

IN DIESEM KAPITEL

Neutralisationstest

Agglutinations-Hemmungs-Reaktion und
Präzipitationsreaktionen

Komplementbindungsreaktion und Kompetitiver
ELISA

Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test

Anhang D

Serologie – mehr klassische Testverfahren

In Kapitel 22 wurden Ihnen schon einige serologische Testsysteme vorgestellt, aber das sind bei weitem nicht alle relevanten Tests! Hier ist noch eine kleine Auswahl dieser genialen Antigen-Antikörper-Reaktionen.

Zu klein darf es auch nicht sein!

Antigene müssen mindestens ein Molekulargewicht von 2.000 Dalton haben, um eigenständig eine AK-Bildung auslösen zu können. Zu kleine AG, die zwar AK binden können, aber selbst keine AK-Bildung auslösen, werden **Haptene** genannt. Haptene können jedoch an größere Trägerproteine gekoppelt werden, die die Immunantwort anheizen. Diese Technik wird zum Beispiel bei einigen **Impfungen** genutzt. AG plus Trägerprotein werden zusammen als **Konjugatimpfstoff** bezeichnet.

Der Neutralisationstest – AK, fangt die Viren ein!

Mit dem Neutralisationstest können Sie mit bekannten Viren AK im Serum nachweisen. Sie können aber auch mit bekannten AK unbekannte Viren identifizieren. Der Test ist sehr spezifisch. Sein Nachteil: Er ist teuer und zeitaufwendig.

Die Grundausrüstung

Für den AK-Nachweis mittels Neutralisationstest benötigen Sie

- ✓ eine intakte Zellkultur, die von Ihrem Virus infiziert werden kann,
- ✓ ein bekanntes Virus, das vermehrungsfähig ist und im Zellrasen einen zytopathischen Effekt (CPE) auslösen kann,
- ✓ Patientenmaterial (meist Serum),
- ✓ einen Brutschrank, damit die kleinen Zellen nicht frieren müssen.

Für den AG-Nachweis (= Virus) aus Patientenmaterial benötigen Sie entsprechend einen bekannten AK. Das Testprinzip und die Durchführung bleiben gleich.

So funktioniert es

Das Patientenmaterial wird mit einem bekannten Virus versetzt und für eine bestimmte Zeit inkubiert. In dieser Zeit bilden sich – sofern denn AK vorhanden sind – AG-AK-Komplexe aus. Das inkubierte Material mit den Komplexen wird in eine Zellkultur gegeben. Da die AK die Viren darin zuvor weggefangen, also neutralisiert haben, können diese die Zellen nicht mehr infizieren. Der Zellrasen bleibt heil, es tritt kein zytopathischer Effekt (CPE) auf. Sind hingegen keine AK im Serum, können die freien (nicht geblockten) Viren die Zellen infizieren: Es tritt ein **zytopathischer Effekt** auf. Die Zellen kugeln sich ab, lösen sich von der Oberfläche oder es entstehen Löcher im Zellrasen (Abbildung d.1).

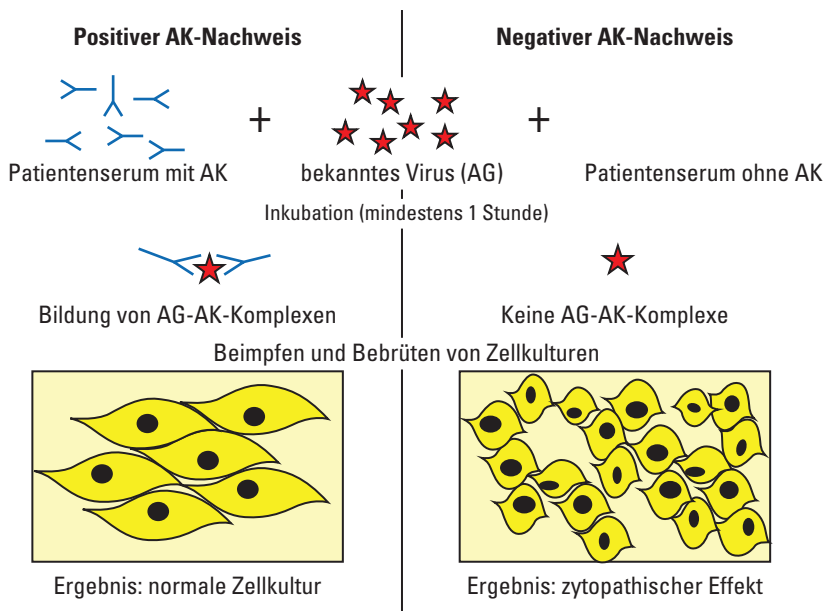


Abbildung d.1: Der Neutralisationstest (Erklärung im Text)

Die Präzipitationsreaktionen – wenn Antigene ausfallend werden

Zunächst, der Ausdruck »ausfallend« ist ein wenig geschummelt. Unter Präzipitation versteht man die Ausfällung von einem löslichen AG durch seinen homologen AK. Je nachdem, wie gut das Mischungsverhältnis von AG und AK ist (Präzipitationskurve nach Heidelberger), entstehen unterschiedlich große AG-AK-Komplexe. Sind sie groß genug, um eine Lichtstreuung zu bewirken, können Sie diese mit dem bloßen Auge erkennen. Führen Sie die Reaktion in einer Lösung durch, tritt als positives Ergebnis eine Trübung ein. Wenn Sie eine Gelmatrix (etwa eine Agarplatte) verwenden, sehen Sie als positives Ergebnis eine sogenannte **Präzipitationslinie**.

Der Elek-Ouchterlony-Test – Toxinnachweis bei *Corynebacterium diphtheriae*

Auf eine Agarplatte legen Sie einen Filterstreifen, der mit **Antitoxin** getränkt ist. *Corynebacterium diphtheriae*-Stämme streichen Sie im rechten Winkel zum Streifen aus und bebrüten alles. Toxin und Antitoxin diffundieren nun in den Agar. Wie in Abbildung d.2 gezeigt, entsteht dort, wo das Toxin auf das Antitoxin trifft, eine **Präzipitationslinie**. Es gibt ähnliche Nachweisverfahren für Toxine auch bei anderen Bakterien.

Venereal-Disease-Research-Laboratory-Test (VDRL) oder auch Cardiolipin-Mikroflockungstest

Cardiolipin ist ein Phospholipid, das in der inneren Membran von Mitochondrien vorkommt. Da sich die Mitochondrien normalerweise ja in der Zelle befinden, kommen die Immunzellen des Menschen nicht mit dem Cardiolipin in Kontakt. Dies ändert sich, wenn viele Zellen zerstört werden (etwa bei einer Infektion mit *Treponema pallidum* spp. *pallidum*). Cardiolipin wird freigesetzt und der Körper bildet daraufhin AK dagegen. Sobald die Infektion abgeheilt oder austherapiert ist, verschwinden die Cardiolipin-AK wieder.



Der VDRL oder auch Cardiolipin-Mikroflockungstest ist nicht spezifisch für Lues! Der Titer der Cardiolipin-AK gibt aber ein gutes Maß für die Aktivität der Infektion. Sind hohe Cardiolipin-Antikörper-Titer vorhanden, ist Ihr Patient noch therapiebedürftig. Sie können diesen Test nur in Kombination mit anderen Lues-spezifischen Testsystemen verwerten!

Und so funktioniert der Test: Lipidextrakt aus dem Rinderherzen (da ist nämlich Cardiolipin drin) wird mit dem Patientenserum zusammengebracht und die gelösten Lipide werden von den AK ausgefällt. Der ausgefällte AG-AK-Komplex ist für das bloße Auge sichtbar (Abbildung d.2). Der VDRL wurde vom RPR abgelöst.

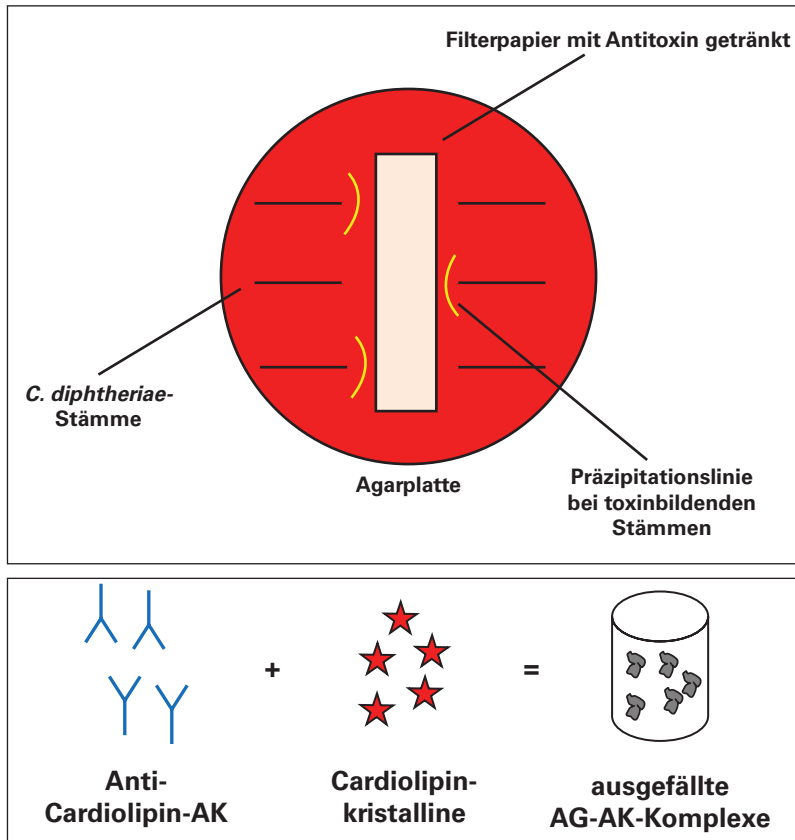


Abbildung d.2: Schematische Darstellung von Präzipitationsreaktionen. Oben: auf einer Agarplatte (zum Beispiel Elek-Ouchterlony-Test); unten in Lösung (zum Beispiel VDRL-Test)

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) – die guten alten Zeiten

Das Komplementsystem ist ein Teil der unspezifischen Immunantwort und sorgt vor allem dafür, dass AG (etwa von eingedrungenen Bakterien) schnell aus dem Körper entfernt werden, bevor der Organismus mit der Produktion der spezifischen AK hinterher kommt. Bei der klassischen Komplementaktivierung läuft eine Kaskade von Aktivierungsreaktionen ab, die letzten Endes dazu führt, dass in der körperfremden Zelle ein **lytischer Komplex** gebildet wird, der die Zelle zum Platzen bringt.

Bei der KBR reagieren AG über Nacht mit den AK des Patienten – sofern er denn welche hat – unter Verbrauch des zugegebenen Komplements. Am zweiten Tag werden das **hämolytische System, Ambozeptor** (ein AK, der Erythrozyten lysieren kann) und Erythrozyten dazugegeben. Der Ambozeptor kann die Erythrozyten jedoch nur mit Hilfe des Komplements lysieren. Hatten die AG jedoch bereits am Vortag AK aus dem Patientenserum zur

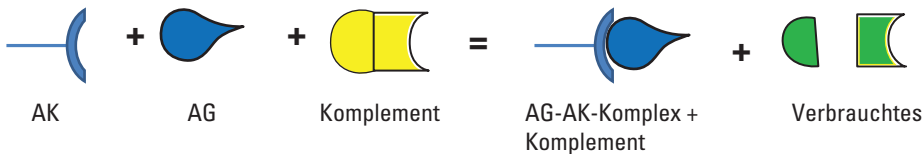
Verfügung und haben sie miteinander reagiert, wurde das Komplementsystem durch diese AG-AK-Komplexe bereits aktiviert (= verbraucht) und ist nun nicht mehr vorhanden. Die Erythrozyten bleiben in diesem Fall intakt und folgen der Schwerkraft auf den Boden des Reaktionsgefäßes. Dort bilden Sie einen sogenannten »Knopf«.

Sind im Patientenserum allerdings keine AK vorhanden, dann gibt's in der ersten Reaktionsphase auch keine AG-AK-Komplexe und das Komplement wird nicht verbraucht. Der Ambozeptor hat am zweiten Tag noch das ganze Komplement für sich allein und kann damit die Erythrozyten zerstören. Die Hämolyse färbt die Flüssigkeit rötlich klar ein (Abbildung d.3).



Da bei der KBR eine definierte Menge an Komplement dazugegeben wird, muss das patienteneigene Komplement zuvor aus dem Serum entfernt werden. Das erreichen Sie durch die Hitzeinaktivierung. Stellen Sie das Serum dafür einfach für die vom Hersteller vorgegebene Zeit bei vorgegebener Temperatur (meist 56 °C) in ein Wasserbad oder einen Heizblock.

1. Tag: AK in Patientenprobe (hitzeinaktiviert) + bekanntes AG + Komplement (definierte Menge) = AG-AK-Komplement-Komplex



2. Tag: Zugabe vom hämolytischen System. Der Ambozeptor kann die Erythrozyten nur mit Hilfe des Komplements lysieren. Da das Komplement allerdings schon gebunden (»verbraucht«) ist, kann diese Reaktion nicht stattfinden. Die Erythrozyten fallen auf den Grund des Gefäßes (Knopfbildung).



Fehlen im Patientenserum die AK, kann das Komplement am zweiten Tag mit dem hämolytischen System reagieren und der Ambozeptor lysiert die Erythrozyten.

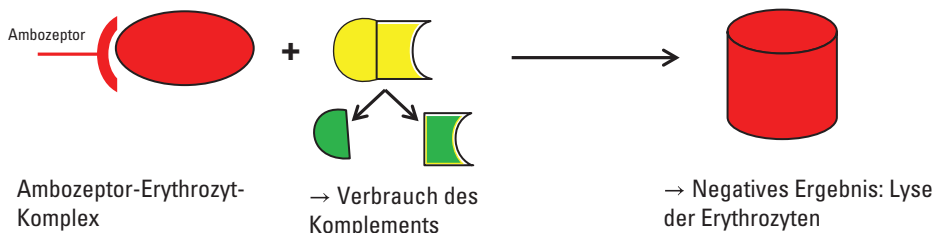


Abbildung d.3: Prinzip der Komplementbindungsreaktion (Erklärung im Text)

Widal-Reaktion – Agglutinationsreaktion

Mit der Widal-Reaktion können Sie AK gegen *Salmonella Typhi* und *Paratyphi* (AK gegen die O-AG und H-AG) sowie gegen Shigellen und Yersinien nachweisen. In Kapitel 22 wurde Ihnen die partikelgebundene Agglutination am Beispiel des Treponema-pallidum-Partikel-Agglutinationstestes (TPPA) ja schon vorgestellt. Die Widal-Reaktion beruht auf dem gleichen Prinzip, nur ohne Partikel. Zu einer Verdünnungsreihe mit Patientenserum geben Sie Testseren, welche entsprechende Suspensionen von Erreger-AG enthalten. Bilden sich Agglutinate, hat(te) Ihr Patient mal Kontakt mit dem Unruhestifter. Inwieweit der AK-Nachweis für die Behandlungsbedürftigkeit des Patienten spricht, müssen Sie immer mit der Klinik und ggf. dem Mikrobiologen Ihres Vertrauens abklären.

Agglutinationshemmungsreaktion – positive Hemmungen

In Kapitel 22 wurden Ihnen ja schon einige Agglutinationsreaktionen vorgestellt. Hier kommt ein Test, wie der Name schon sagt, mit einigen Hemmungen. Bei der Agglutinationshemmungsreaktion wird ein AG (zum Beispiel das Rötelnvirus) verwendet, das in der Lage ist, Erythrozyten zu einer »Matte« zu agglutinieren. Wenn Sie jedoch zum Virus vorher Patientenserum mit AK geben, wird das Virus durch die Komplexbildung gebunden und ist nun nicht mehr in der Lage, Erythrozyten zu agglutinieren. Als Folge sinken die ungebundenen Erythrozyten auf den Boden des Reaktionsgefäßes und bilden einen »Knopf«. Die Agglutination wurde, wie das Testprinzip schon sagt, gehemmt. In Abbildung d.4 sehen Sie den Testablauf am Beispiel der Hämagglutinations-Hemmungsreaktion (HAHR) für AK gegen das Rötelnvirus.

A AK im Patientenserum vorhanden: positive Reaktion



B Keine AK im Patientenserum: negative Reaktion



Abbildung d.4: Agglutinationshemmungsreaktion am Beispiel für Röteln-Antikörper (Erklärung im Text)



Denken Sie daran, zuerst das AG mit dem Patientenmaterial zusammenzubringen und beiden genügend Zeit zur Bindung zu lassen. Für Sie heißt das: Inkubationspause und Kaffee trinken. Erst danach können Sie die Erythrozyten dazugeben. Wenn Sie alles gleichzeitig zusammen pipettieren, streiten sich die AK aus dem Patientenserum mit den Erythrozyten um die Aufmerksamkeit der Viren.

Der kompetitive ELISA – gegen Konkurrenz muss man sich durchsetzen können

In Kapitel 22 wurde Ihnen schon der Sandwich-ELISA vorgestellt. Die zweite Methode, der kompetitive ELISA, wird eher selten durchgeführt, aber es gibt ihn halt doch. Beim kompetitiven (lateinisch: »*competitor*« = Mitbewerber) ELISA geben Sie enzymmarkierte AK zusammen mit dem Patientenmaterial in den Test. Diese markierten AK, die gegen das gleiche (!) AG gerichtet sind wie die Patienten-AK, konkurrieren mit ihren Brüdern und Schwestern aus dem Patientenmaterial um Bindungsstellen am Boden des Reagenzgefäßes. Binden wenige Patienten-AG bzw. -AK, können mehr markierte AG bzw. AK binden. Je mehr markierte AK binden, umso größer wird der Substratumsatz und umso stärker der Farbumschlag des Chromogens, d. h., bei dieser Testmethode ist der Farbumschlag umgekehrt (!) proportional zur Menge des Analyten im Patientenmaterial. Je geringer (!) der Farbumschlag, umso mehr AG beziehungsweise AK war im Patientenmaterial vorhanden (Abbildung d.5).

Kompetitiver ELISA zum Nachweis von AK

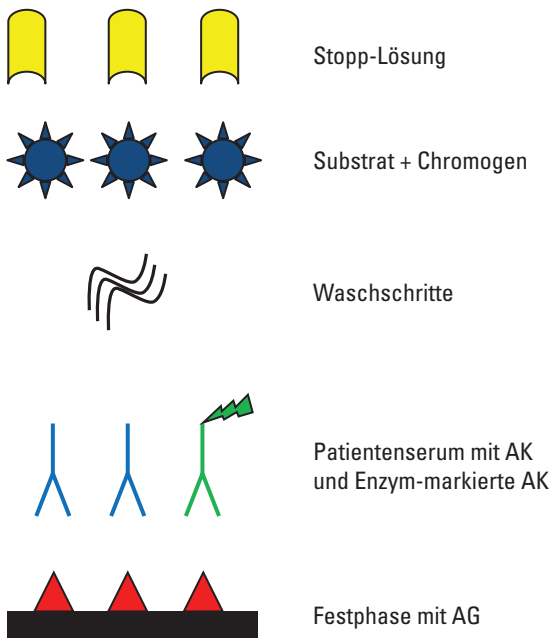


Abbildung d.5: Schematische Darstellung des Prinzips des kompetitiven ELISA (Erklärung im Text)



Beim **Sandwich-ELISA** ist der gemessene Farbumschlag proportional zur Menge an AG beziehungsweise AK im Patientenmaterial. Je größer die Menge, umso größer der Farbumschlag.

Beim **kompetitiven ELISA** ist der gemessene Farbumschlag umgekehrt proportional zur Menge an AG beziehungsweise AK im Patientenmaterial. Je größer die Menge, umso geringer der Farbumschlag.

Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-T) – von Pilzen und den Immunzellen von Urzeitierchen

In diesem Abschnitt lernen Sie den (auch für viele Routinelabore unbekannten) *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Test kennen. Wie die Interferon-Gamma Release Assays gehört auch der LAL-T nicht zu den klassischen AG-AK-Reaktionen, passt aber in den Teil zur Serologie am besten hinein. Mit dem LAL-T können Sie das 1,3- β -D-Glukan-Antigen im Serum nachweisen. Er dient als Hilfsmittel für die Diagnose einer invasiven Mykose.

Das 1,3- β -D-Glukan ist ein **entzündungsförderndes Polysaccharid**, welches in vielen **Pilzen**, einigen Bakterien, aber auch in Pflanzen vorkommt. Es ist ein unabdingbarer Bestandteil der Zellwand dieser Organismen. Interessant ist dieses AG vor allem für die Medizin, um **invasive, Pilzinfektionen und Pilzpneumonien** des Menschen zu detektieren, da Sie es bei einer Pilzinfektion im Serum nachweisen können. Unter anderem sind folgende klinisch relevante Pilze Eigentümer von diesem AG:

- ✓ Schimmelpilze: *Aspergillus spp.*
- ✓ Hefepilze: *Candida spp.*, *Pneumocystis jirovecii*, *Saccharomyces cerevisiae*
- ✓ Hautpilze: *Trichosporon spp.*
- ✓ Dimorphe Pilze: *Histoplasma spp.*, *Blastomyces spp.*



Bei einem positiven LALT-Ergebnis können Sie die Erregerspezies nicht unterscheiden!

Pilze, die wenig (wie zum Beispiel der Hefepilz *Cryptococcus neoformans*) oder gar kein (zum Beispiel die wichtigen Schimmelpilze *Absidia*, *Mucor* und *Rhizopus*) 1,3- β -D-Glukan produzieren, können im LALT nicht erkannt werden. Der dimorphe Pilz *Blastomyces* kann in der Hefephase auch nicht immer erkannt werden!

Limulus – lebende Fossilien mit blauem Blut

Limulidae, zu Deutsch **Pfeilschwanzkrebse**, leben seit über 150 Millionen Jahren in den Weltmeeren. Trotz »niederer« Entwicklungsstufe können die einzelnen Tierchen nicht nur auf einen langen Stammbaum zurückblicken, sie haben wirklich blaues Blut (was jedes Adelshaus blass werden lässt). Der Grund: Anstatt Eisen als Sauerstofftransporter nutzten sie Kupfer, welches durch die Oxidation nicht rot, sondern zu einem schicken Blau wird, dem Hämocyanin. Ein weiterer zellulärer Bestandteil des Blutes der Pfeilschwanzkrebse sind die **Amöbozyten**. Sie sind ein Bestandteil des Immunsystems und reagieren auf fieberauslösende (pyogene) Stoffe wie die Endotoxine von gramnegativen Bakterien, das LPS und auch das 1,3- β -D-Glukan. Die Amöbozyten bilden Blutgerinnsel aus, welche nach Verletzungen den Blutverlust und die Invasion von Mikroorganismen verhindern sollen.

LAL-T – einem der ältesten Immunsysteme bei der Arbeit zuschauen

Das Prinzip des LAL-T beruht auf der **entzündungsfördernden Eigenschaft von 1,3- β -D-Glukan**, welches es auf das Lysat ausübt. Es beginnt eine Kettenreaktion, in der jeder Schritt den folgenden aktiviert. 1,3- β -D-Glukan aktiviert den Faktor G (ein Serinproteasezymogen, welches Proteine in Peptide, die nächstkleineren Bausteine der Proteine, spaltet), dieser wiederum wandelt ein **Progerinnungsenzym** in ein **aktives Gerinnungsenzym** um. Das Gerinnungsenzym spaltet von einem künstlich hergestellten, chromogenen Peptidsubstrat die chromophore (Farben bildende) Gruppe, das Chromophor, ab. Das entstandene Chromophor absorbiert Licht einer bestimmten Wellenlänge. **Im positiven Falle entsteht ein Farbumschlag, den Sie mittels eines Photometers** (wird auch bei ELISA verwendet) **messen können** (Abbildung d.6). Je größer die Menge des absorbierten Lichtes, umso größer ist die Konzentration an 1,3- β -D-Glukan im Serum. Durch das Mitführen einer Standardkurve können Sie die Konzentration des 1,3- β -D-Glukan im Serum abschätzen.

Die Durchführung – eigentlich ganz simpel

Beim Arbeiten mit dem LAL-T müssen Sie darauf achten, dass keine Materialien oder Reagenzien mit **Glukan** (beispielsweise Pilzpartikel vom Körper, der Kleidung oder Verbrauchsmaterial) **verunreinigt** sind. Der Ablauf ähnelt den »normalen« AK-AG-Testsystemen.

1. Zubereitung der Reagenzien aus dem Testkit laut Herstellerangaben.
2. Vorbehandlung des Patientenserums, um die Serinproteasen und Serinproteaseinhibitoren, die im Serum vorkommen, zu inaktivieren. Zudem werden die Glukane, die in einer Dreifachhelix vorliegen, aufgetrennt. Die einzelsträngigen Glukane können besser nachgewiesen werden.

3. Zugabe des Faktors G, des Progerinnungsenzyms und des chromogenen Peptidsubstrates.
4. Inkubation laut Herstellerangaben.
5. Ablesen des Farbumschlages mit Hilfe des Photometers.

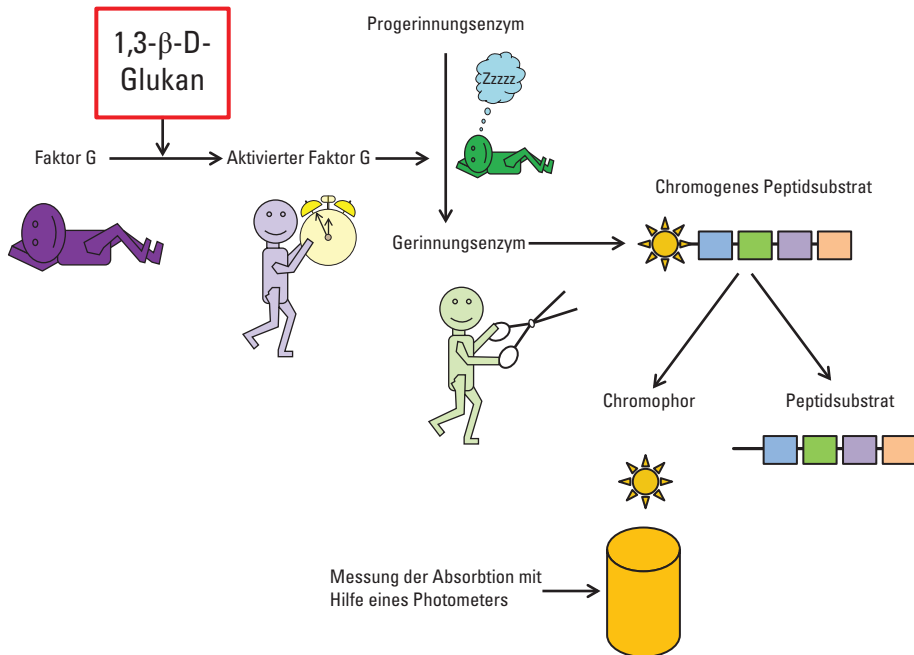


Abbildung d.6: 1,3-β-D-Glukan aktiviert den Faktor G aus dem Amöbozyten-Lysat. Der aktivierte Faktor G ist in der Lage, ein inaktives Progerinnungsenzym zu aktivieren. Das aktivierte Gerinnungsenzym spaltet von einem Peptidsubstrat das Chromophor ab. Es entsteht ein Farbumschlag, den Sie mit Hilfe eines Photometers messen können.

Falsche Testergebnisse – auch beim LAL-T gibt es Fehler

Wie erwähnt, können Sie nicht alle Pilze mit dem LAL-T nachweisen. Aber es gibt auch falsch positive Ergebnisse. Diese können zum Beispiel folgende Ursachen haben:

- ✓ grampositive Sepsiserreger (wie *Staphylococcus ssp.*)
- ✓ Operationen durch Gaze und Einsatz operativer Schwämme vor der Blutabnahme
- ✓ hämolytische oder lipämische Proben
- ✓ vorangegangene Antibiotikatherapie mit zum Beispiel Cefotaxim



Der Limulus-Amöbozyten-Lysat Test ist nur eine Hilfestellung bei der Diagnostik invasiver Pilzinfektionen! Ein negatives Ergebnis schließt eine Pilzinfektion nicht aus, ein positives Ergebnis müssen Sie klinisch weiter abklären (zum Beispiel durch Abnahme von Blutkulturen bei Verdacht auf Candidämien).

Mit dem LAL-T können Sie auch Endotoxin (LPS) von gramnegativen Stäbchen nachweisen. Anstatt den Faktor G setzen Sie im Test die Faktoren C und B ein. LPS aktiviert Faktor C, welcher wiederum Faktor B aktiviert. Der aktivierte Faktor B wandelt daraufhin das Progerinnungsenzym in das aktive Gerinnungsenzym um. Der Testablauf ist dann der Gleiche wie beim 1,3- β -D-Glukan.

So, das war noch ein kurzer Extra-Ausflug in die große Welt der Serologie. Und wer weiß, vielleicht wird Ihnen doch mal so ein Test über den Weg laufen!

Antikörper-Aviditäts-Bestimmung – richtig feste binden

Die **Avidität ist die Bindungsstärke**, mit der ein **AK an seinem AG bindet**. Am Anfang der Infektion (also bei einer frischen Infektion) passen die gebildeten AK noch nicht ganz so gut zu ihrem AG. Je länger die Infektion andauert, umso mehr AK werden gebildet, die besser und fester an ihr AG binden. Das ist ein bisschen so, als ob Sie einem Kind einen viel zu großen Wintermantel kaufen. Je länger Sie warten umso besser passt er, bis er irgendwann perfekt sitzt (nur das AK nicht aus ihren »Klamotten herauswachsen« und dann neue gekauft werden müssen). Wichtig ist diese Aviditätsmessung vor allem bei IgG-AK. Einige Patienten können, aus unterschiedlichen Gründen, kein IgM bilden. IgM-AK stehen ja für eine frische Infektion. Als »Ersatz« dient bei Verdacht auf eine frische Infektion der 4-fache Titer-Anstieg bei IgG oder (zum Beispiel bei Toxoplasmose) eine niedrige IgG-Avidität (also eine schwache Bindung zu den AG).

Und so funktioniert der Test (Abb. d.07): Je nach Testsystem und Hersteller werden maschinelle ELISA-Verfahren oder Immunfluoreszenzteste verwendet. Bei diesen Tests setzten Sie das Patientenmaterial zwei Mal an. Nach der ersten Inkubation, in der die Patienten-AK an ein festphasengebundenes AG binden konnten, wird in einem Ansatz mit normalem Waschpuffer gewaschen (Abb. d.07 A). In dem anderen Ansatz mit einer Lösung, die dafür sorgt, dass die niedrig-aviden (also nicht so gut passenden AK) von den AG abgelöst werden (Abb.: d.07 B). Dazu können Sie zum Beispiel Harnstoff verwenden. Die weiteren Testschritte sind wieder identisch. Sie geben ein Konjugat dazu und waschen wieder (diesmal in beidem mit dem normalen Waschpuffer, schließlich wollen Sie ja nicht das Konjugat ablösen). Im Falle des ELISA kommt noch Chromogen-Substrat und Stopplösung dazu. Das Gerät misst jetzt in beiden Ansätzen die AK-Menge. In der Probe, die Sie mit normalem Puffer gewaschen haben, haben Sie die Gesamtmenge der Patienten-AK. In der Probe, die mit Harnstoff gewaschen wurde, sind nur die AK übrig geblieben, die sich an ihrem AG sehr gut festhalten konnten. Durch die unterschiedliche Menge an gebunden AK ergeben sich unterschiedlich starke Farbumschläge beziehungsweise Fluoreszenz-Intensitäten. Aus diesem Verhältnis berechnet das Gerät jetzt die Gesamt-Avidität in Prozent-Angaben.



Je höher die AK-Avidität ist umso länger liegt die Infektion schon zurück. Ist die AK-Avidität niedrig, handelt es sich wahrscheinlich eher um eine frische Infektion.

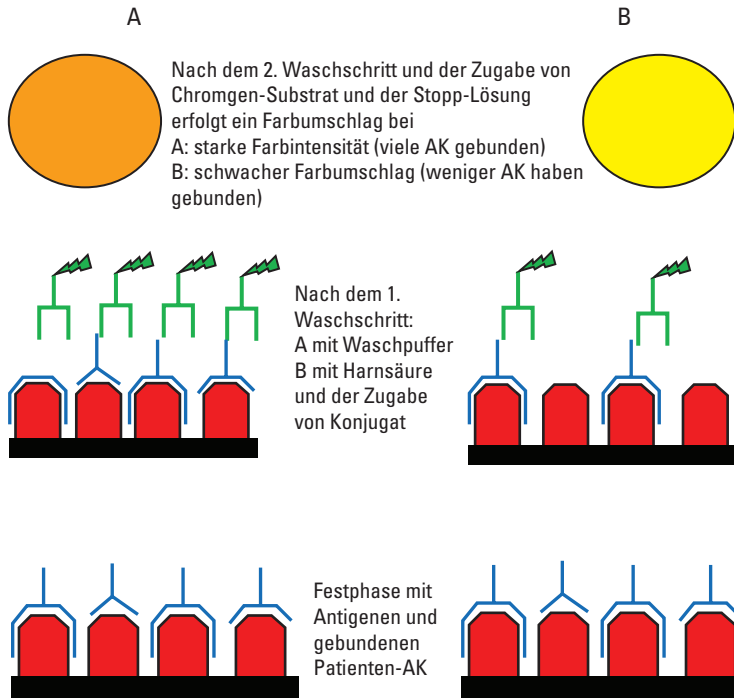


Abbildung d.7: Die AK-Aviditätsbestimmung am Beispiel eines ELISA (Erklärung im Text).