

Der diagnostische Wert von Salmonella-ELISA und Widal-Test in Gebieten mit sporadischem und endemischem Vorkommen von Typhus abdominalis

A. Hirschl¹, G. Stanek¹, M. Rotter¹, P. Y. Chau² und A. H. Niemetz³

1 = Hygiene-Institut der Universität Wien (Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Flamm)

2 = Department of Microbiology of the University of Hong Kong

3 = Institut für Blutgruppenserologie der Universität Wien

Der Widaltest ist auch heute noch eine zur Diagnose fieberhafter enteritischer Erkrankungen häufig eingesetzte Untersuchungsmethode. Gerade in manchen Ländern mit häufigem Vorkommen solcher Erkrankungen wird dieser Test oft als einer der wenigen zur Verfügung stehenden zur Abgrenzung einer Salmonelleninfektion von Diarrhoen durch andere Bakterien, Viren oder Parasiten verwendet. Wie alle Agglutinationsreaktionen mit Bakterien hat dieser Test aber auch einige Nachteile; etwa die geringe Spezifität (SCHROEDER 1968, REYNOLDS et al. 1970, PROTELL et al. 1971, SANSONE et al. 1972), falsch negative Reaktionen (STUART und PULLEN 1946, LEVINE et al. 1978) und eine hohe Prävalenz agglutinierender Antikörper vor allem in Endemiegebieten (LEVINE et al. 1978). Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß der Widaltest hauptsächlich nur Antikörper der Klasse IgM erfaßt (CHERNOKHVOSTOVA et al. 1969, KUMAR et al. 1974, CHAU und NG 1978, BEASLEY et al. 1981). Es hat sich zwar gezeigt, daß in Gebieten mit sporadischem Vorkommen von Typhus abdominalis im akuten Stadium überwiegend eine IgM-Immunität induziert wird und daher auch ein IgM-spezifischer Test zur Diagnose dieser Erkrankung ausreicht (HIRSCHL et al. 1983); dem stehen jedoch Untersuchungen gegenüber, die in Gebieten mit endemischem Vorkommen von Salmonelleninfektionen bei akutem Typhus abdominalis ein anderes „Muster“ der Immunantwort, nämlich Antikörper der verschiedenen Klassen, zum Teil sogar nur wenig IgM, fanden (BEASLEY et al. 1981, CHAU et al. 1981, TSANG et al. 1981). Wir haben daher die Immunantwort bei Patienten mit akuten Typhusinfektionen in Gebieten mit sporadischem und relativ häufigem Vorkommen von Typhus abdominalis, nämlich in Österreich und Hong Kong, verglichen. Diese Untersuchungen wurden sowohl mit dem klassischen Widaltest als auch mit der modernen ELISA-Technik durchgeführt.

Material und Methoden

Es wurden 26 bzw. 16 Seren von verschiedenen Patienten aus Hong Kong und Österreich mit kulturell verifiziertem Typhus abdominalis sowie jeweils 50 Kontrollseren von gesunden Blutspendern getestet. Sowohl positive als auch negative Seren stammten größtenteils von 20–40jährigen Personen. Alle positiven Seren wurden 10–30 Tage nach Erkrankungsbeginn abgenommen. Für den Versand wurden die Seren lyophilisiert, ansonsten bei –25° C aufbewahrt. Einmal aufgetaute Serumproben wurden verworfen.

ELISA

Antigen: Lipopolysaccharid W (Präparation nach Westphal) von *S. typhi* (Difco-Laboratories); in Vorversuchen wurde in einer Schachbrett-Titration eine Antigenverdünnung von 0,01 mg/ml als optimal ermittelt. Das Lipopolysaccharid wurde in Carbonatpuffer pH 9,6 verdünnt.

Feste Phase: U-Nunc- Mikrotiterplatten.

Konjugat: Mit Peroxidase gekoppeltes Antihuman-IgG, -IgM und -IgA (Fc-spezifisch) von der Ziege (F. Nordic); die letztlich dann in den Tests verwendete Gebrauchsverdünnung von 1:1000 wurde in Vorversuchen bestimmt.

Substrat: 40 mg Orthophenylendiamin und 0,04 ml Wasserstoffperoxid in 100 ml Phosphat-Citratpuffer (pH 5).

Verdünnungs- und Waschlösungen: Serum und Konjugat wurden in Phosphatpuffer (pH 7,4) + 2% Hammelserum + 2% Tween 20 verdünnt. Als Waschflüssigkeit diente Phosphatpuffer (pH 7,4) + 0,05% Tween 20.

Durchführung: Die Näpfcchen der Mikrotiterplatten wurden mit 0,05 ml Antigenverdünnung beschickt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten ausgeklopft. Danach wurden sie entweder sofort weiter verwendet oder im Luftstrom einer reinen Werkbank getrocknet und in Plastikhüllen bei 4° C bis zu 6 Wochen aufbewahrt. Vor dem eigentlichen Test wurden die Näpfcchen der Mikrotiterplatten mit 0,1 ml Phosphatpuffer (pH 7,4) + 2% Hammelserum gefüllt und 1 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Platten ausgeklopft und mit 0,05 ml der Testseren in einer Verdünnung von 1:1280 (doppelter Ansatz) gefüllt. In der Folge wurden die Platten zugedeckt 2 h bei 37° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden pro Näpfcchen 0,05 ml der Konjugat-Gebrauchsverdünnung zugetropft. Danach wurde das System wiederum 2 h bei 37° C bebrütet. Anschließend wurden die Platten dreimal gewaschen und alle Näpfcchen mit je 0,1 ml Substratlösung beschickt. Schließlich wurde nach halbstündiger Inkubation in einem abgedunkelten Raum (22–24° C) die enzymatische Reaktion mit 2,5 M Schwefelsäure (0,05 ml) gestoppt. Die Extinktion wurde direkt in der Mikrotiterplatte mit Hilfe eines 8-Kanal-Photometers (Titertek-Multiscan, Flow Laboratories) bei 492 nm gemessen. Als Leerwert diente eine Reihe einer antigenbeschichteten Platte, die anstelle des Serums nur Puffer enthielt. Als Kontrollen fanden positive und negative Seren mit bekanntem Titer Verwendung.

Widal-Test

Antigen: *S. typhi* (Wellcome, Widal Kit) in einer Gebrauchsverdünnung von 1:30.

Durchführung: Je 0,025 ml von Serumverdünnungen (in physiologischer Kochsalzlösung) und Antigen wurden in U-Nunc-Mikrotiterplatten gemischt und 18 ± 2 h bei 35° C bebrütet.

Bewertung: Als Titer galt diejenige Serumverdünnung, bei der mit freiem Auge gerade noch eine Agglutinationsreaktion sichtbar war.

Statistische Auswertung

Unterschiede zwischen Seren aus Österreich und Hong Kong wurden bei zweiseitiger Fragestellung im U-Test nach Mann und Whitney (für stetige Verteilungen) sowie im U-Test nach Raatz (für klassierte Daten) auf Signifikanz geprüft. Als Signifikanzniveau wurde $2p = 0,05$ vereinbart.

Ergebnisse

Abb. 1 zeigt die reziproken Widal-titer bei positiven und negativen Seren aus Österreich und Hong Kong. Kontrollseren aus Hong Kong weisen im Vergleich zu negativen Seren aus Österreich deutlich höhere Titer auf (mediane Titer: 80 bzw. 15; $2p < 0,001$). Auch bei positiven Seren besteht im Durchschnitt ein signifikanter Titerunterschied, wobei in Seren von Typhuspatienten aus Österreich wesentlich höhere Titer zu finden sind (Tab. 1).

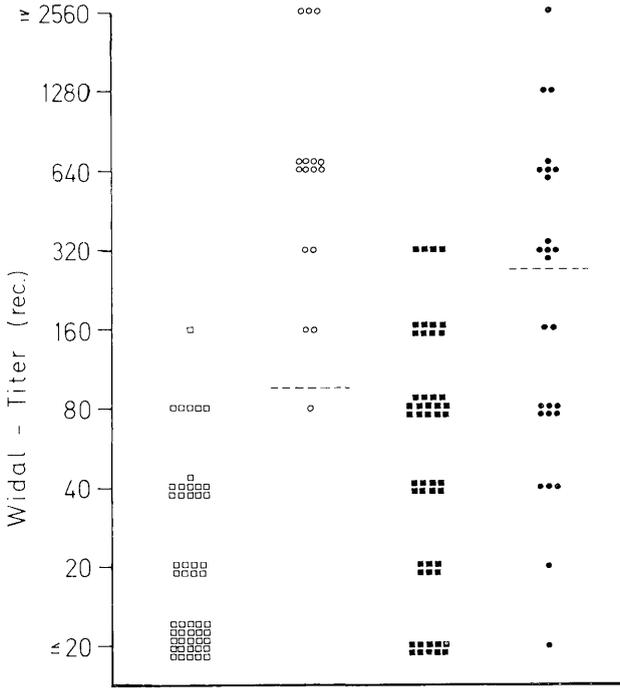


Abb. 1: Verteilung der reziproken Agglutinationstiter gegenüber dem somatischen Antigen von *S. typhi* (Widal-Test) in Seren von gesunden Blutspendern aus Österreich (□) und Hong Kong (■) sowie Patienten mit kulturell gesichertem Typhus abdominalis aus Österreich (○) und Hong Kong (●)
 - - - - - Schwellenwert (2 Standardabweichungen über dem Mittelwert der entsprechenden Kontrollseren)

TABELLE 1: **Mittlere Antikörpertiter gegenüber dem somatischen Antigen (Widal-Test) und Lipopolysaccharid (ELISA) von *S. typhi* in Seren von Patienten mit kulturell gesichertem Typhus abdominalis aus Österreich und Hong Kong**

Herkunft	Patienten			Mediane Titer			
	Anzahl	Alter in Jahren	Tage nach Krankheitsbeginn; Median (Bereich)	Widal	ELISA		
		Median			IgM	IgG	IgA
Österreich	16	24	15 (10–30)	640	0,32	0,16	0,37 ¹
Hong Kong	26	23,5	14 (6–30)	240	0,21	0,71	0,33 ²
Signifikanz der Unterschiede ³		n.s. ⁴	n.s.	<0,05	n.s.	<0,001	n.s.

Widal-Titer: reziproke Agglutinationstiter

ELISA-Titer: Extinktionswerte (492 nm) bei einer Serumverdünnung von 1:1280

¹⁾ 14 Sera getestet ²⁾ 25 Sera getestet ³⁾ U-Test ⁴⁾ nicht signifikant (2p>0,05)

Abb. 2 und 3 zeigen die relativen ELISA IgM-, IgG- und IgA-Titer gegenüber dem Lipopolysaccharid von *S. typhi*, dargestellt als Mittelwerte von je zwei Extinktionsmessungen (Serumverdünnung 1:1280) bei positiven und negativen Seren aus Österreich und Hong Kong.

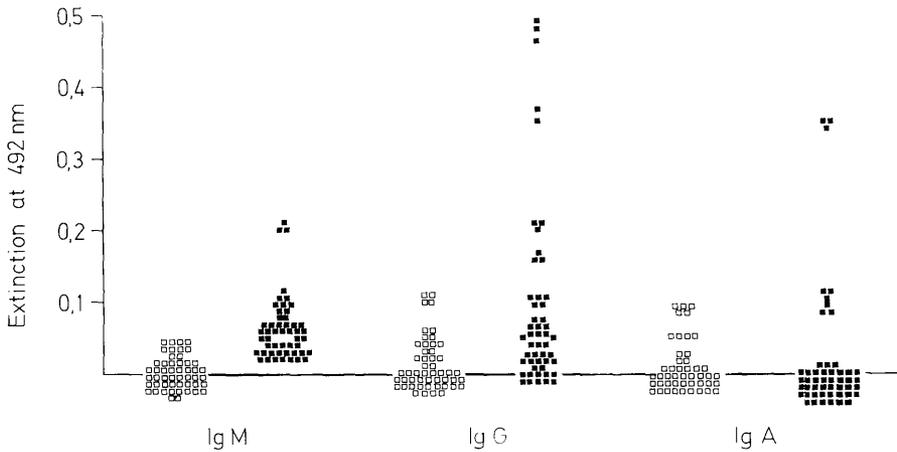


Abb. 2: Verteilung der relativen ELISA IgM-, IgG- und IgA-Titer gegenüber dem Lipopolysaccharid von *S. typhi* (ausgedrückt als Extinktionswert, gemessen bei einer Serumverdünnung von 1:1280) in Seren von gesunden Blutspendern aus Österreich (□) und Hong Kong (■)

Negative Hong Kong-Seren weisen dabei in allen gemessenen Immunglobulin-Klassen höhere relative Titer als diese aus Österreich auf (mediane Titer: IgM: 0,057 bzw. 0,00, IgG: 0,05 bzw. 0,00). Bei Vergleich der positiven Seren fällt auf, daß Seren aus Hong Kong signifikant höhere ($2p < 0,001$) relative IgG-Titer aufweisen, während die relativen IgM und IgA-Titer etwas niedriger als die von österreichischen Seren sind (Tab. 1).

Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen, daß Antikörper gegen *S. typhi* in wenigstens drei Immunglobulinklassen (IgM, IgG, IgA) nachweisbar sind.

Es besteht jedoch ein beträchtlicher Unterschied darin, ob die untersuchten Personen aus einem Gebiet mit relativ häufigem oder lediglich sporadischem Vorkommen von Typhus abdominalis stammen. So finden sich im Serum von gesunden, aus einem Endemiegebiet stammenden Probanden, deutlich mehr Antikörper vor allem der Klassen IgM und IgG als in Seren von Probanden aus einem Nicht-Endemiegebiet.

Ähnliche Ergebnisse wurden von LEVINE et al. (1978) und BEASLEY et al. (1981) berichtet.

Die Herkunft der Patienten beeinflusst aber auch die Immunantwort bei Personen mit gesichertem Typhus abdominalis entscheidend.

So wurde in 93% der Seren von Patienten aus Österreich 2–4 Wochen nach Krankheitsbeginn ein signifikanter Anstieg der IgM- und IgA-Titer beobachtet, in 11 von 16 Seren finden sich zu diesem Zeitpunkt auch bereits im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte IgG-Titer; diese liegen jedoch stets unter dem Wert der korrespondierenden IgM-Titer. Der Wechsel von IgM zu IgG vollzieht sich erst nach etwa 4–6 Wochen (HIRSCHL et al. 1983).

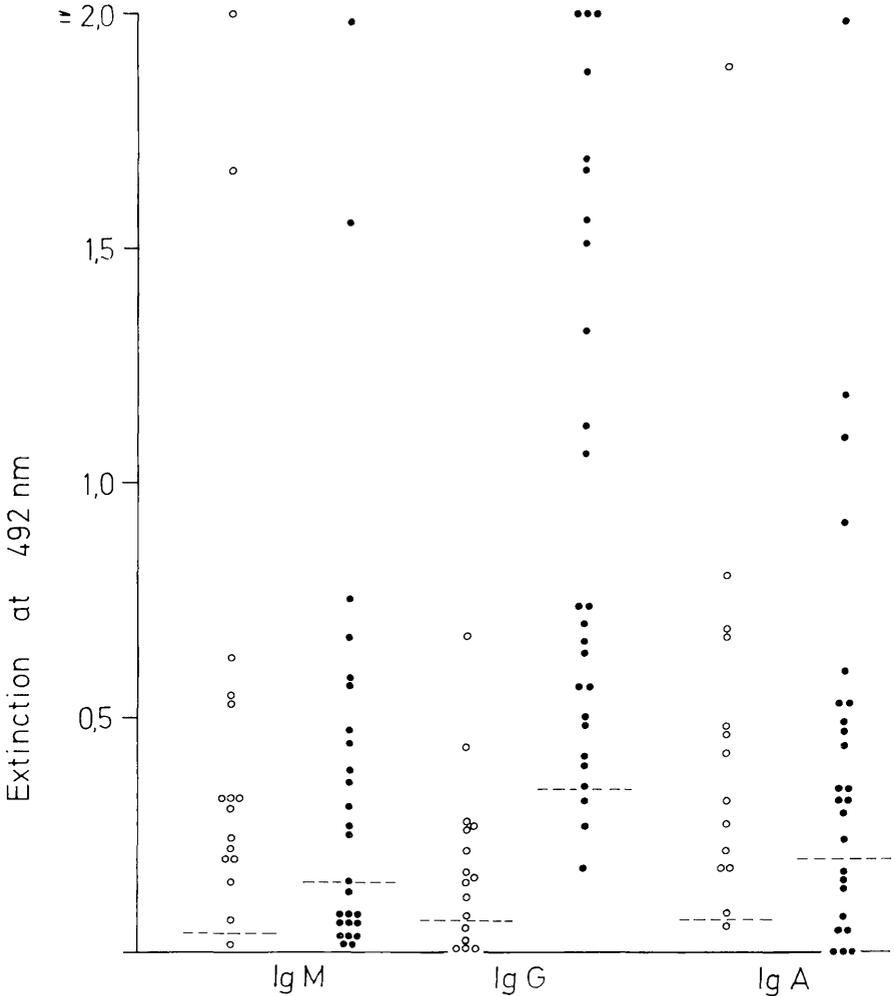


Abb. 3: Verteilung der relativen ELISA IgM-, IgG- und IgA-Titer in Seren von Patienten mit kulturell gesichertem Typhus abdominalis aus Österreich (○) und Hong Kong (●) ----- Schwellenwert (2 Standardabweichungen über dem Mittelwert der entsprechenden Kontrollseren)

Bei Patienten aus Hong Kong lassen sich hingegen 2–4 Wochen nach Krankheitsbeginn erhöhte IgM-Titer (sowohl im Widalttest als auch im ELISA) und IgA-Titer nur in etwa 50% der Fälle nachweisen. Dafür sind jedoch bei 88% der Patienten die spezifischen IgG deutlich erhöht.

Eine akute Infektion mit *S. typhi* kann also zwei verschiedene Muster von Immunantworten induzieren: 1. eine typische primäre IgM-dominierte Immunantwort, die bei Patienten aus Nicht-Endemiegebieten zu überwiegen scheint. 2. eine sekundäre, vor allem durch Anstieg der IgG geprägte Immunantwort, die bei Patienten aus Endemiegebieten aufgrund häufigerer Kontakte mit spezifischen oder ähnlichen Antigenen anzutreffen ist.

Diese Ergebnisse unterstreichen die diagnostische Bedeutung „früher IgG“ im Rahmen einer akuten Typhusinfektion, auf die unseres Wissens erstmals von OSLER et al. (1966) hingewiesen wurde. Da IgG jedoch keine oder zumindest nur geringfügige agglutinierende Eigenschaften besitzen, wurden jene bei der Messung von O- und H-Antikörpern im Widaltest oft unterschätzt (LOSPALLUTO et al. 1962, FINK et al. 1962).

Mit einer einmaligen Serumuntersuchung läßt sich – abhängig von der Herkunft der Seren und vom verwendeten Test – ein kulturell gesicherter Typhus abdominalis mit unterschiedlicher Häufigkeit nachweisen (Tab. 2). Als „positiv“ gilt dabei ein Agglutinations- oder relativer ELISA-Titer, der den Mittelwert der entsprechenden Kontrollseren um wenigstens die zweifache Standardabweichung übertrifft.

Bei über 90% der Patienten aus Österreich konnte die Diagnose Salmonelleninfektion sowohl im Widaltest als auch im IgM- und IgA-ELISA bestätigt werden. Bei Patienten aus Hong Kong hingegen wird ein ähnlich gutes Ergebnis nur mit dem IgG-ELISA erreicht.

Ein IgM-spezifischer Test wie der Widaltest mag daher zur Diagnose von Salmonelleninfektionen in Nicht-Endemiegebieten ausreichen; in Gegenden mit häufigerem Vorkommen solcher Erkrankungen dürften hingegen Tests, die auch Immunglobuline der Klasse G erfassen, wichtig sein. Diese Bedingung erfüllt der LPS-ELISA, der sich darüber hinaus durch eine gute Sensitivität und Spezifität auszeichnet (CARLSSON et al. 1972, CARLSSON et al. 1975, SVENUNGSSON et al. 1979, KARLSSON et al. 1980, HIRSCHL et al. 1983), in hervorragender Weise.

TABELLE 2: Anzahl der Patienten (kulturell gesicherter Typhus abdominalis) aus Österreich und Hong Kong mit signifikant erhöhten Serumantikörper-Titern gegenüber dem somatischen Antigen (Widal) oder Lipopolysaccharid (ELISA) von S. typhi

Herkunft der Patienten	Anzahl der Patienten positiv (getestet)				
	Widal	ELISA			
		IgM	IgG	IgA	IgM + IgG
Österreich	15 (16)	15 (16)	11 (16)	13 (14)	15 (16)
Hong Kong	13 (26)	14 (26)	23 (26)	16 (25)	24 (26)

Zusammenfassung

In Seren von 16 und 26 Patienten aus Österreich und Hong Kong mit kulturell gesichertem Typhus abdominalis wurden im Widal-Test bei 93% (Österreich) bzw. lediglich 50% (Hong Kong) der Patienten signifikante Titer nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse (93% bzw. 54% positive Seren) wurden mit einem IgM-ELISA (Antigen LPS von S. typhi) erzielt. Im Gegensatz dazu wurden spezifische IgG nur bei 69% der Patienten aus Österreich, aber 88% der Patienten aus Hong Kong gefunden. IgM-spezifische Tests wie der Widal-Test scheinen daher nur zur Diagnose von Salmonelleninfektionen in Nicht-Endemiegebieten ausreichend zu sein; in Endemiegebieten hingegen sind Tests, wie der ELISA, die auch IgG erfassen, erforderlich.

Summary

Diagnostic value of Salmonella-ELISA and Widal Test in Areas Endemic and Non Endemic for Typhoid Fever

In sera from 16 Austrian and 26 Hong Kong patients with culturally verified typhoid fever (6th–30th day) agglutinating antibodies (Widal-Test) at significant titers were detected in 93% of the former (median titer: 640) but in only 50% of the latter ones (median titer: 240). Similar results (93% and 54% positive sera respectively) were obtained for specific IgM as assessed by ELISA using lipopolysaccharide of *S. typhi* as antigen (median relative titer: 0,32 and 0,21 respectively). In contrast, specific IgG at significant concentrations were found in only 69% of the Austrian (median relative titer: 0,16) but 88% of the Hong Kong sera (median relative titer: 0,71). It is concluded that the (IgM-detecting) Widal-test may be sufficiently diagnostic for typhoid fever in non-endemic areas like Austria. In endemic regions like Hong Kong, however, tests indicative for early specific IgG are indispensable for serological diagnosis of the disease. The ELISA proved useful and is an example for such tests.

Literatur

- BEASLEY, W. J., JOSEPH, S. W., WEISS, E. (1981): Improved serodiagnosis of salmonella enteric fevers by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 13, 106–114
- CARLSSON, H. E., LINDBERG, A. A., HAMMARSTRÖM, S. (1972): Titration of antibodies to salmonella 0 antigens by enzyme linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 6, 703–708
- CARLSSON, H. E., LINDBERG, A. A., HAMMARSTRÖM, S., LJUNGGREN, A. (1975): Quantitation of salmonella 0-antibodies in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 48, 485–494
- CHAU, P. Y., NG, M. H. (1978): Differential agglutination of particulate Vi and 0 antigens by the IgM and IgG class antibodies. *Annst. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 56, 39–45
- CHAU, P. Y., TSANG, R. S. W., LAM, S. K. LA BROOY, J. T., ROWLEY, D. (1981): Antibody response to the lipopolysaccharide and protein antigens of *S. typhi* during typhoid infection. II. Measurement of intestinal antibodies by radioimmunoassay. *Clin. exp. Immunol.* 46, 515–520
- CHERNOKHVOSTOVA, E. K., LUXEMBURG, K. I., STARSHINOVA, V., ANDREEVA, N., GERMAN, G. (1969): Study on the production of IgG-, IgA- and IgM-antibodies to somatic antigens of *Salmonella typhi* in humans. *Clin. Exp. Immunol.* 4, 407–421
- FINK, C. W., MILLER, W., DORWARD, B., LOSPALLUTO, J. (1962): The formation of macroglobulin antibodies. II. Studies on neonatal infants and older children. *J. Clin. Invest.* 41, 1422–1428
- HIRSCHL, A., STANEK, G., ROTTER, M., NIEMETZ, A. H., DIRIDL, G. (1983): Vergleich von ELISA (Lipopolysaccharid) und Widal-Reaktion (0-Antigen) in der Diagnose von Salmonellen-Infektionen. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 255, 247–257
- KARLSSON, K., CARLSSON, H. E., NERINGER, R., LINDBERG, A. A. (1980): Application and usefulness of enzyme immunoassay for diagnosis of *Salmonella typhimurium* infection. *Scand. J. Infect. Dis.* 12, 41–47
- KUMAR, K., MALAVIYA, A. N., MURTHY, R. G. S., VENKATARAMAN, M., MOHAPATRA, L. N. (1974): Immunological study of typhoid: immunoglobulins, C₃, antibodies and leukocyte migration inhibition in patients with typhoid fever and TAB vaccinated individuals. *Infect. Immun.* 10, 1219–1225
- LEVINE, M. M., GRADOS, O., GILMAN, R. H., WOODWARD, W. E., SOLIS-PLAZA, R., WALDMAN, W. (1978): Diagnostic value of the Widal test in areas endemic for typhoid fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 795–800
- LOSPALLUTO, J., MILLER, W. E., DORWARD, B., FINK, C. W. (1962): The formation of macroglobulin antibodies. I. Studies on adult humans. *J. Clin. Invest.* 41, 1415–1421

- OSLER, A. G., MULLIGAN, Jr., J. J., RODRIGUEZ, E. (1966): Weight estimates of rabbit antihuman serum albumin based on antigen binding and precipitin analyses: specific haemagglutinating activities of 7S and 19S components. *J. Immunol.* 96, 334–344
- PROTELL, R. L., SOLOWAY, R. D., MARTIN, W. J., SCHOENFIELD, L. J., SUMMERSKILL, W. H. J. (1971): Anti-salmonella agglutinins in chronic active liver disease. *Lancet* 1, 330–331
- REYNOLDS, D. W., CARPENTER, R. L., SIMON, W. H. (1970): Diagnostic specificity of Widal's reaction for typhoid fever. *J. Am. Med. Assoc.* 214, 2192–2193
- SANSONE, P., SASLAW, M. S., HENNEKEN, Jr., C. H. (1972): High titer Widal reaction. *J. Am. Med. Assoc.* 220, 1615–1616
- SCHROEDER, S. A. (1968): Interpretation of serologic tests for typhoid fever. *J. Am. Med. Assoc.* 206, 839–840
- STUART, B. M., PULLEN, R. J. (1946): Typhoid: clinical analysis of three hundred and sixty cases. *Arch. Intern. Med.* 78, 629–661
- SVENUNGSSON, B., JÖRBECK, H., LINDBERG, A. A. (1979): Diagnosis of salmonella infections: Specificity of indirect immunofluorescence for rapid identification of *Salmonella enteritidis* and usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Infect. Dis.* 140, 927–936
- TSANG, R. S. W., CHAU, P. Y., LAM, S. K., LA BROOY, J. T., ROWLEY, D. (1981): Antibody response to the lipopolysaccharide and protein antigens of salmonella typhi during typhoid fever. I. Measurement of serum antibodies by radioimmunoassay. *Clin. exp. Immunol.* 46, 508–514

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. A. Hirschl
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: 1984

Band/Volume: [6](#)

Autor(en)/Author(s): Hirschl A., Stanek Gerold, Rotter Manfred, Chau P. Y., Niemetz A. H.

Artikel/Article: [Der diagnostische Wert von Salmonella-ELISA und Widal-Test in Gebieten mit sporadischem und endemischem Vorkommen von Typhus abdominalis. 25-32](#)