

## Der Einsatz des „enzyme-linked fluorescence assay“ (ELFA) in der Serodiagnostik parasitärer Infektionen

H. Auer, H. Aspöck

**Einleitung** Seit der Einführung der Enzymimmuntest-Technik (ELISA) durch ENGVALL UND PERLMANN (1971 [3]) hat sich dieses Testprinzip auch in der Diagnostik parasitär bedingter Infestationen, Infektionen und Krankheiten weitgehend durchgesetzt. In den letzten Jahren wurden darüber hinaus große Anstrengungen zur automatisierten Durchführung des ELISA unternommen.

Der „enzyme-linked fluorescent assay“ (ELFA) stellt ein Ergebnis dieser Bemühungen dar und ist unter dem Produktnamen VIDAS der Firma bioMérieux kommerziell erhältlich. Das VIDAS-Analysengerät stellt ein automatisches, universell einsetzbares System zur (gleichzeitigen) Testung mehrerer Serumproben z. B. auf verschiedene immunchemische Parameter, das Vorhandensein von Virus-Antigenen oder von Antikörpern gegen verschiedene Krankheitserreger (z. B. Rubella-, HI-, Hepatitis-Virus, *Borrelia burgdorferi*) dar.

In unserem Routinelaboratorium wird das VIDAS-Analysengerät seit mehreren Jahren ergänzend zu den Basistests (IIFT, SFT) zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii*-Antigen eingesetzt. Der große Vorteil dieses vollautomatischen Testsystems liegt nicht nur in der einfachen Handhabbarkeit und dem hohen Maß an Reproduzierbarkeit, sondern auch in dem nur etwa 30minütigen Testdurchlauf. Wir haben daher das bestehende VIDAS TOXO IgG-Kit unter Verwendung selbst sensibilisierter Plastikspitzen – sie stellen die Antigenträger dar – für eine Untersuchung zum Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen verschiedene andere, von der Firma bioMérieux nicht vertriebene Parasitenantigene, adaptiert. Wir haben dabei vor allem überprüft, ob mit diesem Schnelltest eine mit den in unserem Routinelaboratorium etablierten Methoden (Basistests) vergleichbare Sensitivität erreicht werden kann. Dafür wurden Seren von Patienten mit nachgewiesenem Amöbenleberabszeß, mit verifizierter Fasziole, Bilharziose, Zystischer oder Alveolärer Echinokokkose sowie verschiedenen Filariosen vergleichend getestet. Darüber hinaus wurde die optimale Anlagerungstemperatur und -dauer für die Antigenbeschichtung sowie die Lagerungsdauer der Pipettenspitzen ermittelt.

<b>Material und Methodik</b>	Insgesamt wurden 16 Seren von Patienten mit verifiziertem Amöbenleberabszeß, 9 Seren von Fasziole- und 17 Seren von Bilharziose-Patienten, 24 Seren von Patienten mit <i>E. granulosus</i> -, zehn Seren von Patienten mit nachgewiesener <i>Echinococcus multilocularis</i> -Infektion sowie 5 Seren von Filariose-Patienten (3 Onchozerkose-Patienten, je 1 Patient mit einer lymphatischen Filariose bzw. einer <i>Loa loa</i> -Infestation), die bereits in den routinemäßig eingesetzten Basistests (siehe unten) getestet und als serologisch positiv befundet worden waren, im ELFA vergleichend getestet.
Patienten- und Kontrollseren	Als negatives Kontrollserum wurden Seren von 12 gesunden Probanden ausgewählt, die vorab in allen im Routinelaboratorium vorhandenen helminthologisch-serologischen Tests untersucht und als negativ befundet worden waren.
Routinetestverfahren (Basistests)	Die wichtigsten Parameter der im Routinelaboratorium etablierten Basistests (1, 2, 4) sind Tabelle 1 zu entnehmen.  Alle verwendeten Enzymimmuntests wurden nach folgendem technischen Prozedere durchgeführt: Die Parasitenantigene wurden (nach Durchführung von Schachbrett-Titrationsen) entweder über Nacht (bei 8°C) oder 1 Stunde bei 37°C an die Nöpfchen der Mikrotiterplatten (Costar, USA) angelagert. Nach einem dreimaligen Waschvorgang mit Leitungswasser plus Tween 20 (0,05%) wurden die freien Plastikstellen der Mikrotiterplatten mit 5%iger Milchpulverlösung (in PBS + 0,05% Tween 20) abgesättigt (30 Minuten), anschließend wurden die Seren (Serumpuffer: PBS + 5% Milchpulver + 0,05% Tween 20) einpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde (37°C) erfolgte ein zweiter Waschvorgang, anschließend wurde Konjugatverdünnung (PBS + 5% Milchpulver + 0,05% Tween 20) zugegeben und wiederum 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem dritten Waschvorgang wurde Substrat (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 5-Aminosalicylsäure) zugegeben und eine Stunde später bei einer Wellenlänge von 450 nm photometriert. Die Auswertung der ELISA-Testergebnisse erfolgte nach der ZAHNER'schen Formel (5), wobei die gemessenen Extinktionen in Relation zu positivem und negativem Kontrollserum gesetzt werden. Der errechnete Index wird in Antikörpereinheiten (AKE) ausgedrückt.  Der Indirekte Hämagglutinationstest zum Nachweis spezifischer <i>Echinococcus</i> -Antikörper wurde nach den Richtlinien des Herstellers (bioMérieux) durchgeführt.
Enzyme-linked fluorescence assay (ELFA)	Für die Durchführung des ELFA wurde das VIDAS TOXO IgG-Testkit der Firma bioMérieux verwendet. Die Anlagerung der Antigene erfolgte durch Einpipettieren von 350 µl Antigenverdünnung in die Pipettenspitzen (Antigenträger) und – nach Verschließen der an der Pipettenspitze befindlichen Öffnung mit „Parafilm“ – durch Inkubation bei 8°C über Nacht oder bei 37°C für 1, 2, oder 3 Stunden. Vor Beginn des Tests wurde die Antigenverdünnung aus der Pipettenspitze entfernt; danach wurde das Patientenserum (15 µl) in die zweite Kavität des Reagenzriegels einpipettiert, das weitere Testprozedere erfolgte vollautomatisch im VIDAS-Multiparameter-Analysengerät. Als Konjugat diente ein Antihuman-IgG, an das das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Als Substrat diente 4-Methylumbelliferylphosphat, das durch die alkalische Phosphatase zu 4-Methylumbelliferon hydrolysiert wird. Die Ablesung der Fluoreszenz erfolgte durch eine Photodiode (Wellenlänge: 450 nm).  Die Testergebnisse wurden vom VIDAS-Analysengerät in Relativen Fluoreszenzwerten (RFW), bezogen auf einen Leerwert, ausgedrückt. Für die Auswertung der RFW und Bewertung der Testergebnisse wurden die gemessenen RFW der negativen Kontrollseren mit jenen der Patientenseren in Beziehung gesetzt.
Lagerbarkeit der Antigene	Um zu überprüfen, ob mit Antigen beschichtete Pipettenspitzen mehrere Monate gelagert werden können, wurde eine kleine Vergleichstudie mit zwei Testansätzen durchgeführt. Zum einen wurde ein Teil der Pipettenspitzen nach der Antigen-Sensibilisierung (bei 8°C über Nacht) – ohne die Antigenverdünnung aus der Spitze zu entfernen (Versuchsserie 1) – in einen -20°C Kühlschrank überführt und dort gelagert, zum anderen wurde die Antigenverdünnung nach der Sensibilisierung der Pipettenspitzen aus den Antigenträgern entfernt (Versuchsserie 2) und ebenfalls bei -20°C

Tabelle 1:

Wichtige Parameter der im Routinelaboratorium etablierten Basistests und des neuadaptierten ELFA zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Entamoeba histolytica*-, *Fasciola hepatica*-, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus granulosus*-, *E. multilocularis*- und *Dipetalonema viteae*-Antigen. Die ELISA-Testergebnisse sind in Antikörperereinheiten (AKE) nach der Formel nach ZAHNER (5) angegeben, die ELFA-Ergebnisse werden in „relativen Fluoreszenzwerten“ (RFW) angegeben.

Antigen	Test	Antigen-verdünnung	Serum-verdünnung	Testergebnis in	positiv ab
<i>Entamoeba histolytica</i> (Stamm SFL3)					
Eigenpräparation	ELISA	1: 200	1:200	AKE	31
	ELFA	1: 200	1: 41	RFW	89*
<i>Fasciola hepatica</i> (Arc 2)					
Sanofi Pasteur, Frankreich	ELISA	1: 800	1:400	AKE	31
	ELFA	1: 800	1: 41	RFW	53*
<i>Schistosoma mansoni</i> (Arc 4)					
Sanofi Pasteur, Frankreich	ELISA	1:1000	1:200	AKE	31
	ELFA	1:1000	1: 41	RFW	328*
<i>Echinococcus multilocularis</i> (T1/85 Isolat)					
Eigenpräparation	ELISA	1: 200	1:400	AKE	31
	ELFA	1: 200	1: 41	RFW	246*
<i>E. granulosus</i> bioMérieux, Frankreich					
Eigenpräparation	IHA	—	—	Titer	1:100
	ELFA	1: 500	1: 41	RFW	175*
<i>Dipetalonema viteae</i>					
Eigenpräparation	ELISA	1: 200	1:100	AKE	31
	ELFA	1: 200	1: 41	RFW	89*

\* Die angegebenen Zahlen stellen die jeweils höchsten bei den negativen Kontrollseren gemessenen Werte dar.

sibilisierungszeit. Alle eingesetzten Antigene zeigten in beiden Versuchsserien bei unterschiedlich hohen Ausgangswerten bereits nach 20 Tagen der Lagerung einen Aktivitätsverlust, der allerdings nach 60 und 150 Tagen nicht mehr wesentlich zunahm (Tab. 8). Insgesamt wurden in der Versuchsserie 1 bei den Antigenen *Entamoeba histolytica*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni* und *Echinococcus multilocularis* höhere RFWs gemessen, in der Versuchsserie 2 konnten bei den Antigenen *E. granulosus* und *Dipetalonema viteae* im Vergleich zur Versuchsserie 1 etwas höhere RFW gemessen werden. Als stabilstes erwies sich das *Fasciola hepatica*-Antigen (Absinken der RF-Werte bis zum Tag 150 um nur 28%), der stärkste Aktivitätsverlust (Abfall der RF-Werte auf 16% des Ausgangswertes in der Versuchsserie 2) wurde beim *Echinococcus multilocularis*-Antigen beobachtet. Insgesamt konnten bei allen Antigenen auch nach 150 Tagen der Lagerung noch deutliche Unterschiede zwischen den RF-Werten von positivem und negativem Kontrollserum beobachtet werden.

## Diskussion

Der „enzyme-linked fluorescence assay“ (ELFA) verbindet das herkömmliche ELISA-Verfahren mit der photometrischen Ablesung fluoreszierender Strahlung eines Fluoreszenztests. Als Antigen-träger („solid phase“) dient dabei eine Pipettenspitze, die in Abhängigkeit vom Testkit mit dem entsprechenden Antigen beschichtet ist. Die übrigen Reagenzien (Wasch- und Verdünnungspuffer, Konjugat, Substrat) sind in einem Reagenzriegel enthalten. Alle Reaktionsschritte werden vom VIDAS-System innerhalb von etwa 30 Minuten vollautomatisch durchgeführt. Es war vor allem die kurze Durchlaufzeit, die uns dazu bewogen hat, den ELFA auf seine Einsetzbarkeit als möglichen Routinetest im parasitologischen Laboratorium zu überprüfen.

Da wir ausschließlich an einer qualitativen Auswertung (zum Ausschluß negativer Seren) interessiert waren, haben wir den VIDAS TOXO IgG, ein Reagenzien-Kit zur quantitativen *Toxoplasma-*

gelagert. Für diesen Versuchsansatz wurden, für jedes Antigen gesondert, aus Kostengründen nur ein positives Patienten- und ein negatives Kontrollserum ausgewählt; die Testdurchläufe wurden 20, 60 und 150 Tage nach Sensibilisierung durchgeführt.

## Ergebnisse

### Testvergleich

Die Ergebnisse des Testvergleichs zwischen den in unserem Routinelaboratorium verwendeten Basistests (ELISA, IHA) einerseits und dem ELFA andererseits sind in den Tabelle 2-7 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, daß alle getesteten Patientenserum auch mittels ELFA als positiv „erkannt“ werden.

Anlagerungstemperatur und -dauer, Lagerbarkeit der antigenbeschichteten Pipettenspitzen

Als optimale Bedingungen für die Sensibilisierung der Plastikspitzen mit Antigen erwiesen sich nach mehreren Vorversuchen eine Anlagerungstemperatur von 8°C und eine 12stündige Sen-

Tabelle 2:

Ergebnisse der Untersuchungen von 17 Seren von Patienten mit Amöbenleberabszeß mittels ELISA und ELFA auf spezifische Antikörper gegen *Entamoeba histolytica*-Antigen. Der cut-off liegt im ELISA bei 31 AKE, im ELFA zeigten die 12 negativen Kontrollseren Relative Fluoreszenzwerte (RFW) bis maximal 89.

Patient	ELISA (AKE)	ELFA (RFW)
12 neg. Kontrollseren	< 31	bis 89
M. S.	90	414
H. T.	90	434
K. T.	55	589
F. R.	70	695
A. W.	70	831
M. S.	90	871
L. S.	55	1202
J. P.	100	1328
B. E.	85	1343
D. G.	60	1700
E. K.	>100	2133
Z. Z.	100	2391
J. W.	>100	2417
J. P.	>100	2740
D. N.	60	2809
E. P.	100	3514

Tabelle 3:

Ergebnisse der Untersuchungen von 9 Seren von Fasziose-Patienten mittels ELISA und ELFA auf spezifische Antikörper gegen *Fasciola hepatica*-Antigen. Der cut-off liegt im ELISA bei 31 AKE, im ELFA zeigten die 12 negativen Kontrollseren Relative Fluoreszenzwerte (RFW) bis maximal 53.

Patient	ELISA (AKE)	ELFA (RFW)
12 neg. Kontrollseren	< 31	bis 53
S. W.	>100	596
G. S.	>100	628
A. H.	>100	669
E. W.	>100	733
G. H.	90	792
H. T.	65	824
A. F.	>100	1160
E. S.	>100	1597
J. W.	>100	2481

IgG-Antikörper-Bestimmung in Humansenen, „zweckentfremdet“ und haben nur die auf einen Leerwert geeichten „Relativen Fluoreszenzwerte“ (und nicht die auf einem internationalen IgG-Standardserum basierenden und vom Gerät automatisch ausgeworfenen internationalen Einheiten) zur Testauswertung herangezogen.

Die Auswahl der verwendeten Antigene orientierte sich nach dem möglichen Einsatz des ELFA im parasitologischen Routinelaboratorium, wir haben deshalb den ELFA für den Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern gegen *Entamoeba histolytica*-, *Fasciola hepatica*-, *Schistosoma mansoni*-, *Echinococcus granulosus*-, *E. multilocularis*- und *Dipetalonema viteae*-Antigen adaptiert.

Das Kriterium der Adaptierung lag in der Beschichtung der Einmal-Festphasenzepitoren (Pipettenspitzen) mit den von uns ausgewählten Antigenen bzw. Antigenverdünnungen. In mehreren Vorversuchen und unter Verwendung mehrerer positiver und negativer Kontrollseren aus der Serothek der Abt. f. Med. Parasitologie des Klinischen Instituts für Hygiene der Universität Wien wurde nicht nur die optimale Antigenkonzentration (Tab. 1), sondern auch die Anlagerungstemperatur und -dauer und Lagerungsdauer der Pipettenspitzen ermittelt.

Dabei erwies sich das Anlagern der Antigene an die Plastikoberfläche der Pipettenspitzen bei Kühlschranktemperaturen (bei 8°C) über Nacht jenem der 37°C-Anlagerung für einige Stunden überlegen. Alle Pipettenspitzen wurden daher immer am Tag vor Gebrauch (etwa 12 Stunden) mit Antigen sensibilisiert, kurz vor Beginn des Tests wurden die Antigenverdünnungen entfernt und die Pipettenspitzen getrocknet.

Bei der Austestung mittels ELFA konnten bei allen Patientenseren RF-Werte gemessen werden, die über jenen der negativen Kontrollseren lagen. Nur ein Serum eines Patienten (A. F.) mit alveolärer Echinokokkose war auch im ELFA nur unwesentlich höher als die Negativkontrolle. In allen anderen Patientenseren konnten auch mittels ELFA RF-Werte gemessen werden, die deutlich über jenen der negativen Kontrollseren lagen, wodurch die direkte Vergleichbarkeit zwischen ELFA-Ergebnissen und den in unserem Routinelaboratorium mittels der Basistests erhobenen Resultaten auf der Basis einer qualitativen Auswertung (negativ, positiv) dokumentiert werden konnte.

Hinsichtlich der Lagerbarkeit der Antigen-beschichteten Pipettenspitzen konnte gezeigt werden, daß bei fast allen Antigenen bereits nach 20 Tagen Lagerung ein zum Teil erheblicher Aktivitätsverlust (5-74%) bei den positiven Kontrollseren auftrat. Bei den negativen Kontrollseren konnte hingegen nur eine geringgradige Änderung der RFW festgestellt werden. Ab dem 60. Tage nach der Sensibilisierung der Antigenträger konnte generell ein „Einpendeln“ der RF-Werte beobachtet werden. Die stärksten Aktivitätsverluste des Antigens nach 150tägiger Lagerung wurde bei mit *E. multilocularis*- (84%) und *Schistosoma mansoni*-Antigen (72%), die geringsten Aktivitätsverluste bei mit *Fasciola hepatica*- (71%) und *E. granulosus*-Antigen (46%) beschichteten Pipettenspitzen beobachtet werden. Trotz dieser offensichtlichen Aktivitätsverluste der verwendeten Antigene unterschieden sich die RF-Werte von positivem und negativem Kontrollserum jedoch auch nach 150 Tagen Lagerung noch deutlich (Tab. 8), so daß eine valide Aussage über die Präsenz oder Absenz von spezifischen Antikörpern gegen die getesteten Parasitenantigene angenommen werden kann. Insgesamt fielen die Aktivitätsverluste in der Versuchsserie 1 (durchgehende Lagerung des Antigen innerhalb der Pipettenspitzen bei -20°C) geringer aus als in der Versuchsserie 2, bei der die Antigenverdünnung nach der Beschichtung über Nacht (8°C) aber noch vor dem Tiefrieren aus der Pipettenspitze entfernt worden war; vermutlich hat in der Versuchsserie 1 eine weitere Antigenanlagerung auch noch während der Lagerung bei -20°C in geringem Ausmaß an die Plastikoberfläche der Pipettenspitzen stattgefunden.

Die Ergebnisse unserer Vergleichsuntersuchung zeigen, daß der ELFA unter Zuhilfenahme des VIDAS TOXO IgG-Reagenzien-Kits (der Firma bioMérieux) einen geeigneten Test zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Entamoeba histolytica*-, *Fasciola hepatica*-, *Schistosoma mansoni*-, *Echinococcus granulosus*-, *E. multilocularis*- oder *Dipetalonema viteae*-Antigen in Humansenen dar-

Tabelle 4:

Ergebnisse der Untersuchungen von 17 Seren von Bilharziose-Patienten mittels ELISA und ELFA auf spezifische Antikörper gegen *Schistosoma mansoni*-Antigen. Der cut-off liegt im ELISA bei 31 AKE, im ELFA zeigten die 12 negativen Kontrollseren Relative Fluoreszenzwerte (RFW) bis maximal 328.

Patient	ELISA (AKE)	ELFA (RFW)
12 neg. Kontrollseren	< 31	bis 328
B. J.	75	733
F. G.	50	758
M. M.	70	772
A. A. 1	80	866
A. A. 2	40	901
A. G.	75	937
M. T.	80	934
I. S.	50	950
J. M. 1	35	1019
J. M. 2	70	1071
T. G.	100	1075
S. R.	85	1095
A. S.	60	1445
A. F.	70	1466
S. M. 1	80	1486
S. M. 2	>100	2624
Y. G.	>100	2646

stellt, wobei die besonderen Vorteile dieses - allerdings nicht ganz billigen - Testsystems vor allem in der schnellen Testdurchführung liegen. Als sehr positiv zu bewertender zusätzlicher Befund unserer Untersuchung ist zu vermerken, daß die mit Antigen sensibilisierten Pipettenspitzen mehrere Wochen bis einige wenige Monate bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagerbar sind, so daß es nicht notwendig erscheint, die Antigenbeschichtung erst am Tag vor der Testdurchführung vorzunehmen, sondern daß mehrere (oder viele) Pipettenspitzen, z. B. für den Bedarf von 1 bis 2 Monaten, auf einmal sensibilisiert und eingefroren werden können, so daß sie jederzeit für eine Ausstestung zur Verfügung stehen. Damit erscheint dieser von uns für mehrere Parasitenantigene adaptierte ELFA ganz besonders geeignet für Laboratorien, die mit der Ausstestung kleiner und kleinster Patientenkollektive befaßt sind.

### Danksagung

Wir danken unseren Mitarbeiterinnen im Laboratorium, Joanna Will, Elisabeth Cholkowski-Sliwinski und Renate Schneider, für ihre gewissenhafte und sorgfältige Arbeit auch an dieser Stelle sehr herzlich.

### Zusammenfassung

Seit der Einführung der Enzymimmuntest-Technik (ELISA) zu Beginn der 70er Jahre durch ENGVALL UND PERLMANN (1971) hat sich dieses Testprinzip auch in der Diagnostik parasitär bedingter Infestationen, Infektionen und Krankheiten weitgehend durchgesetzt. In den letzten Jahren wurden darüber hinaus große Anstrengungen zur automatisierten Durchführung des ELISA unternommen.

Der „enzyme-linked fluorescent assay“ (ELFA) stellt ein Ergebnis dieser Bemühungen dar und ist unter dem Produktnamen VIDAS der Firma bioMérieux kommerziell erhältlich. Das VIDAS-Analysengerät stellt ein automatisches, universell einsetzbares System zur (gleichzeitigen) Testung mehrerer Serumproben z. B. auf verschiedene immunchemische Parameter, das Vorhandensein von Virus-Antigenen oder von Antikörpern gegen verschiedene Krankheitserreger (z. B. Rubella-, HI-, Hepatitis-Virus, *Borrelia burgdorferi*) dar.

Wir haben nun unter Zuhilfenahme jener Reaktionsstreifen, die die Testreagenzien (Verdünnungspuffer, Waschlösung, Konjugat, Substrat) zum Nachweis humaner Antikörper der IgG-Klasse (aus dem VIDAS TOXO IgG-Kit) enthalten und durch Sensibilisierung nichtbeschichteter Festphasenrezeptoren mit eigenen Parasitenantigenen, versucht, dieses Analysengerät mit einem etwa halbstündigen Testdurchlauf auch für den Antikörpernachweis gegen *Entamoeba histolytica*-, *Fasciola hepatica*-, *Schistosoma mansoni*-, *Echinococcus granulosus*-, *E. multilocularis*- und *Dipetalonema viteae*-Antigene einzusetzen. Getestet wurden Seren von Patienten mit nachgewiesenem Amöbenleberabszeß, mit verifizierter Fasziole, Bilharziose, Zystischer oder Alveolärer Echinokokkose, verschiedenen Filariosen sowie von gesunden Probanden (negative Kontrollgruppe). Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden mit den Resultaten der in unserem Routinelaboratorium etablierten Testmethoden verglichen.

Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Testergebnisse des ELFA mit jenen unserer Routine-testverfahren erscheint ein Einsatz des „enzyme-linked fluorescence assay“ in der Serodiagnostik parasitärer Infektionen sinnvoll.

### Schlüsselwörter

Enzyme-linked fluorescence assay (ELFA), VIDAS-System, *Entamoeba histolytica*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *Dipetalonema viteae*.

Tabelle 5:

Ergebnisse der Untersuchungen von 24 Seren von Patienten mit zyst. Echinokokkose mittels IHA und ELFA unter Verwendung von *E. granulosus*-Antigen. Der cut-off im IHA liegt bei 1:100, im ELFA zeigten die 12 neg. Kontrollseren Relative Fluoreszenzwerte (RFW) bis maximal 175.

Patient	IHA (Titer)	ELFA (RFW)
12 neg. Kontrollseren	<1: 100	bis 175
A. Ü.	<1: 100	401
A. S.	1: 100	412
H. K.	1: 100	413
A. S.	1: 400	505
M. S.	1: 100	605
C. W.	1: 200	619
A. D.	1: 100	674
J. B.	1: 1600	705
I. A.	1: 400	802
H. B.	1: 400	996
A. P.	1: 800	997
J. B.	1: 400	1216
J. B.	1: 1600	1321
B. A.	1: 200	1783
U. A.	1: 400	2061
S. E.	1: 800	2132
A. K.	1: 400	2288
A. A.	1: 6400	2890
J. N.	1: 400	3113
A. A.	1:12800	3335
M. H.	1: 3200	3516
A. S.	1:25600	4354
A. Ö.	1:12800	4392
S. T.	1: 1600	4738

Tabelle 6:

Ergebnisse der Untersuchungen von 10 Seren von Patienten mit alveolärer Echinokokkose unter Verwendung von *E. multilocularis*-Antigen. Der cut-off liegt im ELISA bei 31 AKE, im ELFA zeigten die 12 neg. Kontrollseren Relative Fluoreszenzwerte (RFW) bis maximal 246.

Patient	ELISA (AKE)	ELFA (RFW)
12 neg. Kontrollseren	< 31	bis 246
A. F.	30	249
Z. S.	40	328
P. R.	40	423
F. S.	55	418
E. E.	45	476
K. A.	55	715
M. M.	70	551
J. M.	>100	1871
S. K.	>100	2845
J. S.	>100	4763

## Summary

### *The enzyme-linked fluorescence assay (ELFA) as a tool for the diagnosis of parasitic infections*

Since the establishment of the ELISA technique by ENGVALL AND PERLMANN (1971) at the beginning of the seventies this test principle has proved very efficient also in the serodiagnosis of parasitic infestations, infections and diseases. During the last years, however, strong efforts have been made in order to reach complete automation of the ELISA technique. The ELFA (enzyme-linked fluorescent assay) represents a result of these efforts, it is nowadays available as a commercial product (VIDAS system) of bioMérieux for the examination of human serum for tumor markers, circulating antigens (e. g. HSV, RSV) or for specific antibodies (e. g. Rubella or Hepatitis virus, *Borrelia burgdorferi*).

In our study the ELFA technique has been adapted for the detection of circulating antibodies against parasitic antigens commercially not available from bioMérieux to be applied as a screening test. For this purpose we used the VIDAS Toxo IgG test reagent strips in combination with solid phase receptacles coated with own preparations of *Entamoeba histolytica*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis* and *Dipetalonema viteae* antigens. Sera of patients suffering from extraintestinal amoebiasis (16), bilharziosis (7), fasciolosis (9), alveolar (10) or cystic echinococcosis (24) and filariosis (5), respectively, were examined comparatively by ELFA and by our routine tests established for basic screening in our laboratory (ELISA, IHA).

Due to the fact that all sera examined in this study showed positive results in our basic screening tests as well as in ELFA, the application of ELFA in the serodiagnosis of parasitic infestations, infections or diseases can be recommended.

## Key words

Enzyme-linked fluorescence assay (ELFA), VIDAS-System, *Entamoeba histolytica*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *Dipetalonema viteae*.

Tabelle 7:

Ergebnisse der Untersuchungen von 5 Seren von Patienten mit Filariosen mittels ELISA und ELFA unter Verwendung von *Dipetalonema viteae*-Antigen. Der cut-off im ELISA liegt bei 30 AKE, im ELFA zeigten die 12 negativen Kontrollseren Relative Fluoreszenzwerte (RFW) bis maximal 247.

Patient	ELISA (AKE)	ELFA (RFW)
12 neg. Kontrollseren	< 30	bis 247
Onchozerkose	90	490
Onchozerkose	85	532
Onchozerkose	>100	545
Loiose	50	649
Lymphatische Filariose	>100	5729

Tabelle 8:

Überprüfung der Lagerbarkeit der mit Antigen beschichteten Pipettenspitzen: Die Pipettenspitzen wurden nach der Antigenbeschichtung (bei 8°C, über Nacht) entweder ohne die Antigenverdünnung aus der Spitze zu entfernen (Serie 1) oder nach Entfernen der Antigenverdünnung (Serie 2) bei -20°C gelagert und nach 20, 60 und 150 Tagen mit einem positiven und einem negativen Kontrollserum im ELFA getestet. Die Ergebnisse sind in Relativen Fluoreszenzwerten (RFW, siehe Material und Methodik) angegeben, bei den positiven Kontrollseren (+ KS) sind in Klammer die Aktivitätsverluste in%, bezogen auf den Ausgangswert, angegeben.

Versuchsserie (Lagerungs- dauer)	0 Tage + KS	0 Tage - KS	20 Tage + KS	20 Tage - KS	60 Tage + KS	60 Tage - KS	150 Tage + KS	150 Tage - KS
<i>Entamoeba histolytica</i>								
Serie 1	831	99	670 (19)	101	399 (52)	169	401 (52)	178
Serie 2			216 (74)	89	213 (74)	69	235 (72)	144
<i>Fasciola hepatica</i>								
Serie 1	1673	201	1586 ( 5)	223	1110 (34)	110	1185 (29)	131
Serie 2			1149 (31)	208	685 (59)	277	656 (61)	73
<i>Schistosoma mansoni</i>								
Serie 1	1475	530	1374 ( 7)	528	510 (65)	331	630 (57)	359
Serie 2			1018 (31)	574	495 (66)	328	415 (72)	260
<i>Echinococcus granulosus</i>								
Serie 1	7202	661	6268 (13)	578	4493 (38)	227	3890 (46)	244
Serie 2			6317 (12)	345	4098 (43)	149	4118 (43)	168
<i>Echinococcus multilocularis</i>								
Serie 1	1368	330	1281 ( 6)	366	714 (48)	274	686 (50)	335
Serie 2			614 (55)	313	360 (74)	230	217 (84)	162
<i>Dipetalonema viteae</i>								
Serie 1	2335	153	2501 (+ 7)	188	988 (58)	163	1218 (48)	122
Serie 2			2610 (+12)	125	828 (65)	95	1217 (48)	75

### Literatur

1. 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.
2. AUER, H., RADDI, A. C., ESCALONA, T., ASPÖCK, H. (1995):  
Seroepidemiological studies in Oriental Mindoro (Philippines) - Prevalence of parasitic zoonoses. Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 17, 153-158.
3. ENGVALL, E., PERLMANN, P. (1971):  
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 8, 871-874.
4. RADDI, A. C., AUER, H., ESCALONA, T. G., HARTNETT, I., ASPÖCK, H. (1995):  
Seroepidemiological studies in Oriental Mindoro (Philippines) - Prevalence of mosquito-borne parasitoses. Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 17, 159-168.
5. 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 f. Medizinische Parasitologie  
Klinisches Institut f. Hygiene d. Universität  
Kinderspitalgasse 15  
A-1095 Wien · Austria





# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://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: 1997

Band/Volume: [19](#)

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

Artikel/Article: [Der Einsatz des "enzyme-linkedfluorescence assay" \(ELFA\) in der Serodiagnostik parasitärer Infektionen. 129-136](#)