

Differenzierung spezifischer Antikörper der Subklassen IgG 1 bis IgG 4 bei Patienten mit alveolärer Echinokokkose

Barbara Bauder, H. Auer, H. Aspöck

Einleitung Die alveoläre Echinokokkose (AE), verursacht durch Metazestoden (Finnen) von *Echinococcus multilocularis* („Fünfgliedriger Fuchsbandwurm“, Em), gilt als die gefährlichste Helminthozoonose Mitteleuropas.

Das Hauptverbreitungsgebiet des Parasiten in Mitteleuropa umfaßt neben Frankreich, Italien, der Schweiz und Süddeutschland auch Österreich, wo es ein West-Ost bzw. Süd-Nordgefälle der Infektionshäufigkeit zu geben scheint (4); betroffen sind vor allem Vorarlberg, Tirol, Salzburg, Kärnten und die Steiermark, allerdings konnte in den letzten zehn Jahren auch ein Herd in Niederösterreich festgestellt werden (3). Grundsätzlich ist anzunehmen, daß das gesamte Bundesgebiet als Endemieregion gilt, da *Echinococcus multilocularis* in Füchsen in allen Bundesländern nachgewiesen werden konnte (19, 20).

Der biologische Zyklus von *Echinococcus multilocularis* ist mit einem Generations- und Wirtswechsel verbunden, der zwischen Karnivoren – in Mitteleuropa in erster Linie *Vulpes vulpes*/Rotfuchs – als Endwirten und Herbivoren – in Mitteleuropa sind dies vor allem *Microtus arvalis*/Feldmaus, *Arvicola terrestris*/Schermaus und *Ondatra zibethica*/Bisamratte – als Zwischenwirten abläuft (1, 12, 16, 25). Auch der Mensch kann in diesen Zyklus in Form eines Fehl-Zwischenwirtes einbezogen werden, wenn er sich durch die orale Aufnahme von larvenhaltigen Fuchsbandwurmeiern infiziert.

Aus den Eiern schlüpfen im Darmtrakt Sechshakenlarven, die die Darmwand durchdringen und auf hämatogenem Weg in die Leber gelangen, wo sie sich zu einem tumorähnlichen, proliferativ-destruierend wachsenden Metazestoden entwickeln. Eine krebsähnliche Metastasierung durch die Abspaltung einzelner Parasitenzellen kann zur sekundären Etablierung in anderen Organen (Lunge, Milz, Niere, ZNS) auf lymphogenem-hämatogenem Weg führen und letztlich auch das Bild einer generalisierten alveolären Echinokokkose hervorrufen.

Da es für die AE kein klinisches Diagnostikum gibt und auch die allgemeine Laborchemie differentialdiagnostisch nur wenig ergiebig ist (Transaminasen, γ GT, alkalische Phosphatase, Bilirubin und BSG können erhöht sein), stützt sich die Diagnostik einerseits auf die bildgebenden Verfahren, mit denen Organlokalisation und Ausdehnung der parasitenbedingten Läsionen festgestellt werden können, andererseits auf parasitologisch-serologische Untersuchungen.

Heute beruht die Serodiagnostik der Fuchsbandwurmkrankheit auf dem Einsatz von Enzymimmuntests und Western Blot-Verfahren unter Verwendung unterschiedlicher *Echinococcus multilocularis*-Antigenpräparationen, was sowohl eine hohe Sensitivität als auch eine hohe Spezifität bedingt.

Nun stehen zwar hochsensitive und -spezifische Tests mit „Trefferquoten“ bis an die 100% für die Diagnostik der alveolären Echinokokkose zur Verfügung und gestatten so die Aufdeckung beinahe jeder Infektion, sie alle beruhen aber auf dem Nachweis spezifischer Antikörper der IgG-Gesamtfraktion. Da IgG (gesamt)-Antikörper als sogenannte „späte“ Immunglobuline als Indikatoren für schon länger bestehende Infektionen gelten und ihr Spiegel in den Patienten lange unverändert hoch bleibt, sind die oben angeführten Tests nur begrenzt einsetzbar, was die Therapieüberwachung betrifft – sie lassen kaum Aussagen über Erfolg oder Mißerfolg der durchgeführten operativen und/oder medikamentösen Maßnahmen zu.

Wir haben uns nun die Aufgabe gestellt, zu klären, ob unter Verwendung einfacher und auch bereits etablierter Tests zum Nachweis *Echinococcus multilocularis*-spezifischer Antikörper der IgG-Subklassen eine serologische Kontrolle des Krankheitsverlaufes bzw. des Erfolges der therapeutischen Maßnahmen möglich ist.

Im Rahmen dieser nun vorliegenden Arbeit wurden Seren von 29 Patienten mit verifiziertem *Echinococcus multilocularis*-Befall (Diagnose abgesichert durch entsprechende Befunde in den bildgebenden Verfahren, sowie durch histologische und serologische Untersuchungen) auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern der IgG-Gesamtfraktion und der Subklassen IgG1 bis 4 mittels Enzymimmuntests und Western Blot-Verfahren überprüft. Die Blutproben waren in unterschiedlichen Zeitabständen im Verlauf der Krankheit bzw. einer operativen und/oder medikamentösen Therapie abgenommen worden.

Idealerweise sollte ein Muster in der Antikörperantwort gefunden werden, das es ermöglicht, in der Zusammenschau mit klinischen Daten (besonders aus Befunden der bildgebenden Verfahren sowie der Laborchemie) eine Aussage über den Zustand bzw. den Krankheitsverlauf des jeweiligen Patienten zu machen.

Material und Methoden

Patienten und Seren

Für diese Untersuchung standen insgesamt 110 Seren von 29 Patienten mit klinisch verifizierter alveolärer Echinokokkose zur Verfügung. Die Blutproben waren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Diagnosestellung und in unterschiedlichen Zeitabständen während der operativen und/oder medikamentösen Therapie abgenommen worden, die Seren lagerten seit der serologischen Erstuntersuchung bei -20°C in der Serothek der Abteilung für Medizinische Parasitologie des Klinischen Institutes für Hygiene der Universität Wien.

Bei den 29 Patienten handelt es sich um 15 Männer und 14 Frauen, weitere Daten zu Person und Klinik der Patienten sind Tabelle 1 zu entnehmen.

In den meisten Fällen (69%) war nur die Leber von *Echinococcus multilocularis* befallen, bei einigen Patienten (27,5%) bot sich allerdings das Erscheinungsbild einer multiorganischen alveolären Echinokokkose; in einem Fall (3,5%) lag eine singuläre Infektion der Lunge vor (Tab. 1).

Enzymimmuntest (ELISA) zum Nachweis Em-spezifischer Antikörper der IgG-Gesamtfraktion sowie der Subfraktionen IgG1 bis 4

Der hier durchgeführte Test wurde zu Beginn der 80er Jahre entwickelt und im Routinelaboratorium etabliert (7); er wird seither mit kleinen Änderungen eingesetzt (5) und gelangte in dieser Studie mit Ausnahme der eingesetzten Konjugat- (Tab. 2) bzw. Serumverdünnungen (1 : 50) sowie der Inkubationszeit der IgG-Subklassen-Konjugate (1,5 h bei 37°C am Wasserbad) unverändert zur Anwendung (9).

Western Blot-Verfahren zum Nachweis Em-spezifischer Antikörper der IgG-Gesamtfraktion sowie der Subfraktionen IgG1 bis 4

Unter Verwendung von in vitro-produziertem Antigen (2, 6) wurde ein Western Blot-Verfahren zum Nachweis *Echinococcus multilocularis*-spezifischer IgG-Antikörper im Echinokokkoselaboratorium im Jahr 1984 etabliert, das seither zur speziesspezifischen Diagnose von Fuchs- und Hundebandwurmkrankheit eingesetzt wird (3). Der Test wurde für diese Studie mit Ausnahme der eingesetzten Konjugatverdünnungen (Tab. 2) bzw. der Inkubationszeit der IgG-Subklassen-Konjugate (mind. 12 h bei Zimmertemperatur) unverändert eingesetzt (9).

Patient	Geschl.	Alter bei Diagnosestellung	Organlokalisation des Parasiten	Operation	Antihelminthikum A = Albendazol M = Mebendazol
1	M	28	Leber	ja (PE)	M
2	W	43	Leber	ja	A
3	M	31	Leber, Magen, Pankreas	ja	M, A
4	M	51	Leber	ja	M
5	M	57	Lunge	ja	A
6	M	62	Leber	ja (PE)	A
7	W	50	Leber	ja	A
8	M	24	Leber, Nebenniere	ja	A
9	W	61	Leber	nein	keines
10	W	33	Leber, Lunge	ja	M, A
11	W	31	Leber, Lunge, ZNS	nein	M
12	M	50	Leber	ja	A
13	W	35	Leber	ja	M
14	W	54	Leber, Haut	ja	M
15	W	30	Leber	ja	M bis Sept. 91, dann A
16	M	68	Leber, Lunge, Haut	ja	A
17	W	67	Leber	ja	A
18	W	71	Leber, Bauchwand	ja	keines
19	M	38	Leber, Niere	ja	A
20	W	73	Leber	nein	A
21	M	59	Leber, Lunge, Pleura	nein	A
22	M	53	Leber	ja	A
23	W	53	Leber	ja	M
24	W	62	Leber	ja (PE)	M
25	M	58	Leber	ja	keines
26	W	60	Leber	ja	M
27	M	31	Leber	ja	M
28	M	50	Leber	ja	A
29	M	30	Leber	ja (PE)	A

Tabelle 1:

Klinische Daten der 29 AE-Patienten
(PE = Probeexzision)

Hersteller	Produktbezeichnung	Wirt	Antigenquelle zur Konjugat-herstellung	gerichtet gegen	Antikörperkonzentration in mg/ml	verwendete Verdünnung ELISA/WB
Jackson Immuno Research Laborat.	Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG	Ziege	Humanserum	Fc-Region humaner IgG-Antikörper	0,8	1:6000/1:500
Zymed Laborat.	Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody	Maus	Humanserum	Fc-Region von Human-IgG 1	0,5	1:1000/1:300
Zymed Laborat.	Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody	Maus	Humanserum	Fab-Region von Human-IgG 2	0,5	1:1000/1:300
Zymed Laborat.	Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody	Maus	Humanserum	Hinge-Region von Human IgG 3	0,5	1:1000/1:300
Zymed Laborat.	Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody	Maus	Humanserum	Fc-Region von Human-IgG 4	0,5	1:1000/1:300

Tabelle 2:

Daten der verwendeten Konjugate

Tabelle 3:
Meßergebnisse ELISA

Extinktionswerte im IgG (gesamt) ELISA		Extinktionswerte im IgG 1-ELISA		Extinktionswerte im IgG 2-ELISA		Extinktionswerte im IgG 3-ELISA		Extinktionswerte im IgG 4-ELISA	
Bereich	Mittel	Bereich	Mittel	Bereich	Mittel	Bereich	Mittel	Bereich	Mittel
0,305-1,140	0,937	0-0,300	0,084	0-0,561	0,036	0,007-0,801	0,124	0,007-1,086	0,561

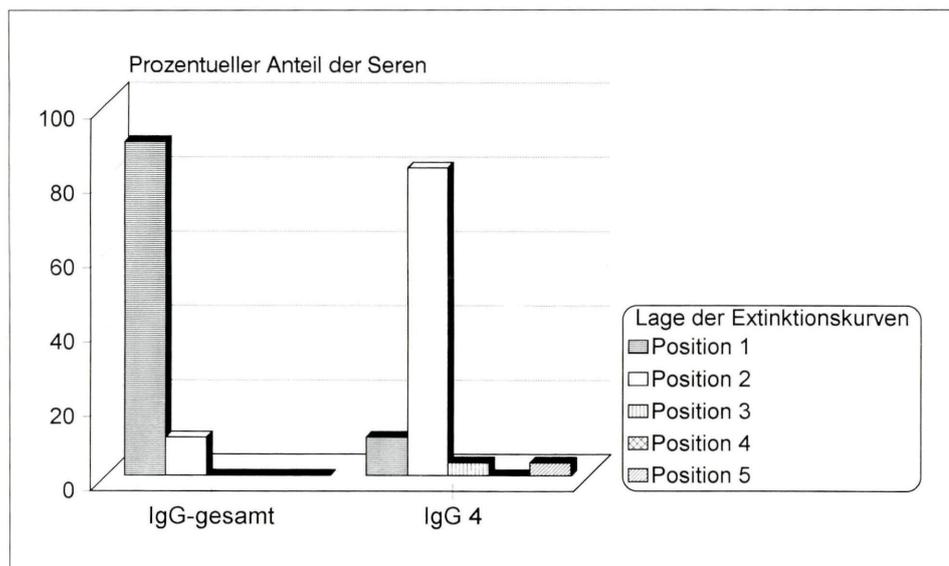


Abbildung 1:
Nachweis spezifischer Antikörper in 102 Seren von 29 AE-Patienten mittels ELISA; geordnet nach der Höhe der Extinktionswerte (siehe Text).

In allen untersuchten Seren konnten Em-spezifische IgG (gesamt)-Antikörper nachgewiesen werden, wobei die Extinktionswerte zwischen 0,3045 und 1,1395 Extinktionseinheiten (Mittel 0,937) lagen. Bei 89,7% der Seren (26 Patienten) zeigten sich im IgG (gesamt)-ELISA die höchsten Extinktionswerte (Tab. 3, Abb. 1).

Im IgG 1-ELISA lagen die Extinktionswerte zwischen 0 und 0,3015 Extinktionseinheiten (Mittel 0,084) und damit bis auf einige Seren zweier Patienten (Nr. 11 und Nr. 21) annähernd im Meßfehlerbereich (< 0,3; Tab. 3).

Im IgG 2-ELISA ergaben sich Extinktionswerte zwischen 0 und 0,5605 Extinktionseinheiten (Mittel 0,036), die somit bis auf einige Ausnahmen (einige Seren der Patienten Nr. 3, 6, 8, 12, 15, 19, 21) annähernd im Meßfehlerbereich lagen (Tab. 3).

Im IgG 3-ELISA wurden Extinktionswerte zwischen 0,007 und 0,8005 Extinktionseinheiten (Mittel 0,124) gemessen, wobei manche Seren der Patienten Nr. 3, 6, 12, 14, 15, 19 und 21 deutliche, aber nicht übermäßig hohe Extinktionswerte im IgG 3-ELISA aufwiesen, während alle übrigen im Meßfehlerbereich lagen (Tab. 3).

Bei 10,3% der Seren konnten im IgG 4-ELISA die höchsten Extinktionswerte nachgewiesen werden, die sich in einem Bereich zwischen 0,007 und 1,0855 Extinktionseinheiten (Mittel 0,561) bewegten (Tab. 3, Abb. 1).

Als positiv wurde das getestete Serum dann bewertet, wenn auf der Nitrozellulosemembran die *Echinococcus multilocularis*-spezifischen Banden bei einem Molekulargewicht von 55.000 bzw. 65.000 Dalton vorhanden waren, als negativ, wenn diese fehlten.

In wenigen Fällen wurde das Serum mit der Bewertung „fraglich“ versehen; nämlich dann, wenn trotz Wiederholung des Tests die genannten Proteinbanden nicht eindeutig nachweisbar waren.

Ergebnisse

Enzymimmuntest (ELISA) zum Nachweis Em-spezifischer Antikörper der IgG-Gesamtfraktion sowie der Subfraktionen IgG 1 bis 4

Tabelle 4:
Meßergebnisse ELISA nach Lage der Extinktionskurven bei 450 nm

Antikörper (sub)klasse	Pos. 1 bei x Patienten	Pos. 2 bei x Patienten	Pos. 3 bei x Patienten	Pos. 4 bei x Patienten	Pos. 5 bei x Patienten
IgG-gesamt	26	3	0	0	0
IgG 4	3	24	1	0	1

Tabelle 5:
Ergebnisse Western Blot

	Anzahl der Seren		
	positive Reaktion	negative Reaktion	fraglich
IgG (gesamt)-Blot	49	52	1
IgG 4-Blot	69	32	1
IgG 3-Blot	0	102	0
IgG 2-Blot	0	102	0
IgG 1-Blot	12	84	6

Tabelle 6:
Reaktionsmuster der Seren im Western Blot

Patientengruppe	Reaktionsmuster		
A (4 [5]* Patienten)	IgG (gesamt)-Blot neg.	IgG 4-Blot neg.	IgG 1-Blot neg.
B (4 Patienten)	IgG (gesamt)-Blot pos.	IgG 4-Blot pos.	IgG 1-Blot pos.
C (9 [10] Patienten)	IgG (gesamt)-Blot pos.	IgG 4-Blot pos.	IgG 1-Blot neg.
D (1 Patient)	IgG (gesamt)-Blot pos.	IgG 4-Blot neg.	IgG 1-Blot neg.
E (8 [9] Patienten)	IgG (gesamt)-Blot neg.	IgG 4-Blot pos.	IgG 1-Blot neg.

*) Im Zweifelsfall wurden die vorher mit dem Attribut „fraglich“ versehenen Seren als negativ gewertet, woraus die in eckigen Klammern angeführten Zahlen resultieren.

Patienten (= etwa 83%) an Position 2 sowie bei je einem Patienten (je 3,5%) an den Positionen 3 bzw. 5. Abbildung 1 verdeutlicht das Resultat durch die Darstellung der prozentuellen Verteilung der Seren nach der Lage der Extinktionskurven.

Western Blot-Verfahren zum Nachweis Em-spezifischer Antikörper der IgG-Gesamtfraktion sowie der Subfraktionen IgG 1 bis 4

Die positiven Resultate im Western Blot beschränkten sich im wesentlichen auf die IgG-Gesamtfraktion bzw. auf die Subklasse IgG 4, in sehr geringen Ausmaß auch auf die Subklasse IgG 1, während kein einziges der getesteten 102 Seren im IgG 2 und 3-Blot positive Reaktion zeigte (Tab. 5).

Im IgG (gesamt)-Blot zeigten 49 Seren (entspricht einem Anteil von 49,8%) die *Echinococcus multilocularis*-spezifischen Proteinbanden, während mittels IgG 4-Blot 69 Seren (entspricht einem Anteil von 70,4%) als positiv erkannt wurden.

In den meisten Fällen sind also die durch die in den Seren enthaltenen *Echinococcus multilocularis*-spezifischen Antikörper verursachten Extinktionswerte nur für die IgG-Gesamtfraktion bzw. für die IgG 4-Subklasse von bemerkenswerter Höhe, während die Werte der Subklassen IgG 1 – 3 fast immer im Bereich des Meßfehlers liegen (Ausnahmen siehe oben); daher stützte sich die weitere Auswertung der Daten in erster Linie auf die IgG-Gesamtfraktion sowie die Subfraktion IgG 4.

In Tabelle 4 sind die Meßergebnisse des ELISA nach der Lage der Extinktionskurven, die dadurch erhalten wurden, daß die Extinktion in Abhängigkeit von der während der Therapie verstrichenen Zeit graphisch dargestellt wurde, genauer aufgeschlüsselt.

Position 1 bedeutet die höchste, Position 5 die niedrigste Extinktion bei 450 nm, was mittelbar dem höchsten bzw. niedrigsten Antikörperspiegel in der jeweiligen (Sub-) Klasse entspricht, wobei natürlich zu berücksichtigen ist, daß der ELISA nur eine semiquantitative Methode darstellt. Wie aus Tabelle 4 zu ersehen ist, werden die Positionen 1 und 2 bei nahezu allen Patienten von den oben genannten Antikörper(sub)klassen eingenommen, wobei die IgG-Gesamtfraktion bei 26 von 29 Patienten (das entspricht einem Anteil von fast 90%) an Position 1 und bei 3 von 29 (das entspricht einem Anteil von etwa 10%) an Position 2 rangiert; die Subklasse IgG 4 steht bei drei Patienten (= etwa 10%) an Position 1, bei 24

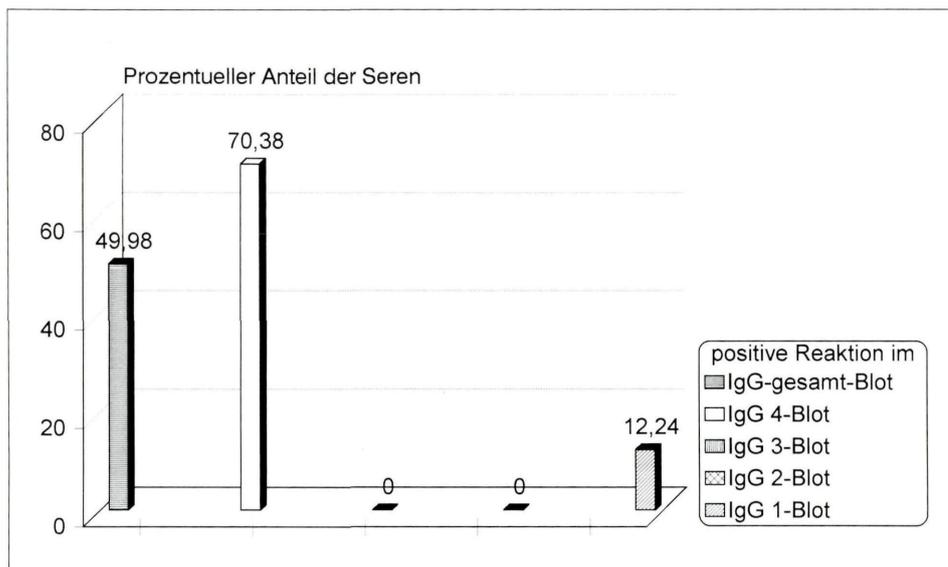


Abbildung 2:

Nachweis spezifischer Antikörper in 102 Seren von 29 AE-Patienten mittels Western Blot; geordnet nach der prozentuellen Verteilung der im Western Blot positiven Seren.

laris auf nur serologischem Weg mittels Western Blot nicht diagnostiziert werden konnte; Gruppe B, C und D wäre in Tests, wo ein Anti-IgG-Gesamtfraktion-Konjugat verwendet wird, als positiv erkannt worden.

Gruppe E lieferte im IgG 4-Blot positive Resultate, wäre aber in Tests, wo ein Anti-IgG-Gesamtfraktion-Konjugat eingesetzt wird, nicht als positiv identifiziert worden.

Abgesehen von den Western Blot-Ergebnissen konnten keine Gemeinsamkeiten oder Unterschiede bezüglich Organlokalisation des Parasiten, Art der Therapie und Krankheitsverlauf innerhalb oder zwischen den Patientengruppen festgestellt werden.

Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es, Seren von Patienten mit alveolärer Echinokokkose unter der Verwendung einfacher und auch bereits etablierter serologischer Tests auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern der IgG-Gesamtfraktion und der IgG-Subfraktionen zu untersuchen, um festzustellen, ob im Verlauf der Krankheit nur bestimmte IgG-Subklassen-antikörper auftreten und ob ihr Erscheinen im Rahmen der Infektion einer gewissen Dynamik unterliegt.

Durch die Kombination der Testergebnisse bzw. durch den Vergleich mit den Daten der Krankengeschichten der Patienten sollte eine serologische Überwachung eines möglichen Therapieerfolges gewährleistet werden.

Die meisten Patienten mit alveolärer Echinokokkose entwickeln eine parasitenspezifische humorale Immunantwort, die alle Antikörperisotypen umfaßt. Antikörper scheinen in immunpathologische Mechanismen, die für den manchmal chronisch granulomatösen Verlauf sowie für Immunkomplex-assoziierte membranöse Nephropathien und histopathologische Veränderungen durch das Auftreten von Amyloidablagerungen verantwortlich sind, involviert zu sein (13, 14).

Im allgemeinen sinken die Antikörperspiegel (bes. IgA, IgE, IgG) bei chemotherapeutisch behandelten Patienten, die an einer regressiven Form der Krankheit leiden, im Verlauf der medikamentösen Maßnahmen ab, während sie bei Personen mit inoperablen Läsionen, operativen Palliativeingriffen oder der progressiven Form der Erkrankung unverändert bleiben

Bei zwölf Seren (entspricht einem Anteil von 12,2%) war der IgG 1-Blot positiv, bei sechs Seren (und mit 5,9% zu einem höheren Anteil als beim IgG (gesamt)- und 4-Blot mit je etwa 1%) fraglich.

Abbildung 2 zeigt die prozentuelle Verteilung der im Western Blot erhobenen Ergebnisse, wobei nur die eindeutig positiv-/negativ-reagierenden Seren berücksichtigt wurden.

Gliedert man die Ergebnisse auf, so treten nach dem Reaktionsmuster der Seren in den verschiedenen Western Blot-Tests folgende Patientengruppen auf, die sich voneinander in eben diesem Muster unterscheiden (Tab. 6).

Gruppe A umfaßt Patienten, deren Infektion mit *Echinococcus multilocu-*

bzw. leicht ansteigen. Da IgM-Antikörper bei einem nur sehr geringen Prozentsatz der Patienten vor der Behandlung gefunden wurden, sind sie für eine Beurteilung der therapeutischen Maßnahmen von geringer Bedeutung (14). Bis jetzt stehen dem Diagnostiker mit den Methoden der klassischen Serologie keine klaren Interpretationsmöglichkeiten im Hinblick auf Krankheitsverlauf u./o. Therapieerfolg zur Verfügung.

Zur Feststellung von Echinokokkus-Antikörpern stehen mehrere Testmethoden unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität zur Verfügung; als spezifische, jedoch wenig sensitive Tests gelten der Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony, die Immun- und Gegenstromelektrophorese und auch die Komplementbindungsreaktion; Agglutinations- und Konjugattestmethoden (Indirekter Hämagglutinationstest – IHA; Indirekter Immunfluoreszenztest – IIFT, Enzymimmuntest – ELISA und Radioimmuntest – RIA) werden hingegen als Verfahren hoher Sensitivität angesehen (7, 23).

Da in Österreich sowohl *Echinococcus granulosus*, der Erreger der zystischen Echinokokkose, als auch *Echinococcus multilocularis*, der Erreger der alveolären Echinokokkose, autochthon vorkommen, müssen an die Serodiagnostik besonders hohe Anforderungen bezüglich Sensitivität und Spezifität der eingesetzten Testsysteme gestellt werden (3, 8).

Als schwierig erwies sich die Standardisierung der erhobenen Ergebnisse der Subklassen-Enzymimmuntests, da es weder in der Literatur Bezugswerte für eine positive Kontrolle noch in unserem Labor selbst ein Patientenserum gibt, das in jedem IgG-Subklassen-ELISA (IgG 1 bis 4) hoch positiv reagiert. Daher mußten für die Auswertung der Ergebnisse die Extinktionswerte bei 450 nm herangezogen werden.

Deutlich zeigt sich, daß die serologische Überwachung der Serumspiegel der IgG-Gesamtfraktion sowie der IgG-Subklassen mittels ELISA nur eine bedingte Kontrolle einer erfolgreichen/-losen Therapie bietet, da die Serumspiegel über lange Zeit unverändert bleiben und erst mit einiger Verzögerung auf die operative und/oder medikamentöse Behandlung reagieren – ein Resultat, das den Erwartungen durchaus entspricht, da IgG-Antikörper als Indikatoren für eine schon lange bestehende Infektion gelten (Ausnahme: unmittelbar nach Operationen, wo ein Großteil der parasitären larvalen Zystenmasse entfernt wird, kommt es relativ rasch zu einem Abfall des Serumspiegels an spezifischen IgG-Antikörpern).

Daß die Summe der Extinktionswerte, die durch die IgG-Subfraktionen hervorgerufen wird, nicht dem Extinktionswert durch die IgG-Gesamtfraktion entspricht, überrascht nicht, soll aber immerhin festgehalten werden – nicht zuletzt unter dem Gesichtspunkt, daß im Immunsystem Interaktionen von entscheidender Bedeutung sind.

In beiden Verfahren (ELISA und Western Blot) zum Nachweis *Echinococcus multilocularis*-spezifischer Antikörper(sub)klassen zeigte sich deutlich, daß der Subklasse IgG 4 bei der Erkrankung an alveolärer Echinokokkose große Wichtigkeit zukommt; sie ergibt im ELISA nach der Lage der Extinktionskurve (Darstellung der Extinktion in Abhängigkeit von der während der Therapie verstrichenen Zeit), in etwa 83% der Seren die zweithöchsten Extinktionswerte nach der IgG-Gesamtfraktion und in etwa 10% sogar die höchsten Extinktionswerte; im IgG 4-Western Blot wurden mehr Seren als *Echinococcus multilocularis*-positiv erkannt als bei der Verwendung von anti-human-IgG-gesamt-Konjugaten.

Nicht geklärt ist allerdings, welche Rolle IgG 4-Antikörper im Rahmen der Immunreaktion bei dieser Infektion spielen.

Die Meinung von MATOSSIAN & UWAYDAH (allerdings in einer Studie über zystische Echinokokkose, Befall durch *Echinococcus granulosus*), daß ein positiver IgG (gesamt)-ELISA nur Exposition zum Erreger, ein positiver IgG (gesamt)- und IgG 1-Test inaktive Zysten bei möglicherweise immunen Individuen bzw. ein positiver IgG 1- und IgG 4-Test entzündliche Prozesse bei aktivem Krankheitsgeschehen widerspiegeln, kann durch die Daten dieser Studie nur sehr bedingt bestätigt werden (18).

Bei zwei Patienten (Nr. 11 u. 21) stimmen die positiven IgG 4- und IgG 1 ELISA-Ergebnisse mit einem aktiven Krankheitsgeschehen überein, bei allen übrigen Patienten ist der IgG 1-ELISA bei positivem IgG 4-ELISA negativ. Weiters tritt der Fall, daß bei einem Patienten nur der IgG (gesamt)-ELISA positiv ist, auch bei den hier untersuchten Personen auf (Nr. 9, 13, 22, 24); dies kann allerdings nicht nur auf Exposition, sondern muß auf einen definitiven, klinisch verifizierten Fuchsbandwurmbefall zurückgeführt werden.

Obwohl es nicht die Aufgabe dieser Arbeit ist, die Immunabwehr bei *Echinococcus multilocularis*-Infektionen zu analysieren, sollen einige Hypothesen diskutiert werden, die sich auf die speziellen Eigenschaften von IgG 4-Antikörpern beziehen.

In den Seren der betroffenen Patienten traten oft relativ hohe Extinktionswerte im IgG 4-ELISA auf, während sie im IgG 1-3-ELISA eher niedrig waren, was mit der Tatsache zusammenhängen könnte, daß IgG 1 und 3 in hohem, IgG 2 in mittelmäßigem Ausmaß an Antigen gebunden die Kaskade der Komplementenzyme aktivieren können, während IgG 4 in dieser Hinsicht vollkommen wirkungslos ist. Möglicherweise sind die sonst frei im Serum vorhandenen IgG 1-3-Antikörper bereits an die Körperoberfläche des Parasiten angeheftet, um das Komplementsystem in Gang zu setzen und daher im Serum nur in geringer Konzentration nachweisbar.

Eine zweite Möglichkeit der Anlagerung an die Parasitenoberfläche besteht darin, daß Antikörper auch an der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität beteiligt sein können (wie es zum Beispiel bei Infektionen mit *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni* oder Filarien bekannt und untersucht ist [21]) und sich zytotoxische Zellen wie Makrophagen, Neutrophile und Eosinophile über die Fc- und C3-Rezeptoren an den von Antikörpern umhüllten Erreger anlagern und durch die Freisetzung ihrer Inhaltsstoffe schädigen können.

Bei beiden Erklärungen geht man davon aus, daß die Antikörper-Subklassen IgG 1 bis 3 grundsätzlich vorhanden sind, jedoch im Verlauf der Immunantwort gebunden werden.

Andererseits gibt es Überlegungen, daß IgG 4-Antikörper die Produktion bzw. die Effektorfunktionen der restlichen Subklassen (17) und die Synthese von IgE (10) unterdrücken können, was eine Erklärung für die niedrigen spezifischen IgG 1-3-Serumspiegel bieten würde.

Die Wichtigkeit der IgG 4-Antwort wird auch bei anderen Parasitosen diskutiert; so tritt zum Beispiel bei Befall mit *Schistosoma mansoni* eine deutliche Korrelation zwischen der Resistenz gegen eine Reinfektion nach erfolgter Chemotherapie und Erhöhung der spezifischen IgE-, IgG 2- und IgG 4-Antikörper auf.

Bei erhöhtem IgE-Serumspiegel kommt es relativ selten zu Reinfektionen, während erhöhte IgG 4- und IgG 2-Konzentrationen in den Patientenserum Reinfektionen zu begünstigen scheinen (11), was von den Autoren dahingehend interpretiert wird, daß IgG 4-Antikörper antagonistisch zu IgE-Antikörpern wirken könnten, indem sie die Aktivierung von Mastzellen und Basophilen oder die IgE-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, die von Monozyten, Eosinophilen oder Blutplättchen moduliert wird, verhindern.

Auch bei Zystizerkose (Infektion mit den Larvenstadien von *Taenia solium*) berichten Forschungsgruppen über eine bemerkenswerte IgG 4-Antwort (22), was mit der chronischen Antigenfreisetzung in Zusammenhang gebracht wird.

Besonderes Interesse verdient der Umstand, daß die Ergebnisse dieser Arbeit in guter Übereinstimmung mit den Resultaten von GOTTSTEIN et al. stehen, die kürzlich eine ähnliche Studie, allerdings über experimentell mit *Echinococcus multilocularis* infizierte Mäuse, durchführten (15), in der die parasitenspezifische zelluläre und humorale Immunantwort bei empfänglichen und resistenten Mäusestämmen untersucht wurde.

Kurz zusammengefaßt stellte sich heraus, daß eine Resistenz von verschiedenen Mäusestämmen (AKR, C57B1/6J und C57B1/10J) gegen *Echinococcus multilocularis* mit der Fähigkeit

zur Synthese von spezifischen IgG 1- und IgG 3-Antikörpern gegen ein Lectin-bindendes Kohlehydrat der Außenschicht des Parasiten assoziiert war; empfängliche Mäuse wiesen weder IgG 1- noch IgG 3-Antikörper und nur einen sehr niedrigen IgG 2a-Serumspiegel auf. Aus diesen Ergebnissen und der Tatsache, daß bei empfänglichen Mäusen ein bemerkenswerter Anstieg an CD8+-Zellen zu verzeichnen war, schlossen die Autoren, daß Unterschiede in der Antigenerkennung (was möglicherweise von non-H-2-Genen kontrolliert wird) verbunden mit einer Immunsuppression (was durch CD8+-Zellen und/oder Zytokine moduliert werden könnte) über Empfänglichkeit oder Resistenz gegenüber *Echinococcus multilocularis* entscheiden.

Weiters stimmen unsere Ergebnisse mit den Resultaten von WEN & CRAIG weitgehend überein, wenngleich die Autoren einen wesentlich höheren Anteil an IgG 1-positiven Seren von AE-Patienten (84%) in ELISA und Western Blot verzeichneten, was möglicherweise auf Unterschiede in der Antigenpräparation zurückzuführen ist.

Wichtig erscheint die Tatsache, daß mit dem IgG 4-Blot allein ein weit höherer Prozentsatz an Seren als *Echinococcus multilocularis*-positiv erkannt wurde als im normalen IgG (gesamt)-Blot, was den Schluß nahelegt, daß diese Methode sensitiver und vielleicht auch spezifischer ist und in Zukunft zur Absicherung der Diagnose im Basis-Screening eingesetzt werden sollte.

Innerhalb der in Tabelle 6 nach dem Reaktionsmuster der Seren im Western Blot zusammengefaßten Patientengruppen traten, wie schon erwähnt, keine Korrelationen zwischen Reaktionsmuster, Lokalisation des Parasiten, Chemotherapie und Krankheitsverlauf auf.

Die immunologische Rolle der IgG 4-Antikörper im Rahmen einer *Echinococcus multilocularis*-Infektion muß noch endgültig geklärt werden; Tatsache ist jedenfalls, daß diese Subklasse bei alveolärer Echinokokkose in hohen Konzentrationen auftritt.

Die Resultate der Studie haben eindeutig gezeigt, daß durch den Einsatz eines IgG-Subklassen-ELISAs zwar keine wesentliche Verbesserung der Kontrolle des Krankheitsverlaufes sowie des Therapieerfolges erreicht werden kann, daß jedoch Tests zum Nachweis spezifischer IgG 4-Antikörper auf Basis eines Western Blots aufgrund ihrer höheren Sensitivität große Bedeutung zukommt.

Überzeugend konnte dargelegt werden, daß die Einbeziehung dieses Verfahrens in das Testsystem zur Abklärung von Verdachtsfällen von alveolärer Echinokokkose zur Aufdeckung sonst nicht erkannter Fälle führen kann.

Der IgG 4-Western Blot sollte daher auch Eingang in die Routinediagnostik finden.

Zusammenfassung Seren von 29 Patienten mit klinisch verifizierter alveolärer Echinokokkose wurden mittels Enzymimmuntests (ELISA) und Western Blot-Verfahren auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern der IgG-Gesamtfraktion sowie der Subfraktionen IgG 1 bis 4 überprüft. Zielsetzung der Arbeit war es, durch Kombination der Testergebnisse bzw. durch den Vergleich mit den Daten der Krankengeschichten der Patienten eine serologische Überwachung der therapeutischen Maßnahmen gewährleisten zu können.

Sowohl im ELISA als auch Western Blot zeigte sich, daß der IgG 4-Antwort bei alveolärer Echinokokkose große Bedeutung zukommt; im ELISA wurden bei etwa 10% der Seren die höchsten und bei 83% die zweithöchsten Extinktionswerte bei 450 nm (vor bzw. nach den Extinktionswerten im IgG [gesamt]-Test) im IgG 4-Test gemessen, mit dem IgG 4-Western Blot sogar ein weitaus höherer Anteil an Patientenserum (etwa 70%) Em-positiv erkannt als mit dem bisher in der Routinediagnostik eingesetztem IgG (gesamt)-Blot (etwa 50%).

Dennoch konnte auch bei Verwendung von IgG-Subklassen-Tests keine wesentliche Verbesserung in der serologischen Überwachung von Therapiemaßnahmen und Krankheitsverlauf erreicht werden.

Schlüsselwörter *Echinococcus multilocularis*, alveoläre Echinokokkose, Serodiagnostik, IgG-Subklassen, IgG 4.

Summary *Differentiation of specific antibodies of the subfractions IgG1 to IgG4 in patients with alveolar echinococcosis*

Immunglobulin G subclass-specific antibody responses were investigated in sera from 29 clinically confirmed AE patients by using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot technique. The aim of the study was to control therapy and course of the infection by combination of serological results and comparison with clinical data.

The results of our study show that the IgG 4 antibody response seems to be particularly important in alveolar echinococcosis. In 10% of the sera the highest and in 83% the second highest measured values of extinction (at a wavelength of 450 nm) were detected in the IgG 4-ELISA (followed by/preceded by the values of extinction in the total-IgG-ELISA).

By using an IgG 4-Western Blot, even more sera (70%) were recognized to be *Echinococcus multilocularis* positive than in the total-IgG-Western Blot (50%), which is usually performed in routine diagnostics. Thus, it is recommended to include an IgG 4-Western Blot in the routine diagnostics. For an assessment of the effect of a chemotherapy tests for *Echinococcus multilocularis*-specific antibodies of IgG-subclasses are, however, of very limited significance.

Key words *Echinococcus multilocularis*, alveolar echinococcosis, serodiagnosis, IgG subclasses, IgG 4.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AE	alveoläre Echinokokkose
BRSg	Blut(körperchen)senkungsreaktionsgeschwindigkeit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Em	<i>Echinococcus multilocularis</i>
γ GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
IHA	Indirekter Hämagglutinationstest
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
RIA	Radioimmunoassay
WB	Western Blot
ZNS	Zentralnervensystem

Literatur

1. AUBERT, M., JACQUIER, P., ARTTOIS, M., BARRAT, M. J., BASILE, A. M. (1987):
Le portage d' *echinococcus multilocularis* par le renard (*Vulpes vulpes*) en Lorraine. Consequences sur la contamination humaine.
Rec. Med. Vet. 163, 839-843.
2. AUER, H., ASPÖCK, H. (1985):
Studies on Antigens from in vitro Cultivated Protoscolices of *Echinococcus multilocularis* and their Possible Use in the Serodiagnosis of Human Echinococcosis.
Proc. Sec. Int. Symp. Taeniasis/Cysticercosis & Echinococcosis/Hydatidosis, 7-15.
3. AUER, H., ASPÖCK, H. (1985):
Echinokokkose in Österreich: Eine kritische Übersicht.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 7, 101-107.

4. AUER, H., ASPÖCK, H. (1992):
Incidence, Prevalence and Geographic Distribution of Human Alveolar Echinococcosis in Austria from 1854 to 1990.
Parasit. Res. 77, 430-436.
5. AUER, H., ASPÖCK, H. (1993):
Optimierung serologischer Befunde durch die Verwendung von Milchpulver.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 15, 129-134.
6. 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.
7. AUER, H., PICHER, O., ASPÖCK, H. (1986):
Erfahrungen bei der Serodiagnostik der Echinokokkosen mittels ELISA.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8, 17-22.
8. 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 the Post-Operative Surveillance of Human Alveolar and Cystic Echinococcosis.
Zbl. Bakt. Hyg. A 268, 416-423.
9. BAUDER, B. (1994):
Untersuchungen über den Nachweis und die Dynamik des Auftretens spezifischer Antikörper der IgG-Gesamtfraction und der Subfraktionen IgG 1 bis 4, sowie von Immunkomplexen und von zirkulierendem Antigen bei Patienten mit alveolärer Echinokokkose.
Diplomarbeit, Klinisches Institut für Hygiene, Universität Wien.
10. CATTY, D., JASSIM, A., HASSAN, K., RAYKUNDALIA, C. (1986):
IgG Subclasses in Parasitic Infestations.
Monogr. Allerg. 19, 144-155.
11. DEMEURE, C. E., RIHET, P., ABEL, L., OUATTARA, M., BOURGOIS, A., DESSEIN, A. J. (1993):
Resistance to Schistosoma mansoni in Humans: Influence of the IgE/IgG 4 Balance and IgG 2 in Immunity to Reinfection after Chemotherapy.
J. Infect. Dis. 168, 1000-1008.
12. FRANK, W. (1984):
Echinococcus multilocularis – ein endemischer Bandwurm des Rotfuchses in Süddeutschland. Biologie, Epidemiologie und humanmedizinische Bedeutung.
Wien. Tierärztl. Mschr. 71, 19-22.
13. GOTTSTEIN, B. (1992):
Molecular and Immunological Diagnosis of Echinococcosis.
Clin. Microbiol. Rev. 5 (3), 248-261.
14. GOTTSTEIN, B., ECKERT, J., WOODTLJ, W. (1984):
Determination of Parasite-Specific Immunglobulins Using the ELISA in Patients with Echinococcosis Treated with Mebendazole.
Z. Parasitenkd. 70, 385-389.
15. GOTTSTEIN, B., WUNDERLIN, E., TANNER, I. (1994):
Echinococcus multilocularis: Parasite-Specific Humoral and Cellular Immune Response Subsets in Mouse Strains Susceptible (AKR, C57B1/6) or "Resistant" (C57B1/10) to Secondary Alveolar Echinococcosis.
Clin. Exp. Immunol. 96, 245-252.
16. HOUIN, R., DENIAU, M., LIANCE, M., PUEL, F. (1982):
Arvicola terrestris and Intermediate Host of Echinococcus multilocularis in France: Epidemiological Consequences.
Int. J. Parasitol. 12, 593-600.
17. KING, C. L., MAHANTY, S., KUMARASWAMI, V., ABRAM, J. S., REGUNATHAN, J., JAYARAMAN, K., OTTESEN, E. A., NUTMAN, T. B. (1993):
Cytokine Control of Parasite-specific Anergy in Human Filariasis.
J. Clin. Invest. 1667-1673.
18. MATOSSIAN, R., UWAYDAH, M. (1994):
Alternative Approach to the Sero-Surveillance of E. granulosus Infections.
Discussionpaper in Echinomed. 14/15, 3.
19. PROSL, H. (1992):
Weitere Untersuchungen zum Vorkommen von E. multilocularis bei Füchsen in Österreich.
Vortr. 26. Tg. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. Graz.
20. PROSL, H., SCHMID, E. (1991):
Zum Vorkommen von Echinococcus multilocularis bei Füchsen in Vorarlberg.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 13, 41-46.

21. ROITT, I. M., BROSTOFF, J., MALE, D. K. (1987):
Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 2. Auflage, Georg Thieme-Verlag Stuttgart, New York, 372 pp.
22. SHORT, J. A., HEINER, D. C., HSIAO, R. L., ANDERSEN, F. L. (1990):
Immunglobulin E and IgG 4 in Cysticercosis.
J. Clin. Microbiol. 28, 1635-1639.
23. TORNIEPORTH, N. G., DISKO, R. (1994):
Alveolar Hydatid Disease (Echinococcus multilocularis) – Review and Update.
Progr. Parasitol. 4, 66-68.
24. WEN, H., CRAIG, P. S. (1994):
Immunglobulin G Subclass Responses in Human Cystic and Alveolar Echinococcosis.
Am. J. Trop. Med. 51, 741-748.
25. ZEYHLE, E. (1982):
Die Verbreitung von Echinococcus multilocularis in Süddeutschland.
Akt. Probl. Chir. Orthop. 23, 26-33.

Korrespondenzadresse: Mag. Barbara Bauder
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Klinisches Institut für Hygiene 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: 1995

Band/Volume: [17](#)

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

Artikel/Article: [Differenzierung spezifischer Antikörper der Subklassen IgG1 bis IgG4 bei Patienten mit alveolarer Echinokokkose. 85-96](#)