

Ein Verfahren zur quantitativen Bewertung von Antikörpern mit dem Enzym-Immunassay (EIA)*

P. Felgner

Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg

Zusammenfassung:

Seit vier Jahren wird ein Verfahren erprobt, mit dem Antikörperaktivitäten im Enzymimmunassay (EIA) als „Mehraches normaler Aktivität (MeNA)“ ausgedrückt werden. MeNA-Werte geben Antikörperaktivitäten titerproportional in Relation zur mittleren Aktivität normaler Vergleichskontrollen wieder. Dieses Verfahren ermöglicht eine antigenunabhängige Beurteilung quantitativer Antikörperergebnisse im EIA und führt so zu einer verbesserten immunologischen Differentialdiagnostik von Parasiten in Gegenwart von kreuzreagierenden Antikörpern.

Schlüsselwörter:

Antikörpermitteilung – MeNA-Werte (Mehraches normaler Aktivität) – Enzymimmunassay (EIA) – Immundiagnose von Parasiten

Summary:

For a period of four years quantitative antibody results in enzyme immunoassay (EIA) were communicated as "Multiple of normal activity – MONA". MONA-values represent titer proportional antibody activities relative to the median activity in normal controls. This method led to a uniform and comparable quantitative antibody report regardless of the antigen in test, which has proven of special advantage for the differential immunodiagnosis of parasitic diseases in the presence of crossreactive antibodies.

Keywords:

Antibody communication – MONA-values (multiple of normal activity) – Enzyme immunoassay (EIA) – Immundiagnosis of parasitic diseases

Einleitung

Der Enzymimmunassay-(EIA) hat in den letzten Jahren wegen seines Vorteils, aus einer einzelnen Serumverdünnung stufenlos quantitative Messungen von Antikörperaktivitäten zu ermöglichen, zunehmend Eingang in die Routinediagnostik von Antikörpern gefunden. Demgegenüber bestehen noch immer wenig Ansätze, diesen Vorteil auch auszuschöpfen oder quantitative Antikörperergebnisse in einer dem Kliniker verständlichen Form anzubieten. Antikörperbefunde werden in den meisten Berichten und käuflichen Tests als für den Kliniker schwer zu beurteilende photometrische Extinktionen oder noch als stufenweise Serumverdünnungstiter mitgeteilt, wenn nicht überhaupt auf quantitative Angaben zugunsten qualitativer (wie positiv und negativ) verzichtet wird.

Van Loon wies erst kürzlich auf die großen Unterschiede von Extinktionsbefunden bei zwei käuflichen und einem eigenen Rötelnantikörpertest hin. Er fand unterschiedliche Normgrenzen, Extinktionshöhen und Verläufe von Titrationskurven (1).

Seit vier Jahren wird im Tropeninstitut mit Erfolg ein Verfahren erprobt, mit dem Antikörperaktivitäten im EIA intern standar-

* Mit Unterstützung der deutschen Forschungsgemeinschaft, nach einem Vortrag auf dem Kongreß für Laboratoriumsmedizin, Berlin 1981.

disiert als „Mehraches normaler Aktivität (MeNA)“, oder englisch „multiple of normal activity (MONA)“, ausgedrückt werden. Darüber wurde erstmals 1978 berichtet (2). Dies Verfahren wurde später von Savigny und Voller (4, 5) in einer vergleichenden Wertung unterschiedlicher Methoden zur Mitteilung quantitativer Antikörperergebnisse an den Kliniker ausführlich erörtert.

Da vom Tropeninstitut Antikörperbefunde seit einiger Zeit als MeNA-Werte mitgeteilt werden, scheint eine kurze Darstellung des Bewertungssystems angebracht. Mit dem hier geschilderten Verfahren werden unbekannte Seren rechnerisch auf das antigenunabhängige Merkmal geprüft, wie stark sie verdünnt werden müssten, um ihre Aktivität gegen irgendein Antigen der mittleren Aktivität von normalen Kontrollseren (Normalstandard = NST) gegen dasselbe Antigen anzugeleichen. Die Reziprokwerte der Verdünnung drücken dann aus, wieviel „Mehraches normaler Aktivität (MeNA)“ die Seren gegen das Antigen enthalten.

Ein vereinfachtes graphisches Beispiel soll einleitend die Vorteile von MeNA-Werten gegenüber Extinktionsbefunden erläutern.

In Abbildung 1 sind die Reaktionen eines unbekannten Serums (US) und des Normalstandards (NST) gegen zwei

Antigene (A und B) als Extinktionen dargestellt. Die Extinktionsbefunde suggerieren eine höhere Antikörperaktivität des Serums US gegen Antigen A.

Eine Analyse dieser Extinktionsergebnisse in Abbildung 2 läßt erkennen, daß bei weiterer Verdünnung des unbekannten Serums (US) von 1:8 dieses gegen beide Antigene die jeweilige Reaktionsstärke des NST erreicht. Umgekehrt kann man sagen, daß das unbekannte Serum gegen beide Antigene die gleiche Aktivität der 8fachen Stärke des NST oder 8 MeNA enthält.

Ursachen der schwierigen Beurteilung von Extinktionsbefunden sind unterschiedlich steile und nicht lineare Dosiswirkungsverhältnisse neben unterschiedlichen Zusammensetzungen der meßbaren Gesamtreaktionen aus gewünscht spezifischen-, nicht gewünscht spezifischen- und unspezifischen Reaktionen (GSR, NGSR,USR). Diese Bezeichnungen von Teilreaktionen (GSR, NGSR,USR) sind der Nomenklatur für Immunfluoreszenz entlehnt und im Anhang und an anderer Stelle näher erläutert (3).

Aus den genannten Gründen konnte van Loon auch keine Übereinstimmung von Extinktionsbefunden verschiedener Enzymimmunassays für Rötelnantikörper erwarten (1).

Das einleitende Beispiel sollte deutlich machen, daß sich die quantitative Wertung von Extinktionsbefunden erst aus der Berücksichtigung zweier Faktoren ergibt, nämlich der Reaktionsstärke von Normalseren gegen verschiedene Antigene und der Art der Dosiswirkungskurven von hochaktiven Seren. Beide Faktoren sind in MeNA-Werten berücksichtigt.

Methodik

Für die Berechnung von MeNA-Werten aus Extinktionen im EIA sind zwei Voraussetzungen zu erfüllen:

1. die mathematische Berechnung nicht linearer Dosiswirkungskurven hochaktiver Seren und
2. die Definition einer möglichst antigenunabhängigen und natürlichen Bezugsaktivität auf den Dosiswirkungskurven. Als solche wurde die geometrisch mittlere Aktivität von „Normalseren“ gewählt und als Normalstandard (NST) bezeichnet.

Aus den Kombinationen der Dosiswirkungskurven und ihren zugehörigen Normalstandardaktivitäten ergeben sich dann Standardkurven für MeNA-Werte.

Zu 1.: Die Berechnung der Dosiswirkungskurven kann nach dem früher veröffentlichten Verfahren der 2-Punkt-Berechnung in kleinen Laboratorien mit Taschenrechnern erfolgen, die eine Logarithmusfunktionstaste aufweisen (2, 4, 5, und Anhang). Seit einem Jahr werden mit einem eigenen Programm polynome Regressionen 3° und 2° und vornehmlich eine Kombination beider im on-line-Verfahren mit einem Rechner der Firma Tews-Elektronik (Hamburg) verwendet und damit eine Linearisierung der Kurven bis 200 MeNA erreicht, während nach der alten 2-Punkt-Methode nur Werte bis zu 60 MeNA berechnet werden können. Letzteres hat sich jedoch für die Praxis als ausreichend erwiesen.

Zu 2.: Als Aktivität des NST wurde die geometrisch mittlere Aktivität von mindestens 100 frischen nicht inaktivierten Seren Erwachsener aus einem Unfallkrankenhaus gewählt. Es

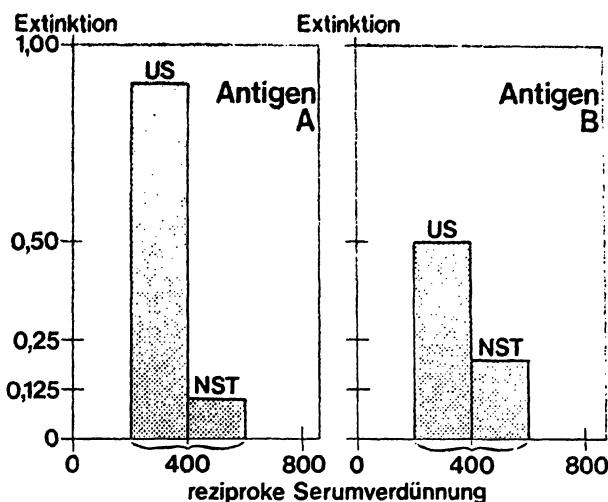


Abb. 1: Extinktionsbefunde eines unbekannten Serums (US) und des Normalstandards (NST) gegen zwei verschiedene Antigene (A und B).

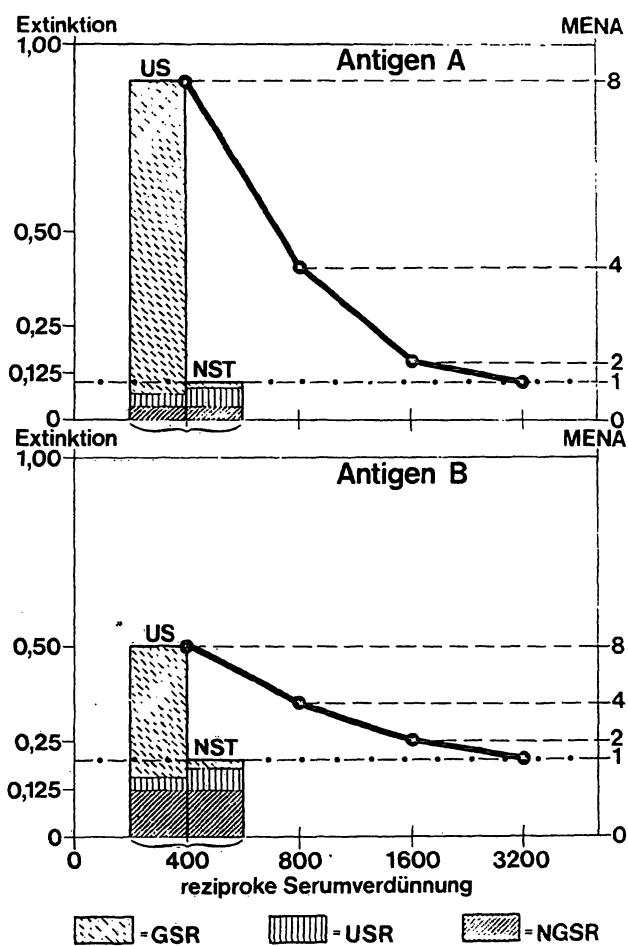


Abb. 2: Graphische Analyse der Extinktionsbefunde aus Abbildung 1 mit Transformation in MeNA-Werte.

GSR = gewünschte spezifische Reaktion
NGSR = nicht gewünschte spezifische Reaktion
USR = unspezifische Reaktion

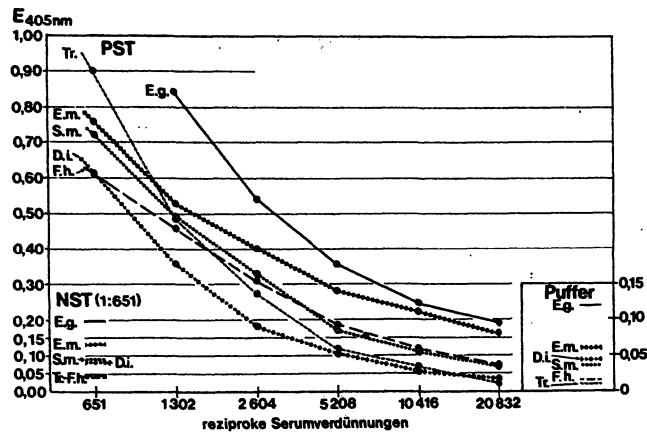
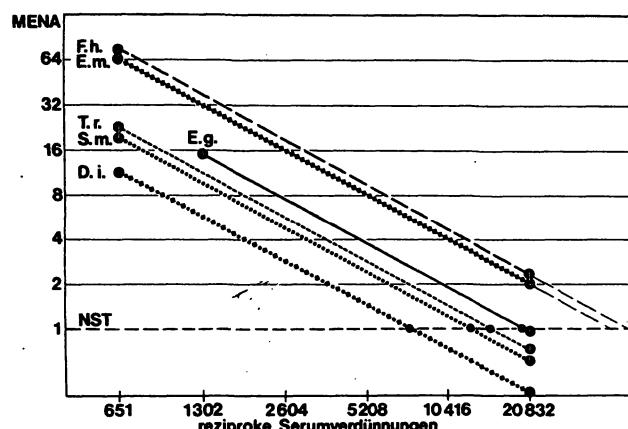


Abb. 3a und 3b: Dosiswirkungskurven von pathologischen Standardseren (PST) und Aktivitäten des Normalstandards (NST) mit einigen Wurmantigenen (deren genaue Benennung hier unwesentlich ist) vor (a) und nach (b) Transformation in MeNA-Werte. Extinktionen des Puffers mit geändertem Maßstab.

hat sich gezeigt, daß MeNA-Werte in Normalkontrollen annähernd log-normal verteilt sind, unabhängig von der Tatsache, ob Durchseuchungsantikörper vorhanden sind oder nicht.

Um eine stabile Standardisierung zu erreichen und dennoch nicht gezwungen zu sein, dafür in jedem Ansatz eine Vielzahl von Normalkontrollen in die Untersuchung einzubeziehen, werden in Vorserien zunächst Sollwerte für pathologisch aktive Seren erstellt, die als pathologische Standards (PST) in der Routine zur Berechnung von MeNA-Werten dienen. Das on-line-Programm ermöglicht eine laufende Überprüfung der Standardisierung. Dazu dient eine Prüfgröße am Schluß jeder Untersuchungsreihe, die das geometrische Mittel aller MeNA-Werte unter 10 angibt und in der Nähe von 1,0 zu erwarten ist. Durch sie läßt sich erkennen, ob sich die Durchseuchung ändert, oder die PST an Aktivität verlieren.



innerhalb dieser Bereiche werden als „unauffällig“, oberhalb dieser Bereiche mit 95% diagnostischer Spezifität als „auffällig“ bewertet (7). Es läßt sich erkennen, daß diese Grenzen der „Normalaktivitäten“ sehr einheitlich zwischen 3 und 4 MeNA gegen Antigene liegen, gegen die keine Durchseuchungsakti-

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 3 ist das Wesentliche des eben genannten Bewertungssystems zusammengefaßt:

Dosierungswirkungskurven und NST ergeben zusammen Standardkurven für MeNA-Werte. Die Extinktionen nicht linearer und gegen verschiedene Antigene unterschiedlich steil verlaufender Titrationskurven werden titerproportional linearisiert und die gegen die einzelnen Antigene unterschiedlich hohen Extinktionen des NST werden zur einheitlichen Größe von 1 MeNA.

Der besondere Vorteil dieses Bewertungssystems von Antikörpern liegt in seiner Antigenunabhängigkeit und der damit verbundenen besseren Vergleichbarkeit von Antikörperaktivitäten gegen verschiedene Antigene. Dies führt zu einer verbesserten Differentialdiagnostik kreuzreagierender Antikörper bei Helminthiasen (6).

Abbildung 4 zeigt den on-line Ausdruck der Befunde mit Prüfgröße für die Standardisierung.

Abbildung 5 zeigt 90% Aktivitätsbereiche in Normalkontrollen gegen verschiedene Antigene, aus denen sich eine erste Einteilung von Einzelbefunden ableiten lässt. Einzelbefunde

E .406	M 5.4	U 0
E .25	M 2.8	U 0
E .935	M 17.2	U 0
E .877	M 14.4	U 0
E .228	M 2.5	U 0
E .183	M 1.9	U 0
E .652	M 10.9	U 0
E .633	M 10.4	U 0

E .161	M 1.6	U 0
E .106	M 1	U 0
E .746	M 13.5	U 0
E .688	M 11.9	U 0
E .582	M 9.2	U 0
E .57	M 8.9	U 0
E .937	M 17.3	U 0
E .835	M 12.8	U 0

E 1.103	M 29.2	U 0
E 1.139	M 32.7	U 0
E .996	M 20.9	U 0
E 1.016	M 22.2	U 0
E .032	M .3	U 0
E .139	M 1.4	U 0
E .012	M .2	U 0
E .051	M .5	U 0

E 0 M .1 U 0
GEM. MITTEL ALLER WERTE UNTER 10 = .995425891

Abb. 4: Auszug aus dem Druckprotokoll von Antikörperergebnissen „on-line“ als Extinktionen (E) MeNA-Werte (M) und internationalen Einheiten (U, nur sofern Standards vorhanden). Am Ende der Serie Ausdruck der Prüfgröße für die interne Standardisierung: das geometrische Mittel aller Werte unter 10 MeNA muß nahe bei 1,0 liegen.

vitäten im NST vorhanden sind. Diese Einheitlichkeit erleichtert die Beurteilung von MeNA-Werten. Sind jedoch Durchsuchungsaktivitäten in den Normalkontrollen vorhanden, so rücken diese Grenzen höher, wie hier bei der Toxoplasmose.

Es muß berücksichtigt werden, daß die Normalkontrollen von Erwachsenen stammen und bei Kindern z.B. im Falle der Toxoplasmose wegen geringerer Durchsuchung andere Bewertungsgrenzen für Einzelbefunde gelten können.

Es wäre denkbar, als NST die mittlere Aktivität nur solcher Seren zu wählen, die frei von Durchsuchungsaktivitäten der gesuchten Spezifität (GSR) sind. Es hätte zwar den Nachteil, daß in Gegenden, in denen mit Durchsuchungsantikörpern zu rechnen ist, die Grenzen diagnostischer Spezifität für Einzelbefunde nicht aus den Vertrauengrenzen der NST direkt abzulesen wären, sondern zusätzlich ermittelt werden müßten. Die interne Standardisierung würde jedoch unabhängig von wechselnden Durchsuchungen und damit an Stabilität gewinnen, wie es in den hier aufgeführten Beispielen von exotischen Parasitenosen, bezogen auf deutschen NST, der Fall ist.

Die Abbildung 6 soll verdeutlichen, daß auch Serumverdünnungstiter in MeNA-Werte umgewandelt werden können. Bei dieser Methode entspricht 1 MeNA dem medianen Titer der Normal-Kontrollen (3). Die Normgrenzen sind hierbei natürlich nicht so exakt zu ziehen und sind in der Abbildung als 50–90% angegeben.

Auf diese Weise könnte eine test- und antigenunabhängige, einheitlichere und besser vergleichbare Befundmitteilung über Antikörperaktivitäten erzielt werden, da aus unterschiedlichen Reaktivitäten (NGSR,USR) einzelner Tests resultierende stark unterschiedliche Titerniveaus nahezu ausgeglichen werden können. Auch würde der Kliniker nicht mehr mit vermeintlich „hohen“ Titeranstiegen konfrontiert, von negativ auf z.B. 1:100 bei Tests, deren Anfangsverdünnung – dem Kliniker unbekannt – z.B. 1:100 ist und negativ lediglich 1:50 bedeuten kann. Einem MeNA-Wert ist der Bezug zur mittleren Normalaktivität anzusehen und diese Mehrinformation in einem Antikörperbefund hilft solchen Irrtümern vorzubeugen. Auf die vorteilhaften Aspekte solcher Befundmitteilung wurde schon früher hingewiesen (2).

Für die Beurteilung von Einzelbefunden anhand der oben genannten Grenzen ist eine Kenntnis darüber notwendig, ob die epidemiologische Situation der Gegend, in der die Antikörper erworben wurden, der epidemiologischen Situation der Gegend entspricht, in der die Antikörper anhand eines lokalen Normalstandards diagnostiziert werden. In Sonderfällen, wenn z.B. afrikanische Seren mit deutschem Normalstandard (NST_D) untersucht werden, muß dies im Befund berücksichtigt werden wegen unterschiedlicher Durchsuchungen und vermehrtem Auftreten unspezifischer Reaktionen (3).

Die Einteilung von Einzelbefunden und diagnostisch unauffällige und auffällige bildet nur eine erste Interpretationsebene und kann nicht darüber hinwegtäuschen, daß der Kliniker weiterer Beurteilung besonders der auffälligen Befunde bedarf. Dies gilt aber allgemein für Immundiagnostik und kann hier nicht weiter ausgeführt werden.

Schrifttum:

- VAN LOON, A. M.: Evaluation of commercial ELISA kits. *Lancet* I, 319–320 (1980).
- FELGNER, P.: Stepless antibody determination with the stick-ELISA technique. Results expressed as multiple of normal activity (MONA). *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A* 242, 100–105 (1978).
- FELGNER, P., BRINKMANN, U., ZILLMANN, U., MEHLITZ, D., ABU-ISHIRAH, S.: Epidemiological studies on the animal reservoir of gambian sleeping sickness. Pat. II. Parasitological and immunochemical examination of the human population. *Tropenmed. Parasit.* 32, 129–208 (1981).
- SAVIGNY, D., VOLLMER, A.: The communication of quantitative ELISA results. *J. Immunoassay* 1, 105–128 (1980).
- SAVIGNY, D., VOLLMER, A.: In: *Immunoenzymatic assay techniques* / R. Malvano, Herausgeber. Martinus Nijhoff Verlag (1980).
- FELGNER, P., MANNWEILER, E.: On the differential serodiagnosis of helminthic diseases with the enzyme immunoassay. Vortrag. X. Internat. Kongreß für Tropenmedizin und Malaria, Manila (1981).
- FUNKE, M., FELGNER, P., GEISTER, R.: Quantification of ambae specific antibodies as "multiple of normal activity (MONA)" with a standardized enzyme immunoassay (ELIA). *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A*, in press.

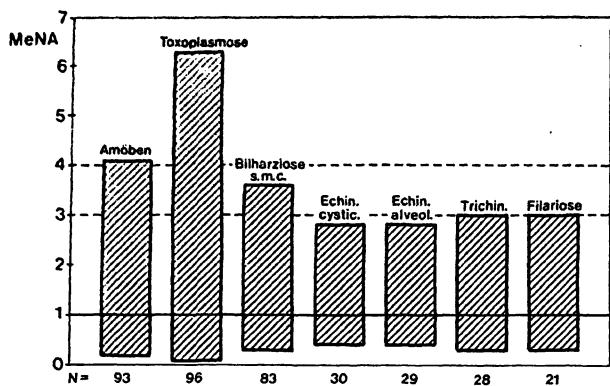


Abb. 5: 90% Aktivitätsbereiche in deutschen Normalseren (NST) gegen einige Parasitenantigene im EIA. (Log-normale Verteilung.)

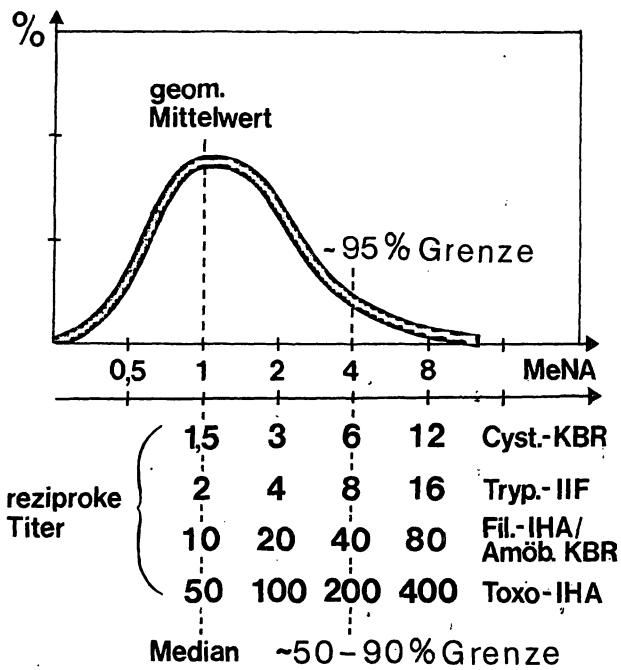


Abb. 6: Verteilung von MeNA-Werten in Normalkontrollen mit Spezifitätsgrenzen. Im oberen Teil der Darstellung ist ein Beispiel für die Verteilung von MeNA-Werten im EIA und im unteren sind einige Beispiele konventioneller Titrationsmethoden als Titer und MeNA-Werte angegeben (mit laboreigentlichem Antigen).

Anhang 1: Teilreaktionen, aus denen sich die meßbare Gesamtreaktion im ELISA zusammensetzt:**1. Gewünscht spezifische Reaktion (GSR)**

Sie bezeichnet eine immunologische Reaktion eines zu untersuchenden Serums mit dem angelagerten Antigen.

(Zur GSR sind neben homologen auch eventuelle vorhandene heterologe Reaktionen von Antikörpern zu rechnen, also Reaktionen aller Antikörper, die die Spezifität des angebotenen Antigens aufweisen.)

2. Nichtgewünscht spezifische Reaktion (NGSR)

Sie bezeichnet eine immunologische Reaktion zwischen den Reaktionspartnern im Test ohne und mit Beteiligung des zu prüfenden Testserums.

Als Beispiele seien erstens die Reaktion von Konjugat gegen Bestandteile des angelagerten Antigens und zweitens die Wirkung von Rheumafaktor im Testserum genannt.

3. Unspezifische Reaktion (USR)

Sie bezeichnet eine nicht immunologisch bedingte Reaktion zwischen Reaktionspartnern im Test.

Anhang 2: Errechnung von MeNA-Werten auf einfachen Taschenrechnern mit log-Funktion**1. Zweipunktberechnung des parabolischen unteren Teils der Titrationskurve eines stark positiven Serums (POS):**

Die Extinktionen zweier Verdünnungsstufen der Titrationskurve (E_{POS} und $E_{\text{POS-Verd.}}$), zwischen denen ein Verdünnungsfaktor von mindestens 8 und höchstens 32 liegt, werden in die Formel 1 zur Ermittlung des Parabelexponenten (n) eingesetzt.

$$\text{Formel 1: } n = \frac{\log \text{Verd. Faktor}}{\log E_{\text{POS}} - \log E_{\text{POS-Verd.}}}$$

$E_{\text{POS-Verd.}}$ muß zunächst der Extinktion des NST und über dieser liegen. Nach Formel 2 oder Formel 2a werden dann MeNA-Werte unbekannter Seren (US) gegen NST errechnet.

$$\text{Formel 2: } \text{MeNA}_{\text{US}} = \left(\frac{E_{\text{US}}}{E_{\text{NST}}} \right)^n$$

$$\text{Formel 2a: } \text{MeNA}_{\text{US}} = \text{antilog} (n[\log E_{\text{US}} - \log E_{\text{NST}}])$$

Sind pathologische Standards (PST) mit definierten MeNA-Werten verfügbar, können MeNA-Werte unbekannter Seren nach der Formel 3 errechnet werden.

$$\text{Formel 3: } \text{MeNA}_{\text{US}} = \text{antilog} (n[\log E_{\text{US}} - \log E_{\text{PST}}] + \log \text{MeNA}_{\text{PST}})$$

Anschrift des Verfassers:

Dr. med. Paul Felgner

Allgemeines Krankenhaus Celle, Siemensplatz 4, D-3100 Celle

Referate aus Zeitschriften

Radioimmunoassay for Hepatitis B Core Antigen

E. Saynelli, C. Pereira, G. Triolo, S. Vernace, F. Paronetto

Departments of Pathology and Medicine (Division of Liver Disease), Mount Sinai School of Medicine of the City University of New York and Immunopathology Laboratory, Veterans Administration Medical Center, Bronx, N.Y.

Clin. Chem. 28/2, 351–353 (1982)

Das intakte Hepatitis-B-Virus, genannt Dane-Partikel, ist in Seren von Patienten mit akuten oder chronischen Virusinfektionen nachweisbar. Es besteht aus einer Oberfläche (enthält das Hepatitis-B surface-Antigen HBsAg) und aus einem Kern (enthält das Hepatitis-B-core-Antigen (HBcAg)). HBsAg findet sich nicht nur auf den Hüllen, sondern auch in kleinen Serumpartikeln und im Zytoplasma von Hepatozyten. HBcAg ist im Kern der Dane-Partikel und in den Leberzellkernen nachweisbar. Das dritte Antigen, das zum Hepatitis-B-Virus in Beziehung steht, ist das HBeAg, ein lösliches Protein, das nur in HBsAg-positiven Seren vorkommt. HBcAg ist ein wichtiger Marker für eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus. Sein Vorkommen spricht dafür, daß der Patient infektiös ist.

Die Verfasser beschreiben einen neuen RIA, mit dem HBcAg im Serum von Hepatitispatienten gemessen werden kann. Die Ergebnisse wurden mit denen eines Festphasen-RIA verglichen.

Mit beiden RIA-Methoden ließ sich HBcAg im Serum von 20 von 49 Patienten nachweisen. Bei 6 Patienten war nur der HBcAg-RIA

pathologisch. Serum-Partikel von 30 Gesunden und von 50 Patienten mit HBsAg-negativer Hepatitis enthielten kein HBcAg. Die Ergebnisse wurden als N:S-Quotient ausgedrückt, wobei unter S die cpm der Patientenproben und unter N die cpm der Proben gesunder Kontrollen verstanden wurden. Ein N:S-Quotient von 2.1 und höher galt als positiv. Es zeigte sich, daß die N:S-Quotienten der Patienten, die mit beiden RIA-Methoden positiv waren, signifikant höher lagen als die Quotienten der 6 Patienten, bei denen nur der neue HBsAg-RIA ein positives Ergebnis zeigte. Beide RIA-Methoden waren spezifisch: Die S:N-Quotienten von 4 untersuchten Seren sanken um mindestens 50%, wenn die Dane-Partikel durch Anti-HBs-Antikörper eliminiert wurden.

HBeAg fand sich nur in Seren, die mit beiden HBcAg-RIA-Methoden positiv waren. Dagegen waren 19% aller HBeAg-negativen Patienten mit beiden RIA-Methoden HBcAg-positiv, 17% nur mit einem HBcAg-RIA.

Fehler treten auf durch Anwesenheit von Anti-HBc-Antikörpern. Daher war es erforderlich, die Serum-Partikel vor der Bestimmung von HBcAg sorgfältig zu waschen, sowie zu trocknen.

Die Untersuchungen zeigen, daß die Bestimmung des HBcAg der des HBeAg zur Erkennung infektiöser Patienten und Verlaufskontrolle der Hepatitis überlegen ist, da sie bei gleicher Spezifität und Reproduzierbarkeit empfindlicher ist und mehr positive Ergebnisse erbringt.