

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 5 (1983) 75—82

Aus dem Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin (Vorstand: Prof. Dr. G. Wiedermann)

Die Bestimmung der Tetanus-Antikörper mit Hilfe einer neuen ELISA-Technik

F. Ambrosch und G. Wiedermann

Einleitung

Der Tetanus ist auch heute noch, mehr als 50 Jahre nach der Einführung der aktiven Immunisierung, eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten. Gemessen an der Zahl der Todesfälle liegt der Tetanus mit einer globalen Mortalität von 7.5 auf 100.000 Personen (4) bei den bakteriellen Infektionen an zweiter Stelle hinter der Tuberkulose (5).

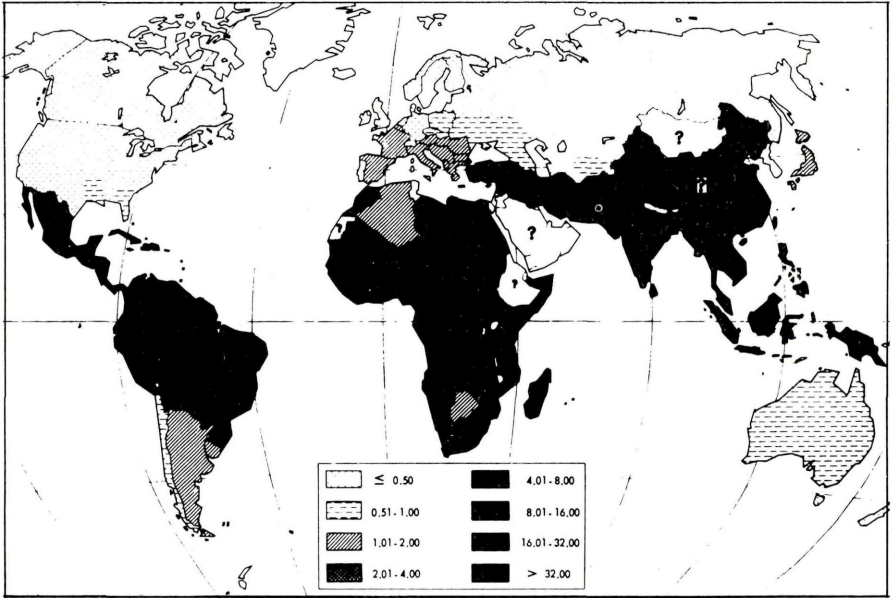
Wenn man die regionale Verteilung der Tetanusmortalität betrachtet (Abb. 1), so sieht man, daß in Europa, Nordamerika und Australien die Mortalität meist unter 1 auf 100.000 Einwohner und Jahr liegt, während sie in den subtropischen und tropischen Gebieten etwa ein bis zwei Zehnerpotenzen höher ist. Ein Teil dieses Unterschiedes geht sicher auf die verschiedenen Durchimpfungsraten und das unterschiedliche Vorgehen bei Verletzungen zurück, aber selbst bei Berücksichtigung dieses Faktors bleiben Unterschiede in der Mortalität von einer halben bis einer Zehnerpotenz übrig. Dies bedeutet, daß das Infektionsrisiko bezüglich Tetanus in den Tropen und Subtropen etwa 3—10 mal höher angesetzt werden muß als in den nichttropischen Gebieten.

Aus diesem Grunde kommt der aktiven Immunisierung gegen Tetanus in der Tropenmedizin eine besondere Bedeutung zu. Wirksame, gut verträgliche und kostengünstige Impfstoffe, die gereinigtes Tetanus-Toxoid und Al-hydroxid enthalten, stehen ja seit vielen Jahren zur Verfügung. In den Ländern der Dritten Welt forciert die Weltgesundheitsorganisation seit einigen Jahren das sogenannte EPI (Expanded Program of Immunization), das neben der Tuberkulose-, Diphtherie-, Pertussis-, Poliomyelitis- und Masernimpfung auch die Tetanusimpfung umfaßt (11).

Bei Personen, die in tropische Gebiete reisen, sollte neben der Impfung gegen Cholera, Gelbfieber und Typhus auch die Impfung gegen Poliomyelitis und vor allem Tetanus durchgeführt werden, soweit dies im Einzelfall notwendig ist (1, 9). Man wird sich dabei im allgemeinen an den Tetanus-Impfplan halten (Tab. 1), der zwei Impfungen im Abstand von 4 Wochen sowie eine dritte Impfung nach 6—12 Monaten vorsieht. Im besonderen ist zu empfehlen, Auffrischimpfungen bereits nach 5 Jahren vorzunehmen, wodurch bei Verletzungen (Tab. 2) keine weitere Tetanusprophylaxe notwendig ist (9).

Die Tetanusimpfung ist für Tropenreisende aber nicht nur wegen der erhöhten Infektionsgefahr wichtig, sondern auch wegen der bei fehlender und unvollständiger Impfung im Verletzungsfall erforderlichen passiven Immunisierung (Tab. 2). In den meisten Reiseländern wird nämlich aus ökonomischen Gründen nicht ein humanes Tetanus-Immunglobulin, sondern ein tierisches Tetanus-Serum verwendet, wodurch die Gefahr der Allergisierung, der Serumkrankheit und des Serumschocks besteht. Aus diesem Grunde ist es auch wichtig, die Impfkarte oder den Impfausweis, in der die vollständige Tetanusimpfung ordnungsgemäß eingetragen und bestätigt ist, mitzuführen und bei Verletzungen vorzuweisen.

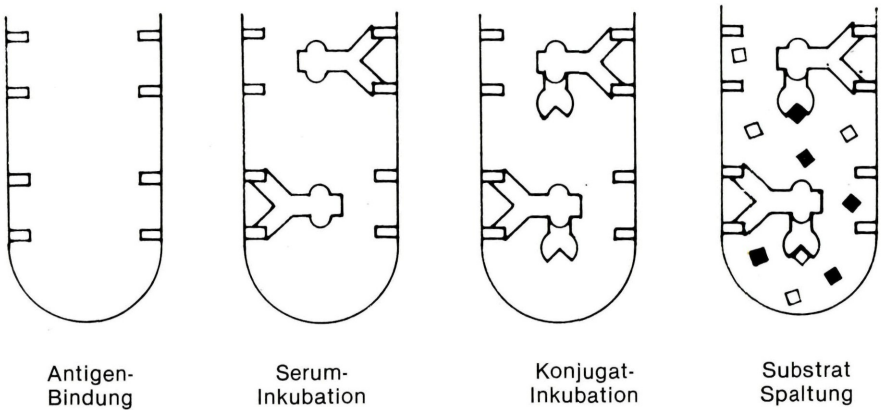
ABBILDUNG 1



Tetanus-Mortalität nach Berechnungen von Bytchenko (4)

ABBILDUNG 2

Prinzip des Tetanus-Mikro-ELISA



Ein besonderes Problem stellen nun jene Personen dar, deren Impfdokumente entweder nicht ausgestellt oder aber verloren wurden. Hier mußte bisher mit einer neuerlichen Grundimmunisierung begonnen werden, da eine Bestimmung des Antikörpertiters mit Hilfe des Toxinneutralisationstests oder IPSEN-Tests (8) aus Kostengründen kaum in Frage kam. Diese neuerliche Grundimmunisierung mußte jedoch häufig mit zunehmenden Lokalreaktionen erkaufte werden.

Material und Methoden

Wir haben daher, ausgehend von der Empfehlung der WHO (11) und der von Stiffler (10), Frühwein (7) und Ershler (6) beschriebenen Techniken, eine neue ELISA-Methode zur einfachen und genauen Bestimmung der Tetanus-Antikörper entwickelt (3). Das Prinzip der ELISA-Technik besteht darin, daß ein geeigneter Träger nacheinander mit Antigen, Patientenserum, einem Enzym-Antiimmunglobulin-Konjugat sowie mit einem geeigneten Substrat beschickt wird (Abb. 2).

Als Träger wurden Mikrotiterplatten der Firma Dynatech mit Flachboden verwendet. Die Platten wurden zunächst mit Tetanus-Toxoid Behringwerke (10 Iu/ml) in einer Verdünnung von 1 : 1000 mit WHO-Puffer beschickt, über Nacht bei + 4°C inkubiert und anschließend bei — 20°C aufbewahrt. Nach dreimaligem Waschen mit Tween-PBS (pH 7.5), das 2% Rinderalbumin enthält, wird die Platte mit den zu untersuchenden Sera, einem humanen Tetanus-Antitoxin-Standard sowie einem Pool aus negativen Sera beschickt. Ausgehend von einer Verdünnung von 1 : 10 wird eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 hergestellt und die Platte über Nacht bei + 4°C inkubiert. Der nächste Schritt besteht in der Inkubation mit einem Anti-IgG-Phosphatase-Konjugat, wiederum über Nacht bei + 4°C. Zuletzt wird p-Nitrophenol-Phosphat zugesetzt und nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Zimmertemperatur die Extinktion jedes einzelnen Lochs bei 405 nm photometrisch gemessen. Die Titrationskurven werden graphisch dargestellt, wobei von jedem gemessenen Extinktionswert eines Serums bzw. des Standards die Extinktion des Negativ-Pools in der entsprechenden Verdünnung abgezogen wird (Abb. 3). Der waagrechte Abstand zwischen Standard und Probe in Titerstufen wird bei einer Extinktion von 0.1 ausgemessen und daraus der Titer des zu untersuchenden Serums in IE/ml berechnet. Negative Sera, deren Titer unter der Schutzgrenze von 0.01 IE/ml liegen, zeigen einen sehr flachen Verlauf oder sind überhaupt nicht darstellbar.

Die mittlere Standardabweichung bei wiederholten Bestimmungen ergab einen Wert von $\pm 18.3\%$, das entspricht etwa einer $\frac{1}{4}$ Titerstufe. Der Test zeigt damit eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit. Zur Beurteilung der Richtigkeit wurde eine Reihe von Sera zusätzlich im Toxin-Neutralisationstest nach IPSEN (8) untersucht (Abb. 4)*.

Es ergab sich eine gute Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.82$. Auch die Übereinstimmung von positiven Sera mit einem Titer von mehr als 0.01 IE/ml und negativen Sera mit einem Wert unter 0.01 IE/ml war fast vollständig (Tab. 3).

Ergebnisse

Mit dieser Methode wurden die Antikörpertiter zahlreicher Sera bestimmt. Abgesehen von der Feststellung des individuellen Immunitätszustandes konnten eine Reihe von interessanten Fragen untersucht und beantwortet werden.

*) Der Toxinneutralisationstest wurde freundlicherweise von Frau Dr. H. Müller (Bundesstaatliche Serumprüfungsanstalt Wien) durchgeführt.

ABBILDUNG 3

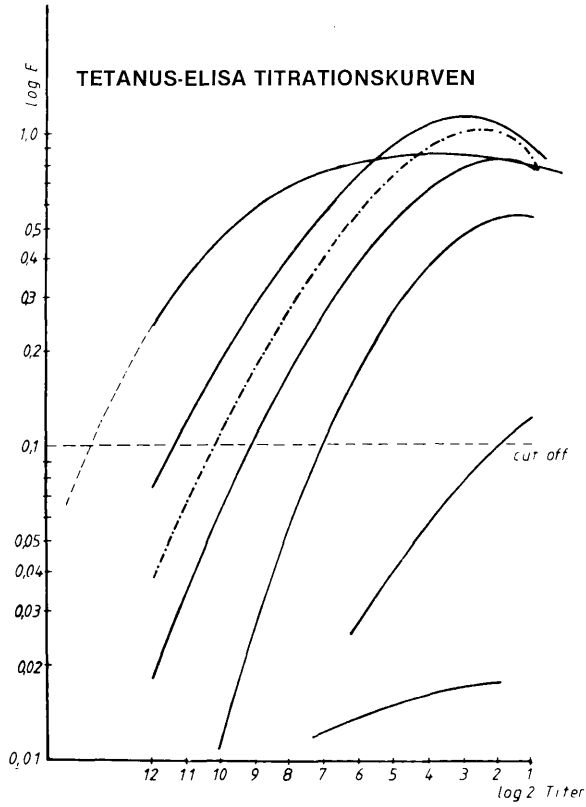
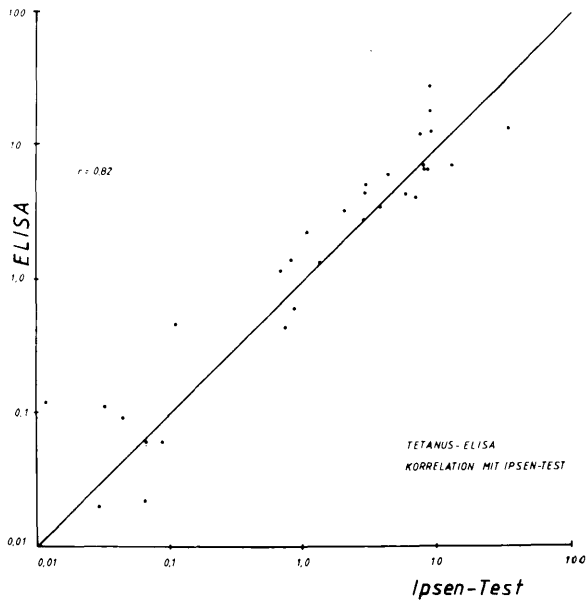


ABBILDUNG 4
TETANUS-ELISA
KORRELATION MIT IPSEN-TEST



Als Beispiel sei hier die Aufstellung eines Antikörperkatasters beim Österreichischen UNO-Bataillon angeführt (Tab. 4). Die meisten der untersuchten 482 Personen zeigten sehr hohe Antikörpertiter als Folge einer sehr guten Durchimpfung. Bei zwei Personen (0.4%) fanden sich jedoch keine Antikörper, sie waren offensichtlich bisher der Impfung entgangen.

Weiters konnte gezeigt werden, daß die Stärke der Lokalreaktionen nach der Tetanusimpfung, die nach einem Punktescore unter Einbeziehung der Symptome Rötung, Schwellung und Schmerzhaftigkeit bewertet wurde, von der Höhe der praevakzinalen Antikörper abhängt (Tab. 5). Während bei Titern unter 5 IE/ml der durchschnittliche Score 2.3 betrug, lag dieser Wert bei Titern über 5 IE bei 6.0.

Diskussion

Die beschriebene Methode der Tetanus-Antikörperbestimmung liefert genaue und reproduzierbare Werte, zeigt eine gute Korrelation mit dem Toxin-Neutralisationstest nach IPSEN in allen Titerbereichen und erlaubt die Durchführung der Bestimmung mit relativ geringen Kosten. Ein scheinbarer Nachteil ist die Dauer des Tests, da die Substratspaltung bzw. die anschließende Auswertung auch bei bereits mit Antigen beschickten Platten erst am übernächsten Tag möglich ist.

Dem ist entgegenzuhalten, daß die Durchführung des Neutralisationstests noch längere Zeit, nämlich mindestens eine Woche, in Anspruch nimmt. Auch von der Fragestellung her ist in der Regel eine sofortige Bestimmung der Tetanus-Antikörper nicht erforderlich. Neben der Untersuchung von epidemiologischen, immunologischen und klinischen Problemen eignet sich die beschriebene Methode vor allem zur Beurteilung der individuellen Immunität. Der gemessene Antikörpertiter erlaubt dabei auch eine Aussage über die zu treffenden Maßnahmen. Bei Titern unter 0.01 IE/ml muß eine komplette Grundimmunisierung, bei Titern zwischen 0.01 und 0.1 IE/ml eine Auffrischimpfung durchgeführt werden. Bei höheren Titern wird man in entsprechendem zeitlichen Abstand eine Wiederholung der Bestimmung durchführen (Tab. 6).

Zusammenfassung

Die aktive Immunisierung gegen Tetanus ist sowohl für die Bewohner tropischer Gebiete als auch für Tropenreisende eine wichtige Maßnahme. Zur Überprüfung der Tetanusimmunität wurde ein neuer ELISA-Test entwickelt, der in allen Titerbereichen gut reproduzierbar ist und eine gute Korrelation mit dem Toxin-Neutralisationstest nach IPSEN zeigt. Der Test kann für die Beantwortung von epidemiologischen, immunologischen und klinischen Fragen, sowie für die Beurteilung der individuellen Tetanusimmunität eingesetzt werden.

Summary

Active immunization against tetanus is an important measure for people living in tropical countries as well as for travellers going to these countries. For the determination of tetanus immunity a new and simple ELISA-test was developed. This test obtains exact values in the whole titer range and correlates excellently with the toxin neutralization test. It can be used for epidemiological, immunological and clinical problems as well as for the evaluation of individual immunity against tetanus.

TABELLE 1

Impfplan für die Tetanus-Impfung

	empfohlenes Intervall	max. Intervall
Grundimmunisierung		
1. Impfung	4 Wochen	5 Jahre
2. Impfung	6—12 Monate	unbegrenzt
3. Impfung		
Auffrisch-Impfungen	5—10 Jahre	unbegrenzt
Im Zweifelsfall Antikörperbestimmung		

TABELLE 2

Tetanus-Prophylaxe bei Verletzungen

Impfstatus	Intervall zur Letzten Impfung	Vorgehen	
Vollständige Grundimmunisierung bzw. Auffrischungsimpfung	< 5 Jahre 5—10 Jahre > 10 Jahre	0 0,5 ml TAI 0,5 ml TAI + 250 IE TIG	
Grundimmunisierung noch nicht abgeschlossen:	2 Impfungen im Abstand von 8—12 Wochen	< 6 Monate 6—12 Monate > 1 Jahr	0 0,5 ml TAI 0,5 ml TAI + 250 IE TIG
	1 Impfung	4 Wochen — 5 Jahre > 5 Jahre	0,5 ml TAI + 250 IE TIG Wiederholung der Grundimmun. + 250 IE TIG

TAI = Tetanus-Adsorbat-Impfstoff

TIG = Tetanus-Immunglobulin

TABELLE 3

**Tetanus-ELISA
Übereinstimmung mit IPSEN-Test**

		IPSEN-Test	
		positiv	negativ
ELISA	positiv	31	1
	negativ	1	9

TABELLE 4

**Tetanus-Antikörper bei Angehörigen des Österreichischen
UNO-Bataillons (n = 482)**

Titer (IE/ml)	n	%
< 0,01	2	0,4 %
0,01 — 0,1	38	7,9 %
0,1 — 1,0	170	35,3 %
1,0 — 10	248	51,4 %
> 10	24	5,0 %

TABELLE 5

**Lokalreaktionen nach Tetanusimpfung in Abhängigkeit
vom praevakzinalen Titer (n = 53)**

Titer	durchschnittliche Punktezahl
< 5 IE/ml	2,3
> 5 IE/ml	6,0

TABELLE 6

Bewertung und Konsequenzen der Tetanus-Antikörperbestimmung

< 0.01 IE/ml	kein Schutz	Grundimmunisierung
0.01 — 0.1 IE/ml	geringer Schutz	Auffrischimpfung
> 0.1 IE/ml	guter Schutz	keine Impfung erforderlich

Literatur

- 1.) AMBROSCH, F., H. PICHLER (1978): Spezifische Prophylaxe im internationalen Reiseverkehr. *Arzneimittelpraxis* 3, 233—237.
- 2.) AMBROSCH, F. (1979): Probleme der Tetanusprophylaxe. *Österreichische Apotheker-Zeitung* 24, 449—452.
- 3.) AMBROSCH, F., G. WIEDERMANN, H. MÜLLER (1983): Eine neue Mikro-ELISA-Methode zur Bestimmung der Tetanus-Antikörper. *Zbl. Bakt. Hyg.* (im Druck).
- 4.) BYTCHENKO, B. (1967): Tetanus as a world problem. In: *Principles on Tetanus*. Hrsg.: Leo Eckmann. Hans Huber Bern u. Stuttgart.
- 5.) COCKBURN, W.C., F. ASSAAD (1973): Some observations on the communicable diseases as public health problems. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 49, 1—12.
- 6.) ERSHLER, W.B. et al. (1982): Specific in vivo and in vitro antibody response to tetanus toxoid immunization. *Clin. exp. Immunol.* 49, 552—558.
- 7.) FRÜHWEIN, N., V. HOCHSTEIN-MINTZEL (1980): Bestimmung von Tetanus-Antikörpern im menschlichen Serum mit dem ELISA-Test (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent-Assay). *Das ärztliche Laboratorium*. 26, 271—274.
- 8.) IPSEN, J.I. (1942): Systematische und zufällige Fehlerquellen bei Messung kleiner Antitoxinmengen. I. Mitteilung: Tetanus-Antitoxin. *Z. Imm. Forsch.* 102, 347—368.
- 9.) KOLLARITSCH, H., F. AMBROSCH (1982): Impfpläne und Impfempfehlungen. *Österr. Ärztezeitung* 37, 663—667.
- 10.) STIFFLER-ROSENBERG, G., H. FEY (1977): Messung von Tetanus-Antitoxin mit dem Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Schweiz. med. Wschr.* 31, 1101—1104.
- 11.) VELIMIROVIC, B. (1980): Globale Impfprogramme: Maßnahmen und Möglichkeiten. *Die Gelben Hefte* XX, 1—8.
- 12.) WHO (1976): The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull. Wld. Hlth. Org.* 54, 129—139.

KORRESPONDENZADRESSE:

Univ. Doz. Dr. F. Ambrosch
Institut für Spezifische Prophylaxe
und Tropenmedizin
Kinderspitalgasse 15
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): Ambrosch Franz, Wiedermann Gerhard

Artikel/Article: [Die Bestimmung der Tetanus-Antikörper mit Hilfe einer neuen ELISA-Technik. 75-82](#)