

Vergleich und Bewertung des quantitativen Nachweises spezifischer IgM- und IgA-Antikörper gegen Toxoplasma gondii in Serumproben von Schwangeren

A. Obwaller, A. Haßl, O. Picher, H. Aspöck

Einleitung Die Ermittlung des Toxoplasmose-Status im Rahmen des Schwangeren-Screenings basiert auf serologischen Methoden zum Nachweis spezifischer Antikörper. Direkte Verfahren und gentechnische diagnostische Methoden (PCR) können wichtige ergänzende Verfahren zur Abklärung der Frage darstellen, ob das Ungeborene infiziert ist. In den weitaus meisten Fällen genügt der Einsatz eines Basistests – in Österreich werden hierfür der Indirekte Immunfluoreszenz-Test (IIFT) oder alternativ der Sabin-Feldmann-Test (SFT) eingesetzt – in Kombination mit leistungsfähigen Tests zum Nachweis spezifischer IgM-Antikörper, um die Frage abzuklären, ob die Frau seronegativ ist oder ob – im Falle einer Seropositivität – eine Erstinfektion vorliegt (3). Daneben verbleibt aber eine gewisse Zahl von Fällen, bei denen die Abklärung schwierig ist. Im besonderen sind es einerseits jene seropositiven Frauen, bei denen trotz einer frischen Infektion nur ein niedriger IgM-Antikörper-Titer erreicht wird (10), andererseits jene, bei denen alte Infektionen durch manchmal jahrelang persistierende IgM-Antikörper fehlinterpretiert werden können (1). In der jüngsten Zeit hat daher der Nachweis spezifischer IgA-Antikörper als möglicher Indikator des Beginns einer Infektion zunehmende Beachtung erfahren. In verschiedenen Laboratorien wurde und wird die Frage untersucht, ob und in welchem Ausmaß Tests zum Nachweis von spezifischem IgA als Entscheidungshilfen eingesetzt werden können. Auch wir haben uns intensiv mit der Frage der Bedeutung von IgA-Tests für das Schwangeren-Screening auseinandergesetzt und berichten im folgenden über die Ergebnisse einer Studie, bei der wir den Infektionsstatus von seropositiven Schwangeren mit Hilfe einer Kombination von Tests zum quantitativen Nachweis spezifischer Antikörper der Klassen G, M und A zu bestimmen versuchten.

In einer retrospektiv getroffenen Zuordnung der Seren zu definierten Infektionsstadien anhand der Höhe des IgG-Titers und der IgG-Titerbewegungen sollten im Sinne eines Indikators für eine Frischinfektion der positive Voraussagungswert des IgA-Nachweises bestimmt und die Persistenz hoher IgM- und IgA-Titer überprüft werden.

Material und Methode

Seren Insgesamt wurden 306 Seren von 122 Schwangeren aus dem Zeitraum von Jänner bis Dezember 1992 in die Untersuchung aufgenommen. Von jeder Schwangeren standen mindestens zwei Seren zur Verfügung. Bei allen diesen Frauen waren im Laufe des Beobachtungszeitraumes im IIFT auffallende Titerbewegungen festgestellt worden (2).

Tests Als Basistest diente ein hausintern hergestellter IIFT, standardisiert nach einer Empfehlung des Bundesgesundheitsamtes Berlin (5), mit einem Antihuman-Ig/FITC-Konjugat aus der Ziege (Behringwerke AG, Marburg/Lahn, Bundesrepublik Deutschland). Die Titerendpunkte wurden in Serumverdünnungen angegeben. Titer ab 1:6 wurden als Ausdruck einer bestehenden Infektion interpretiert.

Zum Nachweis spezifischer Antikörper der Klassen G, M und A wurden ELISA-Kits der Firma Sorin (Saluggia, Italien), nämlich ETI-TOXOK-G, sowie ETI-TOXOK-M und ETI-TOXOK-A verwendet. Die Tests zum Nachweis von IgM und IgA stellen „antibody capture assays“ dar. Der Test auf spezifische IgM-Antikörper, vom Hersteller ursprünglich als qualitativer Test ausgelegt, wurde von uns zu einem Test zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern modifiziert.

- Negativkontrolle** Als negatives Kontrollserum wurde ein Poolserum aus 80 Seren verwendet, die in allen verfügbaren Tests als nicht spezifisch reaktiv gegen *Toxoplasma gondii* beurteilt worden waren.
- Beurteilung der Tests** Die Titer der spezifischen Antikörper wurden in allen drei Tests anhand je einer mit fünf Kalibratoren berechneten Standardkurve ermittelt. Die Standardseren des IgG-Tests wurden gegen das Referenzserum der WHO (1977) kalibriert. Zur Quantifikation spezifischer Immunglobuline der Klasse M wurde das im Kit enthaltene positive Kontrollserum austitriert und als Kalibrator verwendet. Als Maßeinheit dienten von uns definierte Laboreinheiten. IgA-Titer wurden laut Vorschrift des Testherstellers bestimmt und in Arbitrary Units (AU) angegeben. IgG-Titer wurden in Int. Units (IU) per ml ausgedrückt. Als anti-Toxoplasma negativ galt ein Titer unter 15 IU. Um die Resultate der Tests auf spezifische Antikörper der Klassen M und A zu standardisieren (9), wurden die anhand der Standardkurve berechneten Titer durch den Titer der Negativkontrolle dividiert und in MANI (Multiplizierte Aktivität Nicht Infizierter) angegeben. Ein Vergleich mit den Angaben des Testherstellers ergab einen Positiv-Grenzwert von 5 MANI. Titer im Bereich zwischen 6 - 10 MANI gelten als niedrig positiv und Titer über 10 MANI als hoch positiv. Wenn ein Serum bei Normalverdünnung (1:101) höhere Extinktionen als der höchste Kalibrator verursachte, wurde die Verdünnung auf 1:2020 erhöht und das dabei erhaltene Ergebnis mit 20 multipliziert.
- Einteilung der Seren** Anhand der Höhe des IgG-Titers und der Titerbewegungen wurden die Seren folgenden Gruppen zugeteilt:
- Gruppe A Nicht infiziert:**
Seren von Fällen mit IgG-Titern durchwegs unter 15 IU.
- Gruppe B Frischinfektionen mit folgender Spezifizierung:**
- B1 Unmittelbar vor oder nach Infektion:**
Seren mit IgG-Titern unter 15 IU von Fällen mit Titerkonversion.
- B2 Frühes Akutstadium:**
Seren mit einem Titer über 14 IU von Fällen mit steigender IgG-Tendenz bis 200 IU. Folgende Bedingungen mußten erfüllt werden: Als steigend galt eine IgG-Steigerung von über 10% innerhalb eines Monats und von über 15% nach einem Monat Zeitabstand zwischen den Blutabnahmen. In jedem Fall mußte der Titerunterschied zwischen zwei Folgeseren mindestens 10 IU betragen. Die letzte negative Probe eines Falles durfte nicht mehr als drei Monate vor der ersten Probe mit positivem IgG-Titer liegen.
- B3 Hohe Immunantwort:**
Seren mit einem IgG-Titer über 200 IU.
- B4 Abklingende Immunantwort:**
Seren zu Fällen im Übergang zu fallender oder stagnierender Tendenz. Mindestens ein Serum des Falles mußte der Gruppe B2 zugeordnet sein, die Folgeseren mußten einen Titer unter 200 IU aufweisen. Bei einer Zeitdistanz von mehr als 4 Monaten zwischen einem Serum dieser Qualität und dem Serum der Gruppe B2 wurde dieses automatisch der Gruppe C zugeordnet.

Tabelle 1:

Anzahl der Seren (n) pro Gruppe.

Gruppe	Definition	n	%
A	Nicht infiziert	15	4,9
B 1	Unmittelbar vor oder nach der Infektion	9	2,9
B 2	Frühes Akut-Stadium	24	7,8
B 3	Hohe Immunantwort	159	52,0
B 4	Abklingende Immunantwort	26	8,5
C	Latente Infektionen	73	23,9

Tabelle 2:

Ergebnisse der Gruppe B 2.

Anzahl der Seren pro IgM- und IgA-Titerbereich.

Spez. IgM in MANI	Spezifisches IgA in MANI						Summe
	1 - 5	6 - 10	11 - 20	21 - 35	36 - 60	> 60	
1 - 5	5	—	—	—	—	—	5
6 - 10	—	—	1	—	1	—	2
11 - 20	1	1	1	—	1	—	4
21 - 35	1	1	—	—	—	3	5
36 - 60	1	1	1	—	1	—	4
> 60	2	—	1	—	—	1	4
Summe	10	3	4	—	3	4	24

Ergebnisse der Tests auf spezifische Antikörper der Klassen M und A

Gruppe A

Alle 15 Seren lagen in beiden Tests durchwegs in einem Titerbereich von 1 - 5 MANI und waren somit als nicht spezifisch reaktiv zu beurteilen.

Gruppe B 1

Bei acht Seren konnten keine erhöhten IgA-Titer festgestellt werden, während der Titer eines Serums im hochpositiven Bereich lag. Bei einem Serum wurde ein niedriger und bei drei Seren ein hochpositiver IgM-Titer festgestellt. Drei Seren mit positiven IgM- und/oder IgA-Titern zeigten im IIFT bereits Titer von 1:16 bis 1:64.

Gruppen B 2, B 3 und B 4

Die Ergebnisse der Tests auf spezifische Antikörper der Klassen M und A sind aus den Tabellen 2, 3 und 4 ersichtlich.

Gruppe C

61 (62) Seren waren im IgM- (IgA-) Test bei einer Übereinstimmung von 76,7% als nicht reaktiv zu beurteilen. 6 (5) zeigten niedrig positive IgM- (IgA-) Titer. Vier Seren ergaben in jeweils einem und zwei in beiden Tests hochpositive Titer.

Diskussion

In der vorliegenden Studie versuchten wir, den Infektionszeitpunkt von seropositiven Schwangeren anhand der quantitativen Bestimmung spezifischer Antikörper der Klassen M und A genauer einzugrenzen.

Gruppe C

Latente Infektion:

Seren mit einem spezifischen IgG-Titer über 14 IU von Fällen, bei denen nie ein IgG-Titer über 200 IU gemessen wurde und bei denen fallende oder stagnierende Tendenz vorlag.

Der Grenzwert von 200 Internationalen Einheiten wurde willkürlich gewählt. Die Zeitdistanz zwischen zwei Blutabnahmen mußte mindestens zehn Tage betragen. Sprünge über zwei Gruppen in der Zuordnung der Seren wurden nur bei einem Abstand von mindestens vier Monaten zwischen den Probenentnahmen möglich. Serumproben eines Falles, die innerhalb eines Zeitraumes von zwei Monaten entnommen wurden (ausgenommen Fälle mit Titerkonversion) und die per definitionem in drei verschiedene Gruppen gefallen wären, wurden aus dem Kollektiv genommen.

Ergebnisse

Tabelle 1 zeigt die Anzahl der Seren, die den sechs Gruppen unterschiedlicher Stadien der Immunität gegen *Toxoplasma gondii* zugeordnet wurden.

Tabelle 3:

Ergebnisse der Gruppe B3.
Anzahl der Seren pro IgM- und IgA-Titerbereich.

Spez. IgM in MANI	Spezifisches IgA in MANI						Summe
	1 - 5	6 - 10	11 - 20	21 - 35	36 - 60	> 60	
1 - 5	47	3	2	1	1	1	55
6 - 10	12	6	7	2	4	1	32
11 - 20	3	5	7	2	4	2	23
21 - 35	1	3	3	1	4	4	16
36 - 60	1	3	2	1	3	5	15
> 60	—	1	2	2	3	10	18
Summe	64	21	23	9	19	23	159

Tabelle 4:

Ergebnisse der Gruppe B4.
Anzahl der Seren pro IgM- und IgA-Titerbereich.

Spez. IgM in MANI	Spezifisches IgA in MANI						Summe
	1 - 5	6 - 10	11 - 20	21 - 35	36 - 60	> 60	
1 - 5	10	—	—	—	—	—	10
6 - 10	3	4	—	—	1	—	8
11 - 20	—	1	2	1	—	—	4
21 - 35	1	—	1	—	—	—	2
36 - 60	1	—	—	—	—	—	1
> 60	—	—	—	—	1	—	1
Summe	15	5	3	1	2	—	26

Die Berechnung und die damit verbundene Relativierung testinterner Schwankungen der Ergebnisse der IgM- und IgA-Tests durch den Vergleich mit dem negativen Kontrollserum erwies sich entsprechend früherer Erfahrungen als sehr zweckdienlich (9).

Daß bei Fällen mit Titerkonversion bereits erhöhte IgM- und IgA-Titer bei noch negativem IgG-Titer auftreten, zeigt, daß ein ELISA dieser Zusammenstellung (lysiertes Antigen und selektive Anti-IgG-Spezifität des Konjugats) ungeeignet ist, Antikörper des frühesten Infektionsstadiums festzustellen (13). Bei einem Fall wurde bereits ein erhöhter IgM-Titer festgestellt, obwohl weder im Anti-IgG-ELISA noch im IIFT ein als spezifisch reaktiv zu beurteilender Antikörper-Titer zu beobachten war. Da aber auch sieben Wochen nach dieser erstmals beobachteten IgM-Reaktivität ein Titer von 1 : 64 im IIFT bzw. von 18 IU im Anti-IgG-ELISA nicht überschritten wurde, kann nicht beurteilt werden, ob es sich dabei um eine für eine Frischinfektion spezifische IgM-Reaktion handelte oder um persistierende IgM-Antikörper einer latenten Infektion bei falsch negativer Beurteilung des ersten Serums im IIFT.

Fehlende IgM-Antworten bei klinisch dokumentierten Erstinfektionen wurden bereits von mehreren Autoren beschrieben (6, 10). Für den relativ hohen Anteil von

20,8% negativer IgM-Ergebnisse in der Serumgruppe B2 sind mehrere Erklärungen möglich. Zum einen ist das Probenkollektiv mit 24 Seren gering und eine Berechnung relativer Anteile damit sehr „Ausreißer-empfindlich“, zum anderen können auch Reinfektionen den Anstieg spezifischer Antikörper der Klasse G bei fehlender IgM- und IgA-Reaktion verursacht haben.

Übereinstimmend mit anderen Autoren (4, 7, 11, 12) haben wir festgestellt, daß erhöhte IgA-Titer im frühen Infektionsstadium nicht so zuverlässig wie erhöhte IgM-Titer auftreten und/oder nur über kurze Zeitspannen hinweg nachgewiesen werden können.

Beim Vergleich der Titerhöhen zwischen den Serumgruppen kann festgestellt werden, daß negative und niedrig positive IgA-Titer in den Gruppen B2 und B3 sowie in den Gruppen B4 und C annähernd gleich häufig auftreten, während spezifische IgM-Konzentrationen im negativen und schwach positiven Bereich kontinuierlich zunehmen.

Für die Beurteilung des Toxoplasmose-Status einer Schwangeren besitzen absolute Titerhöhen spezifischer Antikörper der Klassen M und A zu wenig Aussagekraft (siehe auch 8, 14), um, basierend auf den Ergebnissen eines einzelnen Serums, eine sichere Abklärung herbeizuführen. Die Heterogenität ihres zeitlichen Auftretens ist zu groß, um als charakteristisch für unterschiedliche Infektionsstadien zu gelten. Insbesondere hat spezifisches IgA als zusätzlicher Parameter sicherlich nur additive, nicht aber ausschließende Aussagekraft (4, 7).

Eine Abklärung kann derzeit nur durch die quantitative Bestimmung aller drei besprochenen Ig-Klassen mit dafür ausreichend sensitiven Testsystemen und durch Vergleich der Titerhöhen von konsekutiven Seren (Blutabnahme im Abstand von 10 bis 20 Tagen) getroffen werden. Die dabei auftretenden Titerbewegungen, insbesondere der Klassen M und A, können in diesem Zeitraum mit genügender Schärfe festgestellt werden, sodaß eine überzeugende Interpretation möglich wird.

Zusammenfassung 306 Seren von 122 Frauen, bei denen im Rahmen des Schwangeren-Screenings zur Beurteilung des Toxoplasmose-Status auffällige Titerbewegungen im IIFT festgestellt worden waren, wurden mittels ELISA-Technik auf spezifische Antikörper der Klassen G, M und A getestet. Der Vergleich der ermittelten IgM- und IgA-Titer von Serumproben von Fällen unterschiedlicher Infektionsstadien ergab zwar deutliche Unterschiede, eine sichere Abklärung erscheint derzeit jedoch nach wie vor nur durch den Vergleich der Testergebnisse von mindestens zwei konsekutiven Seren möglich.

Die Höhe des IgM-Titers hat sich gegenüber der Höhe des IgA-Titers als der eindeutig zuverlässigere Parameter für eine Unterscheidung zwischen akuter und latenter Infektion erwiesen. Der im IgA-Test erhobene Befund stellt aber eine sehr gute zusätzliche Entscheidungshilfe dar, wenn der Verdacht auf eine Akutinfektion zwar gegeben ist, aber keine hohen IgM-Titer feststellbar sind.

Schlüsselwörter *Toxoplasma gondii*, IgA-Antikörper, IgM-Antikörper, ELISA.

Summary *Comparison and evaluation of a quantitative determination of specific IgM- and IgA-antibodies against Toxoplasma gondii in serum samples of pregnant women*

In a comparative study 306 sera of 122 pregnant women with obvious differences of antibody-titres of subsequent serum samples drawn at the occasion of toxoplasmosis screening were tested for specific IgG, IgM and IgA antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. Based on the IgG-titres of consecutive serum samples the sera were classified into different groups, which represent different stages of infection. A comparative evaluation of the IgM- and IgA-titres of the sera of these groups showed clear differences, at present a reliable assessment of the state of immunity can, however, only be made by comparing titres of consecutive serum samples.

The results demonstrate convincingly that the level of IgM-antibodies is the more reliable parameter for differentiation between acute and latent infections than the level of IgA-antibodies. The IgA-test is, however, of importance for the interpretation of cases with insignificant IgM-titres.

Key words *Toxoplasma gondii*, ELISA, IgM-antibodies, IgA-antibodies.

Literatur

1. ADES, A. E. (1991):
Evaluating the sensitivity and predictive value of tests of recent infection: toxoplasmosis in pregnancy.
Epidemiol. Infect. 107, 527-535.
2. ASPÖCK, H., FLAMM, H., PICHER, O. (1986):
Die Toxoplasmose-Überwachung während der Schwangerschaft – 10 Jahre Erfahrungen in Österreich.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8, 105-113.
3. ASPÖCK, H., POLLAK, A. (1992):
Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria.
Scand. J. Infect. Dis.-Suppl. 84, 32-38.
4. BESSIERES, M. H., ROQUES, C., BERREBI, A., BARRE, V., CAZAUX, M., SÉGUÉLA, J. P. (1992):
IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis.
J. Clin. Pathol. 45, 605-608.
5. BUNDESGESUNDHEITSAMT (1976):
Empfehlungen für die Durchführung der Toxoplasma-Seroreaktion mittels Mikromethode.
Bundesgesundheitsblatt 20, 108-112.
6. DEL BONO, V., CANESSA, A., BRUZZI, P., FIORELLI, M. A., TERRAGNA, A. (1989):
Significance of specific Immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of Toxoplasma lymphadenopathy.
J. Clin. Microbiol. 27, 2133-2135.
7. FRANCIS, J. M., JOYNSON, D. H. M. (1993):
Duration of specific Immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by enzyme Immunoassay and Immunosorbent agglutination assay.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12, 556-559.
8. GROSS, U., ROOS, T., APPOLDT, D., HEESEMANN, J. (1992):
Improved serological diagnosis of Toxoplasma gondii infection by detection of Immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 by using the Immunoblot technique.
J. Clin. Microbiol. 30, 1436-1441.
9. HASSL, A., HARMER, Ch., ASPÖCK, H. (1993):
Untersuchungen über die Bedeutung des Nachweises spezifischer IgA-Antikörper zur Aufdeckung einer Toxoplasmose bei HIV-1-Positiven.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 15, 125-128.
10. JANITSCHKE, K., SENK, U., HOFFMANN, H. G., DEMPE, S. (1989):
Aussagekraft von Befunden, erhoben durch Enzymimmunoassays auf Toxoplasma-IgG- und IgM-Antikörper.
Z. Geburtsh. u. Perinat. 193, 203-207.
11. SAATHOFF, M., SEITZ, H. M. (1992):
Nachweis von toxoplasmaspezifischen IgA- und IgM-Antikörper in Serumproben von Erwachsenen mit Toxoplasma-Infektion.
Z. Geburtsh. u. Perinat. 196, 221-223.
12. STEPICK-BIEK, P., THULLIEZ, P., ARAUJO, F. G., REMINGTON, J. S. (1990):
IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis.
J. Infect. Dis. 162, 270-273.
13. THULLIEZ, P., DAFFOS, F., FORESTIER, F. (1992):
Diagnosis of Toxoplasma infection in the pregnant woman and the unborn child: current problems.
Scand. J. Infect. Dis.-Suppl. 84, 18-22.
14. VEERHOFSTEDÉ, C., VAN RENTERGHEM, L., PLUM, J. (1990):
Evaluation of Immunoblotting for the detection of Toxoplasma gondii Immunoglobulin M antibodies.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9, 535-537.

Korrespondenzadresse: Cand. rer. nat. Andreas Obwaller
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria