

Optimierung des Line-Blots als einfaches und sensibles Verfahren für die immunologische Diagnose der Schistosomiasisinfektion

Inauguraldissertation
zur Erlangung eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Stefanie Petereit
aus Neustrelitz

Gießen 2002

Aus dem Biochemischen Institut

Leiter: Prof. Dr. Preissner
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. E. Beck

Gutachter: Prof. Dr. A. Sziegoleit

Tag der Disputation: 30.06.2003

Zusammenfassung

Die Schistosomiasis ist eine durch digene Trematoden hervorgerufene Infektionskrankheit, an der mehr als 200 Millionen Menschen vor allem in Entwicklungsländern leiden. Die Saugwürmer leben im Blutgefäßsystem des Menschen und führen aufgrund der Abwehrreaktion gegen die zahlreichen abgegebenen Eier zu schweren Organschädigungen, hauptsächlich von Milz und Leber. Die Vermehrung der Parasiten erfolgt über eine Süßwasserschnecke als Zwischenwirt und der Mensch infiziert sich bei Wasserkontakt mit den aus der Schnecke ausgeschiedenen Larven, den sogenannten Zerkarien. Das Krankheitsbild reicht von klinisch unauffälligen Verläufen bis hin zu schweren Erkrankungen, die unter Umständen tödlich verlaufen können. Da besonders Kinder und junge Menschen betroffen sind, ist die Bilharziose auch ein großes wirtschaftliches Problem für die betroffenen Länder. Um diese Krankheit dauerhaft auszurotten, ist es notwendig, durch ein geeignetes Diagnoseverfahren alle infizierten Personen zu ermitteln und medikamentös zu behandeln. Dies erfolgt heute vorzugsweise mit Praziquantel, einem sehr potenten Chemotherapeutikum. Erfolgreich behandelte Patienten scheiden nach einiger Zeit keine Eier der Parasiten mehr aus, die zur Infektion weiterer Personen führen könnten. Das zur Zeit gebräuchlichste Diagnoseverfahren ist der Nachweis von Schistosomeneiern im Stuhl oder Urin. Weiterhin wird ein immunologisches Verfahren zur Diagnose herangezogen, das auf dem Nachweis zirkulierender Antigene im Blut der Patienten beruht. Mit diesen gängigen Diagnoseverfahren werden aber nur mittlere bis starke Infektionen erfasst. Da aber auch leicht infizierte Menschen Eiausscheider sind, kann der Infektionskreislauf nicht wirksam unterbrochen werden. Leichte Infektionen können anhand parasitenspezifischer Antikörper, die sich im Blut der infizierten Personen befinden, nachgewiesen werden. Dazu ist es notwendig, spezifische Antigene für den Nachweis der Antikörper zur Verfügung zu haben. In der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Ewald Beck konnten in der Vergangenheit drei diagnostische Antigene rekombinant hergestellt werden. Es handelt sich hierbei um die Antigene SmE16 (Ei-Calmodulin), Sm31 (Cathepsin B) und Sm32 (Haemoglobinase). Tests mit dem ELISA ergaben keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Dagegen wurden gute Ergebnisse im sogenannten Line-Blot erhalten. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Antigene direkt auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen werden. An diese Antigene binden die im Serum der Patienten vorhandenen Antikörper, die dann wie im ELISA mit enzymkonjugierten monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden.

Beim Line-Blot ist der Antikörper mit alkalischer Phosphatase markiert und als Ergebnis dieser Diagnose werden blauschwarze, mit dem bloßen Auge erkennbare Farbbanden auf der Nitrozellulose erhalten. Durch den Einsatz der drei Antigene in einer Mischung werden sehr deutliche und somit einfach auszuwertende Farbsignale erzielt. Im letzten Jahr wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Ewald Beck bei der Herstellung der Antigene Veränderungen vorgenommen, mit dem Ziel, die sich bei vorherigen Versuchen mit dem Line-Blot als instabil erwiesene Antigene zu stabilisieren. Vor allem das Antigen Sm32 in seiner neuen Form ist weitaus stabiler und zeigte eine sehr hohe Sensitivität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das neue Sm32 untersucht und der Line-Blot unter extremen Verhältnissen getestet, um seine Belastbarkeit und Eignung für den Feldeinsatz zu ermitteln. Der Line-Blot ist eine sehr empfindliche Nachweismethode. Es können nahezu alle, auch sehr schwache Infektionen nachgewiesen werden. Er hat allerdings auch seine Grenzen. Die gegen diese drei Antigene gerichteten Antikörper bleiben über lange Zeit im Blut des Patienten nachweisbar. Auch nach erfolgreicher Chemotherapie, wenn die betroffene Person keine Eier mehr ausscheidet, werden diese Immunglobuline noch nachgewiesen. Dies hat zur Folge, dass therapierte, nicht mehr infizierte Personen nicht von akut infizierten unterschieden werden können. Durch eine sorgfältige Dokumentation der Ergebnisse kann allerdings der unnötigen Verabreichung von Medikamenten vorgebeugt werden. Wertvolle Hilfe kann der Line-Blot dort leisten, wo durch Bewässerungsmaßnahmen noch nicht kontaminierte Gebiete bewohnbar gemacht werden. Wenn alle Neuankömmlinge mit dem Line-Blot getestet und, wenn nötig mit Praziquantel gehandelt werden, kann sich die Schistosomiasis dort nicht ausbreiten. Ähnlich verhält es sich mit Gebieten, die durch den Einsatz von Molluskiziden und weiterführenden hygienischen Maßnahmen weitgehend von der Bilharziose befreit werden konnten. Nur mit diesem sehr empfindlichen Immundiagnoseverfahren können auch klinisch unauffällige Eiausscheider, welche die herkömmlichen Diagnoseverfahren nicht erfassen, erkannt und erfolgreich behandelt werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Schistosomiasis	1
1.2	Lebenszyklus des Parasiten	2
1.3	Pathogenese und Krankheitsbild	5
1.3.1	S. haematobium	6
1.3.2	S. mansoni	7
1.3.3	S. japonicum	9
1.4	Bekämpfung der Seuche	10
1.5	Therapie	12
1.6	Diagnose	13
1.6.1	Parasitologische Verfahren	13
1.6.2	Immunologische Verfahren	15
1.6.3	Nachweis zirkulierender Antigene	15
1.6.4	Nachweis Schistosomen-spezifischer Antikörper	16
1.7	Der Line-Blot als neues Diagnoseverfahren	19
1.8	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material	23
2.1	Bakterien, Plasmide, Antibiotika, Kulturmedien	23
2.2	Materialien für die Immunreaktion	24
2.3	Chemikalien	25
2.4	Lösungen und Puffer	27
2.4.1	Puffer und Lösungen für den Line-Blot	27
2.4.2	Puffer für die Aufreinigung des Sm32	28
2.4.3	Puffer für die Aufreinigung des SmE16	29
2.4.4	Puffer für die Gelelektrophorese	30
2.4.5	Farblösungen	31
2.5	Geräte	31
2.6	Sonstiges Material	32

3	Methoden	33
3.1	Biochemische und mikrobiologische Methoden	33
3.1.1	Expression von rekombinanten Proteinen	33
3.1.2	Proteinaufreinigung mit dem QIAexpress-System	33
3.1.2.1	Proteinaufreinigung des SmE16	33
3.1.2.2	Proteinaufreinigung des Sm32	34
3.1.3	Proteinbestimmung nach Bradford	34
3.1.4	Bestimmung des Reinheitsgrades der Proteine auf dem SDS-Polyacrylamidgel	35
3.2	Line-Blot	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Eignung verschiedener Membranen für die Immundiagnose	38
4.1.1	Vergleich verschiedener Membranen	38
4.1.2	Vergleich verschiedener Chargen der BA 85 Membran	41
4.1.3	Stabilität der Antigen-Nitrozellulose-Bindung	42
4.2	Chemisches Cross-linking der Antigene	44
4.2.1	Bestimmung der optimalen Cross-linking-Zeit	45
4.3	Mechanische Verfeinerung des Verfahrens	49
4.3.1	Einfluss der Zusammensetzung des Waschpuffers	54
4.3.2	Einfluss des Eintrocknens der Antigene auf die Signalstärke	56
4.4	Feldtauglichkeit	57
4.4.1	Einsatz verschiedener Wassersorten	57
4.4.2	Einfluss der Temperatur auf den Line-Blot	60
4.5	Verwendung von Blut, das aus Filterpapier rückeluiert wurde	61
4.6	Antikörper- und Antigenverdünnung	62
4.6.1	Optimierung der Antikörperkonzentration	64
4.6.2	Optimierung der Inkubationszeiten	65
4.6.3	Bestimmung der optimalen Antigenkonzentration	67
4.7	Weitere Optimierung durch Eliminierung von Störfaktoren	69
4.7.1	Einfluss von Waschpufferresten beim Färben	69
4.7.2	Färben in den Wannen	70
4.8	Einfluss der Lagerung der Teststreifen auf die Signalstärke	72
4.9	Die endgültige Verfahrensweise beim Line-Blot	74

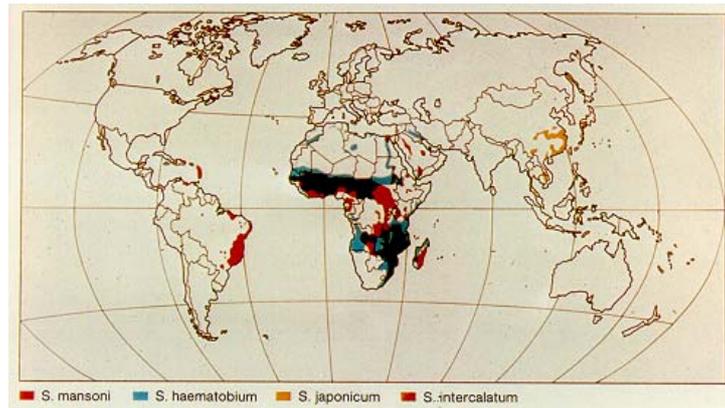
5	Diskussion	78
		78
5.1	Vorteile des Line-Blot gegenüber anderen Immundiagnoseverfahren	
5.2	Durchführung des Line-Blots unter optimierten Bedingungen	79
5.3	Das neue Antigen Sm32	80
5.4	Die optimale Konzentration des SmE16 und Bestimmung des Schwellenwertes	80
5.5	Versuche zur Stabilisierung der Antigene durch chemische Quervernetzung	82
5.6	Feldtauglichkeit	82
5.7	Nutzen und Grenzen des Line-Blots im Vergleich mit anderen diagnostischen Verfahren	84
5.7.1	Vorteile des Line-Blot-Verfahrens	84
6	Literatur	86

1 Einleitung

1.1 Schistosomiasis

In tropischen Ländern stellt die Schistosomiasis (Bilharziose) nach wie vor ein wesentliches, noch nicht zufriedenstellend gelöstes Gesundheitsproblem dar. In über 70 Ländern in Afrika, Südamerika und Asien sind Schistosomosen endemisch. Die Zahl der infizierten Menschen wird auf mindestens 200 Millionen, die der jährlichen Todesfälle auf einige 100 000 geschätzt (WHO, 1996). In Europa tritt die Bilharziose gelegentlich als Importkrankheit bei Tropenrückkehrern auf. Bereits in über 3000 Jahre alten ägyptischen Mumien wurden Eier dieser Parasiten gefunden. Aufgrund zeitgenössischer Aufzeichnungen kann davon ausgegangen werden, dass schon damals diese Infektionskrankheit bekannt war. Erste wissenschaftliche Daten stammen von Theodor Bilharz (1825-1862), der 1851 *Schistosoma haematobium* im Blutgefäßsystem eines Menschen entdeckte. Diese Entdeckung führte zur ebenfalls gebräuchlichen Bezeichnung Bilharziose für diese Krankheit. Die Erreger der Schistosomiasis sind Trematoden der Gattung *Schistosoma*. Die Schistosomatiden parasitieren in Vögeln (Bilharziellinae) und Säugern (Schistosomatinae), sind getrenntgeschlechtlich und teils stark sexualdimorph.

Die wichtigsten beim Menschen vorkommenden *Schistosoma*-Arten sind *S. haematobium*, *S. mansoni* und *S. japonicum*. *S. intercalatum* und *S. mekongi* haben nur lokale Bedeutung. Selten entwickeln sich auch an Tiere adaptierte *Schistosoma*-Arten, wie *S. bovis* und *S. mattheei*, im Menschen bis zur Geschlechtsreife. Je nach Art des Parasiten unterscheiden sich die von der Eiablage am stärksten betroffenen Organe. Bei *S. haematobium* (Afrika) sind es die Urogenitalorgane, bei *S. mansoni* (Afrika, Südamerika) Darmwand und Leber und bei *S. japonicum* (Philippinen, China) ebenfalls Darmwand und Leber.



Verbreitungsgebiete der Schistosomiasis,
(Foto: Siegenthaler 1992)

Von der Morphologie her sind diese Arten einander sehr ähnlich. Das dickere Männchen umschließt das deutlich schlankere Weibchen in einer mit den Seitenrändern des Körpers gebildeten ventralen Rinne, dem *canalis gynaecophorus*. Auf dieser Erscheinung der Dauerpaarung basiert die Bezeichnung Pärchenegel. Erst in diesem *Canalis gynaecophorus* eines Männchens erfolgt die Weiterentwicklung des Weibchens zur Geschlechtsreife. Die 6 mm bis 20 mm (Männchen) bzw. 7 mm bis 26 mm (Weibchen) langen Würmer leben im Gefäßsystem des Menschen und ernähren sich vom Blut. Mit ihren Saugnäpfen heften sich die Männchen an der Wand der Vene fest. In diesen Blutgefäßen überleben die Pärchenegel im Schnitt acht Jahre. Einzelne Egel können ein Alter von bis zu dreißig Jahren erreichen. Die äußerst fruchtbaren Weibchen legen mehrere 100 bis 1000 Eier täglich.

1.2 Lebenszyklus des Parasiten

Die nach der Paarung in den Blutgefäßen vom Weibchen abgesetzten Eier, die in Gefäßen unmittelbar am Darm- bzw. Blasenlumen sitzen, können die Wand durchbrechen und mit dem Kot oder Urin ins Freie gelangen. Sie können aber aufgrund ihrer Lokalisation in den Gefäßen auf hämatogenem Weg auch in andere Organe z.B. Lunge oder Leber gelangen und dort die typischen Abwehrreaktionen hervorrufen. Dadurch geht ein Teil der Eier und mit ihnen die Larven, die sich in ihnen entwickelt haben, zugrunde.

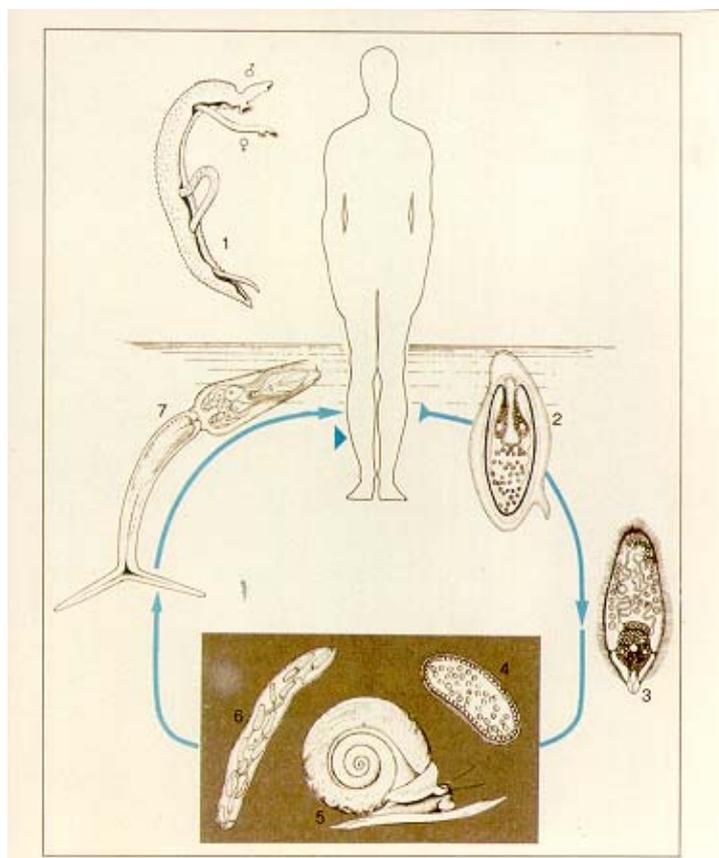
In den über Kot und Urin der infizierten Personen ins Freie ausgeschiedenen Eiern befinden sich bereits entwickelte Larven (Mirazidien). Damit diese schlüpfen können, müssen bestimmte Bedingungen erfüllt sein. Zum einen müssen sich die Eier im Wasser befinden, zum anderen muss eine Temperatur von mindestens 25°C herrschen.

Für ein weiteres Überleben obligat ist ein geeigneter Zwischenwirt. Wird dieser Zwischenwirt (bestimmte Süßwasserschnecken) innerhalb der nächsten Stunden nicht gefunden, müssen die Mirazidien verhungern. Je nach Schistosomenart sind nur bestimmte Schnecken geeignet. Bei *S. mansoni* handelt es sich um Lungenschnecken der Gattung *Biomphalaria*, bei *S. haematobium* um Schnecken aus der Gattung *Bulinus* und bei *S. japonicum* um sogenannte *Oncomelania*. Die Reifungszeit in dem befallenen Zwischenwirt beträgt mehrere Wochen. In dieser Zeit entwickelt sich aus der sich mit Hilfe ihrer Bohrdrüsen in den Körper der Schnecke eingedrungenen Larve eine Mutter-Sporozyste. Dabei handelt es sich um eine weitere Larvenform, aus der mehrere Tochter-Sporozysten entstehen. In jeder dieser Tochter-Sporozysten entstehen viele charakteristisch aussehende Gabelschwanzlarven. Diese Gabelschwanzlarven, auch Zerkarien genannt, schwärmen aus der Süßwasserschnecke aus. Die sich jetzt im Wasser befindenden Zerkarien sind die eigentliche Infektionsgefahr für den Menschen.

Durch Penetrationsdrüsen, die bestimmte Enzyme (u.a. Elastase) ausscheiden, sind sie in der Lage, sich durch die menschliche Haut einen Weg in den Körper zu Lymph- bzw. Blutgefäßen zu bahnen. Ebenfalls infizieren kann sich der Mensch mit dem Trinkwasser. Während des Eindringens werfen die Larven ihren Gabelschwanz ab. Nach der Differenzierung zum Schistosomulum gelangen die Parasiten via Gefäße passiv mit dem Blutstrom zur Lunge und von dort zum linken Herzen und über den großen arteriellen Blutkreislauf in das kleine Becken.

Nach der Paarung verweilen die adulten Formen von *S. mansoni* und *S. japonicum* in den Darm- und Mesenterialvenen, *S. haematobium* dagegen im Venengeflecht der Harnblase bzw. der ableitenden Harnwege und die Weibchen scheiden drei bis sechs Wochen (*S. haematobium*) nach der Invasion die ersten Eier aus.

Entwicklungszyklus von *S. mansoni*



(Foto: Kayser, 1992)

1. Männchen und Weibchen
2. Frisch ausgeschiedenes Ei mit Mirazidium
3. Frei schwimmendes Mirazidium
4. Sporozyste im Zwischenwirt
5. Zwischenwirt (Biomphalaria)
6. Tochttersporozyste mit Zerkarien
7. Freie Gabelschwanzzercarie

1.3 Pathogenese und Krankheitsbild

Die Beschwerden bei dieser Parasitose reichen von klinisch stummen Verläufen über unspezifische Allgemeinsymptome bis hin zu schweren, das Allgemeinbefinden der Patienten stark beeinträchtigenden Krankheitsbildern. Besonders schwere Krankheitsverläufe können zum Tode führen. Die klinisch stummen Verläufe findet man vor allem bei Betroffenen, deren Allgemeinzustand vor der Infektion gut bis sehr gut war. Auch die Stärke der Infektion spielt eine entscheidende Rolle. Für gewöhnlich korrelieren Eizahl (Anzahl der im Stuhl bzw. Urin ausgeschiedenen Eier) und Schwere der Symptome miteinander. Auch bei klinisch inapparent verlaufenden Infektionen scheiden die Patienten Eier aus.

Es werden zwei Hauptformen im klinischen Erscheinungsbild unterschieden. Zum einen die Blasenbilharziose, durch *S. haematobium* hervorgerufen, zum anderen die Darmbilharziose, durch *S. intercalatum*, *S. japonicum* und *S. mansoni* hervorgerufen. Die ersten Stadien der Infektion sind bei allen Arten allerdings gleich. An den Eintrittstellen der Gabelschwanzzerkarien in die Haut bilden sich innerhalb der nächsten Stunden juckende, erythematöse Quaddeln. Diese auch als Zerkarien- bzw. Schistosomendermatitis bezeichnete Hauterscheinung klingt nach wenigen Tagen spontan ab. Sie ist Zeichen einer Sensibilisierung und tritt demzufolge erst bei einem wiederholten Kontakt von Mensch und Zerkarien auf.

Ein bis zwei Monate nach der Infektion treten erste ernstere Beschwerden auf. Die Patienten berichten von Fieber, Mattigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen. Diese sehr unspezifischen Symptome werden dem Initialstadium zugeordnet. Das Blutbild fällt in dieser Phase durch eine Leukozytose mit ausgeprägter Eosinophilie auf. Die Intensität des folgenden Krankheitsbildes ist stark abhängig von der Schwere der Infektion. Besonders heftige Formen der Akutphase werden bei Infektionen mit *S. japonicum* beobachtet. In diesen Fällen spricht man vom Katayama - Syndrom.

Die im chronischen Stadium auftretenden Organmanifestationen unterscheiden sich je nach Erregerart. Entscheidend für die Ausbildung dieser Symptome sind nicht die Würmer selbst sondern deren Eier. Als Reaktion auf die Anwesenheit der Eier bilden sich Granulome vom Pseudotuberkulose Typ.

Diese Granulome sind T-Zell vermittelt. Im Zentrum befindet sich das Ei, um welches sich Granulozyten anordnen. Ein Ring von Epitheloidzellen bildet die äußere Begrenzung, welche sich in älteren Granulomen zu einem Epitheloidzellwall umwandeln kann.

Durch die Abwehrreaktionen des Körpers sterben viele der Eier im Gewebe ab, und gelegentlich kommt es zu Verkalkungen.

Außer ihrer direkt lokal schädigenden Wirkung auf das umliegende Gewebe stimulieren die Eier auch die Proliferation von Fibroblasten, die eine verstärkte Umwandlung von organspezifischen Gewebe zu Bindegewebe bewirken. Dadurch kommt es zu Deformationen und letztlich auch zu beträchtlichen Funktionseinschränkungen bzw. -ausfällen der betroffenen Organe. Je nach Organbefall können die Granulome wiederum verschiedene Folgezustände auslösen.

1.3.1 S. haematobium

S. haematobium gilt als Erreger der Urogenitalbilharziose mit Symptomen vor allem im Harnsystem. Die Eier von *S. haematobium* sind primär in der Blasenwand und den Wänden des ableitenden Harnsystems lokalisiert. Patienten, die mit *S. haematobium* infiziert sind, leiden unter Schmerzen beim Wasserlassen. Durch die Schädigung der Harnwegswände kommt es zur Makrohämaturie. Typische Komplikationen sind entzündliche Vorgänge in den Nieren und ableitenden Harnwegen. Auffällig sind sandfarbene Flecken (sandy patches) von variabler Größe auf der Harnblasenschleimhaut. An diesen Stellen ist die Schleimhaut atrophiert und die Blase somit verstärkt anfällig für Ulzera und polypöse Läsionen. Das Trigonum vesicae und die Urethra selbst sind davon am häufigsten betroffen. Chronische Ulzera können Fissuren der Muskelschicht verursachen. Ist die Anzahl der kalzifizierten Eier in der Blasenwand sehr hoch, kann das Bild einer verkalkten Blase entstehen. Bei Patienten mit dieser Komplikation imponiert die auf Röntgenbildern sehr scharf abbildbare Blase. Während der Behandlung der Krankheit kann manchmal eine teilweise oder vollständige Lösung der Verkalkungen erreicht werden. Die genauen Vorgänge sind allerdings noch ungeklärt. Durch die Chronizität der Blasenulzera lässt sich das erhöhte Auftreten von Blasenkrebs, das in Endemiegebieten von *S. haematobium* beobachtet wird, erklären.

Die Harnleiter sind weniger häufig betroffen, sind aber zum größeren Teil für die komplizierten Verläufe dieser Krankheit verantwortlich. Aufgrund ihres geringen Durchmessers kommt es schnell zu Obstruktionen in ihrem Verlauf, was durch den Rückstau von Urin vor den Verengungen zu extremer Dilatation führt.

Häufig findet man zusätzlich noch eine Hydronephrose, die durch einen Rückstau bis in die Nierenbecken hervorgerufen wird.

Durch den Druck des aufgeweiteten Nierenbeckens und Kelchsystems kann es zur Druckatrophie des Nierengewebes kommen, was ohne Behandlung zu einer Niereninsuffizienz mit Urämie führt.



Fig. 42. Plain X-ray of the pelvis showing dense calcification of the bladder.

Bei dieser Nativaufnahme des Beckens ist die Blase aufgrund der sehr starken Verkalkung der Wand deutlich zu erkennen. (Foto: Jordan, 1993)

1.3.2 *S. mansoni*

Als Erreger der Darmbilharziose hat *S. mansoni* besonders in Afrika und Südamerika große Bedeutung. Auch Doppelinfektionen mit *S. haematobium* treten auf. Außer geringer morphologischer Differenzen sind vor allem in der Lokalisation der Eier Unterschiede im Vergleich zu *S. haematobium* zu finden.

Bevorzugter Ablageort sind bei dieser Art die Venen der Dickdarmwand und die der Dünndarmwand. Die mit *S. mansoni* infizierten Patienten fallen im Stadium der Organmanifestation durch intestinale Störungen auf. Leibschmerzen, Obstipation und Dysenterien sind die häufigsten und leider sehr unspezifischen Symptome. Auch hier bilden sich um die Eier herum Pseudotuberkulosegranulome. Im Rahmen von Koloskopien und Rektoskopien werden die durch die Granulome entstandenen Knötchen und Rötungen der Darmschleimhaut sichtbar. In schweren Fällen sind auch hier Ulzera die Folge. Dadurch kann es zu schleimig-blutigen Durchfällen kommen, den typischen Begleitsymptomen der Schistosomendysenterie. Die wichtigste Differenzialdiagnose in diesem Stadium ist die Amöbenruhr.

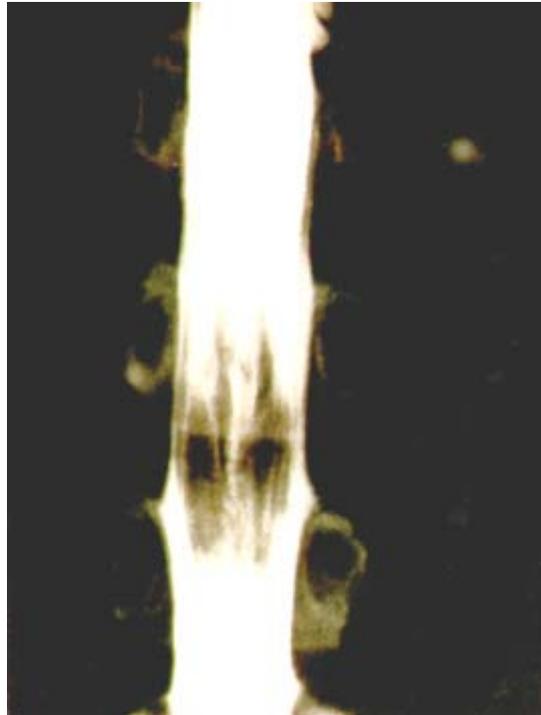
Durch Wucherungen und Verkalkungen in den Darmwänden wird auf Dauer die Darmperistaltik so stark behindert, dass es zu totalen Funktionsausfällen kommt. Dann ist der Dickdarm teilweise ausgeprägt palpabel und sehr druckempfindlich. Durch chronisch bestehende Ulzera können auch im Darm nach Jahren teils bösartige Tumoren entstehen.

Eine wesentliche Komplikation der Darmbilharziose ist die Tatsache, dass durch den physiologischen Blutstrom Schistosomeneier leicht in das Pfortadersystem abgeschwemmt werden können. Folge der Eianschwemmung ist eine Pylephlebitis (Pfortaderentzündung). Dies führt zur portalen Hypertonie, welche in manchen Fällen einen zirrhotischen Leberumbau bewirkt. Klinische Symptome sind hierbei Hepatosplenomegalie, Aszites und Oesophagusvarizen bzw. ein ausgeprägtes Caput medusae.

Die Eier können auch direkt bis in die Leber gelangen und dort durch die bereits erwähnte Stimulation von Fibroblasten zum Umbau des Leberparenchyms führen.

Von der Eiausschwemmung kann auch jedes andere Organ betroffen sein. Sind die Lungen betroffen, kann es zu akut lebensbedrohenden Embolien kommen, bzw. zur pulmonalen Hypertonie mit daraus folgendem Cor pulmonale, welches ebenfalls eine häufig beobachtete Todesursache darstellt. Bei Beteiligung des Rückenmarks kommt es je nach Stärke und Lokalisation der Läsionen zu den entsprechenden neurologischen Ausfällen.

Dieses Myelogramm (Röntgenaufnahme des Rückenmarks nach Kontrastmittelgabe in den Duralsack) zeigt deutliche Läsionen des Rückenmarks, hervorgerufen durch Einfeldern.



(Foto: Jordan, 1993)

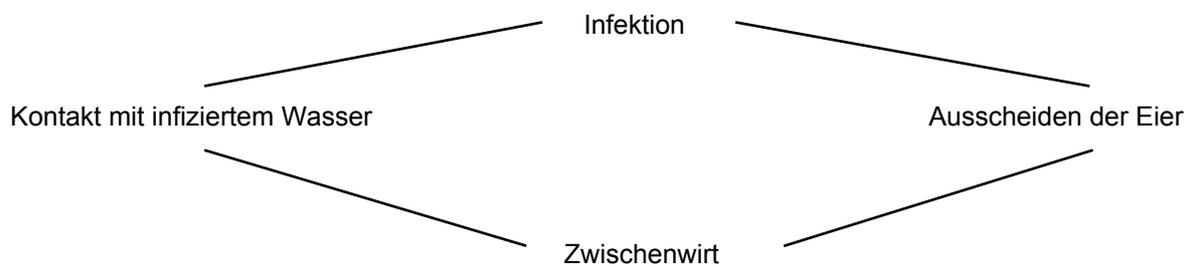
1.3.3 *S. japonicum*

Diese nur in Ostasien vorkommenden Parasiten leben ebenfalls in den Darmvenen und rufen somit ähnliche Symptome wie *S. mansoni* hervor, wobei der Dünndarm jedoch wesentlich häufiger betroffen ist. Infektionen mit *S. japonicum* verlaufen deutlich progredienter als andere. Sehr häufig sind die Lungen in Mitleidenschaft gezogen. Im Gegensatz zu *S. mansoni*- oder *S. haematobium*- Infektionen, bei denen eher das Rückenmark betroffen ist, sind die Eier von *S. japonicum*, wenn eine Beteiligung des ZNS vorliegt, bevorzugt im Gehirn zu finden. Es werden dann ein akutes und ein chronisches Stadium unterschieden. Das akute Stadium ähnelt in seiner Symptomatik einer Meningoencephalitis. Es treten Kopfschmerzen, Fieber und Dysphasien auf. Auch Hemiparesen sind bereits beobachtet worden.

Das chronische Stadium ist durch die Jackson-Epilepsie gekennzeichnet, bei der ein Anfall mit einem tonischen oder klonischen Krampf am distalen Ende einer Extremität beginnt und sich dann homolateral ausbreitet. Der Patient ist während der Ereignisse bei vollem Bewusstsein.

1.4 Bekämpfung der Seuche

Um die Schistosomiasis erfolgreich zu bekämpfen, ist die genaue Kenntnis des Infektionszyklus notwendig. Wichtig dabei ist es, zu erkennen, dass es sich um einen Kreislauf handelt, der an mindestens einer Stelle auf Dauer unterbrochen werden muss. Es folgt ein vereinfacht dargestellter Infektionszyklus:



Um die Kontamination von Gebrauchs- und Trinkwasser mit ausgeschiedenen Eiern zu verhindern, wäre es notwendig, im großen Maßstab angelegte Bewässerungsprojekte zu starten, bei denen die Abwässer strengstens vom Trinkwasser zu trennen sind.

Gleichzeitig wäre eine umfassende Aufklärung der gesamten Bevölkerung über hygienische Maßnahmen vonnöten. Da die betroffenen Gebiete allerdings fast immer in Entwicklungsländern liegen, ist die Durchführung dieses Ansatzes so gut wie unmöglich. Zum einen fehlen finanzielle Mittel zur Einrichtung von Abwasseranlagen, zum anderen ist aufgrund hoher Analphabetenraten die Aufklärung ein großes Problem. Mit Hilfe von massenweise verteilten Handzetteln, die sich der Bildersprache bedienen, konnten bereits Teilerfolge in der Aufklärung erzielt werden. Doch selbst wenn diese Informationen die Bevölkerung erreichen, wird nicht immer danach gehandelt. Ursache dafür sind unter anderem auch die meist im Laufe von mehreren Jahrhunderten entstandenen Traditionen dieser Menschen, die sicher nicht in einigen Jahren umgestürzt werden können.

Als nächste Möglichkeit zur Unterbrechung des Kreislaufes bietet sich die Bekämpfung der Zwischenwirte an. Wenn es gelingt, die für die vorherrschende Schistosomenart spezifische Süßwasserschnecke auszurotten, können die Mirazidien sich nicht zu ihrer infektiösen Form weiterentwickeln.

Als eine Möglichkeit bietet sich der Einsatz bestimmter Molluskizide an, welcher aber nur bei gleichzeitiger Behandlung der Bevölkerung Erfolg verspricht. Ungünstig hierbei ist die Tatsache, dass diese Molluskizide zugleich hochtoxisch für andere Lebewesen sind und das biologische Gleichgewicht in diesen Regionen empfindlich stören (Fenwick, 1987).

In der Praxis bewährt hat sich die Kombination aus Schneckenbekämpfung und hygienisch-erzieherischen Maßnahmen. Doch ist die Gefahr der Wiedereinschleppung der Erreger durch infizierte Personen, die aufgrund fehlender klinischer Symptome unerkant bleiben, sehr groß. Um den Kontakt der Bevölkerung mit infiziertem Wasser zu verhindern, müssen anderweitige Möglichkeiten zum Waschen und Trinken bestehen. Dies ist aber aus ökonomischen Gründen schwierig durchzuführen bzw. nahezu unmöglich. In den meisten betroffenen Gebieten gibt es außer den Seen, Flüssen und Bächen keine anderen Wasserquellen, und so dienen diese als Trinkwasserreservoir und als Wasch- und Badestellen. Die Abwässer und Fäkalien gelangen, wenn nicht direkt, dann durch Umwege früher oder später ohne spezielle Reinigung ebenfalls dorthin.

Als weiterer Ansatz zur Unterbrechung des Infektionszyklus ist die Bekämpfung der Infektion im Menschen selbst zu sehen. Infektionen könnten z.B. durch Vakzination verhindert werden, was zweifellos die optimalste Lösung wäre (Butterworth et al., 1987). Trotz intensiver Forschungen auf diesem Gebiet gibt es jedoch leider noch keine wirksam einsetzbaren Mittel.

Auch eine bleibende Immunität nach durchgestandener Infektion und danach erfolgreich durchgeführter Behandlung stellt sich nicht ein (Gryseels et al., 1991). Gebiete, deren Bevölkerung mit Praziquantel erfolgreich behandelt wurden, können jederzeit durch nur einige wenige neu zugewanderte Personen, die infiziert sind, wieder neu durchseucht werden. Da die chemotherapeutische Behandlung großer Bevölkerungsgruppen sehr kostenintensiv und meist von geringem Erfolg beschieden ist, wird sie so gut wie nicht mehr durchgeführt.

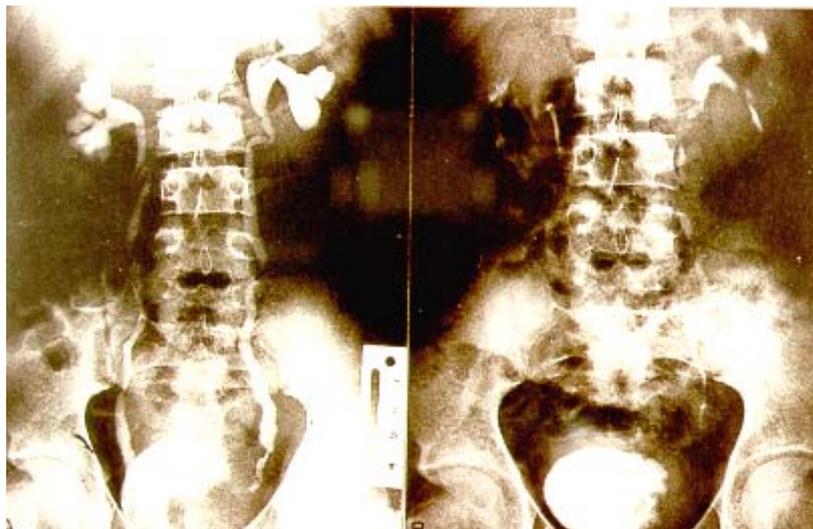
Will man die Infektion in Risikoregionen, die frei von Schistosomiasis sind, dauerhaft verhindern, ist es notwendig, diese in regelmäßigen Abständen auf infizierte Personen hin zu untersuchen und diese dann gezielt zu behandeln.

Das dazu benötigte Diagnoseverfahren muss also auch leicht infizierte Personen erkennen, die vielleicht keinerlei klinische Symptome aufweisen, aber genau wie schwer erkrankte Menschen Eier ausscheiden und somit sauberes Wasser kontaminieren.

1.5 Therapie

Seit Bekanntsein der Bilharziose (Mitte des 19. Jahrhunderts) wird nach geeigneten Medikamenten zur Behandlung dieser Erkrankung gesucht. Wirksame Verbindungen gibt es aber erst seit Anfang dieses Jahrhunderts. Antimonverbindungen waren die einzigen Chemotherapeutika, bei deren Anwendung auf vollständige Heilung gehofft werden durfte. Leider erwiesen sie sich aber als sehr nebenwirkungsreich. Nach einigen besser verträglichen Nachfolgern kam Anfang der 80iger Jahre Praziquantel -oder Biltricide- auf den Markt. Dieses äußerst potente Medikament hat so gut wie keine Nebenwirkungen, ist relativ kostengünstig und leicht verabreichbar. Die Dosis liegt je nach Erregerart zwischen 40 und 60 mg pro kg Körpergewicht und kann oral verabreicht werden (Dönges, 1988). Es ist gut resorbierbar und wird relativ schnell in der Leber metabolisiert und über die Nieren ausgeschieden. Als einzige Nebenwirkungen wurden nach Verabreichung der Höchstdosis in einigen Fällen Übelkeit und Benommenheit beobachtet (Thomas, 1981).

Ein Behandlungserfolg im Sinne einer Restitutio ad integrum ist aber nur bei Erkrankten zu erwarten, bei denen die Zerstörung körpereigenen Gewebes noch nicht oder nur in sehr geringem Maße stattfand. Bei Patienten deren Leber, Blase, Darm oder andere Organe bereits durch Granulombildung oder Kalzifizierungsvorgänge irreversibel geschädigt sind, helfen neben der medikamentösen Behandlung oft nur noch chirurgische Eingriffe.



Bei diesen beiden Bildern (Foto: Jordan, 1993) handelt es sich um Beckenaufnahmen nach Kontrastmittelgabe. Auf der Abbildung A ist zu erkennen, dass die Blase aufgrund eines Defekts nur unvollständig gefüllt wird. Außerdem fallen bilateral die gestauten Ureter und eine deutliche Hydronephrose auf. Bild B zeigt den gleichen Patienten acht Wochen später nach Therapie mit Praziquantel.

1.6 Diagnose

Bei Patienten mit typischen Symptomen und sorgfältig durchgeführter Anamnese ist die Diagnose der Schistosomiasis nicht schwer. Die klinische Diagnose allein ist jedoch nicht ausreichend, da sie in der Regel nur für lange und schwer infizierte Personen zur Anwendung kommt (Dönges, 1988). Bei frisch infizierten Personen, die entweder noch keine Beschwerden haben oder aber die ersten sehr unspezifischen Allgemeinsymptome wie Fieber und Dysenterien aufweisen, sind sowohl die klinische als auch die parasitologische Diagnose selten eindeutig. Das Problem dieser Parasitose besteht darin, dass sehr leicht infizierte Personen nicht als infiziert erkannt werden und trotzdem Eiausscheider sind. Im Gegensatz zu schwer erkrankten Patienten scheiden sie aber sehr wenig Eier aus, die beim Zählen leicht zu übersehen, als Infektionsquelle jedoch nicht zu unterschätzen sind. Das benötigte Diagnoseverfahren muss also sehr empfindlich sein. Die Ergebnisse einer Diagnose sollten außerdem Vorort einzusehen sein. Daher sollte das Diagnoseverfahren auch unter den in den betroffenen Gebieten vorherrschenden Bedingungen durchführbar sein.

In Anbetracht der finanziellen Situation der meisten von dieser Krankheit betroffenen Länder sollte die Diagnose nicht zu kostenaufwendig sein, zumal sie, zumindest in der ersten Zeit, bei fast allen Einwohnern angewandt werden muss. Später reicht es dann aus, nur Neuankömmlinge zu testen, um gegebenenfalls von der Krankheit befreite Gebiete nicht der Gefahr einer erneuten Durchseuchung auszusetzen.

1.6.1 Parasitologische Verfahren

Das gängigste Diagnoseverfahren ist der direkte Erregernachweis durch die Bestimmung der Eizahl. Dabei wird mit Hilfe eines Mikroskops nach Parasiteneiern im Stuhl oder Urin gesucht. Werden dabei Eier entdeckt, ist die Infektion als gesichert anzunehmen. Im Allgemeinen wird das Kato-Katz-Verfahren (Katz, 1972) angewandt. Stuhlproben werden auf einem Objektträger ausgestrichen und nach einigen Aufarbeitungsschritten auf Eier von *S. mansoni* bzw. *S. japonicum* hin untersucht. Aufgrund der spezifischen Merkmale der Eier können diese eindeutig der jeweiligen Schistosomenart zugeordnet werden. Die Eier von *S. haematobium* werden in Urinproben gesucht. Nach Filtration des Urins und einigen weiteren Aufarbeitungsschritten können vorhandene Eier gezählt werden.

Da Schistosomeneier aber intermittierend ausgeschieden werden, kann es vorkommen, dass bei Stuhlproben infizierter Personen keine Eier entdeckt werden. Ähnlich verhält es sich bei Urinproben. Durch die Tagesperiodik der Eiausscheidung bedingt, erhält man die sichersten Ergebnisse bei mittags gesammelten Proben. Negative parasitologische Ergebnisse sind demnach nicht sicher verwertbar. Durch das Untersuchen mehrerer Stuhlproben eines Patienten wird versucht, diesen Fehler möglichst gering zu halten. Trotzdem sind negative Befunde äußerst unzuverlässig. Ein weiterer kritischer Faktor ist das Vorhandensein von qualifiziertem Personal. Kenntnisse im Umgang mit Mikroskopen und das Beherrschen der Aufarbeitungsschritte sind unumgänglich. Auch die Motivation dieser Mitarbeiter spielt eine nicht zu vernachlässigende Rolle.

Durch Biopsien bei Koloskopien oder Blasenpunktionen lässt sich ebenfalls eine Diagnose stellen. Diese Verfahren sind für die Patienten aber in den meisten Fällen unnötige Belastungen und werden deshalb routinemäßig nicht eingesetzt.

1.6.2 Immunologische Verfahren

Bei den immunologischen Verfahren wird die Reaktion der körpereigenen Abwehr auf das Eindringen des Fremdorganismus bzw. Bestandteile desselben ausgenutzt. Dieser Fremdorganismus bzw. Bestandteile von ihm fungieren als Antigen. Der Patient reagiert auf die Fremdartigkeitsantigene mit der Bildung spezifischer Antikörper. Die gängigen immunologischen Diagnoseverfahren beruhen auf dem Nachweis dieser Antigene oder Antikörper.

1.6.3 Nachweis zirkulierender Antigene

Bereits 1961 wurde die Eignung der im Darm adulter Würmer gefundenen Antigene zu Diagnosezwecken erkannt (Okabe & Tanaka, 1961). Diese zuerst GASP (gut-associated schistosome proteoglycan) bezeichneten Antigene sind heute aufgrund ihrer Eigenschaften bei der Elektrophorese unter dem Namen CAA (circulating anodic antigen) bekannt. Im Serum und Urin von experimentell infizierten Tieren fand sich ein weiteres Antigen, CCA (circulating cathodic antigen; Deelder et al., 1976). Diese beiden Antigene können durch Bindung an monoklonale Antikörper markiert und somit nachgewiesen werden (Deelder et al., 1989). Da die Menge des zirkulierenden Antigens von der Menge der im Körper vorhandenen Würmer abhängig ist, korrelieren Antigenmenge und Stärke der Infektion miteinander. Nach erfolgreicher Chemotherapie mit Praziquantel sinkt der Antigen Spiegel sowohl im Serum als auch im Urin nach etwa einer Woche rapide ab (van Etten et al., 1997 *b*). Diese beiden Antigene sind spezifisch für Schistosomen-Infektionen, allerdings unterscheiden sie nicht zwischen *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* und andere Schistosomenarten (de Jonge et al. 1989; Agnew et al. 1995). Nur wenige falsch positive Testergebnisse wurden sowohl in nicht endemischen als auch in endemischen Gebieten gefunden. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit des Nachweises der Antigene im Urin der Patienten, dessen Gewinnung weniger invasiv als die von Blut bzw. Serum ist. Des Weiteren ist eine bestehende Korrelation zwischen ermittelter Antigenmenge und Stärke der Infektion bei diesem Verfahren für die Beurteilung der Wirksamkeit einer Therapie von großer Bedeutung (Feldmeier, H., 1993). Bei starken Infektionen hat diese Methode sicherlich ihre Vorteile gegenüber anderen diagnostischen Nachweisverfahren. Als problematisch erweist sich allerdings die Tatsache, dass die Antigene erst ab einer bestimmten Menge nachgewiesen werden können (de Jonge et al. 1988; van Lieshout et al. 1995a).

Ist ein Patient nur leicht infiziert und zeigt daher auch keine typischen Symptome, greift diese Methode nicht. Potentielle Eiausscheider werden somit übersehen, und der Infektionskreislauf wird nicht unterbrochen.

1.6.4 Nachweis Schistosomen-spezifischer Antikörper

Es wurde eine große Zahl von verschiedenen Nachweisverfahren für die vom infizierten Patienten gegen die Parasiten gebildeten Antikörper entwickelt. Heute übliche Verfahren zum Nachweis von Schistosomen-spezifischen Antikörpern sind z.B. der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT), der solid phase radioimmunosorbent assay (RIA) und der enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Bergquist, 1990; Feldmeier, 1993). Beim IFT binden mit fluoreszierendem Farbstoff markierte anti-human-IgM-Antikörper an die an ein diagnostisches Antigen gebundenen Antikörper aus dem Serum des Infizierten. Unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchten diese Anti-IgM-Antikörper auf. Beim ELISA sind die anti-human-IgM-Antikörper mit einem Enzym konjugiert. Das Enzym dient zur Umwandlung eines farblosen Substrats in einen sichtbaren Farbstoff. Beim RIA sind die anti-human-Antikörper radioaktiv markiert und können in geeigneten Messgeräten nachgewiesen werden.

Eine häufig angewandte IFT-Methode zum Nachweis von Schistosomen-spezifischen Antikörpern ist die Zerkarienhüllenreaktion (CHR) (Dönges, 1988). Lebende Zerkarien reagieren auf die Anwesenheit von Antikörpern mit der Bildung einer membranösen Hülle. Dabei dient ihre Glykokalix als Antigen. Durch Bewegungen der Zerkarien hebt sich diese Membran vom Körper ab und wird somit mikroskopisch sichtbar. Ein weiterer Immunfluoreszenztest verwendet auf Objektträger aufgebrachte Kryoschnitte von adulten Würmern, die zunächst mit Patientenserum und dann mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Humanantikörper inkubiert und anschließend mikroskopisch untersucht werden. Zur Diagnostik in europäischen Ländern sind diese Verfahren gut geeignet und sicher in ihrer Aussage. In endemischen Gebieten sind sie aber ungeeignet, da man die für Massenuntersuchungen benötigten lebenden Zerkarien bzw. Kryoschnitte in diesen Mengen nicht zur Verfügung hat.

Eine häufig angewendete Diagnosetechnik ist der ELISA, der erstmalig von Engvall & Perlman 1971 beschrieben wurde. Als Voraussetzung für dieses Verfahren muss eine ausreichend große Menge an spezifischem Antigen zur Verfügung stehen. Am häufigsten kommt ein löslicher Extrakt aus den Eiern der Parasiten (SEA = soluble egg extract) zum Einsatz.

Der Nachweis ist relativ empfindlich, allerdings liegt die Spezifität aufgrund von Kreuzreaktionen nur bei ca. 90 %. Um die mangelnde Spezifität des Nachweises von Schistosomeninfektionen durch ELISA mit Wurm- oder Eiextrakten als Antigen zu verbessern, wurde von Moser, Doumbo & Klinkert (1990) ein TSP-ELISA (transferable solid phase ELISA) entwickelt, der auf dem Nachweis von Antikörpern gegen drei rekombinant hergestellte Wurmantigene, dem shock protein 70 (Moser et al. 1991) und den Antigen Sm31 und Sm32 (Klinkert et al. 1991) basiert. Dieses Verfahren erwies sich als sehr spezifisch, jedoch wurde keine ausreichende Sensitivität erreicht, obwohl bei dieser Form des ELISA besonders viel Antigen in den mit einer speziellen Oberfläche beschichteten Mikrotiterplatten gebunden werden kann.

Andere verwandte Verfahren wie Western-Blot und Dot-Blot mit Extrakten aus adulten Würmern wurden ebenfalls entwickelt. Bei diesen Tests werden Parasitenextrakte statt auf Mikrotiterplatten auf Membranen aufgebracht und wie beim ELISA mit Patientenserum inkubiert. Der Nachweis gebundener parasitenspezifischer Antikörper geschieht durch enzymkonjugierte anti-Humanantikörper und eine nachgeschaltete enzymvermittelte Farbreaktion. Der Dot-Blot als relativ einfaches Verfahren hat sich als besonders geeignet für den Feldeinsatz in endemischen Gebieten gezeigt (Boctor et al. 1987), allerdings besitzt er bei Verwendung von rohen Wurmextrakten als Antigen keine hohe Spezifität (siehe unten).

Alle Verfahren zum Nachweis Schistosomen-spezifischer Antikörper im Serum von Patienten sind auf die Verfügbarkeit geeigneter diagnostischer Antigene angewiesen. Die bisher eingesetzten Antigene werden im Folgenden kurz vorgestellt.

a) Diagnostische Larvenantigene

Larvenantigene fanden bisher wenig Verwendung in der Diagnostik, da sie nicht an die von Wurm- oder Eiantigenen vorgegebene Sensitivität und Spezifität heranreichen. Die niedrige Reaktivität ist vermutlich durch die nur kurze Verweildauer und die geringe Masse der Larven im Wirt zu erklären. Stark ausgeprägten Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen humanpathogenen und apathogenen bzw. nur tierpathogenen Spezies limitieren darüber hinaus den Einsatz in Gebieten, in denen für den Menschen ungefährliche Arten gehäuft vorkommen (z.B. *Schistosoma bovis* in Afrika). Möglicherweise jedoch liegt in den Larvenantigenen noch ein Potential zur genaueren Ermittlung des Stadiums (akut oder chronisch) der Infektion.

b) Diagnostische Antigene adulter Würmer

Rohe Extrakte aus adulten Würmern sind das am einfachsten zu erhaltene und daher am häufigsten zur Diagnose eingesetzte Antigenmaterial. Diese Antigene reagieren im allgemeinen gut mit Infektionsseren und zeigen eine deutlich höhere Sensitivität und auch Spezifität als Larvenantigene (Lunde, Ottesen & Cheever, 1979). Die Spezifität von rohem Wurm-Antigen liegt allerdings nicht höher als bei ca. 85-90 %. Einzelne aufgereinigte Wurmantigene zeigen dagegen eine deutlich höhere Spezifität. Ein weiterer Vorteil der aufgereinigten Antigene ist z. B die Möglichkeit der Bestimmung der Dauer der Infektion. Patienten mit akuten Infektionen zeigen im ELISA einen höheren Titer von IgA und IgM gegen bestimmte Antigene als Patienten im chronischen Stadium der Infektion (Valli et al. 1997). Weiterhin bietet die Differenzierung zwischen Antikörperklassen und -subklassen eine Möglichkeit zur Ermittlung des Immunitätsstatus eines Patienten nach stattgehabter Infektion (Satti et al. 1996 a). Dem Einsatz von Wurmantigenen in immundiagnostischen Routineverfahren stehen allerdings die hohen Kosten für die notwendige Aufreinigung einzelner Antigene bzw. Antigenfraktionen im Wege.

c) Diagnostische Ei-Antigene

Ein roher Extrakt aus den Eiern von *S. mansoni* (SEA = soluble egg extract) hat sich bisher als am geeignetsten für die Immundiagnose erwiesen. Ein ELISA mit SEA als Antigen wird routinemäßig bei Touristen in parasitologischen Abteilungen von Krankenhäusern in Großbritannien eingesetzt. Antikörper gegen Bestandteile der Eier entstehen im infizierten Wirt sehr früh nach der Infektion. Mit SEA können Infektionen bereits in einem Stadium diagnostiziert werden, in dem noch keine klinischen Symptome auftreten bzw. noch keine Eier im Stuhl nachzuweisen sind (Dunne et al. 1984). Dies ist dadurch bedingt, dass die Eier nur durch eine heftige Immunreaktion des befallenen Wirtes in Form einer Granulombildung um das Ei freigesetzt werden. Dieser Prozess dauert drei bis vier Wochen. Der immunologische Nachweis mit SEA hat eine Spezifität von ca. 90%. Auch bei den Ei-Antigenen sind gereinigte Formen wiederum spezifischer, allerdings kommen sie aufgrund limitierter Mengen zur allgemeinen Anwendung in der Diagnose nicht in Frage.

d) Rekombinante diagnostische Antigene

In den vergangenen Jahren wurde eine große Zahl von Proteinen verschiedener Schistosomenarten rekombinant hergestellt. Obwohl die Mehrzahl dieser rekombinanten Proteine Immunreaktionen mit humanen Infektionsseren zeigt, hat nur ein kleiner Teil davon diagnostisches Potential. Dies liegt darin begründet, dass viele dieser Proteine entweder mit Seren von Patienten mit anderen Infektionskrankheiten kreuzreagieren, oder dass einzelne Antigene nur bei einer geringen Zahl von Patientenseren zu einer ausreichend starken Immunreaktion führen. Von mehreren in der Literatur beschriebenen rekombinant hergestellten diagnostischen Antigenen aus adulten Würmern überzeugten im Wesentlichen nur das Protein Sm31 (Cathepsin B) und die Proteinase Sm32 aufgrund ihrer ausgeprägten Immunreaktion. Beide Antigene treten im Darm der Würmer auf und sind aufgrund der Tatsache, dass der Darminhalt in regelmäßigen Abständen regurgitiert wird offensichtlich in besonderer Weise immunogen. Trematoden besitzen nämlich nur eine Darmöffnung für Nahrungsaufnahme und Ausscheidung der Verdauungsprodukte. Dies gilt in ähnlicher Weise auch für ein drittes beschriebenes diagnostisches Protein, das Ei-Antigen SmE 16 (Klinkert, Ruppel & Beck, 1987; Moser, Doenhoff & Klinkert, 1992), das in größeren Mengen von den im Gewebe festsitzenden Eiern ausgeschieden wird. Diese Antigene können als rekombinante Proteine in Bakterien oder in Hefe in nahezu beliebiger Menge hergestellt werden, was sich wesentlich auf den Kostenfaktor eines Diagnoseverfahrens auswirkt.

1.7 Der Line-Blot als neues Diagnoseverfahren

Wie oben dargestellt, gibt es eine Vielzahl von Diagnosemöglichkeiten für eine Schistosomeninfektion. Trotzdem gibt es keine, die sich als problemlos in endemischen Gebieten einsetzbar herausgestellt hat. Die Gründe dafür sind vielfältig. Eine wichtige Rolle spielt dabei sicher die sehr hohe Anzahl der zu untersuchenden Proben. In den betroffenen Regionen ist dies ein Vielfaches der hierzulande üblichen Mengen. Daraus folgend liegt auch die Menge der benötigten Materialien (Chemikalien, Geräte, usw.) wesentlich höher. Keines der bisher entwickelten Verfahren ist einfach und billig genug für einen flächendeckenden Einsatz im Feld, welches der erste Schritt zur dauerhaften Ausrottung der Schistosomiasis sein muss.

Zum anderen sind die meisten immunologischen Verfahren zur Verlaufskontrolle einer nach der Diagnosestellung veranlassten Chemotherapie ungeeignet. Einmal gebildete Antikörper können bis zu lebenslang im Körper der Patienten nachweisbar bleiben. Somit werden gesunde Menschen, die bei ehemals bestehender Infektion erfolgreich behandelt wurden, als seropositiv eingestuft und vielleicht nochmals medikamentös therapiert. Es gilt also abzuwägen, was bei Vorhandensein eines genügend empfindlichen und preiswerten Diagnoseverfahrens für die Bevölkerung ungünstiger ist: die an sich unnötige Mehrfachmedikation (Praziquantel) oder die Gefahr der Wiedereinschleppung der Bilharziose in Gebiete, deren Einwohner nachweislich nicht mehr infiziert sind.

Um das Problem der mangelnden Sensitivität des ELISA zu umgehen, wurde in der Arbeitsgruppe Beck vor einiger Zeit der sog. Line-Blot entwickelt. Das Prinzip des Line-Blot ähnelt dem des ELISA, allerdings kommt eine erheblich größere Menge Antigen zum Einsatz, was zu einer deutlichen Steigerung der Nachweisempfindlichkeit führt. Um eine ausreichende Menge Antigen für die Immunreaktion mit den Humanseren zur Verfügung zu haben, werden die Antigene auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen, die eine weitaus höhere Bindekapazität besitzt als die Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte. Der Auftrag der Antigene auf die Membran erfolgt mit einem Tuschestift. Um falsch positive Reaktionen zu vermeiden, müssen die Antigene in sehr reiner Form vorliegen. Der Verlauf der Immunreaktion entspricht prinzipiell dem des ELISA.

Eine wesentliche Voraussetzung für den Line-Blot ist das Vorhandensein einer genügend großen Menge an Antigenen. Sie können direkt von den Würmern bzw. Eiern gewonnen werden. Die dabei erreichbaren Mengen sind jedoch zu gering und der Aufwand zu groß. Daher wird im Line-Blot mit rekombinanten Antigenen gearbeitet. Um eine möglichst starke Immunreaktion zu erhalten, müssen die rekombinanten Proteine in nativer bzw. zumindest teilweise richtig gefalteter Konformation erfolgen. Da chronisch infizierte Patienten oft nur sehr niedrige spezifische Antikörper-Titer besitzen, ist die Ausbildung der konformationalen Epitope der Antigene wichtig, denn die Mehrzahl der Antikörper ist gegen konformationale Epitope gerichtet.

Bei den eingesetzten Antigenen handelt es sich um die Schistosoma-mansoni-Antigene Sm31 (Cathepsin B), Sm32 (Hämoglobinase) und um das Ei-Antigen SmE16 (Calmodulin). Das Calmodulin ist ein kalziumbindendes Protein und mit dem Troponin C verwandt.

Es macht ca. 0,5% des Gesamtproteins der adulten Würmer aus, wobei seine genaue Rolle, die es in den Schistosomeneiern spielt, noch ungeklärt ist. (Moser et al., 1991). Bei dem bisher in der Arbeitsgruppe Beck im Line-Blot verwendeten rekombinant hergestellten Sm32 befand sich am C-terminalen Ende ein Histidin-Affinitätspeptid für eine einfache Aufreinigung mit Hilfe einer Nickelchelate-Affinitätschromatographie. Diese Form des Sm32 erwies sich im Line-Blot als nicht sehr stabil, d.h. das Antigen verlor schnell seine Fähigkeit, effizient mit Infektionsseren zu reagieren (Rinnert, 1996). Daher wurde eine andere Form des Antigens hergestellt, bei dem sich das Affinitätspeptid am N-terminalen Ende befindet. Außerdem ist es am N-terminalen Ende um fünf Aminosäuren verkürzt. Das so veränderte Sm32 erwies sich in der Immunreaktion als bedeutend stabiler. Es wird angenommen, dass sich das am C-terminalen Ende angefügte Histidin-Affinitätspeptid störend auf die Faltung und damit auf die funktionelle Stabilität auswirkte.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Zur endgültigen Ausrottung der Schistosomiasis in den betroffenen Gebieten müssen alle erkrankten Menschen mit Praziquantel behandelt werden. Um unnötig kostenaufwendige Massenbehandlungen zu vermeiden, ist es notwendig, ein Diagnoseverfahren zur Verfügung zu haben, das so empfindlich ist, dass zuverlässig auch leicht infizierte Personen erkannt werden. Die zur Zeit eingesetzten Verfahren, die auf der Eiauszählung im Stuhl oder Urin beruhen, greifen im Allgemeinen nur bei Infizierten, die mindestens 100 Eier pro Gramm Stuhl ausscheiden. Menschen, die so viel Eier ausscheiden, sind aber bereits stark infiziert, leiden für gewöhnlich unter typischen Symptomen und sind daher meist schon anhand der klinischen Symptome leicht zu erkennen. Ziel der Behandlung ist neben der Heilung der Patienten auch das Verhindern weiterer Eiausscheidungen in die Umwelt. Patienten, die weniger als 100 Eier pro Gramm Stuhl ausscheiden, werden mit den gängigen Methoden nur noch zu einem geringen Prozentsatz, Patienten mit weniger als 10 Eiern pro Gramm Stuhl gar nicht mehr aufgefunden. Diejenigen, die unerkant bleiben, da sie im klinischen Sinne nicht erkrankt sind, scheiden aber auch weiterhin Eier aus.

Da nach einer durchgestandenen bzw. erfolgreich behandelten Infektion trotz weiterhin vorhandener Antikörper keine Immunität gegen Schistosomiasis besteht, ist es nur eine Frage der Zeit, wann sich ehemals Erkrankte erneut infizieren und wieder als Eiausscheider fungieren.

Es werden also regelmäßige Massenbehandlungen mit Praziquantel notwendig. Dies ist aber sowohl finanziell, technisch als auch logistisch in den meisten betroffenen Gebieten nicht möglich. Mit einem geeigneten Diagnoseverfahren, das empfindlich genug ist, können auch leicht infizierte Personen erkannt und behandelt werden. Somit wird eine vollständige Behandlung aller infizierter Personen sichergestellt und der Kreislauf auf Dauer unterbrochen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Line-Blot weiter zu optimieren, das in neuer Form hergestellte Antigen Sm32 auf seine Eignung hin zu testen und die Flexibilität dieses Diagnoseverfahrens gegenüber äußeren Einflüssen zu bestimmen. Dazu wurde mit unterschiedlichen Materialien gearbeitet, um Alternativen zu den bisher verwendeten Methoden zu entwickeln und zu einer optimalen Durchführung des Testsystems zu gelangen. Weiterhin wurden die in den betroffenen Ländern vorherrschenden Umweltbedingungen so genau wie möglich simuliert, um eventuelle Einflüsse der Umgebungstemperatur auf die Durchführbarkeit des Line-Blots zu erkennen. Gleichzeitig wurden die finanziellen Aspekte beachtet, um einen Test zu erhalten, der auch in Entwicklungsländern eingesetzt werden kann.

2 . Material

2.1 Bakterien, Plasmide, Antibiotika, Kulturmedien

E. coli M15:

Als Abkömmling des K12 Stammes wurde dieser E. coli Stamm (F⁻, Str^R, lacZ^{del}, Zamenhof et al., 1972) zur Vermehrung der beiden pDS-Plasmidkonstruktionen für die Expression von Sm32 und SmE16 benutzt. Durch das zusätzlich in ihm enthaltene Repressorplasmid pREP4 ist er in der Lage, die notwendigen Mengen des lac-Repressors in den Bakterien zur Verfügung zu stellen.

Plasmide

- pDS-Sm32 (Füllkrug , Kießling-Parr; Labor E. Beck)
- pDS-SmE16 (Roth; Labor E. Beck)

Kulturmedien und -platten für Bakterien

- LB-Medium: 1% Bacto-Tryptone, Difco, 0,5% Bacto-Yeast-Extract, 0,5% NaCl
- LB-Platten: LB-Medium mit 1,5% Bacto Agar

Antibiotika

- Ampicillin, Serva, Heidelberg
- Kanamycinsulfat, Merck und Co. Darmstadt

LB-Platten mit Antibiotika folgender Konzentrationen:

- Ampicillin: 100
µg/ml
- Kanamycin: 25 µg/ml

2.2 Materialien für die Immunreaktionen

Infektionsseren:

Die Seren, die für die Optimierungsversuche benutzt worden sind, wurden von langzeitinfizierten Afrikanern während einer Feldstudie in Zusammenarbeit mit der „Ecole Nationale de Medicine et de Pharmacie du Male“ gewonnen. Diese Studie wurde von 1989 bis 1990 durchgeführt. Vier Seren stammen von infizierten Touristen.

Des Weiteren wurden Seren der Bevölkerung eines Dorfes in Papua-Neuguinea, die 1997 gewonnen wurden, verwendet. Diese Seren wurden von Prof. Dr. David Pritchard, University of Nottingham, England zur Verfügung gestellt.

Europäische Kontrollseren:

Als Kontrollseren wurden Seren von ehemaligen Labormitarbeitern der Arbeitsgruppe E. Beck (ZMBH, Universität Heidelberg) und Seren von Blutspendern der Universitätsklinik Gießen, die von der Blutbank Gießen zur Verfügung gestellt wurden, benutzt. Es wird vorausgesetzt, dass die Spender weder akut mit Schistosomen infiziert sind, noch dass sie es je waren.

Endemische Kontrollseren:

Diese Kontrollseren stammen von Labormitarbeitern aus Mali, die nach eigenen Angaben nicht infiziert waren.

Alle Seren wurden mit 50 % Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

Alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper:

- Ziege-anti-Humanserum	IgG	(Dianova GmbH, Hamburg)
Fc- Fragmentspezifität		
0,6 mg/ml		
- Ziege-anti-Humanserum	IgM	(Dianova GmbH, Hamburg)
Fc- Fragmentspezifität		
0,3 mg/ml		
- Ziege-anti-Mausserum	IgG	(Dianova GmbH, Hamburg)
Fc- Fragmentspezifität		
0,6 mg/ml		
- Ziege-anti-Mausserum	IgM	(Dianova GmbH, Hamburg)
Fc- Fragmentspezifität		
0,3 mg/ml		

Nitrocellulosemembranen:

Hybond C	(Amersham, UK)
BA 85	(Schleicher & Schuell)
UltraBind US 450	(Gelman)
BioTrace PVDF	(Gelman)

2.3 Chemikalien

Von den nachfolgend aufgeführten Firmen wurden die unten aufgeführten Chemikalien erworben.

Biomol Feinchemikalien GmbH,	Hamburg
Boehringer Mannheim GmbH,	Mannheim
E. Merck,	Darmstadt
Roth,	Karlsruhe
Serva Feinbiochemika GmbH & Co.,	Heidelberg
Sigma Chemie GmbH,	Deisenhofen

Acrylamid,	Serva
Albumin Rinderserum Fraktion V (BSA),	Roth
Ammoniumpersulfat (APS),	Serva
Ampicillin,	Serva
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP),	Gerbu
Coomassie Brilliant Blue R250,	Serva
N,N-Dimethylformamid (DMF),	Roth
Dithiothreitol (DTT),	Biomol
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA),	Serva
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC),	Sigma
Guanidiniumhydrochlorid (GHC),	Sigma
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranose (IPTG),	Gerbu
β -Mercaptoethanol,	Serva
N,N'-Methylenbisacrylamid,	Serva
Natriumdodecylsulfat (SDS),	Roth
Nitroblautetrazolium (NBT),	Gerbu
N,N,N',N'- Tetramethylendiamin (TEMED),	Serva
Tween-20 (Polyoxyethylen-sorbitan-monolaureat),	Serva
Tris(hydroxymethyl)aminomethan,	Roth

2.4 Lösungen und Puffer

2.4.1 Puffer und Lösungen für den Line-Blot

- Antigenverdünnungspuffer:

1x	TBST
10%	Glyzerin
0,2 %	Tween
1 mM	DTT

- Antikörperverdünnungspuffer:

1x	TBST
1 %	BSA
1 mM	DTT

- Waschpuffer:

1x	TBST
0,5	M NaCl

Standardpuffer:

- 1xTBST-Puffer:

10 mM	Tris HCl	pH 8,0
150 mM	NaCl	
0,05 %	Tween 20	

 (Stammlösung 20x)

- 1xTBS-Puffer:

10 mM	Tris-HCl	pH 8,0
150 mM	NaCl	

 (Stammlösung 20x)

- Absättigungspuffer:

1x	TBST
1 %	Tween 20

Puffer für die Farbreaktion

- Alkalische-Phosphatase-Puffer:

100 mM	Tris-HCl	pH 9,5
100 mM	NaCl	
5 mM	MgCl ₂	

- Stop-Lösung:

10 mM	Tris-HCl	pH 8,0
1 mM	EDTA	

2.4.2 Puffer für die Aufreinigung des Sm32

- Puffer A: (GHC-Lösung):

0,1 M	NaH ₂ PO ₄	pH 8,0
0,01 M	Tris-HCl	
6 M	Guanidinium-HCl	

- Puffer B:

7 M	Harnstoff	pH 8,0
0,1 M	NaH ₂ PO ₄	
0,01 M	Tris-HCl	

- Puffer C:

7 M	Harnstoff	pH 6,2
0,1 M	NaH ₂ PO ₄	
0,01 M	Tris-HCl	

- Puffer D:

7 M	Harnstoff	pH 5,0
0,1 M	NaH ₂ PO ₄	
0,01 M	Tris-HCl	

2.4.3 Puffer für die Aufreinigung des SmE16

- Puffer E: 50 mM NaH_2PO_4 pH 8,0
300 mM NaCl
- Puffer F: 50 mM NaH_2PO_4 pH 7,5
300 mM NaCl
- Puffer G: 50 mM NaH_2PO_4 pH 7,0
300 mM NaCl
- Puffer H: 50 mM NaH_2PO_4 pH 6,5
300 mM NaCl
- Puffer I: 50 mM NaH_2PO_4 pH 6,0
300 mM NaCl
- Puffer J: 50 mM NaH_2PO_4 pH 5,5
300 mM NaCl
- Puffer K: 50 mM NaH_2PO_4 pH 5,1
300 mM NaCl
- Puffer L: 50 mM NaH_2PO_4 pH 4,6
300 mM NaCl

2.4.4 Puffer für die Protein-Gelelektrophorese

- TG- Puffer (für SDS-PAA-Gele):
(Stammlösung 10x)

25,0	mM	Tris-OH	
192,0	mM	Glycin	
1,0	%	SDS	

- Probenpuffer für Proteine:

125,0	mM	Tris-HCl	pH 6,8
4,0	%	SDS	
10	%	β -Mercaptoethanol	
10,0	%	Glyzerin	
0,02	%	Bromphenolblau	

- Färbelösung für Proteingele:

0,1	%	ServaBlau
50	%	Ethanol
10	%	Essigsäure

- Entfärber für Proteingele:

7,5	%	Essigsäure
5,0	%	Ethanol

- 30% Acrylamidlösung (29:1):

300	g/l	Monoacrylamid
7,5	g/l	Bisacrylamid

- Sammelgelpuffer:
(Stammlösung 4x)

125	mM	Tris-HCl	pH 6,8
0,1	%	SDS	

- Trenngelpuffer:
(Stammlösung 4x)

375	mM	Tris-HCl	pH 8,8
0,1	%	SDS	

2.4.5 Farblösungen

- Amidoschwarz-Färbelösung:

7,5	%	Essigsäure
5	%	Ethanol
0,1	%	Amidoschwarz

- BCIP-Lösung:

50 mg/ml	BCIP
----------	------

in 100%igen DMF

- NBT-Lösung:

50 mg/ml	NBT
----------	-----

in 70%igen DMF

2.5 Geräte

Certomat R & H	(Braun, Melsungen)
Diffusionsschüttler	(Desga, Heidelberg)
Geltrockner	(Biorad, München)
Kühlzentrifuge Modell J2 -J21	Beckman Instruments, Summerset/USA)
Microplate Reader 3550-UV	(Biorad, München)
Minigelkammer	(Keutz, Reiskirchen)
Spannungsquelle EPS 500/400	(Pharmacia, Freiburg)
Zentrifuge 5415	(Eppendorfgerätebau, Hamburg)

2.6 Sonstiges Material

Inkubationswannen	(Nunc, Wiesbaden-Biebrich)
Standard Mikrotiterplatten	(Greiner, Solingen)
Streifenschneider	(Schleicher & Schuell)
Zeichenbrett DIN A4	(Rotring, Hamburg)
Zeichenkegel \varnothing 1mm	(Rotring, Hamburg)

3 Methoden

3.1 Biochemische und mikrobiologische Methoden

3.1.1 Expression von rekombinanten Proteinen

Die Kultivierung der Zellen des E. coli M 15 Stammes mit den pDS-Plasmidkonstruktionen für die Expression der Antigene und dem Repressorplasmid pREP4 erfolgt über Nacht bei 37°C. Dabei werden dem LB-Medium Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (25µg/ml) zugegeben, mit dem Ziel, die Coli-Kolonien von anderen Bakterien unbeeinträchtigt wachsen zu lassen. Damit während der Induktion antigenspezifische mRNA synthetisiert werden kann, muss der in den Zellen vorhandene lac-Repressor inaktiviert werden. Diese Inaktivierung erfolgt durch die Zugabe von IPTG (2 mM). Die Inkubationszeit beträgt drei Stunden. Die antigenspezifische Matrizen-RNA dient als Informationsvorlage für die Synthese der Antigene. Nach der Inkubation werden die Zellen im Medium für zehn Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat dient als Ausgangsmaterial für die Proteinaufreinigung.

3.1.2 Proteinaufreinigung mit dem QIAexpress-System

Um die rekombinanten Antigene nach ihrer Expression aufzureinigen, wird das QIAexpress-System benutzt. Es ermöglicht die Aufreinigung unter denaturierenden und nicht denaturierenden Bedingungen für Proteine mit sechs Histidinresten am C- bzw. N-terminalen Ende.

3.1.2.1 Proteinaufreinigung des SmE16

Die synthetisierten Antigene befinden sich noch in den Coli-Zellen. Um sie aufzureinigen, müssen zuerst die Zellen aufgebrochen werden, um an ihren Inhalt zu gelangen. Die Zertrümmerung erfolgt durch Ultraschall. Vorbereitend wird das Zentrifugat, aus den Zellen bestehend, im Extraktionspuffer (1ml Puffer E/g Zentrifugat) mit 1mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach 7 minütiger Inkubationszeit auf Eis werden 0,11 ml 3 M NaCl/1ml zugegeben. Es folgt eine weitere Inkubation für 5 Minuten auf Eis. Durch Zentrifugation bei 10 000 g für 30 Minuten werden die Proteine von den Zelltrümmern getrennt. Der Überstand mit dem Antigen wird über eine Säule laufen gelassen. Diese Säule ist mit ca. 3 ml Ni²⁺-NTA Agarose beladen. Die Durchflussrate beträgt 20 ml/h.

Um das jetzt am Nickel haftende Antigen zu erhalten, wird die Säule über Nacht mit 150 ml Extraktionspuffer gewaschen. Die Durchflussrate beträgt jetzt 10-15 ml/h. Durch einen absteigenden pH-Gradienten der Puffer E bis L von 8,0 bis 4,6 ist ein fraktioniertes Eluieren des Proteins möglich. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt werden auf einem Proteingel aufgetrennt. Dadurch kann auch der Reinheitsgrad dieser Fraktionen festgestellt werden. Durch Zugabe von Tris-HCl pH 8 wird für die Fraktionen ein neutraler pH-Wert eingestellt. Die Lagerung des Antigens erfolgt im Kühlschrank bei 4°C. Bei der folgenden Proteinbestimmung wird die genaue Konzentration des Antigens bestimmt.

3.1.2.2 Proteinaufreinigung des Sm32

Nach einer einstündigen Inkubation des bei der Zentrifugation entstandenen Zellpellets im Lysepuffer A (5ml Puffer A /g Zellen) auf dem Schüttler, werden auch diese Zellen durch Ultraschall aufgebrochen. Die zertrümmerten Zellen werden für 15 Minuten bei 10 000g zentrifugiert. Der Überstand wird ebenfalls auf eine mit ca. 3 ml Ni²⁺-NTA Agarose beladene Säule mit einer Durchflussrate von 20 ml/h gegeben.

Der wesentliche Unterschied zwischen der Proteinaufreinigung beim SmE16 und der Aufreinigung des Sm32 liegt in der Verwendung der Elutionspuffer. Die Aufreinigung des Sm32 findet unter denaturierenden Bedingungen statt. Bestandteil der Elutionspuffer B, C und D ist unter anderem Harnstoff. Dieser verursacht die Denaturierung des Sm32. Die Durchflussrate der Elutionspuffer beträgt 30 ml/h. Bei einem pH-Wert von 5 erscheint des Sm32 in der entsprechenden Fraktion. Der Reinheitsgrad der verschiedenen Fraktionen wird auf einem SDS-Polyacrylamidgel ermittelt. Die Lagerung des Proteins erfolgt in Puffer B bei 4°C (pH 8).

3.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung, die erfolgt, um die Konzentration der aufgereinigten Antigene zu bestimmen, wird nach der Methode von Bradford durchgeführt. Voraussetzung dafür ist die nicht-kovalente Bindung von Coomassie-Blau an Proteine und die Verschiebung des Absorptionsmaximums bei vorliegendem sauren pH-Wert. Dieses Absorptionsmaximum wird bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Rinderserumalbumin dient als Standard für die Eichung der Messung. Die Stammlösung ist eine BSA-Lösung (Rinderalbumin) mit einer Konzentration von 50 µg/ml.

Bei jeder Proteinbestimmung läuft eine Verdünnungsreihe (0,2; 0,4; 0,8 und 1,0 mg/ml) der BSA-Lösung mit. Jeweils 50µl jeder BSA-Verdünnung und 50µl der aufgereinigten Antigene reagieren für fünf Minuten mit 2ml der Bradfordreagenz (100mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50ml Ethanol, 100ml 85%ige Phosphorsäure, 1000ml H₂O). Durch Bestimmung der optischen Dichte der Proben kann im Vergleich mit der BSA-Verdünnungsreihe die Konzentration der Proben berechnet werden.

Für das Sm32 wurde eine Konzentration von 370 µg/ml ermittelt. Die Konzentration des SmE16 lag bei 600 µg/ml.

3.1.4 Bestimmung des Reinheitsgrades der Proteine auf dem SDS-Polyacrylamidgel

Um die Reinheit der aufgereinigten Proteine zu bestimmen, werden diese elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der Gelelektrophorese werden 15%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele mit einem Vernetzungsgrad von 29:1(Acrylamid:Bisacrylamid) eingesetzt. Die Feldstärke beträgt 10 V/cm. In den verwendeten Minigelkammern (Fa.Kreutz) können zwei Gele gleichzeitig laufen. Die Gele werden für jede Auftrennung jeweils frisch angesetzt.

Um die Ergebnisse der Proteinauftrennung sichtbar zu machen, werden die Gele nach der Elektrophorese 30 Minuten in Coomassie-Blau auf einem Horizontalschüttler gefärbt. Zur abschließenden Entfärbung wird Ethanol/Essigsäure benutzt. Das Ergebnis besteht aus blauen Banden auf den Gelen.

Lösungen zur Gelherstellung:

Trenngele 15%ig (10ml):	4xTrenngelpuffer	2,5ml
	bidest. H ₂ O	2,5ml
	30% Acrylamidlösung (29:1)	5ml
	Ammoniumpersulfat	5mg
	TEMED	10µl

Sammelgele 5%ig (6 ml):	4xSammelgelpuffer	1,5ml
	bidest. H ₂ O	3,5ml
	30% Acrylamidlösung(29:1)	1,0ml
	Ammoniumpersulfat	3mg
	TEMED	10µl

3.2 Line-Blot

Bei dieser von Rossi et. al. 1991 beschriebenen immunologischen Methode werden die Antigene im Gegensatz zum indirekten ELISA auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Dazu werden sie in einem Antigenverdünnungspuffer verdünnt. Dieses Gemisch wird in einen Tuschestift pipettiert. Die benutzten Tuschestifte fassen in etwa 100 µl. Die Antigene werden in einer Linie aufgetragen. Dabei berührt der Stift die Nitrozellulose nicht, da die Flüssigkeit von der Unterlage aufgesogen wird. Die Zeichengeschwindigkeit sollte immer gleich sein. Zusätzlich wird eine Spur mit verdünntem Humanserum gezogen, um die spätere Farbreaktion bewerten zu können. Nach dem Auftragen erfolgt eine dreißigminütige Absättigung der Membran durch Eintauchen in TBST und Tween. Um die für den Test notwendigen Streifen zu erhalten, wird die noch feuchte Nitrozellulose auf einen Streifenschneider gelegt. Die Klingebatterie wird in einem Zug über die Membran geführt. Es entstehen 4 mm breite Streifen, auf denen sich untereinander die drei Antigene und das Humanserum befinden. Je ein Streifen dient als Testmaterial für ein zu untersuchendes Serum. Die Seren sind ebenfalls in einem geeigneten Puffer verdünnt. Das Konzentrationsverhältnis Serum : Puffer beträgt 1:200. Als Mindestmengen für die Inkubationswannen gelten 5µl Serum und 500µl Puffer pro Streifen. Die folgende Inkubation bei Raumtemperatur dauert eine Stunde. Während dieser Inkubation befinden sich die Wannen mit den Streifen auf einem Diffusions-Schüttler, wo die ständige Bewegung und somit die ständige Benetzung der Streifen mit den Seren sichergestellt wird. Durch die folgenden Waschritte werden Serumreste und unspezifisch gebundene Antikörper, die das Ergebnis verfälschen könnten, von den Diagnosestreifen entfernt. Es wird drei mal für je 10 Minuten ebenfalls auf dem Diffusions-Schüttler gewaschen.

Der nun folgende Inkubationsschritt, ebenfalls eine Stunde und auf dem Schüttler, erfolgt im mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörper. Dieser ist gegen menschliches IgG gerichtet.

Hierbei beträgt die Verdünnung 1:7000. Es folgen wieder drei Waschschritte auf dem Schüttler mit dem gleichen Waschpuffer. Um die jetzt markierten Antikörper sichtbar darzustellen, werden die Streifen für zehn Minuten in die vorbereitete Färbelösung (120µl BCIP, 120µl NBT, 20ml Alkalische-Phosphatase-Puffer) gelegt. Zum Abstoppen der Farbreaktion, bei der ein bläulicher Niederschlag durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit der Farblösung entsteht, wird die Stop-Lösung benutzt. Die Lagerung der getrockneten Streifen erfolgt lichtgeschützt, um einem Verblässen der Banden entgegenzuwirken.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde versucht, die Parameter für ein im Labor von Professor Dr. E. Beck bereits etabliertes immunologisches Nachweisverfahren für Infektionen mit Schistosomen zu optimieren bzw. weiterzuentwickeln. Das Verfahren, der sogenannte „Line-Blot“, beruht auf dem Nachweis schistosoma-spezifischer Antikörper im Blut bzw. Serum von Patienten mit Hilfe mehrerer rekombinant hergestellter Antigene der Parasiten. Die Details über das Verfahren sind unter „Material und Methoden“ beschrieben. Das Prinzip besteht darin, dass die verschiedenen diagnostischen Antigene in reiner Form mit Hilfe eines Tuschestiftes als Linie („Line“) zusammen mit Kontrollspuren auf eine größere Trägermembran aufgebracht werden. Diese Membran wird dann zur Reaktion mit individuellen Patientenseren in Streifen geschnitten und mit den verdünnten Seren inkubiert. Den Nachweis der an die Antigene spezifisch gebundenen Antikörper geschieht anschließend mit Hilfe eines phosphatase-konjugierten zweiten anti-human-Antikörpers und einer nachgeschalteten Phosphatase-Farbreaktion.

Speziell untersucht wurde in erster Linie der Einfluss verschiedener Trägermembranen, Inkubations- und Waschbedingungen und der Versuch einer chemischen Quervernetzung der Antigene mit der Membran auf die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit des Nachweisverfahrens.

4.1 Eignung verschiedener Membranen für die Immundiagnose

4.1.1 Vergleich verschiedener Membranen

Da die Antigene direkt auf die entsprechende Nitrozellulosemembran aufgetragen werden, können membranspezifische Eigenschaften Einfluss auf die Signalstärke haben. Zum einen sind Porengröße und Dicke der Membran limitierende Faktoren, zum anderen spielt auch die mechanische Stabilität eine entscheidende Rolle für die Qualität der Signale. In bisherigen Versuchen waren bei NC-Membranen verschiedener Hersteller erhebliche Unterschiede in Saugfähigkeit, Bindung von Proteinen und Beschaffenheit der Oberfläche (rauh versus glatt) festgestellt worden. Die Bindung der Proteine beruht auf hydrophoben und elektrostatischen Kräften.

Daher wurden für die Optimierung des Tests verschiedene Membranen getestet. Bisher wurde beim Line - Blot die Nitrozellulosemembran BA 85 von Schleicher und Schuell eingesetzt.

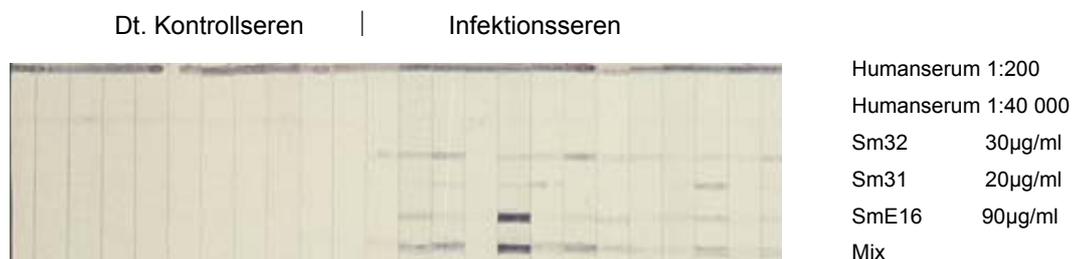
Bei den folgenden Versuchen werden jeweils zwei Blots direkt miteinander verglichen, indem nur eine andere Membran benutzt wird. Die anderen Schritte sind identisch. D. h. es werden die Antigenverdünnungen nur einmal angesetzt, es werden die gleichen Seren benutzt, die Inkubationszeiten sind gleich, und es werden die gleichen Puffer verwendet. Als Vergleichskriterium gilt die Signalstärke der Banden.

Abb.1 zeigt einen Vergleich zwischen drei verschiedenen Nitrocellulosemembranen. Bei a) handelt es sich um die BioTrace NT von Gelman. Diese Membran besteht zu 100% aus Nitrozellulose. Die Signale sind deutlich schwächer als im Bezugsblot b) mit NC-BA 85. Es ist zwar noch eine Diagnose möglich, es zeigen sich aber im Vergleich zur NC-BA 85 weitaus mehr Fälle, in denen eine Schistosomeninfektion nicht sicher erkannt bzw. ausgeschlossen werden kann. Dies lässt die Gelman NT-Membran zu Diagnosezwecken als ungeeignet erscheinen. Im Gegensatz dazu zeigen sich im Vergleich zwischen der BA 85 und der dritten Membran (c) keine signifikanten Unterschiede in der Signalstärke. Bei dieser Membran handelt es sich um die Hybond C von Amersham. Mit einer Porengröße von 0,45 µm entspricht sie der NC- BA 85. Ebenfalls wie die NC-BA 85 besitzt sie keine zusätzliche Faserschicht als Stützanteil. Alle drei Antigene verhalten sich nahezu gleich in der Signalstärke.

Bei der Diagnose sind die Anzahl der als positiv ermittelten Patienten und die der als negativ ermittelten identisch. Die Hybond C-Membran von Amersham ist also eine Alternative zur NC-BA 85. Bei weiteren, hier nicht gezeigten Versuchen bestätigte sich diese Beobachtung.

Abb.1

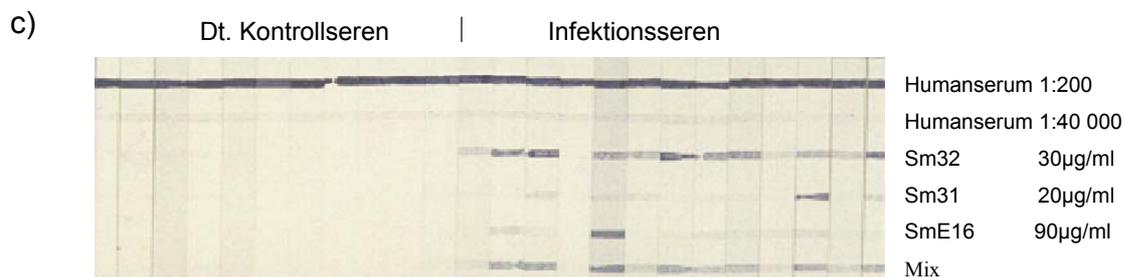
a)



BioTrace NT (Gelman)



BA85 (Schleicher & Schuell)



Hybond C (Amersham)

Als weitere Membran wurde die UltraBind US 450 von Gelman getestet. Das Filtermedium ist modifiziertes Polyethersulfon. Die Porengröße entspricht der der BA85-Membran. Mit der Dicke von 152 µm ähnelt sie auch in diesem Punkt der herkömmlichen Membran. Sie hat eine nominelle Bindekapazität von 135 µg Protein/cm². Durch aktivierte Aldehydgruppen überall in ihrer Struktur soll dadurch eine hohe kovalente Bindungskapazität für Proteine entstehen. Trotz dieser vielversprechenden Eigenschaften erwiesen sich Signale mit dieser Membran als zu schwach für eine sichere Diagnose.

Ebenfalls als mögliche Alternative wurde die BioTrace PVDF Membran von Gelman getestet. Das Filtermedium ist Polyvinylidenfluorid. In der Porengröße und Dicke entspricht auch sie der BA 85-Membran. Ihre Affinität zu Proteinen beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Membran ist die höhere Festigkeit, welche sie gegenüber mechanischen Beanspruchungen während und nach der Immundiagnose unempfindlicher macht. Doch auch mit dieser Membran zeigten sich keine befriedigenden Ergebnisse. Die Signale kamen sehr schwach, teilweise auch gar nicht. Auch der Einsatz verschiedener Antigenverdünnungspuffer und verschiedener Vorbehandlungen konnten die Ergebnisse nicht positiv beeinflussen.

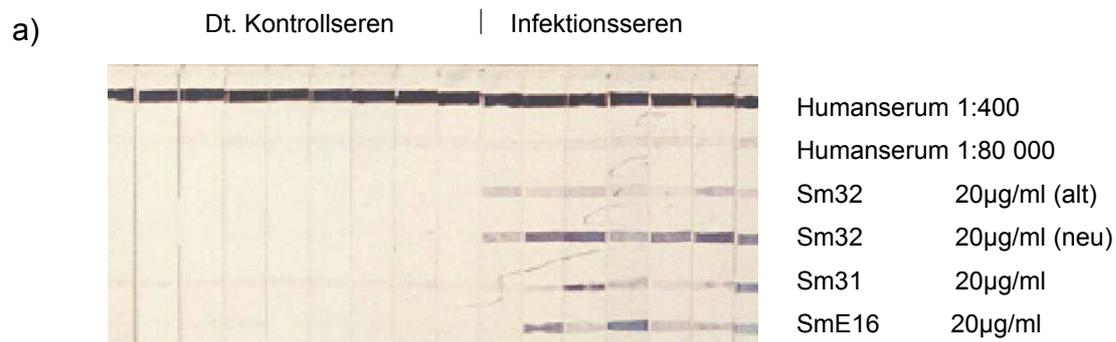
Als einzige akzeptable Alternative zur BA 85-Membran von Schleicher & Schuell ergab sich von den getesteten Produkten somit nur die Hybond C-Membran von Amersham.

4.1.2 Vergleich verschiedener Chargen der BA 85 - Membran

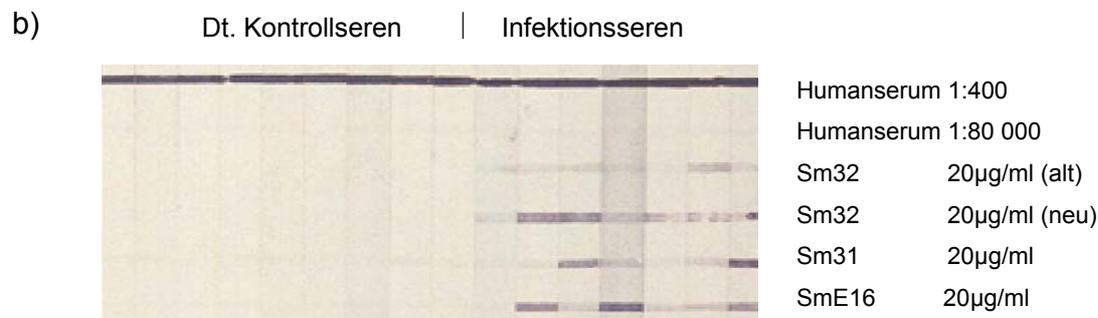
Bereits vom Hersteller wird darauf hingewiesen, dass das Verhalten einer Membran zwischen den einzelnen Chargen schwanken kann. Da dies ein nicht unerheblicher Störfaktor im Line - Blot sein kann, musste dieses Verhalten genauer untersucht werden. Da nach den vorigen Versuchen die bevorzugt benutzte Membran die BA 85 von Schleicher und Schüll war, wurden verschiedene Chargen verglichen. Dabei wurde genauso vorgegangen wie bei den bisherigen Versuchen. Wie zuvor sind alle Schritte der beiden Blots a) und b) in Abb. 2 identisch.

Dieser Test ergab sichtbare Unterschiede in der Signalstärke. Die Banden sind im Versuch a) stärker als bei b), obwohl es sich bei beiden Fällen um die BA85-Membran handelt. Ein vorheriger Vergleich verschiedener Chargen zur Anwendung ist demnach als sinnvoll anzusehen, damit Differenzen in der Ausprägung der Signalstärke bei der Diagnose richtig zugeordnet werden können.

Abb. 2



Charge I BA 85



Charge II BA 85

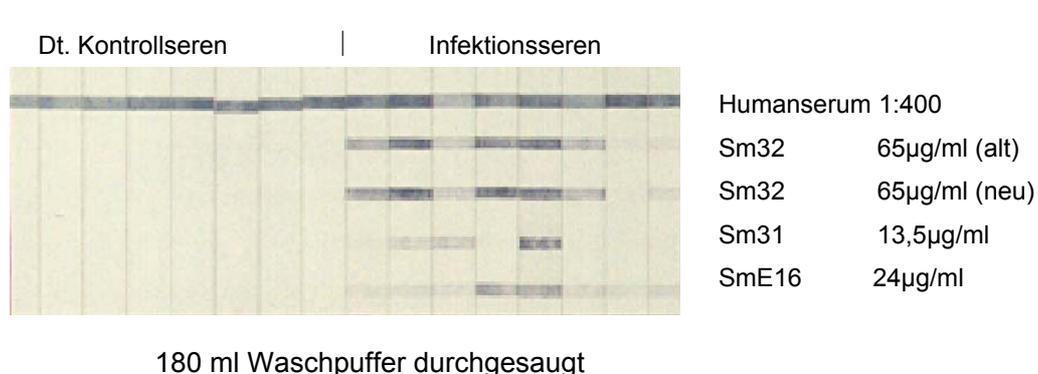
4.1.3 Stabilität der Antigen - Nitrozellulose - Bindung

Ein weiterer Punkt, der die Qualität der Signale erheblich beeinflussen kann, ist die Stabilität der Antigen - Nitrozellulose - Bindung. Diese sollte nicht allzu labil sein, da sie über die gesamten Behandlungsschritte während des Verfahrens hin existent bleiben muss. Da beim Line - Blot die präparierten Nitrozellulosestreifen längere Zeit in Flüssigkeiten inkubieren und mehrmals gewaschen werden, musste untersucht werden, inwieweit die Bindung der Proteine gegenüber diesen Belastungen standhält. Dazu wurde bei den verschiedenen Ansätzen die Membran normal präpariert und nur vor dem Absättigen getrennt behandelt. Ein Problem bei der Durchführung des Tests ist der relativ hohe Zeitaufwand für die Inkubations- und Waschschrte.

Es wurde daher versucht, die Waschschritte durch Durchsaugen des Waschpuffers mittels einer speziellen Vorrichtung statt des üblichen dreimaligen Inkubierens für jeweils 10 Minuten zu verkürzen. Bei a) wurden ca. 180 ml Waschpuffer durchgesaugt, danach die Nitrozellulose wie bisher weiter behandelt. Das Durchsaugen erfolgte in einer speziell für diesen Zweck konstruierten Apparatur. Dabei wird die Nitrozellulose über einem ca. 2 cm hohem und ca. 14 cm in der Länge und 3,5 cm in der Tiefe messenden Kunststoffbehälter eingespannt. Sie liegt auf einer porösen Unterlage. Die entsprechende Flüssigkeit, in diesem Fall der Waschpuffer, wird durch den Sog einer Pumpe in vertikaler Richtung durch die Membran gesaugt. Es zeigte sich in Abb. 3, dass die Signale dieses Blots nur geringfügig schwächer, als die des Bezugsblots c) waren, was für eine gute Haftung der Antigene bzw. der Antigen-Antikörper-Komplexe spricht. Ein weiterer Blot b) wurde lediglich mehrmals mit wenig Waschpuffer besprüht, welcher sehr schnell weggesaugt wurde, wobei die Filterstreifen leicht antrockneten. Die Signale dieses Blots waren wesentlich schwächer als die des Bezugsblots.

Als mögliche Erklärung kommt das kurzzeitige Austrocknen während des Saugens und die damit zusammenhängende Oxidation der Antigene in Frage. Ein Austrocknen der Streifen während der Inkubations- bzw. Waschschritte muss demnach unbedingt vermieden werden. Insgesamt zeigte die Antigen-Nitrozellulose-Bindung eine ausreichende Stabilität gegenüber mechanischer Auswaschung, so dass die schnellere Waschung durch Durchsaugen des Waschpuffers empfehlenswert erscheint. Allerdings müsste hierzu eine optimierte Saugvorrichtung für eine standardisierte Waschung konstruiert werden.

Abb. 3





mit Waschpuffer besprüht



Bezugsblot, ohne Vorbehandlung

4.2 Chemisches Cross – linking der Antigene mit den Membranen

Trotz der bereits gezeigten guten Widerstandsfähigkeit der Antigen-Membran-Bindung gegenüber mechanischen Belastungen gibt es auch noch Möglichkeiten, die Bindung der Antigene an die Membran zu verstärken. Beim Cross-linking werden die Antigene durch kovalente Verknüpfung und Neuverknüpfung noch fester mit Membranbestandteilen bzw. untereinander vernetzt.

Zu diesem Zweck wurde die Membran nach dem Auftragen der Antigenverdünnungen für 10 bis 30 Minuten in einen Cross-linking-Puffer (25 mM MOPS NaOH und 0,1% EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid))gelegt. Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler. Nach dem Cross-linking wurde die Zellulose sofort für 10 Minuten in 1x TBST gewaschen. Danach wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

4.2.1 Bestimmung der optimalen Cross-linking-Zeit

Um falsch positive Ergebnisse, bedingt durch zu starke Cross-linking-Reaktionen, zu verhindern, musste die optimale Reaktionszeit ermittelt werden.

Als Kontrolle für falsch positive Signale wurden deutsche Kontrollseren benutzt, die keine Signale zeigen durften.

Begonnen wurde mit 10 Minuten Reaktionszeit. Bei parallel laufenden Ansätzen wurde die Zeit in 10 Minuten Schritten auf eine halbe Stunde erhöht. Außerdem lief gleichzeitig ein Ansatz ohne Cross-linking als Bezugsblot mit. (Abb. 4).

Durch das Cross - linking ist eine deutliche Signalverstärkung zu verzeichnen. Beim Antigen Sm32 ist zwar kein signifikanter Unterschied zu erkennen und Sm31 gibt nicht mehr positive Signale, aber die bereits vorhandenen sind sehr viel stärker ausgeprägt und vereinfachen somit die Beurteilung der Ergebnisse. Ein wenig anders verhält es sich bei SmE16. Hier waren ohne Cross-linking mehrere Signale nicht eindeutig positiv. Jetzt sind es nur noch zwei Seren, bei denen auf den ersten Blick keine eindeutige Beurteilung möglich ist. Der größte Zugewinn an Signalstärke ist bei einer Reaktionszeit von 30 Minuten zu verzeichnen. Ein ähnliches Verhalten zeigt aber auch der Background. Bei den deutschen Kontrollseren sind nach dem Cross-linking Banden zu erkennen, was eindeutig darauf schließen lässt, dass hier falsch positive Signale erhalten wurden. Da die Stärke des Backgrounds proportional zur Cross-linking-Zeit anstieg, wurde bei den folgenden Versuchen die Nitrozellulose nur noch für 10 Minuten in den Cross-linking-Puffer gelegt, da hierbei der entstandene Background noch vertretbar erschien.

Bei weiteren Versuchen mit dem Cross-linking-Puffer bestätigten sich die oben beschriebenen Beobachtungen. Als maximale Reaktionszeit des Cross-linking sind 10 Minuten ermittelt worden.

Abb. 4

a)



Bezugsblot, ohne Cross-linking

b)



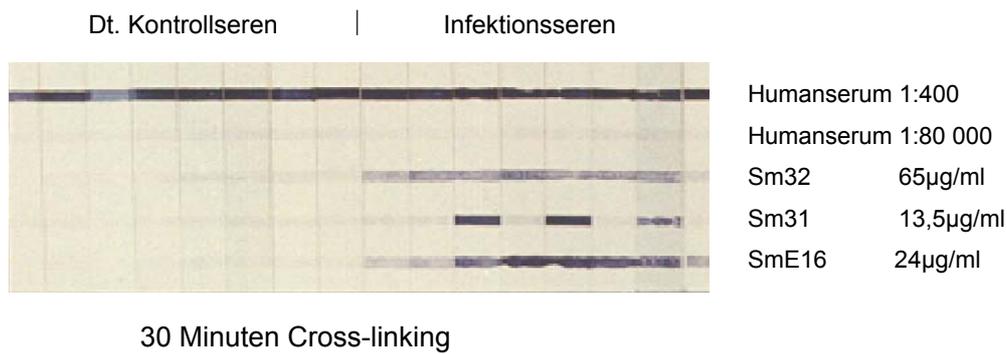
10 Minuten Cross-linking

c)



20 Minuten Cross-linking

d)



Um zu untersuchen, ob die erhöhte Background-Reaktion einzelner Antigene mit Kontrollseren durch geringere Antigenkonzentrationen zu kompensieren waren, wurde ein Test mit verschiedenen Antigenverdünnungen durchgeführt. Bei dem in Abb. 5 mit a) gekennzeichneten Versuch handelt es sich um einen Line-Blot ohne Cross-linking, bei dem mit b) gekennzeichneten wurden die Streifen vor der Inkubation 10 min in den Cross-linking-Puffer gelegt.

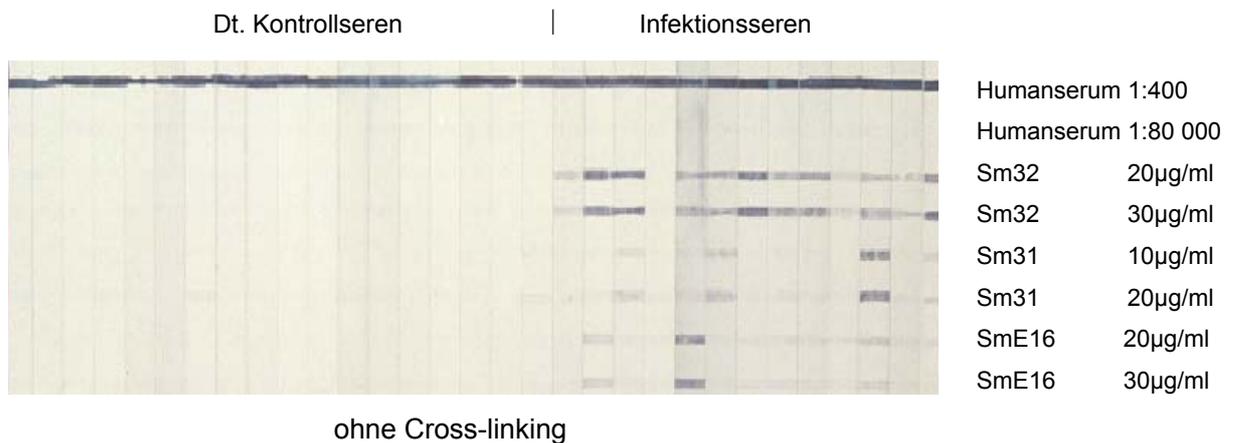
Bei beiden Blots wurden die gleichen Seren benutzt und die Streifen gemeinsam präpariert. Im direkten Vergleich der Ergebnisse ergaben sich folgende Punkte:

Bei a) gibt es zwei Infektionsseren (3. und 9. Spur), bei denen eine Diagnose schwierig ist. Eines erscheint deutlich negativ, das andere könnte ebenfalls so gewertet werden. Bei den Kontrollseren zeigt die letzte Spur beim Sm32 ein Farbsignal und wird somit als positiv gewertet. Insgesamt gibt es also drei Seren, bei denen keine eindeutige Diagnose zu stellen ist. Mit Cross-link (Spur 3) gibt es ein Infektionsserum, das nicht als positiv angesehen werden kann. Da hier mit dem bereits signalverstärkenden Cross-linking-Puffer gearbeitet wurde, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Serum tatsächlich um ein negatives handelt. Das zweite, bei a) (ohne Cross-link) als unsicher positiv eingestufte Serum ist hier jedoch deutlich positiv, vor allem beim Antigen SmE16. Bei den Kontrollseren gibt es jetzt vier, die mit großer Wahrscheinlichkeit als positiv und somit falsch gewertet werden würden.

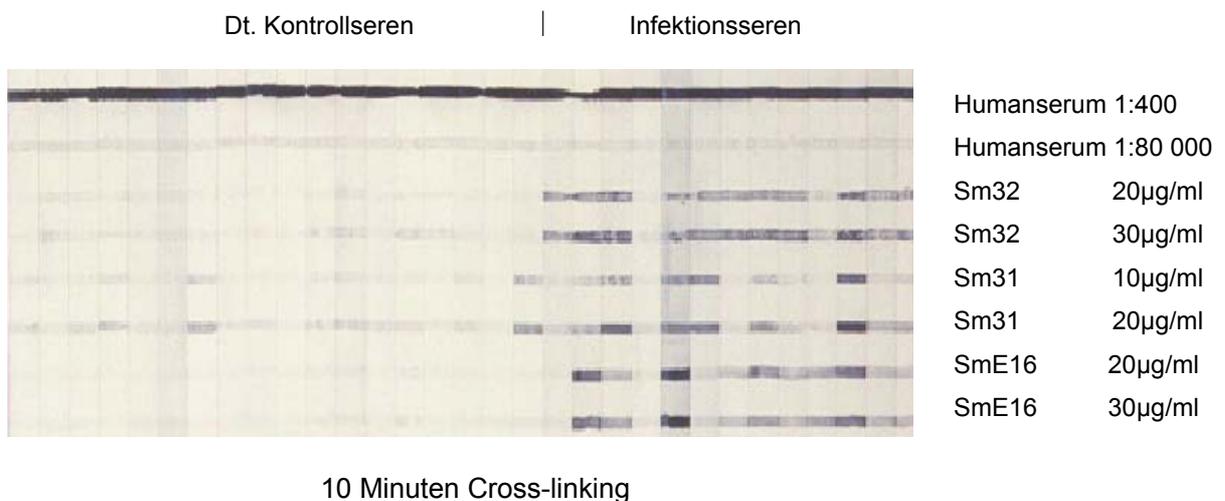
Bei vier anderen deutschen Seren sind die Signale des Antigen Sm31 selbst bei reduzierter Antigenkonzentration so stark, dass auch hier sicherlich zu einem bestimmten Prozentsatz falsche Diagnosen folgen würden. Zum einen ist der Signalgewinn mit dem Cross-linking erheblich, zumindest beim SmE16 gibt es mehr positive Signale, bei denen ohne Cross-linking die Diagnose negativ gelautet hätte. Zum anderen steigt der Background bei den Kontrollseren in manchen Fällen so stark, dass eine Fehldiagnose im Sinne von falsch positiv denkbar ist. Die Anzahl der durch das Cross-linking verursachten Fehlbeurteilungen überwiegt die der eventuell als falsch negativ gewerteten Seren. Die Fehlerquote ist beim Blot b) mehr als doppelt so hoch als die des Blots a). Daher wurde bei weiteren Versuchen vom Cross-linking abgesehen.

Abb.5

a)



b)



4.3 Mechanische Verfeinerung des Verfahrens

Um möglichst saubere und damit eindeutigere Ergebnisse zu erhalten, müssen die Inkubationsschritte auf einem Schüttler erfolgen. Bei Versuchen, in denen die Inkubationsschritte in der Ruhelage erfolgten, wurden auf den Streifen Farbanhäufungen in Form dunkler Flecken beobachtet, die das Auswerten der Immundiagnose stark beeinträchtigten.

Diese Farbanhäufungen können aufgrund des Vorgehens im Prinzip nur entstehen, wenn der phosphatasemarkierte Antikörper an diesen Stellen Serumantikörper gegen Schistosomenantigene erkennt. Ursache dafür ist kumuliertes Serum, auf das die Streifen im ersten Inkubationsschritt treffen. Dies ist hauptsächlich dadurch bedingt, dass die nur in limitierten Mengen verfügbaren Patientenserum in relativ kleinem Volumen zu den Teststreifen gegeben wurden. Durch die Unebenheit der Nitrozellulosestreifen kommen manche Bereiche intensiver mit dem Serum in Kontakt als andere Stellen. Wenn die Inkubationswannen nicht geschüttelt werden, können sich die Serumbestandteile im Puffer nicht gleichmäßig verteilen, was unspezifische Ag-Ak-Bindungen aufgrund eines Ak-Überschusses an einer Stelle zur Folge hat. Diese unspezifisch gebundenen Antikörper reagieren in den folgenden Schritten wie spezifisch gebundene und werden ebenso angefärbt. Um dieses zu verhindern, werden die Streifen bei jedem Inkubationsschritt geschüttelt. Wichtig ist ebenfalls ein gutes Durchmischen der Serumverdünnung vor dem Einlegen der Streifen. Bei den in Abb. 6 gezeigten Versuchen handelt es sich um einen Vergleich zwischen Streifen, deren Inkubationsschritte auf dem Schüttler erfolgten a), und Streifen, die während der Inkubation nicht bewegt wurden b).

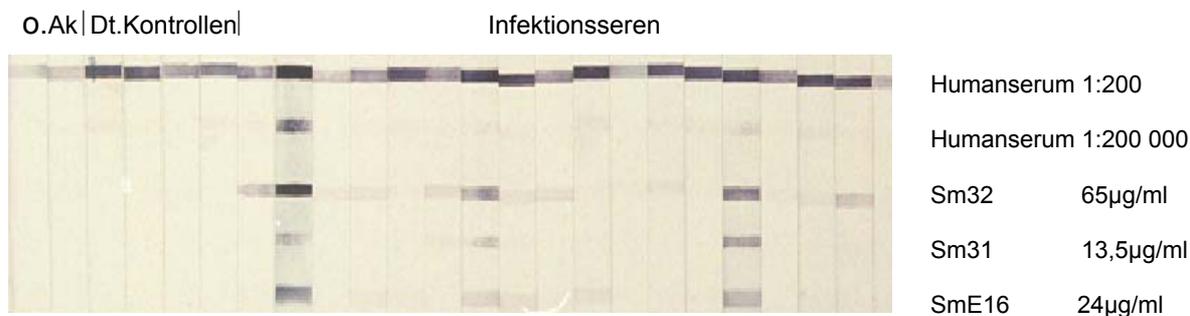
Abb. 6

a)



Beide Inkubationsschritte erfolgten auf dem Schüttler.

b)



Beide Inkubationsschritte erfolgten in Ruhelage.

Deutlich erkennbar sind auf dem unteren Blot die störenden Farbanhäufungen auf mindestens drei der Streifen. Außerdem ist die spezifische Reaktion in einer großen Zahl von Streifen sehr schwach, was auf unzureichenden Zutritt des Serums zum Antigen zurückzuführen ist

Bei den Waschsritten waren bereits verschiedene Techniken getestet worden. Ursprünglich wurden die Streifen nach den Inkubationsschritten aus den Wannen in Glasschalen umgelagert und dort zusammen in ca. 150 ml Waschpuffer für jeweils 3 x 10 Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Dies erfordert allerdings ein zeit- und arbeitsaufwendiges Umsetzen der Teststreifen von ihren Inkubationswannen (Acutran) in die Glasschalen. Ein anderes Verfahren unterscheidet sich darin, dass die Streifen in den Inkubationswannen verbleiben. Der Antikörperverdünnungspuffer wird mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, was mit Hilfe eines geeigneten Plastikvorsatzes für 8 Seren parallel erfolgen kann, und pro Streifen werden 2 ml Waschpuffer pipettiert.

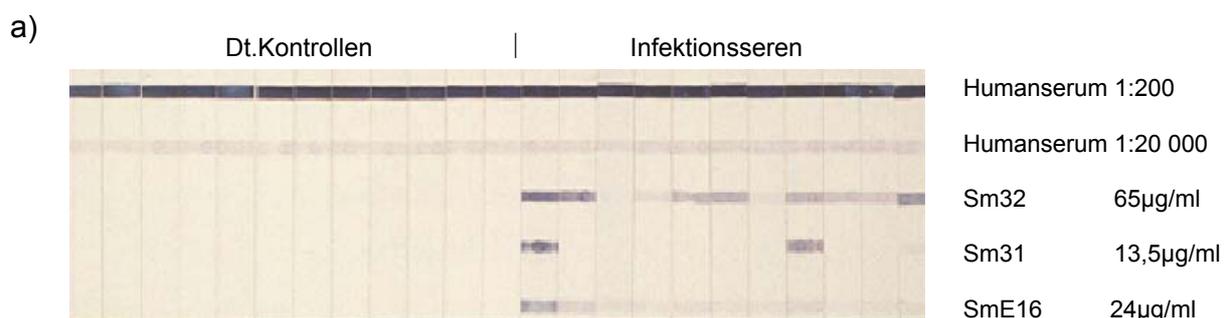
Die Inkubationswannen werden dann 10 Minuten geschüttelt, danach der Waschpuffer wieder abgesaugt. Dieses Vorgehen wird zweimal wiederholt.

Bei ansonsten gleicher Behandlung wurde bei dieser Methode ein gewisser Signalverlust deutlich. Die Ursache dafür liegt am intensiveren Waschen. Dadurch, dass die Streifen separat in ihren Wannen liegen, wird außerdem ausgeschlossen, dass sie übereinander zu liegen kommen und somit einige Stellen auf ihnen weniger intensiv mit dem Waschpuffer in Berührung kommen als andere. Diese Technik hat gegenüber dem gemeinsamen Waschen aller Streifen in einer Glasschale gewisse Vorteile.

Da auf diese Art und Weise deutlich gründlicher gewaschen wird, ist nur noch eine Waschzeit von 3 x 5 Minuten erforderlich. Diese Veränderung bringt eine Gesamtverkürzung des Immundiagnoseverfahrens von 30 Minuten mit sich.

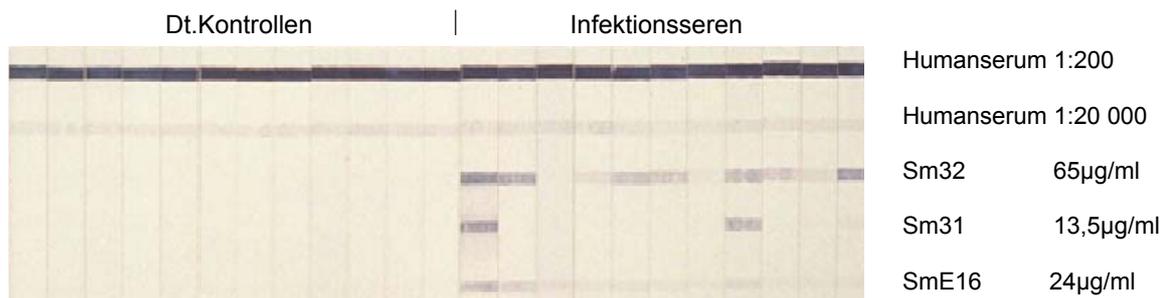
Durch diese Maßnahme wurde außerdem erreicht, dass die Streifen während des Line-Blot nicht mehr umgelagert werden müssen. Zum einen sinkt damit die Wahrscheinlichkeit des Verlustes eines oder mehrerer Streifen durch versehentliches Wegspülen, zum anderen ist der Kontakt mit dem potentiell infektiösem Material deutlich eingeschränkt. Der Antikörperverdünnungspuffer mit dem Serum und der Waschpuffer mit Serumresten werden ohne Risiko in ein mit Desinfektionsmittel gefülltes Gefäß abgesaugt und können nach einer bestimmten Einwirkzeit problemlos entsorgt werden. Die folgende Abbildung zeigt den Unterschied in der Signalstärke, bedingt durch die unterschiedlichen Waschverfahren (Abb. 7).

Abb. 7



Alle Streifen wurden in einem gemeinsamen Gefäß gewaschen.

b)



Die Streifen wurden separat in ihren Inkubationswannen gewaschen.

Die aktuelle Mindestzeit für die Durchführung des Line – Blots beträgt ca. 3 Stunden und setzt sich wie folgt zusammen: 1h Inkubation im Humanserum, 30 min Waschen, 1h Inkubation mit zweitem Antikörper, 30 min Waschen und 10 min zum Färben. Eine Verkürzung der Zeit für die Durchführung wäre wünschenswert.

Als mögliche Ansatzpunkte ergeben sich die zwei Inkubationsschritte und das Waschen. Zunächst wurde die Möglichkeit einer Verkürzung der Waschzeit untersucht.

Ausgehend von der Tatsache, dass die Nitrozellulosemembran ein poröses Material darstellt, wurde versucht, sie nicht wie bisher durch einfache Inkubation im Waschpuffer zu waschen, sondern den Waschpuffer durch die Membran hindurch zu saugen.

Dazu wurde auf die in Kapitel 1.1.3 beschriebene Apparatur zurückgegriffen. Hierbei wurde die Membran nach dem Blocken nicht in Streifen geschnitten, sondern ein spezieller Aufsatz für die Kunststoffwanne ermöglicht das getrennte Auftragen von zwanzig verschiedenen Seren auf ein ca. 14 cm langes Nitrozellulosestück. Nach der Inkubation mit dem Serum wird dieser Aufsatz entfernt und durch einen die gesamte Oberfläche der Membran umspannenden Rahmen ersetzt. Ca. 180 ml Waschpuffer werden auf die Membran gegeben und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durchgesaugt. Allerdings darf die Membran nicht trocken laufen, sondern ein Rest des Waschpuffers muss stehen bleiben und der Rest wird abgeschüttet. Die ganze Prozedur dauert knapp eine Minute. Der Line-Blot könnte also noch einmal um ca. 20 min verkürzt werden. Die folgende Abbildung 8 zeigt einmal einen Blot (a), bei dem 3 x 5 Minuten in den Wannern gewaschen wurde und einen Blot (b), bei dem der Waschpuffer durch die Membran durchgesaugt wurde.

Abb.8

a)



herkömmliche Verfahrensweise (3x5 min Waschen)

b)



Waschen durch Durchsaugen des Waschpuffers

Obwohl nur einmal gewaschen wird, ist der Signalverlust bei dieser Methode enorm. Auch mehrere Wiederholungen des Versuches unter leicht modifizierten Bedingungen ergaben das gleiche Ergebnis.

Die Scherkräfte bei dieser Art des Waschens sind wohl zu stark und lösen nicht wie erwartet nur unspezifische Bindungen sondern anscheinend auch einen großen Teil der spezifischen Bindungen. Die Möglichkeit, auf diese Art und Weise eine Zeitverkürzung zu erreichen, muss also ausgeschlossen werden. Bei den folgenden Versuchen wurde daher wieder 3 x 5 min zwischen den Inkubationsschritten in den Wannen gewaschen.

4.3.1 Einfluss der Zusammensetzung des Waschpuffers

Das Waschen zwischen den Inkubationsschritten spielt eine wichtige Rolle, was die Hintergrundfärbung der Membran, den Background, und die Qualität der Signale angeht. Ein positives Signal ist auf einem weißen Streifen besser als solches zu bestimmen als auf einem, dessen Hintergrund stark unspezifisch gefärbt ist. Ebenso sollten möglichst alle unspezifischen Bindungen, sei es zwischen Antigen und Serumantikörper oder zwischen Serumantikörper und phosphatasemarkiertem zweiten Antikörper, durch das Waschen gelöst werden, da diese falsch positive Signale verursachen können und somit die Qualität des Testes beeinträchtigen.

Als Angriffspunkte für Variationen boten sich die Waschtechnik, die Waschzeit und die Zusammensetzung des Waschpuffers an. An dieser Stelle sollte die Zusammensetzung des Waschpuffers näher untersucht werden. Die bisherige Waschpufferzusammensetzung - 1x TBST, 0,5 M NaCl - wurde in dieser Versuchsreihe verändert. In Abb. 9 werden die Ergebnisse nach dem Einsatz verschiedene Salzkonzentrationen von 0 M NaCl bis 0,5 M NaCl miteinander verglichen.

Die Signalstärke nahm mit steigender Salzkonzentration ab, was für eine Verwendung eines Waschpuffers mit geringerer Salzkonzentration spricht. Allerdings sind deutliche Unterschiede beim Background zu erkennen. Bei den niedrigen NaCl-Konzentrationen ist er wesentlich höher. Da das Auftreten des Backgrounds vermieden werden muss, ist die Reduzierung des Salzgehaltes im Waschpuffer ungeeignet. Es besteht daher kein Grund, die ursprüngliche Salzkonzentration von 0,5 M NaCl zu verändern.

Abb. 9

a)



b)

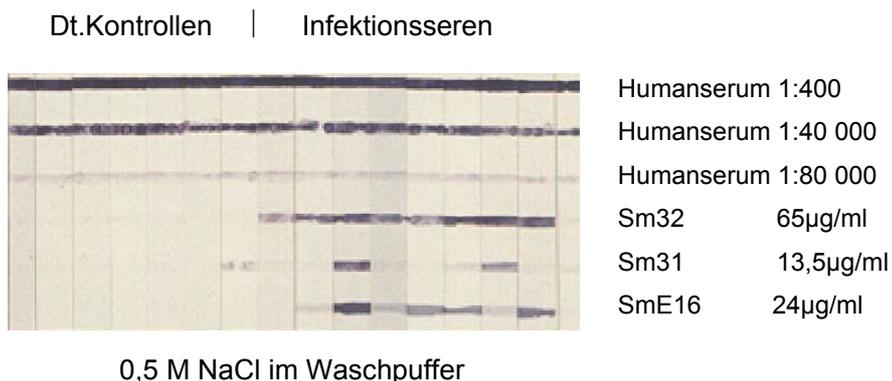
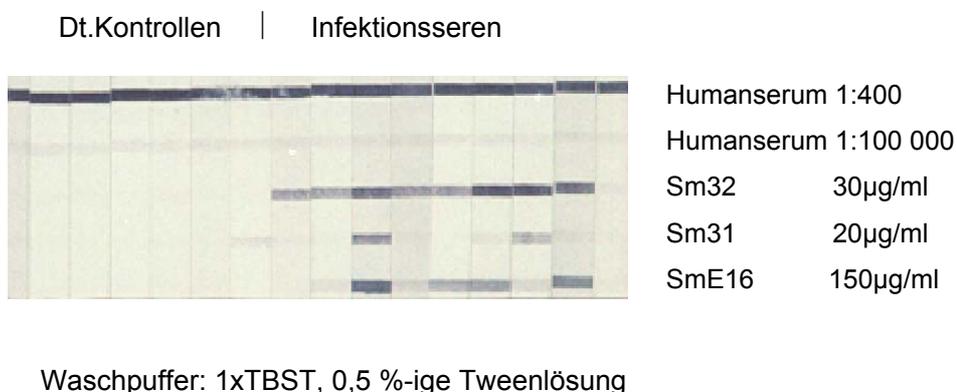


Abbildung 10 zeigt einen weiteren Versuch, wo bei a) anstelle von 0,5 M NaCl eine 0,5%-ige Tweenlösung eingesetzt wurde. Auch diese Möglichkeit erwies sich als nicht sehr vorteilhaft. In der Signalstärke ist ein leichter Verlust bemerkbar, und der Background ist zusätzlich erhöht. Diese Versuche zeigen, dass zumindest gegenwärtig die Kombination aus 1xTBST und 0,5 M NaCl die optimale Zusammensetzung für den Waschpuffer darstellt.

Abb. 10

a)



b)



Bezugsblot, Waschpuffer: 1xTBST, 0,5 M NaCl

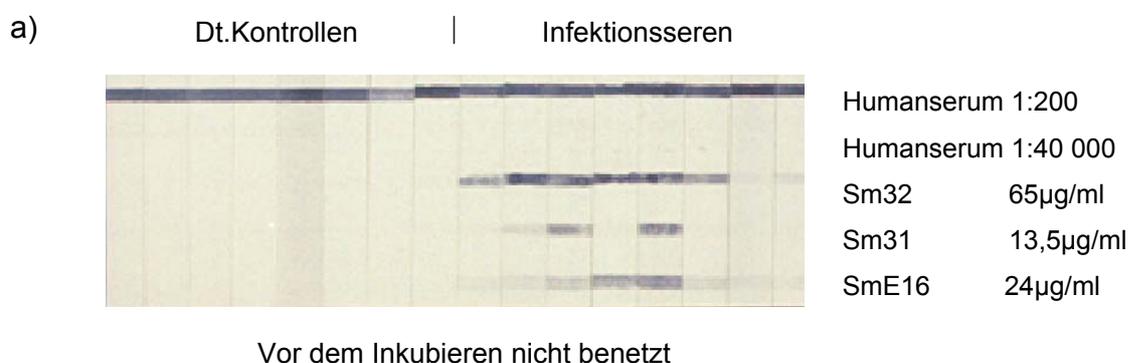
4.3.2 Einfluss des Eintrocknens der Antigene auf die Signalstärke

Damit diese Immundiagnose im Feld zum Einsatz kommen kann, muss sie in bestimmten Dingen relativ robust sein. Z.B. sollte es bei unterschiedlichen Aufbewahrungszuständen der Streifen keine erheblichen Unterschiede in der Qualität der Signale geben. Damit ist gemeint, dass die Streifen sowohl direkt nach der Präparation als auch einige Zeit danach mit gleichem Ergebnis im Test eingesetzt werden können sollten.

Unterschiede im Zustand der Teststreifen bestehen im Labor u.a. darin, dass sie einmal noch nass sind (nach dem Blocken noch nicht getrocknet) und einmal bereits getrocknet. Um den Einfluss des Benetzungsgrades der Antigene bzw. der Teststreifen zu testen, wurden wie in Abb. 11 gezeigt trockene Streifen a) mit Streifen verglichen, die vor der Inkubation im Serum noch einmal in der Blocklösung benetzt wurden (b). Die weiteren Schritte waren wieder identisch. Als optimales Ergebnis wäre zu wünschen gewesen, dass es keinerlei Unterschiede in der Signalqualität geben würde. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt jedoch sehr wohl Unterschiede. Bei den in Blocklösung vorinkubierten Streifen b) waren die Signale deutlich stärker. Der Background war nicht erhöht. Die Qualität der Signale ist also erheblich gestiegen. Bei hier nicht gezeigten Wiederholungen des Versuches, bei denen zusätzlich auch noch die Lagerung der (trockenen) Teststreifen bei verschiedenen Temperaturen untersucht wurde, wurde diese Beobachtung bestätigt. Aufgrund dieser Tatsache wurde dem Line-Blot ein weiterer Schritt hinzugefügt:

Bevor die Streifen im Serum inkubiert werden, werden sie 3 bis 5 Minuten mit Blocklösung benetzt.

Abb. 11



b)



Vor dem Inkubieren drei Minuten im Blockpuffer
(1xTBST, 1%-ige Tween-20-Lösung) benetzt

In weiteren Tests zur Optimierung des Verfahrens wurden verschiedene Variationen der Art der Benetzung untersucht. Bei einem nicht gezeigten Versuch liefen vier Blots parallel:

- a) ohne Benetzen
- b) alle Streifen zusammen in einer Glasschale benetzt und geschüttelt
- c) die Streifen einzeln in ihren Wannen benetzt und geschüttelt bzw.
- d) nicht geschüttelt.

Deutlich waren hierbei wieder die stärkeren Signale bei den benetzten Streifen im Vergleich zu den unbenetzten. Allerdings scheint die Art und Weise des Benetzens keine maßgebliche Rolle zu spielen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bemerkt werden.

Das Benetzen wurde in den folgenden Versuchen der Einfachheit halber für drei Minuten in einer Wanne ohne Schütteln durchgeführt.

4.4 Feldtauglichkeit

4.4.1 Einsatz verschiedener Wassersorten

Beim Einsatz des Line - Blot im Feld ist es unwahrscheinlich, dass die gleichen idealen Bedingungen wie im Labor herrschen. Ein kritischer Faktor hierbei ist das Wasser. Im Labor wird mit vollentsalztem (VE-) Wasser gearbeitet. Unter diesen Bedingungen funktioniert der Test.

Doch im Feld werden nicht immer die optimierten Laborbedingungen herrschen. Es sollte daher untersucht werden, inwieweit der Line-Blot mit der Verwendung weniger gereinigten Wassers realisierbar ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

Dabei wurde davon ausgegangen, dass Stammlösungen der benötigten Puffer vorhanden sind und mit der entsprechenden Wassersorte verdünnt werden. Mit dem Bezugsblot (VE-Wasser) verglichen wurde die Verwendung von Flusswasser (Wieseck) und Tafelwasser/Mineralwasser.

Dem liegt der Gedanke zugrunde, dass sowohl Flusswasser als auch Tafelwasser an den meisten Orten der Welt ohne größeren Aufwand verfügbar sind. Das Ergebnis fiel überraschend günstig aus. Sowohl mit dem Flusswasser als auch mit dem Tafelwasser wurden vollkommen akzeptable Signale erreicht. Der Test ist soweit stabil, dass die Verwendung dieser beiden Wassersorten offensichtlich keinerlei Probleme mit sich bringt.

Des Weiteren wurde die Verwendung von kommerziell erhältlichem Speisesalz im Waschpuffer getestet. Auch diese Vereinfachung erwies sich als ohne Signalverlust durchführbar. Das Immundiagnoseverfahren ist also nicht nur unter strengen Laborbedingungen durchführbar, sondern lässt auch Variationen in der Materialwahl zu, was beim Einsatz im Feld von größter Bedeutung ist.

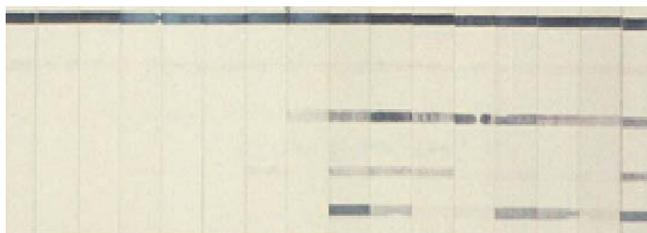
Damit die Streifen und Puffer auch unter Feldbedingungen haltbar sind, ist die Zugabe von Natriumazid unausweichlich. Deshalb wurde der Line - Blot auch unter dieser Bedingung getestet. Das zugefügte Natriumazid erwies sich dabei nicht als Störfaktor, die Signale hatten die gleiche Qualität, wie die des Bezugsblots. Auch der Background verhielt sich unauffällig.

Abb. 12



b)

Dt.Kontrollen | Infektionsseren

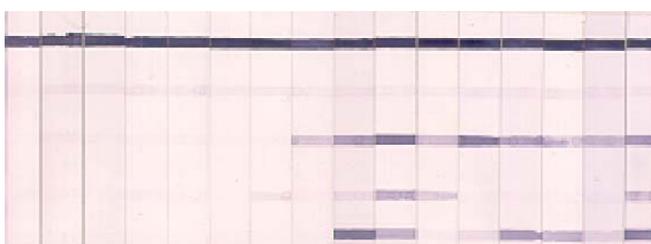


Humanserum 1:400
 Humanserum 1:100 000
 Sm32 30µg/ml
 Sm31 20µg/ml
 SmE16 150µg/ml

Flusswasser, Wieseck

c)

Dt.Kontrollen | Infektionsseren



Humanserum 1:400
 Humanserum 1:100 000
 Sm32 30µg/ml
 Sm31 20µg/ml
 SmE16 150µg/ml

Tafelwasser

d)

Dt.Kontrollen | Infektionsseren

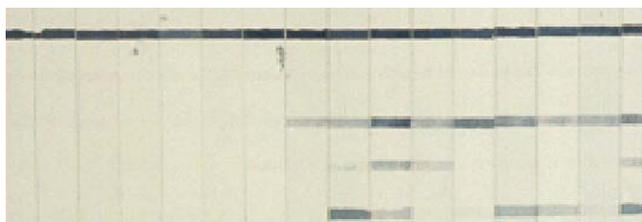


Humanserum 1:400
 Humanserum 1:100 000
 Sm32 30µg/ml
 Sm31 20µg/ml
 SmE16 150µg/ml

Verwendung von herkömmlichen Speisesalz

e)

Dt.Kontrollen | Infektionsseren



Humanserum 1:400
 Humanserum 1:100 000
 Sm32 30µg/ml
 Sm31 20µg/ml
 SmE16 150µg/ml

Zugabe von Natriumazid

4.4.2 Einfluss der Temperatur auf den Line-Blot

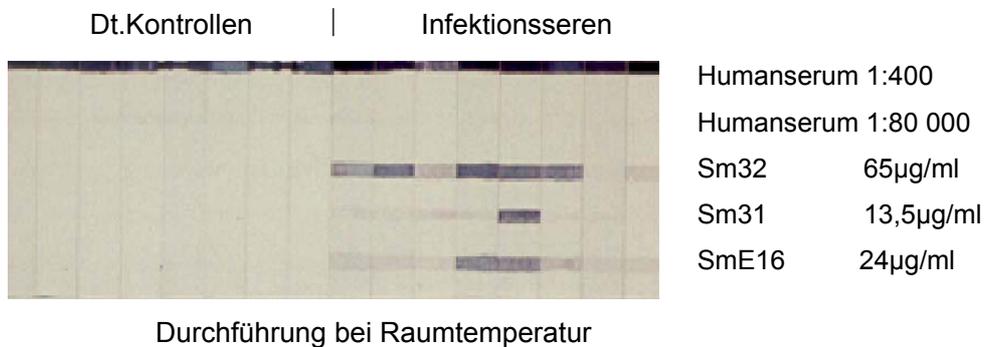
In den Regionen, in denen der Test als Diagnose vorgesehen ist, herrschen das ganze Jahr über höhere Temperaturen als in Mitteleuropa. Diese Tatsache muss ebenfalls berücksichtigt werden. Z.B steigt die Aktivität von Enzymen mit steigender Temperatur, was die Reaktionszeiten bei chemischen Reaktionen beeinflussen kann. Bis jetzt war der Line-Blot nur im Labor bei einer Raumtemperatur von ca. 23 °C durchgeführt worden. Daher musste getestet werden, wie sich dieses Verfahren bei tropischen Temperaturen verhält. Dazu wurden zwei Blots parallel durchgeführt.

Abb. 13: Der eine (a) wurde nach üblicher Vorgehensweise bei Raumtemperatur durchgeführt, der andere im Brutraum bei 37°C b). Die benötigten Puffer wurden beim zweiten Line-Blot vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

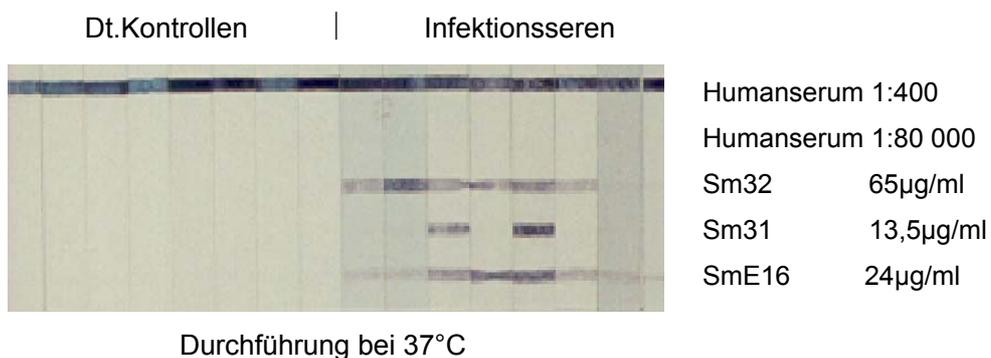
Das DTT wurde erst direkt vor dem Einsatz zugefügt, da es bei erhöhter Temperatur schnell verflüchtigt. Sämtliche Inkubations- und Waschschriffe wurden im Brutraum durchgeführt. Die Präparation der Streifen erfolgte normal bei Raumtemperatur. Als Ergebnis zeigte sich ein Signalverlust bei den bei 37°C behandelten Streifen. Allerdings ging auch der Background leicht zurück. Trotz der doch deutlich schwächeren Banden ist immer noch eine Diagnose möglich. Die Anzahl der positiv gewerteten und der negativ gewerteten Patienten ist bei beiden Durchgängen gleich. Eventuelle Unsicherheiten bei der eindeutigen Zuordnung zu einer der beiden Gruppen könnten sich bei Infizierten ergeben, die nur eine schwache Immunantwort zeigen. Um diesem Problem vorzubeugen, muss bei der Immundiagnose in tropischen Regionen also darauf geachtet werden, dass die benötigten Chemikalien nicht zu sehr erwärmt werden.

Abb. 13

a)



b)



4.5 Verwendung von Blut, das aus Filterpapier rückeluiert wurde

Bei den bisherigen Versuchen wurde im ersten Inkubationsschritt stets Serum benutzt. Serum ist der von Blutzellen und Fibrin befreite, und dadurch nicht mehr gerinnbare, wässrige Bestandteil des Blutes. Um dieses Serum zu gewinnen, muss einem Patienten Blut abgenommen werden, aus dem dann durch Abzentrifugieren das Serum gewonnen wird. Dieser invasive Eingriff birgt sowohl für den Patienten als auch für den Blutabnehmenden die Gefahr einer Infektion durch verschiedene Erreger. Als besonders gefährlich sind dabei Viren wie HBV und HIV anzusehen. Auch die Person, die den Test durchführt, trägt ein gewisses Infektionsrisiko. Optimal wäre eine Methode, bei welcher der Einsatz von Kanülen, die eventuell mehrmals benutzt werden, nicht mehr notwendig ist.

Dazu bietet sich folgendes Vorgehen an: Der Patient wird mit einer Nadel ohne Lumen am Finger gestochen, und der austretende Blutstropfen wird auf Filterpapier aufgefangen, wo er eintrocknet. Es werden also keine Kanülen mit Hohlräumen, in denen Viren persistieren können, benutzt. Voraussetzung für dieses Vorgehen ist die Rückelution funktioneller Antikörper aus dem eingetrockneten Blut. Aus Mangel an Patienten wurde diese Vorgehensweise vorerst mit schistosomainfizierten Mäusen getestet. Dazu wurde ihnen einige Tropfen Blut abgenommen, auf Filterpapier gegeben und luftgetrocknet. Gleichzeitig wurde von den gleichen Mäusen Serum gewonnen. Ziel dieses Versuches war es zu zeigen, dass der Line-Blot mit rückeluiertem Blut ebenfalls zu aussagekräftigen Ergebnissen führt. Als phosphatasemarkierten 2. Antikörper wurde ein gegen Mäuseantikörper gerichtetes Immunglobulin verwendet. Anstelle des Humanserum als Kontrollspur wurde beim Präparieren der Zellulose eine Spur mit Mäuseserum gezogen. Ansonsten entsprach die Verfahrensweise der aller anderen Blots.

Bei diesem Versuch wurden die Blutproben und die dazugehörigen Seren 24 Stunden bei 4°C gelagert. Zum Rückeluierten wurden die Filterpapierstückchen mit dem eingetrockneten Blut (entsprechend 20-30µl Blut) für eineinhalb bis zwei Stunden in 1 ml Antikörperversdünnungspuffer gelegt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die vorpräparierten Streifen direkt mit diesem Eluat inkubiert. Das weitere Vorgehen ist bereits oben beschrieben. Gleichzeitig werden Streifen im Serum inkubiert. Dadurch ist ein direkter Vergleich der beiden Techniken möglich.

Als Ergebnis wurde ein allen Kriterien entsprechender Line-Blot erhalten. Es ergab sich lediglich eine geringe Signalabschwächung bei den Streifen, die im rückeluierten Blut inkubiert wurden.

4.6 Antikörper- und Antigenverdünnung

Der Line-Blot wird sich nur als anerkanntes Immundiagnoseverfahren durchsetzen, wenn er einfach in der Durchführung, zeitlich kurz gehalten und finanziell attraktiv ist. Bei den im Line – Blot verwendeten Materialien sind die Nitrozellulose und der Phosphatase-markierte monoklonale Antikörper finanziell am aufwendigsten. Um einen möglichst sparsamen Verbrauch der Nitrozellulose zu erreichen, sollten die Antigene äußerst dicht untereinander aufgetragen werden. Dies lässt sich technisch mit speziellen Vorrichtungen problemlos realisieren.

Bei dem phosphatasemarkierten Antikörper muss die optimale Konzentration ermittelt werden. Wenn möglich, sollte die niedrigste Konzentration eingesetzt werden, bei der noch eine eindeutige Diagnose möglich ist.

Bezüglich einer weiteren Zeiteinsparung kann beim Waschen (s.o.) und bei den Inkubationsschritten angesetzt werden. Hier sollen jetzt die Inkubationszeiten näher betrachtet werden, d. h. die Reaktionszeit der auf die Nitrozellulose aufgetragenen Antigene mit dem ersten Antikörper und die Zeit, in der diese Antikörper mit dem zweiten, also dem monoklonalem Antikörper reagieren. Für ein gutes Ergebnis spielen sowohl die Konzentration der Antikörper als auch die Inkubationszeiten eine wichtige Rolle. Durch Einsatz konzentrierter Antikörper kann die Zeitverkürzung positiv beeinflusst werden, dafür steigen aber die Kosten, zumindest was den zweiten Antikörper betrifft. Beim Serum kann davon ausgegangen werden, dass bei diesen Überlegungen als sehr groß einzustufende Mengen, z.B. 10- 20 µl, im Feld keinerlei Probleme in der Beschaffung darstellen. Trotzdem ist die Erhöhung der Antikörperkonzentration auf Kosten der Zeit nicht unbegrenzt. Eine bestimmte Mindestzeit für die Inkubation muss auf jeden Fall eingehalten werden. Aufgabe der folgenden Versuche war es, die günstigste Kombination aus einem sparsamen Einsatz der verwendeten Materialien und möglichst kurzen Reaktionszeiten zu finden.

4.6.1 Optimierung der Antikörperkonzentration

Abb. 14: Um die optimale Konzentration des phosphatasemarkierten 2. Antikörpers ($G\alpha h$ IgG) mit den Serumantikörpern zu ermitteln, wurden parallel drei Blots angefertigt. Der einzige Unterschied hierbei betrifft die Antikörperkonzentration. Bei a) beträgt die Verdünnung 1: 5000, bei b) 1: 7000 und bei c) 1: 10 000. Die Stärke der Signale nimmt, wie erwartet, mit steigender Verdünnung ab.

Bei c) sind sie so schwach, dass sich eine sichere Diagnose als schwierig erweisen würde. Unter den Bedingungen einer einstündigen Inkubation sowohl im ersten als auch im zweiten Antikörper ist diese Konzentration unzureichend.

Blot a) zeigt deutlich die besten Signale. Doch ergeben sich im Vergleich zu Blot b) keine zusätzlich positiven Seren. Dies bedeutet, dass eine Verdünnung von 1: 7000 zwar nicht die stärksten Signale zeigt, aber durchaus für eine Diagnose im Sinne von positiv bzw. negativ ausreicht. Es entspricht auch der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung für den Einsatz. In den folgenden Versuchen wurde der zweite Antikörper zum Teil auch aus Ersparnisgründen immer 1: 7000 verdünnt. Da die gekaufte Antikörperlösung mit 1 Volumen Glycerin versetzt wurde, damit sie ohne einzufrieren bei -20°C gelagert werden konnte, muss bei der Vorbereitung die Verdünnung 1: 3500 benutzt werden. Ein Einsatz der 1:2500 Verdünnung wäre im Fall von sehr schwach zu erwartenden Signalen, z.B. in Gebieten mit einer sehr geringen Infektionsrate, denkbar.

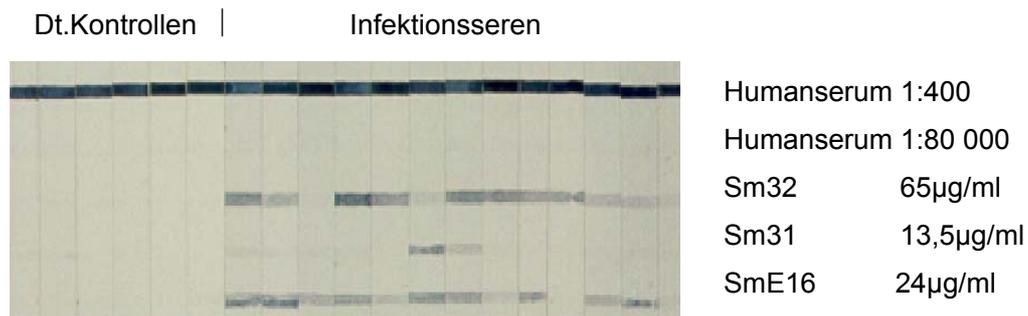
Abb. 14

a)



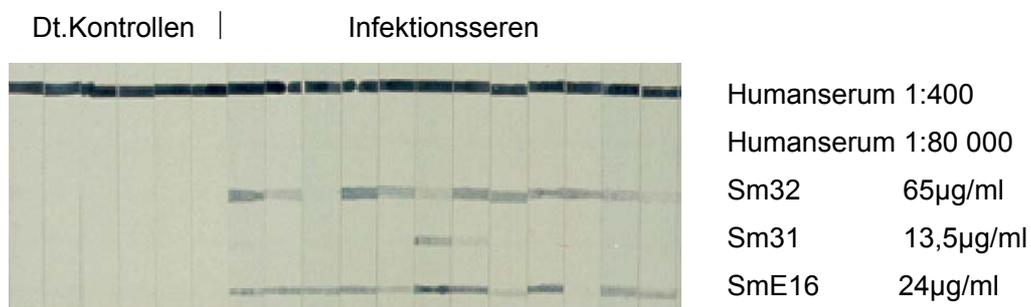
Verdünnung des phosphatasemarkierten
Antikörpers: 1:5000

b)



Verdünnung des phosphatasemarkierten Antikörpers: 1:7000

c)



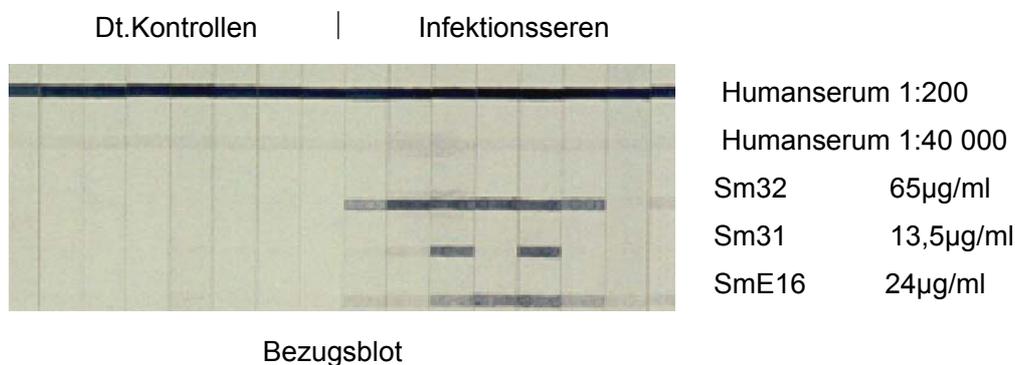
Verdünnung des phosphatasemarkierten Antikörpers: 1:10 000

4.6.2 Optimierung der Inkubationszeiten

Abb. 15: Bei dem folgenden Versuch wurden die beiden einstündigen Inkubationsschritte bei gleichen Verdünnungen auf 30 Minuten verkürzt. Ein Vergleich zwischen dem Bezugsblot (a) und dem Blot mit den verkürzten Zeiten (b) zeigt, dass die Signale von b) geringfügig schwächer sind als bei a). Eine derartige Verkürzung der Inkubationszeiten ist also im Prinzip möglich. Für den Zeitgewinn von einer Stunde, bei gleichem Einsatz an Materialien, muss mit einem geringen Signalverlust gerechnet werden.

Abb. 15

a)



b)



Verkürzung beider Inkubationsschritte auf 30 Minuten

Die Seren wurden bis jetzt in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. In 500µl Antikörperversdünnungspuffer werden 5µl Serum (1:1 mit Glycerin verdünnt für die Lagerung bei -20 °C) pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde. Soll diese Zeit bei gleicher Qualität der Signale verkürzt werden, muss die Konzentration des Serum steigen. In weiteren Versuchen wurde die Zeit auf 30 Minuten verkürzt und gleichzeitig die eingesetzte Serummengung auf 10 µl erhöht. Die Verdünnung betrug nun also 1: 100. Signifikante Unterschiede in der Signalstärke waren im Vergleich mit einem Bezugsblot nicht zu beobachten. Auch die Anzahl der als positiv bzw. negativ gewerteten Seren entspricht sich. Bei einer Halbierung der Inkubationszeit im ersten Antikörper ist eine Erhöhung der Konzentration der Seren empfehlenswert. Da bei der Anwendung im Feld Serum relativ unbegrenzt zur Verfügung steht, ist die Erhöhung der Serummengung auf 10% des Verdünnungspuffer und gleichzeitig die Verkürzung zumindest des ersten Inkubationsschrittes auf 30 Minuten eine akzeptable Alternative.

Bei den folgenden Versuchen wurde allerdings weiterhin die Verdünnung 1:200 benutzt, da Infektionsseren nicht unbegrenzt zur Verfügung standen.

4.6.3 Bestimmung der optimalen Antigenkonzentration

Werden die Antigene in zu niedrigen Konzentrationen eingesetzt, können die Signale bei Patienten mit einer sehr schwachen Immunantwort so schwach ausfallen, dass diese als falsch negativ diagnostiziert werden. Werden die Antigene zu hoch konzentriert eingesetzt, können unspezifische Reaktionen in einem Maße stattfinden, dass das Waschen nicht ausreicht, diese Fehlbindungen zu lösen. Es binden bei den weiteren Schritten die phosphatasemarkierten Antikörper, und bei der Farbreaktion entstehen Banden.

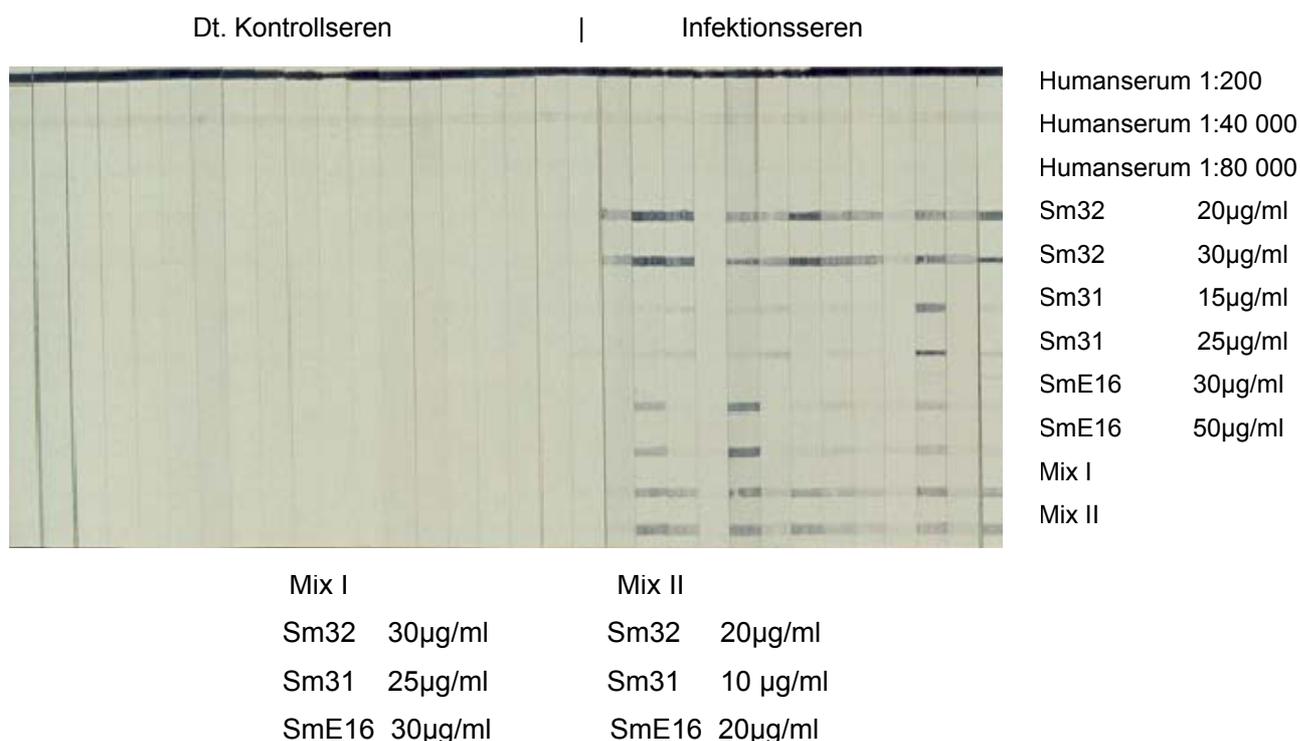
Diese Banden, die zur Diagnose „positiv“ führen, beruhen jedoch nicht auf Bindungen zwischen Schistosomenantigenen und Antikörpern des Patienten gegen diese Antigene, sondern auf Bindungen zwischen Schistosomenantigenen und unspezifischen Antikörpern. Es ist demnach notwendig, eine Antigenkonzentration zu ermitteln, die hoch genug ist, auch bei Patienten mit schwacher Immunantwort gegen Schistosomen die vorhandenen Antikörper zu binden, aber die gleichzeitig so niedrig ist, dass möglichst wenig unspezifische Bindungen auftreten. Die für diese Untersuchung verwendeten Kontrollseren stammen von nicht infizierten Personen. Sollten diese Seren beim Line-Blot Banden zeigen, muss davon ausgegangen werden, dass unspezifische Bindungen stattgefunden haben und dass die aktuelle Antigenkonzentration zu hoch angesetzt wurde. Auf diese Art und Weise kann nacheinander die optimale Konzentration der drei Antigene SmE16, Sm 31 und Sm32 richtig eingestellt werden.

Bei dem folgenden Versuch (Abb. 16) sind die drei Antigene in mehreren Konzentrationen aufgetragen worden. Diese Konzentrationen bewegen sich im vermuteten Optimalbereich. Beim Sm 32 sind 20 µg/ml und 30 µg/ml, beim Sm 31 15 und 25 µg/ml und beim SmE16 30 und 50 µg/ml eingesetzt worden. Zusätzlich befinden sich zwei Spuren mit Mischungen der Antigene (Mix I und Mix II) auf der Membran, deren Zusammenstellung der Legende zu entnehmen sind. Beim Sm 32 sind bei keinem Kontrollserum Banden zu erkennen. Die leichten Schatten in Höhe der Sm 32 Spur sind auf mechanische Belastungen der Membran durch erhöhten manuellen Druck beim Auftragen zurückzuführen. Es kann also eine endgültige Konzentration von 30 µg/ml eingesetzt werden, ohne unspezifische Bindungen zu begünstigen.

Beim Sm 31 sind bei einer Konzentration von 25 µg/ml bei zwei Kontrollseren bereits sehr schwache Signale zu erkennen. Bei 15 µg/ml ist dies noch nicht der Fall. Deshalb wurde bei den folgenden Versuchen eine Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt.

Beim SmE16 sind weder bei 30 µg/ml noch bei 50 µg/ml falsch positive Signale zu sehen. Bei weiteren, hier nicht gezeigten Versuchen wurde die Konzentration vom SmE16 schrittweise bis auf über 150 µg/ml erhöht. Erst in diesen Bereichen zeigten sich bei den Kontrollseren Banden, die auf unspezifische Bindungsreaktionen hinwiesen. Als endgültige Konzentration wurden 150 µg/ml bestimmt. Die in den meisten der vorher durchgeführten Versuchen verwendete Konzentration von 24 µg/ml des SmE16 zeigt zwar auch gute Signale, für den zukünftigen Einsatz zur Diagnose ist durch die deutlich höhere Konzentration von 150 µg/ml jedoch sichergestellt, dass auch sehr schwache Immunantworten angezeigt werden. Durch die Negativkontrollen wurde gezeigt, dass auch in dieser Konzentrationshöhe, im Gegensatz zu den beiden anderen Antigenen, noch keine falsch positiven Banden erscheinen.

Abb. 16



4.7 Weitere Optimierung durch Eliminierung von Störfaktoren

Außer den direkten Faktoren Antigen, 1. und 2. Antikörper können indirekte Faktoren wie Sauberkeit der Durchführung einzelner Schritte, Größe der Reaktionsvolumina, Trocknen der Streifen während der Inkubation, Übereinanderliegen der Streifen beim Waschen, Oxidation von Antigen und Antikörper durch Luftsauerstoff u.s.w. einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis des Line-Blots haben. In diesem Abschnitt werden einige dieser indirekten Faktoren näher untersucht.

4.7.1 Einfluss von Waschpufferresten beim Färben

Nach dem dritten 5-minütigen Waschschrift nach der Inkubation mit dem 2. Antikörper werden die Streifen direkt aus dem Waschpuffer in die Färbeschale gelegt. Dabei lässt sich nicht verhindern, dass sich eine gewisse Menge an Waschpuffer, die an den Streifen haften bleibt, mit dem Farbpuffer vermischt und somit eventuell störend auf die Farbreaktion wirkt.

Abb. 17: Hier soll ein eventuell störender Einfluss dieser Vermischung ermittelt werden. Dazu wurden die Streifen vor dem Färben im Alkalische-Phosphatase-Puffer gewaschen (Blot b). Dieser Schritt wurde an die Stelle des letzten fünfminütigen Waschschriftes gestellt.

Hat die oben erwähnte Vermischung beider Puffer tatsächlich einen störenden Einfluss auf die Farbreaktion, müsste das Ergebnis diesmal eine intensivere Färbung sein.

Dies ist tatsächlich der Fall. Die Intensität der Signale des Bezugsblots b) ist schwächer als die des Blots a). Die Vermischung des Alkalische-Phosphatase-Puffers mit Spuren vom Waschpuffer hat demnach negative Auswirkungen auf die Farbreaktion, und sollte bei der Durchführung der Farbreaktion dringend vermieden werden.

Abb. 17



4.7.2 Färben in den Wannern

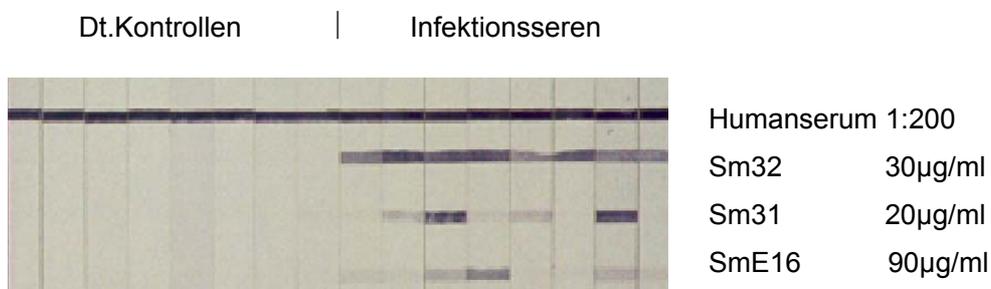
Bei der gesamten Durchführung des Line-Blots verbleiben die Teststreifen in ihren Inkubationswannen. Erst für die Farbreaktion werden die Streifen dann einzeln mit einer Pinzette aus ihren Wannern genommen und in eine gemeinsame Farbschale gelegt. Je größer die Anzahl der Teststreifen bei einem Blot ist, um so länger dauert dieses Umlagern. Um diesen Zeitverlust zu verhindern, wurde versucht, die Streifen in den Inkubationswannen zu färben. Der Schritt des Umlegens fällt dabei weg. Bei den Inkubationsschritten werden die Streifen jeweils in 500µl Antikörperpuffer inkubiert.

Bei dieser relativ geringen Menge an Volumen kann es leicht passieren, dass die Streifen an ihrer Oberfläche nicht oder nur unvollständig benetzt werden. Ergebnis dieser kurzzeitigen Austrocknungen sind für die Diagnose äußerst störende längs gerichtete Verfärbungen auf den Streifen. Um dies zu verhindern, werden die Nitrozellulosestreifen mit der Seite, auf welche die Antigene aufgetragen wurden, nach unten in die Wannen gelegt. Sollen die Streifen jetzt in ihren Wannen gefärbt werden, geschieht dies ebenfalls in dieser Lage, da ein vorheriges Wenden mindestens genauso zeitaufwendig wäre wie das Umlegen in eine Färbeschale. Da die Farbreaktion aber auf einem Ausfallen von Farbpartikeln beruht, könnte es hierbei zu Signalabschwächungen kommen. Der Versuch bestätigt diese Vermutung.

Abb. 18: Blot a) ist der Bezugsblot. Wie in der Abbildung deutlich zu sehen ist, sind die Signale in Blot b) schwächer. Diese Streifen wurden in den Wannen mit den aufgetragenen Antigenen nach unten gefärbt. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, müssten die Streifen vor dem Färben in ihren Wannen einzeln umgedreht werden. Dies würde aber mindestens ebenso viel Zeit in Anspruch nehmen, wie das Umlagern in eine gemeinsame Schale. In diesem Falle entsprechen sich Aufwand und Nutzen in keiner Weise. Daher wurde weiterhin die ursprüngliche Versuchsanordnung beibehalten.

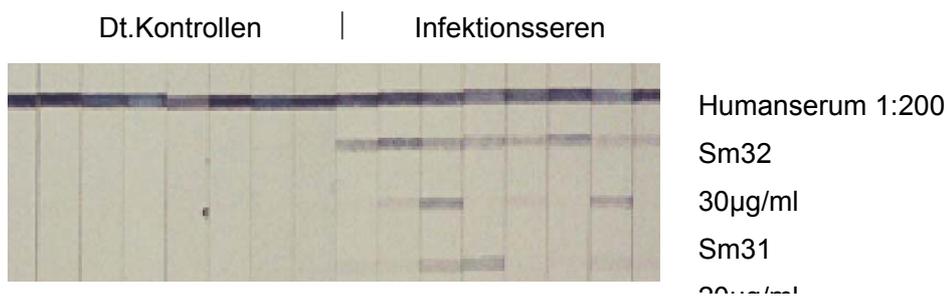
Abb. 18

a)



Bezugsblot, bei dem die Streifen gemeinsam
in einem Gefäß gefärbt wurden

b)



Jeder Streifen wurde separat in seiner Wanne gefärbt,
dabei befand sich die antigenbehaftete Seite unten.

4.8 Einfluss der Lagerung der Teststreifen auf die Signalstärke

Um einen effektiven Einsatz der Immundiagnose im Feld zu gewährleisten, ist es notwendig, präparierte Streifen vorrätig zu halten. Dabei muss eine gleichbleibende Qualität der Signale sichergestellt sein.

Abb. 19: Zu dieser Problematik wurde ein Test durchgeführt, bei dem die an einem bestimmten Tag präparierten Streifen zu verschiedenen Zeitpunkten im Line-Blot eingesetzt wurden. Um ein eventuelles Wachstum von Schimmelpilzen auf den präparierten Streifen zu verhindern, wurde der Blocklösung Natriumazid zugefügt. Als Bezugsblot a) gilt das Ergebnis des ersten Tages, d.h. des Blots am Tag der Präparation der Teststreifen. Da jedes Mal die gleichen Seren verwendet wurden, ist ein direkter Vergleich der Signalstärke möglich. Durchgeführt wurden Blots nach 8 Tagen, 14 Tagen, vier Wochen und nach acht Wochen.

Einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Qualität der Signale hat die Art der Lagerung. Dazu wurden drei verschiedene Lagerungsmöglichkeiten parallel verglichen: Lagerung bei Raumtemperatur (RT, ca. 23°C), im Kühlschrank (4°C) und bei -20°C. In ihrer Signalstärke verglichen wurden die drei Antigene einzeln und als Mischung. Es wurde darauf geachtet, dass jeweils die gleichen Bedingungen bei der Durchführung der Tests herrschten.

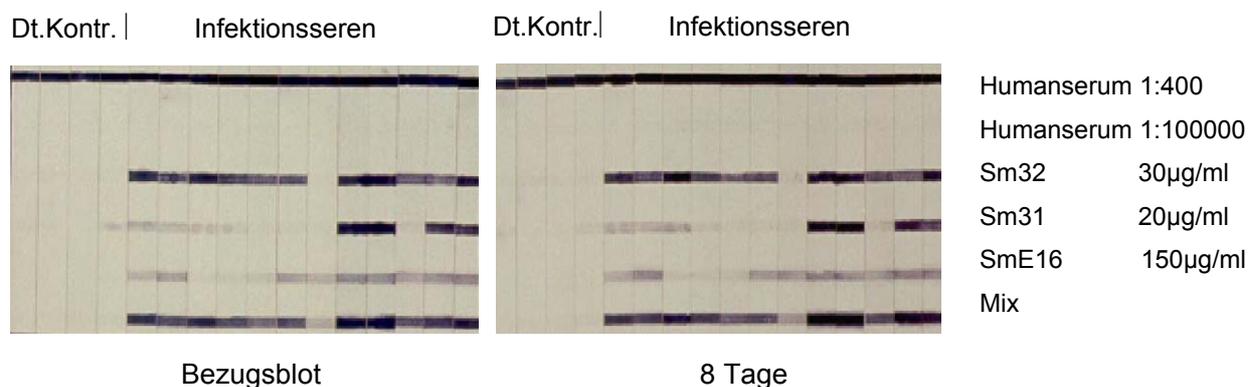
Nach acht Tagen ist weder bei den einzelnen Antigenen noch bei der Mischung eine signifikante Abschwächung der Signale zu erkennen. Dies trifft für alle drei Lagerungsformen zu. Nach 14 Tagen ist bei Lagerung bei Raumtemperatur bereits eine leichte Signalabschwächung des Sm32 und des SmE16 zu bemerken. Bei Lagerung im Kühlschrank (4°C) und bei -20°C ist kein wesentlicher Verlust zu verzeichnen.

Nach vier Wochen zeigen sich auch bei Lagerung im Kühlschrank erste Signalverluste des Sm32. Nach wie vor als stabil erweisen sich das Sm31 bei allen drei Temperaturen und alle Antigene bei -20°C .

Nach acht Wochen Lagerung zeigen dann auch das Sm31 und das SmE16 bei den drei verschiedenen Temperaturen Verluste in der Signalstärke. Aufgrund der Beobachtungen ist die Lagerung bei Raumtemperatur bis zu maximal acht Tagen möglich. Bei Lagerung im Kühlschrank können die Streifen etwa 10 bis 14 Tage nach der Präparation ohne Signalverlust benutzt werden. Am längsten halten sich die Antigene bei Aufbewahrung bei -20°C . Hier können auch nach vier Wochen noch akzeptable Signalstärken erreicht werden.

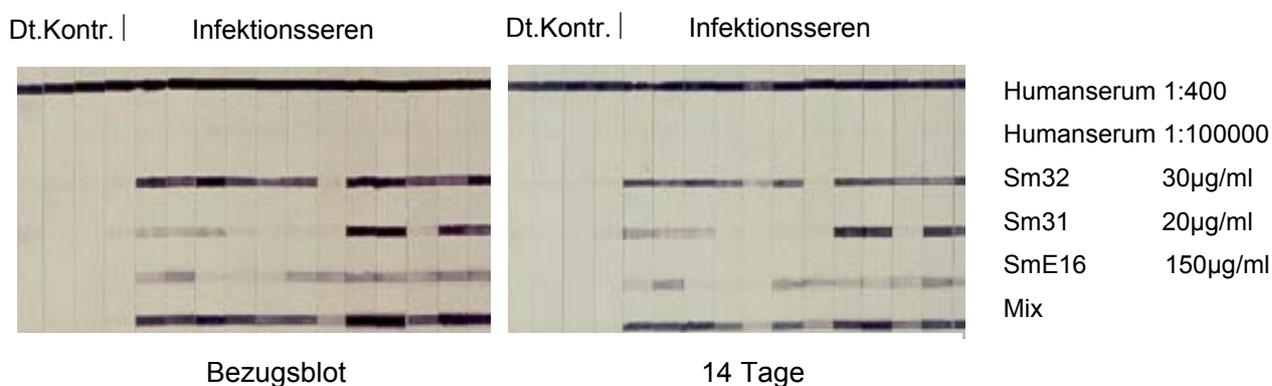
Abb. 19

a)



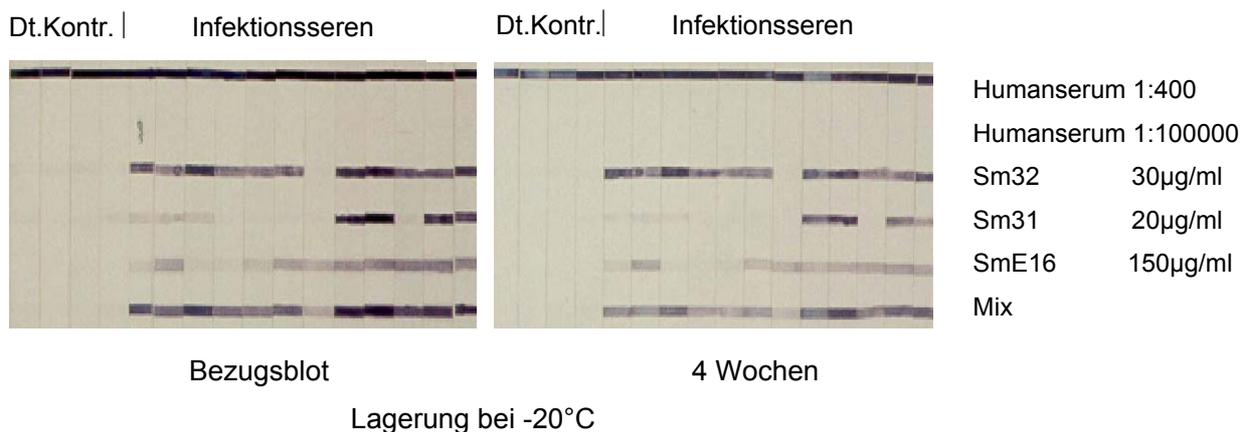
Lagerung bei Raumtemperatur

b)



Lagerung bei 4°C

c)



4.9 Die endgültige Verfahrensweise beim Line-Blot

Aufgrund der während dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wurde die Verfahrensweise bei der Durchführung des Line-Blot geändert. Die besten Ergebnisse werden erhalten, wenn folgendermaßen vorgegangen wird:

Die Antigene werden in einem geeigneten Antigenverdünnungspuffer (1xTBS, 10% Glycerin, 1mM DTT) verdünnt auf die folgenden Konzentrationen: Sm32 30µg/ml; Sm31 20 µg/ml und SmE16 150 µg/ml. In der Mischung sind alle drei Antigene in diesen Konzentrationen enthalten. Das Humanserum für die Kontrollspuren wird einmal 1:400 und einmal 1:100 000 verdünnt. Nacheinander werden das Humanserum und die Antigene mit den Tuschestiften auf die Nitrozellulose aufgetragen. Dabei werden je 100µl in einen Zeichenkegel pipettiert und dieser mit gleichmäßigem Tempo über die Membran bezogen, ohne diese zu heftig zu berühren. Nach dem Auftragen und Eintrocknen der Antigene wird die Nitrozellulose in 1xTBST und 1% Tween 20 für dreißig Minuten abgesättigt.

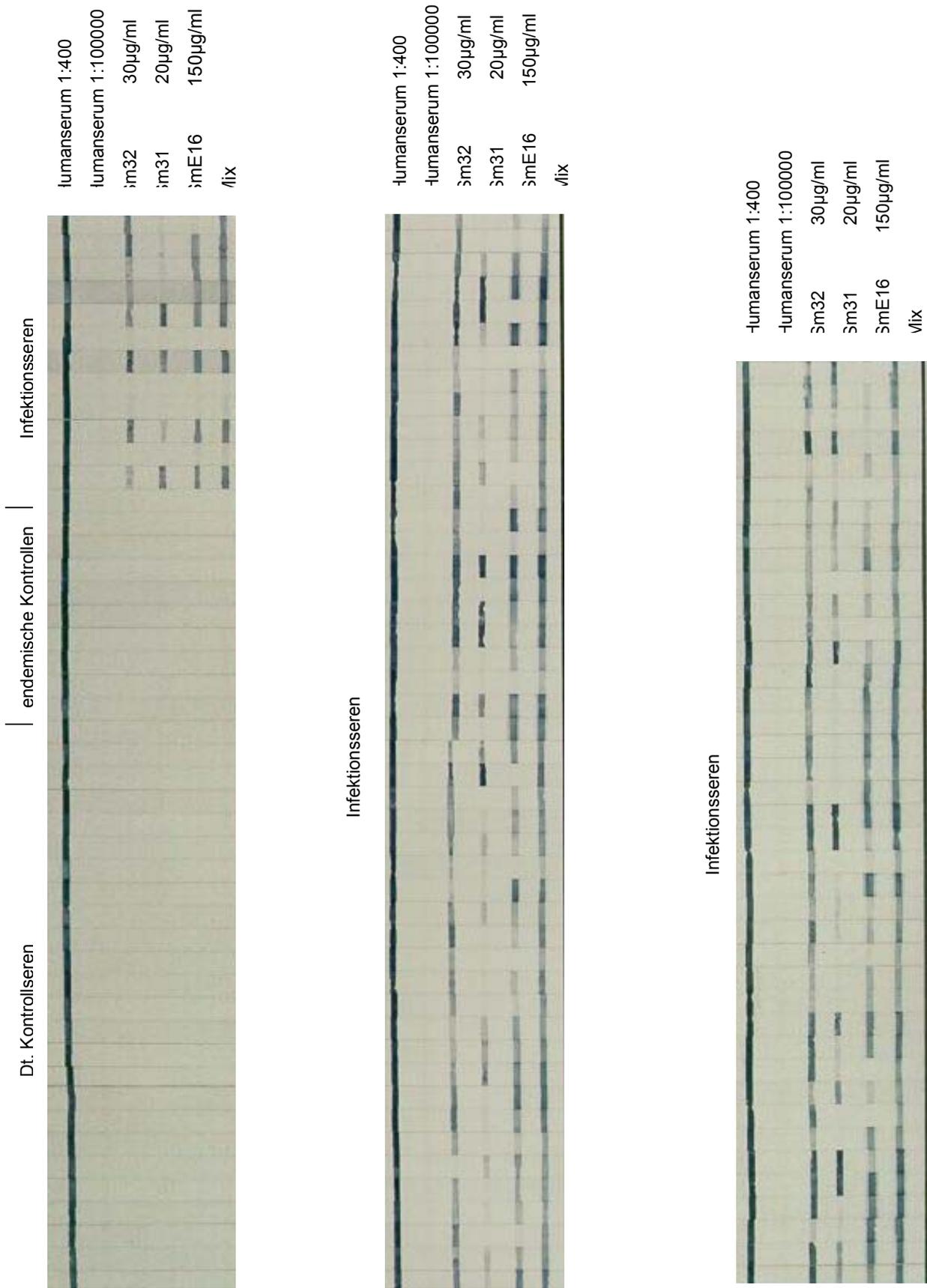
Die noch feuchte Membran wird auf dem Streifenschneider in 4 mm breite Streifen geschnitten. Diese werden durchgehend nummeriert, um eventuellen Verwechslungen während der Diagnose vorzubeugen. Die Streifen werden entweder im Exsikkator oder bei Raumtemperatur getrocknet. Die im Antikörperpuffer (1xTBST, 1%BSA, 1mM DTT) verdünnten Patientenserum werden in die vorher markierten Inkubationswannen pipettiert (500ml Puffer, 2,5µl Serum bzw. 5µl Serum bei Seren in 50% Glycerin). Nach dem Pipettieren bietet sich ein kurzes Mischen auf dem Diffusions-Schüttler an.

Die getrockneten Streifen werden vor der Inkubation zwei bis drei Minuten mit dem Blockpuffer benetzt. Die nassen Streifen werden mit der Seite, auf der die Antigene aufgetragen sind, nach unten in die Serum-Verdünnung gelegt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Es muss darauf geachtet werden, dass die Streifen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sind. Danach werden die Seren-Puffer-Gemische mit der Wasserstrahlpumpe in ein mit Desinfektionsmittel gefülltes Gefäß abgesaugt. Jetzt folgen drei fünfminütige Waschschrte mit je 2 ml Waschpuffer pro Streifen. Nach dem Absaugen des Waschpuffers vom dritten Waschschrte wird der phosphatasemarkierte Antikörper (500 µl) auf die Streifen gegeben. Bei einer Verdünnung von 1:7000 im Antikörperverdünnungspuffer (1xTBST, 1%BSA, 1mM DTT) erfolgt die Inkubation für eine Stunde auf dem Diffusions-Schüttler, bei einer Verdünnung von 1:3500 sind dreißig Minuten ausreichend. Danach folgen wieder drei fünfminütige Waschschrte. Anschließend werden in jede Wanne 1 ml Phosphatasepuffer gegeben. Zum Färben werden die Streifen aus den Inkubationswannen in ein gemeinsames Gefäß mit der antigenbeschichteten Seite nach oben gelegt. Für 60 Streifen werden ca. 20 ml der Färbelösung (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ mit je 20µl NBT und BCIP benötigt. Nach zehn Minuten Inkubation im Farbpuffer (ohne Schütteln) werden die Streifen herausgenommen, bei Raumtemperatur getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt.

Der Versuch auf der folgenden Seite wurde unter diesen optimierten Bedingungen durchgeführt. Anhand dieses Blots ist die Einfachheit in der Auswertung des Diagnoseverfahrens gut darzustellen. Für den Einsatz in betroffenen Regionen ist vorgesehen, anstelle der drei Antigen-Spuren nur noch die Spur mit der Antigen-Mischung auf den Teststreifen zu haben. Zusätzlich sind noch zwei Humanserum-Spuren aufgetragen. Die 1:400 Verdünnung dient als Positivkontrolle für die Reaktion des phosphatasemarkierten Antikörpers. Die mit der 1:100 000 Verdünnung erzielte Signalstärke dient als Schwellenwert. Nur Signale, die stärker als dieser Schwellenwert sind, werden als positiv bewertet. Mit Hilfe einer am Auswertungsort vorliegenden Skala, auf der verschiedene Signalstärken ablesbar und einzuordnen sind, wird durch direkten Vergleich mit dem Testergebnis eine Bewertung auch für den Ungeübten möglich.

Abb. 20 zeigt einen Line-Blot unter diesen Bedingungen mit 100 Infektionsseren und einer großen Zahl von negativen Kontrollseren aus Europa und Afrika. Unter den Infektionsseren sind nun drei (Nr. 4, 5, 7), deren Signal auf der Spur mit der Antigenmischung schwächer oder gleich stark wie der Schwellenwert ist. Alle anderen sind deutlich positiv. Diese drei Seren erwiesen sich bei näheren Untersuchungen als unbrauchbar. In einer Westernblotanalyse waren sowohl die schweren als auch die leichten Ketten von IgG degradiert. Demnach kann anhand des Ergebnisses von Abb. 20 geschlossen werden, dass die Empfindlichkeit des Line-Blot nahezu 100% ist.

Abb. 20



5 Diskussion

5.1 Vorteile des Line-Blot gegenüber anderen Immundiagnoseverfahren

Die Problematik bei der Diagnose der Schistosomiasis ist nicht das Erkennen stark infizierter und schwer erkrankter Patienten, was bei diesen in den meisten Fällen bereits durch die Klinik gegeben ist. Die Problematik liegt vielmehr darin, nur leicht infizierte Menschen auffindig zu machen, da diese klinisch noch gesunden und somit unauffälligen Patienten ein Infektionsrisiko darstellen. Im Vordergrund des hier bearbeiteten Immundiagnoseverfahrens steht also die Empfindlichkeit des Tests schon kleinsten Antikörpermengen gegenüber. Der im Rahmen dieser Arbeit optimierte Line-Blot fasst dort, wo andere Immundiagnoseverfahren aufgrund geringerer Empfindlichkeit versagen. Die Sensitivität des Verfahrens mit der verwendeten der Antigenmischung beträgt bezogen auf die erhaltenen Ergebnisse >99%. Damit wird für einen zukünftigen Einsatz in endemischen Gebieten sichergestellt, dass auch sehr leicht infizierte Personen auffindig gemacht werden können. Werden alle mit dem Line-Blot als positiv bewerteten Personen mit Praziquantel behandelt, dürfte es nach einiger Zeit keine potenten Eiausscheider mehr unter diesen Personen geben. Der Infektionskreislauf wäre dann unterbrochen. Durch die Untersuchung neu zugewanderter Menschen und durch rechtzeitige medikamentöse Behandlung könnte es gelingen, den Infektionskreislauf auf Dauer zu unterbrechen.

Ein weiterer deutlicher Vorteil neben der hohen Empfindlichkeit ist die überaus einfache Auswertung der Ergebnisse des Diagnoseverfahrens. Sie ist ohne Hilfsmittel, Messgeräte oder Mikroskope möglich. Das Ergebnis kann der Patient sogar selbst erkennen. Durch Verwendung von Bildern und Symbolen könnten auch Analphabeten und Kinder, die noch nicht lesen und schreiben können, auf einfache Art und Weise ihre eigenen Ergebnisse einsehen. Durch diese patientennahe Auswertung kann mit einer sehr hohen Compliance in der Bevölkerung gerechnet werden, was auch die Durchführung der auf die Diagnose folgenden Therapiemaßnahmen positiv beeinflussen wird.

Durch die Unabhängigkeit des Line-Blot von komplizierter Technik und empfindlichen Materialien (siehe unten), ist es möglich, direkt in die betroffenen Dörfer zu fahren und die Diagnose Vorort durchzuführen. Dadurch bleiben den Menschen eventuelle lange und zeitraubende Anfahrtswege zu entfernten Sammelstellen erspart.

Vielen wäre dieser Aufwand sicher auch nicht möglich, da sie täglich arbeiten müssen. Außerdem wird so sichergestellt, dass wirklich alle Personen in endemischen Gegenden untersucht werden. Da der Line-Blot schnell erlernbar ist, können Einheimische auch ohne spezielle Berufsausbildung die Diagnose durchführen, was ebenfalls zu einer Erhöhung der Compliance führen dürfte.

Ebenfalls ein positiver Aspekt des Line-Blot ist die Wiederverwendbarkeit der eingesetzten Geräte. Nach Reinigung der Inkubationswannen, die einfach mit Desinfektionslösungen und Bürste erfolgen kann, spricht nichts gegen eine Wiederverwendung. Auch die Gefäße, in denen gefärbt wird, können mehrmals verwendet werden. Dadurch werden die Kosten für die einzelne Diagnose sehr gering gehalten.

5.2 Durchführung des Line-Blot unter optimierten Bedingungen

Ein wesentlicher Fortschritt bei der Optimierung des Line-Blot ist die Verkürzung der Arbeitszeit. Durch das Waschen der Streifen separat in den einzelnen Wannen ist dieser Vorgang wesentlich intensiver, als das zuvor praktizierte Waschen aller Streifen zusammen in einem Gefäß. Dadurch konnte die für einen Waschschrift benötigte Zeit von 10 Minuten auf fünf Minuten verkürzt werden. Das bringt bei sechs Waschschriften insgesamt eine Ersparnis von dreißig Minuten. Auch die Tatsache, dass die Streifen während des ganzen Verfahrens nur noch einmal umgelagert werden müssen (vor dem Färben in ein gemeinsames Gefäß), spart einiges an Zeit.

Da bei diesem Diagnoseverfahren mit Humanseren gearbeitet wird, besteht für den Durchführenden immer die Gefahr einer versehentlichen Infektion. Dies kann gerade in den Endemiegebieten in Afrika leicht eine HIV- oder eine HBV-Infektion sein. Deshalb ist ein sorgfältiges Arbeiten unter absolut sauberen Verhältnissen unbedingt notwendig. Das häufige Umlagern der Streifen, die bereits mit den Seren in Kontakt gekommen waren, war jedes Mal eine theoretische Gefahrenstelle für den Durchführenden. Insgesamt mussten die Streifen achtmal bewegt werden. Nach der Inkubation in den Patientenseren dreimal in den Waschpuffer und danach in den zweiten Antikörper, dann wieder dreimal zum Waschen und einmal in die Färbelösung. Durch den neu eingeführten Einsatz der Wasserstrahlpumpe werden die Teststreifen nur noch einmal direkt in den Farbpuffer umgelagert. Dieses Vorgehen macht das Verfahren eindeutig sicherer für die Person, die diese Diagnose durchführt.

Nicht zu übersehen ist ein weiterer Vorteil, den der Einsatz der Wasserstrahlpumpe mit sich bringt. Durch das nun nicht mehr zeitaufwendige Umlagern jedes einzelnen Streifens, ist der Durchführende in der Lage, weitaus mehr Seren in einem Durchgang zu testen, als unter den vorherigen Bedingungen.

5.3 Das neue Antigen Sm32

Das diagnostische Antigen Sm 32, das vor Entstehen dieser Arbeit verwendet wurde, unterscheidet sich von dem jetzt verwendeten in der Lokalisation des Histidin-tags, das zur Affinitätschromatographischen Reinigung dient. Im Gegensatz zur früheren Form des Antigens, bei dem der Histidin-tag sich am carboxyterminalen Ende des Proteins befand, ist er jetzt am N-terminalen Ende zu finden. Außerdem ist das neue Protein um fünf Aminosäuren kürzer als das vorher eingesetzte. Diese beiden Änderungen in der Struktur des Sm 32 sind für sein verändertes Verhalten im Line-Blot verantwortlich. Vermutlich gelingt die Rückfaltung des Proteins in seine richtige Tertiärstruktur in dieser Form besser. Je ähnlicher die Tertiärstruktur des rekombinanten Proteins derjenigen im Nativzustand des Proteins ist, um so stärker bilden sich seine antigenen Eigenschaften aus. Mit dem jetzigen Sm 32 ist es gelungen, ein stabiles und gleichzeitig immunologisch sehr reaktives Antigen herzustellen. Im Line-Blot macht es sich dadurch bemerkbar, dass die Signale dieses Antigens nach vier und auch noch nach acht Wochen Lagerung bei -20°C deutlich zu erkennen sind. Positiv auf die Sensitivität des Line-Blots wirkt sich die Tatsache aus, dass Banden des Sm 32 bei fast jedem eipositiven Patienten erscheinen. Bei den Kontrollseren erscheinen dabei keine Signale. Tatsächlich erschien bei jedem für diese Arbeit zur Verfügung stehenden und nachweislich infizierten Patientenserum in der Antigenmischspur ein Signal. Es gab also keinen Patienten, der infiziert war und nicht mit dem Line-Blot als solcher erkannt wurde.

5.4 Die optimale Konzentration des Antigens SmE16 und Bestimmung des Schwellenwertes

Während dieser Arbeit wurden unter anderem auch verschiedene Konzentrationen für die drei Antigene ausgetestet. Dabei wurde besonders auf die maximal erreichbare Signalstärke bei minimaler Hintergrundsreaktion geachtet. Bei den Antigenen Sm31 und Sm32 war dies ziemlich eindeutig, so dass als optimale Konzentrationen 20 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 30 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt wurden.

Wurde weniger Antigen eingesetzt, waren die Signale bei gleichem Hintergrund geringer, wurde mehr eingesetzt, war der unspezifische Hintergrund so stark, dass er das Ergebnis verfälschte. Etwas anders verhält es sich beim Antigen SmE16. Hier taucht ein das Ergebnis negativ beeinflussender Hintergrund erst bei Konzentrationen von über 150 µg/ml auf. Die Signale sind aber schon bei Konzentrationen von ca. 30 bis 50 µg/ml verwertbar. Die Versuche, die der Optimierung des Verfahrens dienten, die mitunter auch mehrmals wiederholt werden mussten, wurden aus Ersparnisgründen deshalb mit SmE16-Konzentrationen von 20 µg/ml bis 50 µg/ml durchgeführt. Als endgültige Konzentration sollten aber 150 µg/ml eingesetzt werden. Kennzeichnend für den Line-Blot ist seine hohe Empfindlichkeit gegenüber im Serum der Patienten vorhandenen Antikörpern. Um diese Sensitivität nicht zu beeinträchtigen, ist es sicherer, die höchstmögliche SmE16-Konzentration, bei der noch kein störender Background zu beobachten ist, einzusetzen. So wird sichergestellt, dass auch geringste Mengen vorhandener Antikörper nachgewiesen werden.

Um ein Maß für die Unterscheidung eines positiven Signals von einer Hintergrundreaktion zu erhalten, wurde ein künstlicher Schwellenwert geschaffen. Dies wurde dadurch erreicht, daß ein stark verdünntes Humanserum als Kontrollspur auf die Teststreifen mit aufgetragen wurde. Banden, die nach erfolgter Farbreaktion schwächer oder gleich stark wie dieser Schwellenwert sind, gelten als negativ. Zur Auswertung der Teststreifen auch durch Ungeübte ist dieser Schwellenwert notwendig, um Fehlbewertungen zu vermeiden. Er muss also so eingestellt sein, dass er nach der Farbreaktion grenzwertig zu sehen ist. Die Stärke dieses Schwellenwertes wurde anhand der Reaktion negativen Kontrollseren aus Endemiegebieten bestimmt. Die Hintergrundreaktion dieser Seren erwies sich stets als höher als die der deutschen negativen Kontrollseren. Die Integration einer Schwellenwert-Bande auf den Teststreifen erspart die sonst notwendige ständige Verwendung von negativen Kontrollseren. Während dieser Arbeit wurde der Schwellenwert auf eine Verdünnung des Humanserums von 1:100 000 festgelegt. Signale der deutschen Kontrollseren lagen in ihrer Stärke immer unterhalb der Signalstärke dieser Spur.

5.5 Versuche zur Stabilisierung der Antigene durch chemische Quervernetzung

Als aussichtsreiche Möglichkeit zur Optimierung des Verfahrens wurde die Stabilisierung der Antigenstruktur bzw. der Antigen-Nitrozelluloseverbindung angesehen. Die Idee dabei war, dass es durch eine chemische Quervernetzung (Cross-linking) zu einer besseren Haftung der Antigene auf der Membran bzw. zu einer stabileren Struktur der aufgetragenen Antigene kommt. Dadurch würden die Antigene nicht so leicht durch mechanische Belastung der Nitrozellulose (z.B. Waschen) entfernt oder zerstört werden und die Signalqualität möglicherweise erheblich verbessert werden.

Bei den Versuchen wurde festgestellt, dass Cross-linking die Signalstärke durchaus verstärkt. Der größte Signalzuwachs wurde beim SmE16 erhalten. Auch bei den anderen beiden Antigenen wurden die Banden deutlich intensiver gefärbt. Ein Anteil vorher negativ gewerteter Seren erfüllte jetzt die Kriterien, um als positiv gewertet zu werden.

Es stellte sich aber die Frage, ob diese Seren wirklich schwach positiv und damit vorher unerkant geblieben oder ob diese Bindungen unspezifisch waren. Der Blick auf die deutschen Kontrollseren, die sicher negativ sind, beantwortete diese Frage. Auch hier waren nach dem Cross-linking Banden zu sehen. Diese Tatsache belegt, dass es sich bei den neu erschienen Signalen um unspezifische Antigen-Antikörper-Bindungen handelte. Um die Qualität dieses Diagnoseverfahrens nicht zu gefährden, wird vom Cross-linking abgesehen, da es nur scheinbar die Empfindlichkeit des Line-Blot steigert.

5.6 Feldtauglichkeit des Line-Blots

Ein Diagnoseverfahren ist nur dann sinnvoll einsetzbar, wenn es schnell und einfach durchführbar ist. Eine wichtige Voraussetzung ist auch die Einsatzmöglichkeit Vorort, d.h. der Einsatz unter einfachsten Bedingungen. Unter Berücksichtigung der Verhältnisse in den betroffenen Regionen (meist Entwicklungsländer mit mangelnder Infrastruktur) sollte der Transport von Material zwischen dem der Studie und dem ausführenden Labor nach Möglichkeit vermieden werden. Zum einen würden die Kosten steigen, zum anderen würde sich auch die benötigte Zeit für das Ergebnis verlängern, womit das Verfahren wesentlich unattraktiver würde. Die Bedingungen für die Durchführung müssen möglichst flexibel sein. Das betrifft sowohl die Zeit als auch die benötigten Materialien. Im Vergleich zu anderen Immundiagnoseverfahren für Schistosomiasis, wie dem ELISA oder dem Westernblot, ist der Line-Blot deutlich flexibler. In den Versuchen, welche die Inkubationszeiten betreffen wird dies deutlich. Auch bei den eingesetzten Materialien ist ein relativ großer Spielraum vorhanden.

Unter der Voraussetzung, dass Stammlösungen vorhanden sind, ist destilliertes oder voll entsalztes Wasser nicht zwingend notwendig. Dass auch mit überall erhältlichem Tafelwasser gearbeitet werden kann, zeigt der Versuch auf Seite 59. Sogar mit ganz normalem Flusswasser werden akzeptable Ergebnisse erhalten. Ebenfalls die Verwendung ganz normalen Speisesalzes wirkte sich nicht störend auf die Ergebnisse aus. Selbstverständlich sind dies nur Notlösungen. Sie verdeutlichen aber sehr gut die relative Unempfindlichkeit des Line-Blot, wie sie in dieser Ausprägung bei keinem anderen Immundiagnoseverfahren zu finden ist.

Ein weiterer Punkt ist die Haltbarkeit der präparierten Teststreifen. Eine mögliche Lagerungszeit von acht Tagen bei Raumtemperatur ermöglicht ein Anlegen eines Vorrates von Streifen direkt am Zielort. In Zwischenlagern, die über eine Stromversorgung verfügen, können vorpräparierte Streifen im Kühlschrank, bzw. bei -20°C , sogar bis zu vier Wochen gelagert werden. Das Vorhandensein einer Stromversorgung ist, im Gegensatz zum Westernblot, bei dem die Antigene durch einen Stromfluss auf die Nitrozellulose aufgebracht werden, beim Line-Blot nicht zwingend notwendig. Das Schütteln während der Inkubationsschritte kann notfalls auch rein mechanisch durchgeführt werden. Auch dies gibt dem Line-Blot ein bei Immundiagnosen ungewöhntes Maß an Unabhängigkeit von moderner Technik. Durch die Einfachheit in der Anwendung sind auch die Voraussetzungen für das durchzuführende Personal deutlich besser. Eine schnelle Einarbeitung und Beherrschung des Verfahrens ist somit möglich.

Sehr vereinfachend wird sich die Verwendung von auf Filterpapier gesammeltem und anschließend rückeluiertem Blut auf das Diagnoseverfahren auswirken. Dass dies an sich möglich ist, zeigte ein Versuch mit dem Blut von Mäusen. Allerdings muss dies noch beim Menschen getestet werden. Ein kritischer Punkt ist die Durchführung der Diagnose bei sehr hohen Umgebungstemperaturen, wie sie in manchen Gebieten, die unter der Schistosomiasis leiden, anzutreffen sind. Bei 37°C ist der Line-Blot noch durchführbar, allerdings bereits mit geringen Verlusten bei der Signalqualität (siehe S. 61). Liegen die Temperaturen darüber, was in einigen Gegenden durchaus normal ist, kann die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens beeinträchtigt werden. Daher sollte die Durchführung in solchen Gebieten in kühleren Räumen oder aber zu kühleren Tageszeiten, z.B. morgens oder abends, stattfinden.

5.7. Nutzen und Grenzen des Line-Blots im Vergleich mit anderen diagnostischen Verfahren

Der Nachweis von Antikörpern im Serum infizierter Patienten ist nur eine indirekte Nachweismethode. Es kann mit Sicherheit lediglich festgestellt werden, dass das Immunsystem des Patienten Kontakt mit Antigenen des Parasiten hatte. Der Zeitpunkt dieses Kontaktes wird nicht festgestellt, d.h. eine Aussage über eine bereits ausgeheilte oder noch aktive Infektion ist bei unauffälliger Klinik allein mit z.Z. etablierten Methoden nicht möglich. Ebenso ist der Erfolg einer medikamentösen Therapie, im Gegensatz zum relativ schnellen Sinken der Eizahl bzw. der Konzentration der zirkulierenden Antigene, nicht sofort zu erkennen. Durch eine Differenzierung der verschiedenen Antikörperklassen und -subklassen ist dies theoretisch zwar in gewissem Umfang möglich, allerdings mit entsprechender Steigerung des Kostenaufwandes. Ein weiteres Problem stellt der durch das Persistieren spezifischer Antikörper bedingte scheinbare Mangel an Spezifität dar. Mit diesem Problem ist aber jede Diagnosemethode konfrontiert, die auf dem Nachweis von Antikörpern beruht.

5.7.1 Vorteile des Line-Blot-Verfahrens

Der Antikörpernachweis zur Diagnosefindung bei Schistosomainfektionen überzeugt im Vergleich zu den parasitologischen Verfahren in erster Linie durch die deutlich höhere Sensitivität. Des weiteren kann bei einer nur einmaligen Blutprobe im Gegensatz zu mehreren Stuhl- oder Urinproben, die an verschiedenen Tagen gewonnen werden müssen, von einer höheren Patientencompliance ausgegangen werden. Bei den Gebieten, in denen diagnostische Verfahren zum Nachweis der Schistosomiasis am dringendsten benötigt werden, handelt es sich meist um Regionen der Dritten Welt mit mangelnder Infrastruktur und schwacher Wirtschaft, wo bereits ein Tag Arbeitsausfall zu Diagnosezwecken schwer realisierbar ist. Um so schwieriger wird es, die Patienten ein zweites oder auch drittes Mal einzubestellen. Das zweite wichtige Argument für den Einsatz des Line-Blot als diagnostischem Nachweisverfahren sind die relativ geringen anfallenden Kosten.

Jedes der diskutierten Nachweisverfahren - die Bestimmung der Eizahl, das Messen zirkulierender Antigene und der Line-Blot - hat Vor- und Nachteile. Es existiert kein Verfahren, das allen Erfordernissen einer perfekten Diagnose gerecht werden kann. Welches Verfahren wo eingesetzt werden soll, muss von Fall zu Fall entschieden werden.

Ein denkbarer Kompromiss beim Versuch der Elimination der Krankheit in ganzen Landstrichen wäre der Einsatz von Line-Blot zusammen mit dem Nachweis zirkulierender Antigene. Personen, die in beiden Tests negativ sind, könnten mit hoher Sicherheit als nicht-infiziert eingestuft werden. Auf diese Weise könnten bei großflächiger Anwendung von Praziquantel erhebliche Mengen an Medikamenten gespart werden. Die Verabreichung von Praziquantel an nicht-infizierte Personen kann aus medizinischer Sicht ohne weiteres gerechtfertigt werden, denn die Nebenwirkungen sind erwiesenermaßen niedrig. Diese Strategie würde vor allem in Regionen erfolgreich sein, wo die Schistosomiasis eine niedrige Prävalenz aufweist. Allerdings wird sie auch nur dann eingesetzt werden können, wenn den betroffenen Staaten die notwendigen finanziellen Mittel zur Verfügung stehen.

6. Literatur

AGNEW, A., FULFORD, A.J.C., DE JONGE, N., KRIJGER, F.W., RODRIQUEZCHACON, M., GUTSMANN, V. & DEELDER, A.M. (1995). The relationship between worm burden and levels of circulating antigen (CAA) of 5 species of *Schistosoma* in mice. *Parasitology* **111**, 67-76.

BARETTO, M. L.; FRANCA SILVA, J. T., MOTT, K. E. & LEHMAN, J. S. (1978). Stability of faecal egg excretion in *Schistosoma mansoni* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**, 181-187.

BERGQUIST, N.R., (1990). Immundiagnosis of Schistosomiasis. In: Immundiagnostic Approaches in Schistosomiasis (ed. BERGQUIST, N.R.). John Wiley & Sons, Chichester, 2-8

BERGQUIST, N.R., (1995). Controlling Schistosomiasis by Vaccination: A Realistic Option? *Parasitology Today* **5**, 191-194

BOCTOR, F.N., STEK, M.J., PETER, J.B. & KAMAL, R. (1987). Simplification and standardisation of dot-ELISA for human schistosomiasis mansoni. *Journal of Parasitology* **73** 589-592.

BUTTERWORTH, A.E., BENSTED-SMITH, R., CAPRON, A., CAPRON, M., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., GRZYCH, J.M., KARIUKU, H.C., KHALIFE, J., KOECH, D., MUGAMBI, M., OUMA, J.H., SIONGOK, T.K. and STURROCK, R.F. (1987). Immunity in human Schistosomiasis mansoni: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology* **94**, 281-300

DEELDER, A.M., KLAPPE, H.T.M., VAN DEN AARDWEG, G.J.M.J. & VAN MEERBEKE, E.H.E.M. (1976). *Schistosoma mansoni*: demonstration of two circulating antigens in hamsters. *Experimental Parasitology* **40**, 189-197.

DEELDER, A.M., DE JONGE, N., BOERMAN, O.C., FILLIE, Y.E., HILBERATH, J.P., GERRITSE, M.J. & SCHUT, D.W.O. (1989). Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **40**, 268-272.

DE JONGE, N., GRYSEELS, B., HILBERATH, G.W., POLDERMAN, A. M. & DEELDER, A. M. (1988). Detection of circulating anodic antigen by ELISA for seroepidemiology of Schistosomiasis mansoni. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **82**, 591-594.

DE VLAS, S. J., GRYSEELS, B. (1992) Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitology Today* **8**, 274-277.

DOENHOFF, M. J. (1998c). Is schistosomicidal chemotherapy sub-curative? Implications for drug resistance. *Parasitology Today* **14**, 105-109.

- DUNNE, D.W., BAIN, J., LILLYWHITE, J. & DOENHOFF, M.J. (1984). The stage-, strain- and species-specificity of a *Schistosoma mansoni* egg antigen fraction with serodiagnostic potential. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **78**, 460-470.
- EBRAHIM, A., EL MORSHEDY, H., OMER, E., EL DALY, S. & BARAKAT, R. (1997). Evaluation of the Kato-Katz thick smear and formol ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **57**, 706-708
- ENGELS, D., SINZINKAYO, E., DE VLAS, S.J. & GRYSEELS, B. (1997). Intraspecimen fecal egg count variation in *Schistosoma mansoni* infection. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene* **57**, 571-577.
- ENGVALL, E. & PERLMANN, P. (1971). ELISA: quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871-874.
- FELDMEIERS, H. (1993). Diagnosis. In: Human Schistosomiasis (ed. JORDAN, P., WEBBE, G. & STURROCK, R.F.) *CAB International*. 87-137.
- FENWICK, A. (1987). The role of molluscicides in schistosomiasis control. *Parasitology Today* **3**, 70-73
- GRYSEELS, B., NKULIKYINKA, L. & ENGELS, D. (1991). Repeated community-based chemotherapy for the control of *Schistosoma mansoni*: effect to screening and selective treatment on prevalences and intensities of infection. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene* **45**, 509
- KATZ, N., CHAVES, A. & PELLEGRINO, J. (1972). A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo* **14**, 397-400.
- KATO, K. & MIURA, N. (1954). Comparative examinations. *Japanese Journal of Parasitology* **3**, 35-37.
- KLINKERT, M.Q., RUPPEL, A. & BECK, E. (1987). Cloning of diagnostic 31/32 kDa antigens of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **25**, 247-255.
- KLINKERT, M.-Q., BOMMERT, K., MOSER, D., FELLEISEN, R., LINK, G., DOUMBO, O. & BECK, E. (1991). Immunological analysis of cloned schistosomiasis mansoni antigens Sm31 and Sm32 with sera of schistosomiasis patients. *Tropical and Medical Parasitology* **42**, 319-324.
- LIPPS, G., Füllkrug, R. and BECK, E. (1996). Cathepsin B of *Schistosoma mansoni*: purification and activation of the recombinant proenzyme secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*
- LUNDE, M.N., OTTESEN, E.A. & CHEEVER, A.W. (1979). Serological differences between acute and chronic Schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **28**, 87-91.
- MOSER, D., DOUMBO, O. & KLINKERT, M.-Q. (1991). The humoral response to heat shock protein 70 in human and murine schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunology*

MOSER, D., DOENHOFF, M.J. & KLINKERT, M.Q. (1992). A stage-specific calcium-binding protein expressed in eggs of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **51**, 229-238.

OKABE, K. & TANAKA, T. (1961). Urine precipitation reaction for Schistosomiasis japonica. *Kurume Medical Journal* **8**, 24-29.

RINNERT, T. (1996). Immundiagnose der Bilharziose mit rekombinanten Antigenen: Optimierung der Nachweisempfindlichkeit im Line-Blot. Diplomarbeit, Universität Gießen
SANE, B. (2001). Entwicklung einer einfachen, empfindlichen und schnellen Methode zur Immundiagnose der Bilharziose. Inauguraldissertation, Universität Gießen

ROTH, B. (1993). Rekombinante Darstellung des Calcium-bindenden Proteins SmE16 von *Schistosoma mansoni* in nativer Konformation und Untersuchung seiner Eignung für die Immundiagnose der Schistosomiasis. Diplomarbeit, Universität Gießen.

SATTI, M.Z., LIND, P., VENNERVALD, B.J., SULAIMAN, S.M., DAFFALLA, A.A. & GHALIB, H.W. (1996a). Specific immunoglobulin in measurements related to exposure and resistance to *Schistosoma mansoni* infection in Sudanese canal cleaners. *Clinical and Experimental Immunology* **106**, 45-54.

THOMAS, H. (1981). Bilharziose, eine Seuche und ihre Bekämpfung. *Spektrum der Wissenschaft* **6**, 26-36

VALLI, L.C.P., Kanamura, H.Y., DA SILVA, R.M., SILVA, M.I.P.G., VELLOSA, S.A.G. & GARCIA, E.T. (1997). Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of and serologic distinction between acute and chronic *Schistosoma mansoni* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **57**, 358-362.

VAN ETTEN, L., KREMSNER, KRIJGER, F.W. & DEELDER, A.M. (1997a). Day-to-day variation of egg output and schistosome circulating antigens in urine of *Schistosoma haematobium*-infected school children from Gabon and follow-up after chemotherapy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **57**, 337-341.

VAN ETTEN, L., VAN LIESHOUT, L., MANSOUR, M.M. & DEELDER, A.M. (1997b). A reagent strip antigen capture assay for the assessment of cure of schistosomiasis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **91**, 154-155.

VAN LIESHOUT, L., PANDAY, U. G., DE JONGE, N., KRIJGER, F.W., OOSTBURG, B. F. J., POLDERMAN, A.M. & DEELDER, A.M. (1995a). Immundiagnosis of Schistosomiasis mansoni in a low endemic area in Surinam by determination of the circulating antigens CAA and CCA. *Acta Tropica* **59**, 19-29.

VAN'T WOUT, A.B., DE JONGE, N., WOOD, S.M., VAN LIESHOUT, L., MITCHELL, G.F. & DEELDER, A.M. (1995). Serum levels of circulating anodic antigen and circulating cathodic antigen detected in mice infected with *Schistosoma japonicum* or *S.mansoni*. *Parasitology Research* **81**, 434-437.

WHO (1996). The control of Schistosomiasis. Report of a WHO expert committee. Fact sheet no 115.

YE, X:P., DONNELLY, C.A., Anderson, R.M., FU, Y.L. & AGNEW, A.M. (1998). The distribution of *Schistosoma japonicum* eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **92**, 181-185.

Lebenslauf

Stefanie Petereit M3 – 0518 – 4/00

02.02.1975 geboren in Neustrelitz

1981 Einschulung Hans - Beimler –Oberschule Neustrelitz

1983 Umschulung Wladimir – Komarow – Oberschule
Neustrelitz mit erweitertem Russischunterricht

1991 – 93 Abitur Gymnasium Carolinum Neustrelitz

07/93 Eintritt in die Bundeswehr, Grundausbildung in
Hildesheim
Fahnenjunker- und Offizierlehrgang in München

04/94 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Justus –
Liebig – Universität Gießen

04/99-05/00 Praktisches Jahr in Wetzlar und Gießen

seit 23.05.00 AiP im Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Ewald Beck für die Vergabe dieser Doktorarbeit und seine engagierte Betreuung und für seine Hilfe bei der Lösung aufgetretener Probleme.

Des weiteren danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme in das Team und all die wertvollen Tipps und Ratschläge. Insbesondere möchte ich Thorsten Rinnert danken, ohne dessen persönliches Engagement diese Arbeit so nicht hätte entstehen können.

Ich danke Marco Konzer für die doch ziemlich zeitaufwendige Hilfe beim Bearbeiten der Bilder und seine Geduld mit dem Super-DAU.

Herrn Kurt Nebgen möchte ich ganz besonders danken. Unvergessen sind die ungezählten Stunden „Steuerung hoch, Steuerung runter.“ Was hätte ich ohne Sie getan?

Und meine Eltern – ohne Euch wäre ich nie soweit gekommen. Eure jederzeit vorhandene Unterstützung war sehr wichtig für mich und hat mich immer wieder in meiner Tätigkeit bestärkt.