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

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8 (1986) 7–15

Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. G. Wiedermann)

Die Beurteilung der Immunität gegen N. meningitidis mit Hilfe der klassenspezifischen Antikörper

Eva Rappold, F. Ambrosch, G. Wiedermann

Einleitung

Seit vielen Jahren stehen Impfstoffe gegen die Meningitis epidemica zur Verfügung, die gereinigte Polysaccharide aus der Kapsel der verschiedenen Gruppen von N. meningitidis enthalten (GOTSCHLICH 1972). Mit Hilfe dieser Impfstoffe konnten verschiedene Epidemien erfolgreich bekämpft werden (LAPEYSSONIE 1963; AMBROSCH und WIEDERMANN 1980). Diese Polysaccharide gehören zu den T-Zell-unabhängigen Antigenen und können direkt eine Immunantwort in der IgG-, IgM- und IgA-Klasse induzieren (AMBROSCH et al. 1980).

Zur Bestimmung der spezifischen Antikörper gegen Menigokokkenpolysaccharide wurden bis jetzt verschiedene Methoden verwendet, wie z. B. Radioimmunoassay, Haemagglutination und indirekte Immunfluoreszenz. Als die verläßlichste Methode zur Beurteilung der Immunität, vor allem nach der aktiven Immunisierung, gilt nach wie vor der Bakterizidietest (WONG et al. 1977). Diese Methode ist jedoch etwas aufwendig und mit einer gewissen Streuung behaftet. Aus diesem Grund haben wir bereits 1977 einen vereinfachten Mikrobakterizidietest vorgeschlagen (AMBROSCH et al. 1977). Noch einfacher und vor allem gut reproduzierbar ist hingegen die Bestimmung der spezifischen Antikörper der IgG-, IgM- und IgA-Klassen mit Hilfe der ELISA-Technik.

Auf Grund der bisherigen Untersuchungen zeigen jedoch sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper bei getrennter Betrachtung nur eine schlechte Korrelation mit dem Bakterizidietest (AMBROSCH et al. 1983). Da an einem Zustandekommen eines bakteriziden Effekts sowohl Komplement als auch Antikörper verschiedener Immunglobulinklassen in regelhafter Weise beteiligt sind, erschien eine rechnerische Umwandlung der klassenspezifischen Titer in Bakterizidietiter denkbar.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war daher, ein geeignetes mathematisches Modell dafür zu finden und auf seine Brauchbarkeit zu prüfen. Dafür wiederum war es notwendig , eine möglichst große Anzahl prä- und postvakzinaler Sera sowohl auf klassenspezifische als auch auf bakterizide Antikörper zu untersuchen.

Material und Methoden

1.1. Impfstoff

Verwendet wurde ein tetravalenter Meningokokkenimpfstoff, der je 50 mcg Kapselpolysaccharid der Gruppen A, C, W 135 und Y enthielt (Hersteller Smith Kline-RIT, Rixensart, Belgien). Dieser Impfstoff war bereits 1981 von uns auf Wirksamkeit und Verträglichkeit untersucht worden (WIEDERMANN et al. 1983; AMBROSCH et al. 1984) und inzwischen in Österreich registriert. Die Einzeldosis von 0,5 ml wurde i. m. injiziert.

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

1.2. Impflinge

Im Rahmen einer Impfaktion des Österreichischen Bundesheeres wurden 700 Personen auf freiwilliger Basis geimpft. Von 500 Personen konnte sowohl eine prä- als auch eine postvakzinale Blutprobe vor bzw. 4 Wochen nach der Impfung gewonnen werden. Von 57 Sera konnten sowohl klassenspezifische ELISA-Titer als auch Bakterizidietiter ermittelt werden.

1.3.1. Bestimmug der klassenspezifischen Titer

Die Bestimmung der spezifischen IgG-, IgM- und IgA-Titer gegen die Meningokokken-Polysaccharide der Gruppen A, C, W und Y erfolgte mit Hilfe der ELISA-Technik. Als Antigene wurden gereinigte Polysaccharide dieser Gruppen verwendet.

Die Beschickung der Mikrotiterplatten (Dynatech, Mikrotiter-Platten) erfolgte bei einer Verdünnung von 1:4000 über Nacht bei 4° C. Nach der Seruminkubation, die ebenfalls über Nacht bei +4° C durchgeführt wurde, erfolgte eine weitere Inkubation mit Phosphatase-markierten klassenspezifischen Anti-IgG, -IgM und IgA Konjugaten (2 Stunden bei +37° C).

Als Substrat wurde p-Nitrophenylphosphat 1:1000 verwendet. Die spektrophotometrische Ablesung wurde in Abhängigkeit von Konjugat nach 15 bis 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 405 nm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms. Als Titer wurde der Schritt des geraden Teils der sigmoidförmigen Kurven mit einem cut-off-Wert von 0.3 definiert (Abb. 1). Dieser Schnittpunkt wurde automatisch berechnet und die individuellen Titerwerte in log_2-Titerstufen ausgedruckt.

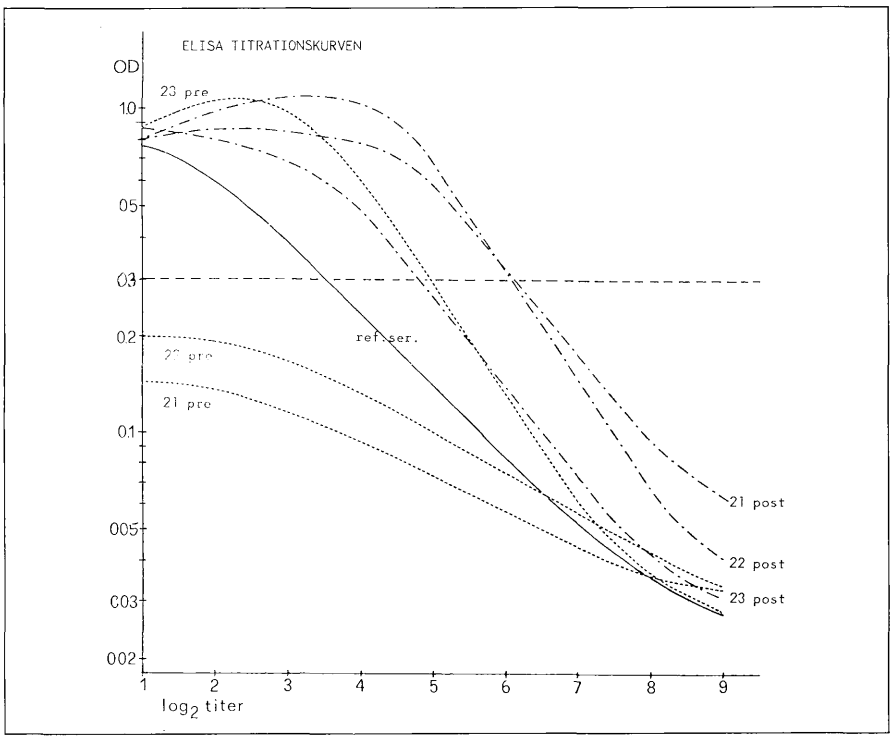

Abb. 1

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

1.3.2. Bestimmung der bakteriziden Titer

Die Bestimmung der bakteriziden Titer erfolgte in den Laboratorien von Smith Kline-RIT nach der von der WHO empfohlenen Methode (WHO 1976).

1.3.3. Umwandlung der klassenspezifischen Titer in Bakterizidietiter

Für die Umwandlung der ermittelten klassenspezifischen Titer in berechnete Bakterizidietiter (BBT) wurden drei verschiedene mathematische Modelle entwickelt, ein kompetitives, ein additives und ein kooperatives (AMBROSCH et al. 1983) (Tab.1).

TABELLE 1:

Berechnung der bakteriziden Titer aus den klassenspezifischen ELISA-Titern

1. Kompetitives Modell
$$BBT = \ln\left(\frac{2^{2xT_{IgG}} + 5x2^{2xT_{IgM}}}{2^{T_{IgG}} + 2^{T_{IgM}} + 2^{T_{IgA}}}\right) \cdot \frac{1}{\ln 2}$$
2. Additives Modell
$$BBT = \ln\left(2^{T_{IgG}} + 5x2^{T_{IgM}}\right) \cdot \frac{1}{\ln 2}$$
3. Kooperatives Modell
$$BBT = \ln\left(2^{T_{IgG}} + 5x2^{T_{IgM}}\right) \cdot \frac{1}{\ln 2} + \sqrt{T_{IgG} + T_{IgM}}$$

BBT = berechneter bakterizider Titer

T_{IgD}, T_{IgM}, T_{IgA} = klassenspezifische ELISA-Titer

Das kompetitive Modell geht von der Annahme aus, daß bakterizide Antikörper der IgG- und IgM-Klassen durch IgA-Antikörper in ihrer Aktivität gehindert werden (GRIFFISS 1975). Das additive Modell berücksichtigt nur die bakterizide Aktivität von IgG- und IgM-Antikörpern. Schließlich wurde ein kooperatives Modell entwickelt, dem eine positive Interaktion zwischen IgG- und IgM-Antikörpern zu Grunde liegt. Dieses Modell zeigte die beste Übereinstimmung.

Ergebnisse

Wir verglichen zuerst die Mittelwerte der berechneten und bestimmten Bakterizidietiter, und zwar für die prä- und postvakzinalen Werte sowie für den Titeranstieg (Tab. 2).

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

TABELLE 2: **Direkt bestimmte (B.T.) und berechnete Bakterizidietiter (B.B.T.) für verschiedene Meningokokkenpolysaccharide (durchschnittliche Titer, Standardabweichung und Variationskoeffizient)**

	B.T.		
	prae	post	Titerdifferenz
A	5,93 ± 2,50 42,2%	11,65 ± 2,82 24,2%	5,72 ± 2,88 50,3%
C	4,70 ± 2,98 63,4%	12,00 ± 2,56 21,3%	7,38 ± 3,41 46,2%
W	3,54 ± 2,01 56,7%	8,84 ± 2,95 33,3%	5,32 ± 2,89 54,3%
Y	4,61 ± 2,71 58,8%	10,36 ± 2,89 27,9%	5,75 ± 3,34 58,1%
	B.B.T.		
	prae	post	Titerdifferenz
A	7,86 ± 2,33 29,6%	12,85 ± 2,21 17,2%	4,99 ± 2,08 41,7%
C	6,52 ± 3,42 52,5%	12,43 ± 2,17 17,5%	5,92 ± 2,48 41,9%
W	9,19 ± 3,22 35,0%	12,66 ± 2,03 16,0%	3,42 ± 2,24 65,5%
Y	8,58 ± 2,80 32,6%	13,44 ± 1,86 13,8%	4,85 ± 2,31 47,6%

Für die Polysaccharide A, C, und Y ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung aller Mittelwerte. Lediglich bei Polysaccharid W 135 sind die prävakzinalen berechneten Durchschnittstiter deutlich höher als die bei direkter Bestimmung erhaltenen Werte.

Als nächstes wurde die Korrelation zwischen berechneten und bestimmten Bakterizidietitern unter Verwendung sowohl der prä- als auch der post-vakzinalen Werte untersucht (Abb. 2–5).

Wie erwartet, zeigt sich bei den Polysacchariden A, C und Y eine gute Korrelation mit den Korrelationskoeffizienten von 0,69 für A, 0,76 für C und 0,71 für Y. Bei Polysaccharid W 135 beträgt der Korrelationskoeffizient 0,47. Alle Korrelationen sind hochsignifikant mit einem $p < 0{,}001$.

Diskussion

Die Mittelwerte der prävakzinalen Titer, der postvakzinalen Titer und der Titeranstiege zeigen beim Vergleich von berechneten Bakterizidietest und direkter Bestimmung eine gute Übereinstimmung.

Bemerkenswert ist, daß die Streuung, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten (Tab. 2) bei den berechneten Werten, insbesondere den postvakzinalen Werten und beim Titeranstieg, deutlich geringer ist als bei den direkt bestimmten. Auch die Korre-

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

lation zwischen den berechneten und bestimmten Werten bei den Polysacchariden A, C, W 135 und Y ist zufriedenstellend.

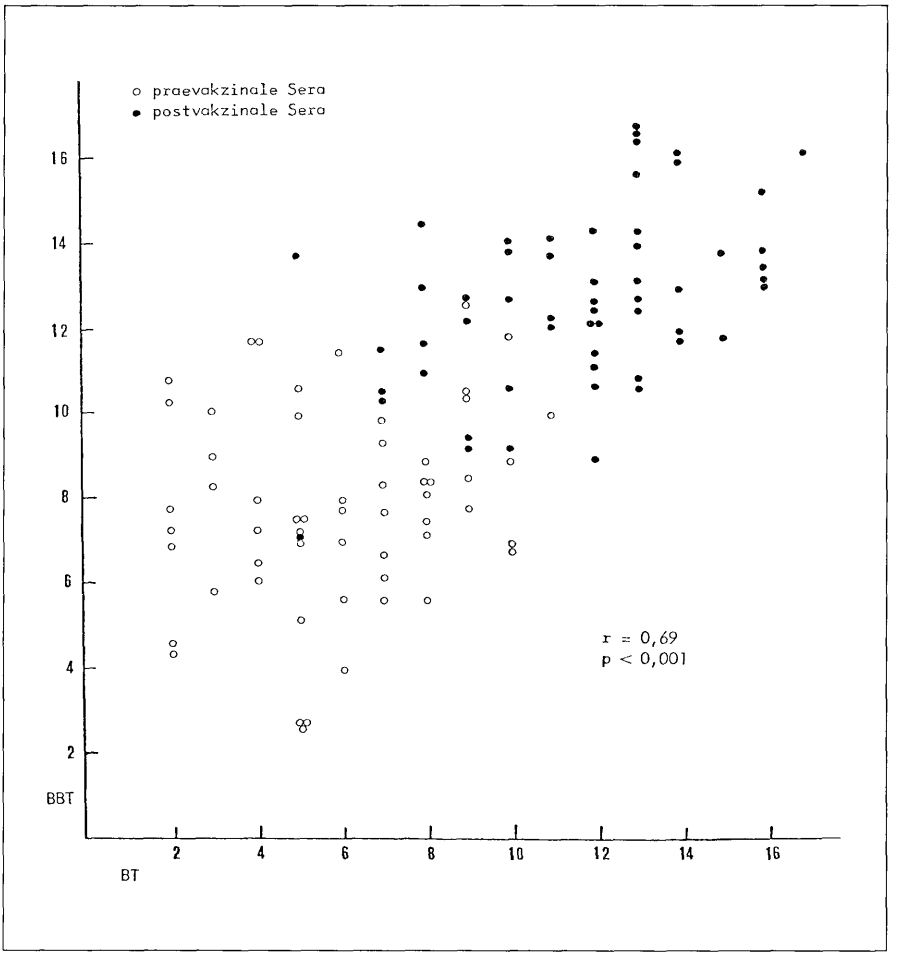

Abb. 2: Korrelation zwischen bestimmtem (BT) und berechnetem Bakterizidietiter (BBT) gegen MPS A

Daher könnte die beschriebene Methode durchaus den Bakterizidietest ersetzen. Dies kommt besonders für die Prüfung von Impfstoffen in Frage. Aber auch für rein immunologische Untersuchungen erscheint die beschriebene Methode wegen ihrer Genauigkeit geeignet.

Auffallend ist die Diskrepanz bei Polysaccharid W 135 beim Vergleich der berechneten und bestimmten prävakzinalen Bakterizidietiter. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß das von uns entwickelte mathematische Modell im Bereich von sehr niedrigen Titern nicht hinreichend genau ist. Eine andere Erklärung wäre das bekannte Prozonenphänomen, das im Bakterizidietest bei hochtitrigen Sera auftreten kann und zu einer scheinbaren Seronegativität führt.

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

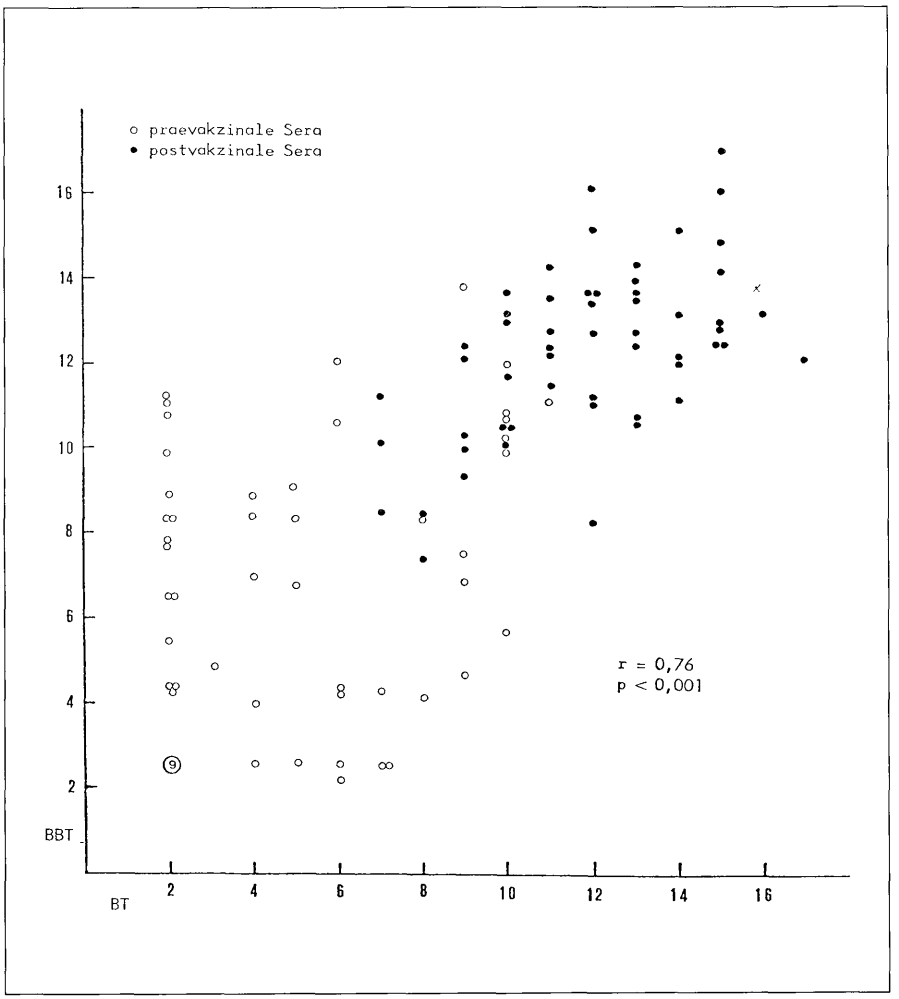

Abb. 3: Korrelation zwischen bestimmtem (BT) und berechnetem Bakterizidietiter (BBT) gegen MPS C

Dafür würde auch sprechen, daß bei der Untersuchung der Immunantwort von Kindern nach Impfung mit einem ähnlichen tetravalenten A, C, W 135 und Y Polysaccharidimpfstoff (CADOZ et al. 1985) der Prozentsatz der im Bakterizidietest gegen Polysaccharid W 135 seronegativen Kinder 42,8 % betrug. Der entsprechende Wert für Polysaccharid C war 71,4%. Bei den von uns untersuchten Erwachsenen würde man einen wesentlich niedrigeren Prozentsatz von seronegativen Probanden erwarten. Tatsächlich betrug dieser bei direkter Durchführung des Bakterizidietests bei Polysaccharid A nur mehr 35,7%, bei Polysaccharid W 135 jedoch 46,4%.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß es möglich ist, klassenspezifische ELISA-Titer gegen Meningokokkenpolysaccharide mit genügender Genauigkeit in Bakterizidietiter umzurechnen. Zur Eichung und Kontrolle ist jedoch die direkte Bestimmung des Bakterzidietiters weiterhin erforderlich.

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

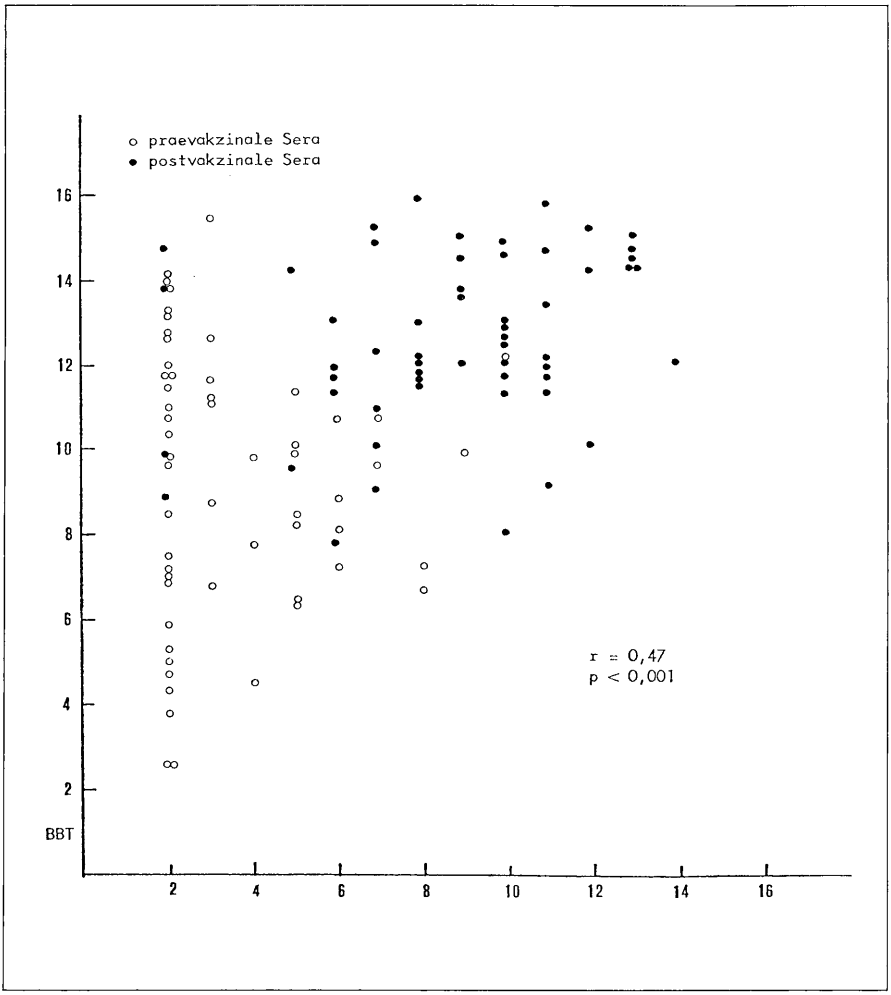

Abb. 4: Korrelation zwischen bestimmtem (BT) und berechnetem Bakterizidietiter (BBT) gegen MPS W 135

Zusammenfassung

Die Bestimmung der bakteriziden Antikörper nach Impfung mit Meningokokkenpolysaccharidimpfstoffen ist aufwendig. Eine Vereinfachung der Bestimmungsmethode, insbesondere der Einsatz der ELISA-Technik, wäre daher von großem Vorteil.

Von 500 Personen, die mit einem tetravalenten Meningokokkenimpfstoff (A, C, W 135, Y) immunisiert worden waren, wurden prä- und postvakzinale Serumproben gewonnen. Mit Hilfe der ELISA-Technik wurden die klassenspezifischen Titer der IgG-, IgM- und IgA-Klassen gegen die einzelnen Polysaccharide bestimmt. Diese klassenspezifischen Titer wurden mit Hilfe eines mathematischen Modells in bakterizide Titer umgerechnet. Bei 57 Impflingen wurden die bakteriziden Titer direkt bestimmt. Die errechneten und die bestimmten Bakterizidietiter ergaben eine gute Korrelation.

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

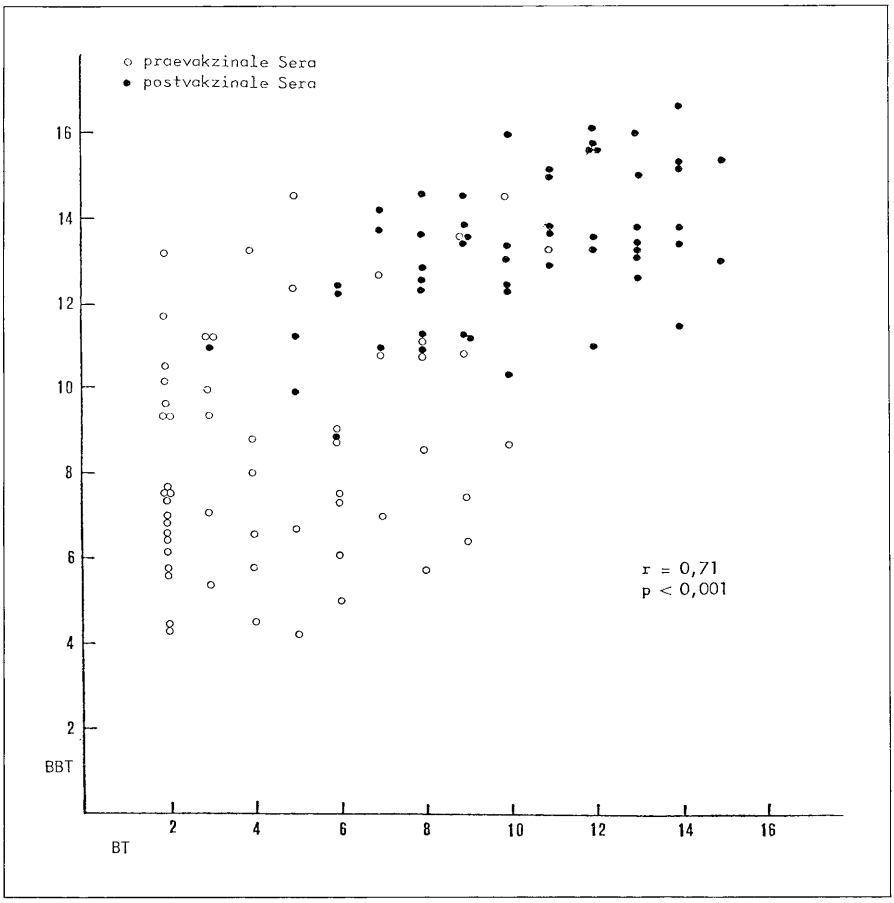

Abb. 5: Korrelation zwischen bestimmtem (BT) und berechnetem Bakterizidietiter (BBT) gegen MPS Y

Summary

Evaluation of immunity against N. meningitidis by means of class specific antibodies

The determination of bactericidal antibodies after immunization with meningococcal polysaccharide vaccines is difficult and expensive. The use of ELISA-technique would be of great advantage.

Pre- and postvaccination serum samples of 500 persones vaccinated with a tetravalent A, C, W 135, Y meningococcal vaccine were investigated. Class specific IgG, IgM and IgA antibodies against the single polysaccharides were determined by means of ELISA-technique. The class specific titers were transformed into bactericidal titers by means of a special formula. Bactericidal titers of 57 pre- and postvaccination sera were determined directly. The calculated and the determined bactericidal titers showed a good correlation.

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

Literatur

AMBROSCH, F., STEMBERGER, H., WIEDERMANN, G., STANEK, G., JOVANOVIC, D. (1977): Determination of meningococcal antibodies by microassay. Bull. Wld. Hlth. Org. 787–790.

AMBROSCH, F., STANEK, G., JÜRGENSSEN, O. (1980): Untersuchung über die durch Meningokokken-Polysaccharid ausgelöste Immunantwort bei Kindern. Immunität und Infektion 8, 11–18.

AMBROSCH, F., WIEDERMANN G. (1980): Tropenmedizinische Bedeutung der Meningokokkenimpfung. Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 2, 22–28.

AMBROSCH, F., RAPPOLD Eva, WIEDERMANN, G. (1983): Evaluation of immunity against meningococci by means of class specific antibodies. Med. Trop. 43, 167–170.

AMBROSCH, F., WIEDERMANN, G., CROOY, P., GEORGE, A. M. (1983): Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent meningococcal polysaccharide vaccine. Bull. Wld. Hlth. Org. 61, 317–323.

AMBROSCH, F., WIEDERMANN, G., GEORGE, A. M., CROOY, P.: Immunologische und klinische Untersuchungen mit einem Vierfachimpfstoff gegen N. mengitidis. Med. in Entwicklungsländern, Band 16 (Tropenmed., Parasitol.). Prof. Dr. J. Boch, Verlag Peter Lang, Frankfurt/Bern/New York 1984.

CADOZ, M., ARMAND, J., ARMINJON, F., GIRE, R., LAFAIX, Ch. (1985): Tetravalent (A, C, Y, W 135) meningococcal vaccine in children: immunogenicity and safety. Vaccine 3, 340–342.

GOTSCHLICH, E. C., REY, M., TRIAU, R., SPARKS, K. J. (1972): Quantitative determination of the human immune response to immunization with meningococcal vaccines. J. Clin. Invest. 51, 89–96.

GRIFFISS, J. M. (1975): Bactericidal activity of meningococcal antisera. Blocking by IgA of lytic antibody in human convalescent sera. J. Immunol. 114, 1779–84.

LAPEYSSONNIE, L. (1963): La meningite cérébro-spinal en Afrique. Bull. Wld. Hlth. Org. 28 (suppl.).

WHO (1976): Technical Report Series, No. 594. (Twentyseventh report of the WHO Expert Committee on Biological Standardization)

WIEDERMANN, G., AMBROSCH, F., GEORGE, A. M., CROOY, P. (1983): Tolerability and immunogenicity of a new tetravealent ACW 135 Y meningococcal polysaccharide vaccine. Med. Tropical 43, 200.

WONG, K. H., BARRERA, O., SUTTON, A., MAY, L., HOCHSTEIN, D., ROBBINS, J. D., ROBBINS, J. B., PARKMAN, P. D., SELIGMAN, E. B. (1977): Standardization and control of meningococcal vaccines group A and group C polysaccharides. J. Biol. Stand. 5, 197–215.

KORRESPONDENZADRESSE:

Frau Dr. Eva Rappold
Institut für Spezifische Prophylaxe
und Tropenmedizin 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: 1986

Band/Volume: 8

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

Artikel/Article: Die Beurteilung der Immunität gegen N. meningitidis mit Hilfe der klassenspezifischen Antikörper. 7-15