

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay mit einem rekombinanten Antigen (r-ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen *Babesia caballi* in Pferdeseren entwickelt.

Das eingesetzte rekombinante Antigen (Bezeichnung R-141.1) wurde als Fusionsprotein mit Glutathion S-Transferase (GST) in *Escherichia coli* exprimiert. Es besaß nach rechnerischem Abzug des Fusionspartners (26 kDa) mit 52 kDa ca. 37 % der Molekülmasse des korrespondierenden nativen 141 kDa-Antigens von *B. caballi* (USDA-Stamm).

Das rekombinante Antigen wurde sowohl von Seren experimentell mit dem homologen *B. caballi*-Stamm (USDA-Stamm) als auch experimentell mit heterologen brasilianischen Feldstämmen infizierten Ponys erkannt. Ebenfalls reagierten Feldseren von Pferden aus verschiedenen europäischen Ländern und brasilianischen Endemiegebieten mit dem rekombinanten Antigen.

Die Qualität des r-ELISA wurde anhand definierter Seren bewertet. Die Testergebnisse wurden mit etablierten serologischen Nachweisverfahren (Komplementbindungsreaktion, KBR, und indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test, IFAT) verglichen. Für die Berechnung der Spezifität wurden Seren nicht-infizierter Pferde aus Island verwendet. Die Spezifität des r-ELISA betrug 97,5 %. Für die KBR und den IFAT wurde eine Spezifität von jeweils 100 % berechnet. Für die Berechnung der Sensitivität wurden Seren ab dem 16. dpi von experimentell mit *B. caballi* infizierten Ponys verwendet. Die Sensitivität des r-ELISA war mit 88,2 % niedriger als diejenige des IFAT (98,7 %), dagegen deutlich höher als die Sensitivität der KBR (50 %).

Die Richtigkeit betrug für den r-ELISA 95,9 %, für die KBR 75,6 % und für den IFAT 99,4 %. Die Prävalenz innerhalb der definierten Seren betrug 48,7 %. Der positive prädiktive Wert des r-ELISA betrug 88,2 %. Für die KBR und den IFAT wurde ein positiver prädiktiver Wert von jeweils 100 % berechnet. Der negative prädiktive Wert des r-ELISA betrug 97,5 % im Vergleich zur KBR mit 67,8 % und zum IFAT mit 98,8 %.

An 480 Feldseren von Pferden aus verschiedenen europäischen Ländern und brasilianischen Endemiegebieten wurde die Übereinstimmung der qualitativen Testergebnisse zwischen r-ELISA und etablierten serologischen Nachweisverfahren (KBR und IFAT) untersucht. Die Übereinstimmung der Testergebnisse von r-ELISA und KBR betrug 65,4 % (314 / 480), von r-ELISA und IFAT 81 % (389 / 480). Bei gleichsinnigen Testergebnissen in KBR und IFAT betrug die Übereinstimmung zu den Testergebnissen des r-ELISA 88,9 % (255 / 287). Dabei stimmten die Ergebnisse des r-ELISA bei gleichzeitigem negativem Ergebnis in KBR und IFAT zu 84,8 % (140 / 165), bei gleichzeitigem positivem Ergebnis in KBR und IFAT zu 94,3 % (115 / 122) überein.

Die Seren eines von insgesamt 11 experimentell mit *B. equi* infizierten Ponys reagierten im r-ELISA konstant positiv. Die Beziehung zwischen Vorliegen einer *B. equi*-Infektion und positivem Testergebnis im r-ELISA war statistisch nicht signifikant. Untersuchungen an Feldseren zeigten ebenfalls keine statistisch signifikante Beziehung zwischen vermutlichem Vorliegen einer Infektion mit *B. equi* (positives Ergebnis im IFAT zum Nachweis von *B. equi*-Antikörpern) und positivem Testergebnis im r-ELISA.

Untersuchungen an Feldseren von Fohlen aus brasilianischen Endemiegebieten ergaben, daß im Lebensalter von 12 Monaten nach den Ergebnissen von r-ELISA und IFAT eine Prävalenz der *B. caballi*-Infektion von 90 % vorlag, während die KBR lediglich bei 35 % der Fohlen eine Infektion anzeigte.

Der einfach und schnell durchzuführende r-ELISA ist sensitiver als die KBR und im Gegensatz zum IFAT standardisierbar. Der r-ELISA ist zur Anwendung bei epidemiologischen Fragestellungen geeignet. Die Eignung für Exportuntersuchungen sollte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

## SUMMARY

Menke, Urte (1997):

Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant 141 kDa antigen for the diagnosis of *Babesia caballi* infections in horses

A recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay (r-ELISA) was developed for the detection of antibodies of *Babesia caballi* in horse sera. The recombinant antigen (R-141.1) used was expressed in *Escherichia coli* as a glutathione S-transferase (GST) fusion protein. After subtraction of the fused GST component (26 kDa) its molecular mass of 52 kDa constituted 37 % of the corresponding native 141 kDa antigen of *B. caballi*.

The recombinant antigen was recognised by sera from horses experimentally infected with the homologous strain of *B. caballi* (USDA-strain) as well as by sera from horses experimentally infected with heterologous field-strains from Brazil. Sera from field-infected horses from different European countries and endemic areas in Brazil also reacted with the recombinant antigen.

The diagnostic potential of the r-ELISA was validated by testing defined sera. The results were compared with established serological tests (complement fixation test, CFT, and indirect fluorescent antibody test, IFAT). The specificity was determined by sera from non-infected horses from Iceland. The specificity of the r-ELISA was 97.5 % as compared to 100 % for the CFT and IFAT. The sensitivity of the r-ELISA (88.2 %) obtained for sera taken from day 16 after experimental infection with *B. caballi* was lower than that of the IFAT (98.7 %) but higher than that of the CFT (50 %).

The accuracy of the tests were 95.9 % for the r-ELISA, 75.6 % for the CFT and 99.4 % for the IFAT. The prevalence among the defined sera was 48.7 %. The positive predictive value of the r-ELISA was 88.2 %, whereas for the CFT and IFAT a positive predictive value of 100 % was calculated. The negative

predictive value of the r-ELISA was 97.5 % as compared to 67.8 % for the CFT and 98.8 % for the IFAT.

To determine the concordance of the qualitative results between r-ELISA and established serological tests (CFT and IFAT) 480 field-sera from horses from different European countries and endemic areas in Brazil were used. The concordance between the r-ELISA and the CFT was found to be 65.4 % (314/480), between the r-ELISA and the IFAT 81 % (389/480). The concordance between identical CFT and IFAT results and the r-ELISA was 88.9 %. If both CFT and IFAT results were negative the concordance was 84.8 % (140/165) whereas the concordance was found to be 94.3 % (115/122) with positive CFT and IFAT results.

The sera obtained from one of 11 horses experimentally infected with *B. equi* showed consistently a positive reaction in the r-ELISA. There was no statistically significant relation between the occurrence of infection with *B. equi* and a positive result in the r-ELISA. Examinations of field-sera also revealed no statistically significant relation between a probable *B. equi* infection (positive result in the IFAT) and a positive r-ELISA result.

By examination of field-sera from 12 months old foals from endemic areas in Brazil a seroprevalence of 90 % for *B. caballi* was obtained in both r-ELISA and IFAT as compared to 35 % in the CFT.

The r-ELISA is simple to perform, fast and more sensitive than the CFT. In contrast to the IFAT, the r-ELISA can be standardised. The r-ELISA is useful for seroepidemiological studies. Further investigations are necessary to determine the suitability for export testing.