

RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin ELISA – ein interessanter Marker für die diagnostische Beurteilung von Darmerkrankungen

Proteine (Eiweißstoffe) sind wesentliche Bestandteile der Nahrung und des Körpers. Der Körper muss in der Lage sein Eiweiße zu verarbeiten d. h. sie je nach Bedarf auf- bzw. abzubauen.

Behilflich beim Abbau sind eiweißzersetzende Wirkstoffe (proteolytische Enzyme) wie Trypsin oder Chymotrypsin.

Diese Enzyme können Nahrung verdauen, aber auch bakterielle oder entzündliche Infekte des Gastrointestinaltraktes bekämpfen. Damit die Wirkung dieser eiweißzersetzenden Stoffe aber auch gestoppt und gesundes Gewebe nicht zerstört wird, gibt es Inhibitoren die diese Enzyme hemmen. Einer der wichtigsten Hemmstoffe ist das α_1 -Antitrypsin (auch α_1 -Proteinase-Inhibitor genannt), ein Glykoprotein mit einer Molekülgröße von 50 kDa. Das Protein stellt einen primären Inhibitor dar, der mit Serin-Proteasen wie z. B. PMN-Elastase, Trypsin, Chymotrypsin sowie mit aktiven entzündlichen Immunzellen reversible Komplexe bildet.

α_1 -Antitrypsin besitzt dadurch auch eine wichtige regulatorische Wirkung bei Entzündungsprozessen und hemmt in erster Linie die in diesem Zusammenhang von Leukozyten freigesetzte Protease PMN-Elastase. Der Körper sendet PMN-Elastase aus, um die Entzündungsreaktionen zu bekämpfen. Damit sich die Wirkung von PMN-Elastase nur auf die Entzündung begrenzt bleibt, d. h. gesundes Gewebe nicht angegriffen wird, reguliert α_1 -Antitrypsin die Proteaseaktivität und kann so zur Beurteilung der Aktivität von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen herangezogen werden. Stark erhöhte Werte können z. B. bei Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa oder bei anderen Erkrankungen

des Darmes, wie Polypen, Colon Carzinom, Divertikulitis, Zölliakie, oder stark ausgeprägten Nahrungsmittelallergien gefunden werden. α_1 -Antitrypsin kann auch als fäkaler Marker für einen intestinalen Eiweißverlust und eine erhöhte Schleimhautpermeabilität bei nicht intakter Darmschleimhaut genutzt werden. Durch seinen weiten Messbereich bietet sich der RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin ELISA für das Therapiemonitoring an und ermöglicht eine saubere Differenzierung zwischen positiven und negativen Werten.

Im Allgemeinen geht man davon aus, dass α_1 -Antitrypsin hauptsächlich in der Leber, aber auch in Darmzellen, synthetisiert und ohne tryptische Spaltung oder Resorption mit der Stuhlprobe ausgeschieden wird. Somit unterliegt der Parameter keinem intestinalen Abbau weshalb sich der RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin ELISA als Stuhlmarker sehr gut eignet.

Nutzen Sie die Vorteile des RIDASCREEN® α_1 -Antitrypsin ELISA:

- klinisch validiert
- saubere Differenzierung zwischen positiv und negativ
- optimiertes Therapiemonitoring durch weiten Messbereich
- kosteneffiziente Einpunkt-Kalibrierung
- konstante, stabile Qualität mit definiertem Messbereich
- automatisierbar
- optionale Low-Positivkontrolle im Kit enthalten
- gleicher Extraktionspuffer wie bei Hb und Hb/Hp Complex; parallele Abarbeitung auf einer Mikrotiterplatte möglich

Stuhldiagnostik – Antigennachweis

Fallen Noroviren vom Himmel?

In der letzten Kinik News (III/07) haben wir unter anderem über die verschiedenen Übertragungswege der Norovirus-Infektion berichtet. In dem vorliegenden Artikel möchten wir an einem bestimmten Beispiel – den Lebensmitteln –, einen möglichen Übertragungsweg näher beleuchten.

Die Infektion kann durch kontaminierte Lebensmittel ausgelöst werden, etwa dann, wenn die Hände vor der Zubereitung von Lebensmitteln nicht gründlich gewaschen wurden. Wird das Lebensmittel anschließend

nicht ausreichend erhitzt, werden die Noroviren mit dem Lebensmittel „verzehrt“ und können zur Erkrankung führen.

„Seafood“, Salate, Beeren und rohes Gemüse waren in der Vergangenheit an Norovirus-Ausbrüchen beteiligt. Prinzipiell können aber alle Lebensmittel, die unter mangelhaften hygienischen Bedingungen zubereitet und anschließend nicht ausreichend erhitzt werden, mit infektiösen Noroviren verunreinigt sein.

So passiert es

Das Virus gelangt in den Magen-Darmtrakt, dringt in Zellen der Darmwand ein und zwingt sie, unzählige neue Viren herzustellen.

Dadurch werden die Darmzellen zerstört und können dem Nahrungsbrei keine Flüssigkeit mehr entziehen. Zusätzlich gelangt Wasser aus dem umgebenden Gewebe ins Innere des Darms und der Mensch bekommt Durchfall. Der Körper reagiert ebenfalls mit starkem Erbrechen, um das Virus wieder loszuwerden.

Noroviren in Austern

In der kürzlich erschienenen Studie von Prof. Ushijima (Universität Tokio) wurden 225 Austern aus China und Japan auf das Vorhandensein von Noroviren getestet. Bei den aus China stammenden Austern wurde in jeder sechsten Auster Noroviren (19 von 130) nachgewiesen. Bei den japanischen Austern wurde in jeder vierten Auster Noroviren detektiert (24 von 90). Zusammengenommen konnte in jeder fünften Auster eine Norovirus Verunreinigung nachgewiesen werden (Clin. Lab. 2007; 53: 405 – 412.).

Ein Norovirus-Ausbruch im September 1993 betraf zahlreiche Personen in den ganzen USA. Als Ursache wurde der Verzehr von Austern identifiziert. Die nähere Untersuchung ergab, dass alle Austern aus dem gleichen Fischfanggebiet stammten. Ausgangspunkt war in diesem Fall ein Fischer, der mit einer

Durchfallerkrankung im seichten Wasser stand und sich im Wasser entleerte. Alle Personen dieses Ausbruches wurden mit dem gleichen Stamm infiziert, der beim Fischer im Stuhl nachweisbar war. Dadurch wurden in 3 Tagen ca. 6 Millionen Austern mit Noroviren infiziert (MMWR 42 (49): 1993).

Wie gelangt das Virus in die Nahrungskette?

Folgendes Gedankenexperiment soll den Eintrag von Noroviren in Nahrungsmittel verdeutlichen. Bei einer akuten Norovirus-Infektion findet man bei Erkrankten von 10^{12} bis zu 10^{14} Viruspartikel pro Gramm Stuhl. Würde beispielsweise ein Pfund infektiösen Stuhls in den Bodensee gelangen, so ergäbe sich daraus eine Konzentration von 5 – 10 Viruspartikel pro Liter. Muscheln filtern eine große Menge Wasser und können somit Noroviren aus dem Wasser regelrecht anreichern. Bei dem Verzehr von rohen Muscheln kann es dann zur Infektion kommen. Somit lässt sich die Frage zu Beginn des Artikels „Fallen Noroviren vom Himmel?“ klar mit „Nein“ beantwortet.

Für die schnelle und zuverlässige klinische Diagnostik – RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation ELISA.

Entamoeba histolytica/dispar – was wirklich zählt

Im menschlichen Darm werden im wesentlichen 4 verschiedene Spezies der Gattung Entamoeba gefunden (E.histolytica, E.dispar, E.coli, E.hartmanni), von denen nach dem Beschluß einer von der WHO 1997 in Mexiko einberufenen Konferenz heute nur E.histolytica als pathogen einzustufen ist.

Mikroskopisch lassen sich E.coli und E.hartmanni klar von E.histolytica unterscheiden. Zysten von E.dispar und E.histolytica jedoch sind morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden. Aufgrund dieser Schwierigkeit hat man viele Jahrzehnte beide Erreger als eine Spezies angesehen. Allein das Erkennen phagozytierter Erythrozyten im mikroskopischen Präparat und das klinische Krankheitsbild (invasive vs. nicht-invasive Amöbiasis) ließen vermuten, daß es sich um zwei Spezies handeln könnte.

Zur Verbesserung der Diagnostik hat man im Laufe der Jahre biochemische, immunologische und genomische Unterschiede herausgearbeitet, die dann schließlich vor etwa 10 Jahren zu der formalen Trennung in zwei Spezies führten. An dieser Stelle sollte jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß E.dispar mit Ausnahme des Krankheitsbildes Enterocolitis in der gleichen Häufigkeit abdominale Beschwerden und Durchfall verursacht wie E.histolytica. Eine Erkrankung mit E. dispar wird allerdings als nicht therapiebedürftig eingestuft.

Für die Entwicklung immunologischer Nachweisverfahren wie z. B. Antigen-ELISA suchte

man in den vergangenen 2 Jahrzehnten nach einem möglichst konservierten und für die Pathogenität bedeutenden Entamoebenmarker. Diesen fand man in einem Lektin des Erregers, das für die Adhäsion an die Darmzellwand verantwortlich ist.

Bei diesem Lektin (syn. Adhäsion) handelt es sich um ein 260 kDa großes Protein, welches spezifisch an Galaktose oder N-acetyl-Galaktosamin der Wirtszellwand bindet und anschließend durch Zytolyse dieser Zellen die Invasion des Erregers ermöglicht. Das spezifische Lektin besteht aus einer schweren (170 kDa) und leichten (31 – 35 kDa) Untereinheiten.

Die Lektine von E.histolytica und E.dispar weisen eine 85%ige Homologie auf. Das bedeutet, es gibt sehr viele gemeinsame Epitope für Immunsereen, aber auch einige spezifische.¹

In genau diesem Punkt nun unterscheiden sich die heute im Markt angebotenen sogenannten gattungsspezifischen und spezies-spezifischen immunologischen ELISA-Teste voneinander. Das heißt, daß die im spezies-spezifischen Test verwendeten Antikörper ihr Epitop in dem zu 15% differenten Lektinbereich finden, während die in den gattungsspezifischen Testen verwendeten Antikörper ihre Epitope in dem zu 85% homologen Bereich haben. Insofern erfassen beide Teste

gleichermaßen E.histolytica, die gattungsspezifischen darüber hinaus aber auch noch E.dispar, dessen „Pathogenität“ mit der oben geschilderten Symptomatik in Fachkreisen ähnlich kontrovers diskutiert wird wie die Pathogenität von Blastocystis hominis und DiEntamoeba fragilis.

Aus dem geschilderten Unterschied heraus versuchen nun teilweise Anbieter eines spezies-spezifischen Testes gegen die gattungsspezifischen Teste zu argumentieren und einen definitiv nicht existierenden Nachteil im Aufspüren von E.histolytica herbeizureden.

Demgegenüber scheint aber eher das Gegenteil der Fall zu sein, wie eine aktuelle Publikation einer holländischen Experten-gruppe eindrucksvoll belegt². Demnach ist der spezies-spezifische Test zwar sehr spezifisch, aber mit einer Sensitivität von ca. 70% eher als unzureichend einzustufen.

Die verminderte Sensitivität liegt vermutlich in den spezifischen Epitopen auf der schweren Untereinheit der Lektinkette, die nicht bei allen bisher gefundenen E.histolytica-Stämmen in Gänze vorhanden ist. In diesem Punkt sind die gattungsspezifischen ELISA, die Antikörper gegen hochkonservierte Epitope verwenden, dem spezies-spezifischen Test überlegen.

Der Vertreter eines spezies-spezifischen amerikanischen Testes in Deutschland hat unter Bereitstellung von gespickten Stuhlproben ein medizinisches Fachlabor zu einer Vergleichstestung des im Labor gebräuchlichen RIDASCREEN® ELISA und eben diesem spezies-spezifischen Test angeregt.

Hierfür wurden dem Labor fix und fertig präparierte Stuhlproben zur Verfügung gestellt, die laut Angabe des Vertreibers mit einem pathogenen E.histolytica-Stamm gespickt waren. Vermutlich handelte es sich bei dem Antigen, mit dem die Stuhlproben präpariert waren um ein sehr spezifisches Antigen, das, wie bereits oben dargelegt, aus dem spezifischen 15% Bereich, der E.histolytica von E.dispar unterscheidet, stammte.

Insofern war eigentlich von vornherein klar, dass der RIDASCREEN®-ELISA diese zur Verfügung gestellten Proben auch nicht detektieren konnte. Es ist zu vermuten, dass die Positivkontrolle dieses spezies-spezifischen Testes das gleiche Antigen enthält, denn auch schon frühere Untersuchungen in unserem Hause haben gezeigt, dass diese Positivkontrolle nur sehr schwach im RIDASCREEN®-ELISA reagiert.

Es ist an dieser Stelle klar festzuhalten, dass sowohl der RIDASCREEN® ELISA als auch andere im Markt befindliche gattungsspezifische Entamoebennachweis-Teste sehr wohl in der Lage sind E.histolytica neben E.dispar gleichermaßen gut und sensitiv zu erfassen, ja sogar – wie oben schon erwähnt – E.histolytica teilweise mit besserer Sensitivität als der spezies-spezifische Test.

Dem Labor wurden daraufhin sowohl pathogene Stämme von E.histolytica aus dem BNI in Hamburg und aus einem tropenmedizinischen Institut in Wien, als auch Entamoeba-haltige Stuhlproben aus dem Tropeninstitut Berlin zur Verfügung gestellt. Der Kunde konnte sich somit also selbst davon überzeugen, dass der RIDASCREEN® Entamoeba ELISA alle E.histolytica-Stämme im gleichen Umfang detektiert, wie der spezies-spezifische.

Wegen der Schwierigkeit einen Marker von E.histolytica zu definieren, der immer und bei allen im Erkrankungsfall vorkommenden pathogenen Entamoeben vorhanden ist (nicht alle E.histolytica-Stämme verfügen über den Epitop-Bereich, den der spezies-spezifische Test zur Erfassung der Erreger benötigt), hat R-Biopharm schon von Anfang an immer den sichereren Weg propagiert. Dieser besteht in der zuverlässigen und sensitiven Erfassung eines potentiell hochpathogenen Erregers unter Verzicht auf die Unterscheidungs-möglichkeit zu seinem „nicht-pathogenen“ Verwandten E.dispar.



Wie vorteilhaft und nützlich ein zusätzlich zum Antigennachweis durchgeführter serologischer Entamoeba-Nachweis (nur E.histolytica führt zur Serokonversion), gerade auch in Nicht-Endemiegebieten ist, belegt die oben erwähnte Publikation der holländischen Fachgruppe ebenso deutlich wie eine Studie, die mit dem RIDASCREEN® Entamoeba IgG - ELISA im Tropeninstitut Berlin 2006 durchgeführt wurde.³

In diesem Zusammenhang bietet R-Biopharm schon seit Jahren ein Ablaufschema zur diagnostischen Vorgehensweise bei Verdacht einer Entamoeben-Infektion an.^{4,5} Dieses Schema sowie die zitierte und weiterführende Literatur sind im Anhang aufgeführt und auf Wunsch als PDF erhältlich.

- 1 Acker, J. P.: J. Biosci. Vol. 27 No. 6, Suppl. 3, 573 – 578 (2002)
- 2 Visser, L. G. et al.: Int. J. of Med. Microbiol. 296, 397 – 403 (2006)
- 3 Knappik, M. et al.: Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24, 701 – 703 (2005)
- 4 R-Biopharm AG: Diagnostikschema Entamoeba histolytica (1988)
- 5 Knappik, M. et al.: Poster zur Entamoebenserologie, Orlando (2006)