

**Aus dem Department für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Kurt Pfister**

**Angefertigt am
Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunologie und Zellbiologie
Laborgruppe Veterinär-Infektiologie und -Immunologie
(Prof. Dr. med. vet. Jabbar S. Ahmed)**

**Entwicklung und Validierung eines
kompetitiven Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstests
für den Nachweis von Antikörpern
gegen *Theileria annulata* im Serum von Rindern**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
(Dr. med. vet.)
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**von
Stefanie Renneker**

**aus
Bad Oldesloe**

München 2010

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Pfister
Korreferent: Prof. Dr. Rambeck

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	6
2	LITERATURÜBERSICHT.....	9
2.1	Durch Zecken übertragene Erkrankungen bei Nutztieren	9
2.2	Theilerien	9
2.2.1	Theilerien bei Rindern	10
2.2.2	Theilerien bei kleinen Wiederkäuern	11
2.3	<i>Theileria annulata</i> und Tropische Theileriose.....	12
2.3.1	Allgemeines.....	12
2.3.2	Epizootiologie und ökonomische Bedeutung.....	12
2.3.3	Lebenszyklus des Parasiten.....	14
2.3.4	Immunantwort des Wirtes auf eine Infektion mit <i>T. annulata</i>	15
2.3.5	Pathogenese.....	16
2.3.6	Klinische Leitsymptome	16
2.3.7	Pathologische Befunde	17
2.3.8	Differentialdiagnosen	17
2.3.9	Möglichkeiten der Bekämpfung von Tropischer Theileriose.....	18
2.3.9.1	Zeckenbekämpfung.....	18
2.3.9.2	Chemotherapie.....	19
2.3.9.3	Impfung	19
2.3.9.4	Infektion & Therapie	20
2.3.10	Diagnostik	21
2.3.10.1	Mikroskopie / Klinische Symptome.....	21
2.3.10.2	Molekularbiologische Methoden	21
2.3.10.3	Serologische Tests.....	21
2.3.10.3.1	ELISA - Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest	22
2.4	Zusammenfassende Darstellung der Problematik - Fragestellung.....	24
3	MATERIAL & METHODEN.....	26
3.1	Materialien & Hersteller	26
3.1.1	Antiseren und Antikörper.....	26
3.1.2	Molekulargewichtsstandards	27
3.1.3	Zelllinien.....	27
3.1.4	Kulturmedien für die Zellkultur.....	28
3.1.5	Bovine Seren.....	29
3.2	Methoden	30
3.2.1	Zellbiologische Methoden.....	30
3.2.1.1	Kultivierung von bovinen <i>Theileria</i> -infizierten Leukozyten	30
3.2.1.2	Kultivierung von COS-7 Zellen	30
3.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	31
3.2.1.4	Kryokonservierung von Zellen.....	31
3.2.1.5	Herstellung von Zelllysaten von infizierten Zellen.....	32
3.2.1.6	Transiente Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000.....	32
3.2.1.7	Herstellung von Zytocentrifugenpräparaten.....	33
3.2.1.8	Immunfluoreszenzfärbung.....	33

3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	35
3.2.2.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
3.2.2.2	Immunblotting von Elektrophoresegelen (Western Blot)	37
3.2.2.3	Ponceau S-Färbung	38
3.2.2.4	Immundetektion	38
3.2.2.5	Proteinbestimmung nach Lowry	40
3.2.2.6	Immunpräzipitation	40
3.2.2.7	ELISA: Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest	42
3.2.2.7.1	Ermittlung und Optimierung der Bedingungen für die einzelnen Reaktionspartner zur Etablierung des kompetitiven ELISA.....	45
3.2.2.7.2	Indirekter ELISA für den Nachweis von Antikörpern im Serum von <i>T. annulata</i> -infizierten Rindern	47
3.2.2.7.3	Kompetitiver ELISA für den Nachweis von Antikörpern im Serum von <i>T. annulata</i> -infizierten Rindern.....	48
3.3	Hardware und Software.....	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	Veröffentlichungen	50
4.1.1	Veröffentlichung # 1	50
4.1.2	Ergänzungen zu Veröffentlichung # 1	59
4.1.2.1	Subzelluläre Bindungsstelle des monoklonalen Antikörpers 1C7....	59
4.1.2.2	Optimierung des cELISA	61
4.1.2.3	Spezifität des cELISA.....	64
4.1.3	Veröffentlichung # 2	65
5	DISKUSSION	73
6	AUSBLICK.....	78
7	ZUSAMMENFASSUNG	80
8	SUMMARY	82
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	84
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	87
11	TABELLENVERZEICHNIS	88
12	LITERATURVERZEICHNIS	89
13	DANKSAGUNG.....	102

1 Einleitung

Tropische Theileriose ist eine durch den einzelligen Parasiten *Theileria annulata* hervorgerufene Erkrankung bei Rindern, die in tropischen und subtropischen Klimazonen der Erde vorkommt (Neitz, 1957; Dolan, 1989; Norval *et al.*, 1992; Mehlhorn *et al.*, 1994). Der Erreger wird durch Zecken übertragen und verursacht massive wirtschaftliche Schäden (Uilenberg, 1995; Brown, 1997). Die klinischen Symptome der Erkrankung reichen, abhängig von der Virulenz des Erregers und der Empfänglichkeit des betroffenen Tieres, von nicht erkennbaren über milde Krankheitserscheinungen wie leichtem Fieber und geringgradigem Nasenausfluss bis hin zu schwerem Durchfall und Lungenödem mit *Exitus letalis* (Neitz, 1957; Srivastava & Sharma, 1981).

Wichtig für die Ausbreitung des Erregers innerhalb eines bestimmten Gebietes sind vor allem die persistent infizierten, klinisch inapparenten Tiere (Reservoirwirte). Sie beherbergen den Parasiten dauerhaft und fungieren dadurch als Infektionsquelle, denn sie werden von Zecken befallen, die den Erreger bei der nächsten Blutmahlzeit an ein anderes, evtl. nicht-infiziertes Tier weitergeben. Diese Reservoirwirte müssen im Rahmen von epidemiologischen Studien und Überwachungsprogrammen sicher identifiziert werden, um genauere Kenntnisse über die Verbreitung zu erlangen und um geeignete Maßnahmen zur Verlust-Minimierung (z.B. Management, Vakzinierung) treffen zu können.

Es gibt verschiedene diagnostische Verfahren, um eine Infektion mit *Theileria annulata* nachzuweisen. In der frühen Phase der Erkrankung kann *T. annulata* direkt mittels mikroskopischer Untersuchung von Blut- oder Organausstrichen nachgewiesen werden (Laiblin, 1978; Mehlhorn & Schein, 1984). Diese Nachweismethode ist jedoch sehr zeit- und personalintensiv. Weiterhin werden moderne molekularbiologische Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der Reverse-Line Blot (RLB) erfolgreich für die Identifizierung von *T. annulata*-DNA in infizierten Rindern eingesetzt. Diese Methoden sind jedoch vergleichsweise teuer und verlangen vom durchführenden Personal ein hohes Maß an Kompetenz (d'Oliveira *et al.*, 1995; Gubbels *et al.*, 1999).

In späteren Phasen der Erkrankung und vor allem bei klinisch inapparenten, persistent infizierten Tieren sind serologische Tests am besten für die Diagnostik geeignet, weil der Antikörper-Titer signifikant höher ist als in der frühen Phase der Infektion (Bakheit *et al.*, 2004). Antikörper gegen *T. annulata* können mittels Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) nachgewiesen werden (BurrIDGE *et al.*, 1974), der im Vergleich zu Untersuchungen von Blutaussstrichen sensitiver ist (Dhar & Gautam 1977; Darghouth *et al.* 1996). Der IFAT ist jedoch zum einen in der Interpretation subjektiv und zum anderen hat er einen geringen Durchsatz, was besonders im Hinblick auf Massenuntersuchungen problematisch ist. Außerdem sind beim IFAT Kreuzreaktivitäten mit Antikörpern gegen andere *Theileria*-Spezies beobachtet worden (BurrIDGE *et al.* 1974; Kiltz *et al.* 1986). Die Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) und der Hämagglutinations-Hemmungs-Test (HAHT) eignen sich ebenfalls zum Nachweis spezifischer Antikörper (Uilenberg, 1981), aber auch diese beiden Testverfahren sind aufgrund derselben Restriktionen wie der IFAT nicht für ausgedehnte epidemiologische Untersuchungen geeignet, welche auf dem Nachweis von Antikörpern basieren.

Als gut geeignet für groß angelegte Untersuchungen hat sich der Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) erwiesen, denn er ist relativ preiswert, einfach und schnell durchführbar, standardisierbar und automatisierbar. Ein indirekter ELISA für den Nachweis einer Infektion mit *T. annulata* wurde auf der Basis eines immunreaktiven Oberflächenproteins, dem *Theileria annulata* Surface Protein (TaSP, Schnittger *et al.*, 2002), etabliert, validiert und für epidemiologische Studien verwendet (Bakheit *et al.*, 2004; Salih *et al.*, 2005a,b, 2007a,b; Seitzer *et al.*, 2007). Problematisch bei diesem Test ist jedoch, dass er nicht sicher zwischen *Theileria annulata* und *Theileria parva* bzw. *Trypanosoma brucei* unterscheiden kann, so dass er z.B. im Süden des Sudan, wo *T. annulata* und *T. parva* gemeinsam vorkommen (Salih *et al.*, 2007c), nicht für eine sichere Diagnose einer Infektion mit *Theileria annulata* eingesetzt werden kann. Untersuchungen von Seren experimentell mit *Babesia bovis* infizierter Rinder ergaben zwar keine falsch positiven Ergebnisse, dennoch besteht die Möglichkeit des Auftretens weiterer Kreuzreaktivitäten mit Antikörpern gegen noch nicht getestete Erreger.

Um nun einen diagnostischen Test zur Verfügung zu haben, der Antikörper gegen *Theileria annulata* spezifisch detektiert, ist in der vorliegenden Arbeit das System des kompetitiven ELISA (cELISA) gewählt worden. Aufgrund der Addition eines

monoklonalen Antikörpers (mAk), der lediglich an ein einziges Epitop des Antigens bindet und dadurch mit den in den Seren befindlichen Antikörpern, die an dasselbe Epitop binden, um die Bindungsstelle konkurriert, liefert das kompetitive System spezifischere Ergebnisse als das indirekte System (Knowles *et al.*, 1993). Der kompetitive ELISA wurde auf der Basis desselben Antigens (TaSP) wie der indirekte ELISA von Bakheit *et al.* (2004) mit Hilfe von 50 negativen und 33 positiven Seren aus Deutschland sowie 133 Seren aus dem Sudan entwickelt. Als monoklonaler Antikörper diente der Klon '1C7', der von Shiels *et al.* (1986a) generiert und von Schneider *et al.* (2004) als Marker für die Schizonten-Membran in *T. annulata*-infizierten Zellen verwendet worden ist. Um nun den mAk 1C7 für die Etablierung des cELISA verwenden zu können, mussten im Rahmen dieser Arbeit zunächst Untersuchungen zur subzellulären Bindungsstelle des 1C7 durchgeführt werden, die bestätigen, dass der Antikörper spezifisch an TaSP bindet. Es musste außerdem überprüft werden, ob der mAk 1C7 in der Lage ist, die Bindung von Serum-Antikörpern an rekombinantes TaSP kompetitiv zu hemmen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Durch Zecken übertragene Erkrankungen bei Nutztieren

Zecken werden vor allem wegen ihrer Bedeutung als Vektor zu den bemerkenswertesten Ektoparasiten der Nutztiere gezählt, da aufgrund von Erkrankungen, die durch Zecken übertragen werden, immense wirtschaftliche Verluste entstehen (Uilenberg, 1995; Jongejan & Uilenberg, 2004; de la Fuente *et al.*, 2008). Bei den Erkrankungen handelt es sich vornehmlich um Bovine Babesiose, Bovine Anaplasrose, Bovine Theileriose und um die Herzwasserkrankheit bei Rindern und kleinen Wiederkäuern, die von Uilenberg (1995) auch als ‚the big four‘ bezeichnet werden. Die durch Zecken übertragenen Erkrankungen gehören in tropischen und subtropischen Ländern zu den wichtigsten limitierenden Faktoren der Rinderhaltung (Brown, 1997), wobei die jährlichen, weltweiten ökonomischen Verluste auf einige Milliarden Dollar geschätzt werden (de Castro, 1997). Auch im Zuge der besonders in Afrika und Asien wachsenden Bevölkerung und dem damit verbundenen ansteigenden Lebensmittelbedarf kommt diesen Erkrankungen eine große Bedeutung zu (Unger, 1996; Fischer *et al.*, 1997).

2.2 Theilerien

Theilerien sind Protozoen, die durch verschiedene Zeckenspezies übertragen werden und bei Huftieren z.T. schwere systemische Erkrankungen und massive wirtschaftliche Verluste verursachen. Die einzelligen Parasiten gehören dem Stamm der Apikomplexa an, zu dem weitere für Mensch und Tier relevante Krankheitserreger wie *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Eimeria* und *Babesia* zählen. Einige Arten von Theilerien (*T. annulata*, *T. parva* und *T. lestoquardi*) haben die unter den Apikomplexa einzigartige Eigenschaft, die von ihnen infizierten Leukozyten des Wirtes zu transformieren, was zu einer unkontrollierten Proliferation der befallenen Zellen ähnlich einer Leukämie führt (Brown *et al.*, 1973; Shiels *et al.*, 1986a; Rocchi *et al.*, 2006).

2.2.1 Theilerien bei Rindern

Bei Rindern parasitieren verschiedene Theilerien-Spezies, von denen *Theileria annulata* und *Theileria parva* die größte wirtschaftliche Bedeutung zukommt. Im Folgenden werden die wichtigsten Spezies kurz dargestellt.

Der Erreger der Tropischen Theileriose ist als *Theileria annulata* beschrieben (Uilenberg, 1981), er wird später genauer erläutert.

Theileria parva verursacht das Ostküstenfieber und kommt in ost-, zentral- und südafrikanischen Ländern vor, wobei sich das Verbreitungsgebiet mit dem der Überträgerzecke *Rhipicephalus appendiculatus* deckt (Perry *et al.*, 1991; Uilenberg, 1995). In den betroffenen Gebieten kommt der Erreger in endemischer Stabilität vor, doch auch bei einheimischen Rinderrassen werden Kälberverluste bis zu 30% beobachtet, wohingegen die Mortalität bei importierten Rindern 90% bis 100% betragen kann (Irvin, 1985; Uilenberg, 1995; Perry & Young, 1995). Für den afrikanischen Raum stellt das Ostküstenfieber die bedeutendste durch Zecken übertragene Krankheit dar (Rosenberger, 1994; Gitau *et al.*, 1997). Schätzungen der Mortalität infolge Ostküstenfieber für das Jahr 1989 ergaben, dass über eine Million Rinder in elf afrikanischen Ländern dieser Krankheit zum Opfer fielen. Die absoluten ökonomischen Kosten für das Ostküstenfieber einschließlich Tierverluste, Ausgaben für Kontrolle und Forschung beliefen sich für dasselbe Jahr auf ca. 168 Millionen Dollar (Mukhebi *et al.*, 1992). Neben dem Ostküstenfieber verursacht *T. parva* auch die Korridor-Krankheit (Südafrika) und die Januar-Krankheit (Simbabwe), welche dem Ostküstenfieber sehr ähnlich sind, aber durch unterschiedliche Stämme von *T. parva* verursacht werden (Uilenberg, 1999).

Von den rund 63 Millionen in Ost-, Zentral- und Süd-Afrika gehaltenen Rindern sind ca. 24 Millionen einem Infektionsrisiko mit *Theileria parva* ausgesetzt (ILRAD, 1992), womit die durch *T. parva* verursachten Erkrankungen zu den bedeutendsten und kostenaufwendigsten Rinderkrankheiten überhaupt zählen.

Theileria mutans parasitiert bei Rindern, Zebus und Büffeln in Afrika südlich der Sahara, wobei die Mehrzahl der Infektionen klinisch inapparent verläuft. Es gibt Berichte über das Vorkommen pathogener Linien von *T. mutans* in Ost-Afrika mit Auftreten von Fieber und Anämie (Norval *et al.*, 1992). Vektoren sind Zecken der Gattung *Amblyomma*.

In China, Korea und Japan ist *T. sergenti* (Jeong *et al.*, 2005) weit verbreitet, dessen Überträger *Haemaphysalis longicornis* ist. Eine Infektion mit *T. sergenti* führt in erster Linie zu Fieber und Anämie.

T. buffeli wird bei Rindern in Australien, Japan, Korea, Malaysia und den USA nachgewiesen, wobei der Vektor in Australien *Haemaphysalis humerosa* ist (Gubbels *et al.*, 2000a).

Theileria orientalis kommt in Europa wie z.B. Frankreich und Portugal (L'Hostis *et al.*, 2002; Brigido *et al.*, 2004) und Nordafrika vor und wird durch *Haemaphysalis punctata* übertragen.

Letztere drei *Theileria*-Arten sind noch nicht eindeutig voneinander abgegrenzt und werden deshalb auch als *Theileria sergenti/buffeli/orientalis*-Komplex bezeichnet (Fujisaki *et al.*, 1994).

Für das Rind avirulente *Theileria*-Spezies sind *T. velifera* und *T. taurotragi*, die durch *Amblyomma*- respektive *Rhipicephalus*-Arten übertragen werden.

2.2.2 Theilerien bei kleinen Wiederkäuern

Bei kleinen Wiederkäuern kommen sechs verschiedene Spezies von Theilerien mit unterschiedlicher Pathogenität vor. So ist *T. lestoquardi* (= *T. hirci*) der Erreger der bösartigen Theileriose bei Schaf und Ziege (Morel & Uilenberg, 1981). *T. lestoquardi* kommt in Afrika, Südosteuropa, Kleinasien, Südrussland und Indien vor und wird durch *Hyalomma anatolicum anatolicum* übertragen. Weitere Spezies sind *T. ovis*, *T. separata* (beide übertragen durch *Rhipicephalus evertsi*), *T. recondita*, *T. sp.1* (China) und *T. sp.2* (China) (Ahmed *et al.*, 2006). Letztere zwei Arten sind von Yin *et al.* (2007) als *T. luwenshuni* und *T. uilenbergi* beschrieben worden und werden durch *Haemaphysalis qinghaiensis* übertragen. Die Transmission von *T. recondita* erfolgt durch *Haemaphysalis punctata* (Alani & Herbert, 1988).

2.3 *Theileria annulata* und Tropische Theileriose

2.3.1 Allgemeines

Entdeckt und zum ersten Mal beschrieben wurde *Theileria annulata* von Dschunkowsky und Luhs (1904). Der Erreger wird durch Zecken der Gattung *Hyalomma* übertragen (Robinson, 1982) und entwickelt sich in den Leuko- und Erythrozyten des Wirtes (Srivastava & Sharma, 1981; Mehlhorn, *et al.*, 1994). *Theileria annulata* ist der Erreger der Tropischen Theileriose, die bei Rindern, Yaks und Büffeln in tropischen und subtropischen Klimazonen der Erde vorkommt und besonders bei hochgezüchteten Importrindern eine hohe Sterblichkeit und bei Kreuzungsrassen massive ökonomische Verluste verursacht (Norval *et al.*, 1992; Mehlhorn *et al.*, 1994).

2.3.2 Epizootiologie und ökonomische Bedeutung

Tropische Theileriose erstreckt sich von den mediterranen Uferzonen Südeuropas und Nordafrikas nach Süden bis in den Sudan und durch den mittleren Osten und Zentralasien bis nach Indien und China (Dolan, 1989; Uilenberg, 1995) und es gibt Berichte über das Vorkommen der Erkrankung in Eritrea und Mauretanien (Uilenberg, 1981; Jacquiet *et al.*, 1990). Die Verbreitung von *T. annulata* ist in Abbildung 1 dargestellt. Weltweit gelten 250 Mio. Tiere als infektionsgefährdet (Tait & Hall, 1990). Musoke *et al.* (1996) sprechen sogar von 500 Mio. infektionsgefährdeten Tieren und die Erkrankung verursacht allein in Indien pro Jahr einen Verlust von 800 Mio. US\$ (Brown, 1990).

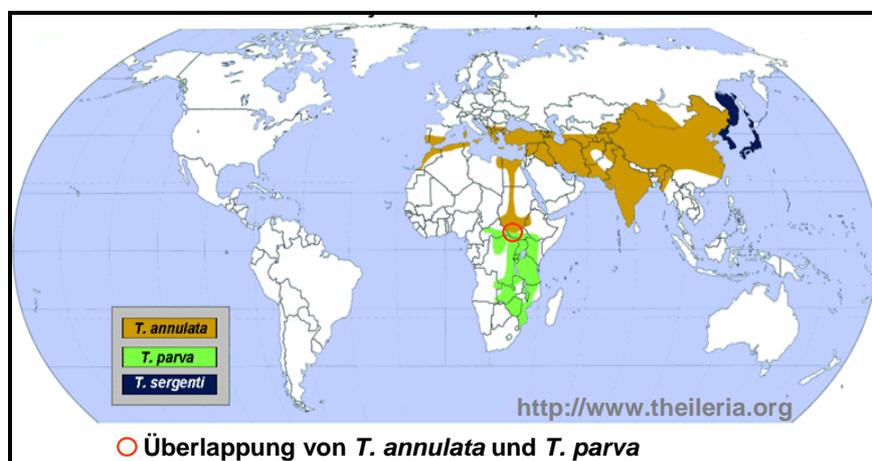


Abb. 1 Verbreitung von *T. annulata*, *T. parva* und *T. sergenti* weltweit

Das ökonomische Ausmaß der Tropischen Theileriose wird von der jeweiligen lokalen endemischen Situation bestimmt, welche durch das Verhältnis zwischen Umwelt, Vektor, Parasit und Wirt gekennzeichnet ist (Norval *et al.*, 1992). In der Epizootiologie der Erkrankung reicht das Spektrum von einer stabilen bis zu einer instabilen endemischen Situation und ist abhängig von Faktoren wie Klima, Management, Rasse, Haltungstradition und Produktionsrichtung (Perry, 1994). Eine endemisch stabile Situation ist gekennzeichnet durch hohe serologische Prävalenzraten (Deem *et al.*, 1993) bei gleichzeitig niedriger klinischer Inzidenz und Letalitätsrate (Perry & Young, 1995). Je instabiler die Situation wird, desto niedriger sind die Seroprävalenzen und desto mehr steigen die klinische Inzidenz und die Letalitätsrate (O'Callaghan *et al.*, 1994; Perry, 1994).

Empfängliche Rinder, die in Gebieten gehalten werden, in denen die Vektoren vorkommen, sind prinzipiell gefährdet sich mit *T. annulata* zu infizieren. Besonders betroffen sind die extensiv gehaltenen Tiere, die den Großteil der Gesamtpopulation repräsentieren. Abhängig vom Klima (v. a. Temperatur und Feuchtigkeit) gibt es saisonale Schwankungen beim Vorkommen der Erkrankung, die mit der Aktivität der Vektoren zusammenhängen (Perry *et al.*, 1991; Uilenberg, 1995).

Für jede Erkrankung, so auch für die Tropische Theileriose, existieren bestimmte Risikofaktoren. Zum einen spielt das Alter eine wichtige Rolle, denn es gibt eine gewisse Jungtierresistenz durch maternale Antikörper (Perry & Randolph, 1999), und zum anderen sind sowohl der Ort der Tierhaltung (Feuchtgebiete, viel Buschwerk etc.) als auch das Management (Aufstellungsmöglichkeiten, Maßnahmen gegen Zeckenbefall) bedeutsam (Irvin, 1987; Salih *et al.*, 2007a). Die Rasse der Rinder hat ebenfalls Einfluss auf die Ausprägung der Erkrankung. Einheimische Rinderrassen sind im Vergleich zu importierten, hochgezüchteten Rassen resistenter, denn die Resistenz einer lokalen Rinder-Population ist das Ergebnis einer lange andauernden, natürlichen Selektion (Uilenberg, 1995). Ferner muss die Struktur der Betriebe in den betroffenen Gebieten betrachtet werden, denn es gibt viele Kleinbetriebe, die häufig am Existenzminimum leben und finanziell nicht in der Lage sind, teure Arzneimittel für die Zeckenprophylaxe oder die Behandlung der erkrankten Tiere zu erwerben (Perry *et al.*, 2002). Daher zielt die Bekämpfungsstrategie auf kostengünstige und verlässliche diagnostische Testverfahren in Kombination mit ebenfalls preiswerten und sicheren Impfstoffen gegen die Tropische Theileriose.

2.3.3 Lebenszyklus des Parasiten

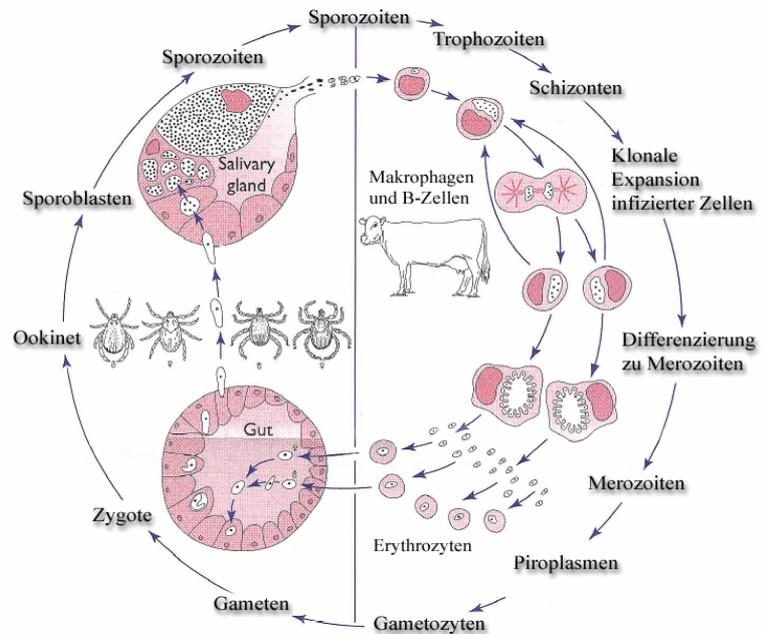
Der Lebenszyklus von *Theileria annulata* besteht aus drei Phasen: Sporogonie, Schizogonie und Gamogonie. Dabei durchläuft der Parasit eine asexuelle und eine sexuelle Phase der Vermehrung, die mit einem Wirtswechsel assoziiert ist. In der den Parasiten übertragenden Zecke (Endwirt) findet die sexuelle Vermehrung (Gamogonie) und die Sporogonie statt, wohingegen sich im Rind (Zwischenwirt), die asexuelle Vermehrung in Form von Schizogonie und Merogonie ereignet. Der Zyklus im Zwischenwirt beginnt in dem Moment, wenn die Sporozoiten, welche das infektiöse Stadium des Parasiten repräsentieren, die Speicheldrüsen der Zecke beim Saugakt verlassen und in das Blutgefäßsystem des Wirtes eindringen. Die Sporozoiten infiltrieren ihrerseits die Leukozyten (Jura *et al.*, 1983; Shaw, 1997; Shaw, 2003) und entwickeln sich durch Schizogonie innerhalb von 24-48 Stunden zum Makroschizonten, einem vielkernigen Syncytium, das durch wiederholte Kernteilungen ohne anschließende Zellteilung entsteht. Der Makroschizont repräsentiert das Stadium des Parasiten, welches die für Protozoen einzigartige Wirtszelltransformation und Proliferation verursacht.

Ausgelöst durch die Fieberreaktion des Tieres (Glascodine *et al.*, 1990) differenziert sich der Makroschizont über Mikroschizonten zu Merozoiten, die dann ihrerseits in die Erythrozyten eindringen (Shaw & Tilney, 1992; Mehlhorn & Schein, 1984) und sich als sogenannte (runde oder ovale) Piroplasmen in diesen Zellen vermehren, wobei man die Vermehrungsstadien in den Erythrozyten häufig in Form eines ‚Malteser Kreuzes‘ (Uilenberg, 1981) findet. Die Piroplasmenstadien des Parasiten werden während des Saugaktes von den Zecken aufgenommen und durchlaufen im Zeckendarm eine Gamogonie, die zur Bildung von Zygoten führt. In den Epithelzellen des Darmes entwickeln sich die Zygoten zu beweglichen Ookineten, die dann über die Haemolymphe in die E-Zellen der Speicheldrüsen wandern, wo sie sich zu inaktiven Sporoblasten entwickeln. Nach der folgenden Häutung der Zecke entstehen aus den Sporoblasten während des Saugaktes tausende infektiöse Sporozoiten (Fawcett *et al.*, 1982), die bei der Blutmahlzeit in den Wirt inokuliert werden, womit der Kreislauf von neuem beginnt. Die Übertragung des Parasiten innerhalb der Zecke verläuft ausschließlich transstadial (Uilenberg, 1981). In Abbildung 2 ist der Lebenszyklus von *T. annulata* vollständig dargestellt.

Abb. 2 Lebenszyklus von *T. annulata*

Sporozoiten befallen bovine Makrophagen und B-Zellen und induzieren über die Bildung von Schizonten deren unbegrenzte klonale Expansion. In manchen Zellen differenzieren die Schizonten zu Merozoiten und Piroplasmen, die in die Blutbahn abgegeben werden und dort die roten Blutzellen befallen. Wenn eine Zecke Blut infizierter Rinder saugt, kommt es im Zeckendarm zur Ausbildung von Mikro- und Makrogameten, die zu einer Zygote fusionieren. Daraus entsteht ein beweglicher Ookinet, der das Darmepithel durchbricht und mit der Lymphflüssigkeit zu den Zellen der Speicheldrüsen gelangt. Dort differenzieren sich die Ookineten zu Sporoblasten, die sich ungeschlechtlich vermehren. Beim Saugakt des folgenden Zeckenstadiums werden die reifen Sporozoiten in den nächsten Wirt übertragen.

In Anlehnung an Mehlhorn & Schein (1984) und modifiziert nach Preston & Jongejan (1999).



2.3.4 Immunantwort des Wirtes auf eine Infektion mit *T. annulata*

Der Verlauf einer Primärinfektion wird wesentlich durch immunsuppressive und immunpathologische Vorgänge geprägt. Die Sporozoiten befallen vorzugsweise Haupthistokompatibilitäts-Komplex (Major Histocompatibility Complex - MHC) Klasse II positive Zellen (Makrophagen und B-Zellen) *in vitro* (Spooner *et al.*, 1988; Glass *et al.*, 1989), wohingegen *in vivo* die Monozyten als Hauptzielzellen gelten (Forsyth *et al.*, 1997). Nach überstandener Infektion entwickelt sich eine über Jahre hinweg belastbare Immunität gegen erneute Infektionen (Pipano, 1981). Spezifische Antikörper werden gebildet und bewirken eine partielle Immunität gegen freie Sporozoiten und Merozoiten (Preston *et al.*, 1999), bieten jedoch keinen Schutz gegen die Etablierung einer Primärinfektion (Ahmed *et al.*, 1988 und 2007). Die zellvermittelte Immunität ist effizienter, denn sie richtet sich in erster Linie gegen das Schizontenstadium, welches für den Hauptanteil der klinischen Symptome verantwortlich ist (Irvin, 1985). Das Schizontenstadium wird sowohl durch die angeborene (NK-Zellen, Makrophagen) als auch durch die erworbene Immunität (zytotoxische T-Zellen, T-Helfer-Zellen, B-Zellen) kontrolliert (Preston *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2007), wobei den CD8⁺ T-Zellen eine besondere Bedeutung zukommt (Ahmed & Mehlhorn, 1999; McKeever *et al.*, 2009; MacHugh *et al.*, 2009).

2.3.5 Pathogenese

Nach einer ca. achttägigen Inkubationszeit (Mehlhorn *et al.*, 1994) kommt es bei Tropischer Theileriose zunächst zu einer massiven Hyperplasie mononukleärer Zellen und danach zur Lymphozytolyse, wofür multifaktorielle immunologische Prozesse verantwortlich sind. In Lymphknoten, Milz, Leber, Nieren, Thymus, Knochenmark, Labmagen und Darm vermehren sich lymphoide Zellen nahezu unbegrenzt und verursachen z.T. lymphomartige Wucherungen (Eckert *et al.*, 2008). Später sind aktivierte Makrophagen mit gesteigerter Phagozytoseaktivität (Hämosiderophagen durch Erythrophagie) sowie hochgeregelter TNF-Synthese als Ursache für Fieber, Entzündungen und spätere Kachexie anzusehen (Forsyth *et al.*, 1999). Letztendlich finden MHC-unabhängige zytotoxische Vorgänge über NK-Zellen mit Lymphozytolyse und gestörter Leukopoese statt und im finalen Stadium treten Nekrosen und Hämorrhagien in allen Organen auf (Srivastava & Sharma, 1981), wobei die Pathomechanismen im einzelnen noch nicht geklärt sind. Bei letalem Ausgang der Infektion sterben die Tiere i.d.R. nach zwei bis vier Wochen. Überlebende Rinder sind häufig unproduktive Kümmerer, die den Parasiten dauerhaft beherbergen und als Reservoirwirte oder Carrier bezeichnet werden (Uilenberg, 1981; Irvin & Morrison, 1987).

2.3.6 Klinische Leitsymptome

Die Erkrankung beginnt mit Apathie, Schwäche und hohem Fieber (41°C), bei Kühen auch mit plötzlichem Milchrückgang (Uilenberg, 1981). Herz- und Atemfrequenz sind stark beschleunigt, die Schleimhäute blass und leicht ikterisch und die Tiere weisen Tränen-, Nasen- und Speichelfluss, Lymphknotenschwellungen und z. T. blutige Diarrhoe auf (Giesecke & Wiesenhütter, 1965; Mehlhorn *et al.*, 1994), wobei die Ausprägung der klinischen Symptome von der Menge der inokulierten Sporoziten abhängig ist (Radley *et al.*, 1974; Morzaria & Nene, 1990; Preston *et al.*, 1992 und 1999).

Durch den massiven Befall mit Makroschizonten und einer hochgradigen Parasitämie von bis zu 80% beträgt die Mortalität bei einer Infektion mit *T. annulata* von 60% bis 90% (Brown, 1990; Uilenberg, 1981; Seifert, 1996). Die Mortalität ist ihrerseits von der Virulenz des Erregers und der Anfälligkeit des Rindes abhängig (Uilenberg, 1995; Perry & Young, 1995), denn Rasse, Ernährungszustand, Immunsystem und

vorausgegangene Erkrankungen spielen eine wichtige Rolle für die Ausprägung des klinischen Bildes (Morzaria & Nene, 1990; Irvin, 1987). Während des terminalen Stadiums leiden die Tiere unter einem hochgradigen Lungenödem mit schwerer Atemnot, Leukopenie, hämolytischer Anämie, Bilirubinämie und -urie sowie Ikterus (Neitz, 1957). Jene Tiere, die sich von einer Infektion erholen, weisen keine klinischen Symptome nach einer Superinfektion auf (Gautam, 1981; Brown, 1990), stellen jedoch zeitlebens ein Erregerreservoir dar (Uilenberg, 1981; Irvin & Morrison, 1987).

2.3.7 Pathologische Befunde

Befunde bei der Sektion sind neben Schleimhautblutungen und Nekrosen in allen Organen starke Schwellungen von Lymphknoten, Milz, Leber sowie nichteitriges Nephritis und ein z.T. hochgradiges Lungenödem (Srivastava & Sharma 1981; Mehlhorn *et al.*, 1994). Nach ein bis zwei Wochen kommt es zu einem Multiorganversagen, das letztendlich zum Tode des erkrankten Rindes führt (Uilenberg, 1981), wobei das Versagen der Lunge meist die primäre Todesursache darstellt. In fast allen Organen kann der Parasit *post mortem* nachgewiesen werden (Forsyth *et al.*, 1999).

2.3.8 Differentialdiagnosen

In Regionen der Welt, in denen die Erkrankung vorkommen kann, sollte bei Fieber und Anämie im Rind immer die Tropische Theileriose als mögliche Ursache in Betracht gezogen werden (Uilenberg, 1981). Differentialdiagnostisch sind im Speziellen neben *Theileria parva* und weiteren Arten von *Theileria* insbesondere Babesiose und Anaplasmosen in Betracht zu ziehen (Giesecke & Wiesenhütter, 1965; Morzaria & Nene, 1990). Außerdem sollte an die Herzwasserkrankheit, Trypanosomose und Bösartiges Katarrhalfieber gedacht werden (CFSPH, 2003).

2.3.9 Möglichkeiten der Bekämpfung von Tropischer Theileriose

Die Kontrolle der Tropischen Theileriose erfolgt durch vier verschiedene Ansätze: Zeckenbekämpfung, Chemotherapie, Impfung und die Methode ‚Infektion & Therapie‘ (Boulter & Hall, 2000).

2.3.9.1 Zeckenbekämpfung

Die Bekämpfung der Vektor-Zecken ist ein möglicher Ansatz zur Kontrolle der Tropischen Theileriose, sie gestaltet sich jedoch sehr schwierig (Uilenberg, 1981; de la Fuente & Kocan, 2006). Weiterhin gibt es Autoren (Tatchell, 1981; Young *et al.*, 1988; Pipano & Grewal 1990), die eine Zeckenbekämpfung nur in moderatem Maße empfehlen, um die direkten Schäden (z.B. Haut-/ Lederschäden, Schaffung von Infektionspforten, Blutentzug) zu reduzieren, da für den Erhalt der endemischen Stabilität die Infektionskette nicht unterbrochen werden sollte (Deem *et al.*, 1993; Perry & Young, 1995).

Bei der konventionellen Zeckenbekämpfung werden Akarizide als Tauchbäder oder Sprays verwendet (Chizyuka & Mulilo, 1990). Neuere Methoden sind Akarizid-imprägnierte Ohrmarken, Pansen-Boli, die einen Wirkstoff gegen Zecken langsam freisetzen und Akarizide zum Aufgießen (pour-on) (de Castro & Newson, 1993). Letztere Möglichkeiten der Zeckenbekämpfung sind zwar anwenderfreundlich, haben aber dennoch Nachteile hinsichtlich der hohen Kosten, der möglichen Kontamination von Fleisch und Milch sowie der Resistenzbildung bei den Zecken (Young *et al.*, 1988; de Castro, 1997).

Im Bereich des Managements gibt es Möglichkeiten, die Tiere weitgehend vor einem Befall mit Zecken zu schützen, entsprechende Maßnahmen sind jedoch häufig teuer und aufwendig und für extensiv wirtschaftende Kleinbetriebe somit nicht praktikabel. So können ganze Herden, insbesondere im Falle von importierten Hochleistungskühen, auf kleinen Flächen oder in Ställen gehalten und mit zeckenfreiem Futter versorgt und zusätzlich in regelmäßigen Abständen mit Akariziden behandelt werden (Lawrence, 1990).

Eine Vakzinierung gegen Zecken mit Antigenextrakten ist teilweise erfolgreich (Kay & Kemp, 1994). Untersuchungen von Willadsen *et al.* (1996 und 2004) und von de la Fuente & Kocan (2003 und 2006) ergaben vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich

der Immunisierung gegen *Boophilus microplus* und auch gegen *Hyalomma anatolicum anatolicum* ist laut Gosh *et al.* (2008) ein Impfstoff in der Entwicklung.

2.3.9.2 Chemotherapie

Eine Chemotherapie wird eher selten für die Behandlung von Infektionen mit *T. annulata* durchgeführt, ist aber bedeutend bei der Bekämpfung von Infektionen mit *T. parva* (Uilenberg, 1995). Zur Behandlung werden Parvaquon (Clexon®) (McHardy *et al.*, 1985a) und Buparvaquon (Butalex®) (McHardy *et al.*, 1985b) eingesetzt, wobei Parvaquon gegen alle Stadien des Parasiten wirkt, wohingegen die Wirkung von Buparvaquon nur gegen das Schizontenstadium gerichtet ist.

Eine Therapie ist in jedem Falle sehr teuer, so dass die genannten Behandlungsmaßnahmen für die Mehrzahl der Tierhalter aus den betroffenen Regionen unwirtschaftlich sind.

2.3.9.3 Impfung

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Zeckenbekämpfung und der Therapie ist die Entwicklung neuer, wirksamer und kostengünstiger Vakzinen zentraler Bestandteil der Forschung. Die Impfung basierend auf einer Inokulierung der Tiere mit einer attenuierten Zelllinie ist die am weitesten verbreitete Methode, um die Infektion mit *T. annulata* zu kontrollieren, wobei es sich bei der Zelllinie um Schizonten-infizierte Zellen handelt, die kontinuierlich *in vitro* kultiviert werden. Die Produktion und Verwendung dieser Zellkultur-Vakzine ist von zahlreichen Autoren beschrieben worden (Pipano, 1989; Brown, 1990). In Israel, dem Iran, Marokko, Tunesien, Indien, China und Usbekistan sind attenuierte Vakzinen gegen *T. annulata* erfolgreich eingesetzt worden (Überblick von Shkap *et al.*, 2007).

Für mögliche molekular-basierte Impfstoffe wurden Sporozoitenproteine getestet, die das Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle verhindern sollen (Musoke *et al.*, 1993 und 1996). Für *T. annulata* wurde das Sporozoitenprotein SPAG-1 identifiziert und charakterisiert (Williamson *et al.*, 1989), und ein Antikörper gegen SPAG-1 hatte eine neutralisierende Wirkung auf die Infektiosität der Sporozoiten für die Wirtszelle (Hall *et al.*, 2000). Immunisierungsversuche mit rekombinantem SPAG-1 führten allerdings zu keiner vollständigen und belastbaren Immunität, weshalb es notwendig ist, weitere

Proteine aus verschiedenen Entwicklungsstadien des Erregers zu identifizieren, zu charakterisieren und deren Potential als Impfstoff zu untersuchen (Perry & Young, 1995). Dass dies ein möglicher Ansatz ist, zeigten Versuche, bei denen eine gleichzeitige Vakzinierung mit einer attenuierten Zelllinie und dem SPAG-1 Protein einen synergistischen Effekt hatten (Darghouth *et al.*, 2006).

2.3.9.4 Infektion & Therapie

Diese Methode wurde ursprünglich für *T. parva* entwickelt, da eine Attenuierung *in vitro* bei *T. parva* nicht möglich ist. Wie der Name vermuten lässt, werden die Tiere mit einer definierten Dosis von Sporozoiten infiziert und danach mit einem Chemotherapeutikum behandelt (Radley, 1981; Hashemi-Fesharki, 1988). Dabei ist die Wahl des optimalen Zeitpunktes von entscheidender Bedeutung, denn eine zu früh angesetzte Behandlung könnte den Parasiten vor seiner Etablierung in den Leukozyten eliminierten, so dass keine Immunität aufgebaut werden kann. Andererseits müssen Arzneimittel früh genug appliziert werden, um das Auftreten klinischer Symptome zu verhindern (Morzaria & Nene, 1990). Diese Art von Impfung führt zu einer soliden Immunität, aber sie hat auch Nachteile, denn es werden virulente Parasitenstämme für die Impfung verwendet und die Tiere entwickeln Piroplasmestadien in den Erythrozyten, wodurch die Übertragung der Erkrankung auf ungeschützte Rinder begünstigt wird (Young *et al.*, 1981). Weiterhin muss für die gesicherte Wirkung eines solchen Impfstoffes die Kühlkette aufrechterhalten werden, was in den betroffenen Ländern häufig ein Problem darstellt (Uilenberg, 1995).

2.3.10 Diagnostik

2.3.10.1 Mikroskopie / Klinische Symptome

Traditionell und auch heute noch wird die Tropische Theileriose via Mikroskopie diagnostiziert. In der frühen Phase der Erkrankung kann *Theileria annulata* direkt mittels mikroskopischer Untersuchung von Blut- oder Organausstrichen nachgewiesen werden. In den Erythrozyten sind dabei 1-2 µm große runde Gebilde zu erkennen und bei Lymphknotenausstrichen befinden sich in den Zellen die ca. 8 µm großen Makroschizonten, die bereits 1898 von Robert Koch entdeckt wurden und die seitdem als Koch'sche Kugeln bezeichnet werden.

Auch kann anhand der typischen klinischen Symptome wie Fieber über 41°C, Vergrößerung der Lymphknoten oder Nasen- und Augenausfluss eine Verdachtsdiagnose gestellt werden (Uilenberg, 1981).

2.3.10.2 Molekularbiologische Methoden

Moderne molekular-biologische Methoden für die Diagnostik wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der Reverse-Line Blot (RLB) werden erfolgreich für die Identifizierung von mit *T. annulata* infizierten Rindern verwendet, aber diese Methoden sind vergleichsweise teuer und verlangen vom durchführenden Personal eine nicht unerhebliche Kompetenz (d'Oliveira *et al.*, 1995; Gubbels *et al.*, 1999). Durch PCR und RLB wird die DNA des Parasiten detektiert, so dass der Einsatz dieser Methoden vor allem in der frühen Phase der Infektion sinnvoll ist.

2.3.10.3 Serologische Tests

In späteren Phasen der Erkrankung und vor allem bei klinisch inapparenten, persistent infizierten Tieren, den Reservoirwirten, sind serologische Tests am besten für die Diagnostik geeignet, weil einerseits die Parasitämie kaum noch nachzuweisen ist und andererseits der Antikörper-Titer signifikant höher ist als in der frühen Phase der Infektion (Bakheit *et al.*, 2004). Da die Mehrzahl der betroffenen Tiere einheimische oder mit europäischen Rassen gekreuzte Rinder sind und damit Reservoirwirte darstellen, müssen umfangreiche Studien durchgeführt werden, die die Verbreitung der Tropischen Theileriose im Rahmen von epidemiologischen

Untersuchungen und Kontroll-Programmen inklusive der Anwendung von attenuierten Vakzinen überwachen.

Antikörper gegen *T. annulata* können mittels Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) nachgewiesen werden (Burridge *et al.*, 1974), der im Vergleich zu Untersuchungen von Blutaussstrichen sensitiver ist (Dhar & Gautam 1977; Darghouth *et al.* 1996), aber zum einen in der Interpretation subjektiv ist und zum anderen einen geringen Durchsatz hat, was besonders im Hinblick auf Massenuntersuchungen problematisch ist. Weiterhin sind beim IFAT Kreuzreaktivitäten mit anderen *Theileria*-Spezies beobachtet worden (Burridge *et al.* 1974; Kiltz *et al.* 1986). Die Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) und der Hämagglutinations-Hemmungs-Test (HAHT) eignen sich ebenfalls zum Nachweis spezifischer Antikörper (Uilenberg, 1981), aber auch diese beiden Testverfahren sind aufgrund derselben Restriktionen wie der IFAT nicht für Antikörpernachweise im großen Stil geeignet.

Serologische Untersuchungen wurden z.B. im Sudan in den frühen 1980ern durchgeführt und ergaben einen Rückgang der Prävalenz von Antikörpern gegen *Theileria annulata* im Serum der getesteten Rinder von 90% in Khartoum auf weniger als 13% im Ursprungsbereich des Blauen Nils, was im Zusammenhang mit der Verteilung und der Menge von *Hyalomma anatolicum anatolicum* in diesen Gebieten steht (FAO, 1983; Jongejan *et al.*, 1987). Im Gegensatz dazu betrug die Prävalenz von *T. annulata*-DNA bei Rindern in Khartoum ermittelt durch Reverse-Line Blot (RLB) lediglich 65% (Ali *et al.*, 2006).

2.3.10.3.1 ELISA - Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest

Der Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) wird von Luttmann *et al.* (2004) als der am häufigsten angewendete quantitative Immuntest bezeichnet, wobei das Prinzip des ELISA zeitgleich von zwei verschiedenen Laborgruppen in Frankreich und Schweden beschrieben wurde (Avrameas & Guilbert, 1971; Engvall & Perlman, 1971). Die Handhabung dieses Tests ist vergleichsweise unkompliziert und es hat sich herausgestellt, dass der ELISA zuverlässig, wirtschaftlich, reproduzierbar und automatisierbar bei einem hohen Mengendurchsatz ist und sich deshalb gut für groß angelegte Untersuchungen eignet.

Bis heute wurden für den Nachweis einer Infektion mit *T. annulata* mittels indirektem ELISA zwei Ansätze auf der Grundlage rekombinant exprimierter Proteine beschrieben, die mehr oder weniger geeignet sind, Antikörper gegen *T. annulata* nachzuweisen.

Glascodine *et al.* (1990) und Dickson *et al.* (1993) beschrieben Tams-1 als ein polymorphes und immundominantes Oberflächenprotein des Merozoiten- bzw. Piroplasmenstadiums von *T. annulata*. Ein indirekter ELISA auf der Grundlage von Tams-1 wurde von Gubbels *et al.* (2000b) entwickelt, aber genetische Variationen beschränken die Anwendung dieses Proteins im Zuge von diagnostischen Tests wie dem ELISA (Altay *et al.*, 2007). Weiterhin werden Antikörper gegen Tams-1 erst in der letzten Phase des Infektionszyklus gebildet, was wiederum dazu führt, dass die Infektion erst 3 Monate *p.i.* sicher nachgewiesen werden kann (Gubbels *et al.*, 2000b). Ein weiterer Nachteil dieses ELISA sind die beobachteten Kreuzreaktionen mit *T. parva*, die die Anwendbarkeit des Tests zusätzlich beschränken (Gubbels *et al.*, 2000b).

Ein indirekter ELISA für den Nachweis einer Infektion mit *T. annulata* wurde außerdem auf der Basis eines immunreaktiven Oberflächenproteins, dem *T. annulata* Surface Protein (TaSP, Schnittger *et al.*, 2002), etabliert, validiert und für epidemiologische Studien verwendet (Bakheit *et al.*, 2004; Salih *et al.*, 2005a,b, 2007a,b; Seitzer *et al.*, 2007). Der Test ist auf der Basis von 50 negativen Seren aus Deutschland und 140 Feldseren aus dem Sudan entwickelt worden. Sämtliche Seren wurden für die initiale Validierung mittels IFAT (Pipano & Cahana, 1969; BurrIDGE *et al.*, 1974) getestet und der ELISA wies anhand dieser Untersuchungen eine Sensitivität von 99,1% und eine Spezifität von 90,47% auf (Bakheit *et al.*, 2004). Der indirekte ELISA zeigte keine Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen *Babesia bovis*, einem eng verwandten Erreger von *T. annulata*, aber Untersuchungen mit Serum von Rindern, die experimentell mit *Theileria parva* infiziert wurden, wiesen einen Anteil an falsch positiven Ergebnissen von 95% auf. Obwohl *T. annulata* und *T. parva* in verschiedenen geographischen Regionen vorkommen, gibt es dennoch Berichte einer Koexistenz beider Erreger im Süden des Sudan (Salih *et al.*, 2007c), wo Untersuchungen mittels RLB eine Prävalenz von 0,2% für *T. annulata* ergeben haben, was die Anwendung des indirekten ELISA zumindest in diesem Gebiet fragwürdig erscheinen lässt. Auch im Hinblick auf *Trypanosoma* ist ein falsch positiver Anteil von 66,6% ermittelt worden, so dass in anderen Gebieten ebenfalls

Probleme in Bezug auf Kreuzreaktivitäten, auch mit Antikörpern gegen noch nicht getestete Erreger, auftreten könnten.

2.4 Zusammenfassende Darstellung der Problematik - Fragestellung

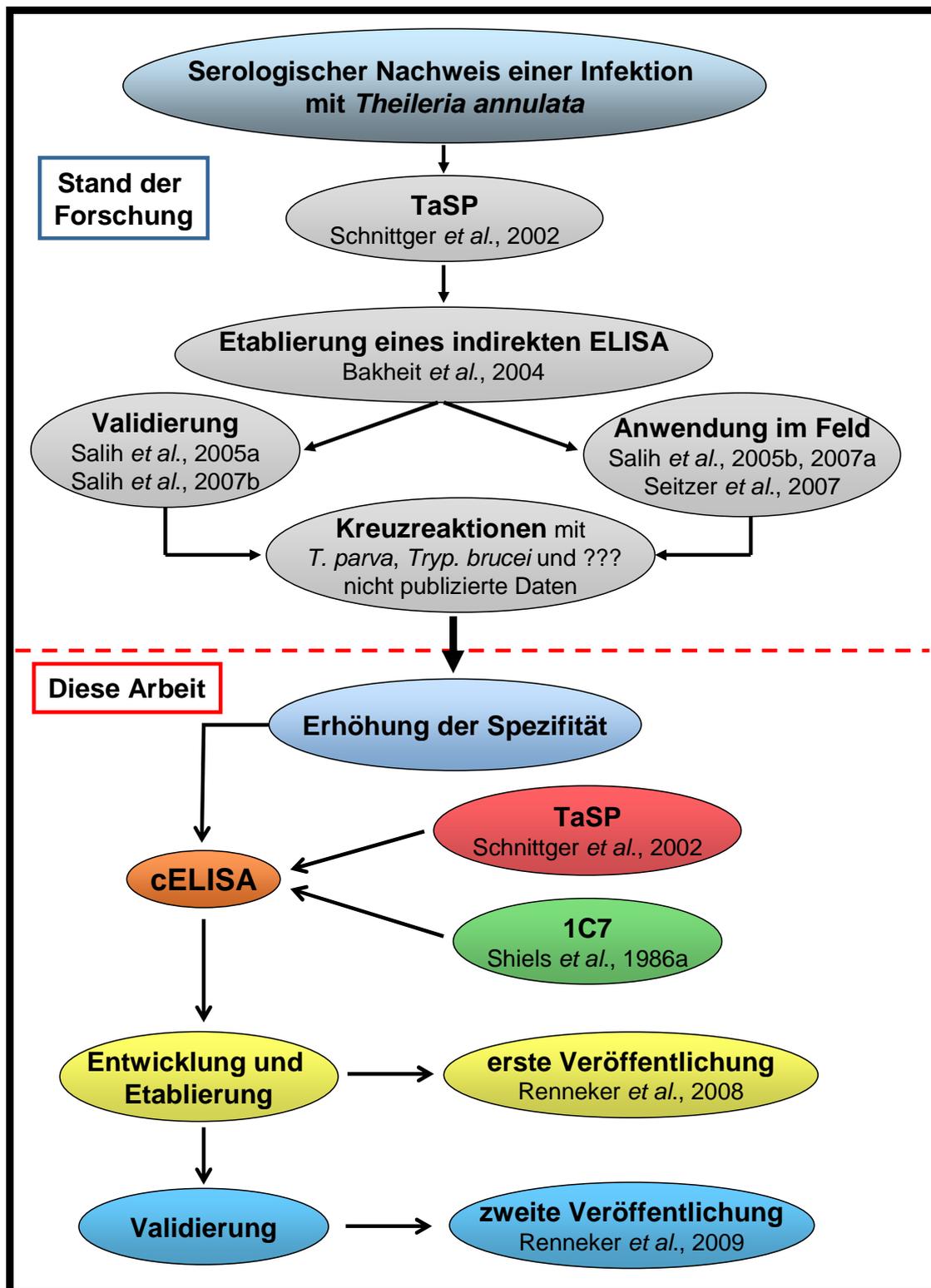


Abb. 3 Zusammenfassendes Schema zur Erläuterung der Fragestellung

Ein indirekter ELISA für den Nachweis einer Infektion mit *T. annulata* wurde auf der Basis eines immunreaktiven Oberflächenproteins, dem *T. annulata* Surface Protein (TaSP, Schnittger *et al.*, 2002), etabliert, validiert und für epidemiologische Studien verwendet (Bakheit *et al.*, 2004; Salih *et al.*, 2005a,b, 2007a,b; Seitzer *et al.*, 2007). Dieser Test birgt jedoch das Problem, nicht sicher zwischen Antikörpern gegen *T. annulata* und *T. parva* bzw. *Trypanosoma brucei* unterscheiden zu können, so dass er z.B. im Süden des Sudan, wo *T. annulata* und *T. parva* gemeinsam vorkommen (Salih *et al.*, 2007c), für eine sichere Diagnose von *T. annulata* nicht eingesetzt werden kann. Untersuchungen mit Seren, die Antikörper gegen *Babesia bovis* enthielten, ergaben zwar keine falsch positiven Ergebnisse, dennoch besteht die Möglichkeit des Auftretens weiterer Kreuzreakтивitäten mit Antikörpern gegen noch nicht getestete Erreger. Um nun einen diagnostischen Test zur Verfügung zu haben, der in der Lage ist, Antikörper gegen *T. annulata* spezifisch zu detektieren, ist in der vorliegenden Arbeit das System des kompetitiven ELISA (cELISA) gewählt worden. Aufgrund der Addition eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an ein Epitop des an die Mikrotiterplatte adsorbierten Antigens bindet und dadurch mit den in den Seren befindlichen Antikörpern, die an dasselbe Epitop binden, um die Bindungsstelle konkurriert, liefert das kompetitive System spezifischere Ergebnisse als das indirekte System (Knowles *et al.*, 1993). Der kompetitive ELISA wurde auf der Basis desselben Antigens (TaSP) wie der indirekte ELISA von Bakheit *et al.* (2004) mit Hilfe von 50 negativen (Bad Bramstedt, Deutschland) und 33 positiven Seren (Berlin, Deutschland und Utrecht, Niederlande) sowie 133 Seren aus dem Sudan entwickelt. Als monoklonaler Antikörper diente '1C7', der von Shiels *et al.* (1986a) generiert und von Schneider *et al.* (2004) als Marker für die Schizonten-Membran in *T. annulata*-infizierten Zellen verwendet worden ist. Um den monoklonalen Antikörper 1C7 für die Etablierung des cELISA verwenden zu können, mussten im Rahmen dieser Arbeit zunächst Untersuchungen zur subzellulären Bindungsstelle des 1C7 durchgeführt werden, die bestätigen, dass der Antikörper spezifisch an TaSP bindet. Es musste außerdem überprüft werden, ob der mAk 1C7 in der Lage ist, die Bindung von Serum-Antikörpern an rekombinantes TaSP kompetitiv zu hemmen. Die Validierung des kompetitiven ELISA erfolgte mit 230 Seren aus dem Irak (Kurdistan).

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 Materialien & Hersteller

Soweit nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien und Reagenzien folgender Firmen verwendet:

Biochrom AG (Berlin, Deutschland), Biorad (München, Deutschland), Gibco/BRL (Eggenstein, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), PAA Laboratories (Pasching, Österreich), Pierce (Bonn, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Svanova Biotech (Uppsala, Schweden).

Molekularbiologische Reagenzien und andere DNA-modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Sterile Materialien für die Zellkultur und andere Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen erworben: Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Greiner (Frickenhausen, Deutschland), Nunc (Wiesbaden, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Biozym (Hessisch-Oldendorf, Deutschland).

In allen unten beschriebenen molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden wurden sterile Lösungen und Gefäße eingesetzt.

3.1.1 Antiseren und Antikörper

Spezifität	Antigen	Klon/Antikörper	Spezies	Hersteller, Land
RGS-His	RGSHHHHHH (AS-Sequenz)	α His	Maus	Qiagen, Hilden, Deutschland
TaSP	zytoplasmatische Domäne AS 26 - AS 157	α TaSP-Antiserum	Kaninchen	(Schnittger <i>et al.</i> 2002)
Oberflächen- protein (Schneider <i>et al.</i> , 2004)	<i>T. annulata</i> Schizont	1C7	Maus	(Shiels <i>et al.</i> , 1986a)
Ki-67 Protein	Proliferations- assoziiertes Kern- Antigen (Ki-67)	MIB-1	Maus	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tab. 1 Primärantikörper

Die Hybridom-Zelllinie 1C7, die den Maus-monoklonalen Antikörper 1C7 produziert, wurde in Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin Medium kultiviert (Shiels *et al.*, 1986a). Der Zellkultur-Überstand wurde gesammelt und bei -20°C gelagert.

Spezifität	Wirtsspezies	Hersteller, Stadt, Land
Anti-Maus-IgG, Alexa 488- oder 568-konjugiert	Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Anti-Kaninchen-IgG, Alexa 488- oder 568-konjugiert	Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Anti-Maus-IgG, AP-konjugiert	Ziege	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Kaninchen-IgG, AP-konjugiert	Ziege	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Rind-IgG, HRP-konjugiert	Kaninchen	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tab. 2 Sekundärantikörper

3.1.2 Molekulargewichtsstandards

Als Protein-Standards dienten der ‚SeeBlue® Plus 2‘ von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und die ‚PageRuler™ Prestained Protein Ladder‘ von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland).

3.1.3 Zelllinien

Folgende Theilerien-infizierte bovine und ovine Zelllinien wurden verwendet:

Erreger	Stamm	Bezeichnung der Zelllinie	Referenz
<i>T. annulata</i>	Ankara, Türkei	TaA288	Ahmed <i>et al.</i> , 1989
<i>T. annulata</i>	Ankara, Türkei	TaA346	Ahmed <i>et al.</i> , 1989
<i>T. annulata</i>	Ankara, Türkei	TaA2006	Seitzer <i>et al.</i> , 2006
<i>T. annulata</i>	Ankara, Türkei	TaA1272	Ahmed <i>et al.</i> , 1989
<i>T. annulata</i>	Ankara, Türkei	TaA285	Ahmed <i>et al.</i> , 1989
<i>T. annulata</i>	Hissar, Indien	TaH2006	Gill <i>et al.</i> , 1980
<i>T. annulata</i>	Tunis, Tunesien	TaT429	Ben-Miled, 1993
<i>T. annulata</i>	Marokko	TaM2006	Ouhelli, 1985
<i>T. annulata</i>	Jordanien	TaJ	LG Vet. Inf. Imm., Prof. J. S. Ahmed
<i>T. parva</i>	Entebbe	TpE97	LG Vet. Inf. Imm., Prof. J. S. Ahmed
<i>T. parva</i>		Tp46	Seitzer <i>et al.</i> , 2006
<i>T. parva</i>	Muguga	TpM803	Emery <i>et al.</i> , 1981
<i>T. lestoquardi</i>	Atbara	T. lest	Bakheit <i>et al.</i> , 2006

Tab. 3 Bovine und ovine Zelllinien

Für die Transfektion verwendete Säugetierzelllinie:

Name	Eigenschaften	Referenz
COS-7	Die Zelllinie COS-7 wurde 1981 aus Nierengewebe (Fibroblasten) von Grünen Meerkatzen (<i>Cercopithecus aethiops</i>) gewonnen.	Gluzman et al., 1981

Tab. 4 Säugetierzelllinie für die Transfektion

3.1.4 Kulturmedien für die Zellkultur

Die Zellkulturmedien RPMI-1640 und DMEM wurden von den Firmen PAA (Pasching, Österreich) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen, und die Zusätze wurden separat und steril zu den Medien gegeben. Bei den Zusätzen handelte es sich um fetales Kälberserum und Stammlösungen von 10000 U Penicillin (Pen) und 10000 µg/ml Streptomycin (Strep; kombiniert mit Pen) sowie 200 mM L-Glutamin (alle von Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Für die Trypsinierung von COS-7 Zellen wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verwendet, und die adhärenen *Theileria*-infizierten Zelllinien wurden mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst.

Zelllinie	Medium	Subkultivierung
<i>T. annulata</i> (adhärent)	RPMI 1640, 10% FKS, 100 U/ml Pen und 100µg/ml Strep, 2mM L-Glutamin	Ablösung mit Zellschaber
<i>T. parva</i> (in Suspension)	RPMI 1640, 20% FKS 100 U/ml Pen und 100µg/ml Strep, 2mM L-Glutamin	Zentrifugation
<i>T. lestoquardi</i> (in Suspension)	RPMI 1640, 20% FKS 100 U/ml Pen und 100µg/ml Strep, 2mM L-Glutamin	Zentrifugation
COS-7 (adhärent)	DMEM, 10% FKS 100 U/ml Pen und 100µg/ml Strep, 2mM L-Glutamin	Trypsinierung

Tab. 5 Kulturmedien für verwendete Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilwerkbank LaminAir® HLB2448 (Heraeus Instrumente, Osterode, Deutschland) durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde zur Herstellung von Puffern und Medien deionisiertes Wasser verwendet.

3.1.5 Bovine Seren

Serum von adulten Rindern wurde von verschiedenen Firmen für Vergleichszwecke bezogen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; Biochrom AG, Berlin, Deutschland; PAA Laboratories, Pasching, Österreich und ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und für die durchgeführten Untersuchungen diente schließlich das Serum von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland als Negativkontrolle. Um den Grenzwert zwischen positiven und negativen Seren (cut-off) zu ermitteln, sind 50 Seren von nicht-infizierten Rindern aus dem Schlachthof in Bad Bramstedt, Deutschland verwendet worden. Seren von 33 experimentell mit *Theileria annulata* infizierten Tieren, die an der freien Universität Berlin, Deutschland (Ahmed *et al.*, 1989) und an der Universität Utrecht, Niederlande (Jongejan *et al.*, 1987) hergestellt wurden, sind als positive Testseren benutzt worden. Von diesen Seren diente als Positivkontrolle für die Etablierung des kompetitiven ELISA das Serum 285/21 und für die Validierung das Serum 287/17.

Die Seren von mit *Theileria mutans* und *Theileria parva* infizierten Rindern waren Positivkontrollen aus kommerziellen Kits (Svanova Biotech, Uppsala, Schweden). Zusätzlich sind Seren von drei Rindern, die mit *T. parva* (Dirk Geysen, Antwerpen, Belgien) infiziert waren und jeweils einem Rind, das mit *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* und *Babesia bigemina* sowie *Trypanosoma brucei* (alle vier von Jiansan Wu, Qingdao, China) infiziert war, verwendet worden, um Informationen über Kreuzreaktivitäten zu erhalten.

Feldseren wurden nach dem Zufallsprinzip von 133 Rindern aus einem Gebiet im Sudan, wo *T. parva* bis jetzt noch nie nachgewiesen wurde, und von 230 Rindern aus dem Irak (Kurdistan) gewonnen.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung von bovinen *Theileria*-infizierten Leukozyten

Theileria annulata-infizierte Zellen wurden in 25 cm²-, 75 cm²- oder 175 cm²-Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ in RPMI-1640-Medium (PAA, Pasching, Österreich) mit den Zusätzen 10% FKS (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum, Biochrom, Berlin, Deutschland), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco/BRL, Eggenstein, Deutschland) in einem Inkubator (HERAcell® 150, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. Die Zellen sind alle zwei bis drei Tage passagiert worden. Dazu wurden die adhärennten Zellen dreimal mit PBS-Z (s. unten) gewaschen und mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vom Boden der Flaschen gelöst, in ein 50 ml Röhrchen (Cellstar, Greiner, Essen, Deutschland) überführt und bei 294 g für 5 min zentrifugiert (Heraeus Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in einer Dichte von 6×10^4 Zellen/ml in neue Kulturflaschen (10 ml Medium für 25 cm²-, 20 ml für 75 cm²- oder 40 ml für 175 cm²-Kulturflaschen) überführt. Die Kultivierung von *T. parva*-infizierten Zellen wurde wie oben beschrieben in Kompletmedium mit 20% FKS durchgeführt, wobei diese Zellen in Suspension wachsen. Die Kompletmedien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

PBS für Zellkultur (PBS-Z); pH 7,4: 145 mM NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
6 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Merck, Darmstadt, Deutschland)
18 mM NaH₂PO₄ x 2 H₂O (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

3.2.1.2 Kultivierung von COS-7 Zellen

Die adhärennt wachsenden COS-7 Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 70% bis 90% passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit 10 ml PBS-Z gewaschen und je nach Flaschengröße mit 1-3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland; 0,5% [w/v] Trypsin; 0,2% [w/v] EDTA in PBS-Z) bedeckt. Nach 3-5 min Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) wurde das Ablösen der Zellen mikroskopisch überprüft

und bei vollständiger Ablösung wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von DMEM-Kulturmedium gestoppt. Die COS-7 Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml ausgesät, mit einem der Flaschengröße adäquaten Volumen (5-30 ml) DMEM-Kulturmedium versehen, resuspendiert und dann im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Quantifizierung wurden die Zellen nach dem Waschen in 10 ml PBS-Z aufgenommen und resuspendiert. Dann wurden 10 µl der Suspension in 190 µl Trypanblau-Arbeitslösung (0,5% [w/v] Trypanblau [Biochrom AG, Berlin, Deutschland] 1:3 mit PBS-Z verdünnt) gegeben. Aus dieser Lösung wurden wiederum 10 µl abgenommen und in eine Neubauer-Kammer (Brand, Wertheim, Deutschland) pipettiert. Unter einem Durchlicht-Mikroskop (Hund, Wetzlar, Deutschland) sind vier Großquadrate ausgezählt worden.

Die Anzahl der Zellen/ml wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\sum \text{der Zellen von 4 Großquadraten}}{4} \times 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4$$

3.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen bei -196°C über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die Kryokonservierung sind die Zellen durch Trypsinierung vom Flaschenboden gelöst und das erhaltene Pellet mit Einfriermedium (9 Teile FKS und 1 Teil DMSO [Serva, Heidelberg, Deutschland]) auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt worden. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt und 1 h auf Eis vorgekühlt, bevor es mit Zellstoff umwickelt zunächst üN bei -70°C und dann über flüssigem Stickstoff gelagert wurde.

3.2.1.5 Herstellung von Zelllysaten von infizierten Zellen

Um Proteinextrakte aus *Theileria annulata*-infizierten Leukozyten zu gewinnen, wurden tiefgefrorene oder frische Zellen in 500 µl ddH₂O aufgenommen und 10 x 15 s mit jeweils 15 s Pause auf Eis mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier 250 mit Microtip, Branson, Schwäbisch Gmünd, Deutschland). Der Auslastungsgrad (duty cycle) des Sonifiers betrug dabei 30%, während der Ausgangsregler (output control) auf Stufe 3 eingestellt war. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 14000 g und 4°C zentrifugiert (Biofuge 28 RS; Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland), der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung nach Lowry (3.2.2.5, S. 39) durchgeführt.

3.2.1.6 Transiente Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000

Ein GFP-Konstrukt, das die polymorphe Region von TaSP enthält (Gerber, 2008), wurde in COS-7 Zellen transfiziert. Hierzu wurden die adhärennten COS-7 Zellen in Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit DMEM-Komplettmedium unter Standardbedingungen bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90% kultiviert, wobei vor der Transfektion das Komplettmedium durch serum- und antibiotikafreies Medium ersetzt wurde. Für die Transfektion wurden pro mittelgroße Kulturflasche (75 cm², Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) 24 µg gereinigte Plasmid-DNA und 60 µl Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) jeweils in 1500 µl serumfreiem Medium verdünnt (Tabelle 6). Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (18-22°C) wurden die Lipofectamine™ 2000-Lösung und die DNA-Lösung vereint und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese für 18 h bis 48 h bei 37°C inkubiert.

Kulturgefäß	Auszusäende Zellzahl	Medien-Volumen [ml]	Verd. Med. DNA / Lipofectamine 2000 [µl]	DNA-Menge [µg]	Lipofectamine 2000 [µl]	Gesamt-volumen [ml]
6-well-Platten (d = 3 cm)	2 – 4 x 10 ⁵	2	250	4	10	0,5
25 cm ²	4 – 8 x 10 ⁵	5	500	8	20	1
75 cm ²	1 – 2 x 10 ⁶	15	1500	24	60	3

Tab. 6 Pipettierschema für die Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000

3.2.1.7 Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten

Die benötigte Anzahl von infizierten bzw. transfizierten Zellen wurde dreimal mit PBS-Z gewaschen (5 min bei 294 g), auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt und in 10% (w/v) BSA/PBS-Z (bovines Serumalbumin, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) aufgenommen. Jeweils 100 μ l der Zellsuspension wurden dann in einer Zytozentrifuge (Cytospin 3, Shandon, Pittsburgh, USA) bei 800 U/min für 4 min auf einen Objektträger (Superfrost[®] Plus, Omlilab, Bremen, Deutschland) zentrifugiert. Die Objektträger wurden dann üN bei Raumtemperatur (18-22°C) getrocknet und anschließend bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.1.8 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Zytozentrifugenpräparate von infizierten bzw. transfizierten Zellen verwendet. Die Zellen wurden 3 x 1 min mit PBS-Z gewaschen und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur (18-22°C) mit 2% Paraformaldehyd in PBS-Z fixiert. Nach einem weiteren Waschschriff fand die Permeabilisierung der Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 0,25% Triton-X 100 (UBS, Cleveland, USA) in PBS-Z statt. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen für 30 min in 5% (w/v) BSA/PBS-Z (PAA Laboratories, Hanau, Deutschland) inkubiert. Der Primärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung (Tabelle 7) mit 1% BSA-Lösung in einem Volumen von 100 μ l auf die Zellen gegeben und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Z konnte der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 in 1% BSA-Lösung (Tabelle 8) zusammen mit dem Nukleinsäurefarbstoff Propidiumjodid (1:250 verdünnt; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) auf die Zellen appliziert und 30 min in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert werden. Danach wurden die Objektträger in PBS-Z gewaschen, wiederum in 2% Paraformaldehyd fixiert, ein weiteres Mal mit PBS-Z gewaschen und schließlich mit DABCO (1,4-Diazabicyclo [2,2,2] octan; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland [Johnson *et al.*, 1982]) eingedeckelt. Die gefärbten Präparate wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop (TCS SP, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland) oder einem Fluoreszenzmikroskop (Diaphot 300, Nikon, Japan) ausgewertet.

Spezifität	Antigen bzw. Klon und Hersteller	Wirtsspezies	Verdünnung
TaSP	TaSP teilexprimiert (Schnittger <i>et al.</i> 2002)	Kaninchen-Polyklonal	1:1000
Oberflächenprotein (Schneider <i>et al.</i> , 2004)	1C7 (Andy Tait, University Glasgow, Schottland) (Shiels <i>et al.</i> , 1986a)	Maus-Monoklonal	1:10
MIB-1	Proliferations- assoziiertes Kern-Antigen (Ki-67)	Maus-Monoklonal	1:1000

Tab. 7 Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Spezifität	Wirtsspezies	Hersteller, Stadt, Land	Verdünnung
Anti-Maus IgG, Alexa 488- oder 568-konjugiert	Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	1:500
Anti-Kaninchen IgG, Alexa 488- oder 568-konjugiert	Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	1:500

Tab. 8 Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Die verwendeten Sekundärantikörper waren mit Alexa-Fluoreszenz-Farbstoffen unterschiedlicher Anregungswellenlängen (Alexa 488 oder 568) konjugiert.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische diskontinuierliche Elektrophorese von Proteinen wurde nach Laemmli (1970) in einer Gelelektrophorese-Kammer (Mini/Maxi Gelkammer vertikal, Harnischmacher, Schauenburg, Deutschland) durchgeführt. Für die Auftrennung der Proteine wurde die Konzentration des Trenngels entsprechend der erwarteten Größe der zu trennenden Proteine gewählt (10% oder 12,5%).

Für die Herstellung der Polyacrylamidgele (PA-Gele) wurden die Lösungen nach folgendem Schema gemäß Tabelle 9 zusammengestellt: Zunächst wurde das Trenngel zwischen 2 Glasplatten (10 cm x 11 cm oder 10 cm x 20 cm) auf einem Gießstand (Harnischmacher, Schauenburg, Deutschland) gegossen, mit 70% Ethanol überschichtet und für 30 min zum Polymerisieren stehengelassen.

Für je 2 kleine Sammel- und Trenngele:

Lösungen	3% Sammelgel	10% Trenngel	12,5% Trenngel	15% Trenngel
ddH ₂ O	3 ml	5 ml	4 ml	6 ml
Acrylamide/Bisacrylamide Lösung	0,5 ml	4 ml	5 ml	3 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml	-	-	3 ml
Trenngelpuffer	-	3 ml	3 ml	100 µl
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethyldiamin)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Pyronin Y-Puffer	10 µl	-	-	6 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	20 µl	100 µl	100 µl	3 ml

Tab. 9 SDS-PA-Gel-Zusammensetzung

Das 10 bis 12,5%ige Trenngel wurde nach der Polymerisation und dem Entfernen von Ethanol mit einem 3%igen Sammelgel überschichtet, der Silikonkamm (Harnischmacher, Schauenburg, Deutschland) zwischen die beiden Glasplatten gesteckt und wiederum für 30 min zwecks Auspolymerisierung stehengelassen. Die kleinen (Minigel: 7,5 cm x 8,5 cm) und großen Gele (Maxigele: 7,5 cm x 16 cm) hatten eine Dicke von 0,75 mm und die zu analysierenden Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen mit SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C im Thermoblock (Eppendorf Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Es wurden jeweils 10-15 µl Probe und 5 µl Marker bei einem 15-/20- oder 25-Taschen-Kamm aufgetragen.

Als Marker wurden die ‚Page Ruler™ Prestained Protein Ladder‘ (Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland) oder ‚SeeBlue® Plus 2‘ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für die Western Blot Analyse (vorgefärbt, somit erfolgreicher Transfer nachweisbar) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte vertikal in einer Elektrophoresekammer mit einer Spannungsquelle (EC 3000P Series 90; E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Russland) in SDS-Laufpuffer nach folgendem Programm: Bei konstanter Stromstärke (300 mA) 5 min bei 50 V, 10 min bei 100 V und 60 min bei 200 V.

Für die spezifische Identifikation der Proteine wurde ein Western Blot an die Elektrophorese angeschlossen, mit Hilfe dessen Proteinmengen von 1-10 ng spezifisch nachgewiesen werden können (Harlow & Lane, 1988).

4x Protein-Probenpuffer: 180 mM Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl pH 6,8
40% (v/v) Glycerin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
4% (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
0,04% (w/v) Bromphenolblau (Merck, Darmstadt, Deutschland)
100 mM DTT (Dithiothreitol; Roth, Karlsruhe, Deutschland)

**Acrylamide/
Bisacrylamide-Lösung** 30%; Roth, Karlsruhe, Deutschland

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl pH 8,8
0,4% (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Sammelgelpuffer: 500 mM Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl pH 6,8
0,4% (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

**TEMED N,N,N',N'-
Tetramethylendiamin;** Merck; Darmstadt, Deutschland)

Pyronin Y-Puffer 0,5 M Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl
10% (w/v) Glycerin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
0,4% (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
0,01% (w/v) Pyronin Y (Serva, Heidelberg, Deutschland)

**gesättigte APS (Ammonium-
peroxodisulfat)-Lösung:** 10% (w/v) APS (Merck, Darmstadt, Deutschland)

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl, pH 8,3
192 mM Glycin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
0,1% (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

3.2.2.2 Immunblotting von Elektrophoresegelen (Western Blot)

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus einem PA-Gel auf eine Nitrocellulose- (NC) Membran erfolgte direkt im Anschluss an die SDS-PAGE nach dem ‚Semi-Dry-Verfahren‘ (Kyhse-Andersen, 1984) nach der Vorschrift von Millipore (Immobilon-P Transfer Membran User Guide).

Dazu wurde eine ‚Semi-Dry‘-Blotkammer mit Graphitelektroden (Perfect Blue™ semi dry Elektroblogger, Peqlab, Erlangen, Deutschland) verwendet.

Die auf Gelgröße zugeschnittene NC-Membran (Protran®BA, 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) wurde, genauso wie das PA-Gel, 5 min in Anodenpuffer II äquilibriert. Der luftblasenfreie Aufbau des Blots erfolgte nach folgendem Schema (‚Sandwich-System‘):

Zwei mit Anodenpuffer I durchfeuchtete Lagen extra dickes Filterpapier (Whatman® GB 005, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) wurden direkt auf die Anode der Blotkammer gelegt. Darüber ist eine in Anodenpuffer II getränkte Lage Filterpapier und auf diese die NC-Membran geschichtet worden. Als nächstes wurde das PA-Gel aus der Gelelektrophorese-Kammer entnommen und zwecks Äquilibrierung kurz in Anodenpuffer II geschwenkt, bevor es auf die NC-Membran gelegt wurde. Auf das PA-Gel sind drei weitere Lagen Filterpapier geschichtet worden, die zuvor mit Kathodenpuffer gewässert wurden. Nach Entfernung evtl. vorhandener Luftblasen ist die Blotkammer geschlossen und mit der Elektrophorese begonnen worden.

Die Elektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen mit einer Spannungsquelle (EC 3000P Series 90; E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Russland) durchgeführt (2,5 mA/cm² PA-Gel):

Anzahl der Gele	U [V]	I [mA]	t [min]
1 kleines Gel; 0,75 mm	25 V (konst.)	60	90
2 kleine oder 1 großes Gel; 0,75 mm	25 V (konst.)	120	90
2 große Gele; 0,75 mm	25 V (konst.)	200	90

Tab. 10 Bedingungen für Western Blot

Ein erfolgreicher Transfer wurde sofort nach dem Lauf an dem vorgefärbten Proteinmarker auf der Membran und/oder durch eine Ponceau S-Färbung der NC-Membran kenntlich gemacht. Danach konnten die Proteine durch immunologische Methoden spezifisch identifiziert werden.

Lösungen für Western Blot:

Anodenpuffer I:	300 mM Tris-HCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 10 20% (v/v) Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Anodenpuffer II:	25 mM Tris-HCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 10,4 20% (v/v) Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kathodenpuffer:	300 mM Tris-HCl, pH 9,4 20 mM 6-Aminohexansäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 10% (v/v) Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.2.2.3 Ponceau S-Färbung

Das Anfärben mit Ponceau S (Eltest GmbH, Bonn, Deutschland) wurde durchgeführt, um die durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteinextrakte nach Transfer auf die NC-Membran sichtbar zu machen. Dazu wurde die Blotmembran 5 min in 2% (w/v) Ponceau S-Färbelösung (1% (v/v) Essigsäure mit 0,02% (w/v) Ponceau S) auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde dann so lange in ddH₂O gewaschen, bis sich die Proteinbanden vom Hintergrund abhoben. Die Ponceau S-Färbelösung wurde durch Waschen mit PBS-Z wieder ausgewaschen, so dass die NC-Membran wieder vollständig entfärbt war.

3.2.2.4 Immundetektion

Die Detektion von Proteinen, die auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert wurden, erfolgte durch einen antigen-spezifischen Primärantikörper und einen sekundären Antikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet und mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert war. Das Enzym setzt das Substrat NBT/BCIP um, das als dunkelblauer bis schwarzer Niederschlag ausfällt.

Wenn nicht anders angegeben, erfolgten die Inkubations- und Waschschrirte bei Raumtemperatur (18-22°C) und unter leichtem Schütteln auf einem Schütteltisch (GFL 3016, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland). Unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran wurden durch Inkubation in 5% (w/v) Magermilchpulver (Fluka, Buchs, Schweiz) in PBS-Z für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Nitrocellulose-Membran wurde nach dreimaligem Waschen für 10 min mit PBS-Z mit dem entsprechenden primären Antikörper (Tabelle 11) in PBS-Tween (PBST) üN bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Membran 3 x 10 min mit PBST-Puffer gewaschen worden ist, wurde sie

mit dem sekundären AP-konjugierten Antikörper in PBST (Tabelle 12) für 1 - 2 h inkubiert. Die vorherige Waschprozedur (3 x 10 min) wurde ein weiteres Mal wiederholt und die Membran konnte dann für 10 min in AP-Puffer äquilibriert werden. Die Detektion der immunreaktiven Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran mit NBT/BCIP (0,1% [w/v] NBT: Nitroblautetrazoliumchlorid in 70% Dimethylformamid (DMF), pH 9,5 und 0,5% [w/v] BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat, Toluidin-Salz in 100% DMF, beides gelöst in 10 ml AP-Puffer; beides Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Farbreaktion wurde durch Absaugen der Substratlösung und Inkubation mit der Stopplösung beendet.

Phosphat-buffered-Saline-(PBS)-Puffer:	80 mM Na ₂ HPO ₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland) 20 mM NaH ₂ PO ₄ (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 100 mM NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland) pH 7,5 mit NaOH
PBS-Tween (PBST):	0,1% (v/v) Tween 20 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) ad 1 l PBS pH 7,5
Blockier-Lösung:	5% (w/v) Magermilchpulver (Fluka, Buchs, Schweiz) in PBST-Puffer
AP-Puffer:	0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 0,1 M NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 5 mM MgCl ₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Stopplösung:	20 mM EDTA (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in ddH ₂ O

Spezifität	Antigen bzw. Klon und Hersteller	Wirtsspezies	Verdünnung
RGS-His	RGSHHHHHH (Qiagen, Hilden, Deutschland)	Maus-Monoklonal	1:1000
TaSP	TaSP teilexprimiert (Schnittger <i>et al.</i> 2002)	Kaninchen-Polyklonal	1:1000
Oberflächen-Protein (Schneider <i>et al.</i> , 2004)	<i>T. annulata</i> Schizont; 1C7; Andy Tait, Universität Glasgow, England (Shiels <i>et al.</i> , 1986a)	Maus-Monoklonal	1:10

Tab. 11 Verwendete Primärantikörper für Western Blot

Spezifität	Wirtsspezies	Hersteller, Land	Eingesetzte Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG, AP-konjugiert	Ziege	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	1:2000
Anti-Maus IgG, AP-konjugiert	Ziege	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	1:2000

Tab. 12 Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot

3.2.2.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry wurde mit einem BioRad Micro-DC-Assay 500-0116 (BioRad, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers in einer Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden 0,2-2 µg BSA (Pierce, Bonn, Deutschland) im Assay eingesetzt. Die Platten wurden dann 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (18-22°C) inkubiert und danach erfolgte die Messung mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Expert 96, Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Österreich) bei einer Wellenlänge von 550 nm. Für die Erstellung einer Eichkurve wurden die BSA-Werte dreifach bestimmt, während die Proteinwerte durch eine Zweifachbestimmung ermittelt wurden. Als Nullwert diente ddH₂O. Die Ergebnisse wurden mit Microwin (Version 4.2) ausgewertet.

3.2.2.6 Immunpräzipitation

Der Nachweis eines bestimmten Proteins in einem Proteingemisch erfolgt bei einer Immunpräzipitation *in vitro*, indem das Protein mit Hilfe eines Antikörpers präzipitiert wird. Hierfür wurde ein Protokoll nach Gordon (1991) verwendet.

Die Immunpräzipitation wurde sowohl mit infizierten Zellen (*TaA288*) als auch mit transfizierten (COS-7-Zellen) durchgeführt.

Die Zellen wurden entsprechend mit dem Zellschaber geerntet (*TaA288*) oder trypsiniert (COS-7-Zellen), 3 x mit PBS-Z gewaschen und die Zellzahl bestimmt. 1×10^7 Zellen wurden in 1 ml eiskaltem, modifiziertem RIPA-Puffer (s. unten) resuspendiert und für 30 min bei 4°C auf einem Invertierer (Rotator Drive STR 4, Stuart Scientific, Staffordshire, Großbritannien) lysiert. Das Lysat wurde bei 14000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert (Biofuge 28RS, Heraeus, Hanau, Deutschland) und der Überstand auf vorher äquilibrierte (3 x mit 500 µl eiskaltem PBS-Z gewaschen und 1 min bei 10000 g zentrifugiert) 100 µl Protein-A-Agarose (Fast Flow, 100 µl pro 1 ml Zelllysat; Upstate, Schwalbach, Deutschland) gegeben. Die Zelllysat-Protein-A-Agarose-Suspension wurde 30 min bei 4°C auf dem Invertierer inkubiert, um das Lysat von unspezifisch an die Agarose bindenden Proteinen zu befreien. Die Suspension konnte dann bei 14000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert werden und vom Überstand eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt werden. Das Zelllysat wurde danach mit PBS-Z auf 1 mg/ml in 500 µl verdünnt und der

immunpräzipitierende Antikörper gemäß Tabelle 13 zum Lysat dazugegeben. Das Lysat-/Antikörper-Gemisch wurde üN bei 4°C auf dem Invertierer inkubiert und am folgenden Tag konnte der Immunkomplex durch die Zugabe von 100 µl gewaschener (3 x mit 500 µl eiskaltem PBS-Z, dazwischen 1 min bei 10000 g zentrifugiert) Protein-A-Agarose und anschließender Inkubation für 60 min bei 4°C auf dem Invertierer präzipitiert werden. Der Immunkomplex wurde bei 16873 g (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 5 s pelletiert und 3 x mit 800 µl eiskaltem RIPA-Puffer (ohne Proteaseinhibitoren) gewaschen, kurz zentrifugiert (16873 g für 5 s) und der Überstand gesammelt. Die Protein-A-Agarose wurde in 50 µl 2x Probenpuffer aufgenommen und anschließend, wie auch der Überstand und die Waschschriffe (beide in 4x Probenpuffer), auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Zelllysat mit Protein-A-Agarose, aber ohne Antikörper inkubiert, und um die zu erwartenden Proteinbanden von den Proteinbanden der Antikörper, die der leichten und schweren Kette entsprechen, zu unterscheiden, wurde ein zusätzlicher Immunblot lediglich mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Als weitere Negativkontrolle ist das gesamte Protokoll auch mit Zelllysat von Leukozyten nicht-infizierter Rinder durchgeführt worden.

Spezifität	Klon und Hersteller	Spezies	Verdünnung
Oberflächen-Protein (Schneider <i>et al.</i> , 2004)	1C7; Andy Tait, Universität Glasgow, England (Shiels <i>et al.</i> , 1986)	Maus-Monoklonal	1:10

Tab. 13 Für die Immunpräzipitation verwendeter Antikörper

RIPA-Puffer:	50 mM Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland)-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 1% (v/v) Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 0,25% (w/v) Desoxycholat (Fluka, Buchs, Schweiz)
modifizierter RIPA-Puffer:	RIPA-Puffer 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, in 100% EtOH) 1 mM EDTA pH 7,4 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 1 µg/ml Aprotinin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 1 µg/ml Leupeptinhydrogensulfat (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) 1 µg/ml Pepstatin A (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 1 mM aktiviertes Na ₃ VO ₄ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 1 mM NaF (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
4x Protein-Probenpuffer:	180 mM Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl pH 6,8 40% (v/v) Glycerin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 4% (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 0,04% (w/v) Bromphenolblau (Merck, Darmstadt, Deutschland) 100 mM DTT (Dithiothreitol; Roth, Karlsruhe, Deutschland)
2x Protein-Probenpuffer:	mit ddH ₂ O verdünnter 4x Protein-Probenpuffer

3.2.2.7 ELISA: Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest

Die Antigen-Antikörper-Reaktion des Immunsystems stellt die Grundlage für das Prinzip eines ELISA dar. So kann man mittels ELISA je nach Aufbau des Detektionssystems entweder Antigene oder Antikörper nachweisen, wobei hier gemäß der Zielsetzung dieser Arbeit der allgemeine Aufbau eines ELISA für den Nachweis von spezifischen Antikörpern dargestellt wird.

In die (meist 96) Vertiefungen (Wells) einer Mikrotiterplatte werden nacheinander verschiedene Reagenzien pipettiert, wobei für jedes Reagenz eine bestimmte Inkubationszeit eingehalten werden muss und die Platte zwischen den einzelnen Schritten mit einem speziellen Puffer gewaschen wird, damit ungebundene Reagenzien entfernt werden. In Abbildung 4 ist der Ablauf eines indirekten ELISA schematisch dargestellt: Für den Nachweis von spezifischen Antikörpern wird zunächst das Antigen in die Wells pipettiert (Abb. 4/1), welches am Boden der Vertiefung bindet (Abb. 4/2). Anschließend wird ein zu testendes Serum dazugegeben, welches die nachweisbaren, an das Antigen bindenden Antikörper enthält (Abb. 4/3). Nachdem die Antikörper aus dem Serum an das Antigen gebunden haben (Abb.4/4), wird ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper dazugegeben (Abb.4/5), der selektiv an die Serum-Antikörper bindet (Abb. 4/6). Der letzte Schritt besteht aus der Zugabe von Substrat (Abb.4/7), das vom Enzym des Sekundärantikörpers chemisch umgesetzt wird, so dass eine Farbreaktion zu beobachten ist, die nach einer bestimmten Inkubationszeit gestoppt wird.

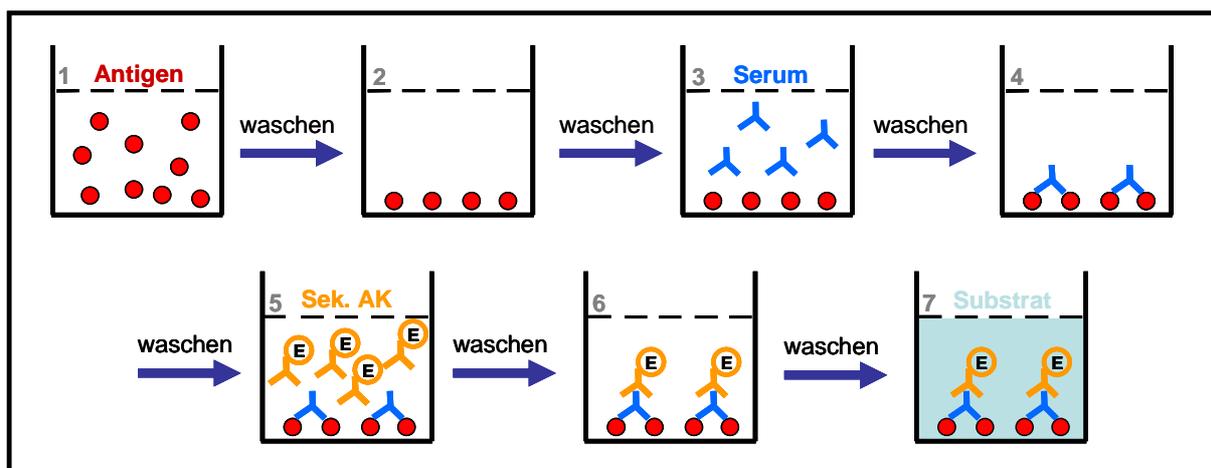


Abb. 4 Schematische Darstellung eines indirekten ELISA

(Erläuterungen im Text)

Der Versuchsaufbau für einen kompetitiven ELISA (cELISA) ist dem des indirekten ELISA sehr ähnlich. Allerdings muss bei diesem System stets bedacht werden, dass zwischen der Positivität des Serums und der Stärke der Farbreaktion eine negative Korrelation besteht, so dass ein positives Serum eine geringe bzw. keine Farbreaktion auslöst und *vice versa*. Zum besseren Verständnis wird der Ablauf der einzelnen Schritte im cELISA für ein negatives und ein positives Serum getrennt dargestellt. Auch in diesem System wird die Platte mit Antigen beschichtet (Abb. 5 und 6, Schritte 1 und 2) und anschließend werden die verschiedenen Seren hinzugefügt.

Im Falle eines negativen Serums (Abb. 5/3), welches keine Antikörper gegen das an die Platte adsorbierte Antigen enthält, kommt es folglich auch zu keiner Bindung von Serum-Antikörpern an das Antigen (Abb. 5/4). Wird dann ein spezifischer monoklonaler Antikörper dazugegeben (Abb. 5/5), so kann dieser an das Epitop des adsorbierten Antigens binden (Abb. 5/6). Nach Zugabe eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers (Abb. 5/7), der ausschließlich an den monoklonalen Antikörper bindet (Abb. 5/8), wird Substrat in die Wells gegeben, das im Zusammenwirken mit dem Enzym des Sekundärantikörpers eine Farbreaktion auslöst (Abb. 5/9).

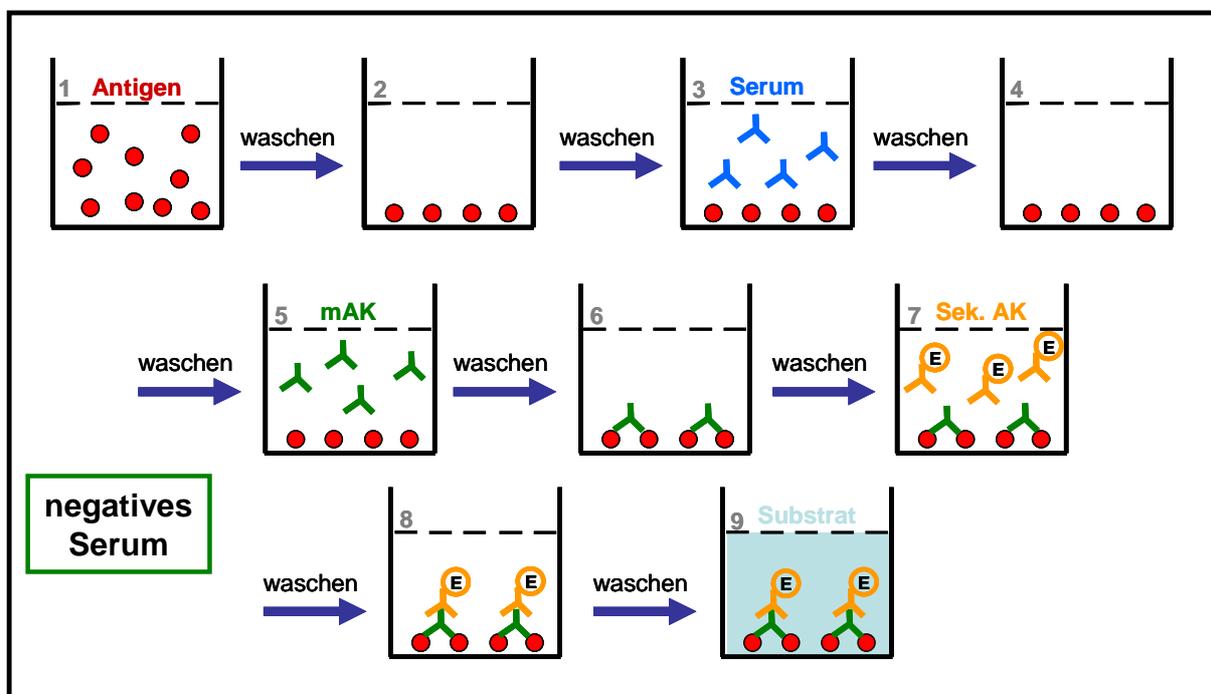


Abb. 5 Schematische Darstellung der Reaktion eines negativen Serums im cELISA

(Erläuterungen im Text)

Wird ein positives Serum im cELISA getestet (Abb. 6/3), so können die im Serum vorhandenen, für das Antigen spezifischen Antikörper an das an die Platte adsorbierte Antigen binden (Abb. 6/4). Der im Anschluss dazugegebene monoklonale Antikörper (Abb. 6/5) kann nicht an das Antigen binden, da die Bindungsstellen bereits von Serum-Antikörpern besetzt sind (Abb. 6/6). Folglich ist auch eine Bindung des Sekundärantikörpers nicht möglich, da sich dieser spezifisch an den monoklonalen Antikörper anlagert (Abb. 6/7 und 6/8). Demnach findet nach Zugabe des Substrates auch keine Farbreaktion statt (Abb. 6/9).

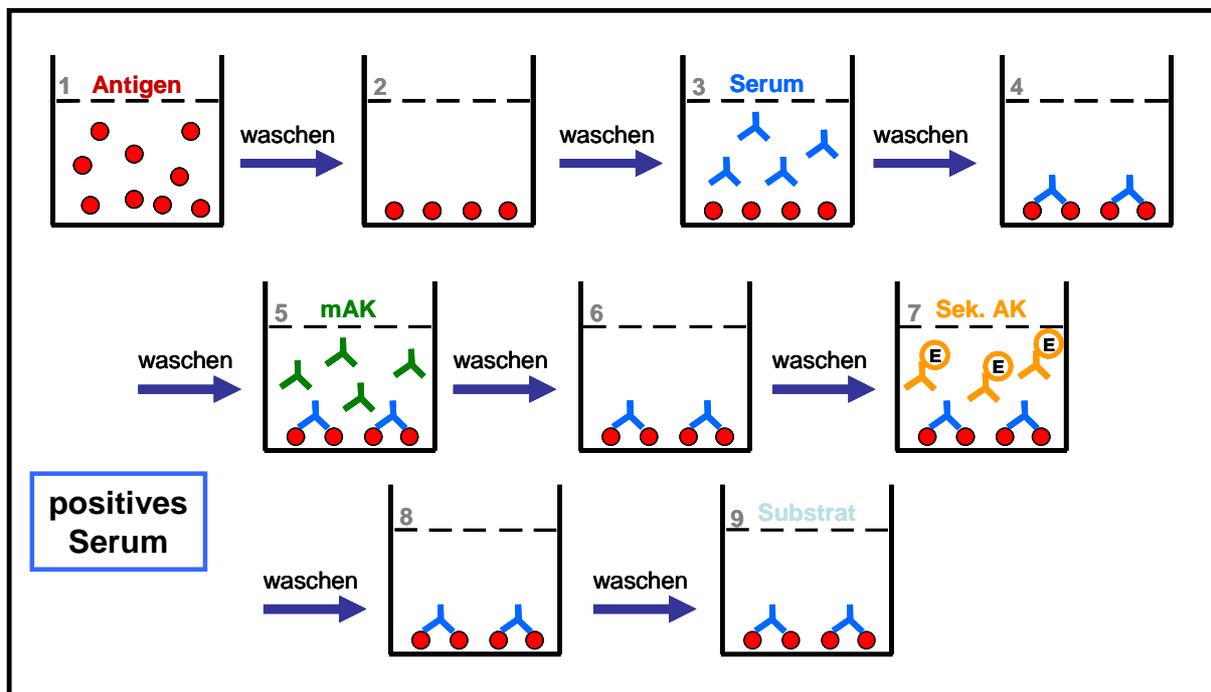


Abb. 6 Schematische Darstellung der Reaktion eines positiven Serums im cELISA
(Erläuterungen im Text)

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie ein fertig entwickelter ELISA aussieht, ist in Abbildung 7 eine 96-Well-Platte nach Abschluss eines Versuches dargestellt. Es handelte sich bei dem Versuch um einen cELISA, so dass die Wells mit einer grünen Färbung die negativen Proben repräsentieren, während die farblosen Wells das Ergebnis der Testung von positiven Seren veranschaulichen. Von der dargestellten Platte sind lediglich die oberen vier Reihen verwendet worden.

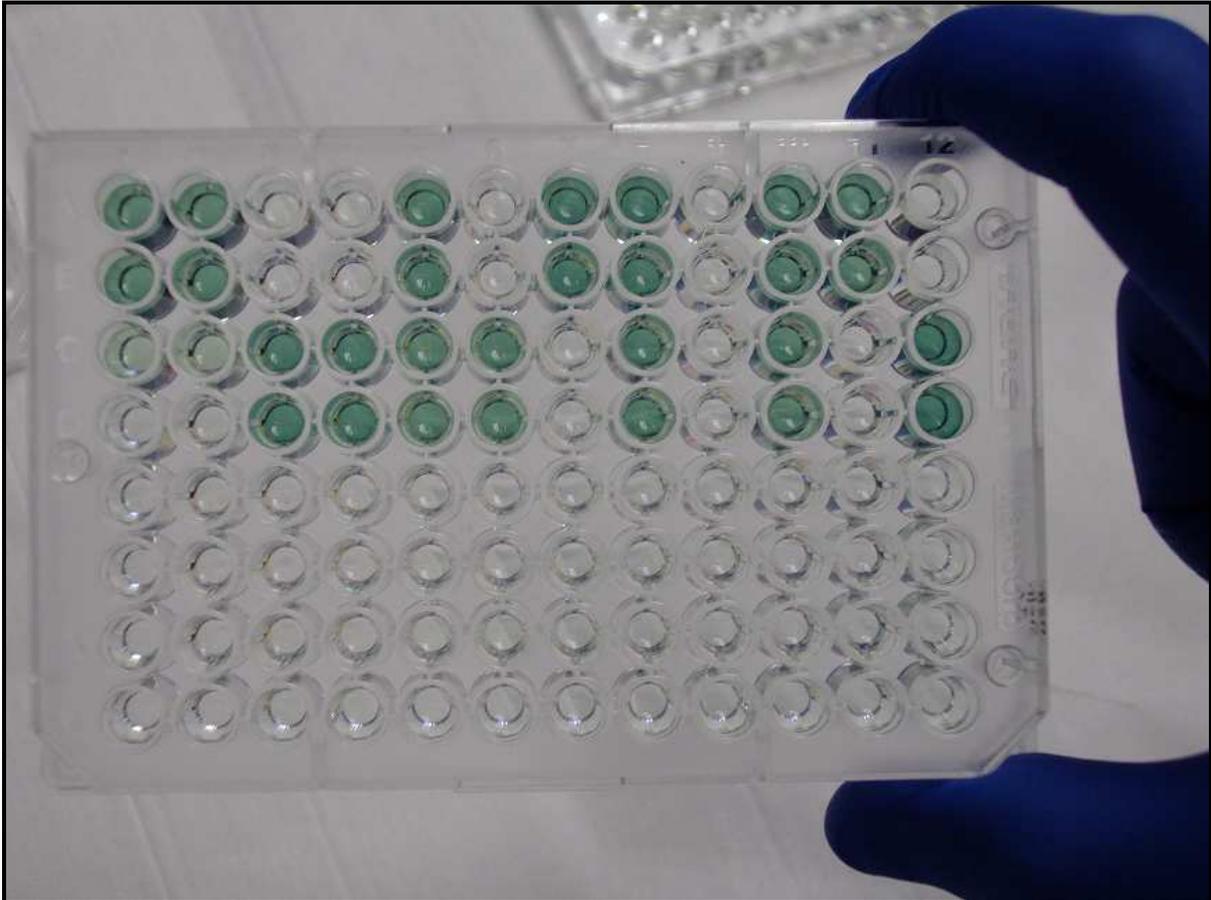


Abb. 7 Entwickelter cELISA
(Erläuterungen im Text)

3.2.2.7.1 Ermittlung und Optimierung der Bedingungen für die einzelnen Reaktionspartner zur Etablierung des kompetitiven ELISA

Für die Etablierung des kompetitiven ELISA sind die optimalen Konzentrationen und Verdünnungen der einzelnen Reaktionspartner im indirekten ELISA-System ermittelt worden.

Nunc Maxisorp Mikrotiterplatten (Nunc, Glostrup, Dänemark) wurden mit 0 bis 2,5 µg/ml rekombinarem TaSP (rTaSP) beschichtet, welches in Karbonat/Bikarbonat-Puffer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; pH 9,6) verdünnt wurde. Ein Gesamtvolumen von 100 µl wurde in jedes Well pipettiert und die Platten wurden abgedeckt bei Raumtemperatur (18-22°C) üN in einer feuchten Kammer inkubiert. Alle folgenden Inkubationen sind für 1-2 h bei Raumtemperatur auf einem orbitalen Schüttler (IKA-VIBRAX-VXR, Sternkopf, Laborbedarf Lübeck, Deutschland) durchgeführt und sämtliche Lösungen in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Well hinzugefügt worden. Für alle Waschschritte wurde, sofern nicht anders angegeben, PBS (s. unten, pH 7,2) mit 0,5% (v/v) Tween 20 (Roth, Karlsruhe,

Deutschland; PBST/0,5%) als Waschpuffer verwendet, wobei jeder Waschschrift aus drei Zyklen (Absaugen/Spülen) bestand, die von einem automatischen Waschgerät für Mikrotiterplatten (ELISA Washer; Bio-Tek 405, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland) durchgeführt wurden. Nach dem Beschichten mit rTaSP wurden die Platten mit PBS gewaschen und danach mit 2% (w/v) Kasein (BDH Biomedical Ltd., Poole, England) in PBST/0,1% blockiert, um die freien Bindungsstellen der Wells abzusättigen. Anschließend wurde der monoklonale Antikörper 1C7 in verschiedenen Verdünnungen (1:200 bis 1:1600) in PBST/0,1% mit 1% (w/v) Kasein appliziert. Der Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase markierter Ziege anti-Maus Antikörper [GαM-HRP], Dianova, Hamburg, Deutschland) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:16000 in demselben Puffer, der für die Serumverdünnung verwendet worden ist, angesetzt. Nach der Inkubation des Sekundärantikörpers sind drei Waschschriffe mit jeweils 10 min Einweichzeit zwischen den einzelnen Waschschriften (250 µl/Well) durchgeführt worden. Danach wurden 100 µl einer Substrat-Chromogen Lösung (Tetramethylbenzidin [TMB]; Sigma-Aldrich/Fluka, Steinheim, Deutschland) in jedes Well pipettiert und die Platte anschließend in einer feuchten Kammer für 10 min inkubiert, damit die Farbreaktion - ausgelöst durch die Interaktion von Enzym und Substrat - stattfinden konnte. Nach den 10 min ist die Reaktion mittels der Zugabe von 100 µl einer 1 N Schwefelsäurelösung (H₂SO₄) gestoppt worden und die optische Dichte (OD) wurde gleich im Anschluss bei 450 nm gemessen, wozu ein Mikrotiterplatten-Lesegerät (ELISA Reader; Expert 96, Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Österreich) verwendet worden ist. Die optimalen Konzentrationen von rTaSP, 1C7 und GαM-HRP wurden durch fortlaufende Verdünnungen einzelner Komponenten ermittelt.

Um die Spezifität des mAk 1C7 zu überprüfen, wurde ein anderes Membranprotein von *T. annulata* (TaD, Schneider *et al.*, 2004) als Antigen eingesetzt, und als Isotypen-Kontrolle ist der mAk MIB-1 (Dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet worden, der an das Proliferations-assoziierte Kernantigen Ki-67 bindet.

PBS für ELISA (PBS); pH 7,2:

136 mM NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
3 mM KCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Merck, Darmstadt, Deutschland)
2 mM KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.2.2.7.2 Indirekter ELISA für den Nachweis von Antikörpern im Serum von *T. annulata*-infizierten Rindern

Für die Entwicklung und Validierung des cELISA ist der indirekte ELISA als Referenztest in leicht abgewandelter Form gemäß Bakheit *et al.* (2004) durchgeführt worden. Nunc Maxisorp Mikrotiterplatten wurden mit 2,5 µg/ml rTaSP beschichtet, welches in Karbonat/Bikarbonat-Puffer verdünnt wurde. Ein Gesamtvolumen von 100 µl wurde in jedes Well pipettiert und die Platten wurden abgedeckt bei 4°C üN inkubiert (Abb.4/1). Alle folgenden Inkubationen sind für 2 h bei Raumtemperatur (18-22°C) auf dem orbitalen Schüttler durchgeführt und sämtliche Lösungen in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Well hinzugefügt worden. Für alle Waschschritte wurde, wenn nicht anders angegeben, PBST/0,1% verwendet, und jeder Waschschritt bestand aus drei Zyklen (Absaugen/Spülen), die vom ELISA Washer durchgeführt wurden. Nach dem Beschichten wurden die Platten mit PBS gewaschen und danach mit 2% (w/v) Kasein in PBST/0,1% blockiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:50 in PBST/0,1% mit 1% (w/v) Kasein appliziert (Abb.4/3). Der Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase markierter Kaninchen anti-Rind Antikörper [RbαBov-HRP] Dianova, Hamburg, Deutschland) wurde in einer Verdünnung von 1:2500 in PBST/0,1% plus 1% Kasein eingesetzt (Abb.4/5). Es sind für Test- und Kontroll-Seren sowie für die Sekundärantikörper-Kontrolle Zweifachbestimmungen durchgeführt worden, die Puffer-Kontrolle hingegen wurde vierfach bestimmt. Im Anschluss sind drei Waschschritte mit jeweils 5-minütiger Inkubation (250 µl/Well) durchgeführt worden. Danach wurden 100 µl der Substrat-Chromogen Lösung in jedes Well pipettiert (Abb.4/7) und die Platte anschließend in einer feuchten Kammer inkubiert, damit die Farbreaktion stattfinden konnte. Nach 10 min ist die Reaktion mittels Zugabe von 100 µl 1 N H₂SO₄ gestoppt worden und die optische Dichte (OD) wurde gleich im Anschluss bei 450 nm mit dem ELISA Reader gemessen. Die Grenze (cut-off) zwischen positiven und negativen Seren lag bei 18% und wurde von Bakheit *et al.* (2004) ermittelt, indem der bei 50 Seren von nicht-infizierten Tieren (Schlachthof Bad Bramstedt, Deutschland) gemessene Mittelwert der Positivität (%) inklusive zwei Standardabweichungen berechnet wurde. Die Positivität in Prozent (PP) der einzelnen Seren ist dabei wie folgt errechnet worden:

$$PP[\%] = [(Durchschnitt\ der\ OD\ des\ Test\ Serum\ -\ OD\ des\ Puffers) / (Durchschnitt\ der\ OD\ des\ positiven\ Kontroll\ Serum\ -\ OD\ des\ Puffers)] \times 100$$

3.2.2.7.3 Kompetitiver ELISA für den Nachweis von Antikörpern im Serum von *T. annulata*-infizierten Rindern

Rekombinantes TaSP wurde, verdünnt in Karbonat/Bikarbonat Puffer, in einer Konzentration von 1 µg/ml und einem Gesamtvolumen von 100 µl in die Wells der Nunc Maxisorp Platten pipettiert (Abb. 5/1 und 6/1), welche dann bei Raumtemperatur (18-22°C) üN in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Alle folgenden Inkubationen dauerten 1 h und wurden bei Raumtemperatur auf dem orbitalen Schüttler durchgeführt und sämtliche Reagenzien wurden in einem Volumen von 100 µl/Well aufgetragen. Der Waschpuffer war, sofern nicht anders angegeben, PBST/0,5%, wobei ein Waschschrift aus jeweils drei Zyklen bestand und vom ELISA Wascher verrichtet wurde. Nach der Inkubation des Antigens üN wurden die Platten mit PBS gewaschen und danach wurden die noch freien Bindungsstellen mit PBST/0,1% plus 2% Kasein (w/v) für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem schütteln blockiert. Nachdem die Platten erneut gewaschen wurden, ist das Serum in einer Verdünnung von 1:10 in PBST/0,1% plus 1% Kasein in die Wells pipettiert worden (Abb. 5/3 und 6/3), wobei alle Kontroll- und Testseren sowie die Sekundärantikörperkontrolle im Doppelansatz und die Puffer-Kontrolle im Vierfachansatz aufgetragen wurden. Danach ist der mAk 1C7 in einer Verdünnung von 1:800 in PBST/0,1% plus 1% Kasein in die Wells appliziert worden (Abb. 5/5 und 6/5) und nach einem weiteren Waschschrift wurde der Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper [GαM-HRP] Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:4000 in PBST/0,1% mit 1% Kasein aufgetragen (Abb. 5/7 und 6/7). Im Anschluss sind die Platten dreimal mit einer zwischenzeitlichen Inkubation von 5 min gewaschen worden und dann wurde das TMB in jedes Well pipettiert (Abb. 5/9 und 6/9). Die Platten sind dann für 10 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert worden. Die Farbreaktion wurde mit 1 N H₂SO₄ gestoppt und die Absorption mit dem ELISA Reader bei 450 nm gemessen.

Um die Spezifität des 1C7 zu überprüfen, ist als Serum-Ersatz der aus einem Kaninchen gewonnene polyklonale anti-TaSP Antikörper (Schnittger *et al.*, 2002) in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt worden.

Die ermittelten OD-Werte wurden als Prozent Inhibition (PI) des negativen Kontroll-Serums ausgedrückt und wie folgt berechnet:

$$PI[\%] = [1 - (\text{Durchschnitt der OD des Test-Serums} - \text{OD des Puffers}) / (\text{Durchschnitt der OD des negativen Kontroll-Serums} - \text{OD des Puffers})] \times 100$$

Der cut-off für den cELISA wurde bestimmt, indem der Mittelwert von 50 in Bezug auf eine Infektion mit *T. annulata*-negativen Seren von Rindern aus dem Schlachthof in Bad Bramstedt, Deutschland errechnet wurde und zum Mittelwert zwei Standardabweichungen addiert worden sind.

3.3 Hardware und Software

Datenbankrecherchen wurden mit Hilfe des Internetdienstes PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) durchgeführt. Membranen entwickelter Western Blots wurden mit dem Office Jet G55 Scanner (HP, Böblingen, Deutschland) und mit dem Programm Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems Inc.) digitalisiert. Grafiken und Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems Inc.) oder Microsoft Powerpoint 2000 erstellt. Literatur wurde mit EndNote 5.0 (ISI ResearchSoft, Kalifornien, USA) archiviert. Die Textverarbeitung erfolgte mit Microsoft WordXP. Statistische Analysen und Tabellen sind mit Hilfe von Microsoft Excel (Version 2002) und Statistica (StatSoft Europe, Version 8.2) erstellt worden. Die Auswertung der Mikrotiterplatten wurde mit Hilfe von Microwin (Version 4.2) durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der Entwicklung und Validierung des cELISA durchgeführt wurden, sind in zwei Veröffentlichungen dargestellt, welche in wissenschaftlichen Fachzeitschriften mit Gutachtersystem publiziert wurden (Transboundary and Emerging Diseases (Transbound Emerg Dis) und Parasitology Research (Parasitol Res)).

4.1 Veröffentlichungen

4.1.1 Veröffentlichung # 1

**“Development of a Competitive ELISA for Detection
of *Theileria annulata* Infection.”**

S. Renneker, B. Kullmann, S. Gerber, J. Dobschanski, M. A. Bakheit, D. Geysen, B. Shiels, A. Tait, J. Ahmed and U. Seitzer.

Transbound Emerg Dis **55**(5-6): 249-56.

DOI 10.1111/j.1865-1682.2008.01036.x

ORIGINAL ARTICLE

Development of a Competitive ELISA for Detection of *Theileria annulata* Infection

S. Renneker¹, B. Kullmann¹, S. Gerber¹, J. Dobschanski¹, M. A. Bakheit², D. Geysen³, B. Shiels⁴, A. Tait⁴, J. S. Ahmed¹ and U. Seitzer¹

¹ Division of Veterinary Infection Biology and Immunology, Research Center Borstel, Parkallee 22, 23845 Borstel, Germany

² National Research Center for Protozoan Diseases (NRCPD), Obihiro University for Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Hokkaido, Japan

³ Department of Animal Health, Institute of Tropical Medicine, Nationalestraat 155, 2000 Antwerp, Belgium

⁴ Parasitology Group, Division of Infection and Immunity, Institute of Comparative Medicine, Glasgow University Veterinary School, Bearsden Road, Glasgow G61 1QH, UK

Keywords:

Theileria annulata; competitive ELISA; TaSP antigen

Correspondence:

U. Seitzer. Division of Veterinary Infection Biology and Immunology, Research Center Borstel, Parkallee 22, 23845 Borstel, Germany. Tel.: +49 (0) 4537 188 413; Fax: +49 (0) 4537 188 627; E-mail: useitzer@fz-borstel.de

Received for publication April 1, 2008

doi:10.1111/j.1865-1682.2008.01036.x

Summary

In previous studies, *Theileria annulata* surface protein (TaSP) was identified as an immunodominant antigen and successfully used to develop and validate a recombinant-protein-based ELISA for the detection of circulating antibodies in serum of *T. annulata*-infected animals. In this study, the same antigen was used to develop a competitive ELISA (cELISA) using a monoclonal antibody that was found to bind to TaSP. The cELISA accurately differentiated *T. annulata*-infected from uninfected animals and demonstrated a satisfactory performance with a calculated sensitivity and specificity of 77.4% and 100%, respectively. Thus the test proved its suitability for the diagnosis of tropical theileriosis and has application for use in serological surveys to monitor the prevalence of the disease or identify carrier animals with high specificity.

Introduction

Theileria annulata, the causative agent of bovine tropical theileriosis, causes morbidity and loss in productivity in indigenous cattle, and especially in imported high-grade cattle, in which theileriosis is a severe and often lethal disease. The disease is distributed over a wide geographic area ranging from the Mediterranean littoral regions of Europe and Africa through the Middle East to India and China (Dolan, 1989). In its early phase, it can be diagnosed by direct detection of the schizont-infected cells in biopsy smears and typical clinical signs like enlargement of lymph nodes. In later phases of the disease and in carrier animals, serological tests are most suitable for diagnosis, because on the one hand parasitaemia tends to be at microscopically undetectable levels and on the other hand antibody titres are usually significantly higher than in the early phase of infection.

The majority of infected animals in the field are carrier animals and there is a great demand for studies monitor-

ing disease distribution as a part of control programmes. ELISA has been described as being most suitable for such studies because it has been proven to be economical, reliable, easily standardized and a high-throughput method. Recent molecular biological diagnostic techniques like PCR and reverse-line blotting have also been successfully used to identify *T. annulata*-infected cattle, but these methods have the disadvantages of being expensive and requiring a degree of expertise (d'Oliveira et al., 1995; Gubbels et al., 1999). Recently, an ELISA for detection of *T. annulata* infection was established that has been validated and used for epidemiological studies in the field (Bakheit et al., 2004; Salih et al., 2005a,b, 2007a,b; Seitzer et al., 2007).

Although this ELISA was shown to have no cross-reactivity to another major piroplasm of large ruminants, *Babesia bovis*, subsequent analyses with serum from cattle experimentally infected with *T. parva*, the aetiological agent of East coast fever, showed a high level of cross-reactivity, producing false positive results

of 95% (19/20 sera tested). Although *T. annulata* and *T. parva* have distinct geographical distributions, there are reports of co-existence in Southern Sudan (Salih et al., 2007c), making application of the *T. annulata* ELISA, at least in that region of the world, questionable. Moreover, the presence of cross-reactivity evokes concern that other unknown cross-reactivities may exist, generating a requirement for a serological diagnostic test with improved specificity. A possible approach to increase specificity of serological assays is the use of a competitive assay, such as competitive ELISA (cELISA) based on antibody-binding competitive inhibition. The identification of an antigen which is immunogenic and against which antibodies are produced on the one hand, and a monoclonal antibody that recognizes an epitope on this antigen which is conserved within the pathogen strains on the other hand, are prerequisites for the development of a cELISA. As the *Theileria annulata* surface protein (TaSP) antigen has, to date, been shown to be the most suitable and successful for antibody detection in *T. annulata*-infected animals, identification of a monoclonal antibody that selectively binds this antigen would be ideal for development of a cELISA against this parasite.

In this paper, we show that a monoclonal antibody (1C7) generated against the *T. annulata* macroschizont (Shiels et al., 1986a) and used as a marker for the schizont membrane (Schneider et al., 2004) specifically binds to the TaSP molecule and report the use of this monoclonal for the development of a cELISA for detection of *T. annulata*-infected animals.

Materials and Methods

Cell culture of *Theileria*-infected and other cell lines

Establishment and maintenance of the *T. annulata*-infected bovine cell lines and the *T. parva*-infected bovine cell line TpM308 was performed as described (Dobbelaere et al., 1988; Ahmed et al., 1989). The *T. annulata*-infected bovine cell lines TaA288, TaA285, TaA1272, TaJ, TaM2006 and TaH2006 were derived from parasites originating from different geographical locations (TaA: Ankara/Turkey; TaJ: Jordan; TaM: Morocco; TaH: Hissar/India).

The 1C7 hybridoma cell line producing mouse monoclonal 1C7 antibody was cultured in hypoxanthine aminopterin thymidine medium as described (Shiels et al., 1986a). Culture supernatant was collected and stored at -20°C .

The COS-7 cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Biochrom, Berlin, Germany).

All cell lines were cultured in an incubator at 37°C , 5% CO_2 and 95% humidity.

Expression and purification of recombinant *Theileria annulata* surface protein TaSP

Recombinant TaSP was produced as described (Schnittger et al., 2002). Expression was verified and quality assessed by Western blots and Coomassie gel staining, respectively. Briefly, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out using 12% polyacrylamide gels under reducing conditions. Western blot analysis was performed with an indirect immunoperoxidase method. Antibodies used were the RGS-HisTM anti-histidine antibody (Qiagen, Hilden, Germany) and a rabbit anti-TaSP-specific antiserum (Schnittger et al., 2002) diluted in dilution buffer [1% fish gelatine, 0.1% Tween-20 in phosphate buffered saline (PBS), 137 mM NaCl, 2.67 mM KCl, 3.2 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , pH 7.2]. Secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase [goat anti-rabbit IgG (Dianova, Hamburg, Germany)] was diluted 1 : 5000 in dilution buffer and incubated with the membranes after washing. Immunoreactivity was detected with BCIP/NBT substrate. Recombinant protein concentration was determined using the BioRad Micro-DC Assay kit (Biorad, Munich, Germany).

Bovine sera

FCS from different companies [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Munich, Germany), Biochrom, PAA Laboratories (PAA, Pasching, Austria), MP Biomedicals (Heidelberg, Germany)] and 50 serum samples collected from a slaughterhouse in Bad Bramstedt, Germany, were used as samples from non-infected cattle to establish the threshold value. FCS from Sigma served as the negative control for subsequent testing.

Thirty-three serum samples from animals experimentally infected with *T. annulata* were previously generated at the Free University Berlin, Germany (Ahmed et al., 1989) and the University of Utrecht (kindly provided by Frans Jongejan). The sera from this set that showed highest inhibition activity (285/21) was chosen as positive control for successive examinations.

Serum from cattle infected with *T. mutans* and *T. parva* were obtained from commercial ELISA kits containing positive controls (Svanova, Uppsala, Sweden). In addition, serum from two animals experimentally infected with *T. parva* was used.

Field sera collected at random from 133 animals in Sudan were tested in the established cELISA and compared to previously obtained ELISA data using the

S. Renneker et al.

same set of sera (Bakheit et al., 2004). These sera were collected in areas of Sudan where *T. parva* has never been recorded.

Indirect immunofluorescence staining and confocal laser microscopy

Cytospin preparations of *Theileria* infected or transiently transfected COS-7 cells were fixed and permeabilized in 2.5% formaldehyde and 0.25% Triton X-100 for 10 min, respectively. Samples were incubated with 1C7 antibody diluted 1 : 10 for 30 min at room temperature. Detection of 1C7 was performed with Alexa488-conjugated goat-anti-mouse IgG antibody and Toto-3 iodide or propidium iodide was used to visualize nucleic acid (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany). For the inhibition experiments, fixed, permeabilized cells were incubated with increasing dilutions of rabbit anti-TaSP antiserum, before incubation with a constant dilution of 1C7 antibody. Samples were analysed using a Leica TCS SP confocal laser scanning microscope equipped with an acousto-optical tunable filter and a 63× numerical aperture 1.32 planapochromat oil-immersion objective (Leica microsystems, Wetzlar, Germany). Images were acquired with the Leica TCSNT software and further processed and assembled using Adobe Photoshop 6.0.

Immunoprecipitation with 1C7 antibody

As monoclonal antibody 1C7 does not function in Western blot, immunoprecipitation was performed. TaA288 cells were lysed in modified RIPA buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Nonidet P-40 (octyl phenoxypolyethoxyethanol), 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 µg/ml each aprotinin, leupeptin, pepstatin, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM sodium fluoride]. Lysate was pre-cleared by adding 100 µl of protein A sepharose bead slurry (50%; Biomol, Hamburg, Germany) per 1 ml of cell lysate and incubating at 4°C for 15 min. Protein A beads were removed by centrifugation (14 000 g, 4°C, 10 min), and the cell lysate adjusted to 1 mg/ml before adding 1C7 antibody at a dilution of 1 : 100 and incubating overnight at 4°C on a rocker. The immunocomplex was captured by adding 100 µl protein A sepharose bead slurry and gently rocking 1 h at 4°C. Sepharose beads were collected by pulse centrifugation, the supernatant discarded and the beads washed three times with ice-cold modified RIPA buffer. Finally beads were resuspended in sample buffer, boiled for 5 min and collected by centrifugation. SDS-PAGE was performed with the supernatant fraction as described above. Detection of 1C7 immuno-

Competitive ELISA for Detection of *Theileria annulata* Infection

precipitated TaSP protein was performed by western blot analysis using rabbit anti-TaSP antiserum.

Transient transfection of a green fluorescent protein (GFP)-construct containing the TaSP polymorphic region into COS-7 cells

A 396 bp sequence containing the polymorphic region of the TaSP protein (Accession AJ316256, aa position 26/157 of the whole protein) was amplified using TaSP_{ex_SalI_F} (5'-GTTCGACGATCGACAACCTAATCCTAT-3') and TaSP_{ex_stBamHI_R} (5'-GGATCCTAACCGTCAGAGTCATAATCAT-3') primers and subcloned into the pEGFPc1 eukaryotic expression vector (Clontech; Mobitec, Goettingen, Germany). Confirmation that the cloned insert was in the correct open reading frame was verified by sequencing (MWG, Operon, Edesberg, Germany).

COS-7 cells grown in six-well plates were transiently transfected using Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Cells (80–90% confluency) were transfected with 2 µg plasmid DNA using 8 µl transfection reagent. Cells were analysed, 24 h post-transinfection, by immunofluorescence staining, as described above.

Indirect ELISA

Nunc Maxisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 2.5 µg/ml recombinant *Theileria annulata* surface protein (rTaSP) and 1C7 antibody applied at different concentrations as indicated. Secondary peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Dianova) was used at a dilution of 1 : 10 000. Between reagent incubations, plates were washed three times with phosphate buffered saline plus 0.5% Tween20 (PBST/0.5%). Optimal concentration of rTaSP, 1C7 and GxM-HRP were determined by serial dilution.

To investigate the specificity of the monoclonal 1C7 antibody in this setup, another recombinant *T. annulata* membrane protein (TaD, Schneider et al., 2004) was used as antigen, and the MIB-1 antibody (Dianova), which binds to the proliferation-associated nuclear Ki-67 antigen was used as an isotype control.

Development of the rTaSP competitive ELISA

Antigen (TaSP) was diluted to 1 µg/ml in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). A total of 100 µl was pipetted into each well and the plates (Nunc Maxisorp, Nunc) were incubated overnight at room temperature in a humid chamber. All subsequent incubations were for 1 h at room temperature on an orbital shaker, and all reagents were applied at a volume of 100 µl per well. The

washing buffer was PBST/0.5% unless indicated. Each wash step consisted of three dispensing/aspirating cycles using an automated ELISA washer (Bio-Tek ELx405, Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany). After coating and incubating overnight, the plates were washed with PBS and then blocked with PBS plus 0.1% Tween (PBST/0.1%) containing 2% (w/v) casein. The plates were then washed with PBST/0.5% and serum samples, diluted 1 : 10 in PBST/0.1% plus 1% (w/v) casein, applied to the wells in triplicate. Negative and control positive sera were applied in three replicates and four wells, which received only second antibody, were used as conjugate control. Monoclonal antibody 1C7 was added to the wells at a dilution of 1 : 800 in PBST/0.1%/1% casein followed by a wash step and application of the secondary antibody (HRPO-labelled goat anti mouse antibody, Dianova) diluted 1 : 4000 in PBST/0.1%/1% casein. Following incubation with conjugated second antibody, the plates were washed three times with soaking cycles for 5 min in between and 100 µl of substrate chromogen solution (H₂O₂, 3.3', 5.5'-tetramethylbenzidine) was then pipetted into each well and the plates put into a humid chamber for colour development. The reaction was stopped after 10 min by adding 100 µl of 1 N H₂SO₄. Absorbance was measured at 450 nm using an ELISA reader (Hitech Expert 96, ASYS, Eugendorf, Austria).

In order to test the specificity of 1C7 binding to the rTaSP antigen, inhibition of 1C7 binding was also carried out using serial dilutions of the rabbit anti-TaSP antiserum as indicated.

The optical density (OD) values obtained were expressed as percent inhibition (PI) of the negative control computed as follows:

$$[1 - (\text{average of the OD of the test sample} - \text{OD of the buffer}) / (\text{average of the OD of the negative control} - \text{OD of the buffer})] \times 100.$$

The cut-off value that served as the threshold between negative and positive serum samples was determined as the mean PI value obtained with the 50 negative control serum samples from the Bad Bramstedt slaughterhouse, plus two standard deviations (SD).

Results

Binding of monoclonal 1C7 antibody to *Theileria annulata* surface protein TaSP

In a first set of experiments, inhibition of 1C7 staining of the schizont in TaA288 cells by pre-incubation of the slides with a specific rabbit anti-TaSP antiserum was investigated. Analysis of double stained cytospin preparations with confocal microscopy showed that pre-incubation with the rabbit anti-TaSP antiserum clearly decreased

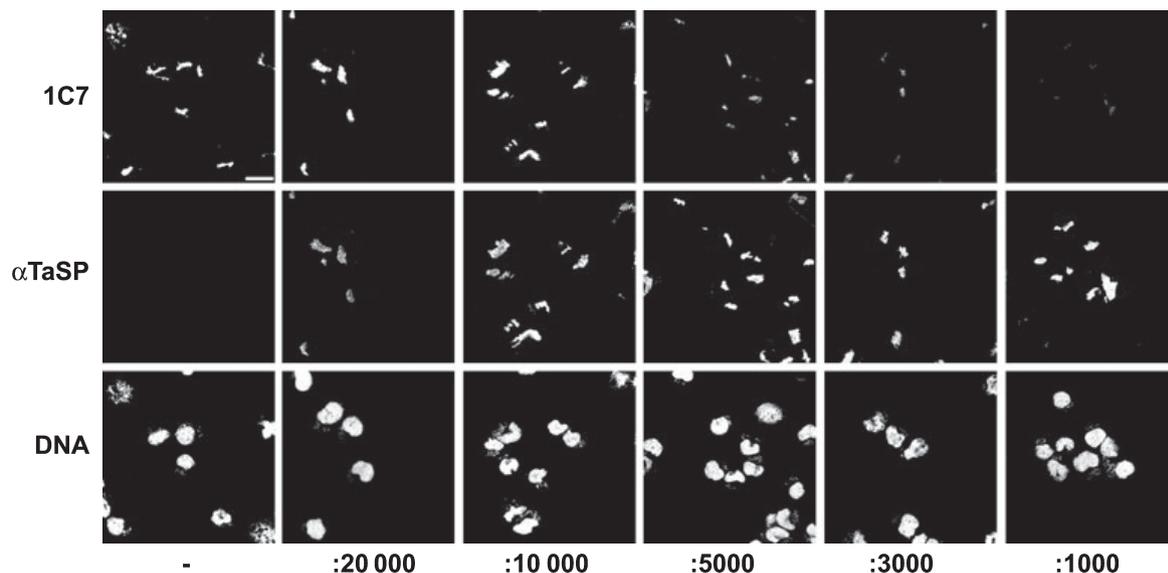


Fig. 1. Inhibition of binding of the 1C7 antibody to *Theileria annulata* schizonts in the TaA288 cell line by pre-incubation with increasing amounts of rabbit anti-*Theileria annulata* surface protein (TaSP) antiserum. Anti-TaSP antiserum was applied in increasing amounts (dilutions 1 : 20000 to 1 : 1000; middle panel), previous to application of the 1C7 antibody at a constant dilution of 1 : 10 to the same specimen (upper panel). Detection of antibody binding by respective fluorochrome labelled secondary antibodies showed that with increasing amounts of the anti-TaSP antiserum, binding of the 1C7 antibody was significantly decreased. Lower panel: nucleic acid stain of the respective sample. Size bar: 10 µm.

S. Renneker et al.

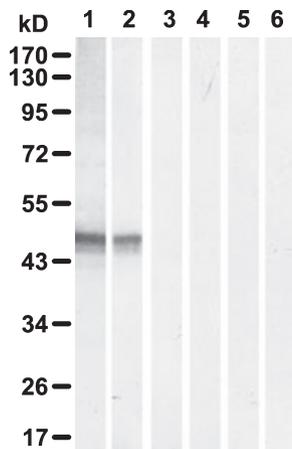


Fig. 2. Detection of *Theileria annulata* surface protein (TaSP) after immunoprecipitation with 1C7 antibody. Lane 1, 3 and 5: TaA288 cell lysate. Lanes 2, 4 and 6: Immunoprecipitation with 1C7 antibody. Lanes 1 and 2: detection with anti-TaSP antibody. Lanes 3 and 4: secondary anti-rabbit-IgG antibody only. Lanes 5 and 6: secondary anti-mouse-IgG antibody only. A band of approx. 47 kDa is specifically detected by the anti-TaSP antiserum in both the cell lysate and in the immunoprecipitate of the 1C7 antibody.

the signal obtained for binding of the 1C7 antibody, indicating that monoclonal 1C7 binds to the antigen recognized by anti-TaSP (Fig. 1).

The 1C7 monoclonal antibody failed to detect a protein band in Western blots (data not shown), therefore immunoprecipitation experiments were carried out. As shown in Fig. 2, Western blot analysis of the 1C7 immunoprecipitated antigen with anti-TaSP serum detected a band of identical size to the TaSP antigen detected in a total cell lysate. As discussed previously, the approximate size of 47 kD estimated for TaSP by Western blotting is larger than the 36 kDa calculated from its predicted amino acid sequence (Schnittger et al., 2002).

Further experiments carried out on COS-7 cells transfected with a construct expressing the polymorphic region of the TaSP antigen, corresponding to the region used to generate the rabbit anti-TaSP antiserum, showed that the 1C7 antibody specifically binds to cells expressing the GFP-tagged TaSP protein (data not shown).

Results from indirect ELISA experiments demonstrated that the 1C7 antibody binds to the rTaSP antigen in a dose-dependent manner as detected by a decreasing signal with increased dilution of the antibody (data not shown). No signals were detected using an ELISA set up employing a different *T. annulata* recombinant membrane protein (TaD), nor was binding of an isotype control antibody to rTaSP detected in the ELISA experiments. Inhibition of 1C7 antibody binding to rTaSP was investigated in a competitive ELISA setup using rabbit

Competitive ELISA for Detection of *Theileria annulata* Infection

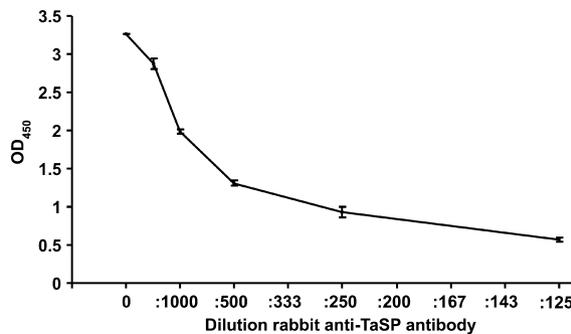


Fig. 3. Inhibition of binding of 1C7 to recombinant *Theileria annulata* surface protein (rTaSP) by anti-*Theileria annulata* surface protein (TaSP) antiserum in competitive ELISA. Increased amounts of anti-TaSP antiserum result in a decreased optical density, indicating an inhibition of binding of the 1C7 antibody to rTaSP.

anti-TaSP antiserum. Increasing concentrations of this antiserum clearly led to inhibition of 1C7 binding to the rTaSP antigen in a dose-dependent manner (Fig. 3).

To further establish whether the epitope recognized by the 1C7 antibody is conserved in different strains of *T. annulata*, cytopins of cell lines generated from isolates from different geographical regions were subjected to immunofluorescence staining. *T. annulata* isolates from Turkey, Morocco, Jordan and India were found to positively react with the 1C7 antibody (data not shown). The *T. parva*-infected cell line TpM803 showed no positive signal.

Taken together, these results indicated that 1C7 binds to an epitope on TaSP that is conserved among *T. annulata* strains tested in this study, pointing to a potential for use of this antibody and antigen for the development of a cELISA diagnostic test that will detect serum reacting

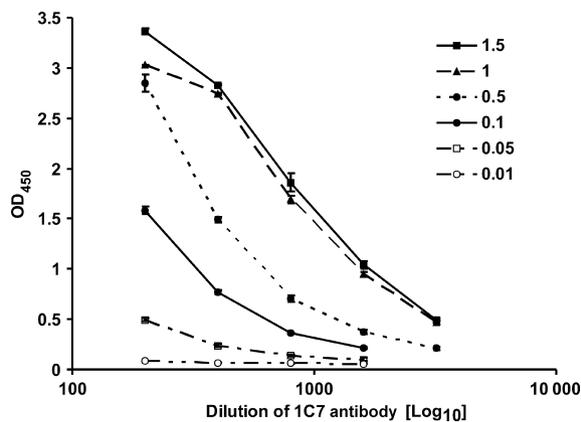


Fig. 4. ELISA block titration with the indicated concentrations of recombinant *Theileria annulata* surface protein and dilutions of 1C7 antibody.

against parasite from a significant number of parasite isolates.

Establishment of competitive ELISA based on rTaSP and 1C7 antibody

Appropriate concentrations of rTaSP and 1C7 antibody were determined by ELISA block titration (Fig. 4). A concentration of 1 µg/ml of rTaSP and a dilution of 1 : 800 of the 1C7 antibody consistently produced an OD at the target level of around 2.0 and at a point in the titration curve (linear range) that allowed optimal inhibition. These conditions were used, therefore, in all subsequent cELISA experiments.

The cut-off value of 17.5% inhibition was set using 50 sera from uninfected cattle and was determined as the mean PI value obtained plus two SD. Subsequent testing of 33 serum samples from experimentally infected animals showed that 31 of these samples tested positive using the established threshold (Fig. 5). The two serum samples that tested negative were samples collected 7 days post-infection.

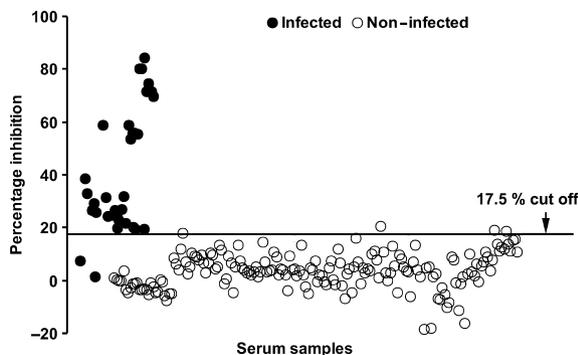


Fig. 5. Percentage inhibition of 50 slaughterhouse sera from Germany (open symbol) and 33 samples from animals experimentally infected with *Theileria annulata* (solid symbol). The solid horizontal line indicates the established threshold value of 17.5%.

Table 1 Comparison of the indirect ELISA (Bakheit et al., 2004) and the competitive (cELISA) using 133 field samples from Sudan

Test	ELISA		Total
	Positive	Negative	
cELISA			
Positive	89	0	89 (66.9%)
Negative	26	18	44 (33.1%)
Total	115 (86.5%)	18 (13.5%)	133 (100%)

Serum samples from cattle after experimental infection with *T. mutans* (1 serum) and *T. parva* (3 sera) all tested negative using the TaSP cELISA setup.

To further assess the diagnostic potential of the TaSP cELISA 133 serum samples collected in the Sudan that had previously been assayed by direct ELISA were tested (Bakheit et al., 2004). The concordance of the two analyses is shown in Table 1. A total of 89 sera were positive in both tests. Of the 44 sera that were negative in the cELISA, 26 had tested positive in ELISA. Thus the sensitivity of the test was calculated at 77.4%. All samples tested negative in the cELISA were also negative in the ELISA, resulting in a specificity of 100%.

Discussion

The major goal of this study was to develop a diagnostic cELISA test based on a recombinant *T. annulata* surface protein (rTaSP) that is expressed on the membrane of *T. annulata* macroschizonts. It is a strong immunodominant protein and has successfully been used to develop a diagnostic indirect ELISA that has been validated with a large number of serum samples obtained from the field (Bakheit et al., 2004; Salih et al., 2005a,b, 2007a,b; Seitzer et al., 2007). Although this indirect ELISA proved to be suitable for the detection of *T. annulata*-specific circulating antibodies, cross-reactivity to *T. parva* could not be excluded.

Competitive ELISA assays have been shown previously to resolve such specificity problems. In this study, we established a cELISA for the detection of *T. annulata*-specific antibodies using a monoclonal antibody (1C7). This antibody was previously shown to stain the macroschizont stage of this parasite within infected bovine cells and has been used as a marker for the macroschizont membrane (Schneider et al., 2004, 2007). In this study, several lines of evidence indicate that the 1C7 monoclonal antibody specifically binds to native and recombinant TaSP antigen. It was shown that the specific rabbit anti-TaSP antiserum interferes with 1C7 binding both against *T. annulata*-infected cells and recombinant TaSP protein. In addition, a protein immunoprecipitated by monoclonal 1C7 was also detected by anti-TaSP antiserum. The suitability of utilizing this antibody in a cELISA setup with rTaSP was further supported by the results, which demonstrated that the antibody reacted with *T. annulata*-infected cell lines obtained from different geographical regions, including Turkey, Morocco, Jordan and India.

Establishment of the threshold value of the cELISA for differentiating between infected and non-infected cattle was performed with sera from a region non-endemic for tropical theileriosis and was calculated at 17.5%. Using this cut off value, sera from experimentally infected ani-

S. Renneker et al.

mals were tested, of which only two out of 33 were diagnosed as negative. As these two samples were obtained from animals 1 week post-infection, it may be argued that at this point of time specific antibodies had not developed and were not yet detectable. Further experiments are needed to establish at what point of time in infection antibodies against rTaSP become measurable and over what period of time they remain thus.

As may be expected, an increased specificity of a serological assay leads to a decreased sensitivity, and this was found to be the case for the cELISA developed in this study. Cross-reactivity to serum from cattle infected with *T. parva* was abolished, and the specificity compared to the previously established indirect ELISA was 100%. Serum from an animal infected with *T. mutans* was also negative, and although not tested, it is highly unlikely that the cELISA delivers false positive results with sera from *B. bovis*-infected animals, as the indirect ELISA showed no cross-reactivity. Thus, regarding the use of the cELISA in geographical regions where animals are likely to be infected by one or more of these piroplasms, prediction that the assay will perform with a high degree of specificity appears to be warranted. However, the sensitivity of the cELISA was decreased, as several Sudanese field sera that reacted positively in the indirect ELISA were negative in the cELISA. A possible explanation for this result is that in a previous study monoclonal antibody 1C7 demonstrated differential reactivity against cell lines derived from the Sudan and Iran (Shiels et al., 1986b). Therefore, to provide a catchall additional diagnostic monoclonal antibodies that detect variant forms of TaSP not recognized by 1C7 are required. Furthermore, with a panel of monoclonal antibodies that detect variant antigenic forms, a serological test could be developed that can assess antigenic diversity and possibly inform epidemiological studies following vaccination programmes. The work presented in this study demonstrates the potential for development of a cELISA that shows high specificity and could be developed into a catchall sero-diagnostic test with the potential to be adapted to distinguish animals infected with different genotypes of parasites. In conclusion validation studies and the generation of further anti-TaSP monoclonals are now needed before this newly established cELISA can be applied in epidemiological surveys and control programmes in regions where tropical theileriosis is endemic and in disease-free areas as a tool for surveillance.

Acknowledgements

This work was supported partly by the EU-funded Inco-Dev project 'INCOME' (INCO-CT-2005-515915).

Competitive ELISA for Detection of *Theileria annulata* Infection

References

- Ahmed, J. S., M. Rother, S. Steuber, and E. Schein, 1989: In vitro proliferative and cytotoxic responses of PBL from *Theileria annulata*-immune cattle. *J. Vet. Med. B.* 36, 584–592.
- Bakheit, M. A., L. Schnittger, D. A. Salih, K. Boguslawski, D. Beyer, M. Fadl, and J. S. Ahmed, 2004: Application of the recombinant *Theileria annulata* surface protein in an indirect ELISA for the diagnosis of tropical theileriosis. *Parasitol. Res.* 92, 299–302.
- Dobbelaere, D. A., T. M. Coquerelle, I. J. Roditi, M. Eichhorn, and R. O. Williams, 1988: *Theileria parva* infection induces autocrine growth of bovine lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4730–4734.
- Dolan, T. T., 1989: Theileriosis: a comprehensive review. *Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.* 8, 11–36.
- Gubbels, J. M., A. P. de Vos, M. van der Weide, J. Viseras, L. M. Schouls, E. de Vries, and F. Jongejan, 1999: Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1782–1789.
- d'Oliveira, C., M. van der Weide, M. A. Habela, P. Jacquiet, and F. Jongejan, 1995: Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 13, 2665–2669.
- Salih, D. A., J. S. Ahmed, M. A. Bakheit, E. B. Ali, A. M. El Hussein, S. M. Hassan, O. E. Shariff, M. Fadl, and F. Jongejan, 2005a: Validation of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Parasitol. Res.* 97, 302–308.
- Salih, D., S. Hassan, M. A. Bakheit, A. M. El Hussein, F. Jongejan, and J. S. Ahmed, 2005b: Application of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle., Proceedings 5th International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens, Neuchâtel, Switzerland, pp. 163–166.
- Salih, D. A., A. M. El Hussein, M. N. Kyule, K. H. Zessin, J. S. Ahmed, and U. Seitzer, 2007a: Determination of potential risk factors associated with *Theileria annulata* and *Theileria parva* infections of cattle in the Sudan. *Parasitol. Res.* 101, 1285–1288.
- Salih, D. A., S. M. Hassan, and A. M. El Hussein, 2007b: Comparisons among two serological tests and microscopic examination for the detection of *Theileria annulata* in cattle in northern Sudan. *Prev. Vet. Med.* 81, 323–326.
- Salih, D. A., A. M. E. L. Hussein, U. Seitzer, and J. S. Ahmed, 2007c: Epidemiological studies on tick-borne diseases of cattle in Central Equatoria State, Southern Sudan. *Parasitol. Res.* 101, 1035–1044.
- Schneider, I., D. Haller, U. Seitzer, D. Beyer, and J. S. Ahmed, 2004: Molecular genetic characterization and subcellular localization of a putative *Theileria annulata* membrane protein. *Parasitol. Res.* 94, 405–415.

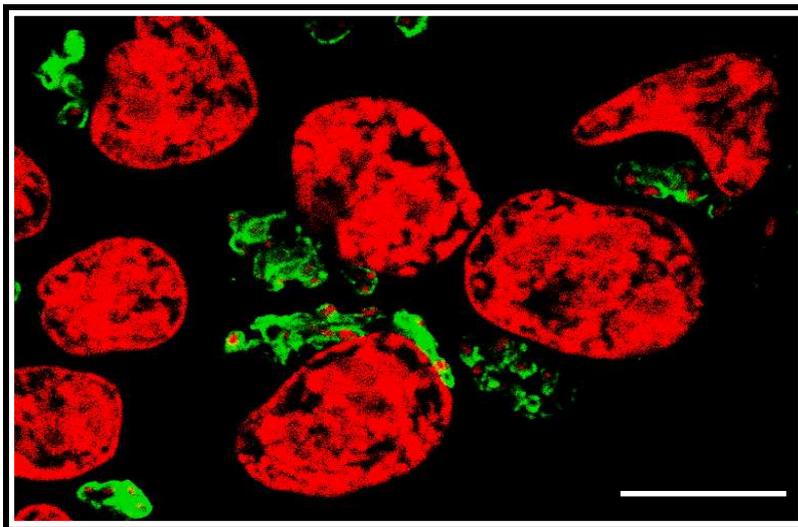
- Schneider, I., D. Haller, B. Kullmann, D. Beyer, J. S. Ahmed, and U. Seitzer, 2007: Identification, molecular characterization and subcellular localization of a *Theileria annulata* parasite protein secreted into the host cell cytoplasm. *Parasitol. Res.* 101, 1471–1482.
- Schnittger, L., F. Katzer, R. Biermann, P. Shayan, K. Boguslawski, S. McKellar, D. Beyer, B. R. Shiels, and J. S. Ahmed, 2002: Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 247–256.
- Seitzer, U., M. A. Bakheit, D. E. Salih, A. Ali, D. Haller, H. Yin, L. Schnittger, and J. S. Ahmed, 2007: From molecule to diagnostic tool: *Theileria annulata* surface protein TaSP. *Parasitol. Res.* 101, S217–S223.
- Shiels, B. R., C. McDougall, A. Tait, and C. G. D. Brown, 1986a: Identification of infection-associated antigens in *Theileria annulata* infected cells. *Parasite Immunol.* 8, 69–77.
- Shiels, B., Mc. Dougall, C., Tait, A., and Brown, CG, 1986b: Antigenic diversity of *Theileria annulata* macroschizonts. *Vet. Parasitol.* 21, 1–10.

4.1.2 Ergänzungen zu Veröffentlichung # 1

Als Ergänzungen werden an dieser Stelle Daten und Abbildungen vorgestellt, die aus Platzgründen in der Veröffentlichung nicht eingehend erläutert werden konnten. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf Untersuchungen zur subzellulären Bindungsstelle des monoklonalen Antikörpers 1C7 in *T. annulata*-infizierten Zellen, auf Experimente zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für den cELISA sowie auf Untersuchungen hinsichtlich Kreuzreaktivitäten mit verwandten Erregern von *Theileria annulata*.

4.1.2.1 Subzelluläre Bindungsstelle des monoklonalen Antikörpers 1C7

Studien von Shiels *et al.* (1986a) haben ergeben, dass der mAk 1C7 ein Infektions-assoziiertes Antigen in *T. annulata*-infizierten Zellen identifiziert, und Schneider *et al.* (2004) haben 1C7 als Marker für die Schizontenmembran in *T. annulata*-infizierten



Zellen verwendet. In Untersuchungen von Zytozentrifugenpräparaten im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der mAk 1C7 an ein Antigen des Schizonten bindet (Abbildung 8).

Abb. 8 Immunfluoreszenzfärbung Theilerien-infizierter Zellen (*TaA2006*) mit 1C7

rot: Nukleinsäurefärbung mit Propidiumiodid

grün: Detektion eines Antigenes des Parasiten durch 1C7

weißer Größenbalken: 10 µm

Die großen roten Areale repräsentieren den Zellkern der *T. annulata* (Ankara 2006)-infizierten Zellen und 1C7 befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft des Parasiten (kleine, rote, punktförmige Struktur).

Weiterhin hat die Analyse von Zytozentrifugenpräparaten mittels konfokaler Lasermikroskopie ergeben, dass das Epitop, welches der mAk 1C7 erkennt, innerhalb verschiedener Linien von *T. annulata* konserviert, jedoch nicht in allen Isolaten vorhanden ist, wobei *T. parva*- und *T. lestoquardi*-infizierte Zelllinien nicht mit dem monoklonalen Antikörper 1C7 reagierten (Abbildung 9).

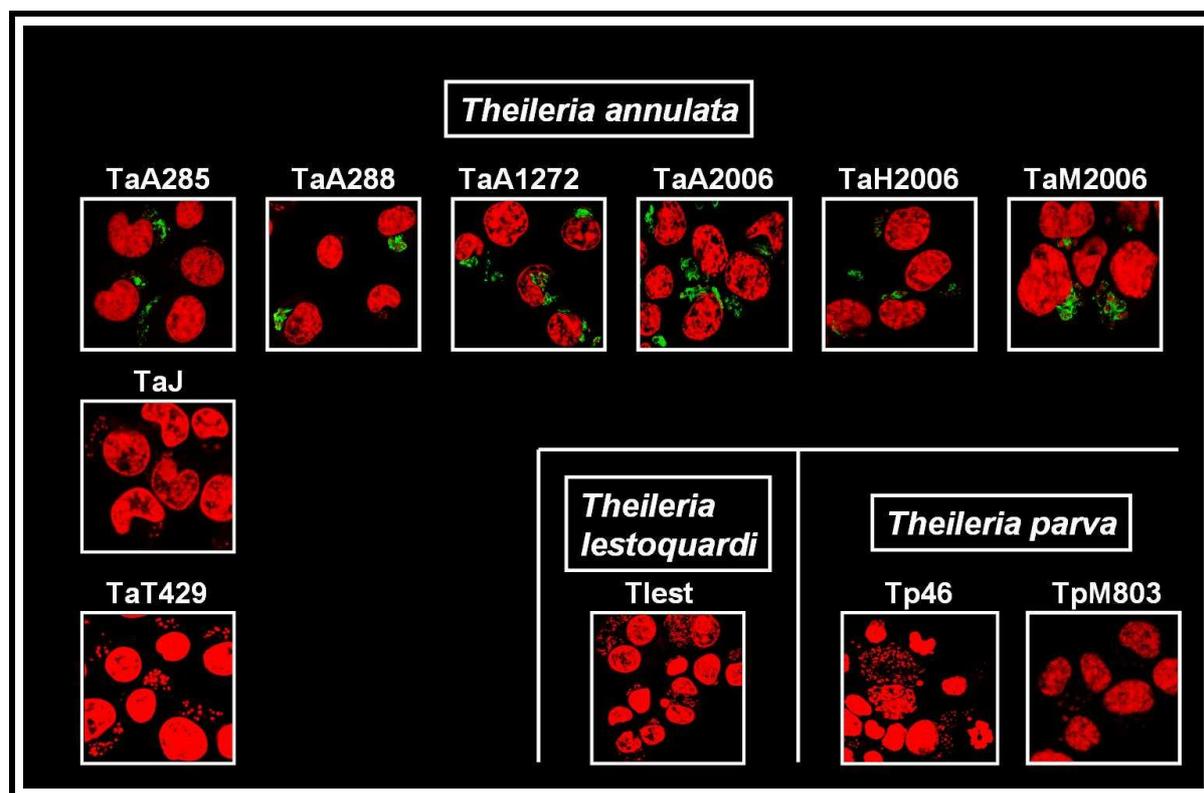
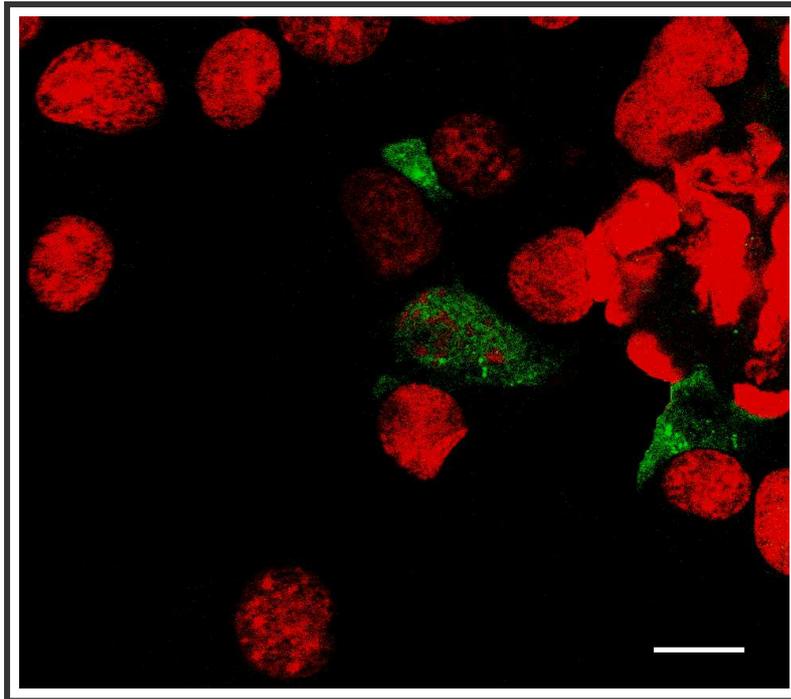


Abb. 9 Reaktivität von 1C7 mit verschiedenen *Theileria*-infizierten Zelllinien

rot: Nukleinsäurefärbung mit Propidiumiodid; grün: Detektion eines Infektions-assoziierten Proteins in verschiedenen *T. annulata*-infizierten Zellen mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 1C7

Sechs der acht getesteten, mit *T. annulata* infizierten Zelllinien zeigten eine positive Reaktion mit 1C7 (TaA285, TaA288, TaA1272, TaA2006, TaH2006 und TaM2006), während zwei Isolate von *T. annulata* (TaJ und TaT429) nicht mit dem monoklonalen Antikörper 1C7 reagierten. Die drei Negativ-Kontrollen (mit *T. lestoquardi*- und *T. parva*- [Tp46 und TpM803] infizierte Zellen) wiesen keine Reaktion mit 1C7 auf.

COS-7 Zellen wurden mit einem GFP-Konstrukt transfiziert, das die polymorphe



Region des TaSP enthält (Gerber, 2008). Transfizierte COS-7 Zellen, die das Gen exprimiert und das Protein synthetisiert haben, konnten in der Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe des mAk 1C7 detektiert werden (Abbildung 10).

Abb. 10 Immunfluoreszenzfärbung von TaSP- transfizierten COS-7 Zellen mit 1C7

rot: Nukleinsäurefärbung mit Propidiumiodid; grün: Immunfluoreszenzfärbung mit 1C7

weißer Größenbalken: 10 µm

Detektion von TaSP mit Hilfe von 1C7 in TaSP-transfizierten COS-7 Zellen

4.1.2.2 Optimierung des cELISA

Nachdem nun alle vorangegangenen Untersuchungen darauf hinwiesen, dass der mAk 1C7 selektiv an TaSP bindet, sind zwei Seren von *T. annulata*-infizierten Rindern (Verdünnung 1:25) im kompetitiven System getestet worden, die eine Inhibition von 51 bzw. 54 Prozent in Bezug auf das negative Kontroll-Serum aufwiesen (Abbildung 11).

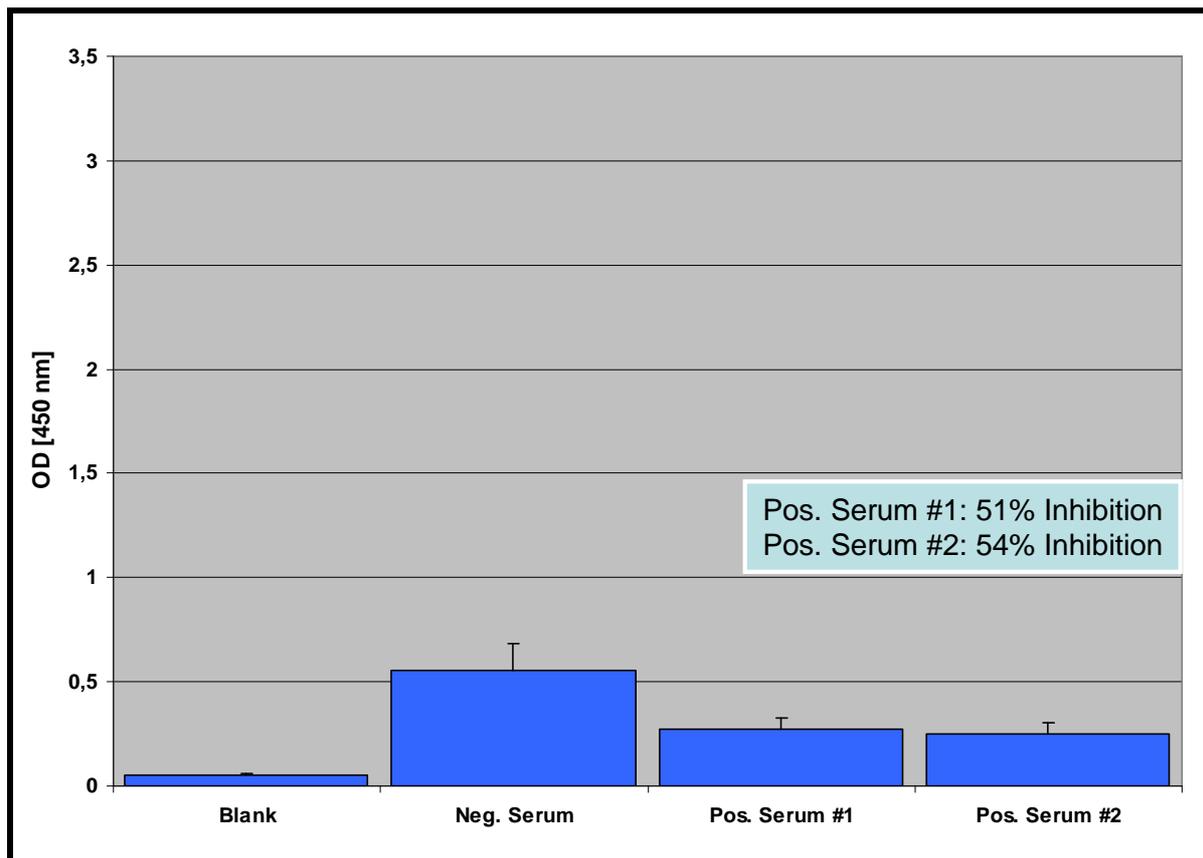


Abb. 11 cELISA von zwei Seren von *T. annulata*-infizierten Rindern

Es sind zwei positive Seren (Pos. Serum #1 und #2) im cELISA getestet worden, die in Bezug auf die Negativkontrolle (Neg. Serum) eine Inhibition von 51% (Pos. Serum #1) bzw. 54% (Pos. Serum #2) aufwiesen. Die Mikrotiterplatte wurde mit 2,5 µg/ml rTaSP beschichtet und die Verdünnungen der einzelnen Reaktionspartner betragen für die Seren 1:25, für den monoklonalen Antikörper 1C7 1:1000 und für den Sekundärantikörper (GαM) 1:10000. Die Kontrolle ohne Beschichtung der Platte mit rTaSP (Blank) ergab bei Zugabe von Serum, 1C7 und Sekundärantikörper in oben genannten Verdünnungen ein sehr geringes Signal.

Aufgrund der niedrigen Absorptions-Werte (Abb. 11) musste die optimale Konzentration sämtlicher Reaktionspartner in verschiedenen Experimenten unter Einsatz der Schachbrett-Titration ermittelt werden. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis für rTaSP und 1C7 bei einer Verdünnung des GαM-HRP von 1:10000. In allen nachfolgenden Versuchen wurden rTaSP und 1C7 in einer Konzentration von 1 µg/ml respektive einer Verdünnung von 1:800 eingesetzt, und für den Sekundärantikörper wurde unter diesen Bedingungen eine geeignete Verdünnung von 1:4000 ermittelt (Abbildung 13). Das Optimum für die Serumverdünnung lag bei 1:10, welches aus Experimenten resultierte, die unter o. g. Voraussetzungen durchgeführt wurden.

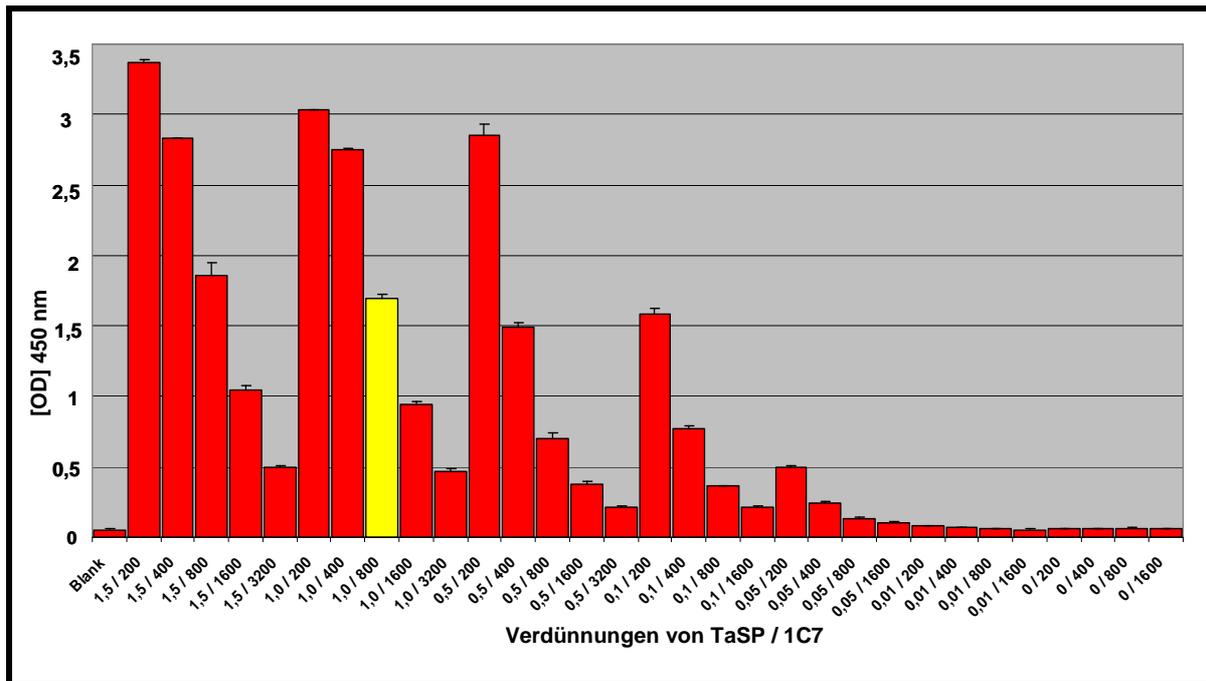


Abb. 12 Schachbrett-Titration von rTaSP und 1C7

Die Schachbrett-Titration von rTaSP (1,5 bis 0 µg/ml) und 1C7 (1:200 bis 1:3200) ergab eine optimale optische Dichte (OD) bei 450 nm von 1,7 (linearer Bereich) bei einer Konzentration von 1,0 µg/ml für rTaSP und einer Verdünnung des 1C7 von 1:800 (gelber Balken). Die Verdünnung des Sekundärantikörpers betrug bei diesem Experiment 1:10000.

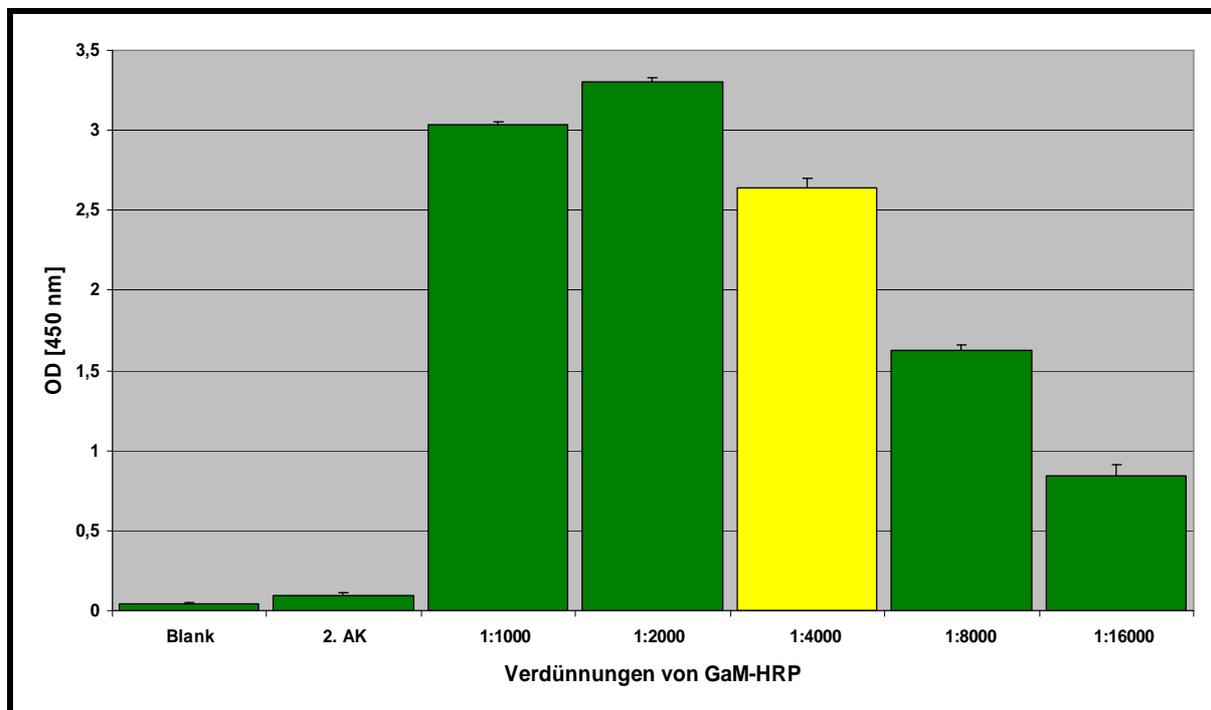


Abb. 13 Verdünnungsreihe des Sekundärantikörpers (GaM-HRP)

Bei Einsatz von rTaSP (1µg/ml) und 1C7 (1:800) konnte für den Sekundärantikörper eine optimale Verdünnung von 1:4000 ermittelt werden (gelber Balken). Die Kontrollen für nicht mit rTaSP beschichtete Wells (Blank) und beschichtete Wells plus Sekundärantikörper (2. Ak) ohne die Zugabe von 1C7 ergaben keine signifikanten Signale.

4.1.2.3 Spezifität des cELISA

Nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen für den cELISA, wurden verschiedene Seren experimentell infizierter Rinder getestet, um Erkenntnisse hinsichtlich der Spezifität des cELISA zu gewinnen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt und lassen erkennen, dass bei Seren von experimentell infizierten Tieren mit verschiedenen, z.T. verwandten Erregern von *T. annulata*, keine Kreuzreaktivitäten auftraten.

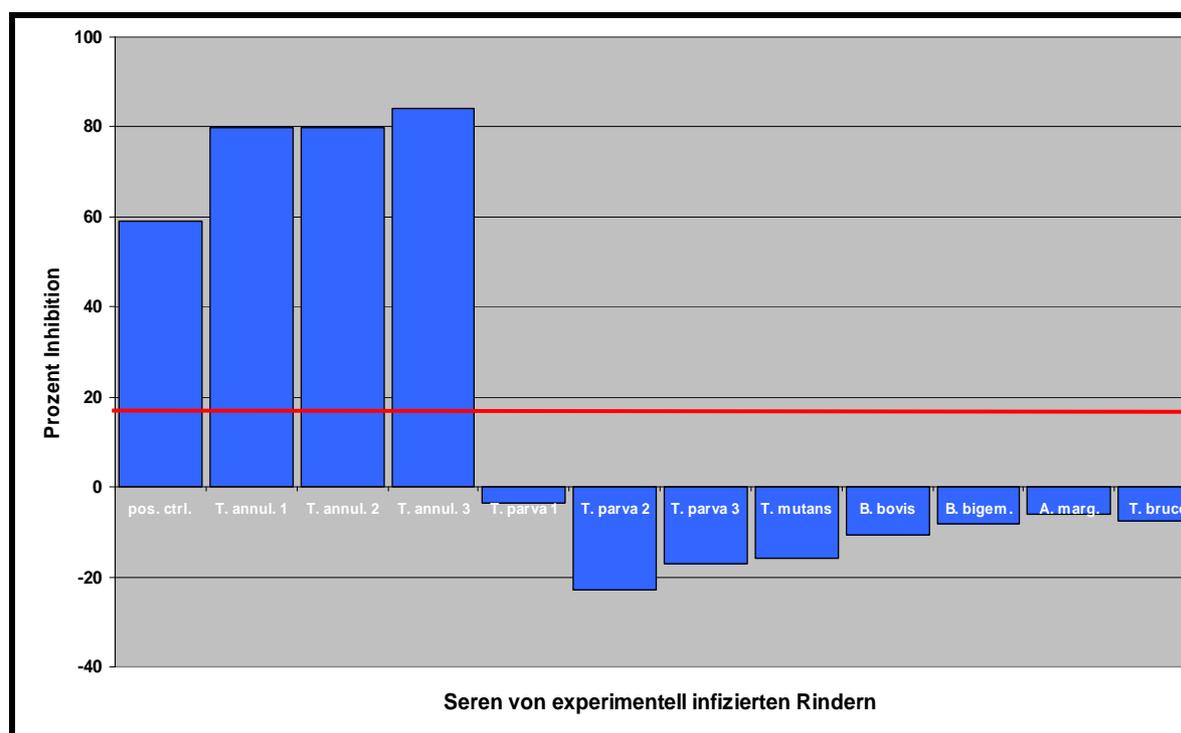


Abb. 14 cELISA von Seren experimentell infizierter Rinder

Drei Seren von experimentell mit *T. annulata*-infizierten Tieren, drei Seren von Tieren, die experimentell mit *T. parva* infiziert wurden und jeweils ein Serum eines Rindes, das experimentell mit *T. mutans*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *A. marginale* und *T. brucei* infiziert wurde, sind unter o. g. Bedingungen mittels cELISA getestet worden und ergaben, dass der Test ausschließlich Antikörper gegen *T. annulata* detektiert und nicht mit Antikörpern gegen andere Erreger reagiert.

4.1.3 Veröffentlichung # 2

**“Field validation of a competitive ELISA for detection
of Theileria annulata infection.”**

S. Renneker, J. Abdo , J. S. Ahmed and U. Seitzer

Parasitol Res. **106** (1): 47-53.

DOI 10.1007/s00436-009-1625-4

Field validation of a competitive ELISA for detection of *Theileria annulata* infection

Stefanie Renneker · Jassim Abdo · Jabbar S. Ahmed · Ulrike Seitzer

Received: 10 August 2009 / Accepted: 31 August 2009

© Springer-Verlag 2009

Abstract In previous studies, *Theileria annulata* surface protein (TaSP) was identified as an immunodominant antigen and successfully used to develop a recombinant-protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of circulating antibodies in serum of *T. annulata*-infected animals. To increase the specificity, a competitive ELISA (cELISA) was developed using recombinant TaSP antigen and a monoclonal antibody (1C7) specifically binding to TaSP. Since the cELISA accurately differentiated *T. annulata*-infected from uninfected animals, a study was performed to analyse the suitability of the cELISA in the field. For this, 230 sera with unknown status from different governorates in the north of Iraq were analysed using both the indirect and competitive ELISA and were compared. There was a significant ($p < 0.5 \times 10^{-19}$) correlation ($r = 0.556$) between the tests, whereby the cELISA detected more sera as negative (44/230) compared to the indirect ELISA (21/270). Accordingly, less sera were determined to be positive in the competitive (186/230) than in the indirect ELISA (209/230). Sensitivity and specificity of the cELISA taking the indirect ELISA as a reference were 84.2% and 52.4%, respectively. Accordingly, the calculated prevalence of *T. annulata* infection was 90.9%, and the positive predictive value was determined to be 94.6%. Taken together, the cELISA proved its suitability for field application and was found qualified for use in serological surveys to monitor the prevalence of *T. annulata* infection and to identify carrier animals.

Stefanie Renneker and Jassim Abdo contributed equally to the paper.

S. Renneker · J. Abdo · J. S. Ahmed · U. Seitzer (✉)
Veterinary Infection Biology and Immunology,
Research Center Borstel,
Parkallee 22,
23845 Borstel, Germany
e-mail: useitzer@fz-borstel.de

Introduction

Theileria annulata, a protozoan parasite transmitted by ticks of the species *Hyalomma*, is the pathogenic agent of bovine tropical theileriosis, which induces morbidity and loss in productivity in indigenous and more notably in crossbreed cattle, but especially in imported high-grade cattle, the infection of which causes a severe and often lethal disease. Tropical theileriosis is distributed over a wide geographic area ranging from the Mediterranean littoral regions of Europe and Africa through the Middle East to India and China (Dolan 1989). In its early phase, the infection can directly be diagnosed by microscopical examination of biopsy smears and clinical signs, including fever over 41°C, enlargement of lymph nodes, mucus discharge and diarrhoea. In later phases of the disease and particularly in carrier animals, serological tests are more suitable for diagnosis because parasitaemia tends to be at microscopically undetectable levels, and antibody titres are usually significantly higher than in the early phase of infection. Recent molecular biological diagnostic techniques like PCR and reverse line blotting have also been successfully used to identify *T. annulata* DNA in samples of cattle, but these methods have the disadvantages of being expensive and requiring a degree of expertise (d'Oliveira et al. 1995; Gubbels et al. 1999).

As the majority of infected animals in the field are indigenous cattle and often carrier animals, there is a great demand for studies monitoring the disease distribution as a part of epidemiological surveys and the implementation of control programmes, including use of attenuated vaccines.

An indirect ELISA for the detection of *T. annulata* infection based on the immunodominant antigen *T. annulata* surface protein (TaSP) was established, validated and used for epidemiological studies in the field (Bakheit et al. 2004;

Salih et al. 2005a,b, 2007a,b; Seitzer et al. 2007). Since in the course of these investigations, a cross-reactivity with serum from cattle experimentally infected with *Theileria parva*, the aetiological agent of East coast fever, and with *Trypanosoma* was observed, a competitive ELISA (cELISA) was established to increase the specificity of the detection of circulating antibodies against TaSP (Renneker et al. 2008). Using sera from experimentally infected animals, the cELISA accurately identified 93.9% (31/33) of the sera as positive, whereby the two negatively reacting sera had been collected 1 week after infection, being too early for the detection of antibodies. The cELISA showed no cross-reactivity with sera from animals experimentally infected with *T. parva*, *Trypanosoma*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma*, and the test exhibited a satisfactory sensitivity and specificity of 77.4% and 100%, respectively, using the indirect ELISA as reference test.

In this paper, the cELISA was compared to the indirect ELISA as a field application using 230 field sera with unknown status from three different governorates in Iraq, showing that the cELISA is  suitable for application under field conditions.

Materials and methods

Expression and purification of rTaSP

Recombinant TaSP was produced as described (Schnittger et al. 2002). Expression was verified and quality assessed by Western blots and Coomassie gel staining, respectively. Briefly, sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis was carried out using 12% polyacrylamide gels under reducing conditions. Western blot analysis was performed with an indirect immuno-alkaline phosphatase method. Antibodies used were the RGS-HisTM anti-histidine antibody (Qiagen, Hilden, Germany) and a rabbit anti-TaSP-specific antiserum (Schnittger et al. 2002) diluted in dilution buffer [1% fish gelatine, 0.1% Tween-20 in phosphate-buffered saline (PBS), 137 mM NaCl, 2.67 mM KCl, 3.2 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.2]. Secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase [goat anti-rabbit IgG (Dianova, Hamburg, Germany)] was diluted 1:5,000 in dilution buffer and incubated with the membranes after washing. Immunoreactivity was detected with NBT/BCIP substrate. Recombinant protein concentration was determined using the Bio-Rad Micro-DC Assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany).

Monoclonal antibody 1C7

The 1C7 hybridoma cell line producing mouse monoclonal 1C7 antibody was cultured in hypoxanthine–aminopterin–

thymidine medium as described (Shiels et al. 1986). Culture supernatant was collected and stored at -20°C until use.

Bovine sera

Two hundred and thirty sera collected in three different governorates of the Kurdistan region of Iraq were used for validation of the cELISA. These governorates were Duhok, Erbil and Sulaimaniya (Fig. 1). The climate in this region is optimal for the reproduction and development of *H. anatolicum*, which is present in this area (Omer et al. 2007).

The samples were collected randomly by Al-Barwary (2007) from animals of the three areas during April to June 2006. All animals were local breed, apparently healthy and female. Furthermore, they were older than 1 year, grazed in an outdoor system and were infested with many ticks. The cows were not treated with any kind of acaricide or anti-theilerial drugs prior to sampling. Eighty blood samples were taken from cattle near Dohuk, 80 from cattle in the vicinity of Erbil and 70 from animals from the Sulaimaniya area. The blood samples were taken from the jugular vein of the animals, kept in a plain tube without anticoagulant and later centrifuged. The serum was then isolated and kept at -20°C until use.

Adult bovine serum (Sigma, Deisenhofen, Germany) served as negative control serum, whereas the positive control serum (287/17) was derived from an animal experimentally infected with *T. annulata*, previously generated at the Free University Berlin, Germany (Ahmed et al. 1989).

Indirect ELISA

The indirect ELISA was performed as described before (Bakheit et al. 2004) with minor modifications. Nunc Maxisorp plates (Nunc, Glostrup, Denmark) were coated with 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ recombinant TaSP (rTaSP) diluted in carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6). A total of 100 μl was pipetted into each well, and the plates were then sealed and allowed to incubate at 4°C overnight. All subsequent incubations were done for 2 h at room temperature, and all subsequent reagents were pipetted at a volume of 100 μl per well. All washing steps were performed using 0.01 M PBS (pH 7.2) containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBST) as washing buffer. Every washing step consisted of three dispensing/aspiration cycles using an automated ELISA washer (Bio-Tek 405, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany). After coating, the plates were washed and blocked with PBS containing 2% w/v casein. Sera were diluted 1:50 in a diluent buffer consisting of PBST plus 1% w/v casein. Test and control sera were

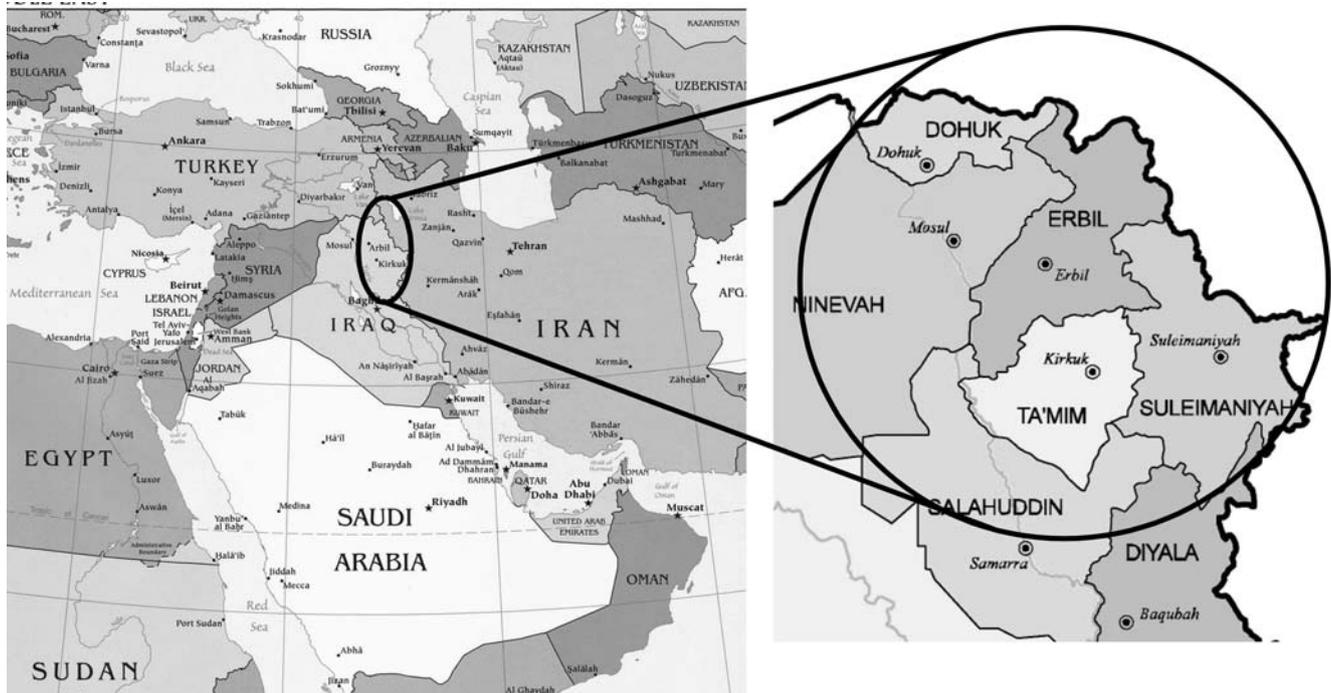


Fig. 1 The three governorates of the Kurdistan region of Iraq where the 230 field samples were collected: Duhok, Erbil and Sulaimaniya (courtesy University of Texas Libraries and <http://www.goalsforamericans.org>)

always applied in duplicate and two wells, which received only the secondary antibody but no serum, were always used as conjugate controls. The conjugate (horseradish peroxidase (HRPO)-labelled rabbit anti-bovine antibody, Dianova, Hamburg, Germany) was used at a dilution of 1:2,500 in a buffer equal to the serum diluent buffer. After conjugate incubation, the plates were subjected to three washing steps as before but with soaking cycles for 5 min with 250 µl per well in between. The plates were then put in a humid chamber, and 100 µl volumes of the substrate chromogen solution (H₂O₂, TetraMethylBenzidin (TMB); Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were pipetted

into each well. Colour development was allowed for 10 min and the reaction was then stopped by adding 100 µl of a 1 M phosphoric acid solution. The absorbance at 450 nm was measured using an ELISA reader (Expert 96, Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

The ELISA cut-off value of 18%, which served as threshold between the positive and the negative serum samples, was determined as the mean value of percentage positivity (PP) obtained with 50 samples from a non-endemic area (slaughterhouse in Germany) plus two standard deviations. The PP value of each serum sample was computed as follows:

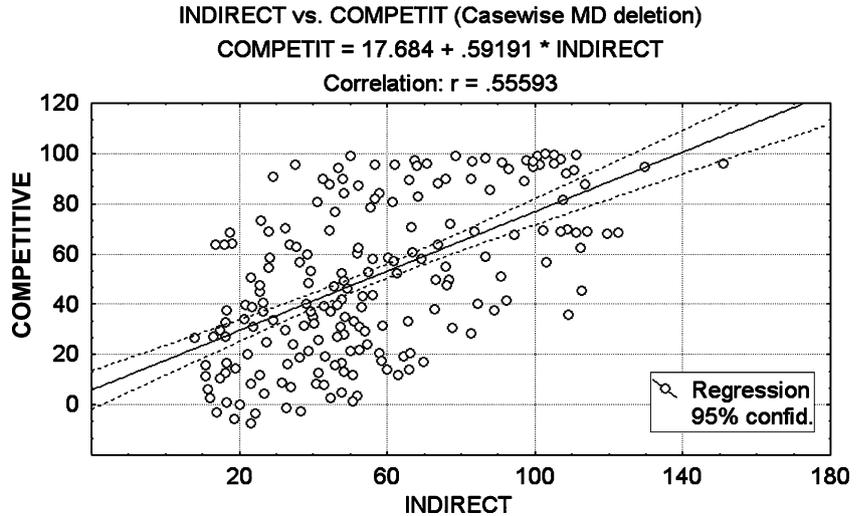
$$\frac{(\text{average of the OD of the test sample} - \text{OD of the buffer})}{(\text{average of the OD of the positive control} - \text{OD of the buffer})} \times 100$$

Competitive ELISA

The cELISA was carried out as described before (Reneker et al. 2008). Antigen (rTaSP) was diluted to 1 µg/ml in carbonate–bicarbonate buffer (pH 9.6). A total of 100 µl was pipetted into each well, and the plates (Nunc Maxisorp, Nunc, Glostrup, Denmark) were incubated overnight at room temperature in a humid chamber. All subsequent incubations were for 1 h at room temperature on an orbital shaker, and all reagents were applied at a volume of 100 µl

per well. The washing buffer was 0.01 M PBS (pH 7.2) containing 0.5% (v/v) Tween 20 (PBST/0.5%). Each washing step consisted of three dispensing/aspirating cycles using an automated ELISA washer (Bio-Tek ELx405, Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichhall, Germany). After coating and incubating overnight, the plates were washed with PBS and then blocked for 2 h with PBS plus 0.1% Tween (PBST/0.1%) containing 2% (w/v) casein. The plates were then washed with PBST/0.5% and test and control sera, diluted 1:10 in PBST/0.1% plus 1% (w/v)

Fig. 2 Correlation of the indirect and competitive ELISA on a case to case comparison. The correlation ($r=0.556$) between both tests was statistically significant ($p<0.5 \times 10^{-19}$)



casein, applied to the wells in duplicate and two wells, which received only secondary antibody, and were used as conjugate control. Monoclonal antibody 1C7 was added to the wells at a dilution of 1:800 in PBST/0.1%/1% casein followed by a wash step and application of secondary antibody (HRPO-labelled goat anti mouse antibody, Dianova, Hamburg, Germany) diluted 1:4,000 in PBST/0.1%/1% casein. Next, the plates were washed three times with soaking cycles for 5 min in between, and 100 µl of

substrate chromogen solution (H₂O₂, TMB) was then pipetted into each well and the plates put into a humid chamber for colour development. The reaction was stopped after 10 min by adding 100 µl of 1 N H₂SO₄. Absorbance was measured at 450 nm using an ELISA reader (Expert 96, Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria). The optical density values obtained were expressed as percentage inhibition (PI) of the negative control and calculated as follows:

$$[1 - (\text{average of the OD of the test sample} - \text{OD of the buffer}) / (\text{average of the OD of the negative control} - \text{OD of the buffer})] \times 100$$

The cut-off value of 17.5% inhibition was set using 50 sera from uninfected cattle (Bad Bramstedt slaughterhouse, Germany) and was determined as the mean PI value obtained plus two standard deviations.

Statistical analysis

To accurately assess sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as the correlation between indirect and cELISA, Microsoft Excel (version

2002) and Statistica by StatSoft Europe (version 8.2) were used.

Results

The present study was carried out to examine the suitability of the cELISA in the field, and for this purpose, 230 randomly collected field sera from three different governorates (Erbil, Dohuk and Sulaimaniya) in Kurdistan Region, Iraq were

Table 1 Comparison of indirect TaSP ELISA and cELISA on 230 field samples

		Reference Test		Total
		Indirect ELISA		
		Positive	Negative	
Competitive ELISA	Positive	176 (76.5%)	10 (4.3%)	186 (80.9%)
	Negative	33 (14.3%)	11 (4.8%)	44 (19.1%)
	Total	209 (90.9%)	21 (9.1%)	230 (100%)

Table 2 Results obtained with the two tests in the three different governorates in Iraq

Governorate	Prevalence indirect ELISA	Prevalence competitive ELISA	Positive predictive value cELISA
Erbil (<i>n</i> =80)	92.5% (74/80)	85% (68/80)	95.60% (65/68)
Dohuk (<i>n</i> =80)	85% (68/80)	67.5% (54/80)	92.70% (51/55)
Sulaimaniya (<i>n</i> =70)	95.7% (67/70)	90% (63/70)	95.20% (60/63)
all three areas (<i>n</i> =230)	90.9% (209/230)	80.9% (186/230)	94.60% (176/186)

investigated for the presence of parasite-specific antibodies by indirect and cELISA. On a case to case comparison, the correlation ($r=0.556$) between both tests was statistically significant with $p<0.5\times 10^{-19}$ (Fig. 2).

Regarding the detection of samples positive for the presence of antibodies against TaSP protein of *T. annulata*, the cELISA determined 186 out of 230 samples to be positive (80.9%), whereas the indirect ELISA detected 209 positive samples out of 230 (90.9%). Accordingly, more sera were determined as being negative by the cELISA (44/230=19.1%) than by the indirect ELISA (21/230=9.1%; Table 1).

Using the indirect ELISA as the reference test, the calculated values for sensitivity and specificity of the cELISA were 84.2% (176/209) and 52.4% (11/21), respectively. Given a determined prevalence of 90.9% (209/230), the positive predictive value was 94.6% (176/186).

Of the 230 serum samples collected in total, 80 samples each were taken from cattle in Erbil and Dohuk governorates and 70 samples were collected from animals in Sulaimaniya governorate. Table 2 and Fig. 3 show the results obtained with the two tests in the different regions. Regarding the serum samples from Erbil, the prevalence using cELISA for this region was 92.5% (74/80), resulting in a positive predictive value of 95.6%. Performing the same calculations for Dohuk, the prevalence for *T. annulata* in this governorate

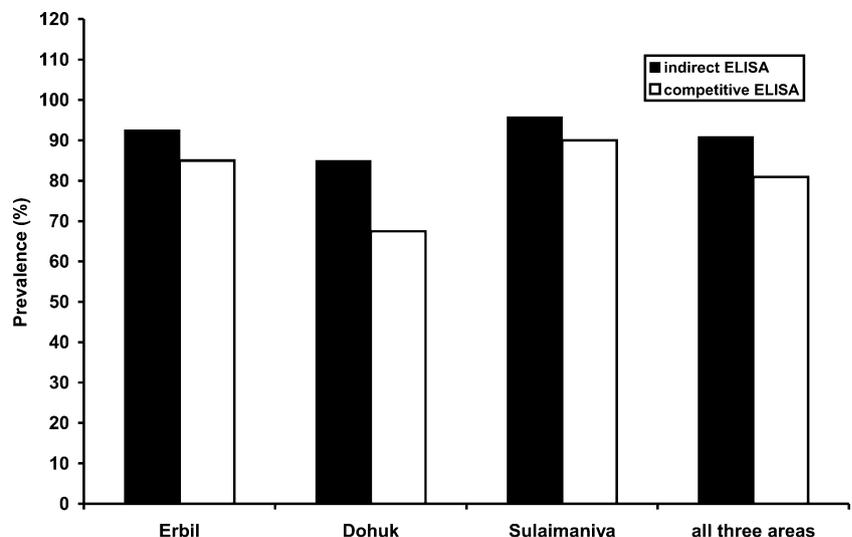
was 85% (68/80), while the positive predictive value was calculated to be 92.7%. Looking at the 70 samples taken from cattle near Sulaimaniya, the prevalence was 95.7% (67/70), and the positive predictive value was calculated to be 95.2%.

Discussion

Due to the economic importance of tropical theileriosis in the regions where the disease is endemic, a reliable and specific diagnostic assay for the detection of *T. annulata* infection is needed to screen subclinically infected and carrier animals for epidemiological surveys and the implementation of control programmes, including use of attenuated vaccines.

Different methods have been developed and utilised to date for the diagnosis of tropical theileriosis, including PCR (d’Oliveira et al. 1995), reverse line blot (RLB) (Gubbels et al. 1999), IFAT (Burrige et al. 1974) and indirect ELISA (Bakheit et al. 2004; Salih et al. 2005a,b, 2007a,b; Seitzer et al. 2007). All these assays allow the detection of *T. annulata*-infected cattle, whereby PCR and RLB have limitations to some extent in being expensive and requiring a good degree of expertise, whereas IFAT is knowingly restricted due to a subjective interpretation, low throughput and inherent cross-reactivity problems. Among these

Fig. 3 Prevalence of *T. annulata* infection as determined by indirect and competitive TaSP ELISA in the three governorates in Iraq



diagnostic approaches, the ELISA system is regarded as being most suitable for large-scale epidemiological and monitoring studies because it has been proven to be economical, reliable, easily standardised and a high-throughput method.

The indirect ELISA for the diagnosis of tropical theileriosis caused by *T. annulata* infection was developed on the basis of an immunogenic antigen (TaSP) and showed a high sensitivity (99.1%) and specificity compared to IFAT, making it a very promising assay for epidemiological surveys. Some cross-reactivity was observed with serum from animals experimentally infected with *T. parva* and *Trypanosoma*; thus, a cELISA was developed to overcome these specificity problems (Renneker et al. 2008).

In the present study, the cELISA was compared to the indirect ELISA using field samples collected from an endemic region in Iraq in order to analyse the suitability of the cELISA for use in epidemiological surveys.

In the comparison using the indirect ELISA as the reference, both the sensitivity and specificity of the cELISA were lower (52.4% and 84.2%, respectively). These differences can be plausibly explained by two properties inherent to the two tests. Firstly, because the prevalence for other hemo-parasites (*Babesia*, *Anaplasma*, and *Trypanosoma*) in cattle is high in Iraq (Leiper 1957), the indirect ELISA may have detected false positive samples due to cross-reactivity, as shown before for *T. parva* and *Trypanosoma* infection. In that case, the cELISA would be the test delivering more reliable results, as the negative samples would be representing true negative samples. Secondly, regarding the cELISA, only one epitope of the TaSP antigen is bound by the monoclonal antibody, but since the TaSP antigen is polymorphic, it may well be that infection by some strains is not detected by this system, resulting in false negative results. Further efforts are necessary to clarify this point, leading to the improvement of the cELISA.

The prevalence calculated from results of the indirect and the cELISA was 90.9% and 80.9%, respectively, having tested 230 sera altogether. Al-Barwary (2007) tested the same samples plus some additional ones from the three governorates by microscopic examination of Giemsa-stained blood smears and observed 56.9% positive cases among 299 cattle in the region. Al-Saeed (2009) also investigated the same 299 samples by PCR resulting in a prevalence of 68.6%. Regarding these differences, the prevalence of *T. annulata* infection was highest when examining the samples by ELISA, which is due to the detection of antibodies being independent of the presence of the parasite itself. Accordingly, the prevalence regarding microscopic examination (56.9%) and PCR technique (68.6%) is lower, as the direct detection of the parasite or parasite DNA may not be possible in asymptomatic carrier

animals. This comparison shows again the ELISA technique being most suitable for identification of long term-infected carrier animals.

Regarding the findings according to the three governorates, it could be shown that the prevalence for *T. annulata* infection is lowest (85%) in the north of the Kurdistan region (Dohuk), whereas it is increased in Erbil (92.5%), placed in the middle of the Kurdistan region and reaching the highest value (95.7%) in sera from the south of the Kurdistan region (Sulaimaniya). This distribution represents the migration activities of the past 20 years, as there were hardly any cases of tropical theileriosis in the north of Kurdistan prior to this time. Reasons for the migration of cattle are founded in trade. The animals are moved from south to north of Iraq, since the prices for cattle are considerably higher in the north.

Taken together, the cELISA is suitable for the detection of antibodies against TaSP in serum of cattle under field conditions. However, further validation experiments with interlaboratory comparison and extended serum numbers including a set of known positive and known negative sera should be taken into consideration for global use of the test.

Acknowledgements This study was supported in part by EU funded projects INCOME (515915), ICTTD-3 (510561). We would like to thank Andy Tait (Department of Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Glasgow) for kindly providing us with the 1C7 monoclonal antibody.

Ethical standards The experiments performed in this study comply with the current laws of the country in which they were performed.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ahmed JS, Rothert M, Steuber S, Schein E (1989) In vitro proliferative and cytotoxic responses of PBL from *Theileria annulata*-immune cattle. *J Vet Med B* 36:584–592
- Al-Barwary, LTO (2007) A study on Hematological parameter, vector taxonomy and serological diagnosis on bovine piroplasmiasis in Kurdistan. Dissertation, College of Vet. Med., University of Dohuk
- Al-Saeed A (2009) Application of Polymerase Chain Reaction (PCR) for Detection of *Theileria annulata* among cattle in Kurdistan region/Iraq. Dissertation, College of Vet. Med., University of Dohuk
- Bakheit MA, Schnittger L, Salih DA, Boguslawski K, Beyer D, Fadl M, Ahmed JS (2004) Application of the recombinant *Theileria annulata* surface protein in an indirect ELISA for the diagnosis of tropical theileriosis. *Parasitol Res* 92:299–302
- Burridge MJ, Brown CGD, Kimber CD (1974) *Theileria annulata*: cross-reaction between a cell culture schizont antigen and antigen of East-Africa species in the indirect fluorescent antibody test. *Exp Parasitol* 35:374–380
- Dolan TT (1989) Theileriosis: a comprehensive review. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 8:11–36

- Gubbels JM, de Vos AP, van der Weide M, Viseras J, Schouls LM, de Vries E, Jongejan F (1999) Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 37:1782–1789
- d'Oliveira C, van der Weide M, Habela MA, Jacquet P, Jongejan F (1995) Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J Clin Microbiol* 13:2665–2669
- Leiper JWG (1957) Report to Government of Iraq, on animal parasites and their control. FAO EPTA report no. 610-30
- Omer LT, Kadir MA, Seitzer U, Ahmed JS (2007) A survey of ticks (Acari: Ixodidae) on cattle, sheep and goats in the Dohuk Governorate. *Iraq Parasitol Res* 101(Suppl 2):S179–S181
- Renneker S, Kullmann B, Gerber S, Dobschanski J, Bakheit MA, Geysen D, Shiels B, Tait A, Ahmed JS, Seitzer U (2008) Development of a competitive ELISA for detection of *Theileria annulata* infection. *Transbound Emerg Dis* 55(5–6):249–256
- Salih DA, Ahmed JS, Bakheit MA, Ali EB, El Hussein AM, Hassan SM, Shariff OE, Fadl M, Jongejan F (2005a) Validation of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Parasitol Res* 97:302–308
- Salih D, Hassan S, Bakheit MA, El Hussein AM, Jongejan F, Ahmed JS (2005b) Application of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. In: *Proceedings 5th International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens*. Neuchâtel, Switzerland, pp. 163–166
- Salih DA, El Hussein AM, Kyule MN, Zessin KH, Ahmed JS, Seitzer U (2007a) Determination of potential risk factors associated with *Theileria annulata* and *Theileria parva* infections of cattle in the Sudan. *Parasitol Res* 101:1285–1288
- Salih DA, Hassan SM, El Hussein AM (2007b) Comparisons among two serological tests and microscopic examination for the detection of *Theileria annulata* in cattle in northern Sudan. *Prev Vet Med* 81:323–326
- Schnittger L, Katzer F, Biermann R, Shayan P, Boguslawski K, McKellar S, Beyer D, Shiels BR, Ahmed JS (2002) Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. *Mol Biochem Parasitol* 120:247–256
- Seitzer U, Bakheit MA, Salih DE, Ali A, Haller D, Yin H, Schnittger L, Ahmed JS (2007) From molecule to diagnostic tool: *Theileria annulata* surface protein TaSP. *Parasitol Res* 101:S217–S223
- Shiels BR, McDougall C, Tait A, Brown CGD (1986) Identification of infection-associated antigens in *Theileria annulata* infected cells. *Parasite Immunol* 8:69–77

5 DISKUSSION

Das Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war es, einen kompetitiven ELISA auf der Basis des rekombinanten Oberflächenproteins TaSP (Schnittger *et al.*, 2002) und des monoklonalen Antikörpers 1C7 (Shiels *et al.*, 1986a) zu entwickeln, um zirkulierende Antikörper im Serum von *T. annulata*-infizierten Rindern nachzuweisen. Der Test sollte zuverlässig und spezifisch sein und sich insbesondere dafür eignen, persistent infizierte, klinisch inapparente Tiere zu identifizieren. Anhand der Ergebnisse des cELISA sollte es möglich sein, die epidemiologische Situation in bestimmten geographischen Gebieten einzuschätzen, um anschließend Kontrollmaßnahmen einschließlich der Anwendung attenuierter Vakzinen durchführen zu können.

Verschiedene Methoden wie PCR (d'Oliveira *et al.*, 1995), RLB (Gubbels *et al.*, 1999), IFAT (BurrIDGE *et al.*, 1974) und indirekter ELISA (Bakheit *et al.*, 2004; Salih *et al.*, 2005a, b, 2007a,b; Seitzer *et al.*, 2007) sind für die Diagnostik von Tropischer Theileriose entwickelt und verwendet worden. Alle genannten Tests erlauben den Nachweis einer Infektion mit *T. annulata*, haben jedoch unterschiedliche Nachteile hinsichtlich Kosten, Durchführbarkeit, subjektiver Interpretation, geringem Durchlauf oder Kreuzreaktivitäten. Für groß angelegte epidemiologische Untersuchungen hat sich das System des ELISA als am besten geeignet erwiesen, denn es ist ökonomisch, verlässlich, einfach durchzuführen und zu standardisieren und erlaubt einen hohen Durchsatz in kurzer Zeit.

Ein indirekter ELISA für die Diagnose der Tropischen Theileriose ist von Bakheit *et al.* (2004) auf der Basis des immunreaktiven Proteins TaSP entwickelt worden, das auf der Membran des Makroschizonten von *T. annulata*-infizierten Zellen exprimiert wird (Schnittger *et al.*, 2002). Der Test wurde mit einer großen Anzahl von Feld-Seren validiert (Salih *et al.*, 2005a, b, 2007a, b; Seitzer *et al.*, 2007) und wies, bezogen auf Ergebnisse im Vergleich mit IFAT, eine Sensitivität von 99,1% und eine Spezifität von 90,47% auf, womit er vielversprechend hinsichtlich der Durchführung epidemiologischer Studien erschien. Der indirekte ELISA zeigte jedoch Kreuzreaktivitäten mit *Trypanosoma brucei* (8/12 = 66,6%) und vor allem mit *T. parva* (19/20 = 95%), weshalb ein kompetitiver ELISA entwickelt werden sollte. Dieser Test kann die Spezifität des Nachweises von Antikörpern erhöhen, indem ein monoklonaler Antikörper kompetitiv zur Bindung eines Epitops am Antigen eingesetzt

wird (Knowles *et al.*, 1993). Der für die Etablierung des cELISA verwendete monoklonale Antikörper 1C7 wurde von Shiels *et al.* (1986a) generiert und von Schneider *et al.* (2004 und 2007) verwendet, um die Membran von Schizonten in *T. annulata*-infizierten Zellen zu markieren.

Um nun 1C7 für den cELISA verwenden zu können, musste im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob er selektiv an rekombinantes und natives TaSP bindet, was in verschiedenen Experimenten verifiziert werden konnte. So wurde gezeigt, dass anti-TaSP Antiserum aus dem Kaninchen mit dem 1C7 Antikörper um die Bindung an TaSP konkurriert (Zytozentrifugenpräparate und Blockierungs-ELISA) und dass ein Protein, welches mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 1C7 immunpräzipitiert wurde, durch die Detektion mit anti-TaSP Antiserum im Western Blot als TaSP identifiziert wurde. Ein GFP-Konstrukt, das die polymorphe Region des TaSP enthält, wurde in COS-7 Zellen transfiziert und TaSP konnte in den transfizierten Zellen mit Hilfe des 1C7 nachgewiesen werden. All diese Ergebnisse wiesen auf eine selektive Bindung des 1C7 Antikörpers an TaSP hin.

Ein weiteres Kriterium für den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers in der Entwicklung eines cELISA ist die Erkennung eines Epitops, welches in möglichst vielen Erregerisolaten konserviert ist. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit dem 1C7 Antikörper an *T. annulata*-infizierten Zelllinien durchgeführt, die aus unterschiedlichen geographischen Regionen stammten. Obwohl in der Mehrheit der infizierten Zelllinien (*T.a.* Ankara 288, *T.a.* Ankara 2006, *T.a.* Ankara 1272, *T.a.* Ankara 285, *T.a.* Hissar/Indien 2006 und *T.a.* Marokko 2006) durch Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen Antikörper 1C7 ein positives Signal erzeugt wurde, gab es dennoch zwei Isolate, die nicht mit dem 1C7 reagierten (*T.a.* Tunis 429 und *T.a.* Jordanien), was durch den Polymorphismus des TaSP zu erklären ist. Somit erkennt der mAk 1C7 ein Epitop auf dem TaSP-Antigen, welches nicht zu 100% konserviert ist, aber in der überwiegenden Anzahl der untersuchten Isolate vorhanden war.

Nachdem nun der 1C7 in Bezug auf die Entwicklung eines cELISA für geeignet befunden wurde, sind die optimalen Bedingungen für die einzelnen Reaktionspartner ermittelt worden. Die Grenze („cut-off“) zwischen positiven und negativen Seren wurde dann mittels 50 negativer Seren aus Deutschland errechnet und lag bei 17,5%. Es sind 33 Seren von experimentell mit *T. annulata* infizierten Rindern mit dem cELISA getestet worden, von denen lediglich zwei als negativ eingestuft

wurden. Diese beiden Seren wurden eine bzw. zwei Wochen *p.i.* entnommen, was hinsichtlich der Bildung von Antikörpern und damit für deren Nachweis bei diesen Tieren wahrscheinlich zu früh war. Andererseits gab es drei Tiere, deren Seren bereits eine Woche *p.i.* eine positive Reaktion im cELISA zeigten. Wenn in Einzelfällen, wie z.B. in Randgebieten endemischer Regionen, das Testergebnis von essentieller Bedeutung ist (Tötung von infizierten Tieren in einem sehr kleinen Bestand / Entscheidung für eine Impfung des kompletten Bestandes), sollte zur Bestätigung entweder ein anderer Test (z.B. PCR) durchgeführt werden oder eine zweite Serumprobe zwei bis vier Wochen nach der ersten entnommen und im cELISA untersucht werden („gepaarte Serumprobe“), um mit Sicherheit sagen zu können, dass es sich um ein (nicht)-infiziertes Tier handelt. Neben der Überprüfung, ab wann anti-TaSP Antikörper in experimentell infizierten Tieren auftreten, sollten außerdem Experimente durchgeführt werden, die zeigen, wie lange Antikörper gegen TaSP im Serum von Rindern nachweisbar sind. Diese Ermittlungen können für eine bessere Einschätzung einer epidemiologischen Situation nach Testung der Tiere mit dem cELISA relevant sein.

Falsch positive Ergebnisse sind im cELISA bei Seren von experimentell infizierten Tieren nicht beobachtet worden. So haben Seren von Tieren, die mit *T. parva* (3), *T. mutans* (1), *Babesia bovis* (1), *Babesia bigemina* (1), *Anaplasma marginale* (1) und *Trypanosoma brucei* (1) infiziert wurden, keine Reaktion im cELISA gezeigt. Damit war das Problem der unerwünschten Kreuzreaktivitäten, die im indirekten ELISA beobachtet worden sind, zumindest bezüglich der untersuchten Erreger beseitigt. Somit würde der cELISA in Gebieten, in denen eine Infektion mit anderen Pathogenen wahrscheinlich ist, hochspezifische Ergebnisse liefern. Allerdings führt eine Erhöhung der Spezifität eines Tests auch immer zu einer Erniedrigung der Sensitivität (und umgekehrt), was bei einem Vergleich von 133 Feldseren aus dem Sudan zu beobachten war. So konnten eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 77,4% im Vergleich zum indirekten ELISA ermittelt werden, der seinerseits mit Ergebnissen des IFAT verglichen wurde und eine Spezifität von 90,47% bei einer Sensitivität von 99,1% aufwies. Zahlreiche Seren (27/133), die sowohl im indirekten ELISA als auch im IFAT positiv waren, reagierten negativ im cELISA, was wieder mit der genetischen Variabilität des TaSP zusammenhängen könnte.

Bei der Validierung des cELISA mit 230 Seren aus Kurdistan, Irak mit dem indirekten ELISA als Referenz-Test konnte eine Sensitivität von 82,4% und eine Spezifität von 52,4% ermittelt werden. Diese für einen Test relativ geringen Werte hinsichtlich Sensitivität und Spezifität lassen sich aber durch unterschiedliche Eigenschaften der beiden Tests plausibel erklären: Zum einen ist die Prävalenz für andere Hämoparasiten wie z.B. *Babesia bigemina* und *Anaplasma marginale* bei Rindern im Irak sehr hoch (Leiper, 1957), womit möglich ist, dass der indirekte ELISA einige Seren als falsch positiv klassifiziert hat, wie schon in vorangegangenen Studien für *T. parva* und *Trypanosoma brucei* gezeigt wurde. In diesen Fällen entsprächen die Ergebnisse des cELISA eher der tatsächlichen Situation, so dass die in Bezug auf den indirekten ELISA als falsch negativ eingestuften Seren in der Realität richtig negativ waren. Zum anderen wird im kompetitiven System lediglich ein Epitop des TaSP von 1C7 erkannt. Da die Möglichkeit besteht, dass eine *T. annulata*-Infektion mit einem Isolat erfolgte, das dieses Epitop nicht exprimiert, konnten dagegen auch keine Antikörper im infizierten Tier gebildet werden. Demzufolge kann auch keine Inhibierung der Bindung von 1C7 erfolgen, was sich dann in einem falsch negativen Ergebnis niederschlägt. Dass 1C7 ein Epitop erkennt, welches nicht von allen *T. annulata* Isolaten exprimiert wird, wurde auch von Shiels *et al.* (1986b) in früheren Studien festgestellt, in denen der mAk 1C7 mit *T. annulata*-infizierten Zelllinien aus dem Sudan und dem Iran unterschiedlich reagierte.

Weitere Untersuchungen in Bezug auf das von 1C7 detektierte Epitop sowie die Charakterisierung der unterschiedlichen genetischen Varianten des TaSP sollten durchgeführt werden, um einerseits genaue Informationen über die Bindungsstelle des 1C7 innerhalb des TaSP zu erlangen und andererseits auf der Basis der vom 1C7 nicht erkannten Varianten des TaSP gezielt weitere mAk zu generieren, mit Hilfe derer dann ein optimierter cELISA entwickelt werden könnte.

Bezüglich der Prävalenz, welche für die 230 Seren aus dem Irak sowohl aufgrund der Testergebnisse des indirekten als auch des kompetitiven ELISA errechnet wurde, hat sich ein Wert von 90,9% respektive 80,9% ergeben. Al-Barwary (2007) hat dieselben Seren und einige zusätzliche (insgesamt 299) mittels Giemsa-Färbung untersucht und eine Prävalenz von 56,9% ermittelt. Al-Saeed (2009) hat diese 299 Seren ebenfalls getestet und mit Hilfe der PCR eine Prävalenz von 68,6% bestimmt. Bei Betrachtung dieser Ergebnisse kann festgestellt werden, dass der ELISA die höchsten Werte für die Prävalenz einer Infektion mit *T. annulata* ergab, was in der

Tatsache begründet ist, dass dieses Testsystem Antikörper detektiert, die ihrerseits nicht an das Vorhandensein des Parasiten gebunden sind. Dementsprechend fiel das Ergebnis für die Prävalenz ermittelt durch Mikroskopie (56,9%) und PCR (68,6%) geringer aus, da diese Methoden den Parasiten selbst bzw. dessen DNA detektieren, was in persistent infizierten oder subklinisch erkrankten Tieren häufig nicht möglich ist und erneut bestätigt, dass die Diagnostik mittels ELISA für die Untersuchung solcher Tiere und damit für die Durchführung epidemiologischer Studien am Besten geeignet ist.

6 AUSBLICK

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der neuetablierte cELISA geeignet ist, Antikörper gegen das immunreaktive Oberflächenprotein TaSP (Schnittger *et al.*, 2002) von *T. annulata* im Serum von Rindern unter Feldbedingungen nachzuweisen. Dennoch sollte in Erwägung gezogen werden, weitere Studien zur Validierung durchzuführen, um den Test für epidemiologische Erhebungen einsetzen zu können. Dazu zählt in erster Linie die Untersuchung einer größeren Anzahl von Feldseren inklusive einer Reihe von sicher positiven und sicher negativen Seren, welche in verschiedenen Laboratorien durchgeführt werden sollte (,interlaboratory comparison'). Weiterhin sollte überprüft werden, ab wann und wie lange Antikörper gegen TaSP im Serum von Rindern nachweisbar sind, um die epidemiologische Situation nach Testung der Seren mit dem cELISA besser einschätzen zu können.

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchungen verschiedener Isolate von *T. annulata* in infizierten Zelllinien durch Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen Antikörper 1C7 und die relativ geringe Sensitivität des cELISA im Vergleich zum indirekten ELISA, so kann geschlussfolgert werden, dass die Bindung eines monoklonalen Antikörpers durch spezifische Serum-Antikörper gegen andere Genotypen des TaSP nicht inhibiert werden kann. Um *T. annulata*-infizierte Tiere mit einer hohen Sensitivität bei ebenfalls hoher Spezifität diagnostizieren zu können, sollten Untersuchungen in Bezug auf das von 1C7 detektierte Epitop sowie die Charakterisierung der unterschiedlichen genetischen Varianten des TaSP vorgenommen werden. Einerseits könnten dadurch genauere Informationen über die Bindungsstelle des 1C7 innerhalb des TaSP Proteins erlangt werden, andererseits wäre es möglich, auf der Basis der von 1C7 nicht erkannten Formen des TaSP weitere monoklonale Antikörper zu generieren, welche andere genetische Varianten des TaSP detektieren. Somit könnte die Bindung der monoklonalen Antikörper durch Antikörper aus dem Serum infizierter Tiere vollständig inhibiert werden, so dass das Auftreten falsch negativer Ergebnisse minimiert würde.

Mit zusätzlichen mAKs und dem 1C7 könnte in der Zukunft ein ,Catchall Diagnostic Assay' im Format eines hochspezifischen und -sensitiven cELISA entwickelt werden, der für epidemiologische Studien und Kontrollprogramme in Regionen einsetzbar wäre, wo Tropische Theileriose endemisch ist.

In Gebieten, in denen das Vorkommen der Theileriose in naher Zukunft in Form einer neuauftretenden Erkrankung („emerging disease“) möglich wäre sowie in *T. annulata*-freien Gebieten könnte der Test als Diagnostikum zur Überwachung dieses Status dienlich sein.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Tropische Theileriose ist eine durch das Protozoon *Theileria annulata* verursachte, mitunter tödlich verlaufende Erkrankung bei Rindern in den Tropen und Subtropen, die für massive wirtschaftliche Schäden verantwortlich ist. Für den Nachweis von Infektionen im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen hat sich generell der Einsatz eines ELISA besonders bewährt, da er einfach durchzuführen, automatisierbar, kostengünstig und für Massenuntersuchungen geeignet ist.

Der von Bakheit *et al.* (2004) entwickelte indirekte ELISA für den Nachweis einer Infektion mit *T. annulata* operiert bei guter Sensitivität und Spezifität im Vergleich mit dem IFAT. Da dieser Test jedoch Kreuzreaktivitäten mit *Trypanosoma* und *T. parva* aufwies, ist im Rahmen dieser Arbeit ein cELISA entwickelt worden, um die Spezifität zu erhöhen. Dazu wurde der mAk 1C7 verwendet, der selektiv an das immunreaktive Protein TaSP bindet, was in verschiedenen Zellkultur- und proteinbiochemischen Experimenten verifiziert werden konnte. Untersuchungen mit Seren experimentell infizierter Tiere haben ergeben, dass der cELISA in der Lage ist, Antikörper im Serum von *T. annulata*-infizierten Rindern spezifisch zu detektieren. Kreuzreaktivitäten mit Antikörpern in Seren von Tieren, die mit anderen, z.T. eng mit *T. annulata* verwandten Erregern experimentell infiziert waren, wurden nicht beobachtet. In Studien mit Feldseren lieferte der cELISA unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Sensitivität (Sudan: 77,4%; Irak: 84,2%) und die Spezifität (Sudan: 100%; Irak: 52,4%) im Vergleich mit dem indirekten ELISA. Einerseits beruhen die Unterschiede der Testergebnisse auf der Tatsache, dass der monoklonale Antikörper 1C7 lediglich ein Epitop des polymorphen TaSP detektiert. Da die Möglichkeit besteht, dass eine *T. annulata*-Infektion mit einem Isolat erfolgte, das dieses Epitop nicht besitzt, können dagegen auch keine Antikörper im infizierten Tier gebildet werden. Demzufolge ist auch keine Inhibierung der Bindung von 1C7 möglich. Somit sind mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit falsch negative Ergebnisse mit dem cELISA produziert worden, woraus eine im Vergleich zum indirekten ELISA geringere Sensitivität resultieren kann. Andererseits, wie auch in vorangegangenen Studien gezeigt, lieferte der indirekte ELISA eventuell falsch positive Resultate mit Seren, die Antikörper gegen Proteine anderer Hämoparasiten enthielten. Durch das mögliche Auftreten solcher Kreuzreaktionen wäre ebenfalls die geringere Sensitivität des cELISA im Vergleich zum indirekten ELISA zu erklären.

Insgesamt ist der cELISA gut geeignet, um Antikörper im Serum von *T. annulata*-infizierten Rindern zu detektieren, sollte aber durch weitere Untersuchungen eingehender validiert werden, um den Test in Zukunft für epidemiologische Zwecke nutzen zu können.

Eine Weiterentwicklung des cELISA zur Erhöhung der Sensitivität bei ebenfalls hoher Spezifität könnte in zukünftigen Studien durch die Entwicklung und den Einsatz weiterer monoklonaler Antikörper, welche andere genetische Varianten des TaSP als der 1C7 erkennen, realisiert werden.

8 SUMMARY

Tropical Theileriosis is caused by the protozoan parasite *Theileria annulata* which can lead to fatal disease in cattle in tropical and subtropical regions of the world and is responsible for massive economical losses. For detection of the infection in the framework of epidemiological studies an ELISA is regarded to be most suitable being easy to perform, automated, economic and appropriate for large scale sampling. Previously, an indirect ELISA for detection of *T. annulata* infection had been developed, which gave satisfactory sensitivity and specificity compared to IFAT (Bakheit *et al.*, 2004) but showed cross-reactivity with *Trypanosoma* and *T. parva*. Thus, in this work, a cELISA based on this indirect ELISA has been developed to increase specificity using the monoclonal antibody (mAb) 1C7. This antibody was shown to selectively bind the immunoreactive protein TaSP, as confirmed in various experimental approaches. Experiments with sera from experimentally infected animals showed that the cELISA is able to reliably detect only *T. annulata* infection as shown by the examination of sera from animals experimentally infected with the different parasite species and genera included in the study, thus eliminating the problem of cross-reactivity.

In investigations of field sera the cELISA provided different results regarding sensitivity (Sudan: 77.4%; Iraq: 84.2%) and specificity (Sudan: 100%; Iraq: 52.4%) compared to indirect ELISA. These different results could be explained by the fact that the monoclonal antibody recognizes only one epitope of the polymorphic TaSP. Since it is possible that a *T. annulata* isolate which does not express this epitope in TaSP has infected an animal, antibodies against this epitope are not generated and thus inhibition of 1C7-binding does not occur. Therefore false negative results might have been produced at a certain probability in comparison to the indirect ELISA, leading to a lower sensitivity. On the other hand, as it was shown in previous studies, the indirect ELISA might have produced false positive results due to cross-reactivity of antibodies against other parasites, also leading to a lower sensitivity in comparing the two tests.

Taken together, the cELISA is suitable for detection of specific antibodies in sera of *T. annulata*-infected cattle but the test should be further validated for possible usage in epidemiological investigations in the future.

An advancement of the cELISA to increase sensitivity at a stable specificity might be realized in future experiments through development and application of other monoclonal antibodies recognizing different genetic variants of TaSP than 1C7 does.

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlendioxid
COS	Cercopithecus aethiops
d	Durchmesser
DABCO	1,4-Diazabicyclo [2,2,2] octan
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid = Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay = Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
FZB	Forschungszentrum Borstel
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GαM-HRP	Meerrettich-Peroxidase markierter Ziege anti-Maus Antikörper
GαRb-HRP	Meerrettich-Peroxidase markierter Ziege anti-Kaninchen Antikörper
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H.	Hyalomma
HAHT	Hämagglutinations-Hemmungs-Test
HCl	Chlorwasserstoff
H ₂ O	Wasser
HRP	Horseradish Peroxidase = Meerrettichperoxidase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
I	Stromstärke
ICTTD	International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases
IFAT	Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
KCl	Kaliumchlorid
KBR	Komplement-Bindungs-Reaktion
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

l	Liter
LF	Luftfeuchte
LG Vet. Inf. Imm.	Laborgruppe Veterinär-Infektiologie und -Immunologie, FZB
mA	Milliampere
mAb	monoclonal Antibody
mAk	monoklonaler Antikörper
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex = Haupthistokompatibilitäts-Komplex
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar (Stoffmengenkonzentration)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
N	Normalität (neue Bezeichnung: c _{eq} = Äquivalentkonzentration)
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NC-Membran	Nitrocellulose-Membran
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannte/r/s
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PA-Gel	Polyacrylamid-Gel
Parasitol Res	Parasitology Research (Wissenschaftliche Fachzeitschrift)
PBS	Phosphate Buffered Saline = Phosphat gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit Tween20
PBS-Z	PBS für die Zellkultur
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>p.i.</i>	post infectionem
PI	Prozent Inhibition
PP	Prozent Positivität
R.	Rhipicephalus

Rb α Bov-HRP	Meerrettich-Peroxidase markierter Kaninchen anti-Rind Antikörper
RLB	Reverse-Line Blot
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rTaSP	rekombinantes <i>Theileria annulata</i> Surface Protein
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
SPAG-1	Sporozoit Antigen-1
Strep	Streptomycin
t	Zeit
<i>T.</i>	<i>Theileria</i>
<i>T.a.</i>	<i>Theileria annulata</i>
Tab.	Tabelle
Tams-1	<i>Theileria annulata</i> merozoite surface protein-1 = Oberflächen Protein des Merozoiten von <i>Theileria annulata</i>
TaSP	<i>Theileria annulata</i> Surface Protein = Oberflächen Protein von <i>Theileria annulata</i>
TBED	Transboundary and Emerging Diseases (Wissenschaftliche Fachzeitschrift)
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit = atomare Masseneinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
u.U.	unter Umständen
V	Volt
v.a.	vor allem
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Massenvolumenprozent
% w/w	Massenprozent
Σ	Summe

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Verbreitung von *T. annulata*, *T. parva* und *T. sergenti* weltweit 12

Abb. 2 Lebenszyklus von *Theileria annulata* 15

Abb. 3 Zusammenfassendes Schema zur Erläuterung der Fragestellung..... 24

Abb. 4 Schematische Darstellung eines indirekten ELISA..... 42

Abb. 5 Schematische Darstellung der Reaktion eines negativen Serums
im cELISA 43

Abb. 6 Schematische Darstellung der Reaktion eines positiven Serums
im cELISA 44

Abb. 7 Entwickelter cELISA 45

Abb. 8 Immunfluoreszenzfärbung *Theileria*-infizierter Zellen (*TaA2006*) mit 1C7. 59

Abb. 9 Reaktivität von 1C7 mit verschiedenen *Theileria*-infizierten Zelllinien..... 60

Abb. 10 Immunfluoreszenzfärbung von TaSP- transfizierten COS-7 Zellen
mit 1C7..... 61

Abb. 11 cELISA von zwei Seren von *T. annulata*-infizierten Rindern 62

Abb. 12 Schachbrett-Titration von rTaSP und 1C7..... 63

Abb. 13 Verdünnungsreihe des Sekundärantikörpers (GαM-HRP) 63

Abb. 14 cELISA von Seren experimentell infizierter Rinder..... 64

11 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Primärantikörper	26
Tab. 2	Sekundärantikörper	27
Tab. 3	Bovine und ovine Zelllinien	27
Tab. 4	Säugetierzelllinie für die Transfektion	28
Tab. 5	Kulturmedien für verwendete Zelllinien	28
Tab. 6	Pipettierschema für die Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000	32
Tab. 7	Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung	34
Tab. 8	Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung	34
Tab. 9	SDS-PA-Gel-Zusammensetzung	35
Tab. 10	Bedingungen für Western Blot	37
Tab. 11	Verwendete Primärantikörper für Western Blot	39
Tab. 12	Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot	39
Tab. 13	Für die Immunpräzipitation verwendeter Antikörper	41

12 LITERATURVERZEICHNIS

Ahmed J. S., L. Diesing , H. Oechtering , H. Ouhelli and E. Schein (1988). "The role of antibodies in immunity against *Theileria annulata* infection in cattle." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A. **267**(3):425-31.

Ahmed, J. S., M. Rothert, S. Steuber and E. Schein (1989). "In vitro proliferative and cytotoxic responses of PBL from *Theileria annulata*-immune cattle." Zentralbl Veterinarmed B **36**(8): 584-92.

Ahmed, J. S. and H. Mehlhorn (1999). "Review: the cellular basis of the immunity to and immunopathogenesis of tropical theileriosis." Parasitol Res **85**: 539-49.

Ahmed, J. S., J. Luo, L. Schnittger, U. Seitzer, F. Jongejan and H. Yin (2006). "Phylogenetic Position of Small-Ruminant infecting Piroplasms." Ann. N.Y. Acad. Sci. **1081**: 498-504.

Ahmed, J. S., E. J. Glass, D. A. Salih and U. Seitzer (2007). "Innate Immunity to tropical theileriosis." Innate Immunity **14**(1): 5-12.

Alani, A. J. and I. V. Herbert (1988). "Morphology and transmission of *Theileria recondita* (Theileriidae: Sporozoa) isolated from *Haemaphysalis punctata* from north Wales." Vet Parasitol. **28**(4): 283-91.

Al-Barwary, L. T. O. (2007). "A study on Hematological parameter, vector taxonomy and serological diagnosis on bovine piroplasmosis in Kurdistan." Dissertation, College of Vet. Med. University of Dohuk.

Ali, A. M., M. A. Bakheit, M. M. Mukhtar, S. M. Hassan, J. S. Ahmed and U. Seitzer (2006). "Epidemiology of *Theileria annulata* infection of dairy cattle in the Sudan using molecular techniques." Ann N Y Acad Sci **1081**: 471-2.

Al-Saeed, A. (2009). "Application of Polymerase Chain Reaction (PCR) for Detection of *Theileria annulata* among cattle in Kurdistan region / Iraq." Dissertation, College of Vet. Med. University of Dohuk.

Altay, K., M. Aktas and N. Dumanli (2007). "PCR-RFLP analysis of the Tams1 gene of *Theileria annulata*." Turkiye Parazitol Derg **31**(3): 173-5.

Avrameas, S. and B. Guilbert (1971). "A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labelled antibodies." Eur J Immunol **1**(5): 394-6.

Bakheit, M. A., L. Schnittger, D. A. Salih, K. Boguslawski, D. Beyer, M. Fadl, and J. S. Ahmed (2004). "Application of the recombinant *Theileria annulata* surface protein in an indirect ELISA for the diagnosis of tropical theileriosis." Parasitol Res **92**(4): 299-302.

Bakheit M.A., E. Endl, J. S. Ahmed and U. Seitzer (2006). „Purification of macroschizonts of a Sudanese isolate of *Theileria lestoquardi* (*T. lestoquardi* [Atbara])." Ann N Y Acad Sci. **1081**:453-62.

Ben-Miled, L. (1993). "Population diversity in *Theileria annulata* in Tunisia." PhD Thesis, Edinburgh: University of Edinburgh.

Boulter, N. and R. Hall (1999). "Immunity and vaccine development in the bovine theilerioses." Adv Parasitol **44**: 41-97.

Brigido, C., I. P. da Fonseca, R. Parreira, I. Fazendeiro, V. E. do Rosário and S. Centeno-Lima (2004). "Molecular and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. parasites in autochthonous bovines (Mirandesa breed) in Portugal." Vet Parasitol **123**(1-2): 17-23.

Brown, C. D., D. A. Stagg, R. E. Purnell, G. K. Kanhai and R. C. Payne (1973). "Infection and transformation of bovine lymphoid cells in vitro by infective particles of *Theileria parva*." Nature **245**(5420): 101-103.

Brown, C. G. (1990). "Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle." Parassitologia **32**(1): 23-31.

Burridge, M. G. and C. D. Kimber (1972). "The indirect fluorescent antibody test for experimental East Coast Fever (*Theileria parva* infection of the cattle). Evaluation of a cell culture antigen." Res Vet Sci **13**:451-455.

Burridge, M. J., C. G. Brown and C. D. Kimber (1974). "*Theileria annulata*: cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test." Exp Parasitol **35**(3): 374-80.

Chizyuka, H. G. B. and J. B. Mulilo (1990). "Methods currently used for the control of multi-host ticks: their validity and proposals for future control strategies." Parassitologia **32**: 127-132.

CFSPH (2003). The center for Food Security and Public Health in Zusammenarbeit mit der OIE [online, Stand: 25.08.2009] URL:

http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/Theileriosis_theileria_parva_and_theileria_annulata.pdf

- Darghouth, M. A., N. R. Boulter, M. Gharbi, L. Sassi, A. Tait and R. Hall (2006).** "Vaccination of calves with an attenuated cell line of *Theileria annulata* and the sporozoite antigen SPAG-1 produces a synergistic effect." Vet Parasitol **142**(1-2): 54-62.
- de Castro, J. J. and R. M. Newson (1993).** "Host resistance in cattle tick control." Parasitol Today **9**: 13-17.
- de Castro, J. J. (1997).** "Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries." Vet Parasitol **71**: 77-97.
- Deem, S. L., B. D. Perry, J. M. Katende, J. J. McDermott, S. M. Mahan, S. H. Maloo, S. P. Morzaria, A. J. Musoke and G. J. Rowlands (1993).** "Variations in prevalence of tick-borne diseases in Zebu cattle by agroecological zone: implications for East Coast fever immunisation." Prev. Vet. Med. **16**: 171-187.
- de la Fuente J and K. M. Kocan (2003).** "Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations." Exp Rev Vaccines **2**: 583-593.
- de la Fuente, J. and K. M. Kocan (2006).** "Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species." Parasite Immunol **28**: 275-283
- de la Fuente, J., A. Estrada-Pena, J. M. Venzal, K. M. Kocan, D. E. Sonenshine. (2008).** "Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals." Front Biosci **13**: 6938-46.
- Dhar, S. and O. P. Gautam (1977).** "Theileria annulata infection of cattle. 1. Complement fixation and conglutinating complement absorption tests for serodiagnosis." Indian J. Anita. Sci. **47** : 389-394.
- Dickson, J. and B. R. Shiels, (1993).** "Antigenic diversity of a major merozoite surface molecule in *Theileria annulata*." Mol. Biochem. Parasitol. **57**: 55-64.
- Dolan, T. T. (1989).** "Theileriosis: a comprehensive review." Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. **8**: 11-36.
- d'Oliveira, C., M. van der Weide, M. A. Habela, P. Jacquiet, and F. Jongejan, (1995).** "Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR." J Clin Microbiol **33**(10): 2665-9.
- Dschunkowski, E. and J. Luhs (1904).** „Die Piroplasmen der Rinder.“ Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene **35**(4): 486-492.
- Eckert, J., K. T. Friedhoff, H. Zahner and P. Deplazes (2008).** „Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin“ 2. Auflage, Enke.

Engvall, E. and P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871-4.

FAO (1983). Food Aid in Figures, Rom, 1983.

Fawcett, D. W., S. Doxsey, D. A. Stagg and A. S. Young (1982). "The entry of sporozoites of *Theileria parva* into bovine lymphocytes in vitro. Electron microscopic observations." Eur J Cell Biol **27**(1): 10-21.

Fischer, M., P. von den Benken, T. Turyatunga, H. J. Kurikayo, G. Hartmann, M. P. O. Baumann (1997). "First results from a baseline survey on dairy production in Rukungiri district, Uganda." Proceedings of the 4th Joint Workshop on Veterinary Epidemiology: Test Methods and Test Evaluation. Fachrichtung Tropenveterinärmedizin und -epidemiologie, Freie Universität Berlin.

Forsyth, L. M., L. A. Jackson, G. Wilkie, A. Sanderson, C.G.D. Brown and P.M. Preston (1997). "Bovine cells infected in vivo with *Theileria annulata* express CD11b, the C3bi complement receptor." Vet Res Commun **21**(4): 249-63.

Forsyth, L. M. G., F. C. Minns, E. Kirvar, R. E. Adamson, F. R. Hall, S. McOrist, C. G. D. Brown and P. M. Preston (1999). "Tissue Damage in Cattle Infected with *Theileria annulata* Accompanied by Metastasis of Cytokine producing, Schizont-infected Mononuclear Phagocytes." J. Comp. Path. **120**: 39-57.

Fujisaki, K., S. Kawazu and T. Kamio (1994). "The taxonomy of the bovine *Theileria* spp." Parasitol Today **10**(1): 31-3.

Gautam (1981). "Bovine tropical theileriosis and its control." In: Advances in the control of theileriosis von A. D. Irvin, M. P. Cunningham and A. S. Young, International Laboratory for Research on Animal Diseases, Martinus Nijhoff Publishers: 262-265.

Gerber, S. (2008). "Assoziation mit dem Wirtszell-Mikrotubulinetzwerk und zytoplasmatische Arretierung von p53: Untersuchungen zur Überlebensstrategie von *Theileria annulata* in transformierten Rinderleukozyten." Inaugural Dissertation aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Lübeck.

Gill B. S., G. C. Bansal, Y. Bhattacharyulu, D. Kaur and A. Singh (1980). "Immunological relationship between strains of *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs 1904)." Res. Vet. Sci. **29**: 93-97.

- Gitau, G. K., B. D. Perry, J. M. Katende, J. J. McDermott, S. P. Morzaria and A. S. Young (1997).** "The prevalence of serum antibodies to tick-borne infections in cattle in smallholder dairy farms in Murang'a District, Kenya; a cross-sectional study." Prev Vet Med **30**(2): 95-107.
- Glascodine, J., L. Tetley, A. Tait, D. Brown and B. Shiels (1990).** "Developmental expression of a *Theileria annulata* merozoite surface antigen." Mol Biochem Parasitol **40**(1): 105-12.
- Glass, E. J. and R. L. Spooner (1989).** "Requirement for MHC class II positive accessory cells in an antigen specific bovine T cell response." Res Vet Sci **46**(2): 196-201.
- Gluzman, Y. (1981).** "SV 40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." Cell **23**(1): 175-81.
- Gordon, J. A. (1991).** "Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor." Methods Enzymol **201**: 477-482.
- Gosh, S., D. D. Ray, Vanlahmuaka, G. Das, N. K. Singh, J. K. Sharma and P. Azhahianambi (2008).** "Progress in development of vaccine against *Hyalomma anatolicum anatolicum*-Indian scenario." Vaccine **26**: G40-G47.
- Gubbels, J. M., A. P. de Vos, M. van der Weide, J. Viseras, L. M. Schouls, E. de Vries and F. Jongejan (1999).** "Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization." J Clin Microbiol **37**(6): 1782-9.
- Gubbels, M. J., Y. Hong, M. van der Weide, B. Qi, I. J. Nijman, L. Guangyuan and F. Jongejan (2000a).** "Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group." Int J Parasitol **30**: 943-952.
- Gubbels, M. J., C. d'Oliveira, G. Hide, F. Jongejan and B. R. Shiels (2000b).** "Development of an indirect Tams1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle." Clin Diagn Lab Immunol **7**(3): 404-11.
- Hall, R., P. D. Hunt, M. Carrington, D. Simmons, S. Williamson, R. P. Mecham and A. Tait (1992).** "Mimicry of elastin repetitive motifs by *Theileria annulata* sporozoite surface antigen." Mol Biochem Parasitol **53**(1-2): 105-12.
- Hall, R., N. R. Boulter, C.G.D. Brown, G. Wilkie, E. Kirvar, V. Nene, A. J. Musoke, E. J. Glass and S. P. Morzaria (2000).** "Reciprocal cross-protection induced by sporozoite antigens SPAG-1 from *Theileria annulata* and p67 from *Theileria parva*." Parasite Immunol **22**(5): 223-30.

- Harlow, E. and D. Lane (1988).** "Antibodies: a laboratory manual." Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, S. 478.
- Hashemi-Fesharki, R. (1988).** "Control of *Theileria annulata* in Iran." Parasitol Today **4**(2): 36-40.
- ICTTD-1 Final Report.** "Integrated control of ticks and tick-borne diseases (ICTTD)" [online]: 30-33, URL: <http://wwwold.icttd.nl/phpwcm/index.php?id=6,7,0,0,1,0>
- ILRAD (1992).** "Theileriosis (ILRAD Annual Report 1992). [online] "The International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya. p.13. [Stand: 18.09.2009] URL: <http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/ILRAD92/ILRAD92.pdf>
- Irvin, A. D. (1985).** "Immunity in Theileriosis." Parasitol Today **1**(5): 124-8.
- Irvin, A. D. and W. I. Morrison (1987).** "Immunopathology, immunology and immunoprophylaxis of *Theileria* infections. In: Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis, Vol. 3 (E.J.L. Soulsby, ed.), Boca Raton, Florida: CRC Press: 223-273.
- Irvin, A. D. (1987).** "Control of tick-borne diseases." Int J Parasitol **17**, pp. 649–657.
- Jacquiet, P., M. L. Dia, N. M. Perie, F. Jongejan, G. Uilenberg and P. C. Morel (1990).** "Presence of *Theileria annulata* in Mauritania." Rev Elev Med Vet Pays Trop. **43**(4):489-90.
- Jeong, W., C. H. Kweon, J. M. Kim, H. Jang and S. G. Paik (2005).** "Serological investigation of *Theileria sergenti* using latex agglutination test in South Korea." J Parasitol **91**(1): 164-9.
- Johnson, G. D., R. S. Davidson, K. C. McNamee, G. Russell, D. Goodwin and E. J. Holborow (1982).** "Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy." Journal of Immunological Methods, **55**(2): 231-242.
- Jongejan, F., D. Zivkovic, R. G. Pegram, R. J. Tatchell, T. Fison, A. A. Latif and G. Paine (1987).** "Ticks (Acari:Ixodidae) of the Blue and White Nile ecosystems in the Sudan with particular reference to the *Rhipicephalus sanguineus* group." Exp Appl Acarol **3**(4): 331-46.
- Jongejan, F. and G. Uilenberg (2004).** "The Global Importance of Ticks." Parasitology **129**: 3-14.
- Jura, W. G., C. G. Brown and B. Kelly (1983).** "Fine structure and invasive behaviour of the early developmental stages of *Theileria annulata* in vitro." Vet Parasitol **12**(1): 31-44.
- Kay, B. H. and D. H. Kemp (1994).** "Vaccines against arthropods." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **50**: 87-96.

- Knowles, D. P., J. R. Gorham (1993).** "Advances in the diagnosis of some parasitic diseases by monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays." Rev Sci Tech **12** (2): 425-33.
- Kyhse-Andersen, J. (1984).** "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." J Biochem Biophys Methods **10** (3-4): 203-9.
- Laemmli, U. K. (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Laiblin, C. (1978).** "Klinische Untersuchungen zur Theileria annulata Infektion des Rindes. II Hämatologische Untersuchungen." Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **91**: 48-50.
- Lawrence, J. A. (1990).** "Summing-up of strategies for tick-borne disease control in Africa, especially east Africa." Parassitologia **32**(1): 113-5.
- Leemans, I., P. Hooshmand-Rad and A. Ugglia (1997).** "The indirect fluorescent antibody test based on schizont antigen for study of the sheep parasite Theileria lestoquardi." Vet Parasitol **69**(1-2): 9-18.
- Leiper, J. W. (1957).** "Animal parasites and their control." Report to the Government of Iraq. Rome, F.A.O., No. **610**: 30.
- L'Hostis, M. and H. Seegers (2002).** "Tick-borne parasitic diseases in cattle: current knowledge and prospective risk analysis related to the ongoing evolution in French cattle farming systems." Vet Res **33**(5): 599-611.
- Luttmann, W., K. Bratke, M. Küpper and D. Myrtek (2004).** „Der Experimentator“ 1. Auflage, Spektrum Verlag, S. 111-6.
- MacHugh, N. D., T. Connelley, S. P. Graham, R. Pelle, P. Formisano, E. L. Taracha, S. A. Ellis, D. J. McKeever, A. Burrells and W. I. Morrison (2009).** "CD8⁺ T-cell responses to Theileria parva are preferentially directed to a single dominant antigen: Implications for parasite strain-specific immunity." Eur. J. Immunol. **39**: 2459–2469
- McHardy, N. and D. W. Morgan (1985a).** "Treatment of Theileria annulata infection in calves with parvaquone." Res Vet Sci **39**(1): 1-4.
- McHardy, N., L.S. Wekesa , A.T. Hudson and A.W. Randall (1985b).** "Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone." Res Vet Sci. **39**(1): 29-33.

- McKeever, D. J. (2009).** "Bovine immunity – a driver for diversity in Theileria parasites?" Trends Parasitol **25**(6): 269-76.
- Mehlhorn, H. and E. Schein (1984).** "The piroplasms: life cycle and sexual stages." Adv Parasitol **23**: 37-103.
- Mehlhorn, H., E. Schein and J. S. Ahmed (1994).** „Theileria." In: Kreier, J.P. (Ed.), Parasitic Protozoa, Vol. 7. Academic Press, London, pp. 217–304.
- Morel, P. C. and G. Uilenberg (1981).** "The nomenclature of some Theileria species (Sporozoa, Babesioidea) of domestic ruminants (author's transl)." Rev Elev Med Vet Pays Trop **34**(2): 139-43.
- Morzaria, S. P. and V. Nene (1990).** "Bovine theileriosis: progress in immunization methods." Int. J. Anim. Sci. **5**: 1-14.
- Mukhebi, A. W., B. D. Perry and R. Kruska (1992).** "Estimated economics of theileriosis control in Africa." Prev. Vet. Med., **12**(1): 73-85.
- Musoke, A., V. Nene and S. P. Morzaria (1993).** "A Sporozoite-based vaccine for Theileria parva." Parasitol Today **9**(10): 385-8.
- Musoke, A., G. H. Palmer, T. F. McElwain, V. Nene and D. McKeever (1996).** "Prospects for subunit vaccines against tick-borne diseases." Brit. Vet. J. **152**: 621-39.
- Neitz, W. O. (1957).** "Theileriosis, gonderiosis and cytauxzoonoses: A review." Onderstepoort J. Vet. Res. **27**: 275-430.
- Norval, R. A. I., B. D. Perry and A. S. Young (1992).** "The reporting, diagnosis and surveillance of theileriosis." In: R.A.I. Norval, B.D. Perry and A.S. Young (Editors) "The Epidemiology of Theileriosis in Africa." Academic Press, San Diego, CA, pp. 231-278.
- O'Callaghan, C. J. (1992).** "An epidemiologic study of the prevalence, risk factors and epidemiologic state of TBDs on smallholder dairy farms in Kiambu District, Kenya." MSc Thesis, University of Guelph, Canada.
- Omer, L. T., M. A. Kadir, U. Seitzer and J. S. Ahmed (2007).** "A survey of ticks (Acari:Ixodidae) on cattle, sheep and goats in the Dohuk Governorate, Iraq." Parasitol Res **101**(Suppl 2): 179-81.
- Ouhelli, H. (1985).** "Theileriose bovine a Theileria annulata (Dschunkowsky und Luhs, 1904) recherche sur la biologie des vecteurs (Hyalomma spp) et sur les interactions hote-parasite." IMP: Toulouse, France.

Perry, B. D., R. Kruska, P. Lessard, R. A. I. Norval and K. Kundert (1991). "Estimating the distribution and abundance of *Rhipicephalus appendiculatus* in Africa." Prev. Vet. Med. **11**: 261-268.

Perry, B. D. (1994). "Modelling vector-borne disease epidemiology and the impact of control programs." In: Perry, B.D., J.W. Hansen (eds.): *Modelling Vector-Borne and other Parasitic Diseases*. Proceedings of a workshop organized by ILRAD in collaboration with FAO, ILRAD, Nairobi, Kenya, 23 - 27 November 1992. Nairobi: International Laboratory for Research on Animal Diseases.

Perry, B. D. and A. S. Young (1995). "The past and future roles of epidemiology and economics in the control of tick-borne diseases of livestock in Africa: the case of theileriosis." Prev. Vet. Med. **25**: 107-120.

Perry, B. D. and T. F. Randolph (1999). "Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals." Vet Parasitol **84**: 145-168.

Perry, B. D., T. F. Randolph, J. J. McDermott, K. R. Sones and P. K. Thornton (2002). "Investing in animal health research to alleviate poverty." ILRI (International Livestock Research Institute), Nairobi, Kenya.

Pipano, E. and M. Cahana (1969). "Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Theileria annulata*." J Parasitol. **55**(4): 765.

Pipano, E. (1981). "Schizonts and tick stages in immunization against *Theileria annulata* infection." In: Irvin AD, Cunningham MP, Young AS (eds) . *Current topics in veterinary medicine and animal science*, vol 14. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, pp 242–252

Pipano, E. (1989). "Vaccination against *Theileria annulata* theileriosis." In: I.G. Wright (Editor) *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*, CRC Press, Boca Raton (1989), pp. 203–234.

Pipano, E. and A. S. Grewal (1990). "Summing-up of strategies for tick-borne disease control in regions of the world other than Africa." Parassitologia **32**(1): 117-25.

Pipano, E. and V. Shkap (2000). "Vaccination against Tropical Theileriosis." Ann N Y Acad Sci **916**: 484-500.

Preston, P. M., C. G. Brown, L. Bell-Sakyi, W. Richardson and A. Sanderson (1992). "Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos taurus* cross *Bos indicus* calves: response to infection with graded doses of sporozoites of *Theileria annulata*." Res Vet Sci **53**(2): 230-43.

Preston, P.M. and F. Jongejan (1999). [Poster of the issue] Parasitol Today **15**(7).

- Preston, P. M., F. R. Hall, E. J. Glass, J. D. M. Campbell, M. A. Darghouth, J. S. Ahmed, B. R. Shiels, R. L. Spooner, F. Jongejan and C. G. D. Brown (1999).** "Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against *Theileria annulata*." Parasitol Today **15**(7): 268-74.
- Radley, D. E., C. G. D. Brown, M. J. BurrIDGE, M. P. Cunningham, M. A. Peirce and R. E. Purnell (1974).** "East Coast Fever: Quantitative studies of *Theileria parva* in cattle." Exp Parasitol **36**: 278.
- Radley, D. E. (1981).** "Infection and treatment method of immunization against theileriosis." In: A.D. Irvin, M.P. Cunningham and A.S. Young (Editors), *Advances in the Control of Theileriosis*. Proc. Int. Conf., ILRAD, Nairobi, 9-13 February 1981. Martinus Nijhoff. The Hague, pp. 227-237.
- Robinson, P. M. (1982).** "Theileria annulata and its transmission – a review." Tropical Animal Health and Production **14**(1): 3-12.
- Rocchi, M. S. L., K. T. Ballingall, N. D. MacHugh and D. J. McKeever (2006).** "The kinetics of *Theileria parva* infection and lymphocyte transformation in vitro." Int Journ Parasitol **36**: 771-778.
- Rosenberger, G., G. Dirksen, H.-D. Gründer and M. Stöber (1994).** „Krankheiten des Rindes.“ 3. Auflage, Parey.
- Salih, D. A., J. S. Ahmed, M. A. Bakheit, E. B. Ali, A. M. El Hussein, S. M. Hassan, O. E. Shariff, M. Fadl and F. Jongejan (2005a).** "Validation of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle." Parasitol Res **97**(4): 302-8.
- Salih, D. A., S. Hassan, M. A. Bakheit, A. M. El Hussein, F. Jongejan and J. S. Ahmed (2005b).** "Application of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle." Proceedings 5th international Conference of Ticks and Tick-borne Pathogens, Neuchâtel, Switzerland, 163-6.
- Salih, D. A., A. M. El Hussein, M. N. Kyule, K. H. Zessin, J. S. Ahmed and U. Seitzer (2007a).** "Determination of potential risk factors associated with *Theileria annulata* and *Theileria parva* infections of cattle in the Sudan." Parasitol Res **101**(5): 1285-8.
- Salih, D. A., S. M. Hassan and A. M. El Hussein (2007b).** "Comparisons among two serological tests and microscopic examination for the detection of *Theileria annulata* in cattle in northern Sudan." Prev Vet Med **81**(4): 323-6.
- Salih, D. A., A. M. El Hussein, A. M. El Hussein (2007c).** "Epidemiological studies on tick-borne diseases of cattle in Central Equatoria State, Southern Sudan." Parasitol Res **101**(4): 1035-44.

- Schneider, I., D. Haller, U. Seitzer and J. S. Ahmed (2004).** "Molecular genetic characterization and subcellular localization of a putative *Theileria annulata* membrane protein." Parasitol Res **94**(6): 405-15.
- Schneider, I., D. Haller, B. Kullmann, D. Beyer, J. S. Ahmed and U. Seitzer (2007).** "Identification, molecular characterization and subcellular localization of a *Theileria annulata* parasite protein secreted into the host cell cytoplasm." Parasitol Res **101**(6): 1471-82.
- Schnittger, L., F. Katzer, R. Biermann, P. Shayan, K. Boguslawski, S. McKellar, D. Beyer, B. R. Shiels and J. S. Ahmed (2002).** "Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines." Mol Biochem Parasitol **120**(2): 247-56.
- Seifert H. S. H. (1996).** "Tropical Animal Health" 2. Auflage, Kluwer Academic Publishers, S. 183.
- Seitzer, U., L. Schnittger, K. Boguslawski and J. S. Ahmed (2006).** "Investigation of MAP kinase activation in *Theileria*-infected cell lines." Ann. N.Y. Acad. Sci. **1081**: 473–475.
- Seitzer, U., M. A. Bakheit, D. E. Salih, A. Ali, D. Haller, H. Yin, H. Schnittger and J. S. Ahmed (2007).** "From molecule to diagnostic tool: *Theileria annulata* surface protein TaSP." Parasitol Res **101**(2): 217-23.
- Shaw, M. K. and L. G. Tilney (1992).** "How individual cells develop from a syncytium: merogony in *Theileria parva* (Apicomplexa)." J Cell Sci **101** (1): 109-23.
- Shaw, M. K. (1997).** "The same but different: the biology of *Theileria* sporozoite entry into bovine cells." Int J Parasitol **27**(5): 457-74.
- Shaw, M. K. (2003).** "Cell invasion by *Theileria* sporozoites." Trends Parasitol **19**(1): 2-6.
- Shiels, B. R., C. McDougall, A. Tait, and C. G. D. Brown (1986a).** "Identification of infection-associated antigens in *Theileria annulata* transformed cells." Parasite Immunol **8**(1): 69-77.
- Shiels, B. R., C. McDougall, A. Tait, and C. G. D. Brown (1986b).** "Antigenic diversity of *Theileria annulata* macroschizonts." Vet Parasitol **21**(1): 1-10.
- Shkap, V., A. J. de Vos, E. Zwegarth and F. Jongejan (2007).** "Attenuated vaccines for tropical theileriosis, babesiosis and Heartwater: the continuing necessity." Trends Parasitol **23**(9): 420-6.

Spooner, R. L., E. A. Innes, E. J. Glass, P. Millar and C. G. Brown (1988). "Bovine mononuclear cell lines transformed by *Theileria parva* or *Theileria annulata* express different subpopulation markers." Parasite Immunol. **10**: 619-629.

Srivastava, A. K. and D. N. Sharma (1981). "Studies on the occurrence, clinical features and clinicopathological and pathomorphological aspects of theileriasis in calves." Vet. Res. J. **4**(1): 22-29.

Tait, A. and F. R. Hall (1990). "Theileria annulata: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines." Rev Sci Tech **9**(2): 387-403.

Tatchell, R. J. (1981). "Current methods of tick control with special reference to theileriosis." In: *Advances in the Control of Theileriosis* (A. D. Irvin, M. P. Cunningham and A. S. Young, eds), pp 148-159. The Hague, Boston, London: Martinus Nijhoff Publishers.

Uilenberg, G. (1981). "Theileria infection other than ECF." In: *Diseases of Cattle in the Tropics*, M. Ristic and I. Mc Intyre, Eds., Martinus Nijhoff, The Hauge: 411-427.

Uilenberg, G. (1995). "International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health." Vet Parasitol **57**(1-3): 19-41.

Uilenberg, G. (1999). "Epidemiology and control of bovine theileriosis." Trop. Med. Int. Health **4**(9): A12-A20.

Unger, F. (1996). "Determination of the serological status for tick borne diseases in calves and adult cattle in Rukungiri District and the associations with different tick control strategies." Berlin: Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, Weiterbildendes Studium Tropenveterinärmedizin, Diploma thesis.

Williamson, S., D. Brown, A. Tait, A. Walker, P. Beck, B. R. Shiels, J. Fletcher and F. R. Hall (1989). "Theileria annulata sporozoite surface antigen expressed in *Escherichia coli* elicits neutralising antibodies." Proc. Natl. Acad. Sci. **86**: 4639-4643.

Willardsen, P., D. Smith, G. Cobon and R. V. McKenna (1996). "Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91." Parasite Immunol. **18**: 241-246.

Willadsen P. (2004). "Anti-tick vaccines." Parasitol **129**: 367-387.

www.theileria.org. "An integrated approach for the development of sustainable methods to control tropical theileriosis." [online, Stand: 18.09.2009] URL: <http://www.theileria.org/index.htm>

Yin H., L. Schnittger, J. Luo, U. Seitzer and J. S. Ahmed (2007). "Ovine theileriosis in China: a new look at an old story." Parasitol Res. **101**(2): 191-5.

Young A. S., C. G. D. Brown, M. J. Burridge, M. P. Cunningham, I. M. Kirimi and A. D. Irvin (1973). "Observations on the cross-immunity between *Theileria lawrenci* (Sergenti) and *Theileria parva* (Muguga) in cattle." Int J Parasitol **3**: 723-728.

Young A. S., B. L. Leitch and R. M. Newson (1981). "The occurrence of a *Theileria parva* carrier state in cattle from an East Coast fever endemic area of Kenya." In: A. D. Irvin, M. P. Cunningham and A. S. Young (eds). *Advances in the Control of Theileriosis*. The Hague: Martinus-Nijhoff Publishers; 1981. pp. 60–62.

Young, A. S., C. M. Grocock and D. P. Kariuki (1988). "Integrated control of ticks and tick-borne diseases of cattle in Africa." Parasitology **96 (Pt 2)**: 403-32.

13 DANKSAGUNG

Allen, die an der Erstellung dieser Arbeit Anteil hatten, möchte ich sehr herzlich danken.

Herrn Professor Jabbar Sabir Ahmed, dass er mir die Möglichkeit gab, diese Dissertation unter seiner Leitung anzufertigen. Er war jederzeit mit konstruktiven Gesprächen und Diskussionen für mich da;

Frau Professor Ulrike Seitzer, die mir von Anfang an immer mit Anregungen, Ratschlägen und neuen Ideen beratend zur Seite stand und am Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beteiligt war;

Herrn Professor Kurt Pfister für die Korrektur dieser Arbeit und dass er es mir ermöglicht hat, an der Ludwig-Maximilians-Universität zu promovieren;

den technischen Assistenten der LG Veterinär-Infektiologie und -Immunologie für das freundliche und entspannte Arbeitsklima, besonders Frau Birgit Kullmann für die fortwährende Unterstützung in allen Belangen des Laboralltages und Frau Jessica Dobschanski für die Einführung in die Zellkultur-Technik;

den Mit-Doktoranden Monika Mackiewicz, Heike Müller, Zhijie Liu, Jasim Abdo, Diaeldin Hassan und Awadia Ali für das freundschaftliche und kollegiale Verhältnis und die konstruktiven Diskussionen. Besonders Monika Mackiewicz sei herzlich für die netten Ausflüge nach getaner Arbeit gedankt. Auch sollen an dieser Stelle die Dres. Silke Gerber und Mohammed Bakheit nicht vergessen werden, die mir wertvolle Tipps für meine Arbeit gegeben haben;

den netten Nachbarn der Laborgruppe Immunepigenetik, die immer bereit waren, zu helfen und die in den Pausen zur Erheiterung beigetragen haben.

meiner Familie, die mich stets uneingeschränkt unterstützt hat und der ich die Möglichkeit verdanke, diese Doktorarbeit am Forschungszentrum Borstel anfertigen zu können.

