

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 10 (1988) 183 - 189

Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien  
(Vorstand: Prof. Dr. G. Wiedermann) (1)  
Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Wien  
(Vorstand: Prof. DDR. M. Peterlik) (2)

## Immunantwort gegen *Entamoeba histolytica*: Bestimmung der IgG-Subklassen

H. Kollaritsch<sup>1</sup>, Cornelia Stock<sup>1</sup>, O. Scheiner<sup>2</sup>, G. Wiedermann<sup>1</sup>

### Einleitung

Der Nachweis von Antikörpern bei invasiven Infektionen mit pathogenen Stämmen von *Entamoeba histolytica* hat einen unbestreitbar hohen Stellenwert bei der Diagnostik dieser parasitären Infektionen. Neben den klassischen Standard-Methoden der Serologie, wie indirekte Haemagglutination und indirektem Immunfluoreszenztest, sind es vor allem ELISA-Techniken, die den Antikörpernachweis mit hoher Sensitivität und Spezifität ermöglichen (1). Mit ELISA-Techniken lassen sich spezifische Anti-Amöben-Antikörper der Klassen IgG, IgA und IgM bei Patienten mit extraintestinaler Amöbiasis in Form von Amöbenleberabszessen (ALA) oder bei intestinal invasiver Amöbiasis (IIA) nachweisen (6). Besonders der Nachweis von IgG-Antikörpern läßt sichere diagnostische Schlüsse zu.

Es ist aber bekannt, daß innerhalb der IgG-Klasse Subklassen (IgG 1 - 4; [7]) existieren und daß gerade bei parasitären Infektionen die Immunantwort innerhalb dieser Subklassen eigenen Gesetzen folgt.

Es war Ziel dieser Untersuchung, die verschiedenen IgG-Subklassen bei Patienten mit invasiver Amöbiasis zu bestimmen, um so eventuell prognostische Aussagen im individuellen Einzelfall zu erhalten oder um einen näheren Einblick in sogenannte „Escape-Phänomene“ von *Entamoeba histolytica* gegenüber dem menschlichen Immunsystem zu erfassen.

### Material und Methoden

Amöben und Antigenpräparation:

Die Kultivierung von Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* sowie die Präparationen von Antigenen der Membranfraktion und der zytoplasmatischen Fraktion aus derartigen Kulturamöben des Stammes SFL 3 wurde bereits von STOCK et al. (6) im Detail berichtet.

ELISA-Technik:

Die für die Bestimmung der Immunglobulin-Subklassen verwendete ELISA-Technik wurde bereits im Detail beschrieben (6). In Kürze seien nochmals die wichtigsten

Schritte geschildert: Mit Methanol-Azeton (9 : 1) vorbehandelte Mikrotiterplatten (Dynatech M 129 A) wurden nach 24-stündiger Trocknungszeit mit einer Membranfraktion des Stammes SFL 3 beschichtet (5 µg/ml; Beschichtungspuffer: Bikarbonatpuffer pH 9,6). In einigen der Versuche wurde auch eine Zytoplasmakrafraction des Stammes SFL 3 als Antigen verwendet, wobei die Beschichtung in identischer Weise erfolgte, allerdings mit einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml. Nach Absättigung der Platten mit 1%igem Humanalbumin in 0,5%igem TWEEN-PBS pH 7,0 für 14 Stunden bei 4° C wurden die Platten dreimal mit TWEEN-PBS gewaschen und waren danach gebrauchsfertig. Die zu testenden Serumproben wurden in log<sub>2</sub>-Stufen, beginnend mit einer Vorverdünnung von 1 : 200 in TWEEN-PBS + 0,5% Humanalbumin aufgebracht und über Nacht bei 4° C inkubiert. Danach dreimaliges Waschen mit TWEEN-PBS und Beschichtung der Platten mit monoklonalen antihumanen IgG-Subklassen-Antikörpern von der Maus (monoklonale Antikörper aus Mäuseascites: Anti-IgG 1: BAM 09, Anti IgG 2: BAM 10, Anti-IgG 3: BAM 08 und Anti-IgG 4: BAM 11; alle monoklonalen Antikörper von der Firma Nordic). Die Gebrauchsverdünnung der Anti-IgG-Subklassen-Antikörper wurde mittels einer Schachbretttitration vorher ermittelt. Die Inkubation erfolgte wiederum während der Nacht bei 4° C. Danach erneut dreimaliges Waschen mit TWEEN-PBS und Applikation eines Fc-spezifischen Antimaus-Immunglobulins, Peroxidase konjugiert (von der Ziege; Jackson Immuno Research, VA; USA). Anschließend Inkubation bei 37° C für 2 Stunden und abschließend Waschen mit TWEEN-PBS. Danach Substratzugabe (Orthophenylendiamin + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Phosphatzitratpuffer pH 5,0) und Inkubation in der Dunkelheit für 30 Minuten. Danach wurde die Reaktion mit 3 molarer Schwefelsäure abgestoppt und die Extinktion bei 492 nm mit einem automatischen ELISA-Lesegerät (Dynatech MR 580) abgelesen.

#### Titer-Bestimmung:

Bei jedem Test wurde ein Positiv-Standard (Serumpool von 5 Patienten mit gesichertem Amöbenleberabszeß) und ein Negativ-Standard (Serumpool von 5 gesunden österreichischen Kindern unter 5 Jahren ohne Auslandsaufenthalt) mitgeführt. Die Berechnung des Titers erfolgte nach der Formel:

$$\frac{MW_{1-3}(\text{pos. Standard}) + MW_{9-11}(\text{neg. Standard})}{2} = E_{50\%}$$

$$(\text{Units}) = 2^{\text{Titer } E_{50\%}} \times \text{Ausgangsverdünnung}$$

Sera: Siehe Tabelle 1.

## Ergebnisse und Diskussion

Wie die in Tabelle 2 ausgewiesenen subklassenspezifischen Titer demonstrieren, finden sich bei Patienten vor allem Antikörper gegen membranassoziierte Antigene. Dies spiegelt sich auch innerhalb der einzelnen Subklassen wider. Während z. B. gegenüber der Zytoplasmakrafraction 94,3% der Seren keine signifikanten Antiamöben-IgG 1-Titer aufwiesen, waren es gegenüber der Membranfraktion nur 56,6%; im Falle der IgG 2-Immunantwort zeigten 41% der Sera einen signifikanten Titer gegenüber der Membranfraktion, hingegen nur rund 7% der Sera gegenüber der Zytoplasmakrafraction. Diese Reaktionen gelten in gleicher Weise für IgG 3 und IgG 4 (Abb. 1 und 2). Betrachtet man die mittleren Titer, wie sie in Tabelle 2 aufgelistet sind, so findet sich der höchste mittlere Titer in der IgG 4-Klasse, gefolgt von IgG 2, IgG 3 und IgG 1 bei Verwendung von Membranantigenen. Da bei Verwenden der Zytoplasmakra-

TABELLE 1  
**Testsera für die Immunglobulinbestimmung**

Anzahl	Herkunft* / Diagnose
47	Amöbenleberabszeßpatienten (extraintestinale Amöbiasis)
6	intestinal-invasive Amöbiasis
1	<u>vor</u> Immunisierung mit SFL-3-Membranantigen (1 Freiwilliger)
6	<u>nach</u> Immunisierung mit 1 mg SFL-3-Membranantigen in wöchentlichem Abstand (Serumprobe jeweils 1 Woche nach Immunisierung gewonnen) (1 Freiwilliger)

\*) Ein Teil der Sera wurde freundlicherweise von Prof. Mannweiler und Dr. Knobloch (Tropeninstitut Hamburg), Dr. Auer (Hygiene-Institut Wien) und Dr. Feldmeier (Tropeninstitut Berlin) zur Verfügung gestellt.

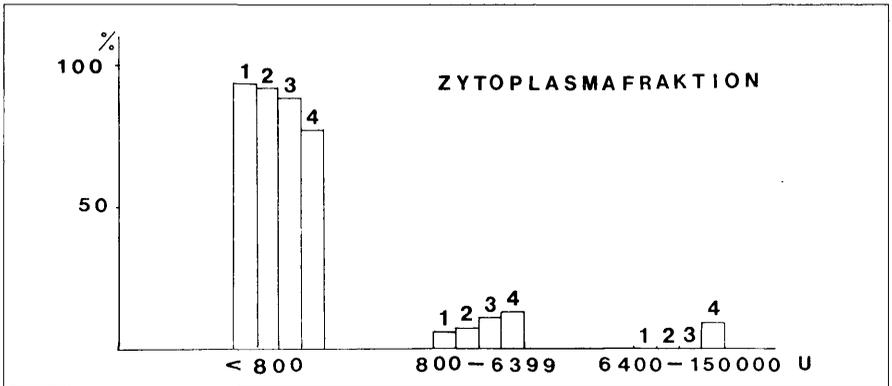


Abb. 1: Immunglobulinsubklassenspezifische Antwort gegen *Entamoeba histolytica* bei Patienten mit ALA oder IIA

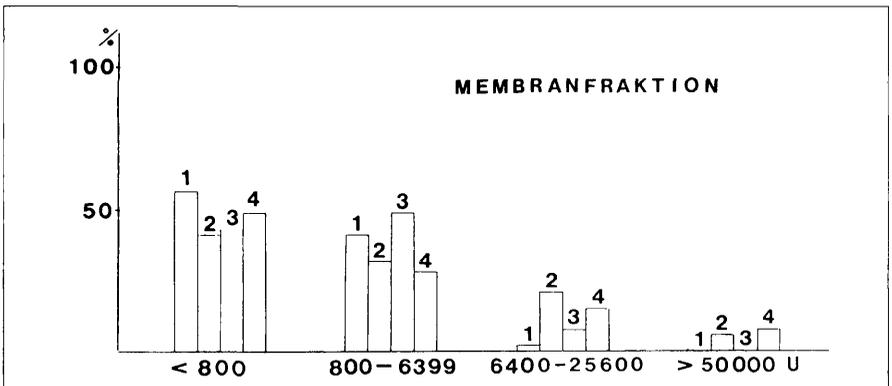


Abb. 2: Immunglobulinsubklassenspezifische Antwort gegen *Entamoeba histolytica* bei Patienten mit ALA oder IIA

TABELLE 2  
**Immunglobulinsubklassenspezifische Immunantwort gegen  
*Entamoeba histolytica* im ELISA**

a) Membranantigen				
	IgG-1	IgG-2	IgG-3	IgG-4
Median	740 U	1900 U	1000 U	90 U
$\bar{x}$	1148 U	7111 U	2491 U	9933 U
GMT	196 U (1090)*	619 U (2760)	439 U (1524)	243 U (3252)
b) Zytoplasmaantigen				
	IgG-1	IgG-2	IgG-3	IgG-4
Median	< 200 U	< 200 U	< 200 U	360 U
$\bar{x}$	197 U	334 U	298 U	10.836 U
GMT	4 U (796)*	5 U (443)	5 U (707)	14 U (1090)

\*) GMT-Werte aller positiver Titer

TABELLE 3  
**Relativer Beitrag der IgG-Subklassen**

	IgG-1	IgG-2	IgG-3	IgG-4
Membranantigen	15%	32,4%	21,1%	31,5%
Zytoplasmaantigen	12,5%	15,2%	25,5%	46,8%

fraktion ein sehr hoher Prozentsatz der Sera überhaupt keine signifikant positive Reaktion zeigte, ist hier eine Beurteilung sicherlich problematisch, jedoch läßt sich auch hier dieselbe Reihung vornehmen (Tab. 2). Besonders transparent wird diese Aussage dann, wenn man den relativen Beitrag der IgG-Subklassen am Gesamt-IgG-Titer prozentual vergleicht (Tab. 3). Hier zeigt sich, daß im Subklassen-ELISA mit Membranantigen Immunglobuline der Klassen IgG 2 und IgG 4 eine überdurchschnittlich hohen Anteil haben, noch krasser wird dieses Verhältnis, wenn man das Zytoplasma-Antigen im ELISA-Test verwendet. Im letztgenannten Fall macht IgG 4 nahezu die Hälfte der gesamten Immunantwort aus.

Da im Falle der invasiven Amöbiasis bisher keine Untersuchungen über Immunglobulin-Subklassen vorliegen, bedarf dieser extrem hohe IgG4-Anteil einer genaueren Interpretation. Es ist bekannt, daß IgG 4 im Serum der gesunden Normalperson nur etwa 2 - 6% der spezifischen IgG ausmacht (5). Auffällig war in unserem Patienten-

kollektiv, daß von den erwähnten 47 Patienten mit Amöbenleberabszeß bzw. 6 Patienten mit intestinal-invasiver Amöbiasis gerade jene extrem hohe IgG 4-Titer aufwiesen, bei denen es im Verlaufe der Beobachtung entweder zu einem Rezidiv gekommen war, oder bei denen durch eine insuffiziente Chemotherapie der Krankheitsverlauf wesentlich über das Normalmaß verlängert war. Bei einem Patienten, der insgesamt 2 Rezidive nach suffizienter Chemotherapie eines Amöbenleberabszesses entwickelte, fand sich bereits nach erfolgter erster Chemotherapie ein IgG 4-Titer von mehr als 25.000 U/l, die nach dem ersten bzw. zweiten Rezidiv abgenommenen Sera ergaben dann ein weiteres Ansteigen des IgG 4-Titers auf über 50.000 U/l (alle Werte bezogen auf Membranfraktion).

Nach den bisher vorliegenden spärlichen Literaturberichten über Immunglobulin-Subklassen-Antwort bei verschiedenen Infektionen (2) fällt auf, daß bei keiner anderen parasitären Infektion, insbesondere aber bei keiner anderen systemischen Protozoen-Infektion eine derart ausgeprägte IgG 4-Antwort stattfindet (4, 8).

Bei systemischen Wurminfektionen (Schistosomiasis; Filariasis) tritt zwar im Gefolge der Erkrankung ein erhöhter IgG 4-Antikörperspiegel auf, doch scheint hier ein Zusammenhang mit dem — ebenfalls meist deutlich erhöhten — Serum-IgG-Spiegel zu bestehen (2). Bei unserem Patientenkollektiv wurde in keinem einzigen Fall eine IgE-Erhöhung gefunden, es drängt sich der Schluß auf, daß hier die IgG 4-Erhöhung völlig unabhängig von einer IgE-medierten Immunantwort stattfindet.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse aus unserem kleinen Patientenkollektiv lassen über eine Bewertung dieser IgG 4-Antwort noch keine Schlüsse zu. Allgemein bestehen auch noch prinzipielle Auffassungsunterschiede, welche prognostischen Aussagen aus einer erhöhten IgG 4-Antwort ableitbar sind (2). Die Bedeutung reduzierter IgG 4-Spiegel, zumeist infolge eines hereditären Mangels, ist recht klar umrissen:

Rezidivierende oder chronische pyogene Infektionen (Otitis media, chronische Sinusitis, Pneumonien) sind bei solchen Patienten häufig (2), allerdings gibt es auch symptomlose IgG 4-Defizienzen. Auch bei Patienten mit Ataxia teleangiectasia finden sich entweder sehr niedrige oder völlig fehlende IgG 4-Spiegel (3). Extrem hohe IgG 4-Spiegel finden sich bei Atopikern mit allergischem Asthma und auch bei anaphylaktoiden Schockzuständen (2).

Es wird durch weiterführende Untersuchungen zu klären sein, ob durch IgG 4, das im Rahmen einer extraintestinalen Amöbiasis gebildet wird, ganz bestimmte amöbenassoziierte antigene Determinanten erkannt werden und ob diese Epitope dann näher charakterisierbar sind. Bei höherer Fallzahl wird auch die Möglichkeit gegeben sein, durch Vergleich des klinischen Bildes und des IgG 4-Spiegels einen Rückschluß auf die prognostische Bedeutung des letztgenannten durchzuführen.

## **Zusammenfassung**

Die Bestimmung der Immunglobulin-Subklassen (IgG 1, IgG 4) mittels einer ELISA-Technik bei Patienten mit extraintestinaler Amöbiasis wird beschrieben. Ziel der Untersuchung war es, quantitativ die einzelne IgG-Subklassenantwort zu bestimmen und einen Vergleich mit anderen systemischen Protozoeninfektionen anzustellen. Nach den Ergebnissen ist es evident, daß sich die höchsten mittleren Antikörpertiter in der IgG 4-Subklasse finden, gefolgt von IgG 2, IgG 3 und IgG 1. Betrachtet man den relativen Beitrag der einzelnen IgG-Subklassen zur gesamten Immunantwort, so entfallen rund 40% auf IgG 4-Antikörper. Dieses Ergebnis ist umso erstaunlicher, als

von anderen Protozoeninfektionen bekannt ist, daß dort IgG 4 nur in weitaus geringerem Ausmaß im Rahmen der Immunantwort gebildet wird. Eine sichere prognostische Aussage ist vorläufig aufgrund der kleinen Patientenzahl nicht möglich, doch war auffallend, daß besonders hohe IgG 4-Titer bei Patienten mit prolongiertem Krankheitsverlauf infolge insuffizienter Chemotherapie und bei Patienten mit Rezidiven eines Amöbenleberabszesses gefunden wurden.

## Schlüsselwörter

Extraintestinale Amöbiasis, Immunantwort, Immunglobulin-Subklassen, ELISA-Technik.

## Summary

### Immune response in patients with amebiasis: evaluation of IgG-subclasses

In order to evaluate the immune response with respect to IgG-subclasses (IgG 1, IgG 4) in patients with extraintestinal amebiasis an ELISA technique was established. It was the aim of this pilot-study to quantify the IgG-subclass response and to compare the resulting pattern with other systemic protozoal infections. Our results show evidence that IgG 4 contributes approx. 40% of the total immune response, followed by IgG 2, IgG 3 and IgG 1. Regarding the IgG 4 response in patients with *Plasmodium falciparum* malaria or Chagas disease, IgG 4 had only a minor role in these systemic protozoal infections.

Due to the small number of patients in this pilot-study we are not able to interpret the prognostic value of the high IgG 4 titers in our patients. However, in patients with prolonged extraintestinal amebiasis (due to insufficient chemotherapy) and in one patient who showed two relapses after successful chemotherapy extremely high IgG 4 titers were observed.

## Key words

Extraintestinal amebiasis, immune response, immunoglobulin subclasses, ELISA technique.

## Literatur

1. HEALY, R. (1986):  
Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis: Epidemiology in the United States  
*Rev. Inf. Dis.* 8, 239 - 246.
2. HEINER, D. C. (1984):  
Significance of immunoglobulin G subclasses  
*Am. J. Med.* 30<sup>th</sup> March 1984.
3. RIVAT-PERAN, L., BURIOT, D., SALIER, J. (1984):  
Immunglobulins in Ataxia teleangiectasia, evidence for IgG 4 and IgG 2 subclass deficiencies  
*Clin. Immunol. Immunopathol.* 10, 99 - 110.
4. SCOTT, M. T., GOSS-SAMPSON, M. (1984):  
Restricted IgG isotype profiles in *T. cruzi* infected mice and chagas disease patients.  
*Clin. Exp. Immunol.* 58, 372 - 379.

5. STEINBERG, A. G., MORELL, A., SKVYRIL, F. (1973):  
The effect of Gm (23) on the concentration of IgG 2 and IgG 4 in normal human serum.  
J. Immunol. 110, 1642 - 1645.
6. STOCK, C., AUER, H., PICHER, O., SCHEINER, O. (1986):  
Diagnose der Amöbiasis mit Hilfe klassenspezifischer Antikörper.  
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8, 23 - 32.
7. TERRY, W. D., FAHEY, J. L. (1964):  
Subclasses of human gamma-globulin based on differences in the heavy polypeptide chains.  
Science 146, 400 - 401.
8. WAHLGREN, M., BERZINS, K., PERLMANN, P., PERSSON, M. (1983):  
Characterization of the humoral immune response in plasmodium falciparum malaria. II. IgG sub-  
class levels of anti-P. falciparum antibodies in different sera.  
Clin. Exp. Immunol. 54, 135 - 142.

KORRESPONDENZADRESSE:

Univ. Ass. Dr. med. Herwig Kollaritsch  
Insitut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien  
Kinderspitalgasse 15  
A-1090 Wien  
Austria

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1988

Band/Volume: [10](#)

Autor(en)/Author(s): Kollaritsch Herwig, Stock Cornelia, Scheiner O., Wiedermann Gerhard

Artikel/Article: [Immunantwort gegen Entamoeba histolytica. Bestimmung der IgG-Subklassen. 183-189](#)