

Gegenstromelektrophorese – ein schnelles und einfaches immunologisches Nachweisverfahren

Counterimmunoelectrophoresis – a rapid and practical immunological method

J. U. Wieding, G. Claus, J. Behnke, G. Eisinger
Haematologie, Universitätskliniken Göttingen

Zusammenfassung:

Verschiedene Faktoren und Inhibitoren der Blutgerinnung sowie weitere Plasmaproteine wurden mit der Gegenstromelektrophorese (CIE) nachgewiesen. Dazu mußten bei Verwendung handelsüblicher Antiseren und vorgefertigter Gelträger die Verdünnungen von Antigen- oder Antikörper-Lösungen, Laufzeiten und Gelelektroendosmose variiert werden.

Insgesamt bewährte sich die Gegenstromelektrophorese als einfach handzuhabende, rasch durchführbare sowie preisgünstige Methode zum immunologischen Nachweis sowohl von Antigenen als auch Antikörpern; der wesentliche Vorteil der CIE gegenüber anderen immunologischen Techniken besteht in der universellen Einsatzmöglichkeit und in der schnellen Ergebnis-Verfügbarkeit. Daher bietet sie sich gerade in der Schnell-Diagnostik von Einzelproben sowohl bei klinischen als auch wissenschaftlichen Fragestellungen an, wenn eine semiquantitative Aussage genügt.

Schlüsselwörter:

Gegenstromelektrophorese – Plasmaprotein-Elektrophorese – Serodiagnostik

Summary:

Several factors and inhibitors of the blood coagulation system were detected by counterimmunoelectrophoresis (CIE). For this purpose the dilutions of antigen or antibody, running time and gel electroendosmosis had to be varied when using commercially available antisera and ready-to-use CIE gels. Altogether the counterimmunoelectrophoresis has proved to be a quick, easy to handle and economical method in detection of both antigens and antibodies. Compared with other immunological techniques the main advantages of CIE are the broad field of possible applications and the fast availability of results. The CIE is especially suited for rapid immunologic analysis of individual samples in both clinical and scientific tasks, if semiquantitative results are considered to be sufficient.

Keywords:

Counterimmunoelectrophoresis – Plasma protein electrophoresis – Serodiagnostics

Einleitung

Immunologische Methoden zeichnen sich gegenüber anderen Möglichkeiten der Protein-Diagnostik durch ihre Spezifität und vergleichsweise hohe Empfindlichkeit aus. Sowohl Antigene (AG) als auch Antikörper (AK) lassen sich je nach Methode mit unterschiedlichem Aufwand und unterschiedlicher Empfindlichkeit nachweisen, wobei die Methoden mit direkter (z. T. visueller) Auswertung des Immun-Präzipitates meist weniger empfindlich, dafür aber besser praktikabel sind, wie z. B. die Gegenstromelektrophorese (1). Viele immunologische Nachweismethoden sind sehr zeit-, arbeits- oder kostenaufwendig und kommen deshalb erst bei größeren Analysenserien zur Anwendung.

Wir beschäftigten uns daher mit der Gegenstromelektrophorese als einer vielseitig anwendbaren, rasch und ein-

fach durchzuführenden Methode zum immunologischen Nachweis gerade bei einzelnen Proben der Routine-Labor Diagnostik oder bei wissenschaftlichen Fragestellungen.

Prinzip der Gegenstrom-Elektrophorese: In einem Agarose-Gel wandern beim Anlegen eines elektrischen Feldes die meisten Plasmaproteine zur Anode, die Immunglobuline jedoch beim pH-Wert 8,4 aufgrund der Elektroendosmose des Agarose-Gels zur Kathode (2–6); dadurch kommt es zum Überwandern der Antigene (AG) und Antikörper (AK) unter Bildung von Immunpräzipitaten, deren Ausfällungen im Gel als weißliche Banden sichtbar werden (7–9). Synonyme sind „Überwanderungselektrophorese“ oder „CountercrossimmunoElectrophoresis“, abgekürzt „CIE“.

Material

Probenmaterial: Lösungen mit nachzuweisendem (a) Antigen oder (b) Antikörper, Serum oder Plasma u.a. Lösungen.

Antigenstandard: Eine Lösung mit dem Antigen bekannter Konzentration (a) zur Standardisierung und (b) zur Reaktion mit dem nachzuweisenden Antikörper.

Antikörperlösung: Handelsübliche Antiseren (Fa. Behringwerke AG, Marburg, und Fa. Immuno GmbH, Heidelberg) mit üblicher Spezifität und Antikörpertiter sind meist ausreichend für den Antigennachweis.

Gelträger-Gerätesystem (Fa. Immuno GmbH, Heidelberg/Wien):

- Netzteil (Strom-/Spannungsversorgung): Elektrophoresesystem „Radiophor®“: konstanter Strom (90 mA), Spannung geregelt (maximal etwa 60 Volt), Feldstärke s. u.
- Fertig-Gelträger für die Überwanderungselektrophorese: Kit-Zusammenstellungen aus Einweg-Agarose-Gelträgern, Einweg-Pufferkammern und Pufferlösung (Diäthylbarbiturat-Acetat, pH 8,2, 0,35 M Ionenstärke).

Die im Agarosegel ausgestanzten Löcher zum Auftragen der Proben (Durchmesser 4 mm) fassen 10 µl Lösung, der (Rand-Rand-)Abstand zwischen anoden- und kathodenseitigem Loch beträgt 4 mm, die Feldstärke bei Verwendung der genannten Spannungsquelle etwa 11 V/cm. Von den angebotenen Elektroendosmose-Qualitäten HE (= hoch), ME (= mittel) und LE (= niedrig) sollten bei unbekanntem AG-/AK-Proben (in der Reihenfolge) mit ME-, LE-, evtl. noch HE-Gelen Versuche durchgeführt werden.

Die Laufzeiten bis zur Immunpräzipitation liegen je nach Gel-Elektroendosmose und Antigen zwischen 25 und 50 min; bei unbekanntem AG-AK-Präzipitationen kann ein Lauf ab 25 min nach jeweils 5 min zur Beurteilung kurz unterbrochen werden. In wenigen Fällen waren Präzipitate besser auszuwerten, wenn entweder Antigen- oder Antikörper 5–15 min vorgewandert waren, bevor dann die korrespondierende AK- oder AG-Lösung aufgetragen wurde.

Methodik

In Vorversuchen sollte in einer 1:2 NaCl-Verdünnungsreihe von Antigen- und Antikörper-Lösung das geeignete AG-AK-Verhältnis für einen guten Präzipitationsbereich ermittelt werden (Vermeidung von Antigen-Überschuß; Heidelberger-Kurve).

Um entstandene Präzipitate gut semiquantitativ auswerten zu können, sind Probe und Standard möglichst mit 2 verschiedenen geeigneten Verdünnungen einzusetzen. Bei Einzelproben in der Routinediagnostik, z. B. beim Nachweis des Faktors VIII assoziierten Antigens, hat sich die Applikation entsprechend dem in Abb. 1 dargestellten Verdünnungsschema bewährt.

Beim (a) Antigen-Nachweis werden die zu untersuchenden Proben (-Verdünnungen) in die kathodenseitigen Löcher des Agarose-Gels (mit geeigneter Elektroendosmose) aufgetragen, anodenseitig die korrespondierende Antikörperlösung; zum Nachweis von (b) Antikörpern wird die Probenverdünnung dementsprechend an der Anode aufgetragen. Für die geringen Volumina von 10 µl haben sich Dispenser mit Glaskapillaren bewährt.

Mit dem Anlegen der elektrischen Spannung an die Elektroden-Pufferlösung erfolgt die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld mit Bildung von Immunpräzipitaten, welche als weißliche Banden zwischen den Auftragsstellen sichtbar ausfallen.

Die Betrachtung der Gele erfolgt im Schräglicht gegen schwarzen Hintergrund, evtl. mit Lupe; schwach sichtbare Präzipitate können gegebenenfalls durch Essigsäure-Fällung deutlicher gemacht werden (Überschichtung des Gels für 1 min mit 1%iger Essigsäure).

Die Ergebnis-Dokumentation ist neben der Titerangabe auch durch kurzzeitige Konservierung der Gele in der feuchten Kammer oder fotografisch möglich.

Zur semiquantitativen Auswertung dienen die Präzipitate einer gleichzeitig eingesetzten Standardlösung. Eine vergleichende Abschätzung der Präzipitastärke ermöglicht die semiquantitative Konzentrationsangabe in Titerstufen. Die Aussagekraft der visuellen Bewertung ist besonders gut, wenn ein Gelträger sowohl die Probe als auch die mitgeführte Standardlösung in jeweils zwei verschiedenen Verdünnungen Immunpräzipitationen ausbilden.

Ergebnisse

Die Anwendbarkeit der Gegenstromelektrophorese zum Nachweis von Plasmaproteinen überwiegend des Blutgerinnungssystems wurde untersucht.

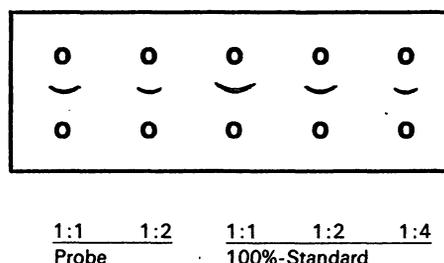
Es gelang der Nachweis vieler verschiedener Antigene und Antikörper, wobei sich die Methode mit geringem Aufwand an die jeweilige Fragestellung anpassen ließ: Für eine gut sichtbare Präzipitation waren nur die Verdünnungen der aufgetragenen Lösungen, Gel-Elektroendosmose sowie die Laufzeit anzupassen. ME- und LE-Gele haben sich für fast alle Fragestellungen bewährt; bei ME-Gelen sind schärfere Banden, bei LE-Gelen eventuell ge-

Abb. 1: Verdünnung/Auftragung von Probe und Standard für semiquantitative Auswertungen. Präzipitatemuster bei einer Probe mit halber Antigenkonzentration des Standards; die genannte Verdünnung von Probe und einem Standard mit einer Antigenkonzentration von 100% der Norm ermöglicht die Auswertbarkeit in Titerstufen von 25 bis 200%

(+)Anode

(-)Kathode

Verdünnung von



Antikörper

Antigen

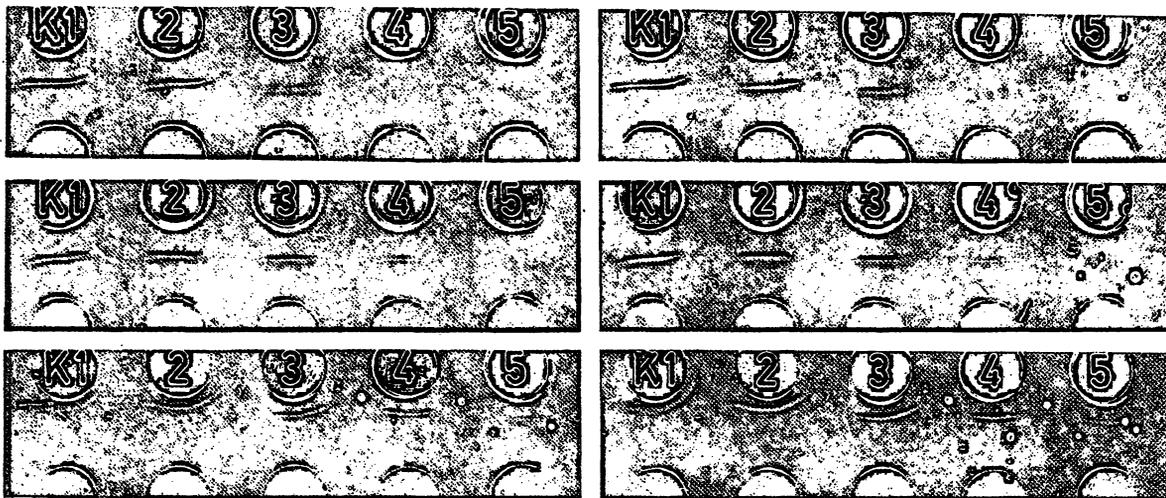


Abb. 2: Vergleich von Gelen mit verschiedener Elektroendosmose bei verschiedenen Laufzeiten: von oben nach unten HE-, ME-, LE-Gel (= hohe, mittlere und niedrige Elektroendosmose); links 25 min, rechts 35 min Laufzeit; Nachweis eines Proteinstandards in einer 1:2-NaCl-Verdünnungsreihe (K1 bis 5)

ringförmig höhere Sensitivitäten zu erwarten (Abb. 2). Bei höherer Elektroendosmose (ME- und insbesondere HE-Gele) treten geringfügige kürzere Analysenzeiten und eine Verschiebung der Präzipitate kathodenwärts auf.

Die Tab. 1 führt die insbesondere im Rahmen der Gerinnungsdiagnostik nachgewiesenen Plasmaproteine auf; genannt sind die erarbeiteten CIE-Bedingungen für eine gute Präzipitatbildung (Gel-Elektroendosmose, Verdünnungen, Laufzeiten sowie Besonderheiten).

Unter Verwendung des angegebenen Testsystems waren die Ergebnisse einfach, ohne Vorbereitung und großen Analysenaufwand gut zu reproduzieren, die Durchführung und Auswertung erfordert nur kurze Einarbeitung. Dabei tragen zur Reproduzierbarkeit u.a. ein standardisierter Lochabstand, gleichmäßige Gel-Dicke und -Zusammensetzung bei, während unterschiedliche Lagerung bei ungünstiger Temperatur, evtl. durch Dehydratation, diese verschlechtern.

Tab. 1: Bedingungen für den CIE-Nachweis verschiedener Proteine im Plasma

Antigen	Gel*	Laufzeit (min)	Sensitivität Proben-Verdünnung	Besonderheiten
Fibrinogen	LE	30-40	1:128	3 Banden
Pro-Thrombin	ME	20-30	1:128	ggf. Antiserum-Vorverdünnung kaum Präzipitate (Schlieren)
Faktor VII				
Faktor VIII	LE	30-40	1:16	
Faktor IX	LE	30-30	1:8	
Faktor X	ME	20-30	1:32	3-4 Banden
Faktor XIII A	LE	30-40	1:8	
Faktor XIII S	LE	40-50	1:16	
Plasminogen	LE	30-40	1:32	4 Banden
Fibronectin	LE	30-40	1:64	Proben-Vorverdünnung 1:4
Antithrombin III	ME	20-30	1:128	Proben-Vorverdünnung 1:4, Bandeninstabilität auf LE, Doppelbanden
Protein C	ME	20-30	1:16	
Protein S	ME	20-30	1:4	
α_1 -Antitrypsin	ME	20-25	1:256	Proben-Vorverdünnung 1:4 Bandeninstabilität auf LE
α_2 -Makroglobulin	ME	20-25	1:128	Bandeninstabilität
α_2 -Antiplasmin	LE	35-40	1:128	Bandeninstabilität auf ME
C ₁ -Inaktivator	ME	20-25	1:64	15 min Antikörpervorlauf
FSP-X, -Y, -D, -E:	Fibrin(ogen)-Spaltprodukt-Differenzierung mittels Antiseren gegen Fibrin(ogen), FSP-D und -E, unterschiedliche Wanderungsstrecke auf dem Gel (24)			

In ähnlicher Weise nachzuweisen:

Apolipoprotein-A1, -A2, -B, -C, -D, -E
Komplement-Faktor C₁ (C_{1q}, C_{1r}, C_{1s}), C₂ (C_{2c}, C_{2d})
Antigene im Rahmen von Infektionskrankheiten: HBsAg etc.
Antikörper: Anti-Streptokinase, Anti-HBs-Ag, Anti-Tetanus-Toxin etc.

* Bemerkungen:

LE-, ME-, HE-Gel = Agarose-Gele mit niedriger, mittlerer, hoher Elektroendosmose; ggf. bei LE-Gelen vor AG-Auftrag den AK bis zu 15 min im elektrischen Feld wandern lassen

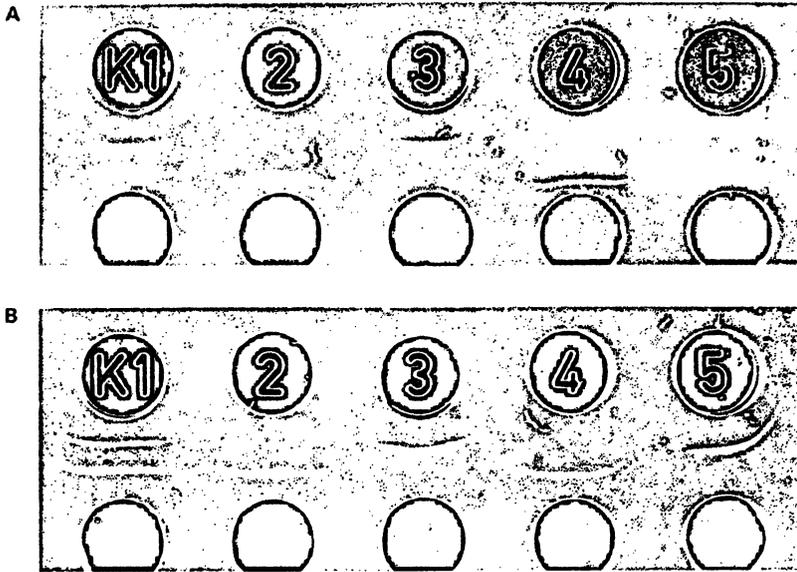


Abb. 3: Fibrin(ogen)-Spaltprodukt-Auftrennung: Bandenmuster 30 min (A) und 100 min (B) nach Streptokinase (SK) induzierter Fibrinolyse in einer Plasmaprobe. Die Anodenlöcher sind markiert (K1 bis 5). Es finden sich Präzipitatbande(n) der Probe (SK-Lysat) mit Antiseren gegen Fibrinogen (K1), FDP-D (K2) und gegen FDP-E (K3) sowie Präzipitatbande mit Anti-FDP-D nach vorangegangener Präzipitation von FDP-E-Antigen (K4) und entsprechend (K5) die Präzipitatbande mit Anti-FDP-E nach vorangegangener Entfernung der Moleküle mit FDP-D-Antigen aus der Probe mittels Immunpräzipitation (Immunpräzipitationen mit Kaninchen-Antiseren der Behringwerke AG).

Interpretation: Nach 30 min Fibrinolyse (A) zeigt sich mit Anti-Fibrinogen eine Doppelbande (K1), deren kathodennaher Anteil mit Anti-FDP-D isoliert dargestellt wird (K2); während diese Bande zum größten Teil aus FDP-D besteht (K2 im Vergleich zu K4), enthält die anodennahe Bande nur geringe Mengen von FDP-E (K5 mit vorangegangener Entfernung der FDP-D-Antigene im Vergleich zu K3). Nach 100 min Lysezeit (B) zeigt das Präzipitationsmuster fast nur noch FDP-D und FDP-E: Die Präzipitate K2 und K4 bzw. K3 und K5 sind kongruent nach Entfernung der Moleküle mit FDP-E-(K4) bzw. FDP-D-Antigenen (K5)

Die semiquantitative Analyse hat eine gute Aussagekraft, wenn auf einem Gel sowohl die Probe als auch eine mitgeführte Standardlösung in jeweils zwei verschiedenen Verdünnungen visuell gut bewertbare Immunpräzipitationen ausbilden. Die dazu erforderliche Bewertung der Präzipitatstärke (von Probe und Standard im Vergleich) erfordert nur geringe Erfahrung.

Das in Abb.1 dargestellte Verdünnungs- und Applikationsschema bewährte sich für zuverlässige, semiquantitative Titerangaben, z.B. in der Routinediagnostik des Faktors VIII assoz. Antigens und FXIIIS-Nachweises.

Bei einigen Antigenen traten reproduzierbare Doppel- bis Mehrfachbanden auf, zum Teil auch in Abhängigkeit vom verwendeten Antiserum.

Mehrfachbanden sind ein Hinweis für Moleküle mit unterschiedlichem Molekulargewicht und unterschiedlicher Ladung aber gleichen antigenen Determinanten; daneben können sie auch durch mangelnde Spezifität der Antiseren bedingt sein (mono-/polyspezifische Antiseren).

Durch Antigenverwandtschaft aller Fibrin(ogen)-Spaltprodukte entstehen zum Beispiel mit einem Antikörper gegen Fibrinogen Doppel- bis Mehrfachbanden. Mit Antiseren gegen die Determinanten FSP-D bzw. -E ließen sich FSP-E bzw. -D spezifisch durch Ausschlußreaktion (= indirekt) nachweisen. Eine weitere Möglichkeit war die Präzipitation von FSP-D oder FSP-E mit entsprechendem Antiserum vor dem Auftragen, weil die Immunkomplexe in der CIE nicht mehr wanderten (10): Fibrinogen- und Fibrinlysate wiesen ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Spaltprodukte auf; bei Patienten mit therapeutischer Fibrinolyse und bei in vitro-Versuchen waren zu Beginn kurzzeitig FSP-X und FSP-Y flüchtig nachweisbar, dann sicher zunächst FSP-D und erst deutlich später FSP-E (Abb.3).

Schlieren im Gel direkt um die Auftragsstelle traten unspezifisch bei manchen Plasmen oder (Anti-)Serum auf,

anscheinend abhängig von der (Lipid-)Zusammensetzung der Probe.

Diskussion

Im Vergleich zu anderen Möglichkeiten des Proteinnachweises in der Labordiagnostik oder bei wissenschaftlichen Fragestellungen zeichnen sich immunologische Methoden durch gute – dem Enzymnachweis vergleichbare – Spezifität und Sensitivität aus.

Gegenüber bewährten immunologischen Techniken wie Latex-Agglutinationstest (LAT), Radiale-Immun-Diffusion (RID), Nephelometrie, Radio-Immuno-Assay (RIA) und Enzym-Immuno-Assay (EIA) oder Hämagglutinationstest sind für die Gegenstromelektrophorese (= Überwanderungselektrophorese, CIE) folgende Vorteile zu nennen (vgl. 11 – 15):

- einfache Handhabung und rasche Durchführung
- schnelle Ergebnis-Verfügbarkeit, kurze Analysenzeit
- geringer apparativer Aufwand
- gute Sensitivität (bis ca. 1 µg Antigen/ml)
- hohe (immunologische) Spezifität
- kleines Probenvolumen (10 µl/Ansatz).

Bezüglich Durchführung, Aufwand und Aussagewert ist die CIE vergleichbar der RID. Die Vorteile der CIE hinsichtlich Analysendauer und -Empfindlichkeit sind bedingt durch die direkte Überwanderung von Antigen und Antikörper im elektrischen Feld gegenüber der radialen Diffusion bei der RID; diese liefert zwar quantitativ besser auswertbare Ergebnisse, jedoch mit geringerer Empfindlichkeit (bis Faktor 10 hinsichtlich der Nachweisgrenze); außerdem benötigt die CIE nach dem Probenauftrag eine Analysenzeit von nur ca. 20–40 min, während bei der RID ein Ergebnis erst nach 24–48 Std. vorliegt. Aufgrund der langen Analysendauer sind die RID, aber auch EIA und RIA (Ergebnisse erst nach etwa 3–6 Std.) für die Akutdiagnostik weniger geeignet.

Die Nephelometrie liefert relativ rasch Ergebnisse, die zudem in der Quantifizierung noch wesentlich sensitiver und exakter als bei der CIE ausfallen; nachteilig ist jedoch der hohe apparative Aufwand sowie die Wirtschaftlichkeit dieser Methode erst bei größeren Analysenserien.

Für Einzelproben in der Routine-/Akut-Diagnostik bietet sich der Latex-Agglutinationstest an (ca. 5 min Analysenzeit), der zum Nachweis von Fibrinolyseprodukten, Rheumafaktoren, Antistreptolysin und anderen Antigenen Verwendung findet; die Verfügbarkeit der je nach Fragestellung mit spezifischen Antikörpern beschichteten Latexpartikeln schränkt jedoch den universellen Einsatz dieser Methode ein.

Demgegenüber gelingt mit der Gegenstromelektrophorese der Nachweis vieler verschiedener Antigene und Antikörper auf gleichen Agarosegelen, denn die CIE läßt sich mit geringem Aufwand an unterschiedliche Fragestellung anpassen (Verdünnungen der aufgetragenen Lösungen, Gel-Elektroendosmose, Laufzeit): mit dem zur Probe korrespondierenden Antikörper/Antigen gelingt ein Nachweis, wenn sichtbar präzipitierende Immunkomplexe entstehen, meist bei Antigenkonzentrationen über ca. 1 µg/ml.

Die CIE ist hinsichtlich der Empfindlichkeit der RID eindeutig überlegen, wohl auch dem LAT, wobei die apparativ und auch sonst sehr aufwendigen Methoden wie Nephelometrie, RIA und EIA noch empfindlichere und vor allem besser quantifizierende Ergebnisse liefern. Für die Akutdiagnostik von einzelnen Proben jedoch, bei denen der semiquantitative Antigennachweis ausreicht, bietet sich die Gegenstromelektrophorese an. Die Anwendungsgebiete sind vielfältig und liegen neben der medizinischen Diagnostik (1) in wissenschaftlichen Fragestellungen dort, wo ein rascher Nachweis von Antigenen oder Antikörpern erforderlich ist und einerseits ein semiquantitatives Ergebnis ausreicht, andererseits es nicht lohnt, großen Aufwand in eine Methodenerarbeitung zu investieren.

Die gute Praktikabilität der hier benutzten Gelträger und hervorragende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch bei nur gelegentlicher Anwendung der Methode erhöht einerseits die Anwendungsmöglichkeit und zum anderen die Aussagekraft. Unter Verwendung des angegebenen Testsystems waren die Ergebnisse einfach, ohne großen Analysenaufwand und auch durch Ungeübte fehlerfrei zu erzielen.

In der *Gerinnungsdiagnostik* lassen sich ergänzend zu den üblichen, funktionellen Tests nahezu alle Faktoren der plasmatischen Blutgerinnung und Fibrinolyse, deren Inhibitoren sowie die Akutphasen-Proteine, immunolo-

gisch nachweisen (16). Fast alle Plasmaproteine der Blutgerinnung und Fibrinolyse ließen sich gegenstrom-elektrophoretisch nachweisen (Tab.1); für die Schwierigkeiten beim Nachweis des Faktors VII wird als Ursache u. a. die Variabilität der Molekülladung diskutiert, anstelle eindeutiger Präzipitatbanden waren nur Schlieren nachzuweisen.

Bei Störungen der globalen Blutgerinnung lassen sich z.T. relativ einfach und schnell zusätzliche diagnostische Hinweise gewinnen; z. B. wurde bei Diskrepanz zwischen normalem Fibrinogenspiegel in der Hitze fällung (nach Schulz) und fehlendem Fibrinogen im funktionellen Nachweis (nach Clauss) eine mangelnde Aktivierbarkeit des Fibrinogens durch eigenes oder in vitro zugefügtes Thrombin gezeigt.

Der Nachweis des Faktor VIII assoziierten Antigens (FVIII R: Ag) in der v. Willebrandt-Diagnostik ist mehrfach beschrieben (13, 17); die CIE stellt dabei eine gut praktikable Alternative zur aufwendigen Rocket-Immunelektrophorese (nach Laurell) dar.

Auch der gegenstromelektrophoretische Nachweis von Protein S, dem Cofaktor von Protein C, ist möglich. Während Protein C inzwischen auch funktionell nachgewiesen wird, ist der Nachweis von Protein S bislang nur immunologisch möglich, die semiquantitativen Ergebnisse (in Titerstufen) schränken jedoch die Aussagekraft des Protein S-Nachweises in der CIE ein.

Die Faktor XIII-Aktivität wird mit den üblichen Gerinnungstests nicht erfaßt und daher anhand der Löslichkeit eines definierten Fibrinogeninnsels in Monochlor-Essigsäure semiquantitativ in Titerstufen bestimmt (funktioneller Schnelltest). Der erarbeitete Nachweis von FXIIIS in der Gegenstromelektrophorese ist ähnlich einfach durchführbar, liefert ebenfalls semiquantitative, aber geringfügig sensitivere Ergebnisse und erlaubt ferner durch verschiedene verfügbare Antiseren Faktor XIII-A und -S zu differenzieren (18).

In der *Immunologie (Bakteriologie/Serologie)* lassen sich Antikörper gegen Bakterien, Viren, Pilze und Toxine nachweisen (15, 19–21); IgG-Antikörper nach einer Impfung gegen das Tetanus-Toxin (22), Pneumokokken-Antikörper sowie die Antistreptokinase-Aktivität, die vor einer Fibrinolysetherapie zu überprüfen ist, sind nur wenige Beispiele (23, 24). Bei Verdacht auf eine frische Hepatitis B-Inoculation kann der Nachweis von HB_s-Antigen in der vermeintlich infektiösen Probe oder der Nachweis von vorhandenen HB_s-Antikörpern unter Umständen schon rasche Hilfe zur Klärung der dringlichen Frage liefern, ob eine sofortige passive Immunisierung mit Hypermimmunglobulin ratsam ist (11, 14, 25).

Tab. 2: Gegenüberstellung immunologischer Routinemethoden

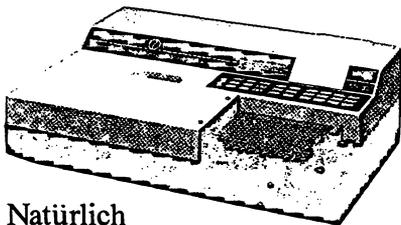
	Analysergebnis		Aufwand/Kosten*			
	Empfindlichkeit*	Verfügbarkeit	Arbeitsaufwand	Geräteaufwand	pro Analyse in einer	
					Einzel-A.	Serien-A.
Gegenstromelektrophorese (CIE)	1 µg/ml	0,5 Std.	+	+	++	++
Radiale Immundiffusion (RID)	10 µg/ml	36 Std.	+	–	++	++
Latex-Agglutinationstest (LAT)	100 ng/ml	0,1 Std.	–	–	++	++
Nephelometrie	500 ng/ml	0,5 Std.	++	+++	+++	+
Enzym-Immuno-Assay (EIA)	0,05 ng/ml	3 Std.	+++	+++	+++	+
Radio-Immuno-Assay (RIA)	0,05 ng/ml	6 Std.	++++	++++	++++	+

* Bemerkung: Analyseempfindlichkeit, nur Anhaltswert (grob geschätzt, stark abhängig von Antikörper und Antigen); Analysenaufwand geschätzt für Einzelanalyse bzw. für Serie von 10 Proben

Der 5-Sekunden-Reader

TITERTEK
MULTISKAN®
PLUS MK II

1
2
3
4
5
fertig!



Natürlich
mit Auswertung

Informationen:

Flow Laboratories GmbH
Mühlgrabenstraße 10
D-5309 Meckenheim

Tel. (0 22 25) 8 80 50
Telex 8 869 334 aflo d
Fax (0 22 25) 88 05 81



MESSES



Flow
Laboratories

In der jederzeit raschen Ergebnisverfügbarkeit von einzelnen Proben liegt hier der Vorteil der CIE; die quantitativ sensitiveren und exakteren Ergebnisse aus Radio-/Enzym-ImmunoAssay benötigen wesentlich längere Zeit und sind erst bei größeren Analysenserien wirtschaftlich.

Jedoch schränken Sensitivität und nur semiquantitative Ergebnisse bei einigen Anwendungen die Aussagekraft der CIE ein. Zum Beispiel wurde auch der gegenstrom-elektrophoretische Nachweis von Antikörpern im Rahmen von HIV-Infektionen untersucht (26). Bei Patienten mit AIDS oder generalisiertem Lymphadenopathie-Syndrom waren Antikörper mit der ELISA-Technik bei 81% der Proben nachzuweisen und mit der CIE nur in 59% (bei Mehrfachanalyse der gleichen Probe in 68%) der Proben. Die Leptospirose läßt sich dagegen sehr gut mit der CIE nachweisen (27).

Weitere Anwendungen, Einsatz im wissenschaftlichen Bereich:

Zur funktionellen Antithrombin III-Heparin-Bindung gelangen Versuche in einem Agarose-Gel mit Heparin durch Beeinflussung der Wanderungsgeschwindigkeit bis zur Immunpräzipitation mit dem ATIII-Antikörper.

Ebenfalls von wissenschaftlichem Interesse ist die erprobte Differenzierung der Fibrin(ogen)-Spaltprodukte (= FSP, = nach Stadium der Fibrinolyse FSP-X, -Y, -D, -E) (10, 12, 28).

Durch Antigen-Verwandtschaft von Fibrin(ogen) mit seinen der Spaltprodukte entstehen mit einem Antikörper gegen Fibrinogen Doppel- und Mehrfachbanden; eine Differenzierung ist mit Antiseren gegen spezifische Determinanten z. B. FSP-D und -E sowie durch das Verteilungsmuster der Präzipitatbanden möglich (10).

Ein ähnliches Problem stellt die Differenzierung der C3-Spaltprodukte dar: Gleiche antigene Determinanten des Ausgangsmoleküls und der Spaltprodukte führen zu Kreuzreaktionen mit den Antiseren; in der CIE entstehen Doppel- und Mehrfachbanden durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Molekülgröße und Ladung der C3-/FSP-Spaltprodukte. Eigene Ergebnisse der C3-Aktivierung mit aggregiertem IgG und Immunkomplexen entsprechen der Literatur (29), haben aber keine Bedeutung für klinische Fragestellungen.

Auch bei anderen, untereinander ähnlichen Methoden ist eine einfache immunologische Differenzierung mittels der CIE beschrieben (30, 31). Apolipoproteine-A1, -A2, -B, -C (und -D) sowie -E lassen sich mit den entsprechenden Antiseren, vergleichbar den Faktoren der Blutgerinnung gut nachweisen. Durch Modifikation der Gel-Zusammensetzung lassen sich selbst niedrige Konzentrationen von schlecht präzipitierenden kleinen Molekülen nachweisen; PEG-Zusatz zur Verstärkung der Präzipitation erlaubt z. B. sogar den Myoglobin-Nachweis (32).

Viele vergleichbare Anwendungen der CIE sind veröffentlicht, weitere denkbar; möglich ist der Nachweis von Antigenen oder Antikörpern, wenn präzipitierende Immunkomplexe in ausreichender Menge und damit sichtbare Präzipitate entstehen. Ein geeignetes AG-AK-Verhältnis ist durch Verdünnung oder auch Anreicherung (der AG- oder AK-Lösungen) zu erzielen, ggf. auch durch eine AK-Ammoniumsulfat-Fällung (10).

Folgende Weiterentwicklungen der Gegenstromelektrophorese sind denkbar:

- Steigerung der Sensitivität: Antigen-/Antikörper-Anreicherung (10) insbesondere aber Präzipitat-Anfärbung (33) oder -Fällung, z. B. durch PEG-Zusatz (32) sind denkbare Möglichkeiten.
- Bessere Quantifizierung: eine genauere Bestimmung der Konzentration ist zum Beispiel durch geräteoptische Präzipitatauswertung versucht worden, ist aber aufgrund des großen technischen Aufwandes wenig praktikabel.
- Molekülabhängige Auftrennung: die Lage der Präzipitatbanden ist u.a. abhängig von Molekulargewicht und -Ladung; dies könnte (evtl. durch Gele mit Siebeffekt) genutzt werden bei der Auftrennung von ähnlichen Molekülen (30, 31) oder von Bruchstücken mit gleichen antigenen Determinanten (5) wie bei den Fibrin(ogen)- oder C3-Spaltprodukten.

- HICKS, E. J., HUGHES, B. J.: Comparative Sensitivities of Radioimmunoassay, Crossover Electrophoresis, and Agar Gel Immunodiffusion for HBAg Detection. *Am. J. Clin. Pathol.* 65, 540-546 (1976).
- GUNASEKARAN, M., SAMBANDAM, T.: Rapid diagnostic methods for aspergillosis. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* A261, 523-528 (1986).
- SCHWICK, H. G., TROBISCH, H., HEIMBURGER, M.: Leistungsfähigkeit und Grenzen immunologischer Methoden in der Gerinnungsdiagnostik. *Internist* 14, 160-165 (1973).
- BUDDE, U., BECKER, P., KAISER, A.: Bestimmung des Faktor VIII-assoziierten Antigens mittels Überwanderungselektrophorese im Vergleich zur Elektroimmunodiffusion nach Laurell. *Arztl. Lab.* 26, 70-73 (1980).
- WIEDING, J. U., CLAUS, G., VEHMEYER, K., SCHUFF-WERNER, P., KÖSTERING, H.: Bestimmung des Faktors XIII in der Gegenstromelektrophorese: Beschreibung des Tests und erste Ergebnisse im Vergleich zur funktionellen Methode. In: KÖSTERING, H. (ed.), *Onkologie und Blutgerinnung*, S. 111-118. Schattauer Verlag, Stuttgart (1983).
- JAMES, J. F., SULLIVAN, P. S., ROBERTS, D. R.: Counter electrophoresis and detection of viruses. *Lancet* i, 99-100 (1975).
- NAIMAN, H. L., ALBRITTON, W. L.: Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of acute infection. *J. Infect. Dis.* 142, 524-531 (1980).
- SMITH, J. M. B.: Counterimmunoelectrophoresis and opportunistic fungal infections. *Mycopathologica (Den Haag)* 60, 99-104 (1977).
- HOLZNER, A.: Immunstatus nach Tetanus-Impfung: Möglichkeiten und Indikation der quantitativen Schnellbestimmung von Tetanus-Antikörpern im menschlichen Serum. *Fortschr. Med.* 13, 680-683 (1978).
- AUEL, H., MARTIN, M.: Die Technik des quantitativen Streptokinasenachweises im Plasma. *Klin. Wschr.* 53, 809-814 (1975).
- GERLACH, D., KOEHLER, W.: Untersuchungen zur Heterogenität von Streptokinasen. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* A244, 222-228 (1979).
- GOCKE, D. J., HOWE, C.: Rapid detection of Australia antigen by counterimmunoelectrophoresis. *J. Immunol.* 104, 1031-1032 (1970).
- BLASER, M. J., COHN, D. L., CODY, H. J., PENLEY, K. A., JUDSON, F. N., SAXINGER, W. C., WEISS, S. H.: Counterimmunoelectrophoresis for detection of human serum antibody to HTLV-III. *J. Immunol. Methods* 91, 181-186 (1986).
- MYERS, D. M.: Serodiagnosis of human leptospirosis by counterimmunoelectrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 25, 897-899 (1987).
- BRODY, J. I.: Detection of fibrinogen-fibrin degradation products by counter-electrophoresis. *J. Clin. Path.* 25, 754-756 (1972).
- ARROYAVE, C. M., TAYLOR, D. G., GALLUP, P., NAKAMURA, R. M.: Screening test for complement activation by counterimmunoelectrophoresis. *Am. J. Clin. Path.* 69, 440-445 (1978).
- GIROLAMI, A., BAREGGI, G., FIORETTI, D.: Different cross-over electrophoretic mobility of factor X Friuli and coumarin-induced abnormal factor X. *Haemostasis* 1, 229-236 (1973).
- LEWIS, J. H., WILSON, J. H., BRANDON, J. M.: Counter-electrophoresis test for molecules immunologically similar to fibrinogen. *Am. J. Clin. Path.* 58, 400-404 (1972).
- HIRAMORI, K., SUMIYOSHI, T.: Rapid, sensitive detection of myoglobinemia by improved counterimmunoelectrophoresis in cases of acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 2, 187-190 (1978).
- CROWLE, A. J., CLINE, L. J.: An improved stain for immunodiffusion Tests. *J. Immunol. Meth.* 17, 379-381 (1977).

Schrifttum:

- ESTELA, L. A., HEINRICHS, T. F.: Evaluation of the counterimmunoelectrophoretic (CIE) procedure in a clinical laboratory setting. *Am. J. Clin. Path.* 70, 239-243 (1978).
- BUSSARD, A., PERRIN, D.: Elektrophoresis in agar plates. *J. Lab. Clin. Med.* 46, 689-701 (1955).
- JOHANSSON, B. G.: Agarose Gel Electrophoresis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, Suppl. 124, 7-19 (1972).
- OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Prog. Allergy* 6, 20-154 (1962).
- GRUBB, A.: Analysis of the Immunochemical Relationship between Antigens by Electrophoresis in Agarose Gels Containing Antibodies. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, Suppl. 124, 59-65 (1972).
- LAURELL, C.-B.: Electroimmuno Assay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, Suppl. 124, 21-37 (1972).
- BUSSARD, A.: Description d'une technique combinat simultanément l'électrophorese et la précipitation immunologique dans un gel: l'électrosynthese. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 34, 258-260 (1959).
- GANROT, P. O.: Crossed Immunoelectrophoresis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, Suppl. 124, 39-47 (1972).
- LANG, N., HAAN, J.: Nachweis präzipitierender Antikörper und nichtpräzipitierender Antikörper durch die Überwanderungs-Elektrophorese. *Int. Arch. Allergy* 10, 305-316 (1957).
- BEHNKE, J.: Methodik zur Differenzierung von Fibrin(ogen)-Spaltprodukten mit der Gegenstromelektrophorese und deren Anwendung. *Med. Dissertation*, Göttingen 1985.
- ALTER, H. J., HOLLAND, P. V., PURCELL, R. H.: Counter-electrophoresis for detection of hepatitis-associated antigen: Methodology and comparison with gel diffusion and complement fixation. *J. Lab. Clin. Med.* 77, 1000-1010 (1971).
- FERGUSON, A. C., KENNEDY, H., ANK, B. J., STURGEON, P., STIEHM, E. R.: Detection of fibrinogen degradation products. A comparison of counterimmunoelectrophoresis and two hemagglutination inhibition methods. *Am. J. Clin. Path.* 62, 861-868 (1974).
- GIROLAMI, A., STICCHI, A., BARBUI, T., BAREGGI, G.: Factor VIII immunological assay. An evaluation of several methods using whole plasma. *Blut* 29, 309-316 (1974).

Anschriften der Verfasser:

Dr. Jörk Ulrich Wieding
 Gunther Claus
 Dr. Julianne Behnke
 Gundel Eisinger
 Haematologie
 Universitätsklinik
 3400 Göttingen

Magic® Lite LIA

Lichtblicke im Labor

Schilddrüse

- Magnetische Trennung
- Nicht-Isotopischer Marker
- Stabiles Luminogen (9 Mon./4°C)
- Meßzeit etwa 1 Sekunde
- Komplettes offenes System - keine Bindung an nur einen Hersteller

CIBA-CORNING

Ciba Corning Diagnostics GmbH
 Industriestraße 11, 6301 Fernwald 2
 Telefon 0641/40 03-0