

## Experimentelle Untersuchungen über das Auftreten von zirkulierendem Antigen nach Infektion mit *Toxoplasma gondii*

**A. Haßl, H. Auer, O. Picher und H. Aspöck**

### **Einleitung**

*Toxoplasma gondii* zählt zu den wichtigsten Erregern pränataler Infektionen des Menschen. Eine erstmals während der Schwangerschaft eintretende Infektion kann zu einer diaplazentaren Infektion und damit zu einer Schädigung des Ungeborenen führen. Verhindern läßt sich diese Schädigung durch eine frühzeitige Aufdeckung der Infektion verbunden mit einer sofort eingeleiteten Therapie. Die Früherkennung einer Toxoplasma-Infektion während der Schwangerschaft basiert ausschließlich auf serologischen Methoden, wobei dem Nachweis der früh auftretenden spezifischen IgM-Antikörper besondere Bedeutung zukommt (ASPÖCK 1982, ASPÖCK und FLAMM 1984). Wegen der möglichen Persistenz spezifischer IgM-Antikörper über längere Zeiträume hinweg einerseits und wegen verschiedener Fehlermöglichkeiten beim Ablauf der Reaktionen andererseits können indes manchmal Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse auftreten; mehrere in den letzten Jahren eingeführte neue Tests zum Nachweis spezifischer IgM-Antikörper haben diese Probleme zwar entscheidend minimiert, jedoch nicht völlig ausschließen können (z. B. HERMENTIN et al. 1983).

Eine neue Facette in der Früherfassung von Toxoplasma-Infektionen hat sich durch den Nachweis von zirkulierendem Antigen (zAg) ergeben. VAN KNAPEN und PANGGABEAN (1977) entwickelten einen ELISA zum Nachweis von zAg und kamen auf Grund ihrer Befunde zu dem Schluß, daß das mit dieser Methode nachweisbare Antigen unmittelbar nach der Infektion auftritt, also indikativ für eine frische Infektion ist. Wir haben daher den ELISA zum Nachweis von zAg routinemäßig für die Abklärung von Verdachtsfällen im Rahmen der Toxoplasmose-Überwachung der Schwangeren eingeführt (ASPÖCK und FLAMM 1984). Parallel dazu haben wir Untersuchungen über das Auftreten von zAg in experimentell infizierten Versuchstieren und über die Charakterisierung des Antigens in Angriff genommen, über deren erste Ergebnisse wir bereits berichtet haben (HASSL et al. 1984). Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den Ergebnissen einer experimentellen Studie über das Auftreten von zAg in Kaninchen.

## Material und Methoden

### 1. Infektionsmodus:

Zehn weibliche Kaninchen (SPF-Auszuchttiere, Stamm: Iva: CHB) wurden in vier Gruppen (3 x 3 Tiere, 1 Tier) geteilt. Die Tiere der Gruppe 1 wurden oral mit ca.  $4 \times 10^6$  Oozysten, die der Gruppe 2 oral mit ca.  $4 \times 10^6$  Trophozoiten und die der Gruppe 3 intraperitoneal mit ca.  $4 \times 10^6$  Trophozoiten von *Toxoplasma gondii* infiziert. Das zehnte Kaninchen wurde nicht infiziert und diente als Negativkontrolle. Während der Versuchsdauer von 67 Tagen wurden den Tieren alle drei Tage kardial Blut abgenommen; die Seren wurden bis zur Austestung bei  $-20^\circ \text{C}$  gelagert.

### 2. Serologie:

#### 2.1. ELISA zum Nachweis von zirkulierendem Antigen

Bis auf geringe Modifikationen folgten wir der VAN KNAPEN und PANGGA-BEAN (1977) publizierten Methode.

Catching Antibody: F(ab)<sub>2</sub>-Teile einer gereinigten IgG-Fraktion eines mit Oozysten infizierten und geboosterten Spenderkaninchens (IHA-Titer: 1:256).

Konjugat: Mit Peroxidase gekoppelte IgG-Fraktion desselben Tieres.

#### 2.2. ELISA zum Nachweis spezifischer IgG- und IgM-Antikörper

Antigen: Extrakt homogener Trophozoiten (Eigenpräparation)

Konjugat: Goat anti-Rabbit IgG/PO

Fa. Cappel

Goat anti-Rabbit IgG/PO

Fa. US Biochem. Coop

Konjugatverdünnung: 1:1000 in ELISA-Puffer

Substrat für alle Testsysteme:  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit 5-Aminosalizylsäure

Auswertung aller Tests: Photometrische Ablesung bei 450 nm, Angabe der Titer in Extinktionswerten.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Studie sind aus Abb. 1 ersichtlich. Ab dem 6. Tag p. i. konnten bei allen infizierten Kaninchen spezifische IgM-Antikörper, ab dem 9. Tag p. i. auch IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Die bei den Kaninchen der drei Gruppen ermittelten Titerwerte unterschieden sich nur geringfügig; aus Gründen der besseren Übersicht wurden daher in Abb. 1 die Titerwerte zu einer Verlaufskurve pro Antikörperklasse zusammengefaßt. Zirkulierendes Toxoplasma-Antigen war zwischen dem 31. Tag und dem 53. Tag p. i. in Seren der Kaninchen nachweisbar.

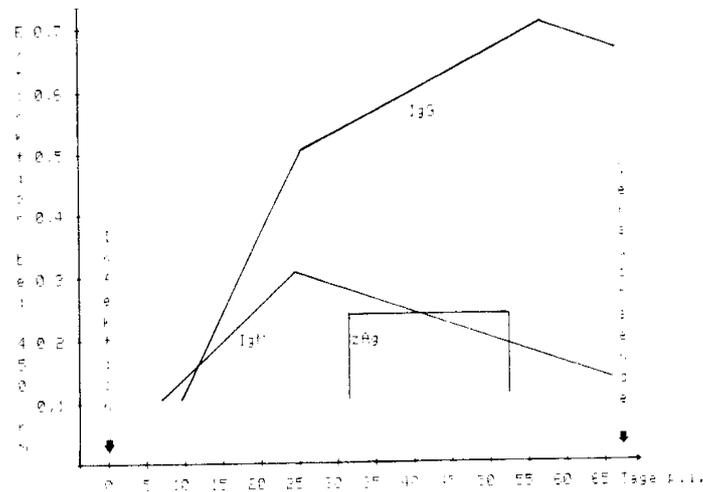


Abb. 1: Titerverläufe in Extinktionswerten nach experimenteller Infektion von Kaninchen mit *Toxoplasma gondii*

### Diskussion

In den letzten Jahren haben sich mehrere Autoren mit dem Nachweis von zirkulierendem *Toxoplasma gondii*-Antigen befaßt (VAN KNAPEN und PANG-GABEAN 1977, RAIZMAN und NEVA 1975). Der Vergleich der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse untereinander und mit den vorliegenden Resultaten ist jedoch problematisch, da der Nachweis von zAg im allgemeinen mit nicht standardisierten und wohl auch schwer standardisierbaren Reagenzien durchgeführt wird. Die Spezifität der F(ab)2-Teile und des Konjugats hängt entscheidend von der Auswahl der Antigene, die für die Immunisierung des Spendertieres verwendet werden, sowie vom Immunisierungsschema selbst und auch von der immunologischen Reaktionsfähigkeit des Tieres ab. Diese — zum Teil nicht beeinflussbaren — Faktoren können der Grund dafür sein, daß wir mit unserem Testsystem zAg erst nach dem Ansteigen des Antikörperspiegels im Serum nachweisen konnten. Wir vermuten, daß durch den Infektionsmodus und durch den zeitlichen Ablauf der Immunisierung des Spendertieres zur Gewinnung der F(ab)2-Teile und des Konjugats vor allem die Produktion von solchen Antikörpern gefördert wird, die eine hohe Affinität zu Zellinnenantigenen aufweisen. In unserem Modell signalisiert der Nachweis von zAg daher vermutlich die Zerstörung der Parasitenzellen durch die Immunabwehr des Wirtes und die Zirkulation von somatischen *Toxoplasma*-Antigenen im Blut. Aus den Ergebnissen unserer Untersuchung muß gefolgert werden, daß die beschriebene Methode zum Nachweis von zAg für die Früherfassung der *Toxoplasma*-Infektion beim Kaninchen nicht geeignet ist. Dies stimmt auch mit den an experimentell infizierten Hausschweinen erhobenen Befunden überein; bei ihnen konnte zAg erst zwischen dem 28. Tag und dem 54. Tag p. i. nachgewiesen werden (HASSL et al. 1984).

Obwohl wir die Ergebnisse der Tierversuche nicht ohne weiteres auf das Infektionsgeschehen beim Menschen übertragen können, vermuten wir doch, daß beim Einsatz desselben Testsystems in der *Toxoplasma*-Diagnostik beim Menschen ähnliche

Ergebnisse erwartet werden müssen. Unter diesem Gesichtspunkt haben Versuche zum Nachweis von zAg im Rahmen der Schwangeren-Vorsorgeuntersuchung einen geringeren Stellenwert als ursprünglich angenommen. Die Bedeutung des Nachweises von zAg bei der Erklärung einer Toxoplasmose bei Personen mit beeinträchtigtem Immunsystem oder bei einer Reinfektion bzw. Exazerbation einer alten Infektion muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

### **Zusammenfassung**

In experimentell mit *Toxoplasma gondii* infizierten Kaninchen wurde das Auftreten von zirkulierendem Erregerantigen mittels ELISA untersucht und mit dem Auftreten von IgG- und IgM-Antikörpern verglichen. Zirkulierendes Antigen konnte erst ab dem 31. und bis zum 53. Tag p. i. nachgewiesen werden. Der späte Nachweis von zirkulierendem Antigen läßt sich plausibel durch die Annahme erklären, daß er vor allem jene Antigene erfaßt, die erst durch die Zerstörung von Toxoplasmazellen im Verlauf der Immunabwehr des infizierten Organismus frei werden. Die bisherigen Vorstellungen über die Bedeutung des Nachweises von zirkulierendem Antigen für die Früherfassung einer Toxoplasma-Infektion beim Menschen bedürfen daher einer weiteren kritischen Überprüfung.

### **Summary**

Experimental studies on the appearance of circulating antigen after infection with *Toxoplasma gondii*.

The appearance of circulating antigen (cag) of *Toxoplasma gondii* was studied in experimentally infected rabbits and compared with the course of IgG and IgM titers. Cag was not detected until the 31st day and remained detectable until the 53rd day p. i., much later than the IgM peak. The late detection of cag can be explained by the assumption that the ELISA used in our studies reacts mainly with antigens which are released by destruction of *Toxoplasma* cells due to the immunological response of the infected organism. The current concept concerning the significance of the detection of cag for the early diagnosis of *Toxoplasma* infections in man needs critical revision.

### **Literatur**

ASPÖCK, H.: Toxoplasmose. — Hoffmann-La Roche, Wien 1982

ASPÖCK, H., H. FLAMM (1984): Die Toxoplasmose-Überwachung während der Schwangerschaft. Api bioMerieux-Monographien Bd. 1, 10—26.

HASSL, A., H. AUER, O. PICHER, H. ASPÖCK (1984): Investigations on detection and characterization of circulating antigen during infection with *Toxoplasma gondii*. — Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 258, 418.

HERMENTIN, K., O. PICHER, H. ASPÖCK, H. AUER, A. HASSL (1983): A solid-

phase indirect haemadsorption assay (SPIHA) for detection of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*: Application to diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. — Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 255, 380—391.

VAN KNAPEN, F. (1984): Immunodiagnosis of toxoplasmosis. — Thesis Univ. Amsterdam, 1984.

VAN KNAPEN, F., S. O. PANGGABEAN (1977): Detection of circulating antigen during acute infections with *Toxoplasma gondii* by enzyme-linked immunosorbent assay. — J. Clin. Microbiol. 6. 545—547.

RAIZMAN, R., F. NEVA (1975): Detection of circulating antigen in acute experimental infections with *Toxoplasma gondii*. — J. Infect. Dis. 132, 44—48.

**KORRESPONDENZADRESSE:**

Dr. A. Haßl

Abt. für Med. Parasitologie, Hygiene-Institut der Universität  
Kinderspitalgasse 15, A-1095 Wien.