

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8 (1986) 17–22

Abteilung für Med. Parasitologie (Leiter: Univ.-Prof. Dr. H. Aspöck) des Hygiene-Instituts
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Flamm) der Universität Wien

Erfahrungen bei der Serodiagnostik der Echinokokkosen mittels ELISA

H. Auer, O. Picher, H. Aspöck

Einleitung

Die Serodiagnostik der zu den gefährlichsten Wurmerkrankungen des Menschen zählenden und im wesentlichen durch *Echinococcus granulosus* (Eg) und *Echinococcus multilocularis* (Em) hervorgerufenen Echinokokkosen basiert vornehmlich auf dem Nachweis humoraler Antikörper.

Zur Feststellung von Echinococcus-Antikörpern stehen mehrere serologische Testmethoden unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität zur Verfügung; Der Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony, die Immunelektrophorese, die Gegenstrom-Elektrophorese und auch die Komplementbindungsreaktion (KBR) gelten als spezifische, jedoch wenig sensitive Tests; die Agglutinationstests (z. B. der Indirekte Hämagglutinationstest – IHA), vor allem aber die Konjugat-Testmethoden (Indirekter Immunfluoreszenztest – IIFT, Enzymimmuntest – ELISA, Radioimmuntest – RIA) werden hingegen als Verfahren mit hoher Sensitivität angesehen. Um die Sicherheit des Antikörper-Nachweises zu erhöhen, werden daher zwei oder mehrere Testmethoden gleichzeitig und möglichst unter Verwendung verschiedener Antigene bzw. Antigen-Präparationen durchgeführt (ECKERT und WISSLER 1978; JANITSCHKE et al. 1981).

In Anbetracht der Tatsache, daß in Österreich sowohl Eg, der Erreger der zystischen Echinokokkose (ZE), als auch Em, der Erreger der alveolären Echinokokkose (AE) autochthon vorkommt (AUER und ASPÖCK 1985), werden an den Serodiagnostiker besonders hohe Anforderungen bezüglich Test-Sensitivität und -Spezifität gestellt.

Um vor allem menschliche Fälle alveolärer Echinokokkose mit größerer Sicherheit abklären zu können, haben wir für unser Echinokokkose-Routine-Laboratorium einen ELISA mit Em-Antigen (Em-ELISA) adaptiert. Im Zuge der Test-Evaluierung wurden Seren von Patienten mit gesicherter ZE bzw. AE sowohl im Em-ELISA, als auch in der in vielen Laboratorien verwendeten Testkombination IHA und KBR (in beiden Tests wird Eg-Antigen verwendet) auf Echinococcus-Antikörper untersucht. Über die Ergebnisse dieser Vergleichsstudie und über den Einsatz des Em-ELISA als Test zur Überprüfung des Therapie-Erfolges nach einem chirurgischen Eingriff soll im folgenden berichtet werden.

Material und Methoden

Em-ELISA

– Verwendete Reagenzien:

- Antigen: Wasserlöslicher Extrakt aus in weißen Mäusen gezüchteten Em-Metazestoden; Proteingehalt: 38 mg/ml.
- Konjugat: Peroxidase-gekoppeltes Antihuman-IgG (Cappel Lab, USA).
- Substrat: H_2O_2 + 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure.

- Kontrollseren: **positive Kontrolle:** Serumpool von Patienten mit gesicherter Eg- bzw. Em-Infektion.
negative Kontrolle: Serumpool von Blutspendern.
- Durchführung:
Die Nöpfchen der Mikrotiterplatten (MTP) (Costar®) wurden mit je 0,1 ml Antigen betropft; die Anlagerung erfolgte bei +4° C (über Nacht). Nach einem Waschvorgang wurden die Seren in die MTP eingebracht und verdünnt (1:25, 50, ... 3200). Nach einstündiger Inkubation bei +37° C und einem zweiten Waschvorgang wurden die Nöpfchen mit Konjugat (Verdünnung 1:2000) betropft. Einer einstündigen Inkubation bei +37° C folgte ein dritter Waschvorgang; anschließend wurde Substrat zugegeben, und nach weiteren 60 Minuten erfolgte die photometrische Ableseung (Filter: 450 nm).
- Auswertung:
Um besser reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Extinktion der zu testenden Patientenseren mit der Extinktion der positiven und der negativen Kontrolle in Beziehung gesetzt (ZAHNER et al. 1981). Dabei erhält man einen in Prozenten (%) ausgedrückten Indexwert I. Nach Austestung von Seren von Patienten mit extraintestinaler Amoebiasis, Toxoplasmose, Fasziole, Bilharziose bzw. Zystizerkose, sowie Seren von klinisch gesunden Schwangeren wurde ein Schwellenwert von 30% (bei einer Serum-Verdünnung von 1:400) festgelegt; darüber liegende Werte wurden als schwach/grenzwertig positiv bzw. positiv (I > 50%) bewertet.

IHA

Cellognost® Echinococcosis (Behringwerke, BRD).

KBR

Antigen: Echinokokken-Antigen (Behringwerke, BRD).

Testseren

- 12 Seren von 12 Patienten mit klinisch und/oder histologisch und/oder parasitologisch gesicherter Em-Infektion;
- 11 Seren von 11 Patienten mit klinisch und/oder histologisch und/oder parasitologisch gesicherter Eg-Infektion;
- 14 Seren von 2 Patienten mit klinisch, histologisch und parasitologisch gesicherter Eg-Infektion (serologische Verlaufskontrollen nach chirurgischem Eingriff).

Ergebnisse

- **der serologischen Untersuchungen bei AE-Patienten (Tab. 1)**
Im Em-ELISA reagierten alle 12 getesteten Seren eindeutig positiv (I > 50%). Im IHA erreichten 2 Seren Titer von 1:256 bzw. 1:128; 2 Seren wiesen Titer von 1:32 auf; 8 Seren waren negativ. In der KBR reagierten nur 2 Seren positiv (1:5 und 1:20).
- **der serologischen Untersuchungen bei ZE-Patienten (Tab. 2)**
Im Em-ELISA reagierten 10 der 11 getesteten Seren positiv (I > 50%); für 1 Serum wurde ein Indexwert von 30% errechnet. Im IHA wiesen 8 Seren Titer von 1:128 oder höher auf; 1 Serum erreichte einen Titer von 1:32, 2 Seren waren negativ. In der KBR zeigten 8 von 12 Seren positive Reaktionen (1:5 oder höher).

TABELLE 1: Ergebnisse von 12 im Em-ELISA, IHA und KBR auf Echinococcus-Antikörper getestete Seren von Patienten mit gesicherter Echinococcus multilocularis-Infektion. Em-ELISA: %-Werte (siehe Text); IHA, KBR: Titer (reziprok)

	H.M.	K.W.	T.T.	X.A.	J.U.	B.R.	F.M.	C.U.	X.G.	V.K.	E.Z.	A.G.
Em-ELISA	237	198	162	161	150	136	105	100	94	72	69	60
IHA	256	128	32*	neg	neg	neg	neg	neg	neg	32*	neg	neg
KBR	20	5	neg									

* Titer von 1:32 bis 1:128 sind nur mit dem positiven Ergebnis einer zweiten serologischen Methode (z. B. KBR) zu bewerten (Beringwerke, Marburg)

TABELLE 2: Ergebnisse von 11 im Em-ELISA, IHA und KBR auf Echinococcus-Antikörper getestete Seren von Patienten mit gesicherter Echinococcus granulosis-Infektion. Em-ELISA: %-Werte (siehe Text); IHA, KBR: Titer (reziprok)

	L.J.	K.A.	A.R.	R.U.	M.T.	G.V.	S.B.	C.M.	M.K.	M.K.	J.H.
Em-ELISA	108	101	83	79	70	59	59	56	56	54	30
IHA	128*	4000	512	1000	1000	1000	8000	256	8000	neg	32*
KBR	5	20	40	5	20	10	10	20	neg	neg	neg

* Titer von 1:32 bis 1:128 sind nur mit dem positiven Ergebnis einer zweiten serologischen Methode (z. B. KBR) zu bewerten (Beringwerke, Marburg)

– **der serologischen Untersuchungen bei 2 operierten ZE-Patienten (serologische Verlaufskontrollen)**

- Dem Patienten A.R. wurde zu Beginn des Jahres 1985 eine Echinococcus-Zyste (8 cm Ø) aus dem rechten Leberlappen in toto entfernt. Präoperativ reagierte das Serum des Patienten sowohl im Em-ELISA (83%), als auch im IHA (1:512) und in der KBR (1:40) positiv (Tab. 3). Bereits wenige Wochen nach der Operation sank der Antikörper-Spiegel stark ab. Im IHA und in der KBR waren zwei Monate post operationem keine Antikörper mehr nachweisbar; mittels Em-ELISA wurde ein niedriger Antikörper-Spiegel festgestellt (40%).
- Beim Patienten A.H. war eine Echinococcus-Zyste in der Hinterwand des linken Ventrikels festgestellt worden. Im Verlauf des chirurgischen Eingriffes wurde die Zyste eröffnet. Sechs Monate nach der Herzoperation verstarb der Patient nach einer progredient verlaufenen zerebralen Echinokokkose. Alle 9 während des Beobachtungszeitraumes durchgeführten serologischen Untersuchungen erbrachten sowohl im Em-ELISA, als auch im IHA und in der KBR positive Befunde (Tab. 4).

TABELLE 3: Verlauf der im Em-ELISA, IHA und in der KBR festgestellten Antikörperkonzentrationen beim Patienten A.R. (Echinococcus granulosus-Zyste im rechten Leberlappen) in den Monaten Jänner bis August 1985. Em-ELISA: %-Werte (siehe Text); IHA, KBR: Titer (reziprok)

Datum	Em-ELISA	IHA	KBR
3. 1. 1985	83	512	40
23. 1. 1985	99	128	40
12. 2. 1985	Exstirpation des Parasiten		
3. 4. 1985	68	neg	neg
17. 4. 1985	40	neg	neg
7. 8. 1985	17	neg	neg

TABELLE 4: Verlauf der im Em-ELISA, IHA und in der KBR festgestellten Antikörperkonzentrationen beim Patienten A.H. (Echinococcus granulosus-Zyste in der Hinterwand des linken Ventrikels) in den Monaten August 1982 bis März 1983. Em-ELISA: %-Werte (siehe Text); IHA, KBR: Titer (reziprok)

Datum	Em-ELISA	IHA	KBR
26. 8. 1982	60	16000	10
2. 9. 1982	103	32000	10
6. 9. 1982	76	16000	10
13. 9. 1982	83	32000	20
28. 9. 1982	Operation, Zysteneröffnung		
11. 10. 1982	91	32000	80
27. 10. 1982	83	256000	20
15. 12. 1982	85	512000	80
Anfang Jänner 1983: ZNS-Symptomatik			
9. 3. 1983	69	2000	5
14. 3. 1983	72	2000	5
26. 3. 1983	Exitus letalis		

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird über einen Enzymimmuntest (Em-ELISA) berichtet, der von uns im besonderen für die serologische Abklärung von Em-Infektionen entwickelt und für das Routine-Laboratorium adaptiert wurde. Im Zuge der Test-Evaluierung sollte die Sensitivität des Em-ELISA für Em-, aber auch für Eg-Infektionen überprüft

werden. Aus diesem Grund wurden Seren von Patienten mit gesicherter AE bzw. ZE mittels Em-ELISA und – vergleichend dazu – im IHA und in der KBR, der in vielen Laboratorien verwendeten Test-Kombination, auf *Echinococcus*-Antikörper untersucht.

Der Em-ELISA erwies sich dabei nicht nur bei der Untersuchung der AE-, sondern auch bei den ZE-Seren, trotz Verwendung von heterologem Antigen, als sehr sensitiv: Alle 12 von AE-Patienten stammenden Seren und 10 von 11 ZE-Patientenserum (=91%) wurden von Em-ELISA als positiv „erkannt“ (Das vom Em-ELISA nicht „erkannte“ ZE-Serum stammte von einer Patientin mit einer stark fibrotisierten *Echinococcus*-Zyste). Im IHA und in der KBR reagierten dagegen nur 2 von 12 AE- (=17%) und 9 von 11 ZE-Patientenserum (=82%) positiv.

Während sich also der Em-ELISA zur serologischen Abklärung von AE- und ZE-Verdachtsfällen anbietet, erscheint der IHA, entgegen der Auffassung des Kit-Herstellers, für die Serodiagnose der AE nicht geeignet. Für die ZE konnte immerhin ein IHA-Sensitivitätsgrad von 82% errechnet werden; auch von JANITSCHKE (1985) wird die Sensitivität für den Behring-IHA mit ca. 80% angegeben.

Die KBR erwies sich auch in dieser Studie als wenig sensitiv und hat deshalb nur geringe diagnostische Bedeutung (ECKERT und WISSLER 1978; JANITSCHKE et al. 1981; JANITSCHKE 1985). Trotzdem wird die KBR in Österreich noch häufig verwendet, da sie der einzige Test ist, der mit dem Krankenversicherungsträger direkt verrechnet werden kann.

Am Beispiel von zwei ZE-Patienten konnte im Rahmen dieser Vergleichsstudie überdies gezeigt werden, daß der Em-ELISA auch zur Überprüfung des Therapie-Erfolges, nach einem chirurgischen Eingriff, eingesetzt werden kann. Während im Fall A.R. der Antikörper-Spiegel nach radikaler (in toto-)Entfernung des Parasiten rasch absank, konnten beim Patienten A.H., bei dem es zu einer intraoperativen Zysten-Eröffnung und dabei sehr wahrscheinlich zu einer Parasiten-Aussaat gekommen war, im gesamten postoperativen Beobachtungszeitraum hohe Antikörper-Konzentrationen im Serum des Patienten mittels Em-ELISA, IHA und KBR nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung veranlaßten uns, den Em-ELISA als Basistest im Echinokokkose-Routine-Laboratorium einzusetzen.

Zusammenfassung

Es wird ein Enzymimmuntest mit *Echinococcus multilocularis*-Antigen (Em-ELISA) vorgestellt. Im Rahmen der Test-Evaluierung überprüften wir die Sensitivität des Em-ELISA für Fälle alveolärer und zystischer Echinokokkose und verglichen dabei die erhaltenen Ergebnisse mit den im Indirekten Hämagglutinationstest (IHA) und in der Komplementbindungsreaktion (KBR) eruierten Resultaten. Der Em-ELISA erreichte bei der Untersuchung von Seren von Patienten mit Em-, aber auch bei Patienten mit *Echinococcus granulosus*-Infektionen eine höhere Sensitivität als der IHA und die KBR. Am Beispiel zweier Patienten mit zystischer Echinokokkose wird überdies gezeigt, daß der Em-ELISA auch zur Überprüfung des Therapie-Erfolges nach einer chirurgischen Intervention eingesetzt werden kann.

Summary

Experiences on the serodiagnosis of echinococcosis by ELISA

In a comparative study sera of patients with alveolar (ae) and with cystic echinococcosis (ce) respectively were tested for anti-*Echinococcus* antibodies by an enzyme-

linked immunosorbent assay using *Echinococcus multilocularis* antigen (Em-ELISA) on one hand and by passive hemagglutination test (PHT) and complement fixation test (CFT) on the other. In contrast to PHT and CFT Em-ELISA proved to be highly sensitive for infections with *Echinococcus multilocularis* as well as with *Echinococcus granulosus*. Furthermore it could be demonstrated that the Em-ELISA may be useful for serological surveillance of patients after surgical treatment.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AE:	alveoläre Echinokokkose
Eg:	<i>Echinococcus granulosus</i>
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
Em:	<i>Echinococcus multilocularis</i>
I:	Indexwert
IHA/PHT:	Indirekter Hämagglutinationstest/passive hemagglutination test
IIFT:	Indirekter Immunfluoreszenztest
KBR/CFT:	Komplementbindungsreaktion/complement fixation test
MTP:	Mikrotiterplatte
RIA:	radioimmunosorbent assay
ZE:	zystische Echinokokkose

Literatur

- AUER, H., ASPÖCK, H. (1985): Echinokokkose in Österreich: Eine kritische Übersicht. Mitt. Öst. Ges. Tropenmed. Parasitol. 7, 101–107.
- ECKERT, J., WISSLER, K. (1978): Immundiagnose und Therapie der Echinokokkose. Rev. thérapeutique 35, 766–776.
- JANITSCHKE, K., KARAVIAS, T., WERNER, H., ROZYCKI, C. (1981): Vergleich der Sensitivität und Spezifität verschiedener serologischer Methoden zum Nachweis von Echinokokkose. Lab med. 5, 274.
- JANITSCHKE, K. (1985): Marktübersicht und Bewertung kommerzieller Reagenzien zum Nachweis von Antikörpern gegen Parasiten. Lab. med. 9, 324–326.
- ZAHNER, H., FAILING, K., KRAUSS, H., ARENS, M., HAMMES, H. (1981): Ein Beitrag zur stufenlosen Antikörperbestimmung mit dem „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA). Immun. Infekt. 9, 33–39.

ANSCHRIFT DER AUTOREN:

Dr. Herbert Auer, Dr. Otto Picher, Univ.-Prof. Dr. H. Aspöck
Abt. Med. Parasitologie, Hygiene-Institut der Universität
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien

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: 1986

Band/Volume: [8](#)

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

Artikel/Article: [Erfahrungen bei der Serodiagnostik der Echinokokkosen mittels ELISA. 17-22](#)