

*Antigen-Präparationen für Enzym-Immuntests zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* – Übersicht und Vorstellung eines neuen Tests*

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

Einleitung

Die Diagnostik der Toxoplasma-Infektion hat drei Hauptanwendungsgebiete; sie betrifft 1.) die (in der Regel harmlose) postnatale Toxoplasmose der Immunkompetenten, 2.) die meist lebensbedrohende Toxoplasmose der Immunsupprimierten und schließlich 3.) die klinisch fast immer inapparente Toxoplasma-Infektion der Schwangeren, die nicht für die betroffene Frau, um so mehr jedoch für das Ungeborene, das durch eine pränatale Infektion geschädigt werden kann, von Bedeutung ist. Der weitaus größte Teil der laboratoriumsdiagnostischen Untersuchungen auf Toxoplasmose erfolgt im Rahmen des Schwangeren-Screenings. Dabei wird zunächst der serologische Status ermittelt, durch den Einsatz zusätzlicher Tests können Verdachtsfälle abgeklärt und Erstinfektionen während der Schwangerschaft aufgedeckt werden. Die dafür eingesetzten Basistests sollen zum einen möglichst kostengünstig und einfach in ihrer Durchführung sein, zum anderen müssen sie eine hohe Sensitivität gegenüber Antikörpern der frühesten Infektionsphase aufweisen. Die zu diesem Zweck am häufigsten eingesetzten Tests sind der Indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT), die direkte Agglutination (DA) und das ELISA-System (16). IIFT und DA zeichnen sich zwar durch ihre hohe Sensitivität und Spezifität aus, die ausschließlich manuelle Ausführung des Tests, sowie das nicht standardisierbare Ablesen des Titerendpunktes unter dem Mikroskop stellen jedoch Fehlerquellen dar. Das ELISA-System hingegen bietet zwar durch seine Automatisierbarkeit große Vorteile, Studien haben jedoch gezeigt, daß die dabei erzielten Ergebnisse nur bedingt mit denen aus den bereits erwähnten etablierten Basistests IIFT und DA vergleichbar sind (19, 31). Als Grund für diese Abweichungen kann wohl hauptsächlich die unterschiedliche Antigen-Präparation angesehen werden. Denn während sowohl im IIFT, als auch in der DA ausschließlich membranständige Antigene zum Einsatz kommen, werden beim ELISA meist Lysate und damit hauptsächlich wasserlösliche intrazelluläre Antigene auf die Mikrotiterplatten aufgetragen. Der Einsatz von Membranantigenen erscheint aber gerade deshalb sehr wichtig, da in der frühesten Infektionsphase hauptsächlich Antikörper gegen Antigene der Zellmembran der Toxoplasmen gebildet werden und erst nach erfolgter Lyse der Trophozoiten intrazelluläre Antigene freigesetzt werden. Im folgenden soll nun unter Punkt I ein Überblick über die verschiedenen Methoden der Antigen-Präparation gegeben und unter Punkt II ein ELISA vorgestellt werden, in dem durch die Art der Kultivierung und Präparation des Antigens die unter Punkt I erwähnten Schwachstellen behoben werden.

I. Antigen-Präparationen für Enzym-Immuntests

Lysat

Die Membranen der Toxoplasmen werden durch Detergenzien (17), durch wiederholtes Einfrieren und anschließendes Auftauen (32), durch Ultraschall (2, 5) oder durch die Kombination letztgenannter Techniken (9, 20, 21) zerstört. Die dabei erhaltenen Lösungen werden anschließend zentrifugiert, und der Überstand in die Nöpfchen der Mikrotiterplatten pipettiert. Das Antigen wird nun durch Eintrocknen oder durch die Verwendung eines „Coating Puffers“ (siehe Material und Methoden) an die Oberfläche der Nöpfchen gebunden. Bei dieser Methode der Aufbereitung des Antigens werden jedoch hauptsächlich wasserlösliche, intrazelluläre Komponenten der Toxoplasmen aufgetragen, größere Membranteile sind in diesem Antigen wahrscheinlich nicht enthalten. Vergleichsstudien (19, 31) ergaben, daß die mit diesen Tests erzielten Ergebnisse zum Teil stark von den in den Referenztests (IIFT, SFT) erhaltenen Resultaten abweichen.

In einer weiteren Modifikation der oben beschriebenen Antigen-Präparationen werden einzelne Komponenten aus dem Lysat aufgetrennt und nur bestimmte Fraktionen auf die Mikrotiterplatten aufgetragen. Diese Auftrennung kann durch Gradienten-Zentrifugation (22) oder durch Immunadsorption (3) erfolgen. Zwar ergab die Methode der Extraktion von „is-coms“ (immunostimulating complex) von LÖVGREN et al. (22) gute Ergebnisse im Test mit Seren von Schafen, Humansenen wurden jedoch nicht getestet. Immunadsorptionsfraktionierte Antigene finden in der Praxis aufgrund des aufwendigen Testverlaufs nur in Differenzierungstests einen Einsatz.

Fixierte Trophozoiten

Diese Methode der Antigen-Präparation und Anlagerung ist ähnlich jener der etablierten Tests IIFT und DA. Durch die Fixierung bleiben die ursprünglichen Strukturen erhalten und es werden den Antikörpern daher fast ausschließlich Oberflächenproteine geboten. Diese Methode der Antigen-Präparation soll die Sensitivität für Antikörper der frühesten Immunantwort erhöhen und damit zu einer besseren Korrelation der Ergebnisse mit denen in den etablierten Basistests führen. PICHLER et al. (25) führten bereits 1982 einen Versuch durch, in dem sie die Trophozoiten mit Formalin fixierten und per Lufttrocknung an die Mikrotiterplatten anlagerten. Die Studie ergab eine sehr gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen aus dem als Referenztest durchgeführten IIFT, die Bindung der Trophozoiten durch Eintrocknen erwies sich aber als instabil. TOMASI et al. (29) lagerten methanolfixierte Trophozoiten an die Oberflächen der Mikrotiterplatten und erzielten in dieser Modifikation ebenfalls eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse aus IIFT und ELISA.

Rekombinante Proteine

In den bisher beschriebenen Methoden der Kultivierung der Trophozoiten, sei es in vivo oder in vitro, unterliegt die Qualität des Antigens gewissen Schwankungen in der Zusammensetzung der Proteine (6, 10, 12, 15). So können sowohl Inkorporationen von Wirtsproteinen aus der Maus als auch Einlagerungen von Proteinen aus den in den Nährmedien verwendeten Seren zu einer Veränderung der antigenen Strukturen in den Toxoplasmen führen. Der Einsatz rekombinanter Antigene versprach die Lösung des Problems der schwankenden Qualität in der Antigen-Produktion. So ist es auch gelungen, mehrere Gene, die Antigene kodieren, zu klonieren und in Bakterien- oder Eukaryontenzellen zur Expression zu bringen (18, 24, 26, 28, 30), eine den bewährten Basistests vergleichbare Sensitivität konnte jedoch bisher nicht erreicht werden.

II. Der TTE (Total Trophozoites ELISA)

Aufgrund der bereits erwähnten Schwankungen der Qualität des Antigens, die durch unterschiedliche Methoden der Kultivierung der Trophozoiten entstehen, und in dem Bemühen, die Zucht der Toxoplasmen vom Tier in die Gewebekultur zu verlegen, wurde in unserem Labor eine in-vitro-Kultivierung (Hep2-Zellen) mit serumfreien Medien eingeführt (11, 13, 14). So war es naheliegend, einen ELISA mit ganzen, durch Formalin fixierten Toxoplasmen aus der Gewebekultur zu etablieren, um so die Vorteile des IIFT oder der DA (Sensitivität, Spezifität), mit der Automatisierbarkeit des ELISA-Systems zu verbinden. Zur Evaluierung der in diesem Test erzielten Ergebnisse wurden 221 Seren vergleichend in zwei Modifikationen dieses ELISAs, im IIFT und in einem kommerziell erhältlichen ELISA mit einem Lysat aus *Toxoplasma* als Antigen getestet.

Material und Methoden

Indirekter Immunfluoreszenz-Test (IIFT)

Der IIFT wurde nach den Bestimmungen des ehemaligen Bundesgesundheitsamtes (4) mit einem an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelten Antihuman-Immunglobulin (Beringwerke AG Mahrburg/Lahn, Deutschland) aus der Ziege durchgeführt. Die Trophozoiten von *T. gondii* (Stamm RH) wurden zwei Tage p. i. aus dem Peritonealexsudat von Mäusen (OF 1, Swiss SPF) gewonnen und dreimal durch Zentrifugation und Resuspension in PBS (pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in Formaldehyd-PBS (4%) fixiert, erneut gewaschen und in PBS (2×10^6 Trophozoiten/ml) suspendiert. Die Kontamination mit Maus-Zellen dieser Suspension betrug weniger als 10%.

ELISA mit einem Lysat aus Trophozoiten als Antigen (STE)

Für diesen Test wurde der Kit ETI-TOXOK-G der Firma Sorin Biomedica (Saluggia, Italien) verwendet. Das Antigen war ein Extrakt aus durch Ultraschall zerstörten Trophozoiten (RH Stamm) (27). Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Seren wurden 1 : 101 in Proben-Puffer (PBS, 0,05% Tween, 2% Rinderserum-Albumin) verdünnt. Als Konjugat wurde ein Antihuman-IgG (Fc)-Immunglobulin aus der Ziege verwendet. Die Extinktionen wurden mit dem Fotometer (SLT Labinstruments, Grödig Ö) abgelesen und die IgG-Konzentration anhand einer aus fünf Kalibratoren berechneten Standardkurve im Computerprogramm Soft 2000 (SLT Labinstruments) ermittelt. Wenn bei einem Serum höhere Extinktionen gemessen wurden als bei dem höchsten Kalibrator, wurde die Probe 20fach verdünnt und die Ergebnisse mit 20 multipliziert.

ELISA mit ganzen Trophozoiten als Antigen (TTE)

Die Trophozoiten (Stamm RH) wurden in serumfreier Zellkultur (Hep-2-Zellen) gezüchtet (11, 13, 14) und in Formaldehyd-PBS (4%) fixiert. Die Positivkontrolle für den IIFT (Toxotrol>F<, bioMerieux, Marcy-L'Etoile, Frankreich) wurde mit Proben-Puffer in fünf verschiedene Konzentrationen (150, 50, 16, 5 und 2 Einheiten) ausstitriert; diese wurden als Kalibratoren verwendet. Der ELISA wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt (Costar, Cambridge); die Inkubationsvolumina der einzelnen Verdünnungen betragen jeweils 100 µl. Nach jeder Inkubationsperiode wurden die Näpfcchen 4mal mit PBS-Tween gewaschen (Denley Wellprep, Denley, Billingshurst UK). Die Platten wurden bei 4° C mit der Antigen-Suspension (10^7 Trophozoiten/ml Hydrogencarbonat [35 mM], Natrium-Bikarbonat [15 mM]-Puffer [pH 9,6]) über Nacht inkubiert. Freie Bindungsstellen auf den Oberflächen der Näpfcchen wurden mit Probenpuffer abgedeckt (30 min, 37° C). Die Platten wurden in feuchter Umgebung bei 4° C gelagert. Seren, Negativkontrolle und Kalibratoren wurden 1 : 101 mit Proben-Puffer verdünnt, in die Näpfcchen pipettiert und 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Alle Seren wurden in diesem Testsystem mit zwei unterschiedlichen Konjugaten getestet: Im G-TTE wurde ein Antihuman-IgG (Fc)-, und im GMA-TTE ein Antihuman-IgG, -M und -A (leichte und schwere Ketten)-Immunglobulin verwendet (Jackson Immunresearch, West Grove, USA). Beide affinitätsgereinigten, gefriergetrockneten und an Peroxidase gekoppelten Antikörper (aus der Ziege) wurden 1 : 1500 in Aqua bidestillata resuspendiert, in die Näpfcchen pipettiert und 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion mit einer Lösung aus neun Teilen Chromogen (80 mg gereinigte [7] 5-amino-2-hydroxybenzoesäure in 100 ml Aqua bidestillata) und einem Teil H₂O₂ (0,05%) entwickelt. Nach 20 Minuten wurden die Extinktionen wie oben beschrieben berechnet.

Grenzwerte	Für den STE setzte der Hersteller einen Grenzwert von 15 internationalen Einheiten (IU) zwischen reaktiv und nicht-reaktiv fest. Für die Bestimmung des cut-off Wertes in den TTEs wurden die Ergebnisse der im IIFT als nicht-reaktiv beurteilten Seren auf Ausreißer und Normalverteilung überprüft (Kolmogorov-Smirnow-Test) und nach der Eliminierung der Ausreißer die Mittelwerte plus dreifache Standardabweichung als Grenzwerte festgesetzt.
Seren	Die 221 Seren stammen aus dem Schwangeren-Screening und wurden nach den im IIFT ermittelten Titern ausgewählt. Die Titerpunkte dieser Seren sind in Tabelle 1 ersichtlich.
Statistik	Die Verteilung der Ergebnisse und deren Symmetrie wurde im Kolmogorov-Smirnow-Test ermittelt. Als Ausreißer wurden Werte definiert, deren Abstand mehr als das 1,5fache des Interquartilabstandes von den inneren Quartilen betrug. Die Korrelation der Ergebnisse zwischen den Tests wurde mit Hilfe des Spearman-Korrelationstests berechnet und mit dem Koeffizienten r_s ausgedrückt. Alle diese Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS (SPSS for Windows: Professional Statistics Release 5.0; SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

Ergebnisse

Berechnung der Grenzwerte zwischen spezifisch reaktiv und nicht-reaktiv in den TTEs

Der statistische Test auf Ausreißer in der Serumgruppe „IIFT < grenzwertig“ ergab ein signifikantes Abweichen der Titer von jeweils sechs Seren in beiden ELISAs. Diese wurden in weiterer Folge ausgeschlossen und von den restlichen 36 Seren die Mittelwerte 2,9 (4,8) im G-TTE (GMA-TTE) mit den Standardabweichungen 1,3 (1,8) berechnet. Aufgrund der geringen und statistisch nicht signifikanten Unterschiede der Werte in beiden Tests wurde ein einheitlicher Grenzwert von 11 Einheiten festgelegt.

Vergleich der Tests

Sensitivität der Tests:

Von den 42 im IIFT nicht-reaktiven Seren wurden im G-TTE in fünf Seren spezifische Antikörper gemessen (Tab. 2). Im GMA-TTE waren die Titer bei sechs Seren erhöht, während im STE vier Seren laut Richtlinien des Testherstellers als spezifisch reaktiv zu beurteilen waren.

Die sechs Seren, die im IIFT mit einem als an der Grenze zur Nachweisbarkeit spezifisch reaktiven Titer beurteilt wurden, zeigten in den ELISAs ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse (Tab. 3). So waren im G-TTE jeweils drei Seren nicht-reaktiv und reaktiv, im GMA-TTE war ein Serum als nicht-reaktiv, fünf Seren waren als reaktiv zu beurteilen, während im STE zwei Seren keine spezifische Reaktivität und vier Seren erhöhte Reaktivität aufwiesen.

Von den im IIFT mit einem Titer größer/gleich 1 : 16 reaktiv beurteilten 173 Seren wiesen alle sowohl im G-TTE als auch im GMA-TTE eine erhöhten Titer auf. Im STE wurde ein Serum mit einem Titer von 1 : 64 im IIFT als nicht-reaktiv eingestuft. Das konsekutive Serum dieser Person reagierte jedoch auch in diesem Test positiv.

Korrelation zwischen den Tests:

Die höchste Korrelation wurde zwischen dem G-TTE und GMA-TTE festgestellt ($r_s = 0,92$), während die Übereinstimmung des STE mit diesen beiden Tests etwas niedriger war ($r_s = 0,83$ bzw. $0,82$). Der IIFT zeigt mit allen drei ELISAs annähernd gleiche Korrelationen (G-TTE: $r_s = 0,78$, GMA-TTE: $r_s = 0,77$, STE: $r_s = 0,77$).

Tabelle 1:

Die im IIFT ermittelte Reaktivität der Seren.
Die Titer sind in reziproken
Serumverdünnungen angegeben.

Seren (n = 221)	Titer
42	negativ
6	grenzw.
57	16
57	64
43	256
10	1000
6	4000

Tabelle 2:

Die ELISA-Ergebnisse der im IIFT als
nicht-reaktiv beurteilten Seren.

Ser. Nr.	G-TTE	GMA-TTE	STE
66	+	+	-
110	+	+	+
116	-	-	+
132	+	+	+
146	+	+	+
178	-	+	-
181	+	+	-

Tabelle 3:

Die ELISA-Ergebnisse der im IIFT als
grenzwertig reaktiv beurteilten Seren.

Ser. Nr.	G-TTE	GMA-TTE	STE
135	+	+	+
136	-	+	+
180	+	+	+
189	+	+	+
194	-	-	-
195	-	+	-

Diskussion

Zur Bestimmung des Toxoplasmose-Status bei Schwangeren ist es essentiell, auch die Antikörper der frühesten Infektionsphase zu erfassen. Nur diese Qualität des verwendeten Testsystems ermöglicht es, Titerkonversionen rechtzeitig zu erfassen und in weiterer Folge therapeutische Maßnahmen zu setzen. Dem SFT, der als erster Test zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *T. gondii* entwickelt wurde und immer noch als Goldstandard gilt, wird diese Qualität deshalb zugesprochen, da in diesem Test ganze, lebende Trophozoiten als Antigen eingesetzt werden und daher den Immunglobulinen ähnliche Epitope, wie es bei der Infektion der Fall ist, geboten werden. Der SFT kann jedoch aufgrund des technischen Aufwandes nur in Speziallabors vorwiegend als Abklärungstest durchgeführt werden und ist zum Aus-testen großer Serumkollektive wenig geeignet. DA und IIFT bieten ähnliche Epitope wie der SFT – es werden ebenfalls ganze Trophozoiten als Antigen eingesetzt –, die Toxoplasmen sind aber durch Formalin fixiert. Eine Automatisierung des Testab-laufs und der Bestimmung des Titerendpunktes ist nicht möglich.

Seit VOLLER et al. (34) 1976 die erste Adaptation des ELISA's für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen *T. gondii* vorstellten, gab es eine Reihe von Modifikation-ationen dieses Systems, deren Unterschiede vor allem in der Präparation des Anti-gens lagen. In den meisten Tests wurden die Trophozoiten lysiert und entweder das komplette Lysat oder nur einzelne Fraktionen an die Oberfläche der Mikrotiterplat-ten gebunden. Zwar stellten BONNEHOME et al. (3) keine Veränderungen der Immun-reaktivität nach unterschiedlicher Präparation des Oberflächenantigens P30 (SAG1) fest, VERHOFSTEDÉ et al. (33) kamen aber zum Schluß, daß die Erhaltung der ur-sprünglichen Oberfläche in serologischen Tests essentiell sei. Versuche, Oberflä-chenproteine in *E. coli* durch Genrekombination zu amplifizieren und damit gezielt Antikörper der frühesten Phase der Infektion nachzuweisen, gaben nicht die ge-wünschten Resultate. Eine Sensitivität, die dem SFT oder IIFT ähnlich ist, konnte erst durch den Einsatz eines Cocktails aus mehreren Proteinen erzielt werden.

Mit der Etablierung des TTE griffen wir eine bereits 1982 in diesem Institut ge-borene Idee wieder auf, ganze formalinfixierte Trophozoiten an die Mikrotiterplatten zu binden (25). Um aber Inkorporationen von Wirtsproteinen und somit unspezifische Ergebnisse zu vermeiden, wurden die als Antigen verwendeten Trophozoiten in serumfreier Gewebekultur gezüchtet.

Die Präparation des Antigens sowie die Durchführung des Tests erwiesen sich als unkompliziert und entsprechen den Anforderungen an einen Einsatz zum Aus-testen von großen Serumkollektiven. Der Test ist fast vollständig automatisierbar, und die Anlagerung der Trophozoiten mit dem beschriebenen Coating-Puffer erwies sich als stabil. Als weiterer Vorteil des Testprotokolls erwies sich der Einsatz von 5-amino-2-hydroxybenzoe Säure als Chromogen. Es weist die nötige Sensitivität auf und kann als Ersatz für die üblicherweise verwendeten kanzerogenen Substan-zen angesehen werden. Im direkten Vergleich der Ergebnisse zwischen den einge-setzten Tests produzierte nur der G-TTE Resultate, die durch mindestens einen weiteren Test bestätigt wurden. Während im STE Insensitivitäten in dieser und in einer früher durchgeführten Studie (23) festgestellt wurden, war dies in beiden TTEs nicht der Fall. Während im G-TTE eine klare Unterscheidung zwischen reaktiv und nicht-reaktiv mög-lich ist, zeigt der GMA-TTE im cut-off-Bereich keinen klaren Unterschied zwischen negativ und positiv. Da in beiden Tests die Präparation des Antigens auf dieselbe Weise erfolgte, muß der Unterschied in der Qualität des Konjugats liegen. Eine Verbesserung dieses Konjugats wäre wünschenswert, um gleichzeitig auch Antikörper der Klassen M und A mit der nötigen Prä-zision nachweisen zu können.

Zusammenfassung Seit der Einführung des ELISA-Systems durch ENGVALL und PERLMANN (8) wurden bereits mehrere Adaptionen zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *T. gondii* vorgestellt. Diese Tests unterschieden sich aber deutlich in der Präparation des Antigens von den aufgrund ihrer Sensitivität und Spezifität anerkannten Basistests (IIFT und DA), sodaß eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den Testsystemen meist nicht möglich war.

In dem hier vorgestellten Test (TTE) setzten wir als Antigen ganze, an die Mikrotiterplatten angelagerte Trophozoiten ein, die in der Gewebekultur mit einem Medium ohne Serumzusätze gezüchtet wurden, um eine Einlagerung von Fremdproteinen und damit möglicherweise unspezifische Bindungen zu vermeiden. Um die Sensitivität und Spezifität des Tests zu überprüfen, wurden 221 Seren aus dem Schwangeren-Screening sowohl in zwei Modifikationen des TTE mit unterschiedlichen Konjugaten als auch in einem kommerziell erhältlichen ELISA mit lysierten Trophozoiten als Antigen (STE) getestet und die Ergebnisse mit denen aus dem IIFT verglichen.

In beiden Modifikationen des TTE wurden keine Insensitivitäten beobachtet, während im STE ein Serum als falsch negativ beurteilt wurde. Im G-TTE (mit einem Anti-IgG-Konjugat) konnte eine klarere Grenze als im GMA-TTE (Anti-IgG, -M und -A-Konjugat) zwischen spezifisch reaktiv und nicht-reaktiv gezogen werden. In einer statistischen Beurteilung der Ergebnisse mit denen aus dem IIFT konnte eine für alle drei ELISAs ähnliche Korrelation berechnet werden.

Wir sehen daher im TTE eine geeignete Methode zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Toxoplasma gondii*. Die hohe Sensitivität und die Erfassung der gegen Membran-Antigene gerichteten Antikörper lassen den Test auch als Basistest für das Schwangeren-Screening als geeignet erscheinen.

Schlüsselwörter *Toxoplasma gondii*, ELISA, Antigen-Präparation, IgG.

Summary *Preparations of antigens in Enzyme-linked Immuno-assays for the detection of specific antibodies against Toxoplasma gondii: an overview and introduction of a new test*

Since the introduction of the enzyme-linked immunoassay (ELISA) by ENGVALL and PERLMANN (8), numerous modifications of this test have been developed for serodiagnosis of infections with *Toxoplasma gondii* in man and animals. The antigens used in these tests differ, however, considerably from the established and widely used screening tests, the indirect fluorescent antibody test (IFAT) and Direct Agglutination (DA). So we made use of an idea developed in 1982 to bind formalin-fixed whole trophozoites on the surface of microtiter plates. As a novel improvement we use trophozoites, which were bred in serum-free in-vitro cultures. This should prevent unspecific results due to incorporations of serum or mouse-derived components.

To examine the reliability of this ELISA, 221 sera were tested comparatively in the new system (TTE, Total Trophozoites ELISA), in the indirect immunofluorescence assay (IFAT) and in a commercially available ELISA using sonicated trophozoites as antigen (STE, Sonicated trophozoites ELISA).

The ELISA with antigen lysate showed a good correlation with the IFAT, some false-negative results were, however, obtained. The TTE was performed with all sera in two modifications: one test with an anti-IgG conjugate (G-TTE), the other with an anti IgG, -M and -A conjugate (GMA-TTE). In none of these TTE modifications insensitivities were observed, the G-TTE seems, however, to offer a clearer differentiation between specifically reactive and non-reactive sera.

The study has shown that the ELISA with whole trophozoites produced in serum-free tissue culture, might be used as an alternative test to detect antibodies against *Toxoplasma gondii*. Due to its high sensitivity, especially against antibodies directed against membrane-antigens, this test may even compete with the other basic tests in the screening program for pregnant women.

Key words *Toxoplasma gondii*, ELISA, antigen preparation, IgG.

Literatur

1. 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.
2. BALSARI, A., POLLI, G., MOLINA, V., DOVIS, M., PETRUZZELLI, E., BONIOLO, A., ROLLERI, E. (1980):
ELISA for Toxoplasma antibody detection: comparison with the other diagnostic tests.
J. Clin. Pathol. 33, 640-643.
3. BONHOMME, A., THIRION, C., BOULANGER, F., CHARTON, F., BURLET, H., PINON, J. M., ALIX, A. J. P. (1994):
Toxoplasma gondii Structure Variations of the Antigen P30.
Parasitology 108, 281-287.
4. BUNDESGESUNDHEITSAMT (1976):
Empfehlungen für die Durchführung der Toxoplasma-Seroreaktionen mittels Mikromethode.
Bundesgesundheitsblatt 20, 108-112.
5. CAMARGO, M. F., FERREIRA, A. W., MINEO, J. R., TAKIGUTI, C. K., NAKAHARA, O. S. (1978):
Immunoglobulin G and Immunoglobulin M enzyme linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns.
Infect. Immun. 21, 55-58.
6. DARDÉ, M. L., BOUTEILLE, B., PESTRE-ALEXANDRE, M. (1990):
Comparison of isoenzyme profiles of Toxoplasma gondii tachyzoites produced under different culture conditions.
Parasitol. Res. 76, 367-371.
7. ELLENS, D. J., GIELKENS, A. L. J. (1980):
A simple method for the purification of 5-aminosalicylic acid. Application of the product as substrate in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).
J. Immunol. Meth. 37, 325-332.
8. ENGVALL, E., PERLMANN, P. (1971):
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin G.
Immunochemistry 8, 871-874.
9. HANNA, S. M. (1982):
La méthode ELISA dans le diagnostic sérologique de la toxoplasmose humaine.
Pathol. Biol. (Paris) 30, 97-101.
10. HARMER, Ch., SOMMER, R., MANAFI, M., HASSL, A., ASPÖCK, H. (1993):
Vergleichende Untersuchungen über Enzymmuster unterschiedlich kultivierter Toxoplasmen.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 15, 113-118.
11. HARMER, Ch. (1995):
Versuche zur Optimierung der Zucht von Toxoplasma gondii in vitro.
Diplomarbeit, Universität Wien.
12. HASSL, A., ASPÖCK, H. (1991):
Serumfreie Zucht von Toxoplasma gondii in vitro: Ein Weg zu besser definierten Antigenen.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 13, 165-176.
13. HASSL, A., ASPÖCK, H. (1992):
In vitro propagation of Toxoplasma gondii in PC1 serum-free medium.
Folia Parasitologica 39, 285.
14. HERMENTIN, K., AUER, H., ASPÖCK, H. (1987):
In vitro cultivation of Toxoplasma gondii under defined, serum-free conditions.
J. Parasitol. 73, 1276-1277.
15. HERMENTIN, K., AUER, H., ASPÖCK, H. (1987):
Serodiagnosis of Toxoplasmosis: Influence of host deriving proteins attached to trophozoites.
J. Parasitol. 73, 1276-1277.

16. Ho-Yen, D. O., JOSS, A. W. L. (ed.) (1992):
Human Toxoplasmosis.
Oxford University Press.
17. HUGES, H. P. A., VAN KNAPEN, F., ATKINSON, H. J., BALFOUR, A. H., LEE, D. L. (1982):
A new soluble antigen preparation of *Toxoplasma gondii* and its use in serological diagnosis.
Clin. Exp. Immunol. 49, 239-246.
18. JOHNSON, A. M., ROBERTS, H., TENTER, A. M. (1992):
Evaluation of a recombinant antigen ELISA for the diagnosis of acute toxoplasmosis and comparison with traditional antigen ELISAs.
J. Med. Microbiol. 37, 404-409.
19. KARIM, K. A., LUDLAM, G. B. (1975):
The relationship and significance of antibody titres as determined by various serological methods in glandular and ocular toxoplasmosis.
J. Clin. Pathol. 28, 42-49.
20. LEOTE, J. B., HANNA, S. M. (1980):
Application de la méthode immunoenzymatique à la détection de l'immunité antitoxoplasmique.
Ann. Biol. Clin. (Paris) 38, 175-178.
21. LIN, T. M., HALBERT, S. P., O'CONNOR, G. R. (1980):
Standardized quantitative enzyme-linked immunoassay for antibodies to *Toxoplasma gondii*.
J. Clin. Microbiol. 11, 675-681.
22. LÖVGREN, K., UGGLA, A., MOREIN, B. (1987):
A new approach to the preparation of a *Toxoplasma gondii* membrane antigen for use in ELISA.
J. Vet. Med. B 34, 274-282.
23. OBWALLER, A., HASSL, A., PICHER, O., ASPÖCK, H. (1994):
Vergleich und Bewertung des quantitativen Nachweises spezifischer IgM- und IgA-Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* in Serumproben von Schwangeren.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 16, 127-132.
24. PARMLEY, S. F., SGARLATA, G. D., MARK, J., PRINCE, J. P., REMINGTON, J. S. (1992):
Expression, characterization and serological reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*.
J. Clin. Microbiol. 30, 1127-1133.
25. PICHER, O., ASPÖCK, H., AUER, H., HERMENTIN, K. (1982):
Enzyme-linked immunosorbent assay with whole trophozoites of *Toxoplasma gondii*.
Zbl. Bakt. Hyg. A 253, 397-401.
26. PRINCE, J. B., AUER, K. L., HUSKINSON, J., PARMLEY, S. F., REMINGTON, J. S. (1990):
Cloning expression, and c-DNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*.
Mol. Biochem. Parasitol. 43, 97-106.
27. SORIN-BIOMEDICA (1992):
Begleittext zur Durchführung des ETI-TOXOK-G.
28. TENTER, A. M., JOHNSON, A. M. (1991):
Recognition of recombinant antigens by human sera in elisa.
Parasitol. Res. 77, 197-203.
29. TOMASI, J.-P., BARKA, N., STADSBAEDER, S. (1986):
Serodiagnosis of human G and M immunoglobulins to *Toxoplasma gondii* by ELISA using whole tachyzoites as antigens: a comparative study with the indirect haemagglutination (IHA) and Immunofluorescence (IFA) tests.
Med. Microbiol. 175, 261-269.
30. VAN GELDER, P., BOSMAN, F., DE MEUTER, F., VAN HEUVERS WYN, H., HERION, P. (1993):
Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in *Escherichia coli*.
J. Clin. Microbiol. 31, 9-15.
31. VAN KNAPEN, F. (1984):
In Immundiagnosis of Toxoplasmosis, Thesis.
University of Amsterdam, p. 17.
32. VAN LOON, A. M., VAN DER VEEN, J. (1980):
Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera.
J. Clin. Pathol. 33, 635-639.

33. VERHOFSTEDE, C., SABBE, L., VAN RENTERGHEM, L. (1987):
Ability of enzyme-linked immunosorbent assays to detect early immunoglobulin G antibodies to *Toxoplasma gondii*.
Eur. J. Clin. Microbiol. 6, 147-151.
34. VOLLER, A., BIDWELL, D. E., BARTLETT, A., FLECK, D. G., PERKINS, M., OLADHIN, B. (1976):
A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody.
J. Clin. Pathol. 29, 150-153.

Korrespondenzadresse: Mag. Andreas Obwaller
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

