

- Gudmundsdottir, S., Magnadottir, S. and Gudmundsdottir, B. K. (1995). Effects of antigens from *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes* on leucocytes from primed and unprimed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunol.* 5, 495-504.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth / cell kill. *J. Immunol. Methods* 119, 203-210.
- Jones, S. R. M., Stevenson, R. M. W. and Paterson W. D. (1993). Proliferation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lymphocytes in response to the bacterial pathogen, *Yersinia ruckeri*. *Bull. Aquacult. Ass. Can.* 4, 93-95.
- Kolb, E. und Grün, E. (1995). Die Bedeutung des Vitamin E und des Selens für das Immunsystem des Rindes, insbesondere für die Eutergesundheit. *Der praktische Tierarzt* 9, 749-756.
- LoPresto, C. J., Schwarz, L. K. and Burnett, K. G. (1995). An in vitro culture system for peripheral blood leucocytes of a sciaenid fish. *Fish & Shellfish Immunol.* 5, 97-107.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63.
- Steffens, W. (1985). *Grundlagen der Fischernährung*. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.
- Troutadaud, D., Le Morvan, C. and Deschaux, P. (1995). A serum-reduced culture medium for carp lymphocyte in vitro mitogen-induced proliferation. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 81-84.
- Weichert, H., Blechschmidt, I., Schröder, S. and Ambrosius, H. (1991). The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes. *Allerg. Immunol.* 37, 139-144.
- Yachnin, S., Lawrence, W. A. Baron, J. M. and Svenson, R. H. (1972). The potentiation of phythämagglutinin-induced lymphocyte transformation by cell-cell interaction; a matrix hypothesis. *Cellular Immunol.* 3, 569-589.
- Yui, M. A. and Kaattari, S. L. (1987). Vibrio anguillarum antigen stimulates mitogenesis and polyclonal activation of salmonid lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 11, 539-549.

Korrespondenzadresse

Dr. Ralf Peter Pund
Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV)
Alt-Marienfelde 17-21
D-12277 Berlin

Entwicklung eines ELISA-Systems zur Beurteilung von Furunkulose-Vakzinen

Ulrich Wagner, Dietlind Härdge, Ingolf Lachmann und Karl Drößler
Institut für Zoologie, Universität D-Leipzig

Zusammenfassung

Als mögliche Alternativmethode zu Letalchallengeversuchen an Fischen wird ein sandwich-ELISA-System entwickelt, mit dem sich Antikörper(Ak)-Populationen mit potentiell unterschiedlichem protektiven Wert nachweisen lassen. Die Testspezifität wird über monoklonale Antikörper (mAk) gegen einzelne Antigene von *Aeromonas salmonicida*, dem Erreger der Furunkulose, festgelegt. Bei Anti-LPS- und Anti-A-Protein-Ak-Analysen von Seren des Atlantischen Lachses wurden mittels ELISA und Antigen-Bindungsassay vergleichbare Resultate erzielt. Diese, wie auch erste Studien an Forellenserien, wiesen auf die Potenz und Spezifität des ELISA-Systems für den selektiven Nachweis einzelner Ak-Populationen hin. Beim Einsatz von zwei A-Protein-spezifischen mAk wurden Hinweise gefunden, daß sich mit diesem Testsystem in den Fischseren zum Teil differente Ak-Populationen, gerichtet gegen den Virulenzfaktor A-Protein, erfassen lassen.

Summary: Development of an ELISA-system for the assessment of furunculosis vaccines

As an alternative method for challenge experiments in fish a sandwich-ELISA has been established for the detection of potentially protective antibody populations. Assay specificity depends on monoclonal antibodies (mabs) directed against different antigens of *Aeromonas salmonicida*, the causative agent of furunculosis. Comparable levels of salmon antibodies against LPS and the A-layer protein were recorded by ELISA and antigen binding assay. These studies, together with the first analysis of trout sera refer to the specificity and suitability of the ELISA-system for monitoring of individual antibody populations. A study of different mabs against the A-layer protein points to the possibility for detecting at least partially different antibody populations against this virulence factor.

Keywords: vaccination, furunculosis, ELISA, antibody response, A-layer protein

1 Einleitung

Die Wirksamkeit von Fischvakzinen wird gegenwärtig ausschließlich über Letalchallengeversuche geprüft. Eine Alternative könnte der Nachweis von Ak sein, die mit der Vakzine-induzierten Protektion korrelieren (Reitan and Secombes, 1997). Der protektive Wert spezifischer humoraler Abwehrmechanismen von Salmoniden gegenüber *Aeromonas salmonicida* (*A.s.*), dem Erreger der Furunkulose, wird bis heute kontrovers diskutiert (Thornton et al., 1994; Bricknell et al., 1997). Eine aktuelle Studie verweist auf eine positive Assoziation zwischen der Wirksamkeit kommerzieller Furunkulose-Vakzine und einer Ak-Antwort gegen Zellwand-assoziiertes A-Protein (Midtlyng et al., 1996). Ak gegen eine extrazelluläre Serinprotease (P1) könnten partielle Schutzfunktion besitzen (Ellis et al., 1988). Für eine selektive Bestimmung einzelner Ak-Populationen im Fischserum mittels Enzymimmunasay (*sandwich-ELISA*) wurden mAk gegen diese und weitere Erregerantigene wie Lipopolysaccharid (LPS), eine zweite Exoprotease (P2) und Glycero-phospholipid:Cholesterol-Acyltransferase (GCAT) entwickelt (Härdge et al., 1997a, b; Wagner et al., 1997b; Lachmann et al., 1998). Mit diesen, bevorzugt native Epitope bindenden mAk war es möglich, selektiv einzelne Ak-Populationen in polyspezifischen Modellsäeren von Kaninchen zu bestimmen (Wagner et al., 1997a). In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse vorgestellt, die bei der bisherigen Optimierung und Spezifitätsprüfung des *sandwich-ELISA*-Systems für Serumproben von Salmoniden gewonnen wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Antigene und Antikörper

Es wurden Schüttelkulturen (72 h, 15°C) verschiedener *A.s.*-Stämme (F216.1/83, MT004, ES24) eingesetzt. Zur sauren Extraktion eines A-Protein/LPS-Gemisches (A/LPS) (Garduno et al., 1992) und zur LPS-Präparation (Westphal et al., 1952) wurde der Stamm F216.1/83 genutzt. Rekombinantes A-Protein (rA) erhielten wir von S. Maurice (Jerusalem). Alle mAk fanden als Kulturerstand Verwendung.

2.2 Gewinnung von Referenzseren

Von sechs Regenbogenforellen (500-800 g) wurden 8 Wochen nach Immunisierung mit A/LPS in komplettem Freudschem Adjuvans (50 µg i.p.) Serumproben gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktions des Ductus Cuvieri unter Benzocain-Betäubung. Das Normalserum sowie ausgewählte Serumproben IBOO-vakzinierter Atlantischer Lachse wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Gudmundsdóttir und Gudmundsdóttir, 1997).

2.3 Antigen-Bindungsassay

ELISA-Platten (Greiner) wurden mit reinem Antigen (5 µg/ml PBS) über Nacht bei 4°C beladen und mit PBS (0.1% Tween 20, TPBS) gewaschen. Nach Inkubation mit den Serumproben (verdünt in TPBS, 4°C über Nacht) wurden IgM-Ak mit einem selbst gewonnenen und Peroxidase-markierten Kaninchen-anti-Forellen-IgM (KAF-POD, 0,64 µg IgG/ml TPBS, 2 h 4°C

) und ABTS als Chromogen detektiert. Die Auswertung erfolgte nach 1 h durch Extinktionsmessung bei 405 nm.

2.4 Sandwich-ELISA

Ziege-anti-Maus IgG/H+L (Dianova)-beschichtete ELISA-Platten wurden sukzessive mit mAk (1:10 in TPBS, 2 h) und entsprechenden Antigenpräparaten [LPS, rA, A/LPS (5 µg/ml) bzw. Kulturfiltrat (KF, 1:5)] in TPBS mit 1% Rinderserumalbumin (TPBS-RSA, 3 h, 4°C) inkubiert. Die nachfolgende Seruminkubation und IgM-Detektion erfolgten wie oben beschrieben. Zur Verdünnung der Seren und des KAF-POD wurde TPBS-RSA verwendet. Jeder Testansatz wurde mindestens zweimal durchgeführt.

3 Ergebnisse

Serumproben vakzinierter Lachse wurden mittels Antigen-Bindungsassay und *sand-*

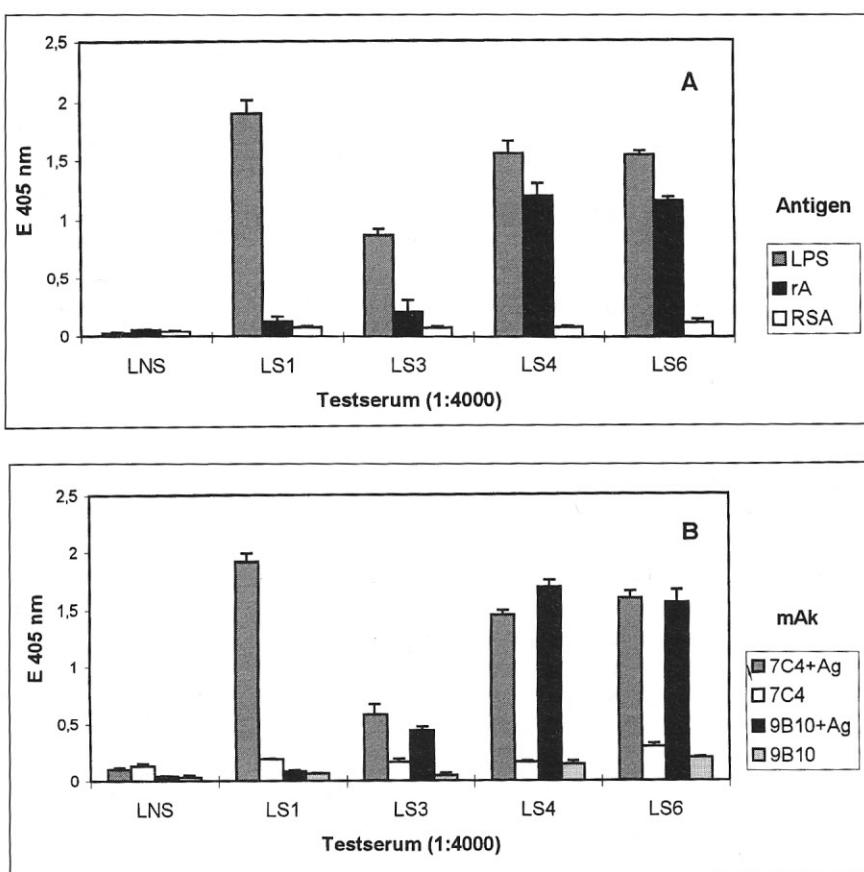


Abbildung 1: Analyse von fünf Lachssäeren mittels Antigen-Bindungsassay (A) und Sandwich-ELISA (B).

Im ELISA wurde zum Anti-LPS-Ak-Nachweis der mAk 7C4 in Kombination mit LPS als Antigen (Ag), zum Anti-A-Protein-Ak-Nachweis der mAk 9B10 und ein KF des Stammes ES24 verwendet ($\bar{x} \pm s$, n = 4).

wich-ELISA auf Anti-LPS- und Anti-A-Protein-Ak analysiert. Abbildung 1 zeigt die Bindungsreaktivität von vier ausgewählten Proben. Im Lachsserum LS1 ließen sich mit beiden Methoden fast ausschließlich Anti-LPS-Ak nachweisen. Die Seren LS4, LS6 und LS3 enthielten sowohl Anti-LPS- als auch Anti-A-Protein-Ak. Beide Techniken lieferten für Serum LS3 recht niedrige Meßwerte. Die Normalserumprobe (LNS) enthielt keine spezifischen Ak.

Durch Verwendung von mAk differenter Antigenspezifität können mit dem sandwich-ELISA unterschiedliche Ak-Populationen bestimmt werden. Das Ergebnis einer solchen Ak-Analyse für ein Referenzserum von Forellen (FS4) ist in Abbildung 2A dargestellt, wobei Ak gegen fünf Erregerantigene bestimmt wurden. In diesem und drei weiteren nach Immunisierung mit dem A/LPS-Zellextrakt gewonnenen Seren ließen sich Anti-LPS- und Anti-A-Protein-Ak nachweisen. Spezifische Ak gegen drei extrazelluläre Antigene (P1, P2, GCAT) wurden nicht gefunden. Die stets zur Erfassung unspezifischer Bindungen der Serumproben mitgeführten Kontrollansätze ohne Antigen zeigten zumindest tendenziell eine Abhängigkeit vom genutzten mAk und der Probe. In Abbildung 2B sind Resultate einer Analyse von Anti-A-Protein-Ak unter Verwendung von mAk differenter Epitopspezifität (9B10, 4B10) und geeigneter Antigengemische dargestellt. Die Anti-A-Protein- und Anti-LPS-Ak-haltigen Seren LS6 und FS4 zeigten in beiden Testvarianten ein eindeutig differentes Verhalten. LS6 lieferte höhere spezifische Meßwerte in Verbindung mit dem mAk 9B10, FS4 reagierte stärker bei Einsatz des mAk 4B10. Beide Varianten sprachen auf ein stark Anti-LPS-Ak-positives Serum (LS1) nicht bzw. kaum an.

4. Diskussion

LPS und A-Protein besitzen bei Salmoniden stark immunogene (Evenberg et al., 1985), jedoch im Hinblick auf die Induktion protektiver Ak vermutlich unterschiedliche Wirkungen (Lund et al., 1995). Für detaillierte Korrelationsanalysen zwischen Ak-Status und Vakzine-induzierter Protektion sollte daher ein Testsystem zum selektiven Nachweis differenter Ak-Populationen in den

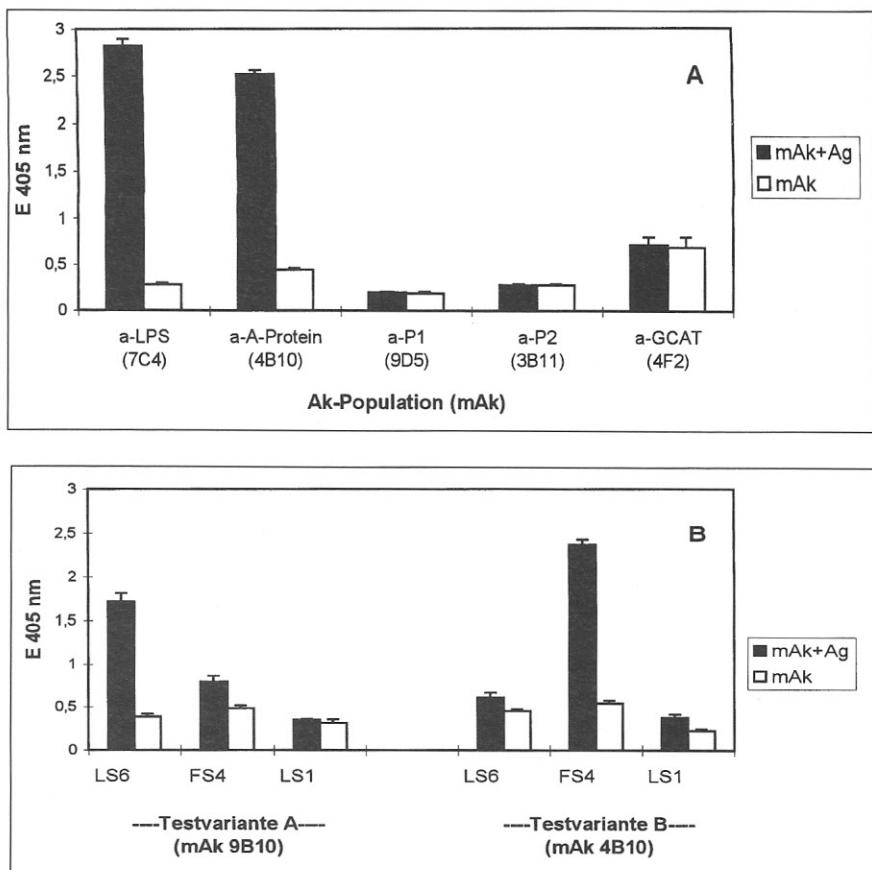


Abbildung 2: Untersuchungen zur Spezifität des sandwich-ELISA-Systems.
(A) Analyse von fünf Ak-Populationen in einem Forellenserum (FS4, 1:1000).
(B) Analyse von drei Serumproben (LS6, FS4, LS1, 1:1000) auf Anti-A-Protein-Ak unter Nutzung von mAk differenter Epitopspezifität. Für die einzelnen Testvarianten wurden folgende mAk-Ag-Kombinationen genutzt: 7C4-LPS, 4B10-A/LPS, 9D5 und 3B11-KF F216.1/83, 4F2-KF MT004, 9B10-KF ES24 ($\bar{x} \pm s$, n = 4).

meist polyspezifischen Serumproben vorteilhaft sein. Dafür nutzbare Immunoblotting- und Antigen-Bindungsassays erfassen nicht selten Ak gegen denaturierte Antigene. Eine Reindarstellung der Antigene, für aussagekräftige Resultate der letzteren Methode essentiell, ist oft problematisch (Leung and Stevenson 1988, Björnsdóttir et al., 1992). Der auf der Bindungsspezifität der mAk sowie auf der sich daraus ergebenden Möglichkeit, leicht zu gewinnende Antigengemische zu benutzen, basierende sandwich-ELISA und ein Bindungsassay unter Nutzung gereinigter Antigene lieferten in unseren Analysen mit Ak-positiven Lachsseren vergleichbare Resultate. Die bezüglich des Ak-Nachweises gegen Exoenzyme (Abb. 2A) und gegenüber dem A-Protein (LS1, Testvariante A, Abb. 2B) in stark Anti-LPS-Ak-haltigen Serumproben negativen

Befunde bestätigten bisherige Spezifitätsanalysen. Sie unterstreichen, daß zumindest diese Assayvarianten auf Ak gegen stark immunogen wirkendes und zur Komplexierung neigendes LPS (Lee and Ellis, 1990) nicht ansprechen.

Die Möglichkeit, ein breites Spektrum an Ak-Populationen nachweisen zu können, erhöht die Potenz des ELISA-Systems als Alternative für Letalchallengeversuche. Die Seren LS6 und FS4 wiesen unterschiedliche Immunreaktivität in zwei Testvarianten auf, die sich vor allem hinsichtlich der Feinspezifität des verwendeten mAk unterschieden (Abb. 2B). Diese Daten belegen, daß es mit Hilfe von mAk, die differente Epitope eines Antigens binden, möglich ist, unterschiedliche Ak-Populationen gegen ein Antigen zu erfassen und zu prüfen, inwiefern jede einzelne mit der Schutzwirkung der Vakzine korreliert.



Literatur

- Bjørnsdóttir, R., Eggset, G., Nilsen, R. and Jorgensen, T. O. (1992). The A-layer protein of *Aeromonas salmonicida*: further characterization and a new isolation procedure. *Journal of Fish Diseases* 15, 105-118.
- Bricknell, I. R., Bowden, T. J., Lomax, J. and Ellis, A. E. (1997). Antibody response and protection of Atlantic salmon (*Salmo salar*) immunised with an extracellular polysaccharide of *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology* 7, 1-16.
- Ellis, A. E., Burrows, A. S., Hastings, T. S. and Stapleton, K. J. (1988). Identification of *Aeromonas salmonicida* extracellular protease as a protective antigen against furunculosis by passive immunization. *Aquaculture* 70, 207-218.
- Evenberg, D., Versluis, R. and Lugtenberg, B. (1985). Biochemical and immunological characterization of the cell surface of the fish pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida*. *Biochimica et Biophysica Acta* 815, 233-244.
- Garduno, R. A., Lee, E. J. and Kay, W. W. (1992). S-layer-mediated association of *Aeromonas salmonicida* with murine macrophages. *Infection and Immunity* 60, 4373-4382.
- Gudmundsdóttir, B. K. and Gudmundsdóttir, S. (1997). Evaluation of cross protection by vaccines against atypical and typical furunculosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 20, 343-350.
- Hädge, D., Lachmann, I., Wagner, U., Ladusch, M. and Dörr, K. (1997a). Studies on surface-exposed A-protein- and LPS-epitopes of various *Aeromonas salmonicida* isolates by special dot blotting and flow cytometry using monoclonal antibodies. *Proceedings of the VIIth International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Edinburgh, Scotland* p.147 (Abstract).
- Hädge, D., Lachmann, I., Wagner, U. and Dörr, K. (1997b). Characterization of core-oligosaccharide- and O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies against *Aeromonas salmonicida* LPS binding to typical and atypical *Aeromonas salmonicida* isolates. *Aquaculture* 157, 157-171.
- Lachmann, I., Wagner, U., Hädge, D. and Dörr, K. (1998). Generation and preliminary characterisation of monoclonal antibodies directed to glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase (GCAT) native epitopes of *Aeromonas salmonicida*. *Diseases of Aquatic Organisms* 33, 73-75..
- Lee, K. K. and Ellis, A. E. (1990). Glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytolsin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *Journal of Bacteriology* 172, 5382-5393.
- Leung, K. Y. and Stevenson, R. M. W. (1988). Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of General Microbiology* 134, 151-160.
- Lund, T., Chiayvareesajja, J., Larsen, H. J. S. and Roed, K. H. (1995). Antibody response after immunization as a potential indirect marker for improved resistance against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 109-119.
- Midtlyng, P. J., Reitan, L. J. and Speilberg, L. (1996) Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology* 6, 335-350.
- Reitan, L. J. and Secombes, C. J. (1997). In vitro methods for vaccine evaluation. *Dev.Biol.Stand.* 90, 293-301.
- Thornton, J. C., Garduno, R. A. and Kay, W. W. (1994). The development of live vaccines for furunculosis lacking the A-layer and O-antigen of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases* 17, 195-204.
- Wagner, U., Lachmann, I., Hädge, D. and Dörr, K. (1997a). A monoclonal antibody-based approach to study the immunogenicity of individual antigens secreted by *Aeromonas salmonicida*. *Proceedings of the VIIth International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Edinburgh, Scotland* p.96 (Abstract).
- Wagner, U., Lachmann, I., Hädge, D. and Dörr, K. (1997b). Development and characterization of monoclonal antibodies specific for two different exoproteases of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases* 20, 223-235.
- Westphal, O., Lüderitz, O. und Bister, F. (1952). Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z.Naturforsch.* 7b, 148-155.

Danksagung

Wir bedanken uns bei Bjarnheidur K. Gudmundsdóttir (Reykjavik) und Sarah Maurice für die freundliche Überlassung der Seren und des A-Proteins, bei der Arbeitsgruppe von Elke Henrion (BgVV, Berlin) für die enge Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Referenzseren und bei Nicole Herth, Simone Hamann sowie Christine Krug für die technische Assistenz.

Dem BMBF möchten wir für die finanzielle Förderung danken (BEO21-0310616B).

Korrespondenzadresse

Ulrich Wagner
Institut für Zoologie, Universität Leipzig
Talstr. 33
D-04103 Leipzig