

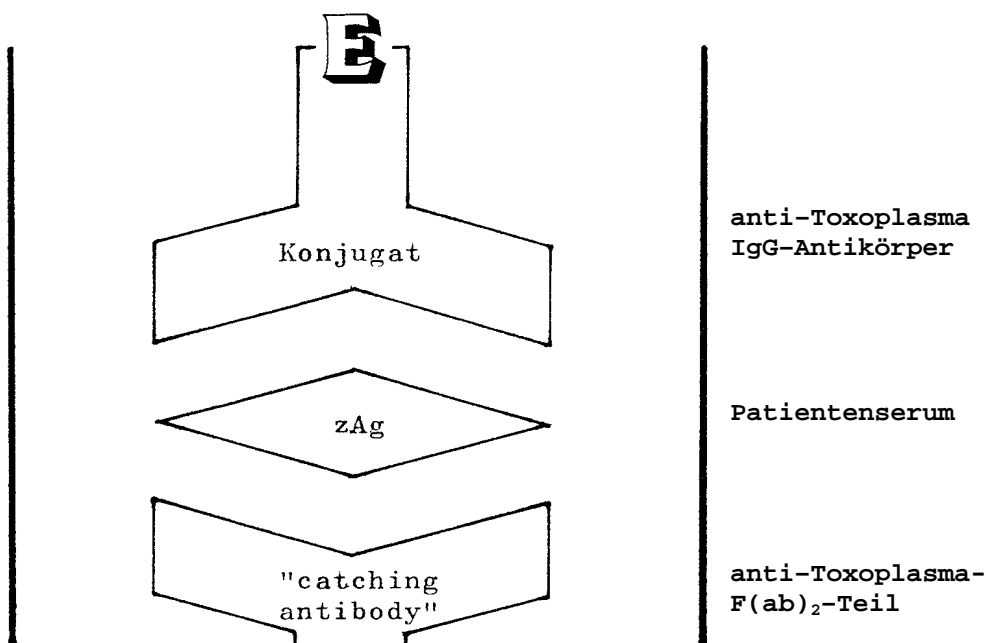
DER NACHWEIS VON ZIRKULIERENDEN ANTIGENEN ALS HILFSMITTEL DER SERODIAGNOSTIK VON PARASITOLEN

Andreas Hassl

In den letzten Jahren entwickelten Forschergruppen in der ganzen Welt zahlreiche neue serologische Tests, welche dann in oft überraschend kurzer Zeit Eingang in die Routinediagnostik fanden. Diese neuen Verfahren haben oft Namen und Abkürzungen, die vielen, nicht speziell immunologisch interessierten Kollegen fremd sind. Schwierig kann sich die Interpretation serologischer Befunde dann gestalten, wenn die Aussagewerte bekannter, etablierter Methoden und neuer zusätzlicher Testverfahren nicht in Beziehung gesetzt werden können. Mehr Hintergrundinformationen über diese neuen Serotests verringern eventuelle Unsicherheiten bei der Befundbeurteilung und lassen auch die enorme Leistungsfähigkeit moderner serologischer Verfahren richtig einschätzen.

Beispielhaft für die Schwierigkeiten rund um die jüngste Generation von Serotests steht der Nachweis zirkulierender Antigene für die Diagnostik parasitär bedingter Infektionen. Dieser Antigennachweis wurde im Zusammenhang mit Toxoplasmose und Schwangerschaft mehrfach erwähnt (Toxoplasmose, Hygiene Aktuell 1 /84), ohne jedoch näher auf die Eigenheiten des Nachweises einzugehen. Ein Versuch einer gerafften Zusammenstellung wissenswerter Informationen soll hier unternommen werden.

Abb. 1: ELISA zum Nachweis zirkulierenden Antigens (zAg) von Toxoplasma gondii



Die verlässlichste und zumeist auch einfachste Diagnosemöglichkeit eines Parasitenbefalls ist ein direkter Nachweis des Erregers oder seiner Fortpflanzungsprodukte. Bei geringem Befall ist die Wahrscheinlichkeit des direkten Nachweises jedoch nicht sehr groß. Zudem ist bei Vorliegen von Gewebeparasitismus der Versuch des direkten Nachweises des Parasiten fast nie zielführend. Als Alternative bietet sich die Bestimmung der spezifischen Immunreaktion des Wirtes an. Für die Routinediagnostik erlangte dabei nur die Antikörperbestimmung praktische Bedeutung, während der Nachweis der zellulären Immunität sich nicht durchsetzen konnte. Zur Bestimmung spezifischer Antikörper wurde eine Reihe von Seroreaktionen entwickelt, die auf unterschiedlichen Immunphänomenen beruhen und deren kombinierter Einsatz sich in der Routinediagnostik bewährt hat.

In speziellen Fällen, z. B. bei Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem, ist eine Diagnose auf Basis der Antikörperbestimmung problematisch, sodaß nach Alternativen gesucht wurde. In Anlehnung an bakteriologische und virologische Verfahren versuchte man durch den Nachweis von freien, gelösten Antigenen (zirkulierende Antigene) die Anwesenheit und Aktivität von Parasiten zu beweisen. Zirkulierende Antigene sind lösliche Proteine oder Polypeptide der Parasiten, die im Serum oder seltener auch in anderen Körperflüssigkeiten des Wirtes auffindbar sind. Zirkulierende Antigene können einerseits Sekrete oder Metabolite der Parasiten sein, andererseits aber auch Zellbestandteile, die beim Abbau von Erregermaterial frei geworden sind. Theoretisch ist somit durch einen selektiven Nachweis bestimmter zirkulierender Antigene eine Unterscheidung zwischen Invasions-, Vermehrungs- und Degenerationsphase des Parasitenbefalles möglich. In der Praxis allerdings ist die Entwicklung der Testsysteme noch nicht soweit gediehen. Gegenwärtig wird weltweit in einigen wenigen Laboratorien ein nicht selektiver Nachweis von zirkulierenden Parasitenantigenen routinemäßig durchgeführt. Kombiniert mit einer Antikörperbestimmung kann dieses Testsystem bei bestimmten Fragestellungen die Diagnostik erheblich verbessern, verglichen mit einer Befunderhebung allein auf Basis einer Antikörperbestimmung.

Ein besonderer Vorteil dieses Testsystems ist sein einfacher Aufbau (Abb. 1). Im Prinzip beruht der Nachweis der zirkulierenden Antigene auf einer Titrierung des diese zirkulierenden Antigene enthaltenden Patientenserums mit spezifischen Antikörpern gegen diese Antigene. Mehrere Autoren beschrieben verschiedene dafür geeignete Testsysteme: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Dot-Immunoassay, Indirekte Hämagglutinationsreaktion, Radioimmunoassay und Präzipitationsreaktionen. Aus technischen und organisatorischen Gründen wird im europäischen Raum der ELISA bevorzugt. Dazu wird aus einem Pool experimentell hergestellter, hochspezifischer IgG-Antikörper eine Hälfte zu F(ab)₂-Teilen präpariert. [F(ab)₂-Teile sind die zur Antigenbindung befähigten, v-förmigen Vorderteile der IgG-Antikörper]. Diese F(ab)₂-Teile werden als „catching antibodies“ so an eine feste Unterlage gebunden, daß sie mit Antigen reagieren können. Als nächster Schritt wird Patientenserum zugegeben, darinnen enthaltenes Parasitenantigen bindet sich an die „catching antibodies“. Zum Messen der Menge gebundenen Antigens werden nun markierte, spezifische Antikörper (Konjugat) zugefügt. Diese Antikörper stammen aus dem vorher genannten Pool an IgG-Antikörpern und wurden durch Koppelung eines Enzyms an ihre Fc-Teile markiert. Im letzten Testschritt wird nun ein Substrat zugefügt, dessen durch das Enzym katalysierte Farbveränderung gemessen werden kann. Mit Hilfe dieses Tests können minimal 4 ng Antigen pro ml Serum nachgewiesen werden. Entscheidend für die Qualität des Testsystems sind natürlich die Spezifität und die Reinheit der verwendeten Antikörper. Diese produziert man heute üblicherweise durch Immunisierung eines Versuchstieres. Die Isolierung reiner IgG-Antikörper aus dem Versuchstiereserum und deren Verwendung zur Reagenzproduktion vermindert die Gefahr unkontrollierbarer Testabläufe durch unspezifische Reaktionen von anderen Serumbestandteilen. Es zeigte sich jedoch, daß das Auftreten falsch positiver Reaktionen durch Rheumafaktoren nur durch die Verwendung von F(ab)₂-Teilen als „catching-antibodies“ ausgeschlossen werden konnte. Falsch negative Reaktionen können durch mangelhafte Sensitivität des Testverfahrens hervorgerufen werden. Die Sensitivität hängt jedoch entscheidend vom Verhältnis von spezifischen zu unspezifischen IgG-Antikörpern im Antikörperpool und damit letztlich von der Qualität der Immunisierung ab. Die zukünftige Verwendung monoklonaler Antikörper wird vermutlich dieses Problem lösen. Von diagnostischem Wert ist ein positiver Nachweis zirkulierender Antigene also nur bei Vorliegen eines korrekten Testaufbaus und höchstmöglicher Qualität der verwendeten Testreagenzien.

Der Nachweis von zirkulierenden Antigenen wird heute in der Bilharziose-, Filariose- und Trypanomiasendiagnostik eingesetzt, weiters in der Echnokokkose diagnostik zur Überbrückung des gelegentlich auftretenden, parasitär bedingten Antikörpermangels und in der Toxoplasmosediagnostik, um damit eine Klärung des Infektionsstatus zu versuchen. Weltweit werden die Forschungen einerseits experimentell an Versuchstieren, andererseits klinisch-laboratoriumsdiagnostisch an Patientenmaterial vorangetrieben. Schwierigkeiten kann dabei die Umsetzung von experimentell erarbeiteten Erkenntnissen in die Praxis bereiten.

Am Hygiene-Institut der Universität Wien befassen wir uns im Rahmen der Toxoplasmose-Schwangerenüberwachung schon längere Zeit mit der Möglichkeit und der Aussagekraft eines Nachweises von im Serum zirkulierenden Toxoplasma gondii-Antigenen. Dabei geht es vor allem um eine Beschleunigung der Prozedur zur Klärung einer Frischinfektion und um die Einbindung des Nachweisverfahrens solcher Antigene in das Schema routinemäßig durchgeführter Testsysteme wie IIFT, KBR, IHA und IgM-Nachweisverfahren. Gegenwärtig beschäftigen wir uns mit der Dynamik des Auftretens und der Struktur von in Seren von Versuchstieren zirkulierenden Toxoplasma-Antigenen. Obwohl sowohl reichlich experimentelle Befunde vorliegen als auch in den letzten Jahren über 10 000 Humansenen untersucht wurden, können noch keine endgültigen Aussagen über den diagnostischen Wert des Nachweises von Antigenen des Toxoplasma gondii im Serum gemacht werden.

Für die Zukunft ist die steigende Bedeutung des Nachweises zirkulierender Antigene absehbar, obwohl als Grundlage der Serodiagnostik auch weiterhin die Bestimmung spezifischer Antikörper unumstritten bleibt. Der (meist einfachere) Nachweis zirkulierender Antigene kann diese Stellung deshalb nicht einnehmen, weil er in vielen Fällen nur zeitlich begrenzte Ereignisse erfaßt und keine Auskunft über die Immunitätslage gibt. Manche Fragestellungen lassen sich allerdings durch die Bestimmung der Höhe des Titers der Serumantikörper nur schwer oder gar nicht beantworten. Beispiele dafür sind Fragen nach der Parasitenlast und Parasitenaktivität; Fragen wie sie bei der Abschätzung der Notwendigkeit oder des Erfolges einer Therapie auftauchen können. Veränderungen der Menge und der Lebensfähigkeit der Parasiten werden stark verzögert angezeigt, wenn eine Bestimmung des Titerverlaufs der Serumantikörper als Meßmethode benutzt wird. Der Nachweis und die Feststellung von Veränderungen der Menge zirkulierender Parasitenantigens im Serum kann dann zu einer rascheren Klärung der Fragen führen. Die Bestimmung der spezifischen Antikörper und der Nachweis zirkulierender Antigens können sich also gegenseitig ergänzen und durch ihre Kombination zu einer noch rascheren und treffsichereren Diagnoseprozedur beitragen.

Literatur beim Verfasser.

Dr. Andreas Hassl, Hygiene-Institut der Universität Wien, Kinderspitalgasse 15, A-1095 Wien, Telefon 0222 / 43 15 95