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

Mitt. Österr. Ges.
Tropenmed. Parasitol. 15 (1993)
129 - 134

Abteilung für Medizinische Parasitologie (Leiter: Univ. Prof. Dr. H. Aspöck)
Klinisches Institut für Hygiene (Suppl. Vorstand: Univ. Prof. Dr. M. Rotter) der Universität Wien

Optimierung serologischer Befunde durch die Verwendung von Milchpulver

H. Auer, H. Aspöck

Einleitung

Der zu Beginn der 70er Jahre von ENGVALL und PERLMANN (9) entwickelte und vor allem von VOLLER et al. (14, 15) in die Parasitologie eingeführte "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA; Enzymimmuntest) stellt heute eine Standardmethode dar, die weltweit sowohl in der parasitologischen Laboratoriumsdiagnostik als auch in der seroepidemiologischen Forschung breite Anwendung findet.

Auch in unserem Institut setzen wir seit vielen Jahren Enzymimmuntests zum Antikörper- und Antigennachweis ein (1), wobei wir – in Anlehnung an die meisten während der ersten Hälfte der 80er Jahre erschienenen parasitologisch orientierten Arbeiten, die sich mit dem Antikörper- und/oder Antigennachweis mittels ELISA befaßten –, in allen unseren Enzymimmuntests Rinderalbumin als Blockierungsprotein (blocker, blocking agent) zur Verhinderung unspezifischer Bindungen von Serumproteinen an das Plastikmaterial der Mikrotiterplatten einsetzten.

Im Verlauf der letzten Jahre hat sich nun gezeigt, daß insbesondere im ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *E. multilocularis*-Antigene (Em-ELISA) (2, 4, 5, 6) regelmäßig (in etwa 1,5% der Fälle) positive Reaktionen auftreten, obwohl in diesen Fällen klinisch und/oder sonographisch/computertomographisch keinerlei Anhaltspunkt für das Vorliegen einer alveolären Echinokokkose (AE) besteht.

Im Zuge einer während der letzten Monate durchgeführten generellen Überprüfung des Em-ELISA sind wir nach systematischer Fehlersuche bald auf die Ursache für das gelegentliche Auftreten von falsch-positiven Reaktionen in unserem Em-ELISA gestoßen: Die Verwendung von Rinderalbumin in einem Enzymimmuntest erwies sich – dies wurde von mehreren Autoren anderer Fachrichtungen bereits vor einigen Jahren beobachtet (7, 8, 10, 11, 12, 13) – in zweifacher Hinsicht als Ursache für falsch-positive Reaktionen:

1. Rinderalbumin kann v. a. aufgrund seiner sehr homogenen biochemischen Zusammensetzung die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatten nicht völlig abdecken und so unspezifische Bindungen von humanen Serumproteinen an die Plastikwände der Mikrotiterplatten nicht völlig verhindern.

2. Eine Reihe von Menschen hat im Serum gegen Rinderproteine gerichtete Antikörper, die im ELISA nicht mit dem vorgegebenen *(E. multilocularis-)* Antigen, sondern mit dem Rinderalbumin selbst oder mit anderen in der Albuminfraktion befindlichen Serumproteinen reagieren können.

Wir haben deshalb im Frühjahr 1992 eine erste orientierende Vergleichsstudie durchgeführt, im Rahmen derer unser „herkömmlicher" Em-ELISA unter Verwendung von Rinderalbumin (Em-ELISA/R) und ein „neuer" Em-ELISA unter Verwendung von Milchpulver (Em-ELISA/M) – Milchpulver gilt aufgrund seiner sehr heterogenen biochemischen Zusammensetzung als besonders effizienter "blocker" – vergleichend getestet und hinsichtlich Sensitivität und Spezifität überprüft wurden. Über die Ergebnisse dieser Vergleichsstudie soll im folgenden berichtet werden.

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

Tabelle 1:

Ergebnisse der im Em-ELISA/M (Milchpulver) und im Em-ELISA/R (Rinderalbumin) getesteten Seren von Patienten mit gesicherter alveolärer (AE) oder zystischer Echinokokkose (ZE). Angabe der Testergebnisse in Antikörpereinheiten (AKE; laborinternes Standardserum hat 100 AKE; Seren unter 30 AKE sind als negativ zu beurteilen; siehe Material und Methoden).

Nr.	Patient	Krankheit	Em-ELISA/M	Em-ELISA/R
1	F. M.	AE	> 100	> 100
2	H. M.	AE	> 100	> 100
3	H. S.	AE	> 100	> 100
4	M. I.	AE	> 100	> 100
5	A. Z.	AE	> 100	> 100
6	K. W.	AE	95	84
7	J. G.	AE	65	53
8	T. T.	AE	54	45
9	Z. S.	AE	39	47
10	M. M.	AE	31	36
11	K. F.	AE	30	30
12	B. M.	ZE	> 100	> 100
13	A. H.	ZE	> 100	> 100
14	F. G.	ZE	> 100	> 100
15	M. K.	ZE	> 100	85
16	M. H.	ZE	92	100
17	M. L.	ZE	72	65
18	G. M.	ZE	72	92
19	J. B.	ZE	61	69
20	G. M.	ZE	58	66
21	N. S.	ZE	55	65
22	E. K.	ZE	48	41
23	G. D.	ZE	44	46
24	P. H.	ZE	42	47
25	R. K.	ZE	37	52
26	N. S.	ZE	35	44
27	S. C.	ZE	34	34
28	I. A.	ZE	34	37
29	N. S.	ZE	33	43
30	G. H.	ZE	< 30	42
31	A. A.	ZE	< 30	39
32	S. A.	ZE	< 30	31
33	H. H.	ZE	< 30	< 30
34	F. H.	ZE	< 30	< 30
35	S. D.	ZE	< 30	< 30
36	G. S.	ZE	< 30	< 30

Material und Methoden

1. Seren: Siehe Tabelle 1 und 2

2. Tests:

2.1 Em-ELISA /M:

Antigen: Rohextrakt aus Metazestodengewebe von *Echinococcus multilocularis;* Proteingehalt: 1,48 mg/ml; Verdünnungspuffer: Karbonat/Bikarbonatpuffer (pH 9,6).

Seren: Verdünnungspuffer: PBS + 0,05% Tween 20 + 5% Milchpulver („Fixmilch Instant", sprühgetrocknet, Dauermilchwerk Gmünd; Fettanteil: < 1%).

Konjugat: Peroxidase-konjugiertes Antihuman-IgG (Jackson Immunoresearch, USA); Konjugatverdünnung: 1 : 6.000; Verdünnungspuffer: PBS + 0,05% Tween 20 + 5% Milchpulver.

Substrat: H_2O_2 + 5-Aminosalicylsäure.

Testprozedur:

- Anlagerung des Antigens bei 4° C (ca. 16 Stunden);
- Waschen mit Leitungswasser + 0,05% Tween 20;
- Absättigen der Mikrotiterplatte mit PBS + 0,05% Tween 20 + 5% Milchpulver (15 Minuten bei 37° C);
- Eintropfen der Seren in die Mikrotiterplatte und Durchverdünnen (1 : 25, 1 : 50 . . . 1 : 3.200), Inkubation bei 37° C (1 Stunde);
- Waschen mit Leitungswasser + 0,05% Tween 20;
- Eintropfen der Konjugatverdünnung, Inkubation bei 37° C (1 Stunde);
- Waschen mit Leitungswasser + 0,05% Tween 20;
- Eintropfen des Substrats in die Mikrotiterplatten, Inkubation bei Zimmertemperatur (1 Stunde);
- Photometrisches Ablesen bei 450 nm;
- Die Auswertung erfolgt nach der Methode von ZAHNER et al. (16), wobei die gemessenen Extinktionen der Testseren und der positiven und negativen Kontrolle in Relation (Formel siehe unten) gesetzt werden. Nach dieser Formel wird ein Index berechnet, der in Antikörpereinheiten/AKE ausgedrückt wird. Das laborinterne Kontrollserum weist einen Index von 100 AKE auf. Seren mit einem Index < 30 AKE gelten als negativ, Seren mit einem Index > 30 AKE sind positiv, Seren mit > 70 AKE gelten als hochpositiv.

$$\frac{Ext._{Testserum} - Ext._{Neg.\ Kontrolle}}{Ext._{Pos.\ Kontrolle} - Ext._{Neg.\ Kontrolle}} \times 100 = \text{INDEX (in AKE)}$$

2.2 Em-ELISA/R: Testreagenzien und Testdurchführung: wie oben.

Ausnahme:
- Puffer zum Abdecken der Mikrotiterplatten und Serumverdünnungspuffer: PBS + 0,05% Tween 20 + 1% Rinderalbumin (Signal);
- Verdünnungspuffer für Konjugat: PBS + 0,05% Tween 20 + 3% Rinderalbumin.

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

Tabelle 2:

Ergebnisse der im Em-ELISA/M und im Em-ELISA/R getesteten Seren von Pateinten mit gesicherter Fasziolose, Zystizerkose, Toxokarose, Bilharziose, mit AIDS, Röteln, Rheumafaktoren sowie Seren von Tropenrückkehrern (z. T. mit erhöhtem IgE-Spiegel und Bluteosinophilie) und Seren von gesunden Schwangeren (Negativkontrolle).

Seren von Patienten mit	Zahl der getesteten Seren	Em-ELISA/M pos. / neg.	Em-ELISA/R pos. / neg.
Fasziolose	4	1 / 3	2 / 2
Zystizerkose	4	2 / 2	3 / 1
Toxokarose	3	1 / 2	1 / 2
Bilharziose	2	0 / 2	2 / 2
AIDS	21	0 / 21	7 / 14
Röteln	9	0 / 9	0 / 9
Rheumafaktor	9	0 / 9	0 / 9
erhöhtem IgE, Eosinophilie (nach Tropenaufenthalt)	20	0 / 20	8 / 12
Seren von gesunden Schwangeren	9	0 / 9	0 / 9
Insgesamt	81	4 / 77	23 / 58

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse dieser Vergleichsuntersuchung sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen; sie lassen sich folgendermaßen zusammenfassen und interpretieren:

1. Sensitivität:

Alle von uns getesteten Seren von Patienten mit gesicherter alveolärer Echinokokkose wurden sowohl im „herkömmlichen" Em-ELISA/R als auch im Em-ELISA/M eindeutig als positiv „erkannt". Wir können also davon ausgehen, daß wir auch mit dem Em-ELISA/M eine Sensitivität von etwa 100% erreichen.

2. Spezifität:

2.1 Die Seren von Patienten mit zystischer Echinokokkose (ZE) reagierten im „Milchpulver-Em-ELISA" etwas seltener positiv (18 von 25 ZE-Seren) als im Em-ELISA/R (21 von 25 ZE-Seren). Aufgrund der Tatsache, daß in unserem Laboratorium *E. granulosus*-Infektionen des Menschen ohnehin nicht mittels Em-ELISA sondern mittels eines indirekten Hämagglutinationstests unter Verwendung von homologem *E. granulosus*-Antigen (Eg-IHA) diagnostiziert werden, erscheint die verminderte Sensitivität des Em-ELISA/M für *E. granulosus*-Infektionen des Menschen kein großer Nachteil, sondern — im Gegenteil — sogar von Vorteil zu sein, weil es so leichter möglich ist, eine (weitgehende) serologische Differenzierung zwischen AE und ZE bereits auf dem Niveau der Basistests (Em-ELISA, EgIHA) — und nicht erst auf der Basis von aufwendigeren Westernblot-Verfahren (3) —, vornehmen zu können.

2.2 Obwohl in dieser Vergleichsstudie nur eine geringe Zahl von Seren von Patienten mit anderen Parasitosen gestestet wurden — es wurden nur Seren von Fasziolose-, Bilharziose-, Zystizerkose- oder Toxokarose-Patienten in dieser Studie miteinbezogen, weil diese im bislang verwendeten Em-ELISA/R sehr häufig vor allem aufgrund des verwendeten Rohantigens positive Reaktionen zeigten (5) —, konnte gezeigt werden, daß sich der Anteil falsch-positiver Befunde durch die Verwendung von Milchpulver im Em-ELISA weiter vermindern ließ.

2.3 Besonders effizient erwies sich der Em-ELISA/M beim Testen von Seren von Tropenrückkehrern (z. T. mit erhöhtem IgE-Spiegel und/oder Bluteosinophilie); alle 20 Seren dieses Probanden-/Krankenkollektivs waren im Em-ELISA negativ, während im Em-ELISA/R 8 Seren (schwach) positive Reaktionen zeigten.

2.4 Völlig eliminiert werden konnten im Em-ELISA/M falsch-positive Befunde beim Austesten von Seren von AIDS-Patienten. Insgesamt wurden 21 „AIDS-Seren" vergleichend im Em-ELISA/R und im Em-ELISA/M getestet. Während im Em-ELISA/R 7 Seren (schwach) positive Reaktionen zeigten, erwiesen sich im Em-ELISA/M alle 21 AIDS-Seren — keiner der 21 AIDS-Patienten zeigte klinisch oder radiologisch/sonographisch/computertomographisch Anzeichen einer alveolären Echinokokkose — als eindeutig negativ.

2.5 Alle 9 Seren von Röteln-Patienten und von Personen mit Rheumafaktoren reagierten in beiden Em-ELISAs negativ.

Die Ergebnisse unserer Vergleichsstudie zeigen, daß die Verwendung von Milchpulver anstelle von Rinderalbumin als Blockierungsprotein im Em-ELISA tatsächlich eine weitere Verbesserung der in diesem Test erhobenen Befunde mit sich bringt, da einerseits die Sensitivität des Em-ELISA beibehalten werden konnte, andererseits unspezifische Reaktionen — seien

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

sie bedingt durch unspezifische Bindungen von Serumproteinen an das Plastikmaterial der Mikrotiterplatten oder durch Anti-Rinderalbumin-Antikörper in menschlichen Seren — weitestgehend ausgeschalten werden. Zuletzt sei noch auf ein nicht unwichtiges Detail am Rande aufmerksam gemacht, das uns zusätzlich veranlaßt hat, Milchpulver als "blocking agent" zu verwenden, nämlich der Kostenvergleich: Während 1 kg fettarmes Milchpulver (im Supermarkt) für etwa öS 220,— zu bekommen ist, muß für 1 kg Rinderalbumin etwa öS 15.000,— bezahlt werden.

Zusammenfassung In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse einer Vergleichsstudie mitgeteilt, im Rahmen derer zwei Enzymimmuntests (ELISA) mit *Echinococcus multilocularis*-Antigen, einmal unter Verwendung von Rinderalbumin (Em-ELISA/R), einmal unter Verwendung von Milchpulver (Em-ELISA/M) als Blockierungsprotein, hinsichtlich Sensitivität und Spezifität getestet wurden. Diese Vergleichsuntersuchung zeigte, daß der „Milchpulver Em-ELISA" gleich hohe Sensitivität wie der „Rinderalbumin Em-ELISA" aufweist, daß jedoch der Anteil falsch-positiver Ergebnisse durch die Verwendung von Milchpulver auf ein Minimum reduziert wird. Darüber hinaus ist der finanzielle Aufwand beim „Milchpulver Em-ELISA" etwa 70mal niedriger als beim „Rinderalbumin Em-ELISA".

Schlüsselwörter *Echinococcus multilocularis,* alveoläre Echinokokkose, ELISA, Rinderalbumin, Milchpulver.

Summary

Improvement of serological test results by means of non-fat dry milk

The present paper summarizes the results of a study in which the sensitivity and specificity of two enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Echinococcus multilocularis* antigens were compared. Whereas bovine serum albumen was used as blocking agent in one test (Em-ELISA/R), non-fat dry milk was used in the other (Em-ELISA/M). The study revealed that the sensitivity of Em-ELISA/M was as high as of Em-ELISA/R; the use of non-fat dry milk in Em-ELISA, however, reduced the occurrence of false-positive test results considerably. Additionally, milk powder is 70 times cheaper than bovine serum albumen.

Key words *Echinococcus multilocularis,* alveolar echinococcosis, ELISA, bovine serum albumen, non-fat dry milk.

Danksagung Unserer Mitarbeiterin, Frau Joanna Will, sei für die sorgfältige Durchführung dieser Vergleichsstudie herzlichst gedankt.

Literatur

1. ASPÖCK, H. (1992):
Tabellen zur Laboratoriumsdiagnostik von Parasiten.
Hygiene Aktuell 2, 21-42.

2. AUER, H., ASPÖCK, H. (1989):
Serodiagnostik der alveolären Echinokokkose mittels eines Antigens aus in vitro-gehaltenen Protoscolices von Echinococcus multilocularis.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 11, 13-18.

3. 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, 416-423.

4. AUER, H., PICHER, O., ASPÖCK, H. (1986):
Erfahrungen bei der Serodiagnostik der Echinokokkosen mittels ELISA.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8, 99-103.

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

5. 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.

6. AUER, H., PICHER, O., HERMENTIN, K., ASPÖCK, H. (1987):
Serodiagnose der Echinokokkosen — Erfahrungen in Österreich.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 9, 73-77.

7. DISE, T., BRUNELL, P. A. (1987):
Anti-bovine antibody in human sera as a cause of nonspecificity in enzyme immunoassay.
J. Clin. Microbiol. 25, 987-990.

8. DREXLER, G., EICHINGER, A., WOLF, C., SIEGHART, W. (1986):
A rapid and simple method for efficient coating of microtiter plates using low amounts of antigen in the present of detergent.
J. Immunol. Methods 95, 117-122.

9. ENGVALL, E., PERLMANN, P. (1971):
ELISA. Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochemistry 8, 871-874.

10. KENNA, J. G., MAJOR, G. N., WILLIAMS, R. S. (1985):
Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbent assay.
J. Immunol. Methods 85, 409-419.

11. SCHONHEYDER, H., ANDERSEN, P. (1984):
Effects of bovine serum albumin on antibody determination by the enzyme-linked immunosorbent assay.
J. Immunol. Methods 72, 251-259.

12. SPENCER, T. L. (1988):
Blockers, diluents and anomalous reactions in ELISA.
In: ELISA technology in diagnosis and research. Burgess G. E. ed., Cook, J.
University North Queensland, Townsville, Australia, 51-60.

13. VOGT, R. F., PHILLIPS, D. L., HENDERSON, L. O., WHITFIELD, W., SPIERTO, F. W. (1987):
Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates.
J. Immunol. Methods 101, 43-50.

14. VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D. E. (1976):
Enzyme immunoassays for parasitic diseases.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 70, 98-106.

15. VOLLER, A., BIDWELL, D. E., BARTLETT, A. (1979):
The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications.
London, 1-125.

16. ZAHNER, H., FAILING, K., KRAUSS, K., ARENS, M., HAMMES, H. (1981):
Ein Beitrag zur stufenlosen Antikörperbestimmung mit dem enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Immun. Infekt. 9, 33-39.

Korrespondenzadresse: Univ. Doz. Dr. Herbert Auer
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

©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: 1993

Band/Volume: 15

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

Artikel/Article: Optimierung serologischer Befunde durch die Verwendung von Milchpulver. 129-134