

Ein einfacher Immunfluoreszenztest zum Nachweis zytomegalieviruspezifischer (CMV-) IgM-Antikörper

H. W. Doerr

Institut für Med. Virologie der Universität Heidelberg

Zusammenfassung:

Mit der indirekten Immunfluoreszenz können in CMV-infizierten, lyophilisierten Zellen, wie sie bei der Herstellung des KBR-Antigenes präpariert werden, die charakteristischen, intranukleären Einschlusskörperchen nachgewiesen werden. Eine darauf basierende Testmodifikation zum Nachweis CMV-spezifischer IgM-Antikörper hat sich in der Erprobung an mehr als 100 Patienten, die mit Deckglaszellkulturen arbeitet, als gleichwertig mit der konventionellen Technik erwiesen.

Schlüsselwörter:

Zytomegalie — Spez. IgM-Antikörper — Indirekte Immunfluoreszenz — Antigenpräparation.

Summary:

Intranuclear inclusion bodies, which are typical of CMV infections, can be demonstrated by the indirect immunofluorescence technique using CMV infected cells, which have been lyophilized, as it is usual for the preparation of antigens for the CFT. A modified test system for the detection of CMV specific IgM antibodies working with this antigen has proven to be adequate to the conventional method, which uses slide tissue cultures.

Key words:

Cytomegalic inclusion disease — Specific IgM antibodies — Indirect immunofluorescence — Antigen preparation.

Neben der Komplementbindungsreaktion (KBR) stellt die indirekte Immunfluoreszenz (IFT) immer noch das am meisten angewandte sero-diagnostische Testverfahren zum Nachweis von CMV-IgM-Antikörpern dar. Gegenüber den neuerdings entwickelten Enzymimmunassays (ELISA) bietet sie den Vorteil, in das Antigen „hineinsehen“ zu können. Ihrer allgemeinen Anwendung steht die Erfordernis einer relativ aufwendigen Zell- und Virusanzüchtung für die Antigenpräparation unter standardisierten Bedingungen entgegen. Davon unabhängig ist eine Testmodifikation, die mit kommerziell erhältlichen, lyophilisierten Antigenchargen arbeitet und im folgenden vorgestellt wird:

Material und Methoden

Mit CMV lytisch infizierte und nach einer Glycinpufferinkubation lyophilisierte Humanfibroblasten*) werden pro Charge in 1 ml A. bidest. resuspendiert, mit Veronalpuffer (VP; pH 7,2) 1:6 verdünnt und 100 µl der Suspension auf Spezial(kunststoff)deckgläschen**) aufgetropft. Nach Antrocknung in einem Umluftbrutschrank bei +37° C erfolgt eine Fixation mit 1% Formalin (in VP) für 5 Min. Die Deckgläschen werden danach

*) Behringwerke, Marburg (CMV-Antigen für die KBR)

**) Fa. Medac, Hamburg

gründlich in VP gewaschen und sind dann für den Test gebrauchsfertig:

Pro Gläschen werden je 100 µl der Patientenserum (1:20 und 1:40 in VP verdünnt) gleichmäßig aufgetropft und bei +37°C in der feuchten Kammer für 3 h inkubiert. Anschließend erfolgt für 20 Min. ein Waschvorgang bei langsamer ständiger Bewegung der Waschlösung (VP + 0,1% Tween 20) über den Präparaten (automat. Schaukelplatte). Zum Nachweis des Serum-IgM, das mit dem Träger-fixierten Antigen reagiert hat, verwendet man pro Deckgläschen je 50 µl µ-kettenspezifische, fluoreszeinkonjugierte Anti-IgM-Antikörper*** (1:40 in VP verdünnt) bei einer Inkubation von 30 Min. bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten gründlichen Waschvorgang (≥ 2 h) sind die Präparate fertig und können unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 zeigt die typische Fluoreszenz der Kerneinschlüsse von CMV-infizierten Humanfibroblasten, die, wie oben angegeben, präpariert und mit einem CMV-IgM-positiven Serum beschichtet worden sind. Sie läßt sich einwandfrei von der unspezifischen Zytoplasm fluoreszenz unterscheiden.

Die neue Testmodifikation wurde in die laufende Labor diagnostik unseres Institutes eingesetzt. Die Serumproben von über 100 Patienten, darunter 15 CMV-IgM- positive Fälle, zeigten in den getesteten Verdünnungsstufen eine völlige Übereinstimmung der Ergebnisse zur konventionellen Arbeitstechnik (Anzüchtung CMV-infizierter Zellen auf Deckgläschen) (4). Wegen begrenzter Haltbarkeit sollte das einmal resuspendierte Antigen unmittelbar in die Tests eingesetzt werden.

Bei jedem positiven Resultat ist die Bildung von IgM-IgG-Immunkomplexen im Patientenserum auszu schließen, die wegen der hohen Populationsdurchseu chung mit CMV in dieser Testanordnung eine falsch positive CMV-IgM-Spezifität vortäuschen können. Wir überprüfen dies mit einem Rheumafaktor-Latex-Ag glutinationstest. Bei positivem Ausfall muß der Rheu mafaktor, besser noch die IgG-Fraktion aus dem Test serum absorbiert werden (3). Ein falsch positives Ergebnis des CMV-IgM-Tests durch antinukleäre Antikörper läßt sich oft an einem unterschiedlichen Fluoreszenzmuster erkennen; gegebenenfalls kann man auch ein Kontrollantigen (nicht oder mit einem anderen Virus infizierte Zellen) einsetzen.

Da CMV-IgM-Antikörper auch unspezifisch im Verlau fe anderer Virusinfektionen reaktiviert werden können

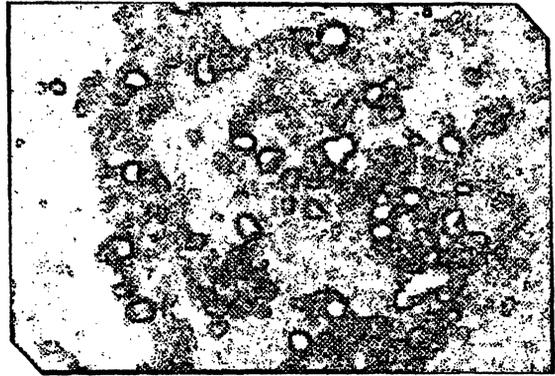


Abb. 1:

Kern(einschlußkörperchen)fluoreszenz und unspezifische Zytoplasmfluoreszenz von CMV-infizierten Zellen nach Lyophilisation und Resuspendierung. Die Zelltrümmer wurden bei +37°C angetrocknet und mit 1%igem Formalin fixiert

(2) bzw. Kreuzreaktionen bei Epstein-Barr-Virusinfektion auftreten (4), sollte ihre Bestimmung stets ergänzend zu einer bewährten Standardmethode (z. B. KBR) erfolgen, um eine adäquate Befundinterpretation sicherzustellen (1).

Schrifttum:

1. DOERR, H. W., DARAI, G.: Fluoreszenzserologischer Nachweis von Virusinfektionen. Lab.med. 2, 209–214 (1978).
2. DOERR, H. W., GEISEN, H. P., KAPP, M., SCHMIDT, W.: Antikörperentwicklung nach Rötelnvaccination im Wochenbett bei primär Röteln-seropositiven Frauen. Nachweis von Antigen-spezifisch (Röteln) und nicht spezifisch stimulierten Antikörpertitern (CMV, EBV, HSV, VZV, Mumps). Dtsch. Med. Wschr., 105, 1316–1320 (1980).
3. GEISEN, H. P., FRANK, R., DOERR, H. W., ENDERS, G.: Simple method to detect virus-specific IgM antibodies in patient's serum samples after immunosorption of immunoglobulins G and A. Med. Microbiol. Immunol. 167, 77–82 (1979).
4. SCHMITZ, H., HAAS, R.: Determination of different cytomegalovirus immunoglobulins (IgG, IgM, IgA) by immunofluorescence. Arch. ges. Virusforsch. 37, 131–140 (1972).

Anschrift des Verfassers:

Priv.-Doz. Dr. med. H. W. Doerr
 Facharzt für Laboratoriumsmedizin
 Institut für Med. Virologie der Universität
 Im Neuenheimer Feld 324
 D-6900 Heidelberg

***) Fa. Dako, Kopenhagen

