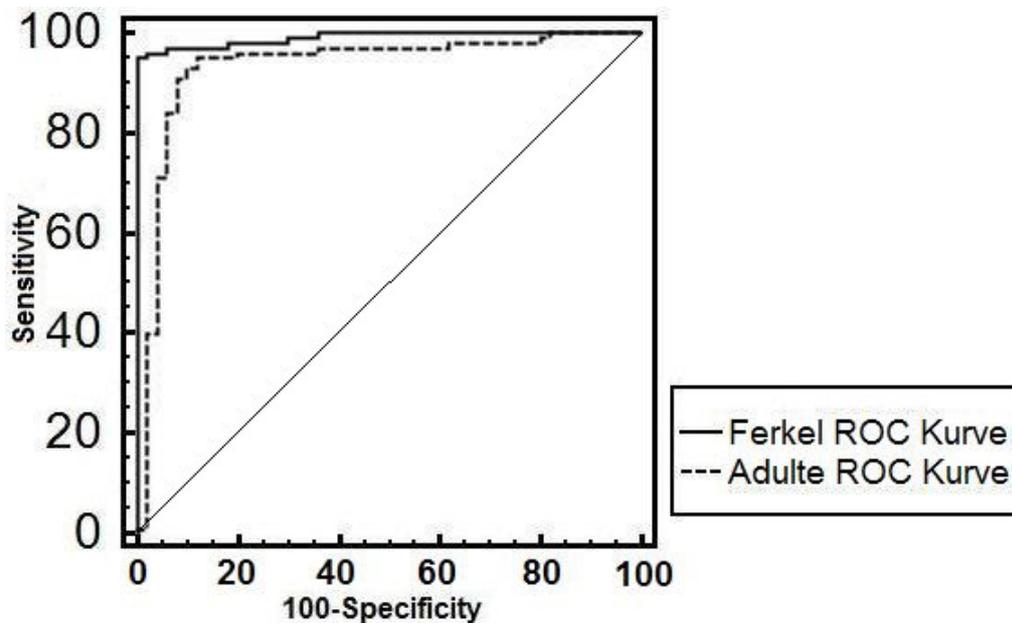


Abbildung 21 Vergleich der ROC-Kurven von Ferkel- und Adult-Seren

Auf der x-Achse ist die Falsch-Positiv-Rate (100-Specificity), auf der y-Achse die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivity) jeweils in Prozent abgetragen. Zur Veranschaulichung ist die  $y = x$  Gerade mit dargestellt. Die ROC-Kurven entsprechen denen aus Abbildung 19 (Ferkel-Seren, durchgezogene Linie) und Abbildung 20 (Adult-Seren, gestrichelte Linie), nur dass sie hier in einem Diagramm dargestellt sind.

Tabelle 25 zeigt zusammenfassend die drei ermittelten Grenzwerte der Validierungsseren in Abhängigkeit von dem Alter der Negativ-Gruppe mit den entsprechenden Sensitivitäten und Spezifitäten.

**Tabelle 25 drei Grenzwerte der Validierungsseren**

In den Spalten sind die bestimmten Parameter und in den Zeilen die ausgewählten Serum-Gruppen dargestellt. Abhängig von der negativen Population ist ein anderer S/P%-Wert der optimale Grenzwert mit entsprechenden Veränderungen der Sensitivität und Spezifität des ELISAs.

<b>positive Population</b>	<b>negative Population</b>	<b>Grenzwert</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>	<b>AUC</b>
Positiv-Gruppe	Ferkel Seren	20,68 S/P%	95 %	100 %	0,991
Positiv-Gruppe	Adult Seren	23,01 S/P%	95 %	88 %	0,934
Positiv-Gruppe	Negativ-Gruppe	23,01 S/P%	95 %	94 %	0,962

## 4.5 ELISA-Ergebnisse der restlichen Seren

Die 313 Seren, die nicht in die Validierung des ELISAs eingeflossen sind, wurden entsprechend den Gruppierungen durch die MAT-Ergebnisse untersucht.

### 4.5.1 SEREN AUS DER NEGATIV-GRUPPE

In Abbildung 22 sind die S/P%-Werte der Negativ-Gruppe der restlichen Seren in einem Säulendiagramm dargestellt. Der niedrigste S/P%-Wert der getesteten Seren befindet sich bei 6,68, der höchste S/P%-Wert liegt bei 75,77. Der Median liegt bei 26,65 S/P%. 50 % der Proben liegen zwischen 18,03 und 44,10 S/P%.

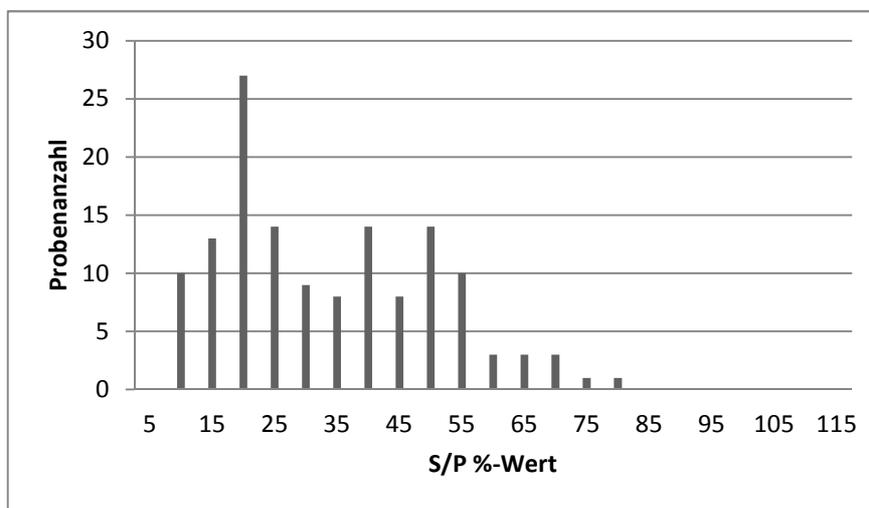


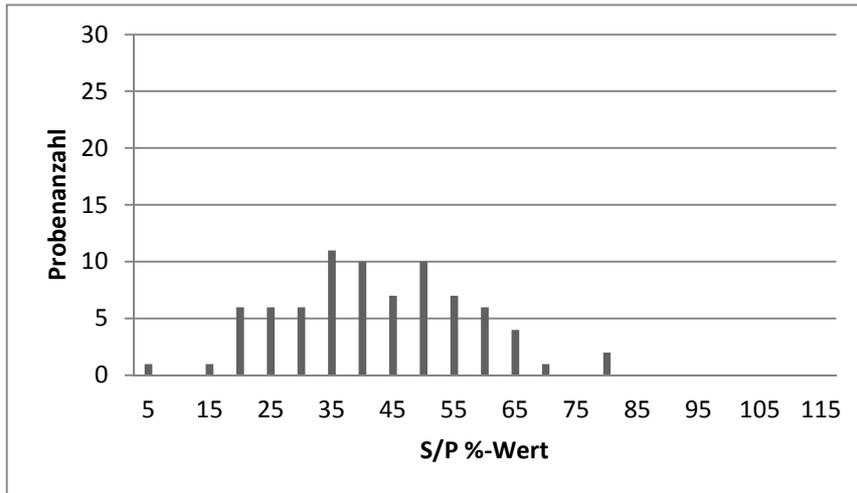
Abbildung 22 S/P%-Werte der Negativ-Gruppe der restlichen Seren

Auf der x-Achse ist der S/P%-Wert, auf der y-Achse die Probenanzahl abgetragen. Es ist die Häufigkeit bestimmter S/P%-Klassen der Negativ-Gruppe der restlichen Seren dargestellt, wobei die angegebene Zahl der maximale S/P%-Wert der jeweiligen Klasse ist.

### 4.5.2 SEREN AUS DER VERDÄCHTIG-GRUPPE

In Abbildung 23 sind die S/P%-Werte der Verdächtig-Gruppe in einem Säulendiagramm dargestellt. Der niedrigste S/P%-Wert der getesteten Seren befindet sich bei 3,29, der höchste S/P%-Wert liegt bei 81,86. Der Median liegt bei 39,38 S/P%. 50 % der Proben liegen zwischen 29,82 und 50,42 S/P%.

- Ergebnisse -

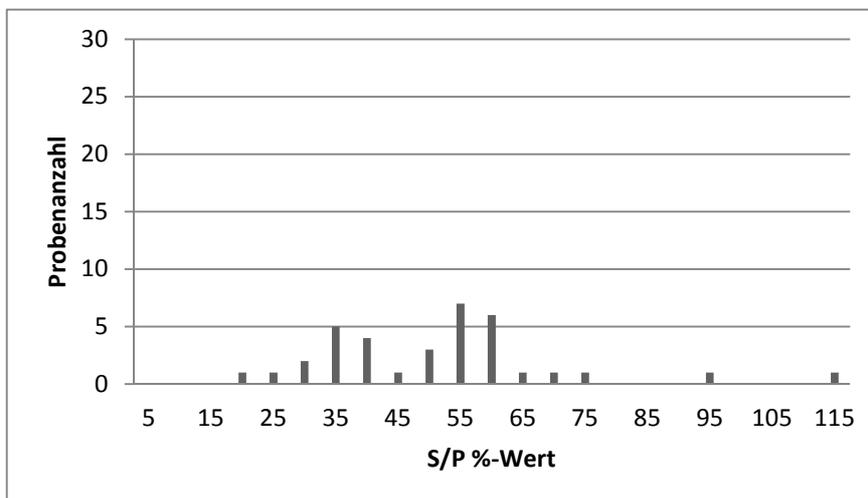


**Abbildung 23 S/P%-Werte der Verdächtig-Gruppe**

Auf der x-Achse ist der S/P%-Wert, auf der y-Achse die Probenanzahl abgetragen. Es ist die Häufigkeit bestimmter S/P%-Klassen der Verdächtig-Gruppe dargestellt, wobei die angegebene Zahl der maximale S/P%-Wert der jeweiligen Klasse ist.

#### 4.5.3 SEREN AUS DER 1 : 50-GRUPPE

In Abbildung 24 sind die S/P%-Werte der 1 : 50-Gruppe in einem Säulendiagramm dargestellt. Der niedrigste S/P%-Wert der getesteten Seren befindet sich bei 18,34, der höchste S/P%-Wert liegt bei 111,66. Der Median liegt bei 51,33 S/P%. 50 % der Proben liegen zwischen 37,45 und 56,32 S/P%.



**Abbildung 24 S/P%-Werte 1:50-Gruppe**

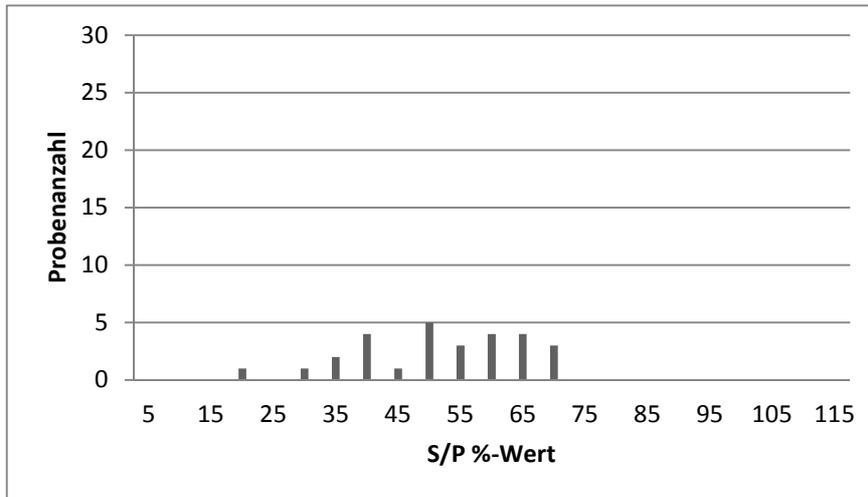
Auf der x-Achse ist der S/P%-Wert, auf der y-Achse die Probenanzahl abgetragen. Es ist die Häufigkeit bestimmter S/P%-Klassen der 1 : 50-Gruppe dargestellt, wobei die angegebene Zahl der maximale S/P%-Wert der jeweiligen Klasse ist.

#### 4.5.4 SEREN AUS DER POSITIV-GRUPPE

In Abbildung 25 sind die S/P%-Werte der Positiv-Gruppe der restlichen Seren in einem Säulendiagramm dargestellt. Der niedrigste S/P%-Wert der getesteten Seren

- Ergebnisse -

befindet sich bei 18,92, der höchste S/P%-Wert liegt bei 68,03. Der Median liegt bei 50,24 S/P%. 50 % der Proben liegen zwischen 39,88 und 58,98 S/P%.

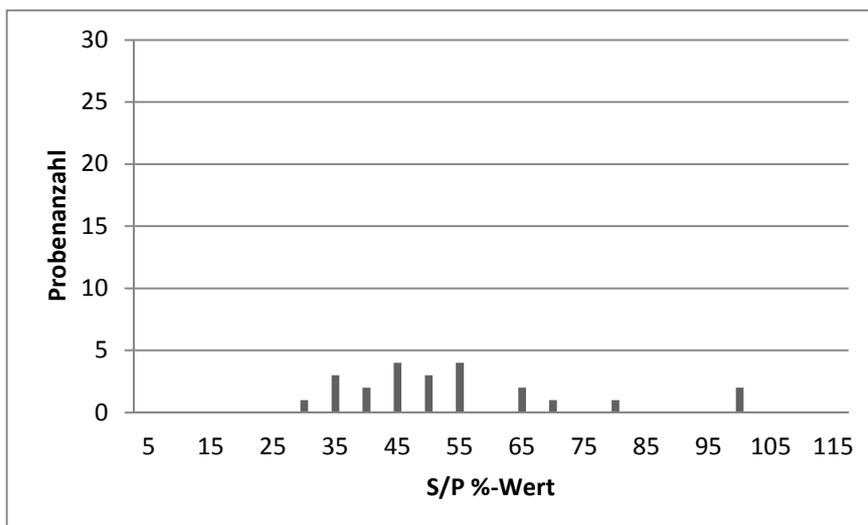


**Abbildung 25 S/P%-Werte der Positiv-Gruppe der restlichen Seren**

Auf der x-Achse ist der S/P%-Wert, auf der y-Achse die Probenanzahl abgetragen. Es ist die Häufigkeit bestimmter S/P%-Klassen der Positiv-Gruppe der restlichen Seren dargestellt, wobei die angegebene Zahl der maximale S/P%-Wert der jeweiligen Klasse ist.

#### 4.5.5 SEREN AUS DER ZUSATZ-GRUPPE

In Abbildung 26 sind die S/P%-Werte der Zusatz-Gruppe in einem Säulendiagramm dargestellt. Der niedrigste S/P%-Wert der getesteten Seren befindet sich bei 25,48, der höchste S/P%-Wert liegt bei 98,01. Der Median liegt bei 46,62 S/P%. 50 % der Proben liegen zwischen 40,08 und 58,14 S/P%.



**Abbildung 26 S/P%-Werte der Zusatz-Gruppe**

Auf der x-Achse ist der S/P%-Wert, auf der y-Achse die Probenanzahl abgetragen. Es ist die Häufigkeit bestimmter S/P%-Klassen der Zusatz-Gruppe dargestellt, wobei die angegebene Zahl der maximale S/P%-Wert der jeweiligen Klasse ist.

- Ergebnisse -

Tabelle 26 zeigt eine übersichtliche Zusammenfassung der ermittelten Parameter der einzelnen Gruppen der restlichen Seren aus den Kapiteln 4.5.1 bis 4.5.5. Zusätzlich ist dargestellt, wie viele Proben über einem S/P%-Wert von 23,01 S/P% liegen: Von den 148 negativen Seren sind es 90 Stück, von den 78 verdächtigen Proben 63 Stück, von den 36 Seren mit einem Titer von 1 : 50 sind es 34 Proben und von den 28 positiven Seren 27 Stück.

**Tabelle 26 Übersicht über die restlichen getesteten Seren**

In den Spalten sind untersuchte Parameter (in S/P%) und die Anzahl an Proben, in den Zeilen die Serum-Gruppen dargestellt. Die letzte Spalte zeigt, wie viele Proben über dem S/P%-Wert von 23,01 liegen.

<b>Serum-Gruppe</b>	<b>Minimum</b>	<b>25 %</b>	<b>Median</b>	<b>75 %</b>	<b>Maximum</b>	<b>Proben-Anzahl</b>	<b>&gt; 23,01 S/P%</b>
<b>negativ</b>	6,68	18,03	26,65	44,10	75,77	148	90
<b>verdächtig</b>	3,29	29,82	39,38	50,42	81,86	78	65
<b>1 : 50</b>	18,34	37,45	51,33	56,32	111,66	36	34
<b>positiv</b>	18,92	39,88	50,24	58,98	68,03	28	27
<b>Zusatz</b>	25,48	40,08	46,62	58,14	98,01	23	23

## 4.6 Vergleichende Darstellung aller untersuchten Seren

### 4.6.1 BOX PLOTS

In Abbildung 27 sind alle Seren, die im MAT keine Agglutination aufwiesen und dementsprechend als negativ klassifiziert worden sind, als box plot dargestellt. Dabei sind folgende drei Serum-Gruppen verwendet worden:

1. Negativ-Gruppe (Validierungsseren)
2. Negativ-Gruppe (restliche Seren)
3. Negativ-Gruppe (Gesamtzahl)

Der Unterschied zwischen den S/P%-Werten der Validierungsseren und der restlichen Seren aus der Negativ-Gruppe wird in der Abbildung deutlich. Entsprechend dem Mann-Whitney-Test liegt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

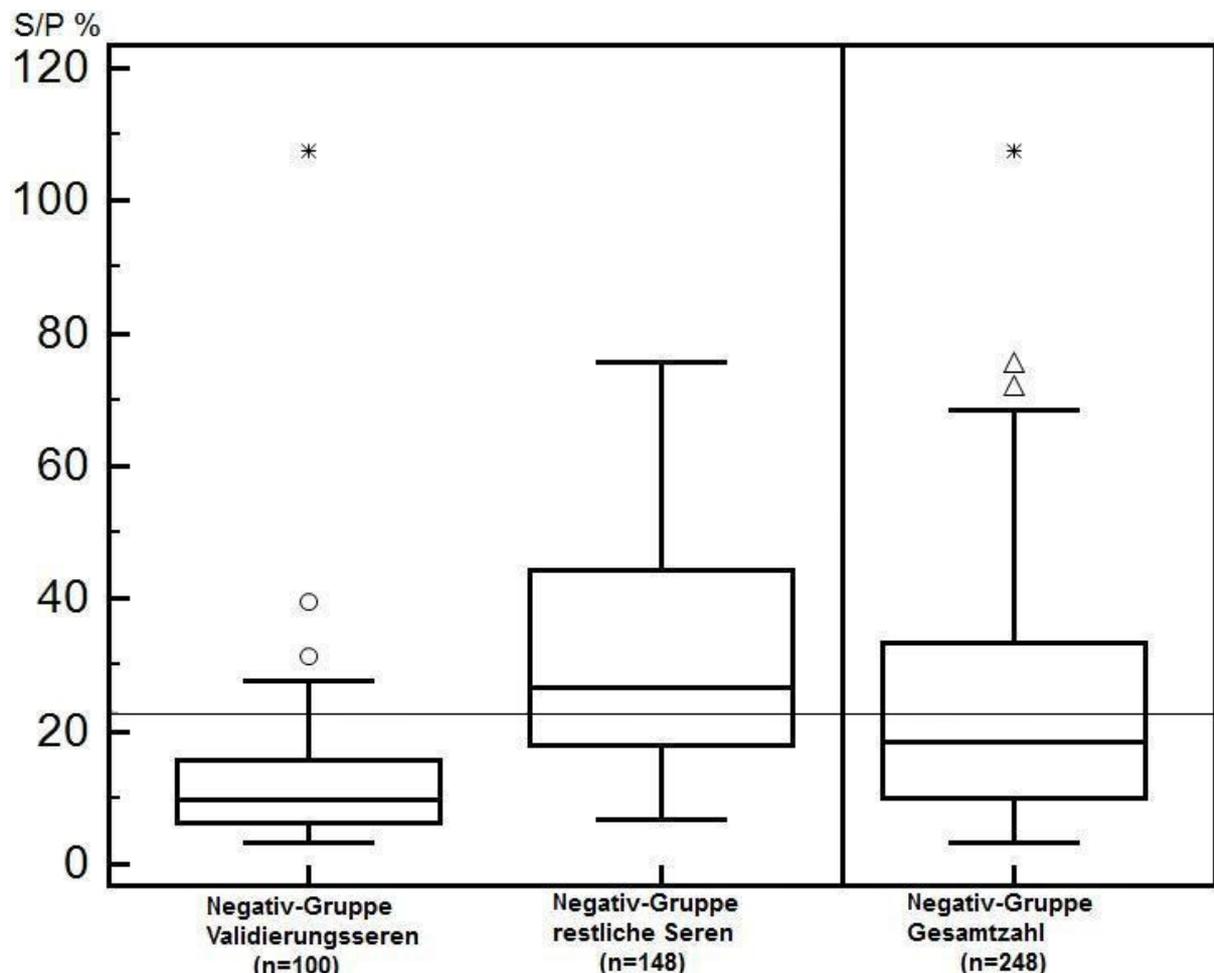
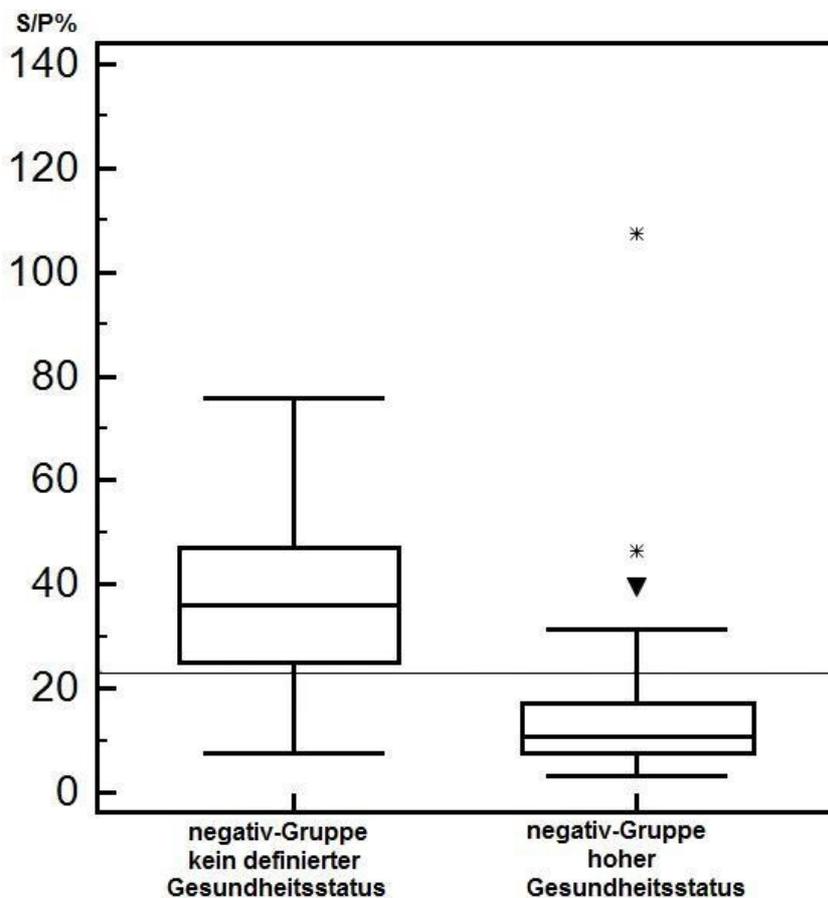


Abbildung 27 Vergleich verschiedener Gruppen MAT-negativer Seren

Auf der x-Achse sind die Serum-Gruppen, auf der y-Achse der S/P%-Wert abgetragen. Die Sterne im Bereich der hohen S/P%-Werte stellen extreme Ausreißer, die Kreise und Dreiecke direkt über den box plots milde Ausreißer dar. Die vertikalen Linien dienen zur optischen Abgrenzung bestimmter Serum-Gruppen. Es sind die S/P%-Werte der Negativ-Gruppe abgebildet, wobei links die Validierungsseren, in der Mitte die restlichen Seren und rechts die Gesamtzahl dargestellt wurden. Der Grenzwert von 23 S/P% ist als graue horizontale Linie eingezeichnet.

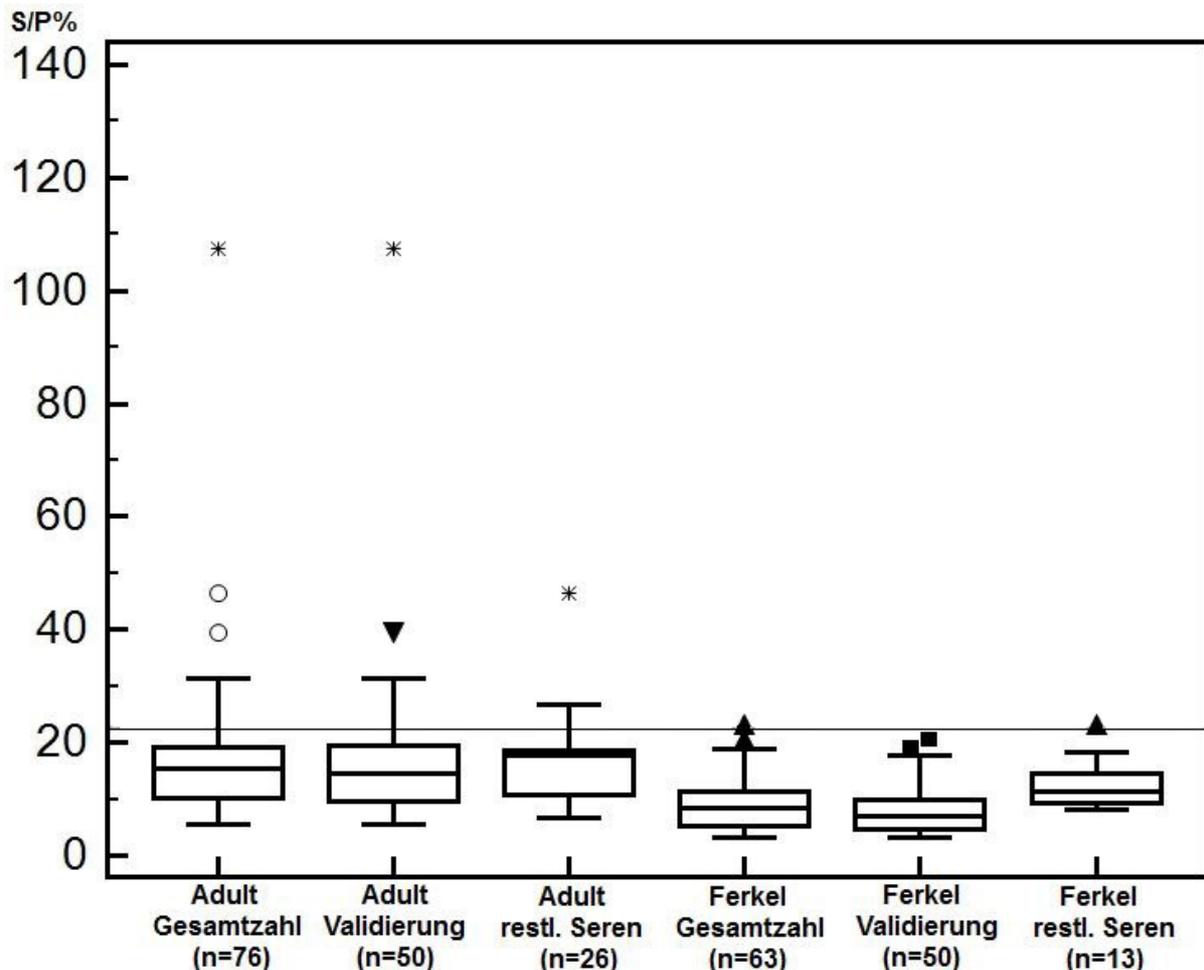
Wenn die Negativ-Gruppe entsprechend dem Gesundheitsstatus in Seren mit hohem und Seren ohne definiertem Gesundheitsstatus aufgeteilt werden, so ergibt sich Abbildung 28. Über 75 % der Seren mit hohem Gesundheitsstatus liegen unter dem Grenzwert von 23,01 S/P%, während ca. 75 % der Seren ohne definiertem Gesundheitsstatus über dem Grenzwert liegen. Genau bestimmt, liegen 10 der 139 Seren mit hohem Gesundheitsstatus über dem Grenzwert. Dies entspricht 7,2 % der Seren mit hohem Gesundheitsstatus. Zwischen den beiden Gruppen „hoher Gesundheitsstatus“ und „kein definierter Gesundheitsstatus“ ist ein signifikanter Unterschied vorhanden.



**Abbildung 28 Negativ-Gruppe aufgeteilt entsprechend Gesundheitsstatus**

Auf der x-Achse sind die Serum-Gruppen, auf der y-Achse der S/P%-Wert abgetragen. Die Sterne im Bereich der hohen S/P%-Werte stellen extreme Ausreißer, das Dreieck direkt über dem box plot einen milden Ausreißer dar. Es sind die S/P%-Werte der Negativ-Gruppe abgebildet, wobei links die Seren ohne definiertem Gesundheitsstatus und rechts die mit hohem Gesundheitsstatus dargestellt wurden. Der Grenzwert von 23 S/P% ist als graue horizontale Linie eingezeichnet.

In Abbildung 29 sind die negativen Seren mit hohem Gesundheitsstatus weiter aufgetrennt entsprechend ihrer Altersgruppen. Der S/P%-Bereich der Adult-Seren der restlichen negativ-Seren liegt etwa in dem der Adult-Seren der Validierungsseren. Es liegt zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied vor. Bei den Ferkel-Seren zeigen sich deutlichere Unterschiede: Der Großteil der restlichen Seren liegt in dem oberen S/P%-Bereich der Validierungsseren, insgesamt liegen aber alle Ferkel-Seren unter dem Grenzwert von 23,01 S/P%.



**Abbildung 29 hoher Gesundheitsstatus aufgeteilt entsprechend Altersgruppen**  
Auf der x-Achse sind die Serum-Gruppen, auf der y-Achse der S/P%-Wert abgetragen. Die Sterne im Bereich der hohen S/P%-Werte stellen extreme Ausreißer, die Kreise, Dreiecke und Quadrate direkt über den box plots milde Ausreißer dar. Es sind die S/P%-Werte der Negativ-Gruppe abgebildet, wobei die drei linken die Adult-Seren (Gesamtzahl; Validierungsseren; restliche Seren) und die drei rechten die Ferkel-Seren (Gesamtzahl; Validierungsseren; restliche Seren) darstellen. Der Grenzwert von 23 S/P% ist als graue horizontale Linie eingezeichnet.

- Ergebnisse -

In Abbildung 30 sind alle Seren, die im MAT Agglutinationen aufwiesen und dementsprechend als positiv oder mit der Titerstufe 1 : 50 klassifiziert worden sind, als box plot dargestellt. Dabei sind folgende vier Serum-Gruppen verwendet worden:

1. Positiv-Gruppe (Validierungsseren)
2. Positiv-Gruppe (restliche Seren)
3. Positiv-Gruppe (Gesamtzahl)
4. 1 : 50-Gruppe

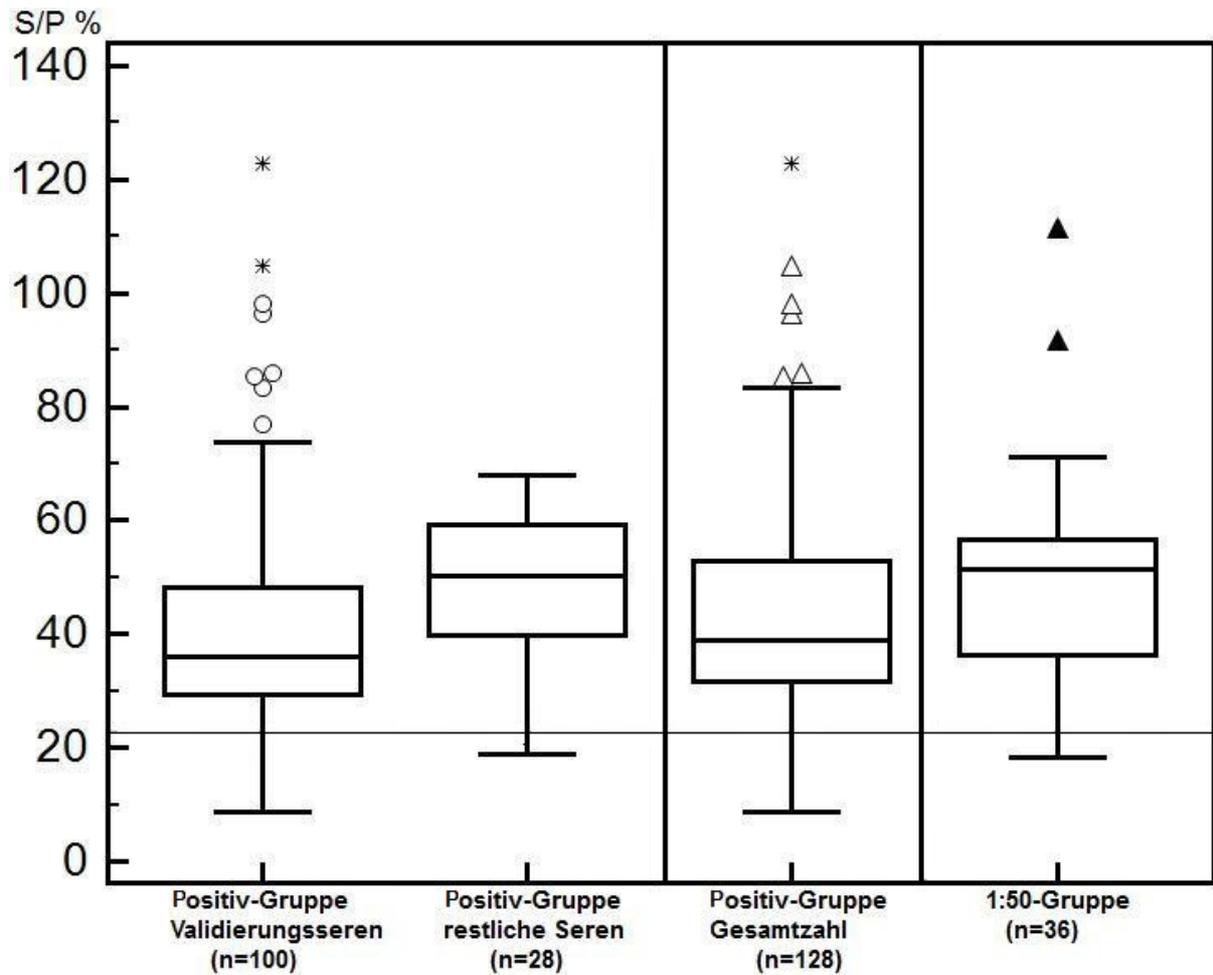
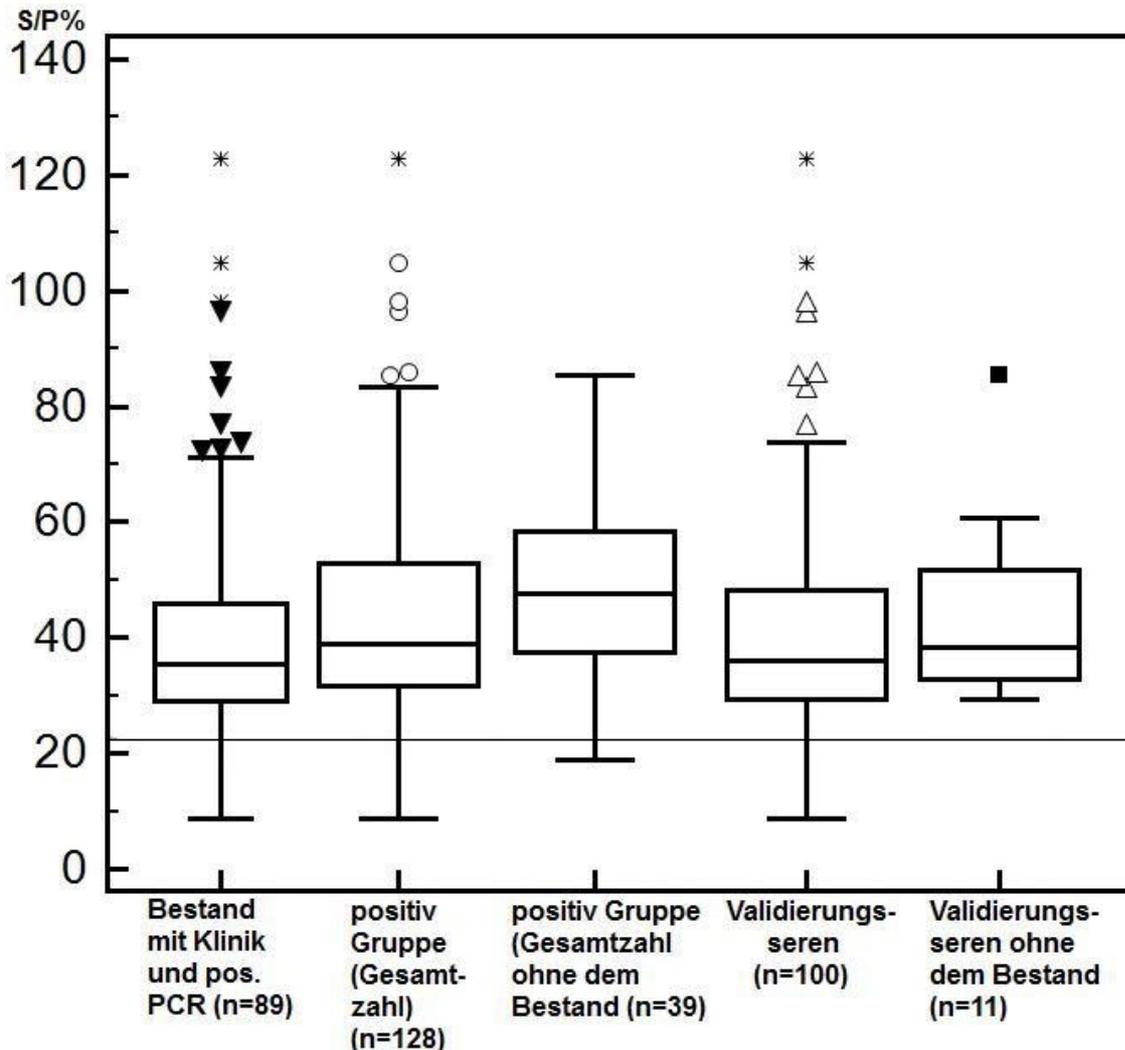


Abbildung 30 Vergleich verschiedener Gruppen MAT-positiver Seren

Auf der x-Achse sind die Serum-Gruppen, auf der y-Achse der S/P%-Wert abgetragen. Die Sterne im Bereich der hohen S/P%-Werte stellen extreme Ausreißer, die Kreise und Dreiecke direkt über den box plots milde Ausreißer dar. Die vertikalen Linien dienen zur optischen Abgrenzung bestimmter Serum-Gruppen. Es sind die S/P%-Werte der Positiv-Gruppe abgebildet, wobei links die Validierungsseren, dann die restlichen Seren daneben die Gesamtzahl und rechts die 1 : 50-Gruppe dargestellt wurden. Der Grenzwert von 23 S/P% ist als graue horizontale Linie eingezeichnet.

Abbildung 31 zeigt Unterschiede zwischen dem Bestand aus der Positiv-Gruppe, der eine Abort-Problematik mit positivem PCR-Ergebnis aus einem Fetus hat, und den restlichen positiven Seren. Die box plots ohne diesem Bestand weisen insgesamt nicht so niedrige S/P%-Werte auf. Die 11 restlichen Validierungsseren liegen über dem Grenzwert von 23,01 S/P%. Allerdings sind in dieser Konstellation auch keine extrem hohen S/P%-Werte mit über 90 S/P% zu finden. Es ist ein signifikanter Unterschied ( $P < 0,05$ ) zwischen den Validierungsseren der Positiv-Gruppe und den restlichen Seren der Positiv-Gruppe vorhanden.



**Abbildung 31 Bestand mit Klinik und positiver PCR aus Validierungsseren**  
Auf der x-Achse sind die Serum-Gruppen, auf der y-Achse der S/P%-Wert abgetragen. Die Sterne im Bereich der hohen S/P%-Werte stellen extreme Ausreißer, die Kreise, Dreiecke und Quadrate direkt über den box plots milde Ausreißer dar. Es sind die S/P%-Werte der Positiv-Gruppe abgebildet, wobei links die Seren des Bestandes mit der Klinik aus den Validierungsseren, dann die gesamte Positiv-Gruppe, die gesamte Positiv-Gruppe abzüglich der Bestand-Seren, die Validierungsseren und rechts die Validierungsseren abzüglich der Bestand-Seren dargestellt wurden. Der Grenzwert von 23 S/P% ist als graue horizontale Linie eingezeichnet.

In Abbildung 32 sind alle getesteten Seren in einem box plot dargestellt:

1. Negativ-Gruppe (Gesamtzahl)
2. Verdächtig-Gruppe
3. 1 : 50-Gruppe
4. Positiv-Gruppe (Gesamtzahl)
5. Zusatz-Gruppe

Es ist erkennbar, dass der Großteil der Seren aus den Gruppen Verdächtig-, 1 : 50-, Positiv- und Zusatz-Gruppe über dem Grenzwert von 23,01 S/P% liegen.

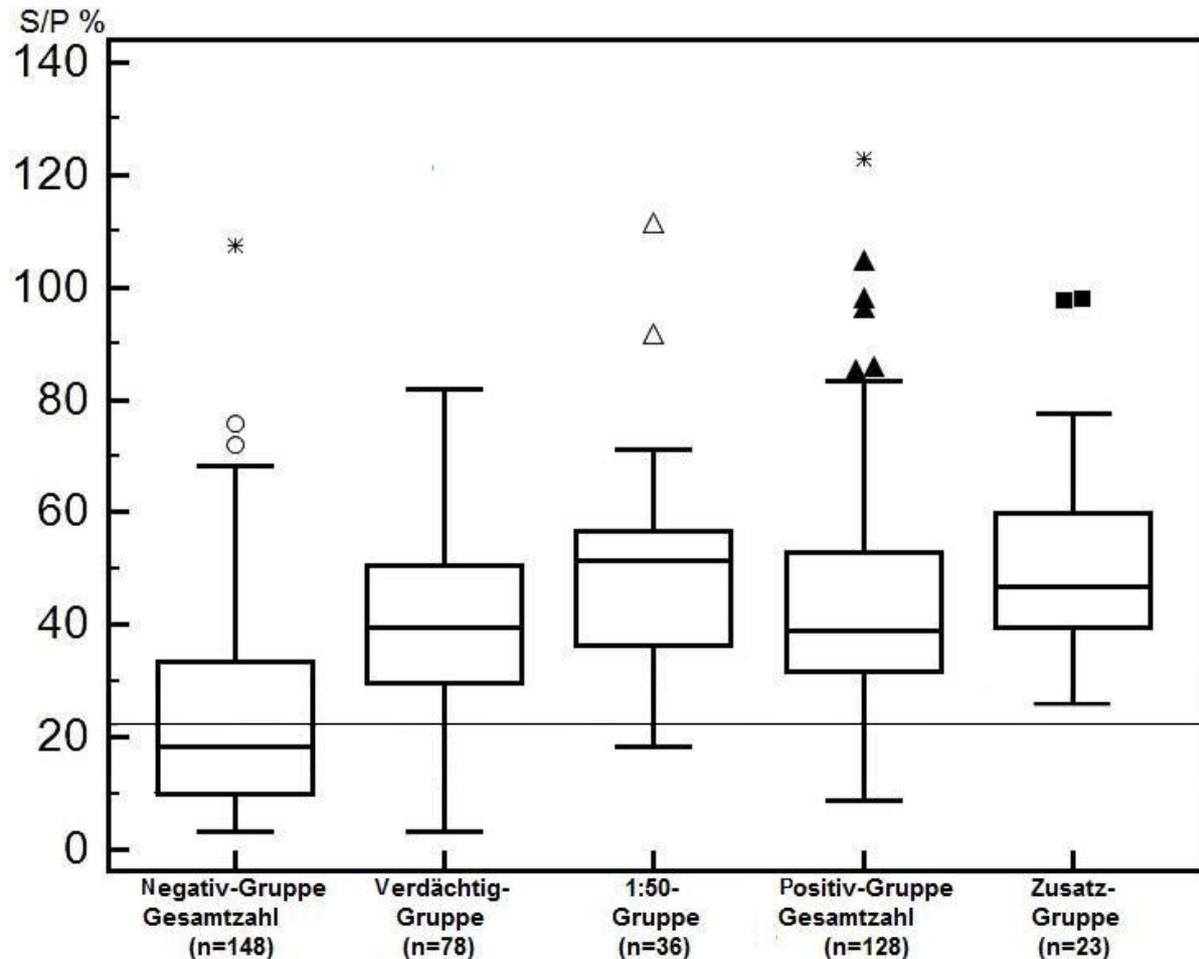
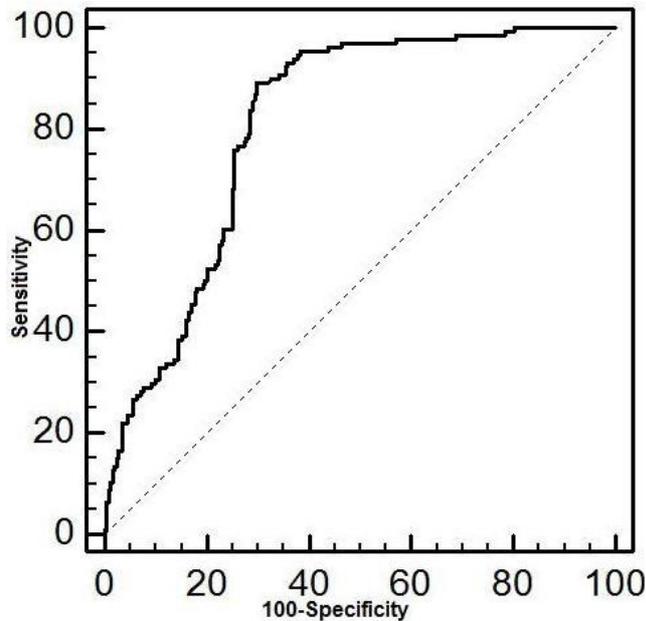


Abbildung 32 Vergleich aller getesteten Seren

Auf der x-Achse sind die Serum-Gruppen, auf der y-Achse der S/P%-Wert abgetragen. Die Sterne im Bereich der hohen S/P%-Werte stellen extreme Ausreißer, die Kreise, Quadrate und Dreiecke direkt über den box plots milde Ausreißer dar. Es sind die S/P%-Werte aller Gruppen abgebildet, wobei links die komplette Negativ-, dann die Verdächtig-, 1 : 50-, Positiv- und rechts die Zusatz-Gruppe dargestellt wurden. Der Grenzwert von 23 S/P% ist als graue horizontale Linie eingezeichnet.

#### 4.6.2 ROC-ANALYSEN

Die Abbildung 33 stellt die ROC-Kurve dar, die aus der Positiv- und Negativ-Gruppe (jeweils Gesamtzahl) berechnet wurde. Der hier ermittelte Grenzwert von 27,07 S/P% liefert eine Sensitivität von 89,06 % und eine Spezifität von 70,16 %. Der AUC beträgt 0,808.

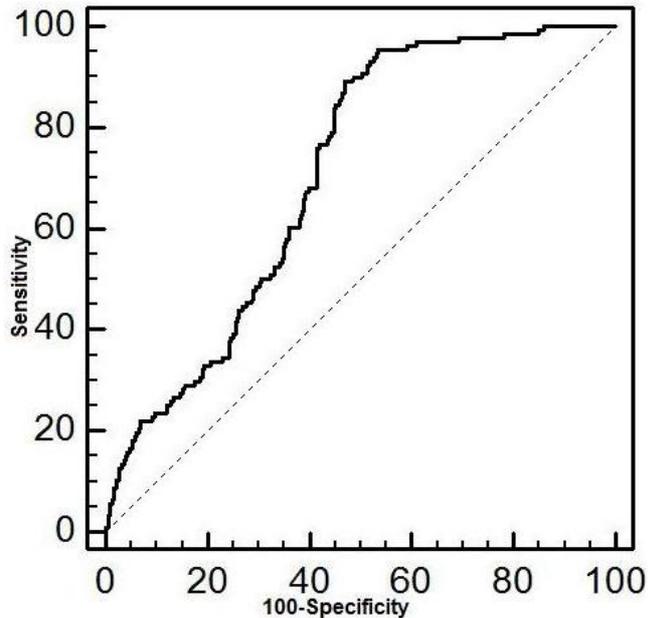


**Abbildung 33 ROC-Kurve aller Proben der Positiv- und Negativ-Gruppe**

Auf der x-Achse ist die Falsch-Positiv-Rate (100-Specificity), auf der y-Achse die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivity) jeweils in Prozent abgetragen. Zur Veranschaulichung ist die  $y = x$  Gerade mit dargestellt. Die ROC-Kurve beruht auf den Ergebnissen der kompletten Negativ- und Positiv-Gruppe.

Folgende ROC-Kurve entsteht, wenn die gesamte Negativ-Gruppe, die Verdächtig-Gruppe und die 1:50-Gruppe in die negative Population einbezogen werden und mit der gesamten Positiv-Gruppe berechnet werden (Abbildung 34).

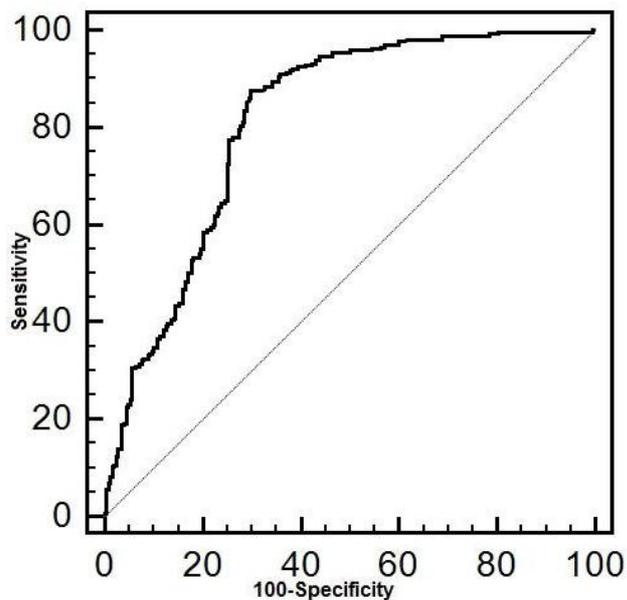
Der ermittelte Grenzwert für diese ROC-Kurve beträgt ebenfalls 27,07 S/P% und liefert eine Sensitivität von 89,06 %; die Spezifität beträgt 53,04 %. Der AUC beträgt 0,707.



**Abbildung 34** ROC-Kurve aller negativ-klassifizierten Proben zu der Positiv-Gruppe

Auf der x-Achse ist die Falsch-Positiv-Rate (100-Specificity), auf der y-Achse die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivity) jeweils in Prozent abgetragen. Zur Veranschaulichung ist die  $y = x$  Gerade mit dargestellt. Die ROC-Kurve beruht auf den Ergebnissen der kompletten Negativ-, Verdächtig- und 1 : 50-Gruppe als negative Population und der Positiv-Gruppe als positive Population.

Unter der Annahme, dass falsch-positive Ergebnisse aufgrund des MATs entstehen, wurde eine ROC-Analyse durchgeführt, in der die gesamte Negativ-Gruppe die negative Population und die vier Gruppen Verdächtig-, 1 : 50-, Positiv- und Zusatz-Gruppe die positive Population bilden (Abbildung 35). Die Abbildung 32 (Vergleich aller getesteten Seren) zeigt, dass bei diesen vier Gruppen 75 % der Proben über dem Grenzwert von 23,01 S/P% liegen.



**Abbildung 35** ROC-Kurve MAT-negative zu restl. Seren

Auf der x-Achse ist die Falsch-Positiv-Rate (100-Specificity), auf der y-Achse die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivity) jeweils in Prozent abgetragen. Zur Veranschaulichung ist die  $y = x$  Gerade mit dargestellt. Die

- Ergebnisse -

**ROC-Kurve beruht auf den Ergebnissen der gesamten Negativ-Gruppe als negative Population und der Positiv-, Verdächtig-, 1 : 50- und Zusatz-Gruppe als positive Population.**

Der ermittelte Grenzwert für diese ROC-Kurve beträgt ebenfalls 27,07 S/P% und liefert eine Sensitivität von 87,55 %; die Spezifität beträgt 70,16 %. Der AUC beträgt 0,813.

Tabelle 27 ist eine Zusammenfassung der untersuchten Grenzwerte mit den unterschiedlichen Serum-Gruppen.

- Ergebnisse -

**Tabelle 27 Grenzwerte mit Sensitivitäten und Spezifitäten**

In den Spalten sind untersuchte Parameter in Abhängigkeit von dem Grenzwert, in den Zeilen die verwendeten Serum-Gruppen für die positive und negative Population dargestellt.

<b>positive Population</b>	<b>negative Population</b>	<b>Grenzwert</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>	<b>AUC</b>
Positiv-Gruppe Validierungs- seren	Negativ- Gruppe Validierungs- seren	23,01 S/P%	95 %	94 %	0,962
Positiv- Gruppe Gesamtheit	Negativ- Gruppe Gesamtheit	27,07 S/P%	89 %	70 %	0,808
Positiv- Gruppe Gesamtheit	Negativ- Gruppe Gesamtheit, Verdächtig- 1:50-Gruppe	27,07 S/P%	89 %	53 %	0,707
Positiv- Gruppe Gesamtheit, Verdächtig- 1:50- Zusatz- Gruppe	Negativ- Gruppe Gesamtheit	27,07 S/P% (optimal)	88 %	70 %	0,813
Positiv- Gruppe Gesamtheit, Verdächtig- 1:50- Zusatz- Gruppe	Negativ- Gruppe Gesamtheit	18,92 S/P% (möglichst hohe Sensitivität)	95 %	54 %	
Positiv- Gruppe Gesamtheit, Verdächtig- 1:50- Zusatz- Gruppe	Negativ- Gruppe Gesamtheit	24,99 S/P% (Sensitivität ≥ 90%, aber Spezifität nicht zu niedrig)	90 %	65 %	
Positiv- Gruppe Gesamtheit, Verdächtig- 1:50- Zusatz- Gruppe	Negativ- Gruppe Gesamtheit	23,01 S/P% (Kompromiss zwischen höherer Sensitivität und hoher Spezifität)	92 %	61 %	

## 5 Diskussion

Die Leptospirose ist eine weltweit verbreitete Erkrankung mit zoonotischem Potential, die sich beim Schwein in Form von sinkender Fertilität, Aborten und lebensschwachen Ferkeln äußert. Der aktuelle Goldstandard der Leptospiren-Diagnostik ist der Mikroagglutinationstest (MAT). Da dieses Verfahren einige Nachteile hat, ist das Ziel dieser Arbeit gewesen, die Verwendbarkeit rekombinant hergestellten LipL32-Antigens in einem ELISA zum Nachweis von Leptospiren-Antikörpern beim Schwein zu untersuchen. Der ELISA in dieser Arbeit soll vor allem ein *proof of concept* darstellen.

### 5.1 Titrationsversuche / ELISA Entwicklung

Im Rahmen der Titrationsversuche konnten die jeweils optimalen Konzentrationen für das Antigen und das Serum bestimmt werden. Für beide Substanzen wurden die Werte ermittelt, bei denen die *signal-to-noise ratio* am höchsten war, das Plateau endete und / oder die OD-Werte der Seren nicht mehr zu hoch lagen. Als Antigen-Konzentration erwies sich die Plattenbeschichtung mit 36,5 ng LipL32 je Kavität als das Optimum, optimal für die Serumkonzentration war die Verdünnungsstufe 1 : 100. Bei der Konjugat-Testung lieferte die Verdünnungsstufe von 1 : 30.000 des Ziege-Anti-Schwein-IgG-Konjugates die geeignetsten Ergebnisse. Der ausschlaggebende Grund für die Wahl dieser Konzentration war die Höhe der OD-Werte. Erst ab einer Verdünnung von 1 : 30.000 lagen die OD-Werte der Negativkontrolle unter 0,3 und die der Positivkontrolle nicht wesentlich über 2,0. Die Berechnung der *signal-to-noise ratio* unterstützte die Auswahl dieser Verdünnung, da die höchsten Werte für die Positivkontrolle und die höher liegende schwach positive Probe bei einer Konjugatverdünnung von 1 : 30.000 liegen.

Die Wahl der Konjugat-Verdünnungsstufe muss allerdings kritisch betrachtet werden. Die graphische Darstellung zeigt, dass kein Plateau vorhanden ist. CROWTHER (2000) empfiehlt bei fehlenden Plateaus im Rahmen von Titrationsen, noch niedrigere Verdünnungen zu verwenden. Da die OD-Werte im Anfangsbereich der Konjugat-Titration (bei den niedrigen Verdünnungen) bereits sehr hoch sind, wurde diese Empfehlung in diesem Kontext als nicht sinnvoll erachtet. Die Wahl der Verdünnungsstufe wurde abhängig von der OD-Wert-Höhe und *signal-to-noise ratio* entschieden und so dieses Problem umgangen.

NAITO et al. (2007) verwendeten für ihren ELISA eine Konzentration von 1,5 ng LipL32 pro Kavität. Das Serum wurde 1 : 500 verdünnt und das Ziege-Anti-Schwein-Konjugat in einer Verdünnung von 1 : 5000 eingesetzt. Die im Vergleich zu dieser Arbeit unterschiedlichen Konzentrationen könnten auf die andere Mikrotiterplatte und Blockmittel, die Naito et al. verwendet haben, zurückzuführen sein. Sicherlich ist auch der Reinheitsgrad des LipL32 ein Grund für die Unterschiede. Durch die

geringere Menge an LipL32 in der Kavität musste die Arbeitsgruppe dann ein weniger stark verdünntes Konjugat einsetzen, als es in dem hier beschriebenen ELISA nötig war.

## **5.2 Validierung des ELISAs / Reproduzierbarkeit**

Im Hinblick auf die Validierungskriterien erzielte der ELISA gute Resultate. Die Reproduzierbarkeit wurde anhand von drei Seren mit unterschiedlich hohen OD-Werten verifiziert. Die Intraassay-Varianz lag zwischen 5,97 % und 12,21 % (je nach OD-Wert der Serumprobe) und die Interassay-Varianz lag je nach OD-Wert zwischen 7,35 % und 10,64 %. Diese Werte entsprechen den häufig verwendeten Richtgrößen kommerzieller Hersteller. Bei einem Test, der reproduzierbare Ergebnisse bringt, sollte der Variationskoeffizient  $\leq 10\%$  sein; 10-20 % müssen allerdings in Kauf genommen werden und sind laut OIE Manual noch im akzeptablen Bereich (OIE 2012b). Die Reproduzierbarkeit zeigt wie stabil der Test läuft und ist ein wichtiges Kriterium um zu bestimmen, wie stark die OD-Werte der Proben von Tag zu Tag bzw. innerhalb einer Platte schwanken.

## **5.3 Validierung des ELISAs / Grenzwert der Validierungsseren**

Der Grenzwert für den ELISA wurde anhand einer Gruppe aus 50 juvenilen (Ferkel) und 50 adulten MAT-negativen Tieren sowie einer Gruppe von 100 MAT-positiven Schweinen bestimmt. Als Referenztest wurde der MAT definiert, da dieser den momentanen Goldstandard der Leptospiren-Diagnostik darstellt. Anhand einer ROC-Analyse mit diesen 200 Seren wurde 23,01 S/P% als Grenzwert gewählt, da bei diesem Wert die höchste Spezifität und zugleich höchste Sensitivität von 94 % bzw. 95 % vorlag. Höhere oder niedrigere Grenzwerte lieferten zwar eine höhere Sensitivität oder Spezifität, jedoch immer auf Kosten des anderen Parameters. Dies sind relativ gute Ergebnisse. Kommerzielle Testsysteme liefern häufig Spezifitäten und Sensitivitäten im Bereich von 95-99 %.

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ist mit einem Wert von 0,890 bei der Untersuchung der qualitativen Ergebnisse (negativ / positiv) des ELISAs und des MATs hoch. Dies ist ein zufriedenstellender Wert, da der Rangkorrelationskoeffizient einen Wert zwischen null und eins (bzw. minus eins) annehmen kann. Dagegen ist der Rangkorrelationskoeffizient in Bezug auf die Höhe des S/P%-Wertes zu dem entsprechenden MAT-Titer mit 0,213 sehr schwach. Da sich 50 % der positiven Proben unabhängig von ihrem MAT-Titer in einem Bereich von 30 – 48 S/P% befinden, ist dieses schlechte Ergebnis nicht erstaunlich. Eine Erklärung dafür ist, dass im ELISA nur IgG-Antikörper gegen LipL32 gemessen werden, im MAT aber Antikörper gegen LPS der Leptospiren (AVIAT et al. 2009). Somit ist die Korrelation der qualitativen Ergebnisse für die 200 Validierungsseren gut, die der quantitativen Ergebnisse dagegen schlecht. Da der ELISA als Screening-Test verwendet wird,

dürfen Seren, die im MAT verifiziert werden sollen, nicht aufgrund ihrer S/P%-Wert-Höhe ausgewählt werden. Es muss stattdessen eine repräsentative Anzahl aller positiver Proben getestet werden.

#### **5.4 Anwendung des Grenzwertes auf die restlichen Seren**

In dem zweiten Teil der Arbeit wurden 313 Seren mit dem entwickelten ELISA im Vergleich zum MAT untersucht. Ein Problem stellte dabei die geringe Zahl an MAT-positiven Seren dar.

Die Auswertung erfolgte entsprechend der Einteilung aufgrund der MAT-Ergebnisse aus Tabelle 6 „Übersicht Gruppierung der Seren“ in die Gruppen *negativ*, *verdächtig*, *1 : 50*, *positiv* und *Zusatz*. Die S/P%-Werte des ELISAs entsprachen nicht dieser Einteilung. Nur 58 der 148 MAT-negativen Seren befanden sich unter dem festgelegten Grenzwert von 23,01 S/P%. Auffällig war, dass 35 dieser korrekt als negativ untersuchten Proben aus Betrieben mit hohem Gesundheitsstatus stammten und nur 4 Proben aus solchen Betrieben über dem Grenzwert lagen und somit als falsch positiv beurteilt wurden. Die restlichen 109 MAT-negativen Seren stammten aus Routineeinsendungen, bei denen aufgrund klinischer Erscheinungen verschiedene Krankheiten abgeklärt werden sollten. In diesem Zusammenhang muss auch kritisch betrachtet werden, dass 75 % der MAT-negativen Validierungsseren (die alle aus Betrieben mit hohem Gesundheitsstatus stammten) unter 15 S/P% liegen, während von den restlichen 148 MAT-negativen Seren aber 75 % einen S/P% von über 18 haben. Ein Grund könnte sein, dass es bei den restlichen 148 MAT-negativen Seren im ELISA zu (partiellen) Kreuzreaktionen mit Antikörpern anderer Infektionen gekommen ist, da sich die Tiere in Betrieben mit hohem Infektionsdruck vermehrt mit verschiedenen Erregern auseinandersetzen müssen. Ein anderer Grund könnte sein, dass der MAT nicht sensitiv genug war, um Leptospiren-Antikörper zu detektieren (eine ausführliche Diskussion zu diesem Thema ist in Kapitel 5.5 Bewertung der unterschiedlichen Ergebnisse in MAT und ELISA).

Da im Rahmen von MAT-Untersuchungen häufig die Frage aufkommt, welche Bedeutung eine geringe Anzahl von Agglutinaten (verdächtige Seren) bzw. Titer von 1 : 50 haben, wurden die Seren, bei denen dies auftrat, getrennt von der Negativ-Gruppe betrachtet. Streng genommen müssen solche Seren aufgrund des Grenzwertes der OIE (2012a) aber als negativ klassifiziert werden. Für die beiden Gruppen wurde ein ähnliches Bild beobachtet wie bei der Negativ-Gruppe: nur 13 der 78 Proben der Verdächtig-Gruppe sind im ELISA negativ. 75 % der Seren haben S/P%-Werte von über 30. Ebenso verhält es sich bei den Proben mit einem Titer von 1 : 50, bei denen nur 2 der 36 Proben im ELISA negativ sind. 75 % der Seren liegen über 37 S/P%. Diese Werte erhärten die Zweifel an der Sensitivität des MATs.

Die Zusatz-Gruppe wurde getrennt von den anderen Seren untersucht, da hier zuerst eine PCR-Untersuchung im Rahmen der Abort-Abklärung durchgeführt wurde und

dann zur Bestätigung der PCR-Untersuchung nachträglich Seren in das Labor eingeschickt wurden. Diese waren im MAT negativ. Da die Interpretation dieser Ergebnisse schwer möglich war, wurden die Seren im Rahmen der Dissertation ebenfalls in dem ELISA untersucht. Auch diese 23 Proben, die in dem MAT negativ, in der PCR aber positiv waren, reagierten im ELISA mit hohen S/P%-Werten. 75 % der Proben liegen bei über 40 S/P%. Dieses ELISA-Ergebnis bietet im Zusammenhang mit dem positiven PCR-Ergebnis der Organmaterialien einen sinnvolleren diagnostischen Interpretationsansatz als die negativen Ergebnisse des MATs. Da die Seren auch in einem Dot-Blot mit LipL32 als Antigen reagierten, ist hier die Wahrscheinlichkeit groß, dass es sich um echt positive Proben handelte und um ein falsch negatives Ergebnis des MATs. Es könnte zum Beispiel sein, dass die infizierende Serovar nicht in dem MAT-Panel enthalten war.

Die 28 MAT-positiven Proben der restlichen Seren haben insgesamt höhere S/P%-Werte als die 100 positiven Validierungsseren. Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Höhe der S/P%-Werte der beiden Gruppen festgestellt werden. Während 75 % der Validierungsseren über 29 S/P% liegen, liegen 75 % der restlichen MAT-positiven Proben über 40 S/P%. Eine Probe liegt unter dem Grenzwert und wurde somit als falsch negativ von dem ELISA gewertet. Diese Ergebnisse waren unerwartet, denn für die Validierungsseren wurden gezielt die Seren verwendet, die aus einem Bestand stammten, in dem Leptospirose nachweislich ausgebrochen war und die Seren haben zum Teil sehr hohe MAT-Werte mit 1 : 6.400. Die 28 MAT-positiven Proben dagegen haben MAT-Titer von 1 : 100 bis 1 : 400 und stammten aus Einsendungen, zu denen keine Informationen über Klinik des Bestandes oder *Leptospira*-PCR-Nachweise vorlagen. Außerdem waren es häufig nur eine oder zwei Proben der Einsendung, die in dem MAT reagierten. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es bei den restlichen Seren in dem ELISA zu Kreuzreaktionen mit anderen Antikörpern gekommen ist. Allerdings gab es in dem Betrieb mit dem gesicherten Leptospiren-Ausbruch ebenfalls eine Schweineinfluenza H1N1-Belastung. Es könnte zum Beispiel aber auch sein, dass die Serovar des positiven Bestandes weniger immunogen ist oder die Infektion länger zurück liegt, so dass der Antikörperspiegel bereits wieder absinkt. Ein anderer Erklärungsansatz könnte sein, dass *L. Bratislava*-Titer höhere ELISA S/P%-Werte hervorrufen. Eine nähere Betrachtung zeigte, dass die restlichen positiven Seren hauptsächlich *L. Bratislava*-MAT-Titer aufwiesen, während die infizierende Serovar in dem positiven Betrieb *L. Pomona* war. Es ist zu vermuten, dass die infizierende Serovar einen gewissen Unterschied in den S/P%-Werten macht, obwohl LipL32 ein Serovar-übergreifendes Antigen ist.

## **5.5 Bewertung der unterschiedlichen Ergebnisse in MAT und ELISA**

Es gibt verschiedene mögliche Erklärungsansätze, warum Proben im MAT negativ, aber im ELISA positiv sind. Es könnte sein, dass der MAT ein schlechter Goldstandard mit niedriger Sensitivität ist, und daher Proben im MAT als negativ beurteilt werden und sich somit im ELISA als scheinbar falsch positiv darstellen. So betrachten auch LEVETT (2001) und MCBRIDE et al. (2005) die Sensitivität von MAT-Untersuchungen kritisch. Das Grundproblem ist dabei die subjektive Auswertung des auf einer Agglutination beruhenden Testes. Die Entscheidung, ob eine Probe einen Titer von 1 : 800 oder 1 : 1600 hat, ändert nichts an der Tatsache, dass die Probe positiv ist. Anders ist es bei der Entscheidung, ob die Probe noch als 1 : 50 beurteilt werden muss, oder ob sie schon 1 : 100 positiv ist. Je nach Labor, Auswerter, persönlicher Tagesform und der Dichte der Leptospiren-Kultur kann diese Entscheidung erheblich schwanken.

In diesem Zusammenhang muss auch hinterfragt werden, ob 1 : 100 ein guter, verlässlicher Cut-off des MATs ist. 1 : 100 wird in der Humanmedizin als Cut-off häufig verwendet (OIE 2012a) und wurde auf die Tiermedizin übertragen. Eine statistische Auswertung und Analyse dieses Grenzwertes in Bezug auf die epidemiologische Lage der deutschen Schweinepopulation wurde bisher aber nicht durchgeführt.

Eine weitere Ursache für die niedrige Sensitivität des MATs (und somit Proben, die im MAT negativ sind aber in dem ELISA z.T. deutliche S/P%-Werte haben), könnte die Abhängigkeit von dem MAT-Panel im Vergleich zu dem Serovar-unabhängigen Antigen des ELISAs sein. Wenn ein Tier mit einer Serovar infiziert ist, die nicht mit dem Panel der MAT-Stämme (kreuz-)reagiert, wird diese Infektion nicht erkannt und die Probe wird als negativ beurteilt. Dieses Problem konnte beispielsweise in dem Ringversuch der International Leptospirosis Society (ILS) 2012 beobachtet werden. Drei der als negativ beurteilten Kaninchenseren enthielten Antikörper gegen Serovare, die üblicherweise in Deutschland verwendeten MAT-Panels nicht enthalten sind. Es handelte sich hierbei um in Deutschland exotische und selten vorkommende Serovare, und die verwendeten Serovare kreuzreagierten anscheinend nicht mit diesen Serovaren. Dieses Phänomen könnte auch auf die hier getesteten Schweineseren zutreffen.

Ein weiterer Faktor in der Beurteilung der MAT- und ELISA-Ergebnisse stellt der Probenentnahme-Zeitpunkt dar (AVIAT et al. 2009). Zu den hier untersuchten Proben liegen keine Informationen über die Klinik der Tiere vor bzw. ob die Proben in einer akuten oder chronischen Phase der Krankheit entnommen worden sind. Der Zeitpunkt der Probenentnahme ist für die Bewertung interessant, da die Antikörperspiegel im Verlauf der Erkrankung unterschiedlich hoch sind (OIE 2012a, WHO 2003) und der MAT chronisch infizierte Tiere meistens nicht detektiert, weil die Titer zu niedrig sind.

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass es sich bei dem Antigen des MATs um vitale Leptospiren-Stämme handelt, die vor langer Zeit aus unterschiedlichsten Tierarten isoliert worden sind. Das hier verwendete MAT-Panel enthält Serovare aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung, die zwar gut charakterisiert sind, aber eventuell nicht in Deutschland isoliert worden sind. Die OIE empfiehlt, in MAT-Panels immer auch regional isolierte Serovare zu verwenden. Leider ist dies nicht einfach umzusetzen, da durch die langwierige schwere Anzucht von Leptospiren nur sehr selten Leptospiren insbesondere aus dem Schwein isoliert und angezüchtet werden konnten.

Kreuzreaktionen im ELISA stellen eine weitere Möglichkeit dar, wie es zu negativen MAT- und positiven ELISA-Ergebnissen kommen könnte. Insbesondere Tiere aus Betrieben mit undefiniertem Gesundheitsstatus müssen sich häufig mit verschiedensten viralen und bakteriellen Erregern auseinandersetzen. Dies ist sicherlich der Grund, weshalb die Negativ-Gruppe der restlichen Seren, die zum Großteil aus Beständen ohne definiertem Gesundheitsstatus stammen, höhere S/P%-Werte haben als Tiere aus Beständen mit hohem Status. Der Unterschied zwischen den S/P%-Werten negativer Ferkel und adulter Tiere kann auch einen Hinweis auf potentielle Kreuzreaktionen liefern. Zu Kreuzreaktionen von LipL32 mit anderen Antikörpern beim Schwein ist allerdings wenig bekannt. BOMFIM et al. (2005) untersuchten Rinderseren, die Antikörper gegen Babesien, Anaplasmen und Brucellen enthielten, in einem LipL32-ELISA. Es kam zu keinen Kreuzreaktionen. FLANNERY et al. 2001 konnten zeigen, dass es zu keinen Kreuzreaktionen mit den beim Menschen relevanten Differentialdiagnosen Denguefieber und Hepatitis kommt. Kreuzreaktionen mit anderen Spirochäten wie z.B. *Borrelia* und *Treponema* konnten dagegen nicht ausgeschlossen werden. Die Relevanz dieser Spirochäten kann beim Schwein als gering eingeschätzt werden; anders könnte es dagegen mit Brachyspiren aussehen, deren (apathogene) Spezies häufig Darmbesiedler sind. Leider war nicht bekannt, ob in den Betrieben, deren Seren in dieser Arbeit verwendet wurden, in vorherigen Untersuchungen Brachyspiren nachgewiesen werden konnten. Der Frage, in wie weit Antikörper weiterer Infektionen im ELISA falsch positive Ergebnisse hervorrufen, konnte experimentell ebenfalls nicht nachgegangen werden. Der Grund war das nicht verfügbare definierte Probenmaterial, also Proben, die keine Leptospiren-Antikörper aber Antikörper anderer Infektionen enthielten. Die Seren aus Beständen mit nicht definiertem Gesundheitsstatus enthielten zwar Antikörper gegen Krankheiten wie APP oder PRRS, aber allein das negative MAT-Ergebnis einzelner eingesandter Proben wurde nicht als ausreichendes Kriterium für eine Leptospiren-Freiheit anerkannt. Da es noch keinen Brachyspiren-ELISA gibt, standen entsprechende Tests zur Abklärung von Brachyspiren-Infektionen auch nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund musste auf die Abklärung potentieller Kreuzreaktionen durch Antikörper anderer Krankheiten verzichtet werden.

Von den hier untersuchten Proben sind 25 % positiv im MAT. Entsprechend STRUTZBERG-MINDER (2008) liegt die Prävalenz der Leptospirose des Schweines in Deutschland aber bei 51 %. Dieser Prozentsatz kann aus unterschiedlichen Gründen variieren. Vor allem muss bedacht werden, dass die hier erzeugten Ergebnisse nicht eine repräsentative Stichprobe zur Bestimmung einer Prävalenz darstellen. Zum einen stammt ein Großteil der positiven Seren aus nur einem Betrieb. Diese Seren sind nur zu einem geringen Teil im Rahmen von Routineuntersuchungen (ca. 10 Seren pro Einsendung) eingeschickt worden. Der Tierarzt entnahm auf meinen Wunsch hin 60 zusätzliche Serumproben. Dadurch ist die Anzahl der positiven Proben nicht mehr repräsentativ. Auf der anderen Seite ist auch nicht bekannt, was für Bestände in der Studie von Strutzberg-Minder untersucht wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten Seren stammen überwiegend von einer Zuchtorganisation, die sehr hohe Gesundheitsanforderungen an ihre Betriebe stellt. Dadurch kann sich auch der Anteil der negativen Seren im Vergleich zu der genannten Studie verschieben. Ein weiterer Grund könnte das kleinere MAT-Panel sein, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Das durch die Serovare *L. Australis* und *L. Autumnalis* sowie *L. Hardjo* eine wesentlich höhere Rate an positiven Seren vorliegen würde, ist jedoch sehr unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zu den MAT-Ergebnissen sind 66 % der 513 Seren im ELISA positiv. Dieser höhere Prozentsatz kann an Kreuzreaktionen des ELISAs (und somit falsch positiven Ergebnissen) oder an der eher schlechten Sensitivität des MATs (und somit richtig positiven Ergebnissen des ELISAs) liegen. Diese möglichen Ursachen wurden in diesem Kapitel bereits angesprochen. Außerdem handelt es sich bei den in diesem ELISA ermittelten Werten nicht um eine Prävalenz. Um genauer zu bestimmen, wie hoch die Prävalenz der Leptospirose des Schweines in Deutschland ist, müssten statistisch auswertbare Probenanzahlen von unterschiedlichen Betrieben aus verschiedenen Regionen in Deutschland genommen werden. Es müsste festgelegt werden, wie mit einzelnen positiven Proben aus einem Bestand verfahren wird, also ob die Prävalenz auf Bestandsebene oder auf Tierebene bestimmt wird. Außerdem müsste entschieden werden, welche Tiergruppen untersucht werden müssen, inwieweit klinisch erkrankte Tiere mit aufgenommen und ab welchem MAT-Titer Proben als positiv bewertet werden. Es ist sicherlich sinnvoll, PCR-Untersuchungen parallel durchzuführen. Die Proben könnten in mehreren Laboren untersucht werden. Da in den Ringversuchen der ILS hyperimmunisierte Kaninchenserum verwendet werden, wäre es interessant zu erfahren, wie groß die Unterschiede zwischen verschiedenen Laboren bei echten Feldseren sind.

## 5.6 Auswahl der (Validierungs-) Seren

Basis für die Auswahl der Validierungsseren war die Gruppierung der Seren in verschiedene Kategorien (siehe Tabelle 6 "Übersicht Gruppierung der Seren"), die entsprechend des Vorberichts zu den eingesandten Seren erfolgte. Das Ziel war, zwei möglichst gut definierte Gruppen für die Validierungsseren zu erhalten. Da Tiere aus Betrieben mit hohem Gesundheitsstatus die größte Wahrscheinlichkeit hatten, keine Leptospiren-Antikörper oder kreuzreagierende Antikörper aufgrund anderer Krankheiten zu haben, wurden diese gezielt als Negativ-Gruppe ausgewählt. Da nicht genügend Seren solcher adulten Tiere verfügbar waren, wurden Ferkel (als Gruppe mit geringem Antikörper-Gehalt) und Adulte (als die eigentliche Zielgruppe des ELISAs) verwendet.

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den S/P%-Werten der Adult-Seren der Validierungsseren und der restlichen negativen Adult-Seren, so dass keine Konsequenz bezüglich des Grenzwertes in Abhängigkeit von der Seren-Wahl dieser Tiergruppe bestehen sollte. Zwischen den Ferkel- und Adult-Seren liegt ein signifikanter Unterschied. Dies spiegelt sich auch darin, dass 75 % der Ferkel in einem S/P%-Bereich liegen, in dem nur die unteren 25 % der Adult-Seren sind.

Die S/P%-Werte der Seren aus Beständen mit hoher Gesundheit weisen einen signifikanten Unterschied zu den S/P%-Werten von Seren aus Beständen ohne definiertem Gesundheitsstatus auf. Dadurch muss kritisch hinterfragt werden, ob in die Negativ-Gruppe der Validierungsseren auch Seren aus Beständen mit nicht definierter Gesundheit aufgenommen hätten werden sollen. Da diese Seren aber nur aufgrund des MAT-Ergebnisses in die Negativ-Gruppe eingeteilt wurden und keine weiteren Kenntnisse in Bezug auf Klinik oder anderer diagnostischer Untersuchungen vorlagen, sind sie nicht verwendet worden. Die Gefahr, kreuzreagierende oder echt positive Seren einzusetzen, schien zu groß. Der signifikante Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen bestätigt diese Einschätzung. Die Frage bleibt, ob es wichtiger ist, sicher negative Tiere in der Negativ-Gruppe der Validierungsseren zu haben, oder ob Tiere mit einbezogen werden sollten, die nicht sicher negativ sind, allerdings die (klinisch) negative Grundpopulation der Schweine in Deutschland darstellen.

Da nur bei einem Bestand ein gesicherter Leptospirose-Ausbruch vorlag, wurden dessen Seren sowie 11 Seren, die zumindest im MAT positiv waren, für die Positiv-Gruppe verwendet. Im Idealfall sollten Seren verschiedener Betriebe mit unterschiedlichen infizierenden Serovaren verwendet werden. Da es sich hier um ein Pilotprojekt handelte und nur limitierte Quellen zum Erhalt von Seren vorhanden waren, lag die Priorität für die positive Validierungs-Gruppe auf sicher positiven Seren.

Um den positiven und negativen prädiktiven Wert errechnen zu können, muss die Anzahl der Validierungsseren der Prävalenz entsprechen. Da laut STRUTZBERG-

MINDER (2008) eine Prävalenz von 51 % in deutschen Betrieben herrscht, wurden jeweils 100 negative und 100 positive Seren für die Validierung verwendet. Außerdem sollten noch zusätzliche positive Seren für den zweiten Teil dieser Arbeit vorhanden sein, in dem die Überprüfung der Verwendbarkeit des Grenzwertes, der mit den Validierungsseren ermittelt wurde, erfolgte.

Das Serum, das als Positivkontrolle in dem ELISA verwendet wurde und zur Bestimmung der optimalen Konzentrationen der ELISA-Bestandteile genutzt worden ist, stammt aus einem Impfversuch. Das Serum reagiert deutlich im ELISA und auch im Dot-Blot (Daten nicht dargestellt). Der MAT-Titer ist jedoch mit einem Titer von 1 : 200 nur eine Titerstufe über dem Grenzwert. Die stark unterschiedlichen Reaktionen dieses Serums im ELISA bzw. im MAT waren unerwartet. Anscheinend reagieren Impfantikörper in dem MAT nicht so stark wie in dem ELISA. Allerdings haben auch andere Autoren bereits von niedrigen Impftitern im MAT berichtet. So wiesen Ferkel, die CHAUDHARY et al. (1966) mit *L. Pomona* impften, knapp drei Wochen später nur MAT-Titer zwischen 1 : 16 und 1 : 256 auf. MIDENCE et al. (2012) untersuchten 20 Hunde im MAT über acht Wochen nach Impfung mit zwei verschiedenen kommerziellen Impfstoffen, die beide *L. Pomona* enthalten. Die *L. Pomona*-Titer lagen durchschnittlich zwischen 1 : 200 und 1 : 400 und nur zu einem Zeitpunkt bei 1 : 600. Auch hier wurden (zumindest für *L. Pomona*) relativ niedrige Titer nach der Impfung gemessen.

### **5.7 Untersuchung alternativer Grenzwerte**

Entsprechend der unterschiedlichen Seren-Gruppierungen, die in den verschiedenen ROC-Analysen verwendet wurden, ändert sich der Grenzwert sowie die Sensitivität und Spezifität des ELISAs.

Um den Einfluss des Alters auf den Grenzwert zu untersuchen, wurden die 50 Adult-Seren mit den 100 MAT-positiven Seren und die 50 Ferkel-Seren mit den 100 MAT-positiven Seren in zwei getrennten ROC-Analysen untersucht. Es stellte sich heraus, dass für die Adult-Seren derselbe Grenzwert wie bei der ROC-Analyse der gesamten Validierungsseren optimal ist. Bei gleichbleibender Sensitivität sinkt jedoch die Spezifität von 94 % auf 88 %. Allerdings ist es für einen Screening-Test (der auf die Freiheit der Tiere von einer Krankheit testet) wichtiger, eine möglichst geringe Anzahl an falsch negativen Proben zu haben (d.h. eine hohe Sensitivität), da falsch positive Proben in einem Bestätigungstest kontrolliert werden können. Im Vergleich dazu steigt die Spezifität des ELISAs in der ROC-Analyse der Ferkel-Seren bei der Verwendung eines Grenzwertes von 20,68 S/P% auf 100 %. Der ELISA ist bei der Verwendung von Ferkel-Seren in Bezug auf falsch positive Proben also perfekt.

Auch NAITO et al. (2007) konnten einen Unterschied zwischen jüngeren und älteren Tieren feststellen. Sie untersuchten ca. 200 Sauen und 700 Tiere aus der Mast, wobei 27 % der Sauen im MAT positiv waren und 9 % der Tiere aus der Mast.

Innerhalb der Gruppe der Mast-Tiere konnten sie feststellen, dass die Prävalenz bei den 1-3 Monate alten Tieren niedriger war als bei den 4-6 Monate alten Tieren. Als Grund für diese Beobachtung nahmen sie an, dass jüngere Tiere häufiger mit Antibiotika behandelt werden als Mastschweine mit 4-6 Monaten oder Sauen, und durch diese „prophylaktische“ Antibiotika-Einnahme bei den jungen Tieren keine Infektionen und dementsprechend keine Antikörperbildung stattfindet. Die Ergebnisse des LipL32-ELISAs wurden allerdings nicht nach den Altersgruppen gegliedert, so dass kein direkter Vergleich mit den hier dargestellten Ergebnissen möglich war.

Ein Grenzwert, der uneingeschränkt für den ELISA gültig ist, kann erst festgelegt werden, wenn die Sensitivität des MATs eindeutig belegt ist. Sollte der MAT sensitiv sein und 1 : 100 erweist sich als der ideale cut-off für deutsche Schweineseren, so liefert der ELISA für alle getesteten Seren bei einem Grenzwert von 27,07 S/P% eine schlechte Spezifität von 53 %, auch wenn die Sensitivität bei 89 % liegt. Diese Werte können mit der Studie von NAITO et al. (2007) verglichen werden, deren ELISA mit einer Sensitivität von 79 % und einer Spezifität von 63 % auch keine überzeugenden Ergebnisse lieferte. Zur besseren Vergleichbarkeit der beiden ELISAs wurde die Spezifität ermittelt, die bei einer Sensitivität von 79 % bei dem hier erarbeiteten ELISA vorliegen würde: Sie läge bei 55 % und damit unter der Spezifität von NAITO. Unter diesen Bedingungen wäre der ELISA nicht in der Routine-Diagnostik verwendbar.

Doch in der Annahme, dass die Sensitivität des MATs schlecht bzw. umstritten ist, stellt sich der ELISA besser dar. Geht man davon aus, dass jede Form von Agglutinationen im MAT auf Leptospiren-Antikörper zurückzuführen ist, so liegt die Spezifität des ELISAs bei 70 %. Nur durch Verschiebung des Grenzwertes wäre es möglich, die Spezifität auf Kosten der Sensitivität aufzuwerten. Da insbesondere die Seren aus dem Bestand mit dem Leptospirose-Ausbruch erstaunlich niedrige S/P%-Werte haben, liegt die Sensitivität des ELISAs aber nur bei 88 %. Für einen Screening-ELISA wären Werte unter 90 % Sensitivität nicht wünschenswert, wodurch diese Möglichkeit nicht in Betracht gezogen werden kann. Wenn sich allerdings die Tendenz von höheren S/P%-Werten der restlichen positiven Seren in der Schweinepopulation widerspiegelt, wäre vermutlich die Trennung negativ / positiv klarer und eine bessere Sensitivität bzw. Spezifität die Folge. Eine größere Anzahl an positiven Seren aus unterschiedlichen Beständen wäre für weiterführende Untersuchungen daher nützlich.

Geht man davon aus, dass jede Agglutination im MAT ein Hinweis für ein positives Serum ist, so hat der ELISA unter Einbezug aller 513 Seren bei einem möglichen Grenzwert von 23,01 S/P% eine Sensitivität von 92 % und eine Spezifität von 61 %. Während die Sensitivität vielleicht noch akzeptabel ist, ist die Spezifität sehr niedrig. In der Literatur gibt es keine vergleichbaren ELISA-Auswertungen, bei denen jede Agglutination als positiv gewertet wurde, so dass dieser Interpretationsansatz nicht in

Bezug auf andere Erfahrungen gesetzt und der ELISA vergleichend bewertet werden konnte.

Das Ergebnis des ELISAs ist in Abhängigkeit von den getesteten Seren zu sehen. Bei dem Grenzwert von 23,01 S/P% wurden aus der Gruppe der MAT-negativen Proben 1,5 % der Ferkelseren und 11,8 % der Adultseren aus Beständen mit hoher Gesundheit als positiv bewertet. Seren aus dem Bestand mit dem Leptospirose-Ausbruch wurden zu 94,3 % und die restlichen 39 positiven Seren zu 97,4 % als positiv bewertet. Diese Zahlen sind für Routineuntersuchungen nicht schlecht und zeigen, dass der ELISA sehr gut für Ferkelseren verwendet werden kann. Die Seren, die hauptsächlich MAT-Titer gegen *L. Bratislava* aufweisen, scheinen auch in dem ELISA gut detektiert zu werden. Die Seren mit *L. Pomona*-Titern werden schlechter detektiert, wobei hier die Ursache eventuell auch eine länger zurückliegende Infektion der untersuchten Tiere sein könnte. Adultseren aus Beständen mit hoher Gesundheit haben eine höhere Wahrscheinlichkeit, ein falsch-positives Ergebnis zu haben. Allerdings ist diese im Vergleich zu den Seren aus Beständen ohne bekanntem Gesundheitsstatus geringer. Bei Seren aus Beständen ohne definiertem Gesundheitsstatus, die im MAT keine Agglutinationen aufwiesen, sind 78,8 % der Seren positiv. Für solche Seren ist der ELISA, wenn die Sensitivität des MATs unangefochten ist, im Prinzip fast nicht brauchbar.

Die Frage, ob andere Seren als die Validierungsseren hätten verwendet werden sollen, ist nicht eindeutig zu klären. Natürlich ist ersichtlich, dass sich der ELISA mit anderen Seren nicht mit so einer guten Sensitivität / Spezifität von > 90 % darstellt. Allerdings soll in dieser Arbeit auch kein fertig entwickelter ELISA produziert werden, sondern die Verwendbarkeit von LipL32 untersucht werden. Für diese gilt, dass Tiere mit hohem Gesundheitsstatus, unabhängig von dem Alter, in diesem ELISA mit einem relativ verlässlichen Ergebnis untersucht werden können. Wenn Proben mit einem MAT-Titer  $\geq 1 : 50$  detektiert werden sollen, so eignet sich dieser ELISA ebenfalls. Seren aus Beständen mit undefiniertem Gesundheitsstatus können in diesem ELISA nur eingeschränkt beurteilt werden.

Um die Sensitivität und Spezifität des ELISAs zu erhöhen, könnte ein verdächtiger Bereich eingeführt werden. Insbesondere um eine höhere Spezifität zu erreichen, müsste dieser Bereich relativ groß sein. Wenn aber beispielsweise der verdächtige Bereich zwischen 20 und 46 S/P% liegt, dann wären 80 Seren aller MAT-positiven Proben im verdächtigen Bereich. Das entspricht 62,5 % der 128 MAT-positiven Seren. Von den gesamten 513 Seren wären 223 Seren in dem verdächtigen Bereich (also 43,5 % der Gesamtzahl). Trotzdem würden noch 94 Proben der Seren mit MAT-Titern unter 1 : 100 falsch positiv sein (24,4 %), wobei es sich dabei vor allem um Seren aus der Verdächtig- und 1 : 50-Gruppe handelt. Solche Ergebnisse sind in einem Routine-ELISA nicht verwendbar und würden immer wieder in Interpretationsnöte führen, weshalb in dieser Arbeit kein verdächtiger Bereich für den ELISA eingeführt worden ist.

Ein sinnvollerer Ansatz, um insbesondere die Spezifität des ELISAs zu erhöhen, ist der Abgleich positiver Ergebnisse mit dem MAT. Es ist üblich, einen leicht und schnell durchführbaren Test mit hoher Sensitivität als Screening-Test zu verwenden und positive Reagenten in einem alternativen Testverfahren abzuklären. Eine gute Stichprobengröße, unter der Annahme einer unbekanntem Prävalenz, wären mindestens 28 Tiere eines Bestandes. In dieser Stichprobengröße ist es unwahrscheinlich, dass ein Leptospirose-Ausbruch nicht festgestellt wird, auch wenn eventuell einzelne falsch negative Ergebnisse vorliegen. Die positiven Reagenten werden dann in einem zweiten Schritt in dem MAT abgeklärt und die Ergebnisse können in Abhängigkeit von der Sensitivität des MATs interpretiert werden.

### **5.8 Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen**

Interessant wäre es, in weiteren Arbeiten zu untersuchen, ob ein Peptid vielleicht noch spezifischer reagieren würde als das Protein LipL32. LOTTERSBERGER et al. (2009) konnten bereits Epitope auf LipL32 identifizieren. Es wäre sinnvoll zu überprüfen, ob diese Epitope in Form eines Peptides in einem ELISA verwendbar wären. Der Vorteil von solchen kleinen Peptiden im Vergleich zu Proteinen als Antigen ist, dass zum einen die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass andere Antikörper aus der Probe mit unspezifischen Bereichen des Proteins kreuzreagieren, und zum anderen insgesamt mehr Antikörper in einer Kavität binden können (CROWTHER 2000). AVIAT et al. (2009) haben so ein Peptid aus LipL32 in einem humanen ELISA getestet und eine 100 %ige Spezifität festgestellt.

Auch andere Antigene wie zum Beispiel LigA und LigB könnten beim Schwein getestet werden. Diese sind beim Menschen mit hohen Sensitivitäten und Spezifitäten getestet worden (SRIMANOTE et al. 2008, CRODA et al. 2007). Allerdings konnten die hohen Sensitivitäten und Spezifitäten, die DEY et al. (2008) oder FLANNERY et al. (2001) bei ihren humanen LipL32-basierenden ELISAs beschrieben haben, nicht auf den hier entwickelten ELISA übertragen werden. So ist fraglich, ob mit anderen Proteinen, die in der Humanmedizin erfolgreich beschrieben worden sind, vergleichbar gute Ergebnisse erzielt werden können. THEODORIDIS (2004) konnte beispielsweise bei seinem auf LipL41 basierenden ELISA für Schweineseren nur gute Sensitivitäten und Spezifitäten mit dem Westernblot als Vergleichstest erzeugen.

Anhand eines besser charakterisierten Probenmaterials (PCR-Untersuchungen im Bestand, größere Stichproben, mehr Informationen über klinische Erscheinungen) bzw. Probenmaterial aus gezielt durchgeführten Infektionsversuchen könnten verschiedene Aspekte näher untersucht werden. Zum einen gäbe es keine Probleme mit potentiell falsch positiven Ergebnissen im ELISA aufgrund eines Goldstandards mit umstrittener Sensitivität. Nur mit definiertem Probenmaterial kann sicher beurteilt werden, ob die Proben tatsächlich positiv oder negativ sind. Die Wahrscheinlichkeit,

dass sie durch das diagnostische Raster fallen, ist geringer. Außerdem könnten diese Proben verwendet werden, um Zusammenhänge bezüglich des MAT-Titers zu der S/P%-Wert-Höhe im ELISA zu untersuchen. Des Weiteren könnte überprüft werden, ob der hier vorgestellte ELISA sich zur Einzeltierdiagnostik eignet, oder ob eine Herdenbeurteilung sinnvoller ist. Dabei wird der gesamte Tierbestand bzw. eine gewisse Stichprobengröße als diagnostische Einheit aufgefasst. Die Untersuchungen werden an den Einzeltieren durchgeführt. Die Bewertung erfolgt aber unter Betrachtung der gesamten Einheit, z.B. wird eine Mindestanzahl an positiven Ergebnissen vorausgesetzt, um eine Herde als positiv zu klassifizieren. Der Vorteil einer Herdenbeurteilung ist, dass einzelne Ausreißer (falsch negative oder falsch positive Proben) keinen Einfluss auf die Einstufung der Herde haben. Da die antibiotische Therapie nicht am Einzeltier stattfindet, sondern eine Bestandsbehandlung durchgeführt wird, ist eine Herdenbeurteilung auch unter praktischen Gesichtspunkten durchaus sinnvoll.

Um den ELISA in der Routine-Diagnostik verwenden zu können, müssten folgende Punkte näher untersucht bzw. verändert werden:

- Die Inkubationszeiten des Antigens und des Blockmittels sind zu lang. Dieses Problem könnte gelöst werden, indem ausgetestet wird, wie stabil das Antigen ist, wenn die Platte nach dem Blocken im Kühlschrank gelagert wird und zur Testung von Proben die Platte bei Raumtemperatur verwendet wird. Eine Platte mit herauslösbaren Streifen wäre in diesem Zusammenhang vorteilhaft. So ist es möglich, nur einzelne Streifen für die Testung zu verwenden und danach zu entsorgen, während die restlichen Streifen im Kühlschrank gelagert werden können.
- Für die Validierung des ELISAs im Sinne eines kommerziellen Testkits müssten mehr Proben, vor allem positive, getestet werden. Eine Gesamtzahl von 128 MAT-positiven Proben ist dafür zu gering.

## 5.9 Fazit

In dieser Arbeit wurde das Protein LipL32 für den Einsatz in einem ELISA zur Diagnose der Leptospirose beim Schwein getestet. Der ELISA eignet sich sehr gut für die Diagnostik von Ferkel-Seren und in zufriedenstellendem Maße für Seren aus Beständen mit hohem Gesundheitsstatus. Die Bewertung anderer MAT-negativer Seren ist nur beschränkt aussagekräftig. Wenn MAT-Titer  $< 1 : 100$  grundsätzlich als negativ bewertet werden, so hat der ELISA eine Sensitivität von 89 % und eine Spezifität von 53 %. Unter der Annahme, dass jegliche Agglutination in dem MAT Leptospiren-Antikörper darstellen kann und deshalb die Probe als positiv bewertet werden muss, hat der ELISA eine Sensitivität von 87 % und eine Spezifität von 70 %, bzw. durch die Wahl eines anderen Grenzwertes eine Sensitivität von 92 % und eine Spezifität von 61 %.

- Diskussion -

Der MAT kann, sofern dessen Sensitivität ausreicht, als Bestätigungstest für den ELISA verwendet werden und könnte eine etwas differenziertere diagnostische Aussage durch die Identifizierung der Serogruppe oder idealerweise der infizierenden Serovar ermöglichen.

In weiteren Versuchen können die Bedingungen optimiert und ein besser definierter Probenpool erzeugt werden, um sicherzustellen, dass es nicht zur Detektion von falsch positiven Proben kommt. Insbesondere grenzwertige Serumtiter sollten in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

Ulrike Ripp

### **Anwendbarkeit von LipL32 als Antigen in einem Screening-ELISA zum Nachweis von Leptospira-Antikörpern beim Schwein**

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Juni 2013

96 Seiten, 35 Abbildungen, 27 Tabellen, 115 Literaturangaben, Anhang

**Schlüsselwörter:** Leptospirose, Schwein, ELISA, LipL32, Mikroagglutinationstest

Die Leptospirose ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit mit zoonotischem Charakter. Der aktuelle Goldstandard für den Antikörpernachweis ist der Mikroagglutinationstest (MAT), dessen Sensitivität umstritten ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher ein *proof of concept* zum Einsatz eines rekombinant erzeugten Antigens (LipL32) in der Anwendung als Screening-ELISA zum Nachweis von Serovar-übergreifenden Leptospiren-Antikörpern des Schweines.

513 Schweineseren wurden in dieser Arbeit verwendet. 128 Seren hatten in dem MAT einen Titer von  $\geq 1 : 100$  und wurden als positiv klassifiziert. 100 dieser Seren wurden für die Validierung des ELISAs verwendet. Als negative Seren für die Validierung wurden 50 Seren adulter Schweine und 50 Seren von Ferkeln aus Beständen mit hohem Gesundheitsstatus genutzt, die in dem MAT negativ gewesen waren.

Zusätzlich wurden 148 MAT-negative Schweineseren aus Beständen mit unbekanntem Gesundheitsstatus, 78 Seren, die eine leichte Agglutination bei einem Titer von  $1 : 50$  aufwiesen (als verdächtig bezeichnet), 36 Seren mit einem Titer von  $1 : 50$  und 23 Seren aus 2 Beständen mit positivem PCR-Befund, die in dem MAT allerdings negativ gewesen waren, untersucht.

Anhand der Ergebnisse der 200 Schweineseren, die in die Validierung einfließen, wurde die Reproduzierbarkeit des entwickelten ELISAs überprüft und ein Grenzwert mittels ROC-Analyse festgelegt. Die Spezifität betrug für diesen Grenzwert 94 %, die Sensitivität 95 %. Die Korrelation der qualitativen Ergebnisse (negativ / positiv) von ELISA und MAT lag bei 0,890; die Korrelation der quantitativen Ergebnisse (Messwert des ELISAs zu MAT-Titer) war mit 0,213 sehr schwach.

Die Untersuchung der weiteren 313 Schweineseren erzielte mit dem festgelegten Grenzwert nur beschränkt zufriedenstellende Ergebnisse. Bei einem MAT-Grenzwert von 1 : 100 stellen sich viele MAT-negative Seren als im ELISA positiv dar. Unter der Annahme jedoch, dass jede Form von Agglutination im MAT ein Hinweis auf eine Infektion sein könnte, liefert der ELISA brauchbarere Ergebnisse. Bei den MAT-negativen Seren konnte ein deutlicher Unterschied bezüglich der ELISA-Ergebnisse je nach Herkunftsbetrieb festgestellt werden. Seren aus Beständen mit hohem Gesundheitsstatus hatten im ELISA deutlich häufiger ein negatives Ergebnis als Seren aus Beständen mit undefiniertem Gesundheitsstatus.

Dies zeigt, dass der ELISA mit LipL32 als Antigen gut geeignet ist, um Schweineseren aus Betrieben mit hohem Gesundheitsstatus auf Leptospirose zu untersuchen. Seren aus Betrieben ohne definiertem Gesundheitsstatus sind nur bedingt geeignet. Unter der Voraussetzung, dass jede Art von Agglutination als positiv im MAT gewertet wird, ist der mit den Validierungsseren berechnete Grenzwert als optimal anzusehen und liefert in Bezug auf alle 513 Seren eine Sensitivität von 92 % und eine Spezifität von 61 %.

In weiterführenden Arbeiten wäre es sinnvoll zu untersuchen, ob ein Peptid vielleicht noch spezifischer reagieren würde als das Protein LipL32. Ebenso könnte getestet werden, ob ein Gemisch mehrerer Antigene die Spezifität des ELISAs verbessern würde. Grundsätzlich ist die Beurteilung eines ELISAs allerdings immer von der Qualität des Goldstandards abhängig. Mit gut charakterisierten Seren aus Infektionsversuchen könnte dieses Problem besser gelöst werden.

## 7 Summary

Ulrike Ripp

### **Suitability of LipL32 as antigen in a screening-ELISA for the detection of Leptospira-antibodies in pigs**

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in June 2013

96 pages, 35 figures, 27 tables, 115 references, appendix

**keywords:** leptospirosis, pig, ELISA, LipL32, microagglutinationtest

Leptospirosis is a widespread zoonotic disease. The gold standard for the detection of antibodies is the microagglutinationtest (MAT) which has a sensitivity that is highly contentious. The goal of this study was to show the feasibility of a recombinant protein (LipL32) as antigen in a screening-ELISA to detect antibodies of all pathogenic serovars of porcine leptospirosis.

A total of 513 porcine sera were used in this work. 128 sera had a titer of  $\geq 1 : 100$  in the MAT and were classified as positive sera. Out of these sera, 100 sera were used for the validation of the ELISA. As negative sera, 50 sera of adult pigs and 50 sera of piglets (which were negative in the MAT) were used for the validation. These MAT-negative sera originated from pigs with a high health standard.

Additionally, 148 MAT-negative porcine sera (of farms with undefined health standard), 78 sera which showed a slight agglutination at a titre of  $1 : 50$  (therefore called suspect), 36 sera with a titre of  $1 : 50$  and 23 sera of 2 farms with a positive PCR result, but negative MAT results, were examined.

The ELISA was validated with 200 porcine sera. The reproducibility of ELISA results was determined; a cut-off was calculated by an ROC-analysis. The specificity of the ELISA for this cut-off was 94 %, the sensitivity 95 %. The correlation of qualitative results (negative / positive) of ELISA and MAT was high with 0,890, while the correlation of quantitative results (measured value of ELISA to MAT-titre) was low (0,213).

The following examination of the additional 313 porcine sera with the determined cut-off revealed a difference between ELISA and MAT results. Numerous MAT-negative sera are positive in the ELISA. Under the assumption that every agglutination seen in the MAT is an indicator of infection, the ELISA gives useful results. A significant

- Summary -

difference could be detected between MAT-negative sera from farms with and those without a high health standard. Sera from farms with high health standard usually had a negative ELISA result which was not so frequently the case for farms without a defined health standard.

This shows that the ELISA with the antigen LipL32 can well be used for the examination of porcine sera from farms with high health standard. The results of the ELISA for farms without a defined health standard have only limited value. Under the condition that every form of agglutination in the MAT has to be assessed as a positive result, then the determined cut-off of the ELISA has a sensitivity of 92 % and a specificity of 61 % for all 513 examined sera.

For further investigations, a peptide of the protein LipL32 could be examined for more specific reactions. It could also be tested if a mixture of different antigens enhances the specificity of the ELISA. Generally, the assessment of an ELISA always depends on the quality of the gold standard. Well characterized serum samples from infection experiments would be an advantage in handling this problem.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adler B, Cousins DV, Faine S, Robertson GM. Bovine IgM and IgG response to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo as measured by enzyme immunoassay. *Vet Microbiol.* 1982;7:577–585.
- Adler B, de La Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010;140:287–296.
- Ahmad SN, Shah S, Ahmad FM. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J Postgrad Med.* 2005;51:195–200.
- Aviat F, Rochereau-Roulet S, Branger C, et al. Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2009;33:375–387.
- Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:803–809.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:757–771.
- Bolin CA, Cassells JA. Isolation of *Leptospira interrogans* serovars Bratislava and Hardjo from swine at slaughter. *J Vet Diagn Invest.* 1992;4:87–89.
- Bomfim MR, Ko AI, Koury MC. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2005;109:89–94.
- Boonyod D, Poovorawan Y, Bhattarakosol P, Chirathaworn C. LipL32, an outer membrane protein of *Leptospira*, as an antigen in a dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2005;23:133–141.
- Branger C, Chatrenet B, Gouvrit A, et al. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun.* 2005;73:4062–4069.
- Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, et al. Identification of the hemolysin-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by Adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun.* 2001;69:6831–6838.
- Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T. Genomereduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:14560–14565.
- Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol.* 2009;9:760–768.
- Chapman AJ, Adler B, Faine S. Antigens recognised by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *J Med Microbiol.* 1988;25:269–278.
- Chappel RJ, Prime RW, Millar BD, Jones RT, Adler B. Comparison of diagnostic procedures for porcine leptospirosis. *Vet Microbiol.* 1992;30:151–163.
- Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The spirochetes. *Annu Rev Genet.* 2002;36:47–73.

- Chaudhary RK, Fish NA, Barnum DA. Experimental infection with *L. Pomona* in normal and immune piglets. *Can Vet J.* 1966;7:106–112.
- Cho HJ, Gale SP, Masri SA, Malkin KL. Diagnostic specificity, sensitivity and cross-reactivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against *Leptospira interrogans* serovars Pomona, Sejroe and Hardjo in cattle. *Can J Vet Res (The Canadian Journal of Veterinary Research).* 1989;53:285–289.
- Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun.* 2007;75:2441–2450.
- Croda J, Figueira CP, Wunder EA, et al. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: Disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect Immun.* 2008;76:5826–5833.
- Croda J, Ramos JG, Matsunaga J, et al. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1528–1534.
- Crowther JR. *ELISA: Theory and practice.* Totowa, N.J: Humana Press; 1995.
- Crowther JR. *The ELISA guidebook.* Totowa, NJ: Humana Press; 2000.
- Crowther JR. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: Walker JM, Rapley R , Hrsg. *Molecular Biomechanics Handbook.* 2. Aufl. Totowa, NJ: Humana Press; 2008.
- Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun.* 2002;70:2311–2318.
- Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28:291–318.
- Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun.* 2003;71:2414–2421.
- Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun.* 2005;73:4853–4863.
- Cumberland P, Everard CO, Levett PN. Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J of Trop Med Hyg.* 1999;61:731–734.
- Dey S, Madhan Mohan C, Ramadass P, Nachimuthu K. Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA. *Indian J Med Res.* 2008;128:172–177.
- Dey S, Madhan Mohan C, Senthilkumar TM, Ramadass P, Nainar AM, Nachimuthu K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2004;103:99–106.
- Dikken H, Kmety E. Serological typing methods of leptospires. *Meth in Microbiol.* 1978;11:260–307.
- Ellis WA. The diagnosis of leptospirosis in farm animals. In: Ellis WA, Little TWA , Hrsg. *The Present state of leptospirosis diagnosis and control.* Dordrecht, The Netherlands: M. Nijhoff; 1986.

- Ellis WA. Leptospirosis. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ , Hrsg. Diseases of swine. 9. Aufl. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006.
- Ellis WA, McParland PJ, Bryson DG, Thiermann AB, Montgomery J. Isolation of leptospire from the genital tract and kidneys of aborted sows. *Vet Rec.* 1986;118:294–295.
- Fish NA, Ryu E, Hulland TJ. Bacteriological and pathological studies of natural and experimental swine abortion due to *Leptospira Pomona*. *Can Vet J.* 1963;4:317–327.
- Flannery B, Costa D, Pinheiro Carvalho F, Guerreiro H. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3303–3310.
- Goddard RD, Luff PR, Thornton DH. The serological response of calves to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo vaccines and infection as measured by the microscopic agglutination test and anti-IgM and anti-IgG enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol.* 1991;26:191–201.
- Greiner M. Serodiagnostische Tests: Evaluierung und Interpretation in der Veterinärmedizin und anderen Fachgebieten. Berlin: Springer; 2003.
- Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel MK. Leptospiral proteins recognized during the humoral response to leptospirosis in humans. *Infect Immun.* 2001;69:4958–4968.
- Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology.* 2000;146:1491–1504.
- Haake DA, Champion C, Martinich C. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol.* 1993;175:4225–4234.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.* 2000;68:2276–2285.
- Haake DA, Martinich C, Summers TA, et al. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun.* 1998;66:1579–1587.
- Haake DA, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun.* 2002;70:4936–4945.
- Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun.* 1999;67:6572–6582.
- Hauk P, Macedo F, Romero EC, et al. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C-Terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect Immun.* 2008;76:2642–2650.
- Hauk P, Rodrigues Guzzo C, Ramos HR, Ho PL, Farah CS. Structure and calcium-binding activity of LipL32, the major surface antigen of pathogenic *Leptospira* sp. *J Mol Biol.* 2009;390:722–736.
- Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun.* 2008;76:2063–2069.

- Hovind-Hougen K. Determination by means of electron microscopy of morphological criteria of value for classification of some spirochetes, in particular treponemes. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1976;255:1–41.
- Hübener EA, Reiter H. Beiträge zur Ätiologie der Weilschen Krankheit. *Dtsch Med Wochenschr.* 1915;41:1275-1277.
- Kingscote BF. Leptospirosis outbreak in a piggery in Southern Alberta. *Can Vet J.* 1986;27:188–190.
- Kmety E, Dikken H. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press, Gronngen, Netherlands. 1993:15–37.
- Koizumi N, Watanabe H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;226:215–219.
- Kömmling Seixas F, Fagonde da Silva É, Drawanz Hartwig D, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine.* 2007;26:88–95.
- Krumbein R, Frieling B. Zur Weilschen Krankheit. *Dtsch Med Wochenschr.* 1916;42:564–566.
- Latell P. Feldversuchsergebnisse zum Einsatz von Doxycyclin bei der Leptospirose von Sauen. 7. AVA Haupttagung; 2008 Feb 14-17; Göttingen, Germany. Horstmar-Leer: Nutztierpraxis aktuell; 2008.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:296–326.
- Levett PN, Branch SL. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am J of Trop Med Hyg.* 2002;66:745–748.
- Lin X, Chen Y, Yan J. Recombinant multiepitope protein for diagnosis of leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:1711–1714.
- Lin Y, Chang Y. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362:443–448.
- Linnodee Animal Care. Linnodee Porcine Leptospirosis Kit. Herstellerinformation. 2004.
- Lottersberger J, Guerrero SA, Tonarelli GG, Frank R, Tarabla H, Vanasco NB. Epitope mapping of pathogenic *Leptospira* LipL32. *Lett Appl Microbiol.* 2009;49:641–645.
- Luo D, Xue F, Ojcius DM, et al. Protein typing of major outer membrane lipoproteins from chinese pathogenic *Leptospira* spp. and characterization of their immunogenicity. *Vaccine.* 2009;28:243–255.
- Mariya R, Chaudhary P, Kumar AA, Thangapandian E, Amutha R, Srivastava SK. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2006;29:269–277.
- Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol.* 2003;49:929–946.

- Matsunaga J, Young TA, Barnett JK, Barnett D, Bolin CA. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infect Immun.* 2002;70:323–334.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Dis.* 2005;18:376–386.
- McBride AJ, Pereira FA, de Matos RB, et al. Evaluation of the EIE-IgM-Leptospire assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *Acta Trop.* 2007;102:206–211.
- Midence JN, Chandler AM, Goldstein RE. Assessing the effect of recent *Leptospira* vaccination on whole blood real time PCR testing in dogs. *J Vet Intern Med.* 2012;26:149–152.
- Mitchell D, Robertson A, Corner AH, Boulanger P. Some observations on the diagnosis and epidemiology of leptospirosis in swine. *Can J Comp Med Vet Sci.* 1966;30:211–217.
- Morse EV, Baver DC, Langham RF. Experimental leptospirosis. IV. Pathogenesis of porcine *Leptospira Pomona* infections. *Am J Vet Res.* 1958:388–394.
- Mousing J, Christensen J, Haugegaard J, Schirmer AL. A seroepidemiological survey of *Leptospira bratislava* infections in Danish sow herds. *Prev Vet Med.* 1995;23:201–213.
- Murray GL, Srikram A, Hoke DE, et al. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 2009;77:952–958.
- Naito M, Sakoda Y, Kamikawa T, Nitta Y. Serological evidence of leptospiral infection in pig populations in different districts in Japan. *Microbiol. Immunol.* 2007;51:593–599.
- Nally JE, Whitelegge JP, Bassilian S, Blanco DR, Lovett MA. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect Immun.* 2007;75:766–773.
- Nascimento AL, Ko AI, Martins EA. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol.* 2004;186:2164–2172.
- Neto JS, Vasconcellos SA, Ito FH, Moretti AS. Icterohaemorrhagiae seropositivity and reproductive performance of sows. *Prev Vet Med.* 1997;31:87–93.
- OIE. Leptospirosis: Chapter 2.1.9. In: OIE , Hrsg. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: (mammals, birds and bees). 7. Aufl. Paris: Office international des épizooties; 2012a. p. 251–264.
- OIE. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases: Chapter 1.1.5. In: OIE , Hrsg. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: (mammals, birds and bees). 7. Aufl. Paris: Office international des épizooties; 2012b.
- Okuda M, Sakai Y, Matsuuchi M, Oikawa T, Watanabe M. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine leptospira antibodies using recombinant OmpL1 protein. *J Vet Med Sci.* 2005;67:249–254.

- Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods*. 2006;65:247–257.
- Palaniappan RU. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J Med Microbiol*. 2004;53:975–984.
- Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang Y. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Dis*. 2007;20:284–292.
- Perolat P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *Int J Syst Bacteriol*. 1998;48:851–858.
- Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of Leptospirosis. *PLoS one*. 2008;3:e1607.
- Pinne M, Choy HA, Haake DA, Picardeau M. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e815.
- Qiu X, Xu H, Guo Z, Wang J, Yan J. Establishment and application of ELISAs based on rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion antigen of *Leptospira interrogans*. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2008;37:592–598.
- Ren S, Fu G, Jiang X, Zeng R. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2003;422:888–893.
- Ribotta MJ, Higgins R, Gottschalk M, Lallier R. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs. *Can J Vet Res (The Canadian Journal of Veterinary Research)*. 2000;64:32–37.
- Ryley JW, Simmons GC. Leptospirosis of pigs. *Aust Vet J*. 1954;30:203.
- Sankar S, Harshan HM, Somarajan SR, Srivastava SK. Evaluation of a recombinant LigB protein of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Res Vet Sci*. 2010;88:375–378.
- Schönberg A, Hahn-Hey B, Kämpe U, Schmidt K, Ellis WA. The isolation and identification of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava from a pig in Germany. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1992;39:362–368.
- Schönberg A, Staak C, Kämpe U. Leptospirosis in West Germany. Results of a research program on leptospirosis in animals in the year 1984. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1987;34:98–108.
- Selbitz HJ. *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie*. 1. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1992.
- Senthilkumar TM, Subathra M, Ramadass P. Evaluation of recombinant leptospiral antigen LipL41 in enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination test for serodiagnosis of canine leptospirosis. *Veterinarski Arhiv*. 2007;77:475–484.
- Senthilkumar TM, Subathra M, Ramadass P, Ramaswamy V. Serodiagnosis of bovine leptospirosis by IgG-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Latex Agglutination Test. *Trop Anim Health Prod*. 2010;42:217–222.

- Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun*. 1996;64:2322–2330.
- Srimanote P, Wongdeethai N, Jieanampunkul P, et al. Recombinant LigA for leptospirosis diagnosis and LigA among the *Leptospira* spp. clinical isolates. *J Microbiol Methods*. 2008;72:73–81.
- Srivastava SK, Chaudhuri P, Thangapandian E, Mariya R, Amutha R. Evaluation of recombinant *Leptospira interrogans* serovar Canicola outer membrane proteins as diagnostic antigen. *Indian J Med Microbiol*. 2006;24:346.
- Stimson AM. Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Rep*. 1907;22:541.
- Strutzberg-Minder K. Ergebnisse diagnostischer Untersuchungen zum Nachweis von Leptospireninfektionen: Bei Schweinen in Deutschland (2003 + 2004) mit dem Mikroagglutinationstest (MAT) und der PCR. 7. AVA Haupttagung; 2008 Feb 14-17; Göttingen, Germany. Horstmar-Leer: Nutztierpraxis aktuell; 2008.
- Strutzberg-Minder K, Kreienbrock L. Leptospireninfektionen beim Schwein: Epidemiologie, Diagnostik und weltweites Vorkommen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2011;124:345–359.
- Sugunan AP, Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sehgal SC. Percutaneous exposure resulting in laboratory-acquired leptospirosis - a case report. *J Med Microbiol*. 2004;53:1259–1262.
- Sun A, Wang Y, Du P. A sensitive and specific IgM-ELISA for the serological diagnosis of human leptospirosis using a rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion protein. *Biomed Environ Sci*. 2011;24:291–299.
- Surujballi OP, Mallory M. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to multiple *Leptospira* serovars. *Can J Vet Res (The Canadian Journal of Veterinary Research)*. 2004;68:1–6.
- Surujballi OP, Marenger RM, Eaglesome MD, Sugden EA. Development and initial evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo antibodies in bovine sera. *Can J Vet Res (The Canadian Journal of Veterinary Research)*. 1997;61:260–266.
- Theodoridis D. Entwicklung eines ELISA zur Serodiagnose der Leptospirose und einer PCR zum direkten Nachweis des Erregers [Dissertation med. vet]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2004.
- Trombert-Paolantoni S, Thomas P, Hermet F, Clairet V, Litou N, Maury L. Dépistage de la Leptospirose : performance de la trousse Sérion Elisa classic *Leptospira* IgM®. *Pathol Biol*. 2010;58:95–99.
- Vivian JP, Beddoe T, McAlister AD, et al. Crystal structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Mol Biol*. 2009;387:1229–1238.
- WHO. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: World Health Organization; 2003.
- WHO country office for India. Leptospirosis: Laboratory manual. New Delhi: World Health Organization; 2007.

- Literaturverzeichnis -

WHO regional office for south-east Asia. Leptospirosis: Fact Sheet. New Delhi: World Health Organization; 2009.

Wolbach SB, Binger CA. Notes on a filtrable Spirochete from fresh water. *J Med Res.* 1914;30:23.

Xue F, Yan J, Picardeau M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. *Microbes Infect.* 2009;11:328–333.

## 9 Anhang

### 9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auszug beschriebener Membranproteine .....	5
Tabelle 2 Verfahren für den Erregernachweis .....	12
Tabelle 3 in der Literatur verwendete Antigene .....	16
Tabelle 4 Verfahren zur Grenzwert-Bestimmung.....	20
Tabelle 5 positive Seren mit MAT Titern und Verteilung auf die Serovare .....	22
Tabelle 6 Übersicht Gruppierung der Seren .....	28
Tabelle 7 Verwendete Serovare .....	29
Tabelle 8 Chemikalien für den ELISA.....	33
Tabelle 9 sonstiges Zubehör für den ELISA .....	33
Tabelle 10 Beschreibung der ELISA-Durchführung.....	39
Tabelle 11 Bewertung von Korrelationskoeffizienten.....	46
Tabelle 12 OD-Werte der Antigen-Titration .....	47
Tabelle 13 signal-to-noise ratio für die Antigen-Titration .....	48
Tabelle 14 OD-Werte der Konjugat-Titration .....	49
Tabelle 15 signal-to-noise ratio für die Konjugat-Titration .....	50
Tabelle 16 OD-Werte der Serum-Titration.....	50
Tabelle 17 signal-to-noise ratio der Serum-Titration.....	51
Tabelle 18 Intraassay-Varianz .....	52
Tabelle 19 Interassay-Varianz für Serum 333-3 .....	53
Tabelle 20 Interassay-Varianz für Serum Nr. 53.....	54
Tabelle 21 Interassay-Varianz für Serum Nr. 77.....	54
Tabelle 22 Probenverteilung S/P%-Werte .....	56
Tabelle 23 Übersicht der Validierungsseren.....	56
Tabelle 24 Übersicht der Grenzwerte zu der ROC-Kurve.....	59
Tabelle 25 drei Grenzwerte der Validierungsseren.....	64
Tabelle 26 Übersicht über die restlichen getesteten Seren .....	68
Tabelle 27 Grenzwerte mit Sensitivitäten und Spezifitäten.....	78

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung direkter und indirekter ELISA.....	18
Abbildung 2 Verteilung der Reaktionen $\geq 1 : 100$ der 128 Seren auf die Serovare...	26
Abbildung 3 Pipettierschema MAT .....	31
Abbildung 4 Pipettierschema für die Bestimmung der Intra- und Interassay-Varianz	41
Abbildung 5 Beispiel von einer ROC-Kurve.....	43
Abbildung 6 ROC-Kurve mit dem AUC-Wert .....	44
Abbildung 7 schematische Darstellung einer Vierfeldertafel.....	45
Abbildung 8 Antigen-Titration .....	48
Abbildung 9 Konjugat-Titration .....	49
Abbildung 10 Serum-Titration.....	51
Abbildung 11 Intraassay-Varianz (OD-Werte) .....	53
Abbildung 12 Verteilung der S/P%-Werte der Validierungsseren.....	55
Abbildung 13 box plot Ferkel, Adult, alle negativen und positiven Seren .....	57
Abbildung 14 box plot MAT-Titer der positiven Seren .....	58
Abbildung 15 ROC-Kurve der Validierungsseren .....	59
Abbildung 16 Kurvenverlauf Sensitivität und Spezifität.....	60
Abbildung 17 dot plot der Validierungsseren mit Grenzwert.....	61
Abbildung 18 Vierfeldertafel ELISA und MAT .....	61
Abbildung 19 ROC-Kurve mit positiven Seren und 50 negativen Ferkel-Seren.....	62
Abbildung 20 ROC-Kurve mit positiven Seren und 50 negativen Adult-Seren .....	63
Abbildung 21 Vergleich der ROC-Kurven von Ferkel- und Adult-Seren .....	63
Abbildung 22 S/P%-Werte der Negativ-Gruppe der restlichen Seren.....	65
Abbildung 23 S/P%-Werte der Verdächtig-Gruppe.....	66
Abbildung 24 S/P%-Werte 1:50-Gruppe.....	66
Abbildung 25 S/P%-Werte der Positiv-Gruppe der restlichen Seren .....	67
Abbildung 26 S/P%-Werte der Zusatz-Gruppe.....	67
Abbildung 27 Vergleich verschiedener Gruppen MAT-negativer Seren .....	69
Abbildung 28 Negativ-Gruppe aufgeteilt entsprechend Gesundheitsstatus.....	70
Abbildung 29 hoher Gesundheitsstatus aufgeteilt entsprechend Altersgruppen .....	71
Abbildung 30 Vergleich verschiedener Gruppen MAT-positiver Seren.....	72
Abbildung 31 Bestand mit Klinik und positiver PCR aus Validierungsseren .....	73
Abbildung 32 Vergleich aller getesteten Seren.....	74
Abbildung 33 ROC-Kurve aller Proben der Positiv- und Negativ-Gruppe.....	75
Abbildung 34 ROC-Kurve aller negativ-klassifizierten Proben zu der Positiv-Gruppe .....	76
Abbildung 35 ROC-Kurve MAT-negative zu restl. Seren.....	76



## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen für die Bereitstellung des interessanten Themas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. Timo Homeier-Bachmann danke ich für die vielen konstruktiven Gespräche und kritischen Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Tilman Kühn, zu meiner Zeit Laborleiter von Synlab.vet Leipzig, für die Ermöglichung dieser Arbeit, der freundschaftlichen Betreuung und Unterstützung sowie der konstruktiven Kritik und Beratung. Ich weiß nicht, ob ich mich für die Routine-Diagnostik, insbesondere beim Schwein, ohne dieses gemeinsame Projekt hätte begeistern können.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen MTAs aus dem Institut für Tierhygiene und von Synlab.vet Leipzig sowie den Mitdoktoranden des Instituts für die Unterstützung und die vielen Ratschläge im Laboralltag. Danke für die schöne gemeinsame Zeit.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Dr. Karsten Nöckler und Herrn Enno Luge vom BfR in Berlin für die Einarbeitung in die Technik des Mikroagglutinationstests und in die Pflege von Leptospiren sowie den freundschaftlichen Austausch über diese Arbeit und über Leptospiren allgemein.

Auch bei Brendon Thatcher von IDEXX Inc. in Portland, Maine (USA) möchte ich mich bedanken. Durch ihn hatte ich mich bereits mit der ELISA-Technik vor Beginn meiner Promotion intensiver beschäftigt und in Grundzügen erfahren, welche Arbeiten in einem R&D-Labor anfallen. Danke für die vielen konstruktiven E-Mails, die wir während meiner Promotion austauschten.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die stets aufmunternden und unterstützenden Worte sowie für das Verständnis meiner mangelnden Zeit neben der Arbeit bedanken.