

# Bestimmung der sekretorischen Antikörper als Maß für die Antigenität und Immunität von Impfstoffen

**E. Rappold, F. Ambrosch, G. Wiedermann**

## Einleitung

Die humorale Immunreaktion auf orale und parenterale Impfungen, wie z. B. Poliomyelitis, Tetanus, Cholera und Gelbfieber ist hinreichend bekannt, hingegen wurde die Bildung von spezifischen Antikörpern nach oraler Immunisierung noch wenig untersucht.

Die Bildung von sekretorischen Antikörpern nach parenteraler Immunisierung, wie z. B. nach der Choleraimpfung, wurde jedoch von Svennerholm nachgewiesen (Svennerholm 1977).

Gerade sekretorische Immunglobuline der IgA-Klasse stellen für die Abwehr von verschiedenen Infektionen einen wesentlichen Schutzmechanismus dar (Beachey 1982). Dies trifft zum Beispiel für Pertussis und Poliomyelitis, im Bereich der Tropenmedizin für Cholera und Typhus zu.

Bei der Bestimmung von spezifischen Antikörpern aus Körpersekreten ergeben sich zwei Probleme, zum einen die geringe Probenmenge, zum anderen die geringe Konzentration des gesamten IgA. Aus diesem Grunde bietet sich die Bestimmung der sekretorischen Antikörper mit Hilfe der ELISA-Technik an.

Als Modell zur Bestimmung von spezifischen sekretorischen Antikörpern haben wir die Wirkung eines bakteriellen oralen Mischimpfstoffes auf die Induktion von spezifischen Antikörpern im Speichel und Nasensekret gewählt.

## Methoden

### 1.1. Probanden

Zu dieser Studie wurden 100 klinisch gesunde Angehörige des Österreichischen Bundesheeres herangezogen. Die Abnahme von Speichel und Nasensekret erfolgte vor der Einnahme der Präparate und zwei bzw. vier Wochen nachher. Die Probanden wurden nach Zufallskriterien in die Gruppe A, B und C geteilt.

### 1.2. Impfstoff

Untersucht wurde ein bakterieller Mischimpfstoff aus inaktivierten Bakterien in zwei verschiedenen Zubereitungen (Buccalin®-Standard-Dragees und Buccalin forte-Kaustabletten). Der Hauptanteil der beiden Präparationen bestand aus Pneumokokken (je  $10^9$  bzw.  $5 \times 10^9$  Keime von *Streptococcus pneumoniae*) und Haemophilusbakterien ( $1,5 \times 10^9$  bzw.  $1 \times 10^9$  Keime von *Haemophilus influenzae* Typ b). Außerdem stand eine Placebopräparation zur Verfügung. Die Probanden der Gruppe A erhielten Buccalin Standard, die Gruppe C Buccalin forte und die Gruppe B eine Placebopräparation.

## 2. Untersuchung der Sekrete

### 2.1. Bestimmung des gesamten IgA-Gehaltes

Die Ermittlung des Gesamt-IgA-Gehaltes der Sekrete erfolgte sowohl mit Hilfe der radialen Immundiffusion (RID) als auch mit einer speziell entwickelten ELISA-Methode. Bei dieser wurden Mikrotiterplatten (Flachboden, Microelisa-Platten, Dynatech) mit Glutaraldehyd vorbehandelt und mit einem Anti-Human-IgA-Serum (H-Ketten-spezifisch) beschickt. Nach der Sekretinkubation erfolgte eine weitere Inkubation mit Phosphatase-markiertem Anti-Human-IgA-Konjugat. Diese Methode wurde von Voller als „Double Antibody Sandwich ELISA“ beschrieben (Voller 1979, Hamaguchi 1982). Die Auswertung erfolgte durch spektrophotometrische Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm und anschließender graphischer Darstellung der gemessenen Extinktionswerte. Der Titer des Standards und die Probe wurde durch den Schnitt der Kurven mit der cut-off-Linie bei einer Extinktion von 0,1 bestimmt. Aus der Titerdifferenz zwischen Proben und Standard wurde nach der Formel

$$C_{\text{Proben}} = C_{\text{Standard}} \times 2^{\Delta T}$$

der IgA-Gehalt in mg/100 ml berechnet.

Der Vergleich der beiden Methoden an Hand von 106 Sekreten ergab zwar eine gewisse Streuung, die auf Inhomogenität der Sekrete zurückzuführen sein dürfte, aber eine zufriedenstellende Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,65 (Abb. 1).

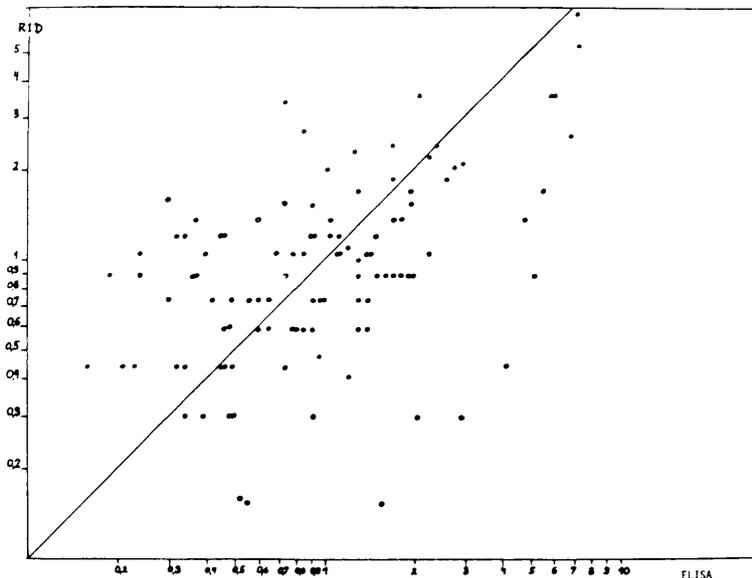


Abb. 1: Bestimmung des sekretorischen IgA-Gehaltes (mg/100 ml)  
Korrelation zwischen RID und ELISA

### 2.2. Die Bestimmung der spezifischen sekretorischen IgA-Titer

gegen *Haemophilus influenzae* Typ b (Hib) und *Streptococcus pneumoniae* Typ 3 (P3) erfolgte ebenfalls mit Hilfe der ELISA-Technik. Als Antigen für die Bestimmung von

Antikörpern gegen P3 wurde gereinigtes Kapselpolysaccharid, als Antigen für die Bestimmung von Antikörpern gegen Hib wurde sowohl Lipopolysaccharid aus der Bakterienkapsel als auch eine Präparation von hintzeinaktivierten Keimen verwendet.

In diesem Fall erfolgte eine Kopplung des Antigens mit Hilfe von Glutaraldehyd. Wie beim IgA-ELISA wurde mit Sekret und anschließend mit Phosphatase-gekoppeltem Konjugat inkubiert und wie vorher beschrieben ausgewertet.

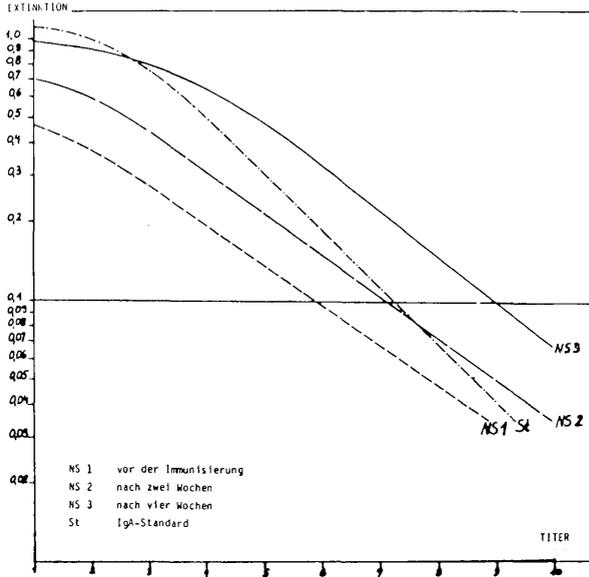


Abb. 2: Antikörper gegen Hib im Nasensekret (ELISA-Titrationen)

### 2.3. Berechnung der korrigierten Titerdifferenz

Der gemessene spezifische Antikörpertiter hängt naturgemäß vom Gesamt-IgA-Gehalt der Sekretprobe ab (Gahnberg, 1981). Da der IgA-Gehalt der Sekrete bei den einzelnen Abnahmen auch bei derselben Person starke Schwankungen zeigte, wurde die rohe Titerdifferenz entsprechend den IgA-Werten korrigiert.

Aus den bestimmten prae- und postvakzinalen Titern wurde zunächst die rohe Titerdifferenz in  $\log_2$ -Stufen berechnet. Dann wurde der Quotient von prae- und postvakzinalen IgA-Wert gebildet und logarithmiert.

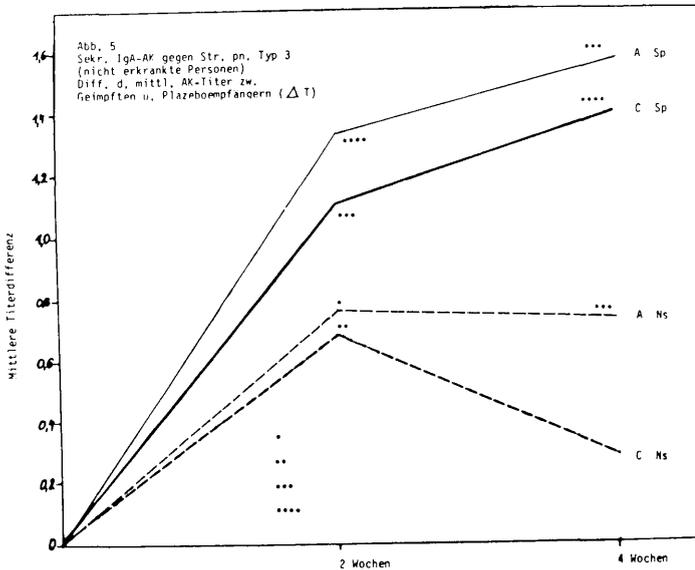
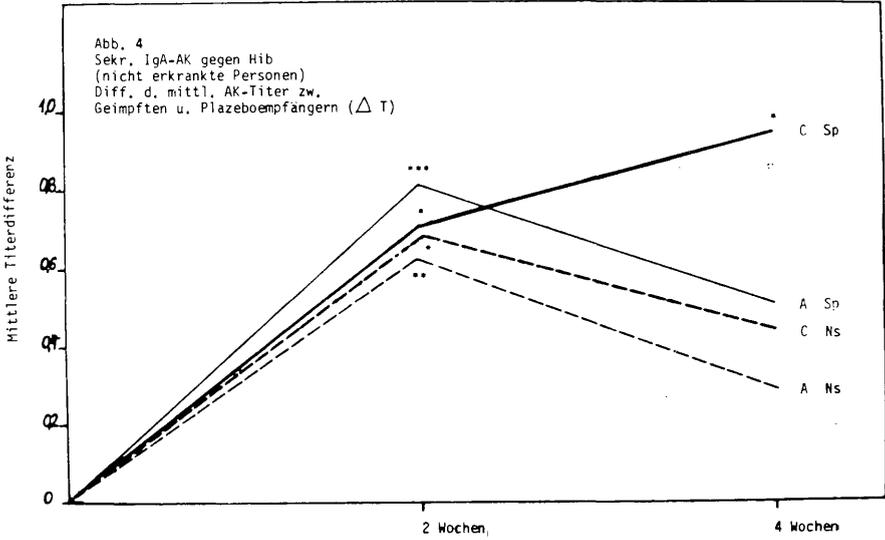
Dieser Wert wurde zur rohen Titerdifferenz addiert (Abb. 3).

$$\Delta T_{\text{korr}} = \Delta T + \log_2 \frac{\text{IgA}_{\text{prae.}}}{\text{IgA}_{\text{postv.}}}$$

Abb. 3: Berechnung der korrigierten Titerdifferenz

### Ergebnisse

Bei dieser Studie konnten deutliche Unterschiede in den Mittelwerten der korrigierten Titerdifferenz zwischen der Impfstoff- und der Placebogruppe festgestellt werden. Um eine Fehlbeurteilung des Titeranstieges, der durch zufällig auftretende Infektion mit diesen Erregern hervorgerufen wird, zu vermeiden, wurden nur die nicht erkrankten Personen miteinander verglichen. Es ergaben sich deutliche und signifikante Unterschiede im Mittelwert der korrigierten Titerdifferenz zwischen Impfstoffgruppe und Placebogruppe sowohl nach zwei als auch nach vier Wochen (Abb. 4, Abb. 5).



Der mittlere Titeranstieg war im Speichel etwas größer als im Nasensekret und verlief in den ersten zwei Wochen steiler und flachte dann ab. Parallel zu diesen Untersuchungen wurde auch eine klinische Studie durchgeführt. Der Vergleich zwischen Impfgruppe und Placebogruppe zeigte eine Verminderung der respiratorischen Infekte um 30,5% bei Gruppe A (B Standard) und 47,9% bei Gruppe C (B. forte). Diese Unterschiede waren ebenfalls signifikant.

## **Diskussion**

Durch die beschriebenen Untersuchungen konnte eine Parallelität zwischen immunologischen Veränderungen und klinischer Wirksamkeit nach oraler Immunisierung nachgewiesen werden. Beide Präparate zeigten sowohl einen scheinbar kleinen, aber signifikanten Anstieg von spezifischen Antikörpern gegen die verwendeten Antigene von *Haemophilus influenzae* b und *Streptococcus pneumoniae* Typ 3, als auch eine Verminderung von respiratorischen Infekten im Beobachtungszeitraum von vier Wochen. Die Bestimmung dieser relativ kleinen Titersteigerungen waren nur dadurch möglich, daß, wie beschrieben, die korrigierte Titerdifferenz berechnet wurde. Die Außerachtlassung der unterschiedlichen IgA-Konzentrationen bei den einzelnen Abnahmen würde zur Überdeckung der spezifischen Titersteigerungen durch Schwankungen des IgA-Gehaltes, und dadurch zu einer Fehlbeurteilung führen (Clancy, 1983). Der Anstieg der spezifischen Titer um 0,8 Titerstufen bei Hib bzw. um 1,6 Titerstufen bei P3 wird durch die Angabe in  $\log_2$  Titerstufen scheinbar unterbewertet. Der tatsächliche Anstieg der spezifischen sekretorischen Antikörper beträgt im Mittel 75% bzw. 220%.

Eine weitere Voraussetzung für den Nachweis von signifikanten Titersteigerungen bei den Impfgruppen war eine genügend große Anzahl von Probanden. Deshalb konnten signifikante Unterschiede zwischen Impf- und Placebogruppe für beide untersuchten Antigene sowohl für Speichel als auch für Nasensekret, sowie nach zwei als auch vier Wochen nachgewiesen werden. Auf diese Weise wurden insgesamt 16 Stichproben durchgeführt, von denen 12 signifikante Unterschiede zeigten.

In ähnlichen Studien mit einer kleineren Anzahl von Probanden gelang es aus diesem Grund nicht, signifikante Unterschiede nachzuweisen (Gahnberg, 1983). Diese Studie erlaubt jedoch keine sichere Aussage, ob die untersuchten Antikörper protektive Bedeutung besitzen, oder ob sie nur Marker anderer durch die Immunisierung induzierte Schutzmechanismen darstellen. Allerdings spricht aus pathogenetischer Sicht manches dafür, daß sekretorische Antikörper Determinanten bzw. Rezeptoren an der Oberfläche von Bakterien blockieren können und dadurch die Adhäsion der Bakterien an die Schleimhaut des Respirationstraktes verhindern können (Beachey 1982, Hall 1981).

## **Zusammenfassung**

Um die immunisierende Wirkung nach oraler Applikation eines Impfstoffes aus inaktivierten Bakterien zu untersuchen, wurden sekretorische Antikörper der IgA-Klasse im Speichel und Nasensekret gegen *Haemophilus influenzae* Typ b und *Streptococcus pneumoniae* Typ 3 mit Hilfe der ELISA-Technik bei zwei Impfungen und einer Placebogruppe untersucht. Zur Berechnung der korrigierten Titerdifferenz wurde das Gesamt-IgA der jeweiligen Sekretprobe mit Hilfe der radialen Immundiffusion bzw. der ELISA-Tests bestimmt. Die untersuchten Präparationen führten im Vergleich zur Placebogruppe zu einem signifikanten Anstieg von spezifischen Antikörpern gegen Hib und P3 sowohl im Speichel als auch im Nasensekret.

## Summary

The immune response to an oral vaccine consisting of inactivated bacteria was investigated. Using an enzyme-linked immunosorbent assay and radial immunodiffusion specific antibodies of the IgA class against *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* type 3 and the concentration of total IgA were determined. These investigations were performed in saliva as well as in nasal swab. In comparison to two test groups a placebo group was assessed. The total IgA values were used for the calculation of the corrected titer differences. Comparing test groups and placebo group a significant increase of specific IgA-antibodies against Hib and P3 was observed in the test groups.

## Literatur

- 1) BEACHEY, E. H. (1982): Die Adhärenz von Bakterien an Schleimhautoberflächen. *Immun. Infekt.* 10, 51–56
- 2) CLANCY, R. L., A. W. CRIPPS, A. J. HUSBAND, D. BUCKEY (1983): Specific Immune Response in the Respiratory Tract After Administration of an Oral Polyvalent Bacterial Vaccine. *Infect. Immun.* 39, 491–496
- 3) GAHNBERG, L., B. KRASSE (1981): Salivary Immunglobuline A Antibodies Reacting with Antigens from Oral Streptococci: Longitudinal Study in Humans. *Infect. Immun.* 33, 697–703
- 4) GAHNBERG, L., B. KRASSE (1983): Salivary Immunglobuline A Antibodies and Recovery from Challenge of *Streptococcus mutans* After Oral Administration of *Streptococcus mutans* Vaccine in Humans. *Infect. Immun.* 39, 514–519
- 5) HALL, J. (1981): The Transport of Immunglobulin A: Implications for Clinical and Experimental Medicine. *Afr. J. Clin. Exp. Immunol.* 2, 195–204
- 6) HAMAGUCHI, Y., M. OHI, Y. SAKAKURA, T. MUKOJIMA (1982): Quantitation of Nasal Secretory IgA by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 69, 1–6
- 7) SVENNERHOLM, A. M., J. HOLMGREN, I. A. HANSON, B. S. LINDBLAD, F. QUERESHI, R. J. RAHIMTOOLA (1977): Boosting of Secretory IgA Response in Man by Parenteral Cholera Vaccination. *Scand. J. Immunol.* 6, 1345–1349
- 8) VOLLER, A., D. E. BIDWELL, A. BARTLETT (1979): The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Dynarech Europe, Borough House

# 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: 1984

Band/Volume: [6](#)

Autor(en)/Author(s): Rappold Eva, Ambrosch Franz, Wiedermann Gerhard

Artikel/Article: [Bestimmung der sekretorischen Antikörper als Maß für die Antigenität und Immunität von Impfstoffen. 13-18](#)