

Aufbau eines Assays zur Detektion von Ascaris suum-Antigenen auf der Basis von Ig Y

Anne Schniering, Rüdiger Schade¹, Theo Hiepe²

¹Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität, D-Berlin ²Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität, D-Berlin

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es, die Entwicklung eines Kopro-Antigen-Testes zum Nachweis von Askaridenantigen in Faeces unter Verwendung vitelliner Antikörper von Legehennen zu beschreiben.

Als Untersuchungsverfahren wurde der indirekte Zwei-Seiten-Enzymimmunoassay (EIA) gewählt, der folgendermaßen aufgebaut war: Affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper wurden als Fangantikörper an die Mikrotiterplatte gekoppelt. Auf den zu testenden Kotprobenextrakt folgte der Primärantikörper, ein aus dem Dotter isolierter, grob gereinigter polyklonaler, aviärer Antikörper (IgY), der schließlich durch einen enzymkonjugierten Anti-Spezies-Antikörper erkannt werden konnte.

Bei hoher Sensitivität (5 Nanogramm Antigen pro Milliliter Puffer) erwies sich der Test hinsichtlich anderer beim Schwein vorkommender Intestinalparasiten als ausreichend spezifisch. Kreuzreaktionen mit Spulwürmern anderer Tierarten traten erwartungsgemäß auf.

Die Verwendung von aviären Antikörpern neben Säugerantikörpern in einem Zwei-Spezies-EIA verspricht eine hohe Sensitivität, da aufgrund des phylogenetischen Unterschiedes von Vogel und Säuger unspezifische Reaktionen vermindert auftreten.

Summary: Development of an IgY-based assay for the detection of ascaris-suum-antigens.

The presented paper describes the development of a coproantigen-test for the detection of ascariosis in pigs using vitelline chicken antibodies.

The method used for these investigations was an indirect two-sided-enzyme-immuno-assay (EIA), which was set up as follows: Affinity-purified rabbit antibody was bound to the microtiter-plate as the catching antibody. After the faeces extract to be tested followed the primary antibody, which was a roughly purified avian antibody (IgY). This again could be detected by an enzyme-conjugated antispecies antibody.

Sensitivity was high as 5 nanograms antigen per milliliter buffer could be detected. Cross-reactions with antigen of other intestinal parasites occuring in pigs did not become obvious. Cross-reactions with ascarids of other species were demonstrated as expected.

The employment of avian antibodies in a two-species EIA promises high sensitivity as unspecific reactions seldom occur because of the phylogenetic difference between birds and mammals.

Keywords: copro antigen, IgY, ascaris suum, EIA

1 Einleitung

Bei der Schlachtkörperuntersuchung an einheimischen Schlachthöfen werden seit Jahren nahezu unverändert 10-15% der Schweinelebern aufgrund von Hepatitis interstitialis parasitaria multiplex chronica, den sogenannten Milchflecken, verworfen (Kraneburg, 1993). Die Ursache dafür sind im wesentlichen Spulwurmlarven von Ascaris suum auf ihrer Wanderung durch den Wirtsorganismus. Auch beim Reinigungsprozess der Schweinedünndärme in den Kutteleien sind Spulwürmer ein alltäglicher Anblick. Demgegenüber stehen nur relativ wenige Spulwurmeibefunde bei koproskopischen Untersuchungen, d.h. bei der traditionell üblichen Untersuchung auf Spulwürmer.

Während der 6-9-wöchigen Präpatenzperiode ist eine Infektion kopro-

skopisch nicht nachweisbar. Darüber hinaus scheiden weibliche Spulwürmer diskontinuierlich, männliche gar keine Eier aus. Da dieser Kopro-Antigen-Nachweis nicht Eier, sondern Spulwurmantigen im Kot nachweist, läßt dieses neue Verfahren eine Verbesserung der Sensitivität erwarten.

Zunächst in der Virologie angewendet (Middelton et al., 1976; Yolken et al., 1977), fand der Kopro-Antigen-Nachweis zunehmend Aufmerksamkeit von parasitologischer Seite. Inzwischen ist er möglich für protozoäre Krankheitserreger (Root et al., 1978; Grundy, 1982; Ungar et al., 1985; Anand et al., 1985; Baumann und Gottstein, 1987; Grundy et al., 1987; Craft und Nelson, 1982; Ungar et al., 1984; Stibbs et al., 1988; Vinayak et al., 1991; Hopkins et al., 1993; El Shewy et al., 1994), für einige Cesto-

denspezies (Machnicka und Krawczuk, 1988; Deplazes et al., 1990; Allan und Craig, 1989; Allan et al., 1990; Maass et al., 1991; Deplazes et al., 1991; Allan et al., 1992; Maass et al., 1992; Deplazes et al., 1992; Allan et al., 1993) und für den Trematoden *Fasciola gigantica* (Youssef et al., 1991).

Ein wichtiges Anliegen der Untersuchungen war die Klärung der Frage, ob Hühnerantikörper zum Nachweis von Kopro-Antigen erfolgreich eingesetzt werden können. In einem Zwei-Spezies-EIA ist die Verwendung von aviären Antikörpern neben Säugerantikörpern – anstatt von Antikörpern von zwei verschiedenen Säugerspezies – von Vorteil, da aufgrund des phylogenetischen Unterschiedes von Huhn und Kaninchen unspezifische Reaktionen vermindert auftreten (Larsson und Sjöquist, 1990).



Abgesehen davon, daß die Produktion von IgY den alternativen Tierversuchsmethoden zugerechnet wird, verdienen diese Ak auch und nicht zuletzt Beachtung unter dem Aspekt der speziesbedingten Vorzüge.

2 Versuchstiere, Material und Methoden

2.1 Zur Antigengewinnung

konnten sowohl männliche als auch weibliche Askariden in der Kuttelei eines Schlachthofes aus noch warmem Darminhalt entnommen und eingesetzt werden. Diese wurden in steriles proteinfreies Nährmedium überführt. Der Wechsel des Mediums erfolgte alle 6 bis 8 Stunden, bis die Askariden einen sterilen Status erreicht hatten. Zwei verschiedene Antigene wurden zur Antikörpergewinnung erprobt: Zur Herstellung von Somatischem-AG (So-AG) wurden mehrere Ascariden homogenisiert, zentrifugiert und der flüssige Überstand nach Sterilfiltration tiefgefroren. Exretorisch-Sekretorisches-AG (ES-AG) enthielt lösliche Parasitenantigene und wurde aus dem Nährmedium nach Filtration und Konzentrierung gewonnen.

2.2 Zur Antikörpergewinnung

wurden 12 Hühner und 3 Kaninchen mit verschiedenen Dosierungen beider Antigene in Freundschem Kompletten Adjuvans immunisiert und die Injektionen an den Tagen 28, 63 und 160 nach der Primärimmunisierung wiederholt. Die Hühnerantikörper wurden aus dem Eidotter isoliert, die Kaninchenantikörper wie üblich aus dem Serum.

2.3 Aufarbeitung der Kotproben

Kot wurde zu gleichen Teilen mit einem detergenzhaltigen Puffer vermischt, mit einem Ultraschalldesintegrator behandelt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit fetalem Kälberserum (FKS) versetzt und bis zum Einsatz im EIA tiefgefroren.

2.4 Untersuchung von Proben

Über 900 Schweinekotproben, die zum Teil Eier von Ascaris suum, Trichuris suis und Magen-Darm-Strongyliden enthielten, wurden sowohl koproskopisch als auch im EIA untersucht.

Ebenso wurden 96 humane Stuhlproben im Koproantigentest eingesetzt. Davon enthielten 44 Proben Eier von einem oder mehreren Intestinalparasiten.

Zur genaueren Abklärung von Kreuzreaktionen fanden auch Kotproben von Hunden mit verschiedenen Intestinalparasiten Verwendung, sowie eine Antigen-Sammlung aus dem Züricher Institut für Parasitologie mit diversen, meist parasitären Antigenen.

2.5 Aufbau und Durchführung des EIA

Bei diesem Koproantigentest handelt es sich um einen indirekten Zwei-Seiten-Enzymimmunoassay. Polyklonales Anti-Ascaris suum-IgG wurde nach einer Vorreinigung mit AbX, einer Mischbettionenchromatographiematrix über Eurocell-ONB-Carbonat A affinitätsgereinigt und in einer Proteinkonzentration von 6 µg pro Milliliter als Fangantikörper an die Festphase gebunden. Es folgte der fragliche Kotprobenextrakt. Als Primärantikörper diente aus Eidotter von hyperimmunisierten Hühnern gewonnenes Anti-Ascaris suum-IgY und als Sekundärantikörper ein kommerzieller peroxidasemarkierter Kaninchen-Anti-Huhn-Antikörper.

Die Verwendung von fetalem Kälberserum als Probenzusatz ist für diesen Test unabdingbar. Speziell die positiven Proben können sonst in ihrer

Aufbau des Kopro-Antigen-EIA

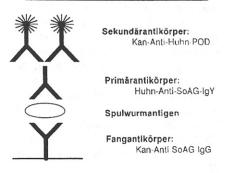


Abbildung 1: Aufbau des Koproantigen-EIA
Fang-Antikörper = Kan-Anti-Ascaris
suum-IgG
= Spulwurmantigen
Primärantikörper = Huhn-Anti-Ascaris
suum-IgY
Sekundärantikörper = Kan-Anti-HuhnIgG, peroxidasemarkiert

Extinktion eine derartige Abschwächung erfahren, daß sie nicht mehr als solche erkannt werden. Dieses Phänomen wird in der Literatur mit einer proteolytischen Aktivität von Kotinhaltsstoffen erklärt, welche die Schicht mit den Fangantikörpern schädigt. Der Zusatz von 50 % FKS vermindert diese Schädigung erheblich.

3 Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurde der CutOff-Wert aus einer Anzahl Kotproben aus spulwurmfreien Schweinebeständen ermittelt. Dazu wurde der Durchschnitt der Extinktion plus der 4-fachen Standardabweichung berechnet. Dieser Wert ist hier mit der durchgezogenen Linie gekennzeichnet. Zusätzlich wurde ein Bereich zwischen der zwei- und vierfachen Standardabweichung über dem Extinktionsdurchschnitt der negativen Proben ermittelt, in dem eine Probe als fraglich bezeichnet wird. Dieser Bereich liegt also zwischen den zwei Linien. Alle Proben unterhalb der unterbrochenen Linie lassen auf ein Freisein von Spulwürmern schließen.

Es folgen die Extinktionswerte von koproskopisch Ascaris-positiven Kotproben. Die zwei "falschnegativen" Proben waren koproskopisch schwach positiv, in einer davon konnte sogar nur ein Askaridenei gefunden werden. Die Möglichkeit von Spulwurmeiern als Darmpassanten ist hierbei zur Erklärung des falsch-negativen Ergebnisses in Betracht zu ziehen.

Die nächste Spalte stellt die Testergebnisse von koproskopisch negativen Kotproben von Schweinen aus spulwurmbelasteten Beständen dar. Dabei bleibt leider unklar, ob es sich wirklich um falsch-positive Ergebnisse in EIA oder um falsch-negative in der Koproskopie handelt, da der Darminhalt der betreffenden Schweine nicht auf Helminthen untersucht werden konnte. Aus der Literatur ist es jedoch bekannt, daß man bei der Koproskopie mit einem mehr oder weniger großen Anteil falsch-negativer Ergebnisse rechnen muß.

Der EIA hat eine Empfindlichkeit von unter 5 ng Protein So-AG pro Milliliter Puffer. In Kotprobenextrakt lag die Nachweisgrenze bei 50 ng Antigen pro Milliliter. So zeigte sich,



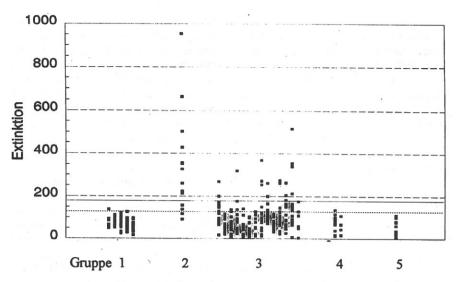


Abbildung 2: Extinktionen im Koproantigen-EIA – Testung von Schweinekotproben aus folgenden Gruppen:

Gruppe 1: Kotproben aus Askariden-freien Schweinebeständen

Gruppe 2: Kotproben, welche koproskopisch Spulwurmeier enthielten

Gruppe 3: koproskopisch negative Proben aus Beständen mit Spulwurmproblemen

Gruppe 4: koproskopisch Eier von Magen-Darm-Strongyliden

Gruppe 5: koproskopisch Eier von Trichuris suis

daß mit dem Einsatz aviärer Antikörper Testsysteme mit hoher Empfindlichkeit aufgebaut werden können.

Was die Spezifität des Testes betrifft, liegen folgende Untersuchungen vor: 10 Proben enthielten *Trichuris*-, 21 Proben MDS-Eier, davon zwei massenhaft. Eine Probe mit MDS-Eiern erschien fraglich, die übrigen waren negativ. Kreuzreaktionen mit diesen Parasiten sind demnach unwahrscheinlich.

Zu den Ergebnissen der untersuchten Humanstuhlproben: Eine deutliche Kreuzreaktion liegt erwartungsgemäß mit Ascaris lumbricoides, dem Spulwurm beim Menschen vor. Es stellte sich die Frage, ob dieser Test möglicherweise auch zur Spulwurmdiagnostik beim Menschen einsetzbar ist. Stuhlproben mit Wurmeiern auch von Hakenwürmern, Trichuris trichiura, Schistosomae, Strongyloides, Taenia saginata und Hymenolepis nana wurden im Test zur Klärung der Spezifitätsfrage untersucht. Den Ergebnissen zufolge ist eine Kreuzreaktion mit Hymenolepis nana möglich und mit Taenia saginata sogar wahrscheinlich. Allerdings ist ein Spulwurmbefall dieser Probanden nicht mit Sicherheit auszuschließen, insbesondere da es sich bei ihnen oft um Einreisende oder

Rückkehrende von Auslandsaufenthalten handelte, wo eine Spulwurminfektion wahrscheinlicher ist als in Deutschland.

Im Rahmen von Spezifitätsuntersuchungen gelangten auch 54 Hundekotproben zur Untersuchung. In vielen waren koproskopisch Eier von diversen Intestinalparasiten nachgewiesen worden; und zwar Toxocara canis (10 Proben), Trichuris vulpis (10), Ancylostoma caninum (5), Taenia hydatigena (4), Echinococcus multilocularis (5) und Echinococcus granulosus (5). Davon lagen Kreuzreaktionen lediglich mit Toxocara canis vor. Die Extinktionswerte dieser Proben liegen im Durchschnitt deutlich über denen der Proben, welche Antigen von anderen Parasiten beinhalten. Man kann jedoch nur von einer teilweisen Kreuzreaktivität sprechen, da die durchschnittlichen Extinktionswerte von Schweinekotproben mit Spulwurmantigen nicht erreicht werden.

Bei der Untersuchung der Züricher Antigene bestätigten sich Kreuzreaktionen zu Ascaris lumbricoides, Toxocara canis, Ascaridia galli und überraschenderweise Taenia saginata. Alle übrigen Antigene, darunter auch von Hy-menolepis nana kreuzreagierten nicht.

Zur Immunisierung wurde FCA verwendet, um eine hohe spezifische Immunantwort zu erhalten. Zudem ging man damals bei der Versuchsplanung noch davon aus, daß die bei Säugern beobachteten entzündlichen Lokalreaktionen bei Hühnern in geringerem Maße auftreten als bei Säugetieren. Wie die pathologisch/ histologische Untersuchung ergab, bewirkte die Immunisierung von FCA sehr wohl Veränderungen. Ausführliche Untersuchungen in dieser Richtung hat Christine Schwarzkopf (BgVV, Berlin) durchgeführt.

Auch die in dieser Arbeit festgestellte, teils drastische Verminderung der Legeleistung spricht für eine Beeinträchtigung der Versuchstiere durch die Immunisierungsprozesse; bei einigen Hühnern sistierte die Legeleistung über Wochen nach den Boosterimmunisierungen. Bisher wurde von solch starken Einbrüchen der Legeleistung nicht berichtet. Die Legeleistung scheint durch den Einsatz von viralen Antigenen relativ schwächer beeinflußt zu werden als durch bakterielle oder parasitäre Antigene, am wenigsten jedoch durch Serumproteine. Es ist wahrscheinlich, daß Extrakte und E/S-Produkte von Ascaris suum mit zu dieser außergewöhnlich starken Wirkung beitragen. Dafür spricht auch die seit langem bekannte Tatsache der Toxizität von Ascaris-Extrakten.

Literatur

Allan, J. C. und Craig, P. S. (1989). Coproantigens in gut tapeworm infections: Hymenolepis diminuta in rats. *Parasitol. Res.* 76, 68–73.

Allan, J. C., Avila, G., Garcia Noval, J., Flisser, A. und Craig, P. S. (1990). Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigendetection. *Parasitology* 101, 473–477.

Allan, J. C., Craig, P. S., Garcia Noval, J., Mencos, F., Liu, D., Wang, Y., Wen, H., Zhou, P., Stringer, R., Rogan, M. und Zeyhle, E. (1992). Coproantigen detection for immunodiagnosis of Echinococcosis and Taeniasis in dogs and humans. *Parasitology 104*, 347–355.

Allan, J. C., Mencos, F., Garcia Noval, J., Sarti, E., Flisser, A., Wang, Y., Liu, D. und Craig, P. S. (1993). Dipstick dot ELISA for the detection of Taenia coproantigens in humans. *Parasitology* 107, 79–85.

64 ALTEX 13, SUPPLEMENT 96



- Anand, P., Malaviya, B., Das, P., Mateen, M. A., Habibullah, C. M. und Das, S. R. (1985). Multilayerenzyme linked immunosorbent assay (ML-ELISA) for detection of Entamoeba histolytica trophozoite coproantigen. *Immunological Inve*stigations 14(5), 443–453.
- Baumann, D. und Gottstein B. (1987). A double-antibody sandwich ELISA for the detection of Entamoeba histolytica antigen in stool samples of humans. *Trop. Med. Parasit.* 38, 81–85.
- Craft, J. C. und Nelson, J. D. (1982). Diagnosis of Giardiasis by counterimmunoelectrophoresis of Feces. *The Journal of Infectious Diseases* 145, 499–504.
- Deplazes, P., Gottstein, B., Stingelin, Y. und Eckert, J. (1990). Detection of Taenia hydatigena Copro-Antigens by ELISA in Dogs. *Vet. Parasitol.* 36, 91–103.
- Deplazes, P., Eckert, J., Pawlowski, Z. S., Machowska, L. und Gottstein, B. (1991). An enzymelinked immunosorbent assay for diagnostic detection of Taenia saginata copro-antigens in humans. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene* 85, 391–396.
- Deplazes, P., Gottstein, B., Eckert, J., Jenkins, J. und Jimenez-Palacios, S. (1992). Detection of Echinococcus copro-antigens by ELISA in dogs, dingoes and foxes. *Parasitology Research* 78, 303-308.
- El Shewy, K., KIlani, R. T., Hegazi, M. M., Makhlouf, L. M. und Wenman, W. M. (1994). Identification of low-molecular-mass coproantigens of Cryptosporidium parvum. *J. Infect. Dis. 169* (2), 460–463.
- Grundy, M. S. (1982). Preliminary observations using a multi-layer ELISA method for the detection of Entamoeba histolytica trophozoite antigens in stool samples. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene* 76f(3), 396–400.
- Grundy, M. S., Voller, A. und Warhurst, D. (1987). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Entamoeba histoloytica antigens in faecal material. Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene 81, 627–632.
- Hopkins, R. M., Deplazes, P., Meloni, B.
 P., Reynoldson, J. A. und Thompson, R.
 C. A. (1993). A field and laboratory evaluation of a commercial ELISA for the detection of Giardia coproantigens in humans and dogs. *Transactions of the Royal Societa of Tropical Medicine and Hygiene* 87, 39–41.
- Kraneburg, W. (1993). Spulwürmer schaden nicht nur der Schweineleber. Landwirtschaftliches Wochenblatt Westpha-

len-Lippe 150(13A), 26-28.

- Larsson, A. und Sjöquist, J. (1990). Chikken IgY: Utilizing the evolutionary difference. Comp. Immun. Microbiol. infect. Diss. 13 (4), 199–201.
- Maass, M., Delgado, E. und Knobloch, J. (1991). Detection of Taenia solium antigens in merthiolate-formalin preserved stool samples. *Trop. Med. Parasit.* 42, 112–114.
- Maass, M., Delgado, E. und Knobloch, J. (1992). Isolation of an immunodiagnosic Taenia solium coproantigen. *Trop. Med. Parasitol.* 43, 201–202.
- Machnicka B. und Krawczuk, S. (1988): Hymenolepis diminuta antigen: Detection in feaces of rats. Bulletin of the Polish Academy of Sciences, *Biological Sciences* 36 (4-6) 103–106.
- Middelton P. J., Petric, M., Hewitt, C. M., Szymanski, M. T. und Tam, J. S. (1976). Couterimmunelectrosmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (orbi-group) antigen and antibody. *J. Clin. Pathol.* 29, 191–197.
- Root, D. M., Cole, F. X. und Williamson, J. A. (1978). The development and standardization of an ELISA method for the detection of Eimeria histolytica antigens in fecal samples. *Arch. Invest.Med.* (Mex) 9 (Suppl.1), 203–210.
- Stibbs, H. H., Samadpour, M. und Mannings, J. F. (1988). Enzyme immunoassay for detection of Giardia lamblia cyst antigens in formalin-fixed and unfixed human stool. *Journal Of Clinical Microbiology* 26(9), 1665–1669.
- Ungar, B. L. P., Yolken, R. H., Nash, T. E. und Quinn, T. C. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Giardia lamblia in fecal specimens. The Journal Of Infections Diseases 149, 90–97.
- Ungar, B. L. P., Yolken, R. H. und Quinn, T. C. (1985). Use of a monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of Entamoeba Histolytica in fecal specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34(3), 465–472.
- Vinayak, V. K., Dutt, P. und Puri, M. (1991). An immunoenzymatic dot-ELI-SA for the detection of Giardia lamblia antigen an stool eluates of clinical cases of giardiasis. *Journal Of Immunological Methods* 137, 245–251.
- Yolken R. H., Kim, H. W., Clem, T., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., Channock, R. M. und Kapikian, A. Z. (1977). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet*, i: 263–267.
- Youssef, F. G., Mansour, N. S. und Aziz, A. G. (1991). Early diagnosis of human fascioliasis by the detection of copro-

antigens using counterimmunoelectrophoresis. Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene 85, 383–384.

Danksagung

Dank gebührt Frau Dr. Hegenscheid, Frau Menninger, Frau Dr. Köhler und Herrn Dr. Deplazes für die freundliche Überlassung von koproskopisch untersuchten Faeces.

Diese Arbeit wurde finanziell mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung und Technologie (0310124A) unterstützt.

Korrespondenzadresse

Dr. Anne Schniering zu erreichen über: Institut für Pharmakologie und Toxikologie Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität Dorotheenstr. 94 D-10117 Berlin