

Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen ELISA zum Nachweis von *Babesia ovis*-Infektionen zu erstellen. Bei niedrigen Parasitämien, die für *B. ovis* typisch sind, stellt die Isolierung von spezifischen Parasitenantigenen aus infizierten Schaferythrozyten das Hauptproblem dar. Eine Konzentration des Ausgangsmaterials durch differenzierte Lysis der nicht-infizierten Erythrozyten mit hypotonischer Kochsalzlösung war nicht möglich.

Zur Diagnose von *Babesia bovis*-Infektionen des Rindes wurden ungereinigte, reine und rekombinante Proteine erfolgreich im ELISA verwendet. Die Eignung dieser Antigene zum Nachweis von heterologen Antikörpern, insbesondere *B. ovis*, wurde geprüft. Dazu wurden im IFAT Antigene von fünf Babesien-Arten mit heterologen *B. bovis*-Antisera, -Immunsere und monoklonalen Antikörpern untersucht. Starke Kreuzreaktionen traten mit *B. bigemina* und schwache mit *B. ovis* auf. Gemeinsame Antigene mit *B. divergens*, *B. equi* und *B. caballi* konnten nicht nachgewiesen werden. Die antigene Verwandtschaft zwischen *B. bovis* und *B. ovis* wurde zusätzlich in der SDS-PAGE und im Western Blot untersucht. Antigene aus erythrozytären Stadien beider Parasiten wiesen unterschiedliche Proteinmuster im Molekulargewichtsbereich von etwa 220 - 20 kDa auf. Heterologe polyklonale *B. bovis*-Antikörper erkannten eine 160 kDa Doppelbande, heterologe *B. ovis*-Seren zeigten schwache Kreuzreaktionen mit vier Antigenen.

Im *B. ovis*-ELISA konnte mit ungereinigten und rekombinanten *B. bovis*-Antigenen keine zufriedenstellende Differenz der Absorptionen positiver und negativer Seren erreicht werden.

Für die Präparation von *B. ovis*-Antigen erwies sich eine Parasitämie von 14% bei Spendertieren als ausreichend. Desintegriertes Material aus dem Sediment lysierter Erythrozyten wurde durch Ultrazentrifugation von den unlöslichen Bestandteilen getrennt und das Hämoglobin weitgehend entfernt. Mit 1,5 µg/ml dieses Antigens konnte im ELISA eine gute Diskriminierung erzielt werden.

Zur Bestimmung positiver und negativer Reaktionen wurden 129 Seren von Schafen aus *B. ovis*-freien Gebieten untersucht. Der Grenzwert wurde anhand der mittleren Absorptionen ($\bar{x} + 3s$) festgelegt und

erlaubte eine richtige Zuordnung von 96,9% dieser Tiere. Für alle weiteren Untersuchungen diente der IFAT als Referenzmethode. Anhand von 12 experimentell infizierten Schafen wurde der zeitliche Verlauf der Seroreaktionen beobachtet. Die Serokonversion trat bei Schafen, denen erythrozytäre Stadien oder Sporozoiten inokuliert worden waren, ab dem 8. dpi, bei Schafen, die durch Zekeninfestation infiziert worden waren, ab dem 14. dpi ein. Maximalwerte wurden zwischen dem 15. - 40. dpi erreicht. Spezifische Antikörper waren bis mindestens 100 dpi (begrenzte Versuchsdauer) nachweisbar.

Bei vergleichenden Untersuchungen an 214 Schafen mit unbekanntem parasitologischem Status aus endemischen Gebieten Israels, Ägyptens und der Türkei zeigte sich eine gute Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse beider Tests (86,5%). Abweichende Befunde wurden hauptsächlich bei niedrigen IFAT-Titern oder ELISA-Absorptionen erhoben (24/29). Die lineare Regressionsanalyse der quantitativen Ergebnisse ergab sowohl für Seren experimentell infizierter Tiere ($r = 0,79$, $p < 0,001$) als auch für Feldseren ($r = 0,69$, $p < 0,001$) eine hochsignifikante Korrelation.

Der ELISA kann als Selektions-Test für epidemiologische Studien verwendet werden. Weitere Untersuchungen zur Spezifität des Tests sind notwendig, da in den *B. ovis*-endemischen Gebieten auch *Anaplasma ovis*, *Theileria ovis* und andere Hämoparasiten auftreten. Feldseren von monoinfizierten Schafen standen für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

SIMONE NIERLICH (1990):

An ELISA for the serodiagnosis of *Babesia ovis* infections in sheep. (Med. Vet. Thesis, School Vet. Med., Hanover, Germany)

The purpose of this study was to develop an ELISA to diagnose *Babesia ovis* infections. The major problem encountered was the isolation of specific parasite antigens from infected sheep erythrocytes at low level parasitaemias, which is typical for *B. ovis*. Concentration of infected erythrocytes by differential lysis in hypotonic saline was not possible.

Crude, purified and recombinant proteins were used successfully in ELISA to diagnose *Babesia bovis* infections in cattle. The use of these antigens to detect heterologous antibodies, particularly those of *B. ovis*, was also tested. Antigens of five *Babesia* spp. were investigated in IFAT using heterologous *B. bovis* antisera, immune sera and monoclonal antibodies. *B. bigemina* cross-reacted strongly and *B. ovis* weakly but no common antigens were detected with *B. divergens*, *B. equi* and *B. caballi*. Additionally, the antigenic relationship between *B. bovis* and *B. ovis* was studied using SDS-PAGE and Western Blot. Antigens from the erythrocytic stage of both parasites indicated distinctive protein profiles between approximately 220 - 20 kDa. Heterologous polyclonal *B. bovis* antibodies recognized a 160 kDa double band. Heterologous *B. ovis* antisera revealed weak cross-reactions with four antigens. However, in the *B. ovis* ELISA crude or recombinant *B. bovis* antigens showed no satisfactory difference between absorption values of positive and negative sera.

For the preparation of *B. ovis* antigen a parasitaemia of 14% proved to be sufficient. The sonicated sediment of lysed erythrocytes was separated from insoluble components by ultracentrifugation and the haemoglobin was removed. A good discrimination in ELISA was achieved with a protein concentration of 1.5 µg/ml of this antigen.

Sera of 129 sheep from *B. ovis*-free areas were used to determine positive and negative reactions. At a threshold of $\bar{x} + 3s$ of the mean absorptions, 96.9% of the animals were correctly classified. For all further investigations the IFAT was used as the reference method. The serological response of 12 experimentally infected sheep was also examined. Seroconversion was detected as early as 8 dpi in sheep inoculated with erythrocytic parasites and sporozoites, and at 14 dpi in sheep infected by tick-infestation. Specific antibody levels peaked between 15 - 40 dpi and were detectable for at least 100 dpi.

Comparative examination of 214 sheep with unknown parasitological status from endemic areas from Israel, Egypt, and Turkey indicated a good agreement with the qualitative test results (86.5%). Differences were mainly found with low IFAT titres and low ELISA absorption values (24/29). Linear regression analysis of quantitative results revealed a highly significant correlation in both sera of experimentally infected animals ($r = 0.79$, $p < 0.001$) and field sera ($r = 0.69$, $p < 0.001$).

Thus, the ELISA can be used for epidemiological surveys. However, further investigation on the test specificity is required since in *B. ovis*-endemic areas *Anaplasma ovis*, *Theileria ovis* and other haemoparasites exist. Unfortunately, field sera of monoinfected sheep were not available for this study.