

6 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Diagnose von *B. caballi*-Infektionen bei Pferden mit einem rekombinanten Fusionsprotein entwickelt, das Antigene der 48 und 50 kDa-Banden (BÖSE u. DAEMEN 1992) repräsentiert. Der ELISA wurde anhand von definierten Seren nicht-infizierter und experimentell infizierter Pferde validiert und seine Verwendung als Nachweisverfahren für *B. caballi*-Infektionen durch die Untersuchung von Feldseren überprüft. Die Ergebnisse wurden mit denen der Komplementbindungsreaktion (KBR) und des Immunofluoreszenz Antikörper-Tests (IFAT) verglichen.

Mit Plasmidklonen transformierte *E. coli*-Bakterien wurden kultiviert und anschließend lysiert. Die Reinigung der exprimierten Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine erfolgte durch Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose 4B im Zentrifugenröhrchen. Die rekombinante Glutathion-S-Transferase (GST) wurde in gleicher Weise behandelt und als Kontrollantigen für das rekombinante *B. caballi*-Fusionsprotein verwendet, um Reaktionen mit dem Fusionspartner GST erkennen zu können und falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Zur Berechnung der Spezifität des ELISA wurden 96 Seren von 93 nicht-infizierten Ponies untersucht. Die Spezifität betrug im ELISA sowie in der KBR und im IFAT 100 %.

Die Sensitivität wurde durch Untersuchung von insgesamt 111 Seren von 18 experimentell mit *B. caballi* infizierten Ponies ermittelt. Zehn dieser Ponies waren mit einem *B. caballi*-Stamm des USDA, 5 Ponies mit *B. caballi*-Isolaten aus Brasilien, zwei Ponies durch Übertragungsversuche mit im Feld gesammelten brasilianischen Zecken und ein Pony mit einem Isolat aus Kolumbien infiziert worden. Für den ELISA konnte mit diesen Seren eine Sensitivität von 100 % ab Tag 10 einer Infektion ermittelt werden. Mit diesem Wert war der ELISA sowohl der KBR (47,00 %) als auch dem IFAT (98,00 %) überlegen.

Die Richtigkeit betrug ab Tag 10 der experimentellen *B. caballi*-Infektionen im ELISA 100 %, in der KBR 72,96 % und im IFAT 98,97 %.

Bei der Untersuchung von 70 Seren von 13 mit *B. equi* experimentell infizierten Ponies traten im ELISA sowie in der KBR keine Kreuzreaktionen auf, während der Anteil an Kreuzreaktionen im IFAT 3 % betrug.

Bei der Untersuchung von insgesamt 421 europäischen und brasilianischen Feldseren wurden mit dem ELISA 274 Seren positiv beurteilt, mit der KBR 120 und mit dem IFAT 250 Seren. Die Richtigkeit dieser Ergebnisse wurde durch den hochspezifischen Western Blot mit nativem *B. caballi*-Antigen bestätigt.

Durch die Entwicklung dieses ELISA mit rekombinanten 48 und 50 kDa-Antigen wird eine sichere und speziesspezifische Diagnose von *B. caballi*-Infektionen bei Pferden gewährleistet.

SUMMARY

Institute of Parasitology, School of Veterinary Medicine Hannover, Germany
Simone Zoch (1997)

Development of an ELISA with recombinant 48 and 50 kDa-antigen for the diagnosis of *B. caballi* infections in horses.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of *B. caballi* infections in horses was developed based on a recombinant fusion protein representing antigens of the 48 und 50 kDa-bands (BÖSE u. DAEMEN, 1992). The ELISA was validated by examination of defined sera from experimentally infected horses and from horses not infected with *Babesia spp.*. The ELISA was used for diagnosis of *B. caballi* infections by examination of field sera. Results were compared with those obtained by the complement fixation test (CFT) and by the immunofluorescence antibody test (IFAT).

E. coli-bacteria, which were transformed with plasmids (pGEX-1 λ t) carrying a *B. caballi* cDNA insert, were cultivated and lysed afterwards. Purification of the expressed glutathione-S-transferase (GST) fusion proteins was done by affinity chromatography with glutathione-sepharose ® 4B in a tube. Recombinant glutathione-S-transferase (GST) was prepared in the same manner. It was used as a control antigen to detect reactions with the fusion partner GST and to avoid false positive results.

The specificity of the ELISA was determined by examining 96 sera of 93 horses not infected with *Babesia spp.*. The specificity of the ELISA, the CFT and the IFAT was 100 %.

The sensitivity was determined by the examination of 111 sera from 18 horses experimentally infected with *B. caballi*. Ten of these horses were infected by the USDA strain, 5 horses were infected by Brazilian isolates, two horses were infected by transmission experiments with field collected Brazilian ticks and one horse was infected by a Colombian isolate. The sensitivity of the ELISA obtained for these sera from day 10 after infection was 100 %. The ELISA was superior to the sensitivity of the CFT (47 %) and the IFAT (98 %).

The accuracy from day 10 after the experimental *B. caballi* infections of the ELISA was found to be 100 %, of the CFT it was 72,96 % and of the IFAT 98,97 %.

By examination of 70 sera from 13 horses experimentally infected with *B. equi* no crossreactions did occur in the ELISA and in the CFT. Crossreactions in the IFAT were 3 %.

By the examination of 421 European and Brazilian field sera 274 sera were positive in the ELISA, 120 were positive in the CFT and 250 in the IFAT. The accuracy of these results was confirmed by western blotting with native *B. caballi*-antigen.

Development of this ELISA based on recombinant 48 and 50 kDa-antigen allows a reliable and specific diagnosis of *B. caballi* infections in horses.