

Serodiagnostik der alveolären Echinokokkose mittels eines Antigens aus in vitro gehaltenen *Protoscolices* von *Echinococcus multilocularis*

H. Auer, H. Aspöck

Einleitung

Österreich ist — wie die Schweiz und die Bundesrepublik Deutschland — eines jener Länder, in denen sowohl Fälle zystischer, als auch Fälle alveolärer Echinokokkose auftreten, diagnostiziert und behandelt werden müssen (5, 6).

Aufgrund der Schwere und der schlechten Prognose der alveolären Echinokokkose kommt der serologischen Abklärung der durch den Fünfgliedrigen Fuchsbandwurm, *Echinococcus multilocularis*, hervorgerufenen Infektion bzw. Erkrankung besondere Bedeutung zu, da der serologische Befund eine wichtige Entscheidungshilfe für das weitere therapeutische Procedere darstellt.

Als wir zu Beginn der 80er Jahre in zunehmendem Maße zur Kenntnis nehmen mußten, daß mit konventionellen Tests bzw. Testkits — alle ausgerüstet mit heterologem *Echinococcus granulosus*-Antigen — keine suffiziente Diagnostik der alveolären Echinokokkose möglich ist, haben wir für unser Routinelaboratorium einen Enzymimmuntest (ELISA) unter Verwendung von homologem *Echinococcus multilocularis*-Antigen (Em-ELISA) etabliert (1, 3, 7). Dieser Em-ELISA wird nun seit dem Jahre 1985 eingesetzt, und er hat sich — insbesondere was die Testsensitivität betrifft — ausgezeichnet bewährt: Alle uns bisher bekannt gewordenen und von uns untersuchten Fälle alveolärer Echinokokkose wurden mittels EM-ELISA „erkannt“.

Bedingt durch die Verwendung von *Echinococcus multilocularis*-Rohantigen können jedoch mitunter unspezifische bzw. Kreuzreaktionen — insbesondere mit Seren von Patienten mit anderen extraintestinalen Helminthosen — auftreten (7, 8, 10, 11, 12).

Im Bestreben, diese störenden Mitreaktionen, die weitgehend auf den im Rohantigen vorhandenen Anteil von Wirtsproteinen zurückzuführen sind, auf ein Minimum zu reduzieren bzw. überhaupt zu eliminieren, haben wir eine Methode zur Gewinnung von reinem *Echinococcus multilocularis*-Antigen entwickelt und etabliert (2, 4). Dabei wird nicht das gesamte aus dem Labortier isolierte Metazestodengewebe homogenisiert und als Extrakt verwendet, vielmehr werden die *Protoscolices* aus dem Metazestodenmaterial isoliert und in einem serumfreien Kulturmedium unter standardisierten in vitro-Bedingungen zwei bis drei Wochen gehalten. Nach elektrophoretischer Auftrennung (SDS-PAGE) der an Stoffwechselprodukten der *Protoscolices* reichen Kulturüberstände (E/S-Antigen) und mittels eines Immunoblotverfahrens ist dann eine artspezifische Diagnose möglich, weil eine bestimmte Polypeptidbande (62 KD) nur von Antikörpern von Patienten mit alveolärer, nicht jedoch mit zystischer Echinokokkose oder anderen Parasitosen „erkannt“ wird.

In Anbetracht der Tatsache, daß die Produktion von E/S-Antigen aufwendig, die produzierten Antigenmengen aber sehr gering sind, erscheint der Einsatz des reinen und hochspezifischen E/S-Antigens im Routinelaboratorium — zumindest derzeit — nicht vertretbar.

Wir haben deshalb versucht, Antigen aus in vitro-gehaltenen (und in großen Mengen verfügbaren) *Protoscolices* zu gewinnen. Dieser als PS-Antigen bezeichnete Extrakt wurde in einem Enzymimmuntest (PS-ELISA) verwendet und auf seine diagnostische Brauchbarkeit überprüft. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden mit jenen des im Routinelaboratorium eingesetzten Rohantigen-ELISA (Em-ELISA) verglichen.

Material und Methoden

PS-Antigen

Das PS-Antigen wurde aus evaginierten und zum Teil vesikulierten *Protoscolices*, die aus dem Metazestodengewebe experimentell infizierter Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) isoliert und fünf Wochen in serumfreiem RPMI 1640-Medium (GIBCO, GB) in 25 ml-Kulturflaschen gehalten worden waren, gewonnen. Dabei wurden sowohl die *Protoscolices* als auch das Kulturmedium aus den Kulturflaschen entfernt und die *Protoscolices* vom Überstand durch Zentrifugation separiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Hanks'balanced salt solution (HBSS; Flow, GB) wurden die *Protoscolices* einer fünfminütigen Ultraschallbehandlung unterzogen. Nach einer 48stündigen Extraktionsphase bei + 4° C in HBSS wurde der Extrakt 100fach konzentriert (PEG 2000) und gegen Karbonat/Bikarbonatpuffer (pH 9,6) dialysiert.

PS-ELISA

Antigen:

Nach Durchführung einer Schachbrett-Titration wurde das PS-Antigen in einer Konzentration von 7 µg/ml im ELISA verwendet.

Konjugat:

Peroxidase-gekoppeltes Antihuman-IgG (Cappel Labs., USA; Verdünnung: 1 : 4000).

Substrat:

H₂O₂ + 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure.

Die Testdurchführung und Auswertung (bei einer Serumverdünnung von 1 : 800) erfolgte nach AUER et al. (7).

Em-ELISA

Antigen: Rohantigen; Proteingehalt: 1,48 mg/ml.

Testdurchführung und Auswertung: Siehe AUER et al. (7).

Testseren

Im Em-ELISA als auch im PS-ELISA wurden 50 Normalseren, 1 Kaninchen-Anti-*Meriones*-Serum (Konjugat: Anti-Rabbit-IgG-PO), sowie Seren von Patienten mit alveolärer Echinokokkose (17), zystischer Echinokokkose (65), Zystizerkose (6), Fasziole (5), Bilharziose (5), Filariose (2), Trichinose (2), Toxokarose (12), extraintestinaler Amoebose (16), viszeraler Leishmaniose (2), Virushepatitis (3), Leberzirrhose (3) oder Neoplasmen (6) getestet.

TABELLE 1
Ergebnisse des Testvergleichs von PS-ELISA und EM-ELISA

Herkunft der Seren	N _i	Em-ELISA N _{pos}	PS-ELISA N _{pos}
Patienten mit Alveolärer Echinokokkose	17	17	17
Zystischer Echinokokkose	65	34	26
Zystizerkose	6	2	0
Fasziolose	5	4	3
Bilharziose	5	2	0
Filariose	2	2	0
Toxokarose	12	2	0
Trichinose	2	1	0
Extraintestinale Amoebose	16	3	0
Viszerale Leishmaniose	2	0	0
Hepatitis	3	0	0
Leberzirrhose	3	0	0
Neoplasmen	6	0	0
Normalpersonen	50	0	0
Kaninchen-Anti-Meriones-Serum	1	1	0
	195	68	46

N_i = Anzahl der getesteten Seren

N_{pos} = Anzahl der positiven Seren (= ≥ 30 Antikörpereinheiten/AKE)

Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Diskussion war es, zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß die Verwendung von in vitro-gewonnenem PS-Antigen in einem serologischen Test (ELISA) eine Verbesserung der Serodiagnostik der alveolären Echinokokkose bewirkt. Dabei sollte besonders darauf geachtet werden, ob einerseits die hohe Sensitivität, die den EM-ELISA auszeichnet, auch im PS-ELISA erreicht werden und ob andererseits die Spezifität, durch Verwendung eines weitgehend Wirtsprotein-freien Antigens (PS-Antigen), wesentlich erhöht werden kann.

Tatsächlich erwies sich der PS-ELISA bei *Echinococcus multilocularis*-Infektionen hochsensitiv. Zwar lagen die im PS-ELISA gemessenen Extinktionswerte geringfügig unter jenen des mit Rohantigen ausgestatteten Em-ELISA — ähnliche Erfahrungen wurden auch von anderen Autoren (GOTTSTEIN, persönliche Mitteilung) beim Einsatz von gereinigten Antigenen in serologischen Tests gemacht —, dennoch waren alle 17 untersuchten Seren von Patienten mit alveolärer Echinokokkose eindeutig positiv ($> > 30$ Antikörpereinheiten/AKE; Sensitivität: 100%).

Durch die 5wöchige in vitro-Haltung der *Protoscolices* in serumfreiem Medium konnte der Anteil von Wirtspoteinen wesentlich verringert, wahrscheinlich sogar völlig eliminiert werden; das hierfür verwendete Kontrollserum (Kaninchen-Anti-*Meriones*-Serum) reagierte jedenfalls nicht mit dem PS-Antigen, hingegen zeigten sich intensive Reaktionen mit dem im Em-ELISA verwendeten Rohantigen. HEATH und OSBORN (9) konn-

ten allerdings in *Protoscolices* von *Echinococcus granulosus*, die 27 Tage in serumfreiem NCTC 135-Kulturmedium gehalten worden waren, noch Spuren von Wirtsprotein nachweisen.

Von den 50 Seren, die von Patienten mit verschiedenen Parasiten-Infektionen (ausgenommen Echinokokkose-Patienten) stammten, reagierten im PS-ELISA nur 3 (ausschließlich Seren von Patienten mit einer akuten Fasziole), im Em-ELISA hingegen 16 (Seren von Patienten mit Zystizerkose, Fasziole, Bilharziose, Filariose, Toxokarose, Trichinose oder extraintestinaler Amöbose) positiv. Die 50 Normalseren und 12 Seren von Patienten mit Virushepatitis, Leberzirrhose oder verschiedenen Neoplasmen zeigten in keinem der beiden Tests positive Reaktionen.

Der Anteil „falsch-positiver“ Reaktionen wird durch die Verwendung von PS-Antigen damit von 32% im Em-ELISA auf 6% im PS-ELISA reduziert. Die beobachteten positiven Reaktionen des PS-Antigens mit Seren von 3 Patienten mit akuter Fasziole — und auch jene mit Seren von 26 Patienten mit zystischer Echinokokkose — müssen, da keine nachweisbaren Wirtsproteine im PS-Antigen vorhanden, als Kreuzreaktionen, verursacht durch identische oder strukturell sehr ähnliche Antigene, interpretiert werden.

Bedingt durch den hohen Sensitivitäts- und Spezifitätsgrad bietet sich der PS-ELISA daher als Alternative zum bislang im Routinelaboratorium als Screeningtest eingesetzten Em-ELISA an; dies nicht zuletzt auch deshalb, weil — im Gegensatz zum Em-ELISA — nur sehr geringe Antigenmengen (PS-ELISA : 7 µg/ml; Em-ELISA: 1,48 g/ml) benötigt werden und daher wesentlich weniger Labortiere infiziert werden müssen; ein Vorteil, der angesichts verschärfter Tierschutzbestimmungen besondere Beachtung finden sollte. Zur weiteren Präzisierung (speziesspezifische Diagnose) eines im PS-ELISA erhobenen positiven Befundes wird aber auch in Zukunft ein Immunoblot-Verfahren unter Verwendung von E/S-Antigen (4) durchgeführt werden müssen.

Zusammenfassung

Für die Diagnostik der alveolären Echinokokkose wurde ein Enzymimmuntest mit einem Wirtsprotein-freien Antigen aus *Protoscolices* von *Echinococcus multilocularis* (PS-ELISA), die fünf Wochen in serumfreiem Kulturmedium unter in vitro-Bedingungen gehalten worden waren, etabliert. Dieser Test wurde mit einem Rohantigen-ELISA (Em-ELISA) verglichen. Der PS-ELISA erwies sich dabei bezüglich Sensitivität dem Em-ELISA ebenbürtig, bezüglich Spezifität zeigte er sich dem Em-ELISA überlegen, da mit dem PS-Antigen — neben allen 17 Seren von Patienten mit alveolärer Echinokokkose und 29 (von 65) mit zystischer Echinokokkose — nur noch Seren von Patienten mit akuter Fasziole reagierten, nicht aber Seren von Patienten mit anderen Parasiten-Infektionen, wie dies beim Em-ELISA beobachtet werden konnte.

Schlüsselwörter

Echinococcus multilocularis, Serodiagnostik, in vitro-Haltung, Protoscolex-Antigen.

Summary

Serodiagnosis of alveolar echinococcosis using antigen from in vitro maintained protoscolices of *Echinococcus multilocularis*

An enzyme-linked immunosorbent assay using *Echinococcus multilocularis* antigen from protoscolices maintained in serum-free culture medium for 5 weeks was established (PS-ELISA) and compared with an ELISA using crude antigen (Em-ELISA). The

PS-ELISA proved to be as sensitive as Em-ELISA (all the sera from 17 patients with alveolar echinococcosis were positive) but showed a much higher specificity than the latter one, since only 29 out of 65 sera from patients with cystic echinococcosis, 3 out of 5 sera from patients with fasciolosis reacted with PS-antigen, whereas it did not react with sera from patients with other parasitic diseases as observed in Em-ELISA.

Key words

Echinococcus multilocularis, serodiagnosis, in vitro maintenance, protoscolex antigen.

Literatur

1. AUER, H., ASPÖCK, H. (1986):
Erfahrungen bei der Serodiagnostik der Echinokokkosen mittels ELISA.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8, 17 - 22.
2. AUER, H., ASPÖCK, H. (1986):
Studies on antigens from in vitro cultivated protoscolices of *Echinococcus multilocularis* and their possible use in the serodiagnosis of human echinococcosis.
Proc. 2nd Symp. Taeniasis/Cysticercosis & Echinococcosis/Hydatidosis, Ceske Budejovice, CSSR, Dec. 1985, pp 7 - 15.
3. AUER, H., ASPÖCK, H. (1987):
Serodiagnose der Echinokokkosen — Erfahrungen in Österreich.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 9, 73 - 77.
4. AUER, H., HERMENTIN, K., ASPÖCK, H. (1988):
Demonstration of a specific *Echinococcus multilocularis* antigen in the supernatant of in vitro maintained protoscolices.
Zbl. Bakt. Hyg. A 268, 416 - 420.
5. AUER, H., HERMENTIN, K., PICHER, O., ASPÖCK, H. (1987):
Echinococcosis in Austria.
Tropenmed. Parasitol. 38, 260.
6. AUER, H., PICHER, O., ASPÖCK, H. (1985):
Echinokokkose in Österreich — Eine kritische Übersicht.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 7, 101 - 107.
7. AUER, H., PICHER, O., ASPÖCK, H. (1988):
Combined application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect haemagglutination test (IHA) as a useful tool for the diagnosis and post-operative surveillance of human alveolar and cystic echinococcosis.
Zbl. Bakt. Hyg. A 270, 313 - 325.
8. GOTTSTEIN, B., WITASSEK, F., ECKERT, J. (1986):
Neues zur Echinokokkose.
Schweiz. Med. Wschr. 116, 810 - 817.
9. HEATH, D. D., OSBORN, P. J. (1976):
Formation of *Echinococcus granulosus* laminated membrane in a defined medium.
Int. J. Parasitol. 6, 467 - 471.
10. RICKARD, M. D., LIGHTLOWLERS, M. W. (1986):
Immunodiagnosis of hydatid disease. In: THOMPSON, R. C. A. (Ed.): The biology of *Echinococcus* and hydatid disease.
1st Ed. George Allen & Unwin, London, p. 217 - 249.
11. SCHANTZ, P. M., SHANKS, D., WILSON, M. (1980):
Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 29, 609 - 612.
12. SPEISER, F. (1980):
Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of filariasis and echinococcosis.
Tropenmed. Parasitol. 31, 459 - 466.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. Herbert Auer
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Hygiene-Institut der Universität Wien
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien • Austria

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: [11](#)

Autor(en)/Author(s): Auer Herbert, Aspöck Horst

Artikel/Article: [Serodiagnostik der alveolären Echinokokkose mittels eines Antigens aus in vitro gehaltenen Protoscolices von Echinococcus multilocularis. 13-18](#)