

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8 (1986) 23–32

Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. G. Wiedermann) (1)

Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Wien
(Vorstand: Univ.-Prof. DDr. M. Peterlik) (2)

Hygieneinstitut der Universität Wien (Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Flamm) (3)

Diagnostik der Amöbiasis mit Hilfe klassenspezifischer Antikörper

Cornelia Stock¹, H. Auer³, O. Pichler³, O. Scheiner²

Einleitung

Die Frühdiagnostik der extraintestinalen Amöbiasis ist von großem Wert für die Klinik. Aus diesem Grund stellten wir uns die Aufgabe, einen ELISA zum Nachweis Amöben-spezifischer Antikörper zu entwickeln, um die Immunantwort bei invasiver Amöbiasis möglichst exakt erfassen und verfolgen zu können. Zu diesem Zwecke wurden zwei unterschiedliche Antigenfraktionen (Zytoplasma- und Membranfraktion) von Kulturamöben hergestellt, und die Antikörper-Antwort der Patienten gegenüber diesen Fraktionen bestimmt und verglichen. Weiters wurde untersucht, ob eine Aussage über die Immunantwort innerhalb der Ig-Klassen zu treffen und ob jene von diagnostischem Wert ist.

Material und Methodik

Amöben: Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* des Stammes A3 wurden monoxenisch in Medium TYI-S₃₃ nach Diamond kultiviert (1980). Für alle Antigenpräparationen wurden die Kulturen 72 Stunden nach dem Überimpfen geerntet.

Antigenherstellung: ca. $2 \cdot 10^8$ Trophozoiten wurden $3 \times$ in Phosphat-gepuffertem isotonen NaCl, pH 7.5 (PBS), gewaschen, letztlich in 1–2 l PBS resuspendiert und bei -20°C bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt. Die aufgetaute Amöbensuspension wurde mit 100 μl PMSF (114 mM in i-Propanol) versetzt und danach mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem bei 0°C 2–3 min homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat 15 min bei 1900 g zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde abgehoben und 1 h bei 25000 g zentrifugiert (4°C). Der Niederschlag wurde als „Membranfraktion“, der Überstand als „Zytoplasmafraktion“ bezeichnet. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951).

Für den ELISA wurden Dynatech (M 129A) Mikrotiterplatten, F-Form verwendet.

Die Platten wurden mit 75 μl Antigen (5 μg Protein/ml 50 mM CO_3^{2-} -Puffer, 0.02% NaN_3 , pH 9.6) bzw. nur mit Karbonat-Puffer über Nacht bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten mit PBS 0.05% TWEEN 20 (PBS-TWEEN) gewaschen und mit 2%igem BSA und PBS-TWEEN über Nacht bei 4°C abgesättigt. Anschließend wurden die Platten $3 \times$ mit PBS-TWEEN gewaschen. Eine Lagerung der fertigen Platten bei -20°C war für die Bestimmung von IgA- und IgG-; nicht aber von IgM-Antikörpern möglich.

Die zu untersuchenden Sera wurden mit 2%iger BSA in PBS-TWEEN 1:2000 (IgG, IgM) und 1:40 (IgA) vorverdünnt und in den ELISA-Platten zu Zweierschritten weiter-

verdünnt. Hierauf wurden die Platten bei 4° C über Nacht inkubiert. Dann wurde 3 × mit PBS-TWEEN gewaschen.

ELISA: Fc-spezifisches anti-human IgG bzw. -IgM von der Ziege, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (ALP) (Fa. Atlantic Antibodies, Nonesuch Rd, Scarborough, Me. USA) wurde in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:800 verwendet. Die Verdünnung erfolgte mit 2%iger BSA in PBS-TWEEN. Für den Nachweis von IgA-Antikörper wurde ein ALP-konjugiertes anti-human IgA (kettenspezifisch Fa. TAGO, INC. Burlingame, CA 94010, USA) in einer Verdünnung von 1:3000 in 2%iger BSA, in PBS-TWEEN verwendet.

75 µl Konjugatverdünnung wurde zupipettiert; die Platten wurden 2 Stunden bei 37° C belassen. Nach der Inkubation wurden die Platten 3 × mit PBS-TWEEN gewaschen.

Das Substrat wurde kurz vor dem Gebrauch hergestellt. Eine Substrattablette (p-Nitrophenylphosphat 5 mg, Fa. Sigma) wurde in 5 ml 10% Diäthanolaminpuffer, pH 9.8 gelöst. 75 µl dieser Substratlösung wurde zupipettiert; die Reaktion wurde nach 30 min mit 3 M NaOH abgestoppt, und die Extinktion bei 405 nm abgelesen (Dynatech).

Titerbestimmung: Bei jedem Test wurde ein Postivstandard (ein hochtitriges Serum eines Patienten nach akutem Amöben-Leberabszeß) und ein Negativstandard (Normalhumanserum-Pool) mitgeführt. Die Berechnung des Titers wurde folgendermaßen

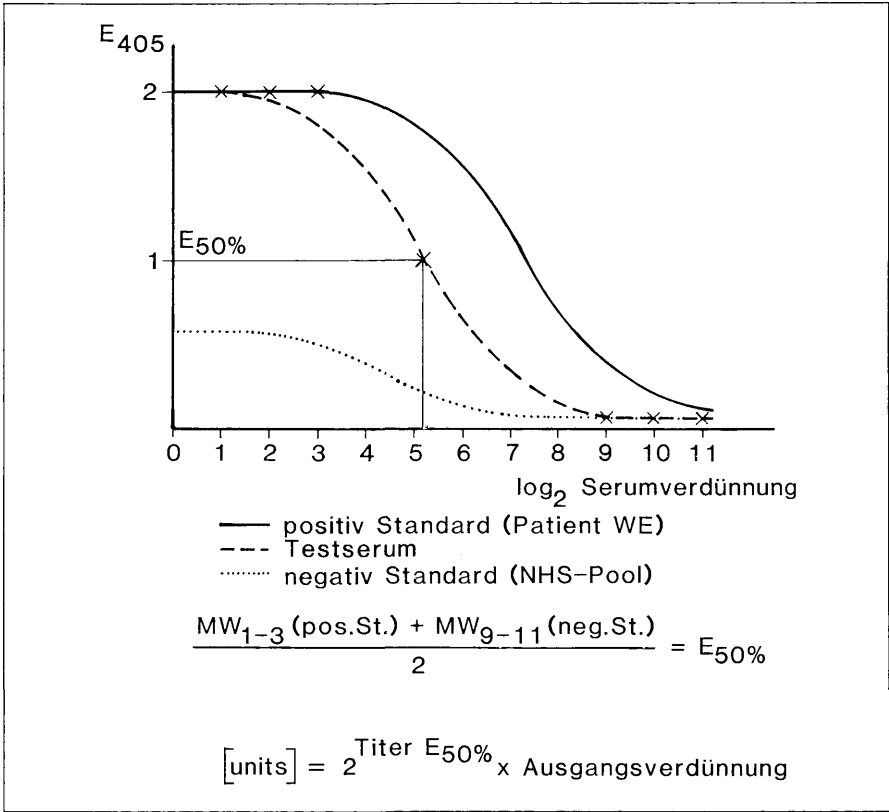


Abb. 1: Titerbestimmung

festgelegt: Es wurde der Mittelwert der Extinktionen der ersten 3 Verdünnungen des Positivstandards sowie der Mittelwert der Extinktion der letzten Verdünnungen des Negativstandards berechnet und daraus der Mittelwert gezogen ($E_{50\%}$). Nach Aufnahme einer Titrationskurve der Patientensera wurde die Verdünnung des Patientenserums bei $E_{50\%}$ bestimmt. Diese Berechnung hat den Vorteil, daß $E_{50\%}$ von der maximalen Extinktion weitgehend unabhängig ist, und kein willkürlicher Cut-off festgelegt werden muß. Fand sich bei der Kontrolle mit unbeschichteten Näpfen ein signifikanter Titer, so wurde dieser vom Titer, bestimmt mit Antigen-beschichteten Näpfen abgezogen.

Die Ergebnisse wurden in Units angegeben (Abb. 1).

6 Gruppen von Patienten wurden erfaßt:

35 Sera von Patienten mit nachgewiesener invasiver Amöbiasis (Amöbenpatienten = AP)

Davon waren:

13 Sera von 6 Patienten mit akutem Leberabszeß bzw. bis zu zwei Monaten nach Ausbruch der Krankheit.

5 Sera von 4 Patienten, abgenommen 3–12 Monate nach der Erstellung der Diagnose Amöben-Leberabszeß

3 Sera von einem Patienten jeweils 2, 3, 4 Jahre nach Erstellung der Diagnose Amöben-Leberabszeß

2 Sera eines Patienten mit rezidivem Leberabszeß

12 Sera von 5 Patienten mit einer intestinalen, invasiven Amöbiasis.

17 Sera von nicht-Amöbenpatienten (= NAP)

14 Sera von 12 Patienten mit parasitären Infektionen (Echinococcosis, Schistosomiasis, Toxocariose, Toxoplasmosis, Fascioliasis, Zystizerkose), 2 Rheumafaktor positiv, 1 SLE

21 Sera von Kindern ohne parasitäre Infektion = Ki

12 Sera von schwangeren Frauen ohne manifeste Infektion = GR

(Test auf Toxoplasmosis)

19 Personen, die auf Tropentauglichkeit untersucht wurden und die nach eigenen Angaben Europa nie verlassen hatten = TT

129 Tropenrückkehrer = TR (Personen, die sich einer routinemäßigen Tropenrückkehruntersuchung unterzogen hatten).

Ergebnisse und Diskussion

IgG-Antwort gegen *E. histolytica*

Die Sera von Personen der Gruppe AP (Amöbenpatienten; s. o.) wiesen sowohl gegenüber der Membranfraktion (im Mittel 12800 U) wie gegenüber der Zytoplasmafraktion (im Mittel 3200 U) hohe Titer in der IgG-Klasse auf (Abb. 2a und 2b). Bis zu 4 Jahren nach Erstellung der Diagnose konnte bei einem Patienten ein signifikanter Titer gegenüber der Membranfraktion (1600 U) und der Zytoplasmafraktion (800 U) beobachtet werden. Alle Patienten der Gruppe AP wiesen bei Verwendung der Membranfraktion >1600 U auf; bei Verwendung der Zytoplasmafraktion zeigte ein einziges Serum <200 U (Membranfraktion 2000 U). Dieses Serum stammte von einer Patientin, bei der einige Tage später ein Amöben-Leberabszeß diagnostiziert wurde. Folgende Serumproben dieser Patientin zeigten, daß bereits nach einigen Tagen IgG-Antikörper (1600 U) gegenüber der Zytoplasmafraktion gebildet wurden.

47% der Gruppe Patienten mit einer parasitären Infektion (NAP) erreichten 200 bis 500 U IgG gegenüber der Membranfraktion. Diese Tatsache ließe sich durch eine Kreuzreaktion der Antikörper dieser Patienten mit Amöbenantigenen, aber ebenso im Sinne eines polyklonalen Stimulus infolge der parasitären Infektion erklären, wodurch vermehrt natürliche Antikörper gegen Amöben gebildet würden (s.u.). Diese offenbar nicht Amöben-spezifischen Reaktionen sind gegenüber der Zytoplasmafraktion kaum zu beobachten (Abb. 2b).

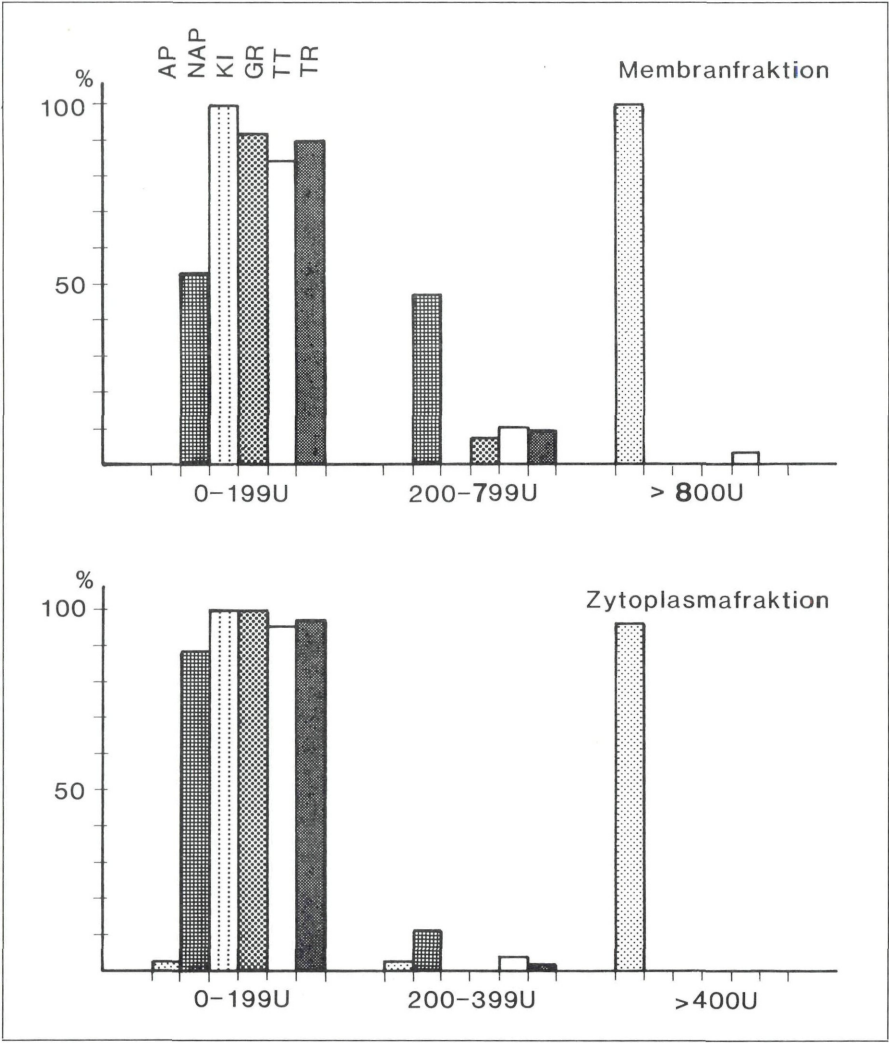


Abb. 2a und 2b: IgG-Antwort gegenüber *E. histolytica*. Membran- und Zytoplasmafraktion (ELISA). AP: Sera von Patienten mit nachgewiesener invasiver Amöbiasis. NAP: Sera von Patienten mit anderen parasitären Infektionen. KI: Sera von Kindern ohne parasitäre Infektion. GR: Sera von schwangeren Frauen ohne manifeste Infektion. TT: Sera von Personen, die auf Tropentauglichkeit untersucht wurden und Europa nie verlassen hatten. TR: Sera von Tropenrückkehrern

TABELLE 1: Vergleich der Antikörperantwort gegen *E. histolytica* – Membran- und Zytoplasmafraktion (ELISA)

	Membran-Fr.		Zytoplasma-Fr.	
	IgG			
	Units (MW)	Range	Units (MW)	Range
AP	12.800	1.600–45.000	3.200	0–45.000
NAP	<200	0–500	<200	0–280
KI		0	0	
GR	<200	0–320		
TT	<200	0–880	<200	0–260
TR	<200	0–760	<200	0–420
	IgM			
AP	360	0–1.400	<200	0–400
NAP	<200	0–320	0	
KI	0		0	
GR	0		0	
TT	<200	0–200	0	
TR	<200	0–720	<200	0–200
	IgA			
AP	200	0–3.800	<40	0–320
NAP	<40	0–50	0	
KI	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GR	0		0	
TT	0		0	
TR	<n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

AP: Sera von Patienten mit nachgewiesener invasiver Amöbiasis. NAP: Sera von Patienten mit anderen parasitären Infektionen. KI: Sera von Kindern ohne parasitäre Infektion. GR: Sera von schwangeren Frauen ohne manifeste Infektion. TT: Sera von Personen, die auf Tropentauglichkeit untersucht wurden und Europa nie verlassen hatten. TR: Sera von Tropenrückkehrern

Mit Hilfe der oben angeführten Daten (Tabelle 1) wurde bei Verwendung von Membranfraktionen eine Signifikanzgrenze von ≥ 800 U, bei Verwendung von Zytoplasmafraktion eine solche von ≥ 400 U festgelegt.

IgM-Antwort gegen *E. histolytica*

Die Immunantwort von Amöbenpatienten in der Klasse IgM ist deutlich schwächer ausgeprägt (Tabelle 1); signifikante Titer (≥ 400 U) lassen sich nur bei Verwendung von Membranantigen beobachten (Abb. 3 a und 3 b). 17% der Sera (6) der Gruppe AP wiesen einen IgM-Titer von mehr als 400 U auf.

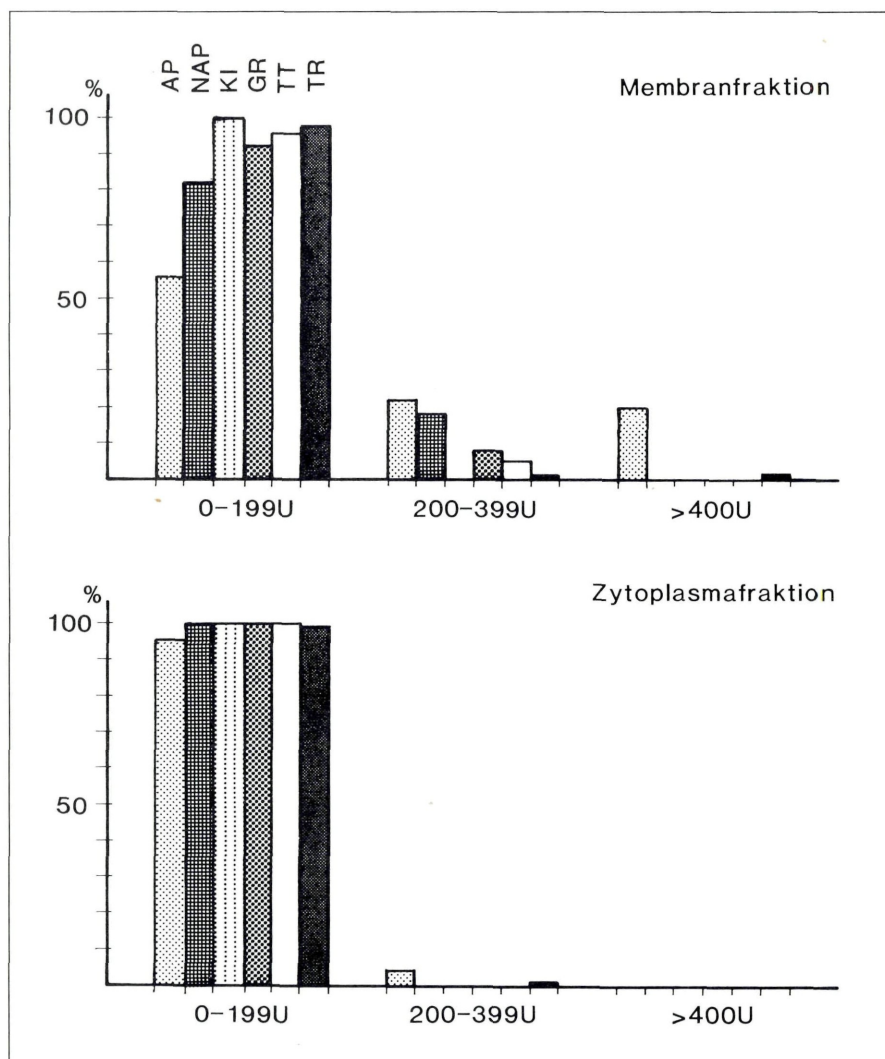


Abb. 3 a und 3 b: IgM-Antwort gegenüber *E. histolytica*. Membran- und Zytoplasmafraktion (ELISA). AP: Sera von Patienten mit nachgewiesener invasiver Amöbiasis. NAP: Sera von Patienten mit anderen parasitären Infektionen. KI: Sera von Kindern ohne parasitäre Infektion. GR: Sera von schwangeren Frauen ohne manifeste Infektion. TT: Sera von Personen, die auf Tropentauglichkeit untersucht wurden und Europa nie verlassen hatten. TR: Sera von Tropenrückkehrern

Alle diese Sera stammten von Patienten mit extraintestinaler Amöbiasis, 4 Sera stammten von Patienten mit akutem Amöbenleberabszeß und 2 Sera von Patienten 2–8 Monate nach der Erstellung der Diagnose Amöben-Leberabszeß (Abb. 4).

Es ist empfehlenswert, für jedes Serum eine Kontrolle mit unbeschichteten Näpfen mitzuführen. Insbesondere wichtig ist dies bei Nachweis von anti-Amöben IgM.

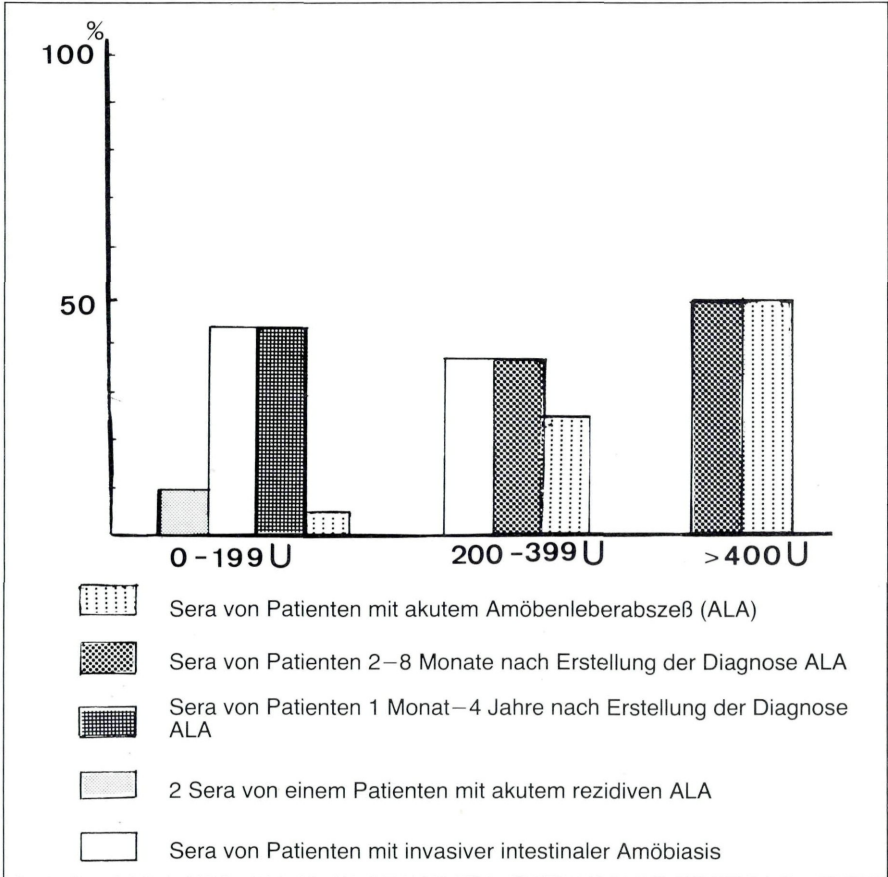


Abb. 4: IgM-Antwort gegenüber *E. histolytica* der Gruppe AP: Membranfraktion

Es sei erwähnt, daß offenbar niedrigere Titer gegen *E. histolytica* (20 U–60 U), IgM und IgG bei Normalpersonen (gesundes Laborpersonal ohne jede einschlägige Anamnese) immer zu beobachten sind. Diese „natürlichen“ Antikörper erkennen auch andere Antigene als jene von Amöbenpatienten mit hohen Titern, wie mittels Western-blot-Technik nachgewiesen werden konnte (SCHULZ et al., zur Veröffentlichung eingereicht).

IgA-Antwort gegen *E. histolytica*

Die verhältnismäßig schwache Immunantwort der Gruppe AP in der Klasse IgA (MW 200 U) ähnelt jener in der Klasse IgM: signifikante Titer sind nur gegenüber der Membranfraktion feststellbar (Tabelle 1). Auffallend ist die Tatsache, daß lediglich von Patienten mit einem akuten bzw. abgeheilten Amöbenleberabszeß signifikante Titer erreicht werden (Abb. 5).

Nur 2 Sera von 2 Patienten mit akutem Amöbenleberabszeß hatten einen Titer von 80–160 U (Abb. 5). Einer der beiden Patienten entwickelte innerhalb von 3 Tagen nach der ersten Bestimmung IgA-Antikörper mit einem Titer von 3800 U (während die IgM-Antwort eher schwach blieb: 230 U). Der andere Patient hatte wohl eine niedrige Immunantwort in der Klasse IgA, die IgM-Antwort war jedoch sehr stark (>1000 U).

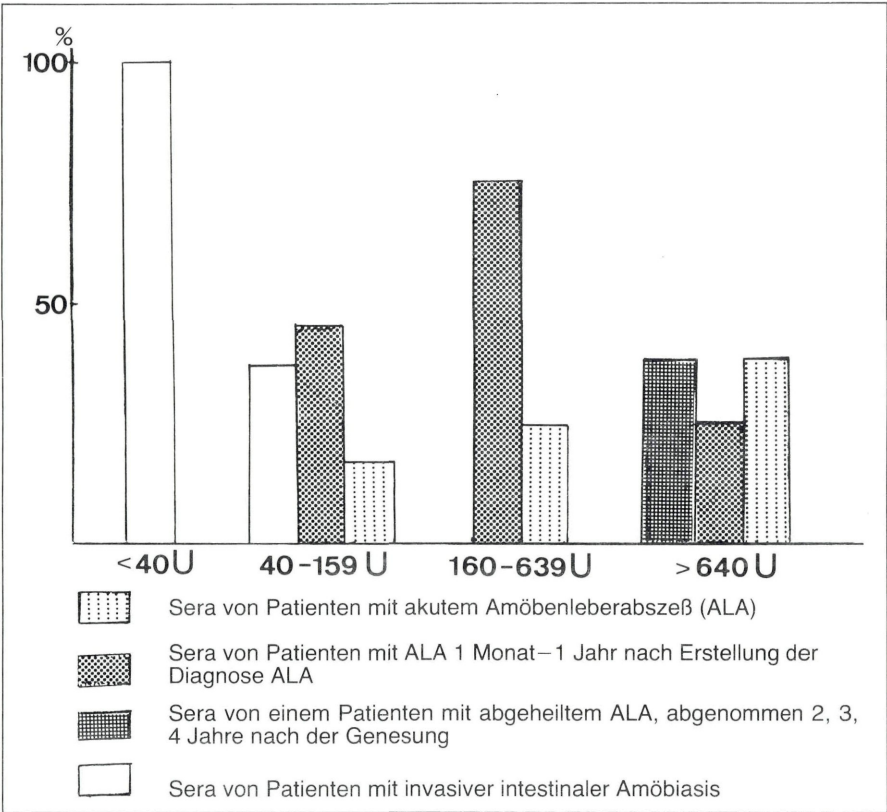


Abb. 5: IgA-Antwort gegenüber E. histolytica der Gruppe AP: Membranfraktion

TABELLE 2: Vergleich der serologischen Methoden

	falsch pos.	falsch neg.
IHA	5/161	1/15
IIFT	2/37	3/8
ELISA		
IgG (MF)	1(?) / 202	0/36
IgG (ZF)	0/202	1/36
IHA pos 1:128 IIFT pos 1:128 ELISA IgG (MF) pos 600 U IgG (ZF) pos 400 U		

Leider hatten wir nur wenige Daten vom indirekten Hamagglutinationstest (IHA) und indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) zur Verfügung, um diese mit dem ELISA zu

vergleichen. IHA und IIFT wurden dann als positiv bewertet, wenn sie einen Titer von 1:128 aufwiesen. Es zeigte sich, daß alle im IHA ausgetesteten Sera von Patienten (5) mit anderen parasitären Infektionen (*Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni* und *Echinococcus*) falsch positiv bewertet wurden. Die Titer reichten von 1:2000 bis 1:32000. Ein Serum eines Patienten mit *Echinococcus* wurde im IIFT 1:512 falsch positiv bewertet, ferner ein SLE-Serum mit 1:160. Die ELISA-Ergebnisse waren sehr zufriedenstellend (s. o.).

Für KNOBLOCH et al. (1982), die sich an die Arbeitsvorschrift von VOLLER et al. (1976) hielten, ist der ELISA im Vergleich zur Komplementbindungsreaktion (KBR), zum IHA und zum IIFT der sensitivste Test zur Bestimmung von Amöben IgG, und das schon in der ersten Woche nach Auftreten der ersten Symptome eines Amöben-Leberabszesses (Fieber, Schmerz im Oberbauch). Bei uns jedoch wies ein Serum eines Patienten in der Frühphase eines Amöben-Leberabszesses einen erhöhten IgG-Titer nur gegenüber der Membranfraktion auf; wir können daher sagen, daß bei Verwendung von Membranantigenen mit dem Auftreten der ersten Symptome sofort eine richtige Diagnose erstellt werden kann.

Nun scheint der ELISA – wie IHA-, KBR- und Latex-Test – verdächtige positive Ergebnisse oder Grenzwerte bei Bewohnern endemischer Gebiete zu liefern (16–46%; MANNWEILER et al. 1976). Es wäre daher die Bestimmung von IgM- bzw. IgA-Antikörpern unter Umständen von großer Bedeutung.

Bei unseren 4 Patienten mit akutem Amöben-Leberabszeß wiesen immerhin die Sera von 3 Patienten einen signifikanten IgM-Titer (>400 U) auf und die Sera von 2 Patienten einen signifikanten IgA-Titer (>700 U). Auffallend war, daß im Falle einer hohen Immunantwort in der IgM-Klasse die Immunantwort in der IgA-Klasse schwächer ausfiel (<1000 U), andererseits bei hohen IgA-Titern die IgM-Antwort die Signifikanzgrenze nicht erreichte. Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß eine verlässliche IgM- und IgA-Bestimmung nur mit der Membranfraktion als Antigen möglich ist. Somit könnte man – neben einer IgG-Bestimmung – auch eine IgM- bzw. IgA-Bestimmung durchführen; der diagnostische und prognostische Wert der Bestimmung von anti-Amöben IgM bzw. IgA scheint jedoch nach den bisher vorliegenden Daten eher gering zu sein. Die anderen serologischen Methoden (KBR, IHA, IIFT, Latex) sind – jede für sich allein – nicht genügend aussagekräftig (Mannweiler). So führen viele Laboratorien parallel mehrere Tests durch, um Amöbenantikörper zu bestimmen. Der hier beschriebene ELISA scheint – insbesondere bei Verwendung von Membranantigenen – hinreichend sicher und genau zu sein, um auch als Routinemethode Anwendung finden zu können.

Zusammenfassung

Zur Untersuchung von Antikörpern gerichtet gegen *Entamoeba histolytica* wurde ein ELISA etabliert. Als Antigen wurde eine Zytoplasma- bzw. Membranpräparation von Kulturamöben verwendet. Es konnte gezeigt werden, daß bei Verwendung von Membranantigenen die IgG-Antwort gegen *E. histolytica* als Folge einer invasiven Amöbiasis mit hoher Empfindlichkeit und ausreichender Spezifität nachgewiesen werden kann. Die Bestimmung von anti-Amöben-IgM und -IgA war überhaupt nur bei Verwendung von Membranantigenen und nur bei Patienten mit akutem bzw. abgeheiltem Amöben-leberabszeß möglich.

Summary

Serological diagnosis of amoebiasis by means of class-specific antibodies

Plasma membranes of *E. histolytica* trophozoites (strain SFL3) were isolated by differential centrifugation technique. This material was then used for coating of ELISA plates. The antibody response of 15 patients suffering from invasive forms of amoebiasis was assessed and compared with control groups. It was found that the antibody response of the patients within the IgG class was about 4-fold higher with plasma membranes as antigen than with the cytoplasmatic antigen. Furthermore, significant titers in the IgM- and IgA-class were solely observed when ELISA plates were coated with plasma membranes. From this data we conclude that most of the antibodies formed during natural infection of man with *E. histolytica* were directed against antigens located on the surface membrane of trophozoites. These observations may be of relevance for diagnostic procedures. Furthermore, it would be necessary to screen for monoclonal antibodies using plasma membrane antigen in order to obtain antibodies directed against significant antigens present in natural infection.

Literatur

- BOS, H. J., VAN den EIJK, A. A. (1975): Application of ELISA; enzym-linked immunosorbent assay in the sero-diagnose of amoebiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69, 440.
- DIAMOND, L. S., HARLOW, D. R., CUNNICK, C. C. (1980): A new medium for the axenic cultivation of *E. histolytica* and other Entamoebae. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 431.
- LIN, T. M., HALBERT, S. P., CHUI, C. T., ZARCO, R. (1981): Simple standardized enzyme-linked immunosorbent assay for human antibodies to *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Mikrobiol.* 13, 646–651.
- LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., PARR, A. K., RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- KNOBLICH, J., MANNWEILER, E., HÖFLER, W., KERN, P. (1982): Efficiency of Serodiagnosis in Amebiasis. Results obtained by four different tests in 13458 Persons with varying Exposure. *Tropenmed. Parasit.* 33, 107–110.
- KNOBLOCH, J., MANNWEILER, E. (1983): Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 727–732.
- MANNWEILER, E., MOHR, W., HÖFLER, W., LEDERER, I. (1976): Serumantikörper bei Patienten mit extraintestinaler Amöbiasis (Amöben-Leberabszeß) und Kontrollpersonen. *Dtsch. med. Wschr.* 101, 1915–1919.
- VOLLER, A. et al. (1976): Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 98–106.
- YANG, J., KENNEDY, M. T. (1979): Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of amebiasis. *J. Clin. Microbiol.* 10, 778–785.

KORRESPONDENZADRESSE:

Univ.-Doz. Dr. Otto Scheiner
Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie
Währinger Straße 13
A-1090 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): Stock Cornelia, Auer Herbert, Picher O., Scheiner O.

Artikel/Article: [Diagnostik der Amöbiasis mit Hilfe klassenspezifischer Antikörper. 23-32](#)