

# Nachweis von IgM-Treponema pallidum-Antikörpern in mit Hilfe der HPLC aus Serum isolierten IgM-Präparaten

W. Graßmann

DRK-Blutspendedienst, Lütjensee (Chefarzt Dr. Stienen)

## Zusammenfassung:

*IgM-Antikörper werden mit Hilfe der HPLC (High performance liquid chromatography) durch sterische Ausschlußchromatographie von den 7s-Immunglobulinen getrennt. Die in den Eluatfraktionen enthaltenen Antikörper werden direkt im TPHA-Test oder nach Aufkonzentrieren im FTA-ABS-Test auf Treponema pallidum-Spezifität analysiert.*

## Schlüsselwörter:

*HPLC – IgM/IgG-Antikörper-Trennung – Treponema pallidum-IgM/IgG-Antikörper – TPHA-, FTA-ABS-, VDRL-Test – 19s-IgM-FTA-ABS-Test – IgM-TPHA-Test*

## Summary:

*IgM-Antibodies are separated from 7s-immunoglobulines by High performance liquid chromatography by steric exclusion chromatography. The eluate fractions are analysed for Treponema pallidum specific antibodies immediately by TPHA or after reconcentration by FTA-ABS-Assay.*

## Keywords:

*Separation of IgM/IgG-Antibodies by HPLC – Treponema pallidum IgM/IgG-antibodies – TPHA-, FTA-ABS-, VDRL-Assay – 19s-IgM-FTA-ABS-Assay – IgM-TPHA-Assay*

## Einleitung

FTA-ABS- und TPHA-Test brachten mit der Ablösung der nicht Lues-spezifischen Reaktionen eine Wende in der Lues-Analytik. Mit Hilfe dieser beiden Analysemethoden ist wie mit dem älteren TPI-Test das Bestehen einer Treponema pallidum-Immunität beweisbar. Je nach Therapiezeitpunkt können diese Reaktionen langjährig positiv bleiben: Die Therapiebedürftigkeit ist somit nur bei frischer Serokonversion bzw. bei Antikörper-Titeranstieg aus diesen Reaktionsbefunden ablesbar; im übrigen bedarf es bei Lues-Verdacht weiterer Parameter zur Klärung der Behandlungsnotwendigkeit. – Zur Klärung der Therapiebedürftigkeit wird der Nachweis von Reagenen/Lipoid-Antikörpern, eine unspezifische Reaktion als VDRL- oder KBR als entscheidender Parameter genutzt (1, 2).

Die Interpretation der Cardioliipin-Befunde ist jedoch problematisch, da „biologisch falsch positive Reaktionen“ bei zahlreichen anderen potentiell überlagernden Ursachen, wie anderen Infektionskrankheiten, Hepatopathien, Gravidität, Autoimmunkrankheiten zu beobachten sind (3), andererseits bei latenter alter Lues die Cardioliipin-Reaktion auch negativ sein kann (4). Der Wert der Lipoid-Reaktionen als 3. Parameter neben TPHA- und FTA-ABS-Test zur Kontrolle des Therapieerfolgs ist unbestritten.

Bei akuter wie bei chronischer Treponema pallidum-Infektion bildet der Organismus Lues-spezifische IgM-Antikörper. Der

IgM-FTA-ABS-Test bietet so die Möglichkeit, die Behandlungsnotwendigkeit zu untersuchen. Bei Analyse des nativen Serums kann jedoch die IgM-Antikörperbindung durch überlagernde IgG-Antikörper kompetitiv beeinträchtigt werden, so daß u. U. falsch negative IgM-Antikörperbefunde resultieren können; diese Problematik ist umgehbar durch Einsatz gereinigter IgM-Präparate (5). IgM-Antikörper können isoliert werden durch Trennung an Ionenaustauschern, IgG-Absorption an Staphylokokken A-Protein, Gelfiltration oder Dichtegradienten-Ultrazentrifugation. Die ersten beiden Methoden sind durch IgM-Aufarbeitungsverluste, letztere durch hohen Zeitaufwand und erschwerte IgM/IgG-Abgrenzung beeinträchtigt. 1982 berichtete B. L. Schmidt erstmals über die HPLC-Präparation von IgM-Antikörpern zur Lues-Antikörperanalytik an einem hydrophil beschichteten Kieselgel (6).

Die sterische Ausschlußchromatographie mit Hilfe der HPLC bietet die Möglichkeit, IgM-Antikörper in kurzer Zeit quantitativ von 7s-Immunglobulinen zu trennen (6, 7). In der vorliegenden Arbeit wird die IgM-Treponema pallidum-Antikörperanalytik an mit Hilfe der HPLC isolierten IgM-Präparaten beschrieben.

## Material und Methoden

Untersucht wurden Seren von Patienten und Blutspendern mit positiven VDRL-, FTA-ABS und TPHA-Reaktionen.

Die chromatographische IgM-Antikörper-Isolierung erfolgte mit einer LKB-HPLC-Anlage (HPLC-Pumpe 2150, Photometer 2151, Schreiber 2210, Fraktionssammler 2211 Superrac) an LKB Ultropac TSK G 4000 SW.

Partikelgröße  $13 \pm 2 \mu\text{m}$ .

Trennbereich für Proteine 5000–1.000.000 Dalton.

Chromatographiesäule  $0,75 \times 60 \text{ cm}$  – Vorsäule  $0,75 \times 7 \text{ cm}$ .

Probe-Volumen: 0,1 ml steril filtriertes Probanden-Serum.

Elutionspuffer: PBS pH 7,2/0,1%  $\text{NaN}_3$   
(0,15 m NaCl/0,025 m Sörensen-Phosphatpuffer pH-Wert 7,2/0,015 m  $\text{NaN}_3$ ).

Elutionsgeschwindigkeit: 0,5 ml/min.

Trenndauer: 60 min – bei höherem Probenanfall ist die Trenndauer durch Steigerung der Elutionsgeschwindigkeit auf 1 ml/min sowie durch überlappende Chromatographie auf 20 min/Trennung reduzierbar.

Detektion: photometrisch bei 280 nm – AUFS 2,56.

Reagenzien: die Analyse der Seren wurde nach den Arbeitsvorschriften der Hersteller durchgeführt; hiervon abweichende Analytik der Eluate wird detailliert beschrieben.

VDRL-Test: Fisher Diagnostics/Oranjeburg, N.Y. – Behring/Marburg.

TPHA-Test: Fa. Medac/Japan Lyophilization Laboratories Tokyo.  $25 \mu\text{l}$  der Eluatfraktionen wurden mit  $25 \mu\text{l}$  Absorptionsmedium in Mikrotiterplatten (V-Form) in geometrischer Verdünnungsreihe verdünnt; nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu jeder Verdünnung  $75 \mu\text{l}$  sensibilisierte Testerythrozyten sowie im Kontrollversuch  $75 \mu\text{l}$  nicht sensibilisierte Testerythrozyten zugegeben. Titerableitung erfolgte nach 4 Std. Inkubation bei Raumtemperatur. Bei einem chromatographisch bedingten Verdünnungseffekt von ca. 1:20 resultiert bei der geometrischen Weiterverdünnung eine der Arbeitsvorschrift des Herstellers für Serumanalyse entsprechende Startverdünnung von ca. 1:80.

Die graphische Darstellung der TPHA-Titer aller Eluatfraktionen ergibt die abgebildeten Antikörper-Titerprofile.

Bei zweifelhaften Agglutinationsreaktionen wurde das in Miniconzellen der Fa. Amicon auf Ausgangsvolumen aufkon-

zentrierte Eluat analog bei geringerer Startverdünnung titiert.

FTA-ABS-Test: Fa. Mast-Diagnostika (Clinical Sciences Inc. New-Jersey USA).

Nach Angaben des Herstellers enthält das Fluoreszein-markierte Anti-Human-Immunglobulin einen IgM-Anteil von ca. 15%. Dieses polyvalente Antiserum wurde zur FTA-ABS-Analytik der nativen Serumprobe sowie des in Miniconzellen auf Ausgangsvolumen aufkonzentrierten IgM-Eluats eingesetzt; da bei den vorangegangenen Versuchen (7) eine IgG-Verunreinigung der IgM-Antikörper-Fraktion nicht zu beobachten war, wurde auf die Verwendung von monovalenten  $\mu$ -Ketten-spezifischen Antiseren verzichtet.

## Ergebnisse

Der Nachweis von Lipid-Antikörpern gilt als entscheidender Parameter für die Diagnostik einer Therapie-bedürftigen Treponema pallidum-Infektion. Der vorliegende Bericht ist Teil einer Studie, in der wir bei bisher 25 Probanden mit positiven VDRL-, TPHA-, FTA-ABS-Reaktionen die 19s/7s-Immunglobuline durch sterische Ausschlusschromatographie mit Hilfe der HPLC trennten, um VDRL-Reaktivität und spezifische IgM-Antikörper-Befunde gegenüberzustellen.

Die in den Eluatfraktionen enthaltenen Antikörper wurden in der Regel direkt im TPHA-Test quantitativ analysiert; der FTA-ABS-Test wurde mit der auf Ausgangsvolumen aufkonzentrierten IgM-Fraktion durchgeführt. Die bei TPHA-Analytik resultierenden spezifischen 19s/7s-Antikörperprofile stimmen überein mit der bei Quantifizierung der verschiedenen Immunglobuline beobachteten Immunglobulintrennung. Je nach Antikörper-Konzentration des Probandenserums ist bei TPHA-Analytik eine erhebliche Weiterverdünnung der Eluate möglich. Die spezifische Antikörper-Analytik ermöglicht so eine empfindlichere Erfassung und Abgrenzung der 19s/7s-Immunglobuline als dies durch quantitative Analyse der verschiedenen Immunglobulinklassen nephelometrisch oder mit der Mancini-Technik der Fall ist (7).

Die Zuordnung der 19s/7s-Antikörper zum photometrisch bei 280 nm registrierten HPLC-Elutionsdiagramm (Abb. 1) ist aus der Gegenüberstellung der TPHA-Titerprofile (Abb. 2a–c) ersichtlich.

Die graphische Darstellung der TPHA-Titer der Eluatfraktionen demonstriert den Umfang der IgM-Antikörper-Beteiligung an der Lues-Immunität des Probanden.

Die Qualität der HPLC-19s/7s-Antikörper-Trennung sei an 3 Beispielen von Probanden mit unterschiedlicher Lues-Antikörper-Situation dargestellt (Tab. 1, Abb. 2a–c).

Tab. 1: Lues-serologische Reaktionsbefunde von 3 Probanden bei Analyse des nativen Serums (TPHA-, FTA-ABS-, VDRL-Test) bzw. der HPLC-chromatographisch gewonnenen IgM-Fraktion (IgM-TPHA-, 19s-IgM-FTA-ABS-Test)

| Proband | TPHA-Titer <sup>-1</sup> | FTA-ABS-Test | VDRL-Titer <sup>-1</sup> | IgM-TPHA-Test | 19s-IgM-FTA-ABS-Test |
|---------|--------------------------|--------------|--------------------------|---------------|----------------------|
| A       | 12800                    | reaktiv      | 32                       | reaktiv       | reaktiv              |
| B       | 6400                     | reaktiv      | 32                       | nicht reaktiv | nicht reaktiv        |
| C       | 48000                    | reaktiv      | 128                      | reaktiv       | nicht reaktiv        |

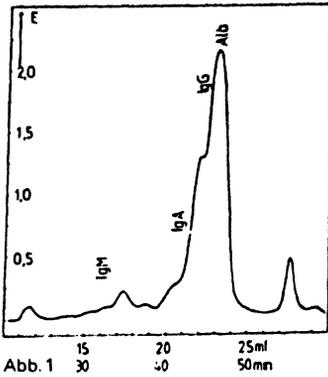


Abb. 1

**Abb. 1:**  
HPLC-Elutionsdiagramm. Probe-Volumen: 0,1 ml Human-Serum. Chromatographie-Säule: LKB-Ultropac TSK G 4000 SW 0,75 x 60 cm. Chromatographiegeschwindigkeit: 0,5 ml PBS/min. Detektion: 280 nm – AUFS 2,56

Bei allen Probanden sind bei Titration der Eluate im TPHA-Test im IgG-Bereich Treponema pallidum-spezifische Antikörper nachweisbar.

Bei Proband A (akute Lues-Infektion, Abb. 2a) wird neben dem IgG-Antikörper im IgM-Bereich ein ausgeprägter, hochtitriger Gipfel Lues-spezifischer Antikörper dargestellt; beide Antikörper-Zonen erscheinen als schmale, getrennte Fraktionen, eine Überlagerung der IgM/IgG-Fraktionen ist nicht zu beobachten.

Bei Proband B (Abb. 2b) sind Lues-spezifische Antikörper ausschließlich im IgG-Bereich zu beobachten; Bei sanierter Luesinfektion besteht bei diesem Patienten eine „biologisch falsch positive“, unspezifische VDRL-Reaktion gleicher Aktivität wie bei Proband A.

Bei Proband C (Abb. 2c) schließlich ist bei einer hochtitrigen IgG-Antikörper-Kurve eine geringe Verbreiterung der IgG-Antikörperzone zu beobachten – der IgM-Bereich bleibt selbst bei hohen IgG-Antikörper-Titern ausreichend abgegrenzt. Im IgM-Bereich sind nur Spuren Lues-spezifischer Antikörper nachweisbar (die Analyse der auf Ausgangsvolumen aufkonzentrierten gesammelten IgM-Subfraktionen ergibt eine deutlich positive TPHA-Reaktion), der IgM-FTA-ABS-Test des aufkonzentrierten IgM-Eluats weist keine Lues-spezifischen Antikörper auf. – Bei Proband C mit hochtitrigen Lues-spezifischen und Lues-charakteristischen Reaktionen besteht wahrscheinlich bei hohem IgG-TPHA-Titer ein negativer, die Bildung Lues-spezifischer IgM-Antikörper hemmender feedback-Mechanismus (8), so daß trotz bestehender Lues-Infektion im 19s-IgM-FTA-ABS-Test keine spezifischen Antikörper nachzuweisen sind.

Bei 25 analysierten Seren von Probanden mit positiven TPHA-/FTA-ABS-Reaktionen und VDRL-Titern<sup>-1</sup> von 2–128 beobachteten wir 10 positive IgM-Antikörper-Befunde: 9 positive 19s-IgM-FTA-ABS/TPHA-Reaktionen, 1 isolierten IgM-TPHA-Befund (Proband C). 15 Seren (60%) mit VDRL-Titern<sup>-1</sup> bis 32 enthielten keine spezifischen IgM-Antikörper; die positiven VDRL-Reaktionen wurden als „biologisch falsch positiv“ gewertet. Eine detaillierte Statistik soll einer größeren Analysenserie vorbehalten bleiben. Ziel des vorliegenden Berichts ist es, die Qualität der 19s/7s-Immunglobulin-Trennung mit Hilfe der HPLC durch sterische Ausschlußchromatographie an TSK G 4000 SW mit Hilfe einer spezifischen Antikörper-Analytik zu demonstrieren.

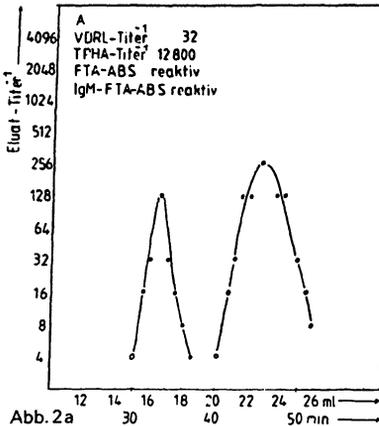


Abb. 2a

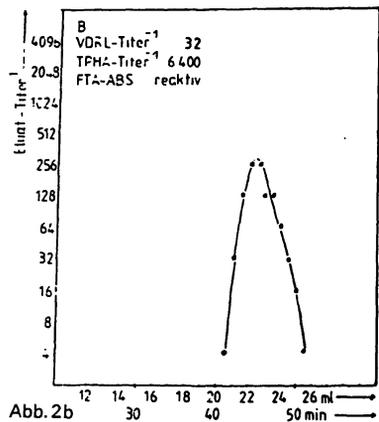


Abb. 2b

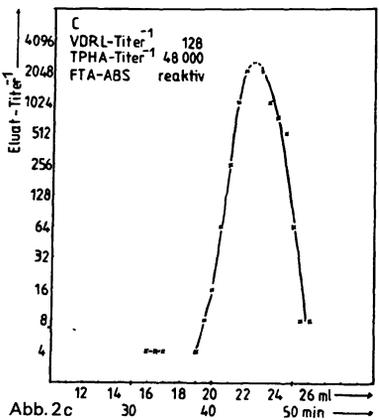


Abb. 2c

**Abb. 2a–2c:**  
TPHA-Titerprofile der Probanden A, B, C bei direkter Titration der Eluatfraktionen. Fraktionsgröße 0,5 ml. Probe-Volumen: 0,1 ml Serum. Chromatographie-Säule: LKB-Ultropac TSK G 4000 SW 0,75 x 60 cm. Elutionsgeschwindigkeit: 0,5 ml/min

## Diskussion

Die vorangehende Studie zur Trennung der 19s/7s-Immunglobuline mit Hilfe der HPLC an LKB Ultropac TSK G 4000 SW ergab bei nephelometrischer Immunglobulinquantifizierung wie in der Mancini-Technik eine überlappungsfreie IgM/(IgA-IgG)-Trennung; zwischen den 19s/7s-Immunglobulinen befanden sich bei dieser Analysetechnik mehrere Immunglobulin-freie Eluatfraktionen (7).

Diese Beobachtung wird durch die spezifische Antikörper-Analytik bestätigt, doch ist bei hohen Antikörper-Titern mit empfindlicher, serologischer Analysetechnik bei „tailing“ der IgM-Zone und Verbreiterung des IgG-Bereiches ein Verfließen der Antikörper-Grenzbereiche möglich. Bei Titration der einzelnen Eluatfraktionen im TPHA-Test ist die 2-gipfelige Antikörper-Verteilung im IgM- und im IgG-Bereich gut darstellbar (Abb. 2a–2c).

Die IgM/IgG-Schwerpunkte sind so weit voneinander getrennt, daß es mit der HPLC-Technik möglich ist, IgG-freie IgM-Präparate zu gewinnen.