©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 13 (1991) 31 - 40

Institut für Zoologie, Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim (Leiter: Prof. Dr. Werner Frank)

Untersuchungen zur Serologie von *Echinococcus multilocularis* im Endwirt

Th. Pfister, V. Schad, W. Frank

Einleitung

Es wäre aus mehreren Gründen wünschenswert, zuverlässige serologische Methoden zur Verfügung zu haben, mit denen eine *Echinococcus multilocularis*-Infestation im Endwirt festgestellt oder eine solche ausgeschlossen werden könnte. Zum einen könnte man bei epidemiologischen Untersuchungen auf die arbeitsintensive und vor allem gefahrenträchtige Sektion von Füchsen verzichten, zum anderen könnte auch die Gefahrenquelle, die infizierte Hunde und Katzen für den Menschen darstellen können, besser kontrolliert werden. So könnte gerade bei diesen Haustieren vor einer Entwurmung festgestellt werden, ob ein *E. multilocularis*-Befall vorliegt oder nicht. Diese genaue Diagnosestellung wäre insofern vorteilhaft, da die ausgeschiedenen Würmer im Falle von *E. multilocularis* ein besonders großes Ansteckungsrisiko für den Tierhalter bedeuten. Darüberhinaus könnten geeignete serologische Testmethoden dafür eingesetzt werden, um Auskunft über Erfolg oder Mißerfolg von Eradikationsmaßnahmen zu geben, wie sie derzeit beispielsweise im Landkreis Göppingen durchgeführt werden (7, 8).

Ziel unserer Untersuchung war es, ein diesen Anforderungen gerecht werdendes serologisches Testsystem zu entwickeln bzw. zu etablieren. Unser Testsystem umfaßt einen Screening-ELISA unter Verwendung von *E. multilocularis*-Rohantigen und ein Immunoblot-Verfahren als Bestätigungstest. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse einer Reihe methodischer Untersuchungen zur Anwendbarkeit des ELISA als Screening-Test vorgestellt; die „Immunoblot-Versuche" sind noch nicht abgeschlossen, die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden anderweitig vorgestellt werden.

Material und Methoden

Insgesamt wurden 41 Füchse, deren Todeszeitpunkt genau bekannt war, serologisch untersucht. Davon waren 14 Füchse juvenil, d. h. jünger als acht Monate. Sie werden im folgenden als „Jungfüchse" bezeichnet, während alle anderen Füchse, deren Alter auf mindestens acht Monate geschätzt wurde, „Altfüchse" genannt werden. Die Altersbestimmung konnte in den meisten Fällen nach der Größe und dem Habitus der Tiere vorgenommen werden. Im Zweifelsfall wurden nach WAGENKNECHT (10) auch Schädel- und Gebißmerkmale sowie das Trockengewicht der Augenlinse zur Altersbestimmung herangezogen.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Alle Füchse stammten aus den Landkreisen Schwäbisch Hall und Ostalbkreis, in denen nach Sektionsbefunden aus etwa 200 Füchsen die Prävalenz von *E. multilocularis* im Untersuchungszeitraum (1989 - 1990) zwischen 30 und 50% lag.

Die Blut- bzw. Plasmaentnahme erfolgte an mehreren Stellen gleichzeitig, indem entweder frei in den Körperhöhlen befindliches bzw. aus dem Körper austretendes Blut aufgefangen wurde, oder indem bestimmte Blutgefäße angeschnitten wurden und das austretende Blut gesammelt wurde.

Einigen Fuchskadavern, die bei Zimmertemperatur in einem Isolierraum gelagert wurden, wurde über mehrere Tage in regelmäßigen Abständen Blut aus den Körperhöhlen entnommen, um einen möglichen Einfluß des Entnahmezeitpunktes auf den Antikörpertiter feststellen zu können.

Der Gesamteiweißgehalt der Fuchsseren wurde mit Hilfe des Biorad Protein Assay (Fa. Biorad Laboratories, München) bestimmt, die qualitative Untersuchung der Serumproteine erfolgte mittels der Elektrophorese auf Zellulose-Azetat-Folie (CAF-Elektrophorese) nach KOHN (5).

Der ELISA wurde als Mikrosystem mit Peroxidase als umsetzendes Enzym durchgeführt. Als Antigen wurde somatisches Rohantigen aus *E. multilocularis*-Protoscoleces verwendet, das nach GOTTSTEIN et al. (2) aufbereitet wurde.

Als Serum- und Konjugatverdünnungspuffer wurde phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit 6% fötalem Kälberserum (FKS) verwendet. Als Konjugat wurde Anti-Hund IgG (H + L) aus der Ziege (Fa. Zymed Laboratories) und als Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das Serum eines in Gefangenschaft aufgezogenen Fuchses, der nachweislich nie mit *E. multilocularis* befallen war. Alle Seren wurden doppelt getestet. Als Grenztiter wurde jene Serumverdünnung festgelegt, bei der die durchschnittliche Extinktion größer war, als die durchschnittliche Extinktion des negativen Kontrollserums plus deren 3fache Standardabweichung. Sensitivität und Spezifität wurden nach THORNER und REMEIN (9) geschätzt.

Ergebnisse

1. Serologische Ergebnisse

Von den insgesamt 41 untersuchten Tieren waren 27 serologisch positiv, 14 serologisch negativ. Davon waren 14 Füchse falsch-positiv und drei Füchse falsch-negativ. Daraus ergibt sich eine Sensitivität des Testsystems von 85% und eine Spezifität von 52,3% (Tab. 1).

2. Einfluß der Blutentnahmestelle auf das serologische Ergebnis

Für die Blutentnahme an toten Füchsen haben sich folgende Stellen als praktikabel erwiesen: Schuß- bzw. Verletzungswunden (Vulnus), natürliche Körperöffnungen, aus denen Blut austritt wie z. B. Nasenlöcher (Nares), Brusthöhle (C. pect.), Herz, Bauchhöhle (C. abdom.) und große Venen wie die Oberschenkelvene (V. saphen.), Halsvene (V. jug.) und Bauchvene (V. cava).

Die Stelle der Blutentnahme hatte nur dann einen Einfluß auf das serologische Ergebnis, wenn der Fuchskadaver zum Zeitpunkt der Blutentnahme schon einige Zeit alt war (Abb. 1). In allen Fällen, in denen in Abhängigkeit von der Blutentnahmestelle unterschiedliche Titer gemessen wurden, wies das Serum aus der V. jugularis immer die höchsten Titerwerte auf.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

TABELLE 1

Serologische Testergebnisse (ELISA) von 41 Fuchsseren auf spezifische Antikörper gegen *Echinococcus multilocularis*, aufgetrennt nach Füchsen mit und ohne Infektion.

Blutabnahmestellen: V. saphena oder V. juguralis.
Berechnung von Sensitivität und Spezifität des Tests nach (9).

	serologisches Testergebnis	
	+	−
mit Infektion	17	3
ohne Infektion	10	11

Sensitivität: $\frac{17}{20} = 85{,}0\ \%$ Spezifität: $\frac{11}{21} = 52{,}3\%$

TABELLE 2

Serologische Testergebnisse (ELISA) wie in Tab. 1 aber nach Blutentnahme aus Bauch- oder Brusthöhle

	serologisches Testergebnis	
	+	−
mit Infektion	13	7
ohne Infektion	10	11

Sensitivität: $\frac{13}{20} = 65{,}0\ \%$ Spezifität: $\frac{11}{21} = 52{,}3\%$

TABELLE 3

Serologische Testergebnisse (ELISA) wie in Tab. 1 aber getrennt nach Jung- und Altfüchsen

Jungfüchse	serologisches Testergebnis	
	+	−
mit Infektion	3	3
ohne Infektion	2	6

Sensitivität: $\frac{3}{6} = 50{,}0\ \%$ Spezifität: $\frac{6}{8} = 75{,}0\%$

Altfüchse	serologisches Testergebnis	
	+	−
mit Infektion	14	0
ohne Infektion	8	5

Sensitivität: $\frac{14}{14} = 100\ \%$ Spezifität: $\frac{5}{13} = 38{,}4\%$

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

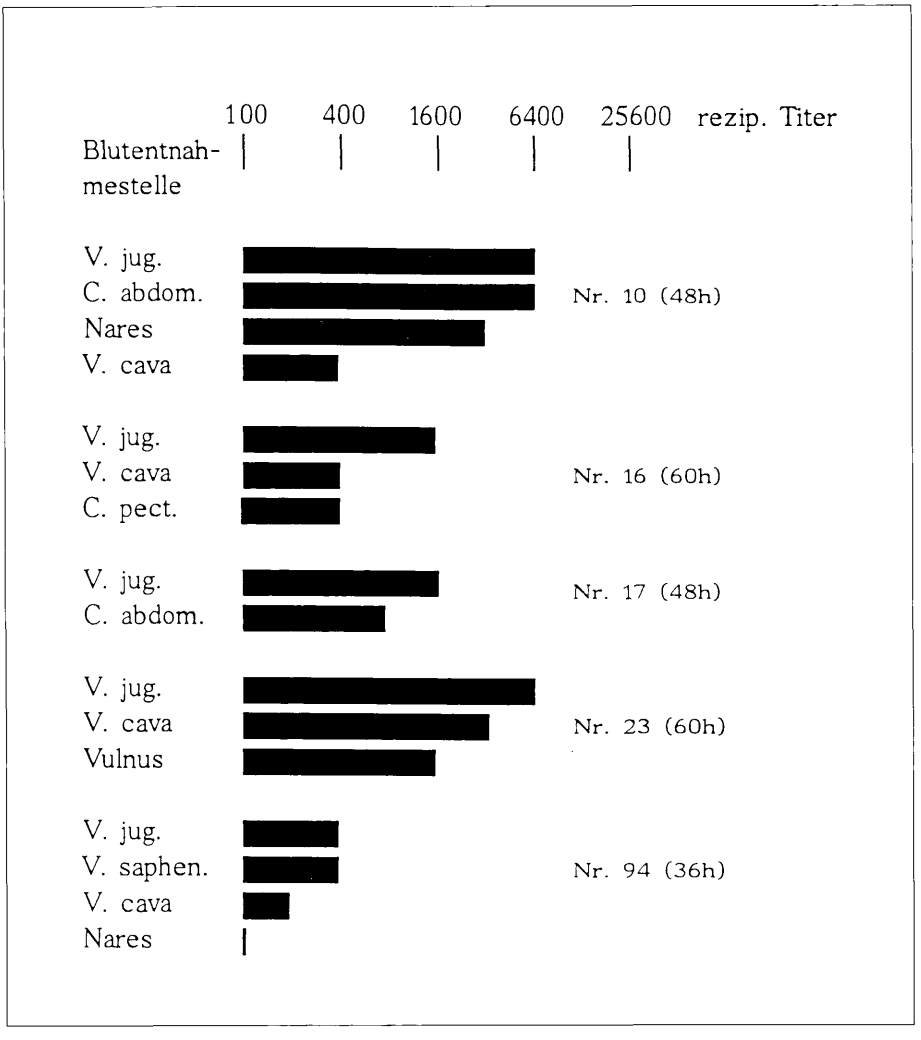

Abb. 1:

Beispiele für unterschiedliche ELISA-Titer gegen *E. multilocularis*-Antigen in Abhängigkeit von der Blutentnahmestelle am Fuchs, Nr. = lfd. Nummer des untersuchten Fuchses, in Klammern: Zeitpunkt der Blutentnahme post mortem.

3. Einfluß des Zeitpunktes der Blutabnahme auf das serologische Ergebnis

Erfolgte die Blutabnahme am Kadaver später als 24 Stunden post mortem, wurden bei einzelnen Füchsen in Abhängigkeit von der Blutentnahmestelle unterschiedliche Antikörpertiter gemessen. Abbildung 1 zeigt fünf Beispiele für unterschiedliche Titerhöhen bei relativ später Blutentnahme. Unter 41 getesteten Füchsen waren vier Füchse, bei denen durch eine Blutentnahme aus der Bauch- oder Brusthöhle kein Antikörpertiter mehr meßbar war, während das Serum aus der V. saphena bzw. V. jugularis noch einen positiven Titer aufwies. Für das serologische Testergebnis über alle 41 Füchse ergibt sich dadurch im ungünstigsten Fall eine Verringerung der Sensitivität von 85% auf 65% (Tab. 2).

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

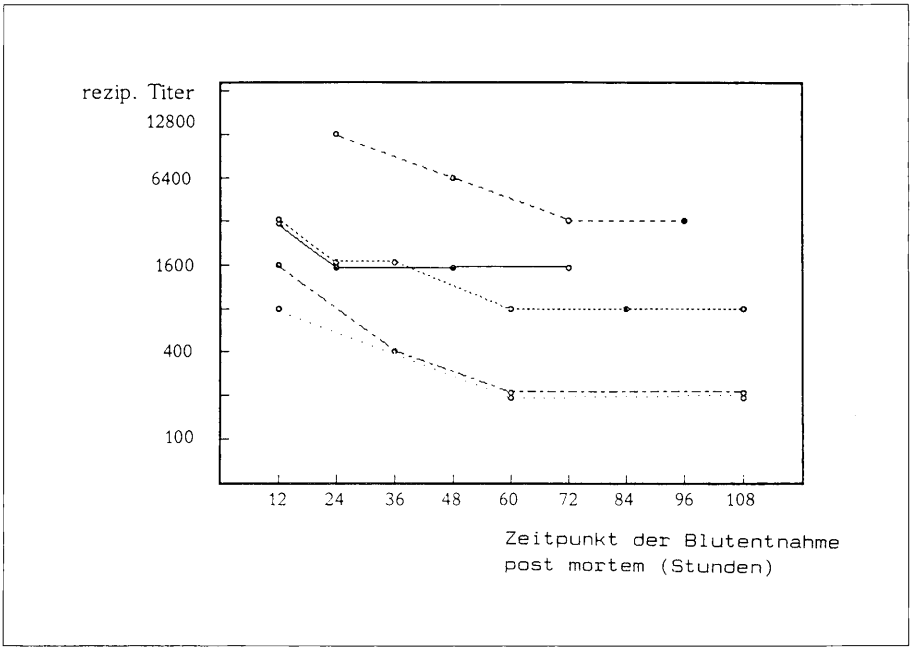

Abb. 2:

Beispiele für die Veränderungen der ELISA-Titer gegen *E. multilocularis*-Antigen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blutentnahme post mortem.

Bei den Versuchen, in denen über mehrere Tage hinweg aus ein und demselben Fuchskadaver Blut entnommen wurde, konnte nur innerhalb der ersten 24 bis 48 Stunden ein Titerabfall im ELISA festgestellt werden. Danach blieben die Titer zumindest vier Tage lang konstant (Abb. 2).

Die CAF-Elektrophorese zeigte folgendes: Je später das Blut post mortem aus dem Fuchskadaver gewonnen wird, desto kleiner ist die Albuminbande. Die α- und β-Banden verschwinden sehr bald völlig, während es im Bereich der γ-Bande zu einer Anhäufung von Protein kommt (Abb. 3).

4. Einfluß des Lebensalters des Fuchses auf das serologische Ergebnis und den Gesamtproteingehalt des Serums.

Die Seren junger Füchse und adulter Füchse lieferten im ELISA qualitativ unterschiedliche Ergebnisse. Von sechs infizierten Jungfüchsen waren nur drei (50%) seropositiv, während von 14 infizierten Altfüchsen alle im ELISA serologisch positiv reagierten. Von acht Jungfüchsen ohne *Echinococcus*-Befall waren zwei Tiere (25%) serologisch falsch-positiv, bei den Altfüchsen waren dagegen von 13 nicht infizierten Füchsen acht Tiere (62%) seropositiv. Der ELISA hatte bei den Seren der Altfüchse demnach eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 38,5%, bei den Seren der Jungfüchse dagegen eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 75% (Tab. 3).

Die Bestimmung der Gesamteiweiß-Konzentration im Serum ergab bei Jungfüchsen, deren Alter auf weniger als 16 Wochen geschätzt wurde, deutlich niedrigere Werte als bei älteren Jungfüchsen und Altfüchsen (Tab. 4).

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

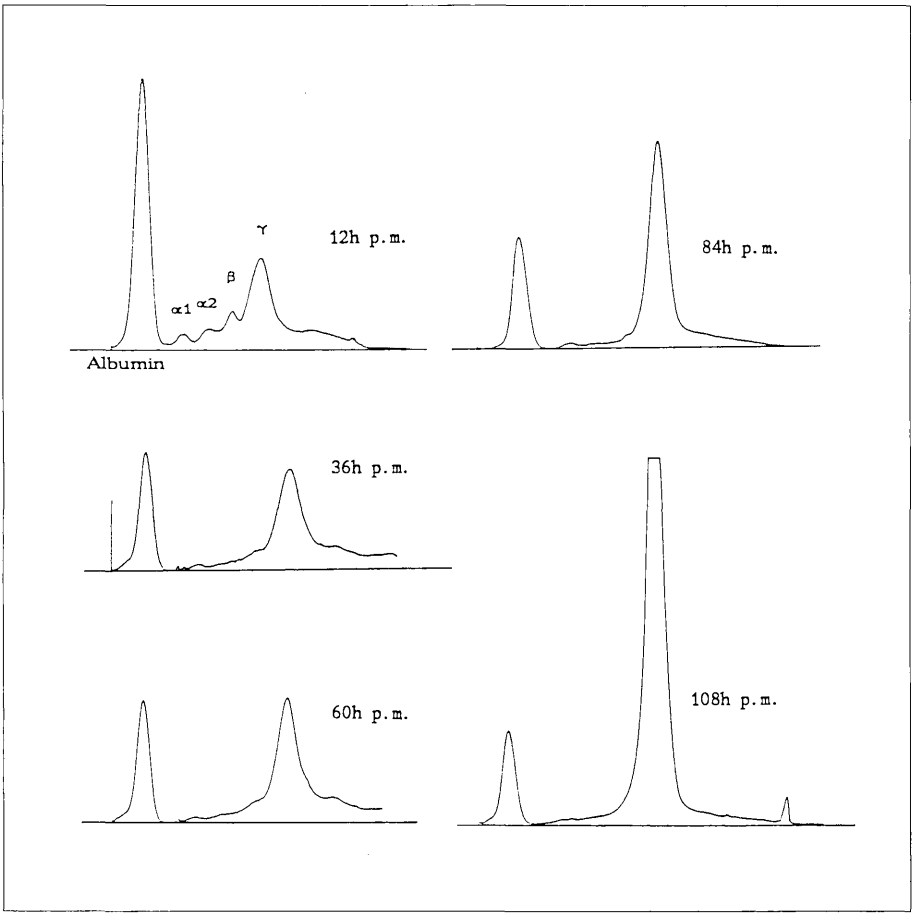

Abb. 3:

Typische Veränderungen im Proteinprogramm eines postmortal gewonnenen Fuchsserums in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blutentnahme p. m.

TABELLE 4

Gesamtproteingehalt postmortal gewonnener Fuchsseren in Abhängigkeit vom geschätzten Lebensalter der Füchse.

(Methode: Biorad Protein Assay)

Alter (Wochen)	Proteingehalt (g/100 ml)	Anzahl gem. Seren
4 - 7	10,4	1
8 - 11	10,4 - 11,4	3
12 - 15	8,6 - 9,6	3
16 - 19	14,0	1
20 - 23	14,2	1
älter	10,4 - 15,1	6

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, daß es mit Hilfe eines ELISA möglich ist, spezifische Antikörper gegen *Echinococcus multilocularis*-Antigen in Fuchskadavern nachzuweisen. Gleichzeitig wird jedoch deutlich, wie schwierig es ist, in einem serologischen Test gleichzeitig eine hinreichende Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Die Verwendung eines verhältnismäßig unspezifischen Rohantigens ergibt in diesem Testsystem eine gute Sensitivität (85%), wohingegen die geringe Spezifität (52%) nicht zufriedenstellend ist. Daß diese geringe Spezifität aber nicht allein eine Frage der Antigeneigenschaften ist, zeigen Untersuchungen von GOTTSTEIN et al. (3). Sie erreichten in einer ähnlichen Studie mit dem spezifischeren Em-2 Antigen an Füchsen aus einem Gebiet Süddeutschlands, in dem die Prävalenz von *E. multilocularis* bei über 50% lag, ebenfalls nur eine Spezifität von 47%, doch reagierten im selben Testsystem die Seren von Füchsen aus *Echinococcus*-freien Gebieten zu 94 bis 100% negativ. Man muß deshalb annehmen, daß in freilebenden Fuchspopulationen mit hoher Prävalenz von *E. multilocularis* viele Füchse leben, die nicht mehr mit diesem Bandwurm infiziert sind, aber noch einen Antikörpertiter gegen die Parasitenantigene besitzen.

Auch bei der Diagnose von *E. multilocularis* in Hunden und Dingos konnten mit serologischen Testverfahren nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt werden, wenn die Tiere aus freier Wildbahn stammten. Wurden dagegen mit verschiedenen Helminthen monospezifisch infizierte Hunde getestet, konnten mit dem ELISA eine gute Sensitivität und Spezifität erreicht werden (1, 4).

Alle serologisch falsch-negativen Proben in dieser Untersuchung stammen von Jungfüchsen. Dagegen war der Anteil falsch-positiver Seren bei den Jungfüchsen wesentlich geringer als bei den Altfüchsen. Während bei den Adulten mehr als 60% der nicht infizierten Tiere im ELISA positiv reagierten, waren dies bei den Jungtieren nur jeder vierte Fuchs. Diese Abhängigkeit der serologischen Ergebnisse vom Lebensalter der Füchse kann auf zweierlei Ursachen zurückgeführt werden. Der geringere Anteil falsch-positiver Proben unter den Seren der Jungfüchse kann man damit erklären, daß bei jungen Tieren die Wahrscheinlichkeit einer bereits überstandenen *Echinococcus*-Infektion viel geringer ist. Man wird also seltener „immunologische Narben" vorfinden als bei adulten Füchsen. Als Ursache für den höheren Anteil falsch-negativer Seren bei den Jungfüchsen kann man die noch unvollständige Immunkompetenz annehmen, d. h. auf einen Antigenstimulus werden von einem jungen Fuchs weniger Antikörper gebildet als von einem ausgewachsenen Fuchs. Diese Interpretation wird auch von der Tatsache unterstützt, daß befallene Jungfüchse durchschnittlich einen niedrigeren Antikörpertiter aufweisen als Altfüchse. Bei Hunden und Farmfüchsen besteht ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen dem „Alter" des Serums und dem Serumeiweißspiegel, insbesondere des γ-Globulinspiegels (6, 11). Obwohl die gemessenen Gesamteiweiß-Konzentrationen in dieser Untersuchung — wahrscheinlich aufgrund postmortaler Veränderung — in einem unphysiologisch hohen Bereich liegen, konnte noch eine Abhängigkeit vom Lebensalter der Füchse festgestellt werden (Tab. 4).

Eine quantitative Bestimmung der γ-Globulinfraktionen im Serum unterschiedlich lang gelagerter Fuchskadaver war aufgrund der beschriebenen Anhäufung von Protein im Bereich der γ-Bande nicht möglich. Wie eine vergleichende Analyse mit bovinem Hämoglobin ergab, handelt es sich dabei sehr wahrscheinlich um freies Hämoglobin bzw. dessen Abbauprodukte. Die CAF-Elektrophorese stellt jedoch eine einfache Möglichkeit dar, an Hand der charakteristischen Veränderungen der Proteinfraktionen das Alter post mortem einer unbekannten Serumprobe abzuschätzen.

Die festgestellte Abhängigkeit der serologischen Ergebnisse vom Zeitpunkt der Blutentnahme post mortem und von der Entnahmestelle spielt insgesamt zwar eine untergeordnete Rolle, sollte aber im Hinblick auf eine Optimierung und Standardisierung

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

serologischer Methoden berücksichtigt werden. Wegen der Vielzahl möglicher Kreuzreaktionen mit Antigenen anderer Darmhelminthen des Fuchses sollten im Anschluß an einen Screening-ELISA positive Seren einem zusätzlichen serologischen Test, z. B. einem Westernblot, unterzogen werden, in welchem die Spezifität der Antikörper genauer untersucht werden kann.

Zusammenfassung

Ein ELISA mit somatischem Protoscolex-Antigen wurde auf seine Anwendbarkeit für ein Screening von Fuchsseren auf *Echinococcus multilocularis*-Antikörper untersucht. Von 41 untersuchten Füchsen waren 27 (65%) serologisch positiv. Davon waren zehn Seren (24%) falsch-positiv, drei Seren (7%) waren falsch-negativ. Es konnte gezeigt werden, daß die Stelle und der Zeitpunkt der Blutentnahme post mortem einen Einfluß auf die Sensitivität des ELISA haben können. Das Lebensalter der Füchse beeinflußt sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des Testsystems. Die Seren junger Füchse reagieren im ELISA häufiger falsch-negativ, aber seltener falsch-positiv, als die Seren adulter Füchse. Es wird vorgeschlagen, im ELISA positiv reagierende Seren in einem anschließenden Westernblot auf Spezifität der Antikörper näher zu untersuchen.

Schlüsselwörter

Echinococcus multilocularis, Fuchs, Serologie, ELISA.

Summary

Serological studies on *Echinococcus multilocularis* in the definitive host

We studied the reliability of an ELISA using protoscolex somatic antigen as a screening method for detection of specific antibodies against *Echinococcus multilocularis* in wild foxes. Serological positive reactions were found in 27 of 41 (65%) fox sera. Ten sera (24%) were false-positive and three sera (7%) showed a false-negative reaction. The site and the point of time of blood collection may have an effect on the sensitivity and the specificity of the test: sera of young foxes were false-negative in a higher portion but less often false-positive than sera of adult foxes. It is proposed to test positive sera in an additional serological test like westernblot to specify the kind of antibodies.

Key words

Echinococcus multilocularis, red fox, serology, ELISA.

Literatur

1. GASSER, R. B., LIGHTOWLERS, M. W., OBENDORF, D. L., JENKINS, D. L., RICKARD, M. D. (1988): Evaluation of a serological test system for the diagnosis of natural Echinococcus granulosus infection in dogs using E. granulosus protoscolex and oncosphere antigens. Aust. vet. J. 65, 369-373.
2. GOTTSTEIN, B., ECKERT, J., FEY, H. (1983): Serological differentiation between Echinococcus granulosus and Echinococcus multilocularis infection in man. Z. Parasitenkd. 69, 347-356.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

3. GOTTSTEIN, B., ECKERT, J., DEPLAZES, P., MÜLLER, B., SCHOTT, E. (1989):
Serological and parasitological examinations of fox population for Echinococcus multilocularis infections.
WHO informal consultation on alveolar echinococcosis, Hohenheim FRG, 14. - 16. Aug. 1989.

4. JENKINS, D. J., GASSER, R. B., ZEYHLE, E., ROMIG, T., MAC PHERSON, C. N. L. (1990):
Assessment of a serological test for the detection of Echinococcus granulosus infection in dogs in Kenya.
Acta Tropica 4a7, 245-248.

5. KOHN, J. (1964):
Zur Technik der Celluloseacetat-Elektrophorese.
Ärztl. Lab. 10, 223-248 u. 269-278.

6. MCKELVIE, D. H. (1970):
Blood serum chemistry.
In: The beagle as an experimental dog (A. C. Andersen, L. S. Good, eds.).
Iowa State University press, Ames, Iowa, USA.

7. SCHELLING, U., FRANK, W. (1990):
Fox baiting with praziquantel in southern Germany.
Second international symposion on echinococcosis, Zürich, 16. - 17. Aug. 1990.

8. SCHELLING, U., FRANK, W. (1990):
Versuche zur Eliminierung des Echinococcus multilocularis im Endwirt mit Hilfe von Anthelminthika-präparierter Ködern.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 12, 185-192.

9. THORNER, R. M., REMEIN, Q. R. (1961):
Principles and procedures in the evaluation of screening for disease.
Pub. Health Monogr. 67, 1123-1124.

10. WAGENKNECHT, E. (1979):
Altersbestimmung des erlegten Wildes.
Neumann-Neudamm Verlag, Berlin.

11. WENZEL, U. D., BERESTOV, V. A. (1987):
Pelztierkrankheiten Nerz und Fuchs.
Schober Verlag, Hengersberg.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. Thomas Pfister

Raiffeisenstraße 47
D-6710 Frankenthal · Bundesrepublik Deutschland

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

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: 1991

Band/Volume: 13

Autor(en)/Author(s): Pfister Thomas, Schad V., Frank Werner

Artikel/Article: Untersuchungen zur Serologie von Echinococcus multilocularis im Endwirt. 31-40