©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 5 (1983) 55—60

Aus der Abteilung für Medizinische Parasitologie (Leiter: Prof. Dr. H. Aspöck)
des Hygiene-Institutes der Universität Wien (Vorstand: Prof. Dr. H. Flamm)

Die Problematik des Nachweises spezifischer IgM-Antikörper bei Toxoplasma-Infektionen und Vorstellung eines neuen Tests: Solid-Phase Indirect Haemadsorption Assay (SPIHA)

Kurt Hermentin, Herbert Auer, Otto Picher und Horst Aspöck

Der Nachweis spezifischer Antikörper der Immunglobulinklasse M stellt ein wichtiges Hilfsmittel in der Diagnostik akuter Infektionskrankheiten dar. Im Bereich der Toxoplasmose-Serologie, speziell bei der Toxoplasmose-Diagnostik im Rahmen der Schwangerschaftsüberwachung, kann der Nachweis von entscheidender Bedeutung sein, wenn es bei einer seropositiven Schwangeren abzuklären gilt, ob es sich um eine alte und für die Frucht daher bedeutungslose Infektion handelt, oder ob eine akute Infektion vorliegt, die die Gefahr einer pränatalen Toxoplasmose birgt (ASPÖCK, 1982; FLAMM & ASPÖCK, 1981).

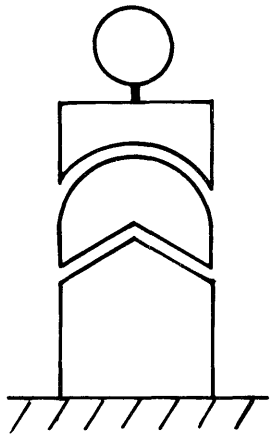
Derzeit werden spezifische IgM-Antikörper in der Toxoplasmose-Diagnostik üblicherweise mittels sogenannter "Indirekter Tests" (Abb. 1) wie Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) oder Indirekter Enzymimmuntest (ELISA) nachgewiesen. In den letzten Jahren stellte man jedoch fest, daß diese Art von Testsystem eine Reihe von Fehlermöglichkeiten beinhaltet. So kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen, wenn im Patientenserum neben spezifischen IgG auch gegen IgG gerichtete IgM-Autoantikörper wie IgM-Rheumafaktor, oder antinukleäre Antikörper vorhanden sind (ARAUJO et al., 1971; CAMARGO et al., 1972; HYDE et al., 1975).

In der Abbildung 2 ist das Modell eines solchen falsch positiven IIFT zum Nachweis spezifischer IgM-Antikörper bei Vorhandensein eines IgM-Rheumafaktors dargestellt: Obwohl im Patientenserum nur antigenspezifische IgG vorliegen, ist der IgM-Nachweis positiv. Der Grund dafür liegt im IgM-Rheumafaktor, der sich gegen die eigenen Immunglobuline richtet und sich somit an die antigenspezifischen IgG-Antikörper bindet, wodurch eine Fixierung des Autoantikörpers an die Festphase eintritt, da die IgG ja ihrerseits an das Antigen gebunden sind. Wird nun im IIFT als abschließender Testschritt ein Konjugat gegen humane IgM-Antikörper zugefügt, so reagiert der Test aufgrund des unspezifisch gebundenen IgM-Rheumafaktors positiv.

Andererseits können aber auch falsch negative Befunde erhoben werden, wenn im Patientenserum neben den spezifischen IgM auch spezifische IgG in hohen Titern vorhanden sind. Es kommt dann zu einem "Wettlauf" zwischen den IgM- und IgG-Antikörpern um die antigenen Bindungsstellen. Die hoch affinen IgG sind besser und schneller in der Lage, die Epitope zu besetzen, sodaß dadurch die Bindung der IgM-Antikörper an das Antigen kompetitiv gehemmt wird. Daraus resultieren negative oder geschwächt positive Ergebnisse (COHEN et al., 1967; FILICE et al., 1980).

Als Folge der aufgezeigten Fehlermöglichkeiten ergibt sich die Notwendigkeit, die IgM- und IgG-Fraktion des Serums zu trennen. Nun gibt es eine Reihe von sehr guten und

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

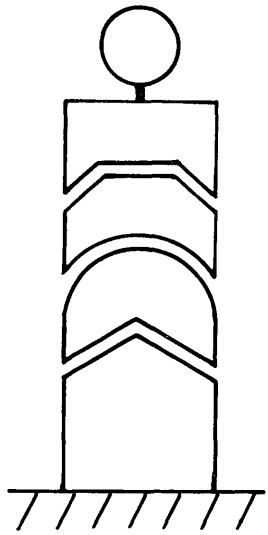


KONJUGAT
(Anti-Human-IgM)

PATIENTENSERUM
(mit spez. IgM)

ANTIGEN

Abb. 1. Indirekter Test (z. B. IIFT)



KONJUGAT
(Anti-Human-IgM)

IgM-RHEUMAFAKTOR
(Anti-Human-IgG)

PATIENTENSERUM
(mit spez. IgG)

ANTIGEN

Abb. 2. Falsch positiver IIFT

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

weniger guten Trennungsmethoden; die meisten sind jedoch in einem durchschnittlich ausgerüsteten Routinelabor nicht anwendbar: So erfordert etwa die Trennung mittels Ultrazentrifuge oder Chromatographie (sei es Gel-, Glas-, Affinitäts- oder Ionen-Austauschchromatographie) Geräte mit einem sehr hohen Anschaffungspreis. Außerdem ist die Zahl der Seren, die pro Tag aufgetrennt werden können, begrenzt. Eine andere Methode, die Adsorbierung des IgG an das Protein A von Staphylococcus aureus, stellt nach neueren Untersuchungen einen ineffektiven Trennungsweg dar, da erstens nicht alle Unterklassen des IgG an das Protein gebunden werden und zweitens auch eine beträchtliche Adsorption von IgM (bis über 50%) auftritt (FILICE et al., 1980; GRANGEOT-KEROS et al., 1982).

In den letzten Jahren wurde nun eine Reihe von Tests entwickelt, bei welchen die IgM-Antikörper aus dem Serum ohne besonders aufwendige oder kostspielige Verfahren selektiert werden. Man bedient sich dabei Festphasen, die mit anti-humanen IgM-Antikörpern beschichtet sind und so die IgM-Antikörper aus dem Patientenserum selektiv zu binden vermögen. Ein recht bekannter Test dieses Typs ist der Double Sandwich ELISA (NAOT & REMINGTON, 1980).

Das Prinzip ist folgendes (Abb. 3): An Mikrotiterplatten werden tierische Anti-Human-IgM-Antikörper fixiert. Nach Überschichtung mit dem Patientenserum verbinden sich die IgM-Antikörper aus dem Serum mit den Anti-Human-IgM-Antikörpern; die IgG-Antikörper werden beim Waschvorgang abgeschwemmt. Wird nun Antigen zugegeben, so geht dieses eine Verbindung mit jenen IgM-Antikörpern ein, die für dieses Antigen spezifisch sind. Im nächsten Schritt wird dann mit einem tierischen, enzym-konjugierten Antikörper überschichtet, der gegen das Antigen gerichtet ist, oder man überschichtet — da in den meisten Fällen keine solch spezifischen Konjugate gegen die einzelnen Antigene zur Verfügung stehen — mit einem tierischen Serum gegen das Antigen und anschließend mit einem konjugierten Antikörper gegen dieses Serum. Durch Zugabe von Substrat wird dann auf bekannte Weise die Farbreaktion in Gang gesetzt und das Ergebnis sichtbar gemacht.

Dieser Test ist allerdings relativ zeitaufwendig und arbeitsintensiv. Wir bemühten uns daher, eine einfachere, leichter durchführbare Methode zu finden, um IgM-Antikörper spezifisch und sensitiv nachzuweisen. Diese Bemühungen führten zur Entwicklung eines indirekten Hämadsorptionstests (Solid-Phase Indirect Haemadsorption Assay (SPIHA)) zum Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen Toxoplasma gondii (HERMENTIN et al., 1983).

Der Anfangsschritt dieses Tests (Abb. 4) ist derselbe wie im Double Sandwich ELISA. Er beinhaltet die selektive Adsorption der IgM-Antikörper aus dem Serum an die Mikrotiterplatten, die mit Anti-Human-IgM-Antikörpern beschichtet sind. Im nächsten Schritt werden dann Erythrozyten zugesetzt, die mit Antigen von Toxoplasma gondii sensibilisiert sind. Wenn nun antigenspezifische IgM-Antikörper vorhanden und an die Anti-Human-IgM-Antikörper gebunden sind, kann sich das Antigen samt den Erythrozyten mit diesen Antikörpern verbinden — die Erythrozyten werden gleichmäßig über den gesamten Näpfchenboden hinweg festgehalten. Sind keine antigenspezifischen IgM-Antikörper vorhanden, so werden die Erythrozyten nicht an die Festphase gebunden und fallen durch die Schwerkraft ins Zentrum des Näpfchens zusammen.

Aufgrund der Anordnung der Testschritte im SPIHA können hier keine solchen falschpositiven Ergebnisse auftreten, wie sie gelegentlich im IgM-IIFT bei Vorhandensein von Autoantikörpern (z. B. IgM-Rheumafaktor) vorkommen. Auch eine "antibody competition" der IgG- und IgM-Antikörper um die antigenen Bindungsstellen ist im SPIHA

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

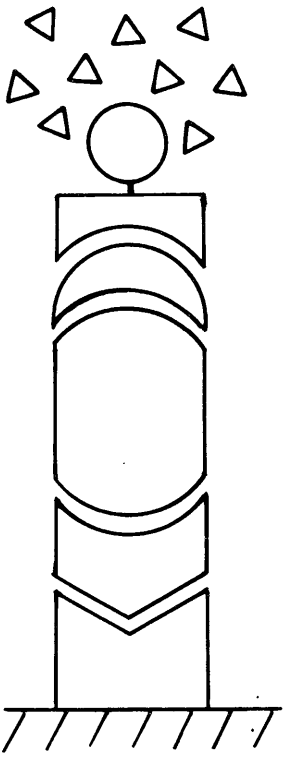


Abb. 3. Double Sandwich ELISA

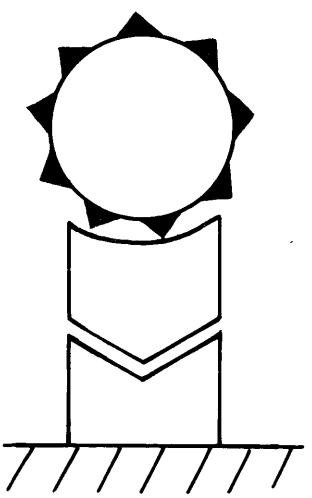


Abb. 4. SPIHA

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

wie auch im Double Sandwich ELISA nicht möglich. Im Gegensatz zum Double Sandwich ELISA , zu dessen Durchführung man 5—6 Arbeitsschritte benötigt, sind beim SPIHA jedoch nur 3 Schritte erforderlich.

Da der Solid-Phase Indirect Haemadsorption Assay sehr einfach durchzuführen und wenig arbeitsaufwendig ist, da ferner der SPIHA sich in Untersuchungen als sehr sensitiv und spezifisch erwies (HERMENTIN et al., 1983), erscheint dieser Test geeignet, im Routinelabor zum Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern gegen Toxoplasma gondii eingesetzt zu werden.

Zusammenfassung

Der Nachweis spezifischer IgM-Antikörper hat große Bedeutung in der Diagnostik akuter Toxoplasma-Infektionen. Bei den derzeit eingesetzten "Indirekten Tests" (z. B. Indirekter Immunfluoreszenztest) kann es jedoch durch Autoantikörper zu falsch positiven, und durch kompetitive Hemmung der IgG und IgM zu falsch negativen Ergebnissen kommen. Der hier dargestellte Solid-Phase Indirect Haemadsorption Assay (SPIHA) schließt diese Fehlermöglichkeiten aus. Da der SPIHA ferner einfach durchzuführen und wenig arbeitsaufwendig ist, stellt dieser Test eine für das Routinelabor geeignete Methode dar, um IgM-Antikörper gegen Toxoplasma gondii spezifisch und sensitiv nachzuweisen.

Summary

The detection of specific IgM antibodies is an important tool in the diagnosis of acute Toxoplasma infections. At present, the most common serological tests use anti-human IgM conjugates in "indirect assays" (e. g. fluorescent antibody test). Antibody competition and false-positive results due to autoantibodies are two major drawbacks of these assays. The Solid-Phase Indirect Haemadsorption Assay (SPIHA), described in this communication, does not succumb to those sources of errors. The test is simple to perform, both highly sensitive and specific, and thus providing an accurate measure of specific IgM antibodies to Toxoplasma gondii and an appropriate method for the routine laboratory.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Literatur

ARAUJO, F.G., E.V. BARNETT, L.O. GENTRY, and J.S. REMINGTON (1971): False-positive anti-Toxoplasma fluorescent-antibody tests in patients with antinuclear antibodies. Appl. Microbiol. 22: 270—275.

ASPÖCK, H. (1982): Toxoplasmose. Hoffmann-La Roche, Wien, 1982.

CAMARGO, M.E., P.G. LESER, and A. ROCCA (1972): Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-Toxoplasma fluorescent tests. A technique for specific results. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 14: 310—313.

COHEN, I.R., L.C. NORINS, and A.J. JULIAN (1967): Competition between, and effectiveness of, IgG and IgM antibodies in indirect fluorescent antibody and other tests. J. Immunol. 98: 143—149.

FILICE, G.A., A.S. YEAGER, and J.S. REMINGTON (1980): Diagnostic significance of immunoglobulin M antibodies to Toxoplasma gondii detected after separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G antibodies. J. Clin. Microbiol. 12: 336—342.

FLAMM, H. und H. ASPÖCK (1981): Die Toxoplasmose-Überwachung der Schwangerschaft in Österreich — Ergebnisse und Probleme. Päd. Grenzgeb. 20: 27—34.

GRANGEOT-KEROS, L., L. LEBRUN, M.J. BRIANTAIS, and J. PILLOT (1982): A critical study of the use of Staphylococci containing protein A for separation of IgG and IgM antibodies. J. Immunol. Methods 51: 183—195.

HERMENTIN, K., O. PICHER, H. ASPÖCK, H. AUER, and A. HASSL (1983): A solid-phase indirect haemadsorption assay (SPIHA) for detection of immunoglobulin M antibodies to Toxoplasma gondii: Application to diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A (im Druck).

HYDE, B., E.V. BARNETT, and J.S. REMINGTON (1975): Method for differentiation of nonspecific from specific Toxoplasma IgM fluorescent antibodies in patients with rheumatoid factor. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148: 1184—1188.

NAOT, Y. and J.S. REMINGTON (1980): An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to Toxoplasma gondii: Use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 142: 757—766.

ANSCHRIFT DER AUTOREN:

Mag. Kurt Hermentin, Dr. Herbert Auer, Dr. Otto Picher, Univ.-Prof. Dr. Horst Aspöck,
Abt. f. Med. Parasitologie am Hygiene-Institut der Universität Wien,
Kinderspitalgasse 15, A-1095 Wien

ZOBODAT - 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: 1983

Band/Volume: 5

Autor(en)/Author(s): Hermentin Kurt, Auer Herbert, Picher O., Aspöck Horst

Artikel/Article: Die Problematik des Nachweises spezifischer IgM-Antikörper bei Toxoplasma-Infektionen und Vorstellung eines neuen Tests: Solid-Phase Indirect Haemadsorption Assay (SPIHA). 55-60