

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 6 (1984) 41–46

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

Nachweis spezifischer IgA-Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* in Galle und Serum von Kaninchen

Kurt Hermentin und Horst Aspöck

Einleitung

Antikörper der Klasse IgA stellen das wichtigste Immunglobulin des Intestinaltraktes dar (CRABBÉ & HEREMANS, 1966). Sie treten jedoch auch in anderen exokrinen Geweben (Respirationstrakt, Brustdrüse, Speicheldrüse, Urogenitalsystem) und im Serum auf (TOMASI et al., 1965; TOMASI, 1983).

Im Serum liegen die IgA vorwiegend als Monomere vor, im Mucus des Darmtraktes hingegen in Form von „secretory IgA“ (slgA), bestehend aus einem IgA-Dimer mit J-Kette und einer sekretorischen Komponente. Diese slgA werden von zwei unterschiedlichen Zelltypen gebildet: Das dimere IgA samt der J-Kette stammt von Plasmazellen der Submucosa des Darmes, während die sekretorische Komponente, der sogenannte SC-Teil, von den Enterozyten beigesteuert wird. Der SC-Teil ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 60 000; er sitzt an der Oberfläche der Epithelzelle und dient als Rezeptor für das dimere IgA. SC-Teil und IgA-Dimer verbinden sich zum slgA und werden von der Epithelzelle endozytiert. Anschließend erfolgt ein Transport durch die Zelle sowie Abgabe der slgA in das Darmlumen.

Jene IgA-Dimere, die sich mit keinem SC-Teil verbinden, werden über Lymphe und Blut abtransportiert und gelangen in die Leber. Dort binden sie sich dann an Hepatozyten, welche ebenfalls an ihren Oberflächen SC-Teile besitzen, die als Rezeptoren fungieren. (Dies wurde bei Tieren nachgewiesen; beim Menschen tragen nach NAGURA u. Mitarb. (1981) nicht die Hepatozyten, sondern die Epithelien der Gallengänge die SC-Teile.) Es erfolgt nun – gleich wie im Darmtrakt – eine Endozytose, Transport durch die Zelle und Ausstoß der slgA ins Lumen der Gallenkapillaren bzw. der Gallengänge (HALL, 1981). Beim Menschen werden auf diese Weise schätzungsweise bis zu 400 mg slgA pro Tag ins Darmlumen abgegeben (NAGURA et al., 1981).

Der Nachweis der slgA stellt nach wie vor ein Problem dar; er erweist sich aber als bedeutend, wenn es gilt, über den Erfolg oder Mißerfolg von oralen Vakzinierungsversuchen eine Aussage zu treffen.

Im Bereich der Toxoplasmose-Serologie stehen nur sehr geringe und lückenhafte Daten über den Nachweis von IgA bzw. slgA und über deren Titerverläufe zur Verfügung (CHESSUM, 1978; SEGUELA, 1982 a, b). Unser Ziel war es, anhand von enteral mit *Toxoplasma gondii* infizierten Kaninchen zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaße spezifische IgA-Antikörper lokal im Darmtrakt und im Serum nachweisbar sind. Dadurch sollten Richtlinien und Vergleichswerte für zukünftige Immunisierungsversuche erarbeitet werden.

MATERIAL UND METHODE

Versuchstiere:

Mischrassekaninchen, 3–5 kg schwer; als Nahrung diente ausschließlich Trockenfutter.

Erreger:

Trophozoiten von *Toxoplasma gondii* (Stamm T) aus dem Peritonealexsudat weißer Mäuse (OF 1-Swiss).

Untersuchungsmaterial:

- a) Galle: durch Punktion der Gallenblase nach vorangehender Laparotomie gewonnen.
- b) Serum: aus der Ohrtrandvene entnommen.

Serologie:

Ouchterlony-Gelpräzipitationstest:

Gel: Agarose L (Behringwerke, Marburg, BRD).

Antiserum: Anti-Kaninchen Secretory IgA (Cappel Lab., Cochranville, USA) vom Schaf. Reaktion in der Immunelektrophorese: positiv gegenüber Kaninchen IgA, negativ gegenüber Kaninchen IgG und IgM.

Indirekter Immunfluoreszenztest:

Durchgeführt nach den Empfehlungen des Bundesgesundheitsamtes der BRD (Bundesgesundheitsblatt, 1976), jedoch längere Seruminkubationszeit bei Nachweis von IgA- und IgM-Antikörpern: 105 min.

Als Konjugate dienen: Anti-Kaninchen Secretory IgA (Cappel), Fluoreszin-konjugierte IgG-Fraktion vom Schaf. Reaktion in der Immunelektrophorese: positiv gegenüber Kaninchen IgA, negativ gegenüber Kaninchen IgG und IgM.

Anti-Kaninchen IgG (Cappel), Fluoreszin-konjugierte IgG-Fraktion vom Schaf.

Anti-Kaninchen IgM (Cappel), Fluoreszin-konjugierte IgG-Fraktion vom Schaf.

Operationstechnik:

Narkosemittel: 0,15–0,20 g Thiopental i.v., Laparotomie und intraduodenale Injektion von 2–5 Millionen Trophozoiten (gereinigt) bzw. Punktion der Gallenblase.

Nachweis der sekretorischen IgA-Antikörper des Darmes:

Zum Nachweis der sIgA des Darmes stehen 4 Möglichkeiten zur Verfügung:

1. direkt aus der Darmschleimhaut,
2. aus dem Stuhl,
3. aus operativ isolierten Darmschlingen,
4. aus der Galle.

Bei der ersten Nachweismethode ist ein Abtöten der Tiere erforderlich; der sIgA-Gehalt des Darmes kann somit nur zu einem einzigen Zeitpunkt festgestellt werden. Weiters ist die quantitative Erfassung der sIgA schwierig.

Bei der zweiten Nachweismethode ergibt sich das Problem, daß die sIgA stark verdünnt vorliegen, sodaß aufwendige Reinigungs- und Konzentrationsverfahren notwendig sind. Der Kaninchenkot ist für einen solchen Nachweis wegen seiner Flüssigkeitsarmut ungeeignet.

Die dritte Methode stellt die eleganteste dar: Ein zirka 20 cm großes Stück des Ileums wird samt den zu- und abführenden Gefäßen aus dem Darm herausgeschnitten. Die Kontinuität des Darmes wird durch eine Anastomose wiederhergestellt. Das isolierte

Darmstück wird an den Enden mit Plastikschläuchen versehen; diese werden dann subkutan zu einer Öffnung im Nacken des Kaninchens geführt. Die Sekrete der isolierten Darmschlinge können nun täglich durch Einblasen von Luft in einen der beiden Plastikschläuche gewonnen werden. Die sIgA stehen in konzentrierter Form zur Verfügung, die Sekretion kann über einige Zeit lang genau verfolgt werden.

Die Methode erfordert allerdings einen hohen operativen Aufwand, und die Lebensdauer der Versuchstiere ist durch die Schwere des Eingriffs begrenzt. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Eingriff zu einer unspezifischen Stimulierung der Immunozyten und somit zu einer allgemein erhöhten IgA-Ausschüttung führt.

Wir entschieden uns – nach Vorversuchen – für die 4. Methode, den Nachweis aus der Galle. Die sIgA liegen in der Galle in ziemlich konzentrierter Form vor und können somit ohne großen operativen Eingriff und daher mit nur geringer Störung des Immunsystems gewonnen werden.

Der Transport der IgA durch die Leber in die Galle wurde erst Ende der siebziger Jahre nachgewiesen (ORLANS et al., 1978; HALL et al., 1979), sodaß über die Methode des sIgA-Nachweises aus der Galle nur relativ geringe Erfahrungswerte zur Verfügung stehen. Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es daher unter anderem auch sein, die Anwendbarkeit dieser Methode zu überprüfen.

ERGEBNISSE

IgA-Nachweis aus der Galle:

Alle abgenommenen Gallenflüssigkeiten erwiesen sich im Ouchterlony-Gelpräzipitationstest als sIgA-positiv. Zur Bestimmung der Spezifität diente der Indirekte Immunfluoreszenztest. Da die Gallenflüssigkeiten der einzelnen Kaninchen stark unterschiedliche Eindickungsgrade aufwiesen und auch bei ein und demselben Individuum große Konzentrationsunterschiede in einem kurzen Zeitraum auftraten, mußten wir auf eine Titrierung des Antikörpergehaltes verzichten. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Galle-Untersuchung. Wir überprüften den Gehalt an spezifischen sIgA sowie IgM und IgG bei seronegativen Kaninchen, bei seropositiven Kaninchen mit einer alten Infektion (diese Tiere kamen bereits mit einem mittleren IgG-Serumtiter zu uns) und bei seropositiven Kaninchen, die von uns enteral infiziert worden waren und welchen dann 20–30 Tage später die Galle abgenommen wurde.

TABELLE 1: Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* aus der Galle von Kaninchen

	sIgA	IgM	IgG
Toxoplasmose seronegative Kaninchen	5 pos. 16 neg.	21 neg.	21 neg.
Toxoplasmose seropositive Kaninchen (alte Infektion)	6 neg.	6 neg.	6 neg.
Toxoplasmose seropositive Kaninchen (frische Infektion)	13 pos.	1 pos. 12 neg.	4 pos. 9 neg.

IgA-Nachweis aus dem Serum:

Spezifische IgA-Antikörper im Serum konnten in allen von uns infizierten Kaninchen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 1). Sie traten ab dem 11. Tag p.i. auf und erreichten maximale Titerhöhen von 1:64 oder 1:256 im Indirekten Immunfluoreszenz-

test. Im Vergleich zu den nachgewiesenen spezifischen IgM- und IgG-Antikörpern traten die IgA-Antikörper etwas später und in geringerer Höhe auf. Die IgM- und IgG-Antikörper zeigen den gewohnten Kurvenverlauf (Abb. 1).

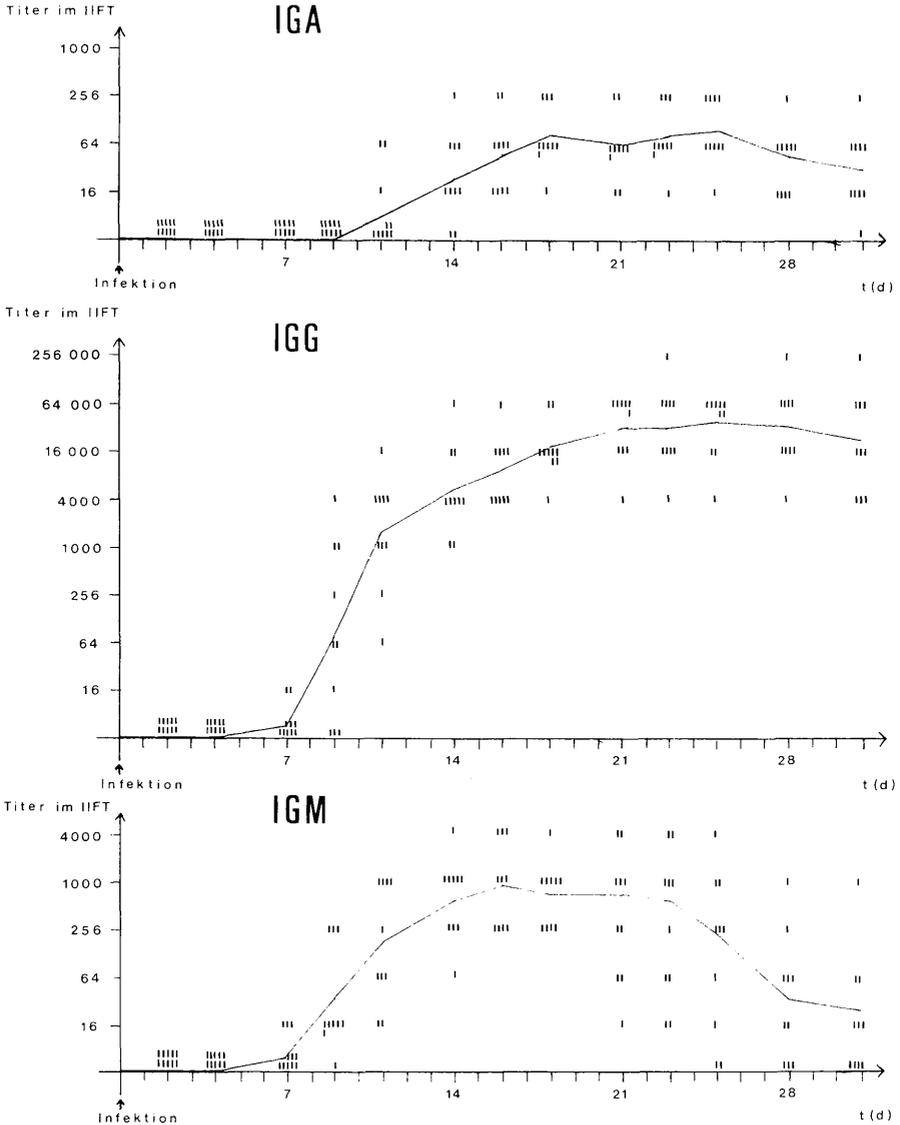


Abb. 1: Serumantikörper von Kaninchen nach Toxoplasma-Infektion (n = 10, individuelle Titer und \bar{x})

Kreuzreaktionen durch andere Kokzidien-Infektionen können nicht für die nachgewiesenen Antikörpertiter verantwortlich gemacht werden, da alle von uns infizierten Kaninchen zu Beginn des Versuches serologisch überprüft wurden und keine kreuzreagierenden Antikörper festgestellt werden konnten.

DISKUSSION

Alle enteral infizierten Kaninchen wiesen in der Galle spezifische IgA-Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* auf (Tab. 1). Des weiteren konnten in der Galle eines frisch infizierten Kaninchens IgM-Antikörper und in der Galle von vier Tieren IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Dieser geringe Prozentsatz an IgM- bzw. IgG-positiven Tieren ist weiter nicht verwunderlich, da auch der normale IgM- und IgG-Gehalt der Kaninchengalle weitaus geringer als der IgA-Gehalt ist (DELACROIX et al., 1982).

Alle seropositiven Kaninchen mit einer alten Infektion waren in der Galle Toxoplasma-sIgA-negativ. Hingegen fällt auf, daß in der Gruppe der seronegativen Kaninchen einige Tiere sIgA-positiv waren. Es dürfte sich dabei um spezifische Reaktionen handeln, denn unsere Kontrollversuche mit Antigenen von Leishmanien und *Ascaris* verliefen negativ. Möglicherweise kann dies als Ausdruck einer Reaktion auf aufgenommenes Toxoplasma-Antigen gedeutet werden: Da die sekretorischen IgA weitgehend von den Serumantikörpern unabhängig reagieren, wäre es möglich, daß aufgenommenes Tot-Antigen zu einer Immunantwort im Darm führt, ohne daß Serumantikörper nachweisbar sind. Es könnte auch sein, daß die Serumantikörper unter der Nachweisbarkeitsgrenze liegen, während die sIgA in der Gallenblase durch das Eindicken der Galle stärker konzentriert vorliegen. Zur weiteren Untersuchung und zur Absicherung der Spezifität werden wir in Zukunft säulenchromatographische Auftrennungen durchführen.

Durch die großen Konzentrationsschwankungen der aus der Gallenblase stammenden Galle konnte keine Titrierung der Antikörper durchgeführt werden. Für genaue sIgA-Antikörpermessungen wird daher in Zukunft die Kanülisierung eines Gallenganges oder der Nachweis der sIgA aus isolierten Darmschlingen notwendig sein. Hier ergibt sich dann jedoch das Problem, daß bei solch schweren Eingriffen die Antikörper-Sekretion nur über einen begrenzten Zeitraum hinweg verfolgt werden kann.

Im Serum konnten spezifische IgA-Antikörper eindeutig ab dem 11. Tag p.i. nachgewiesen werden (Abb. 1). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu differenzieren, ob es sich dabei um monomeres, dimeres oder um secretory IgA handelt.

Wir sind derzeit dabei, zu überprüfen, ob Serum-IgA auch bei humanen, akuten Toxoplasma-Infektionen auftreten und wieweit diese IgA-Antikörper zur Diagnostik akuter Erkrankungen beitragen können. (Der Nachweis des akuten Geschehens ist in der Toxoplasma-Diagnostik bekanntlich dadurch erschwert, daß IgM-Antikörper in niedrigen Titern viele Monate persistieren können; NAOT et al., 1982.)

Zusammenfassung

Kaninchen wurden enteral mit *Toxoplasma gondii* infiziert und mittels des Indirekten Immunfluoreszenztests auf die Bildung spezifischer IgA-Antikörper im Serum und im Darmtrakt untersucht. Die Seren wurden regelmäßig ab dem 2. Tag bis zum 31. Tag p.i. getestet; zur Bestimmung der sIgA-Antikörper wurde den Versuchstieren 20–30 Tage p.i. die Gallenflüssigkeit entnommen. Bei allen infizierten Tieren konnten sowohl im Serum als auch in der Galle spezifische IgA-Antikörper nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den spezifischen IgG- und IgM-Antikörpern im Serum traten die IgA-Antikörper später (ab dem 11. Tag p.i.) und in niedrigeren Titern auf.

Summary

Detection of specific IgA antibodies to *Toxoplasma gondii* in bile and serum of rabbits

The occurrence of specific IgA antibodies was examined in the bowel and in serum of rabbits which had been infected enterically with trophozoites of *Toxoplasma gondii*.

Bile samples were drawn 20 to 30 days after infection, sera were tested regularly from the 2nd to the 31st day. Each of the rabbits developed specific IgA antibodies detectable in the bile and in serum. IgA antibodies in serum could be detected from the 11th day onward, yet to a less extent and later than the IgM and IgG antibodies.

Literatur

- BUNDESGESUNDHEITSBLATT (1976): Empfehlungen für die Durchführung der Toxoplasma-Seroreaktionen mittels Mikromethode. Bundesgesundhbl. 20, 108–112.
- CHESSUM, B. S. (1978): Coproantibody response to oral infection with *Toxoplasma gondii*. Fourth Int. Congr. Parasitol., Warszawa. Short Communications, E, 24–25.
- CRABBÉ, P. A. and J. F. HEREMANS (1966): The distribution of immunoglobulin-containing cells along the human gastrointestinal tract. Gastroenterol. 51, 305–316.
- DELACROIX, D. L., A. M. DENEFF, G. A. ACOSTA, P. C. MONTGOMERY, and J. P. VAERMAN (1982): Immunoglobulins in rabbit hepatic bile: selective secretion of IgA and IgM and active plasma-to-bile transfer of polymeric IgA. Scand. J. Immunol. 16, 343–350.
- HALL, J. (1981): The transport of immunoglobulin A: implications for clinical and experimental medicine. Afr. J. Clin. Exp. Immunol. 2, 195–204.
- HALL, J., E. ORLANS, J. REYNOLDS, C. DEAN, J. PEPPARD, L. GYURE, and S. HOBBS (1979): Occurrence of specific antibodies of the IgA class in the bile of rats. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 59, 75–84.
- NAGURA, H., P. D. SMITH, P. K. NAKANE, and W. R. BROWN (1981): IgA in human bile and liver. J. Immunol. 126, 587–595.
- NAOT, Y., D. R. GUPTILL, and J. S. REMINGTON (1982): Duration of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* after acute acquired toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 145, 770.
- ORLANS, E., J. PEPPARD, J. REYNOLDS, and J. HALL (1978): Rapid active transport of immunoglobulin A from blood to bile. J. Exp. Med. 147, 588–592.
- SEGUELA, J. P. (1982a): Cinétique des anticorps IgA, IgG, IgM dans la toxoplasmose. Lyon Méd. 248 Suppl., 21.
- SEGUELA, J. P. (1982b): Intérêt des profils protéiques dans l'évaluation de l'immunité toxoplasmique. Lyon Méd. 248 Suppl., 23–26.
- TOMASI, T. B. (1983): Mechanisms of immune regulation at mucosal surfaces. Rev. Infect. Dis. 5 Suppl. 4, 784–792.
- TOMASI, T. B., E. M. TAN, A. SOLOMON, and R. A. PRENDERGAST (1965): Characteristics of an immune system common to certain external secretions. J. Exp. Med. 121, 101–125.

ANSCHRIFT DER AUTOREN:

Mag. Dr. Kurt Hermentin, Univ.-Prof. Dr. Horst Aspöck
Abt. f. Med. Parasitologie,
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): Hermentin Kurt, Aspöck Horst

Artikel/Article: [Nachweis spezifischer IgA-Antikörper gegen Toxoplasma gondii in Galle und Serum von Kaninchen. 41-46](#)