

# Bestimmung von IgM-Röteln-Antikörpern durch HPLC-IgM-Präparation im Vergleich mit einem kommerziellen IgM-Antikörper-EIA

W. Gräßmarin, J. Jarms

DRK-Blutspendedienst Lütjensee (Chefarzt Dr. med. G. Stienen)

## Zusammenfassung:

Die HPLC-Technik (High performance liquid chromatography) bietet die Möglichkeit, IgM-Antikörper durch sterische Ausschlußchromatographie in kurzer Zeit quantitativ von den IgG-Antikörpern zu trennen. Die Leistungsfähigkeit der HPLC-Präparation von IgM-Antikörpern wird mit verschiedenen Methoden der Röteln-Antikörper-Analytik demonstriert. Die über eine präparative Isolierung der IgM-Antikörper verlaufenden Analysetechniken sind auf kleine Analysenserien bei Rötelnverdacht begrenzt. Kommerzielle IgM-Röteln-Antikörper-EIAs ermöglichen die Durchführung großer Analysenserien, z. B. Screening-Serien mit dem Ziel, während der Schwangerschaft unbemerkte als stille Feiung abgelassene Röteln-Infektionen zu diagnostizieren und so das trotz Vorsorgeuntersuchung verbleibende Restrisiko einer Röteln-Embryopathie weiter zu senken. Analysenempfindlichkeit, Grenzwertdefinition, Spezifität der Reaktionsbefunde und zeitliche Eingrenzung des Infektionszeitpunktes sind noch bestehende Probleme, die bei Durchführung von IgM-Röteln-Antikörper-EIAs im Rahmen der Schwangerenbetreuung zu beachten sind.

## Schlüsselwörter:

IgA-IgG-IgM-Röteln-Antikörper - HPLC-IgM-Antikörper-Präparation - IgM-Röteln-Antikörper-EIA

## Summary:

By HPLC-technique (High performance liquid chromatography) it is possible to separate IgM from IgG antibodies quantitatively. The efficiency of IgM-preparation by HPLC is demonstrated by several methods of Rubella antibody analysis. IgM-Rubella antibody analysis via preparative isolation of IgM-antibodies is limited to short series of analysis. Commercial IgM-Rubella antibody EIAs enable long series of analysis for instance screening series for diagnosis of asymptomatic Rubella infection during pregnancy with the aim to reduce the remaining risk of Rubella induced embryopathy. Sensitivity, definition of the limiting value, specificity of the results and evaluation of the point of time of infection are problems to be observed when IgM-Rubella-EIA is used for routine analysis for the care of the unborn.

## Keywords:

IgA-IgG-IgM-Rubella-antibodies - HPLC-IgM-antibody-preparation - IgM-Rubella-antibody-EIA

## Einleitung

Wegen des Risikos einer folgenschweren Miterkrankung des Ungeborenen ist es Ziel verschiedener Maßnahmen, eine Rötelninfektion in der Schwangerschaft zu vermeiden bzw. zu diagnostizieren. Die Diagnose einer Rötelninfektion ist dadurch erschwert, daß andere Virusinfekte rubeoliforme Exantheme hervorrufen können, sowie durch die Tatsache, daß ca. 50% der Rötelninfektionen subklinisch verlaufen (1). Die vorsorgliche Röteln-Antikörper-Analytik ist daher Bestandteil der Schwangerenbetreuung. Bei Rötelnverdacht während der Gravidität fordern die Richtlinien zur Schwangerenbetreuung Röteln-Antikörper-Titrationen an 2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommenen Blutproben, - wenn bereits in der ersten Serumprobe ein hoher Röteln-Antikörper-Titer besteht IgM-Röteln-Antikörper-Analytik (2).

Vor IgM-Antikörper-Analyse sind die IgG-Antikörper zu eliminieren, um eine Beeinträchtigung der IgM-Antikörper-

per-Bestimmung durch kompetitiv überlagernde IgG-Immunglobuline auszuschließen. Die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation als Referenzmethode zur IgM-Antikörper-Isolierung ist wie die Gelfiltration zeitaufwendig. Ferner kann die IgM/IgG-Antikörper-Trennung unvollständig sein (3), bzw. es kann ein IgM-Antikörper-Verlust von bis zu 50% entstehen (4). Es finden sich daher zahlreiche alternative Vorschläge zur IgM-Antikörper-Isolierung: die Qualität der IgM-Antikörper-Präparation mit der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation wurde bisher von keiner alternativen Trennmethode erreicht (5, 6).

Die HPLC-Technik (High performance liquid chromatography) hat sich bei der Trennung von humanen Serumproteinen durch sterische Ausschlußchromatographie bewährt (7, 8). 1982 beschrieb B. C. Schmidt erstmals die HPLC-Trennung von Immunglobulinen an einem mit einer hydrophilen Phase beschichteten Kieselgel (4). H. Doerr (9) isolierte IgM-Antikörper zur Röteln-Antikörper-Analytik HPLC-chromatographisch; das eingesetzte

Trägermaterial ermöglichte die Isolierung von 7s-Immunglobulin-freien IgM-Antikörpern in einer Ausbeute von 25%. Mit verbesserten Trennmedien ist es möglich, in kurzer Zeit IgM-Antikörper verlustfrei quantitativ von den 7s-Immunglobulinen zu trennen (10). Die IgM-Röteln-Antikörper-Analytik an mit Hilfe der HPLC durch isokratische sterische Ausschlusschromatographie isolierten IgM-Antikörper-Präparaten wird in der vorliegenden Arbeit beschrieben.

Über eine präparative Isolierung der IgM-Antikörper verlaufende Analysentechniken sind auf kleine Analysenserien bei Infektionsverdacht begrenzt; dagegen sind kommerzielle IgM-Röteln-Antikörper EIAs technisch gut für die Durchführung großer Analysenserien geeignet; damit eröffnet sich die Möglichkeit, durch IgM-Röteln-Antikörper-Screening im Rahmen der Schwangerenbetreuung während der Schwangerschaft als stille Feiung verlaufende Rötelninfektionen zu diagnostizieren. HPLC-IgM-Röteln-Antikörper-Bestimmung und ein kommerzieller IgM-Röteln-Antikörper-EIA werden an Beispielen gegenübergestellt.

## Material und Methoden

Die vorliegende Studie basiert auf der IgM-Röteln-Antikörper-Bestimmung von bisher 50 Seren von Probanden mit Röteln-Verdacht (vorwiegend Kinder und Schwangere), sowie auf der Analyse von 1 000 nicht ausgewählten Schwangerenseren.

a) Bei Patienten mit Röteln-Verdacht wird bei im HAH-Test nachgewiesenen Röteln-Antikörpern eine Serumprobe HPLC-chromatographisch getrennt. Bei 20 Probanden erstellten wir ein komplettes Röteln-Antikörper-Elutions-Profil, indem wir die aufkonzentrierten Eluatfraktionen im HAH-Test, in der radialen Immunhämolysen, im IgM-, sowie im IgG-Röteln-Antikörper-EIA analysierten. Bei den folgenden Probandenseren führten wir die gleichen Analysen am isolierten IgM-Antikörper-Präparat durch.

b) Bei 1000 Serumproben von nicht ausgewählten Schwangeren mit im HAH-Test nachgewiesener Röteln-Immunität führten wir unabhängig von der Höhe des HAH-Titers eine IgM-Röteln-Antikörper-EIA-Analyse durch. Abweichend von den Grenzkriterien des Herstellers isolierten wir bei Seren mit einem Grenzquotienten  $E_{\text{Proband}} : s. \text{ pos. Kontr.} \geq 0,8$  die IgM-Antikörper durch HPLC-Chromatographie. Die auf das Ausgangsvolumen aufkonzentrierten IgM-Antikörper-Eluate wurden im HAH-Test sowie im IgM-Röteln-Antikörper-EIA analysiert.

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

Partikelgröße  $13 \pm 2 \mu\text{m}$

Fraktionierungsbereich für Proteine:  
5000–1 000 000 Dalton

Chromatographie-Säulengröße  $2,15 \times 60 \text{ cm}$   
Vorsäule  $2,15 \times 7,5 \text{ cm}$

Chromatographiert wurde 1 ml steril filtriertes Serum.

Trennmedium:

PBS pH 7,2/0,1%  $\text{NaNO}_3$   
(0,15 m NaCl/0,025 m Sörensen Phosphat-Puffer/  
0,015 m  $\text{NaNO}_3$ ).

Chromatographieschwindigkeit 2–5 ml PBS/min.

Trenndauer:

bei 2 ml PBS/min 125 min

bei 5 ml PBS/min 50 min

bei überlappender Chromatographieführung bis 30 min  
reduzierbar.

Photometrische Registrierung:

280 nm AUFS 2,56.

Das HPLC-Eluat wurde in 10 ml-Fractionen gesammelt. Zur Registrierung der Antikörper-Elutionsprofile wurden bei 20 Seren die Fractionen in Miniconzellen (Fa. Amicon) auf 0,5 ml aufkonzentriert; im folgenden wurde der IgM-Antikörper-Bereich (bei der verwendeten Chromatographiesäule bei 10 ml Fraktionsvolumen Fraktion 12/13) als eine Fraktion gesammelt und auf das Ausgangsvolumen, in Grenzfällen auf ein geringeres Volumen aufkonzentriert.

Die Röteln-Antikörper-Bestimmung der Seren sowie der aufkonzentrierten HPLC-Fractionen wurde entsprechend den Arbeitsvorschriften der Hersteller durchgeführt:

Hämagglutinations-Hemm-Test:

Fa. Ortho Diagnostics Humane Test-Erythrozyten.

Radiale Immunhämolysen (RIH) (Hemolysis in gel Assay, HIG-Test):

Agarplatten eigener Herstellung, Röteln-Antigen Fa. Orion, Hammel-Erythrozyten Fa. Behring.

„HPLC-IgM-Röteln-Antikörper HAH-Test“:

Röteln-Antikörper-HAH-Test am aufkonzentrierten HPLC-IgM-Antikörper-Präparat.

IgG/IgM-Röteln-Antikörper-EIA:

Fa. Abbott.

Anti-Human-IgA-Antikörper (Kaninchen):

Fa. Behring.

Zur Neutralisation von IgA-Antikörpern inkubierten wir 100  $\mu\text{l}$  aufkonzentriertes Eluat mit 200  $\mu\text{l}$  Anti-IgA 1 Std. bei 37°C.

Nach dieser Vorinkubation wurde der Überstand der zentrifugierten Probe im Röteln-Antikörper-HAH-Test analysiert: die durch die Anti-IgA-Zugabe erfolgte Verdünnung des Eluats wurde bei der folgenden Titration des Neutralisats im HAH-Test berücksichtigt, so daß die Startverdünnung im HAH-Test 1:8 betrug.

Um Rheumafaktoren-bedingte Unspezifitäten auszuschließen, führten wir bei divergierenden IgM-Röteln-Antikörper-EIA/HPLC-IgM-Röteln-Antikörper-HAH-Befunden eine Rheumafaktoranalyse durch.

Rheumafaktor-Bestimmung: Latex-Test Fa. Behring.

## Ergebnisse

Die aufkonzentrierten HPLC-Eluatfraktionen wurden wie die nativen Serumproben im Hämagglutinations-Hemm-Test titriert und durch radiale Immunhämolysen sowie im IgM/IgG-Röteln-Antikörper-EIA analysiert.

Da im Gegensatz zur Dichtegradienten-Ultrazentrifugation bei der sterischen Ausschlusschromatographie die unspezifischen Inhibitoren nicht von den 19s-Immunglobulinen getrennt werden, ist bei der Analyse der HPLC-Präparate wie bei der Analyse des nativen Serums eine  $\text{MnCl}_2$ /Heparin-Vorbehandlung der aufkonzentrierten Eluatfraktionen vor Durchführung des HAH-Tests erforderlich.

**IgM-Röteln-Antikörper-Analytik bei Probanden mit Rötelnverdacht**

Der vorliegende Bericht basiert auf der Analyse von bisher 50 Seren von Probanden mit Rötelnverdacht. Die Qualität der Trennung der IgM- von den IgG-Antikörpern am Trennmedium LKB Ultropac TSK G 4000 SW wird an 5 repräsentativen Beispielen demonstriert. Die graphische Darstellung der HAH-Titer<sup>-1</sup> der HPLC-Fractionen veranschaulicht die Beteiligung der 19s/7s-Antikörper an der Röteln-Immunität des Probanden. Abb. 1 zeigt ein typisches HPLC-Serumprotein-Elutionspektrum.

Proband A (Alter 8 Jahre) Blutentnahme 5 Tage nach Exanthembeginn (Röteln-Antikörper-HAH-Titer<sup>-1</sup>/RIH 64, IgM- und IgG-Röteln-Antikörper-EIA positiv). Das HPLC-Eluat enthält 2 Röteln-Antikörper-Zonen: die zuerst eluierende Antikörper-Zone ergibt positive Röteln-Antikörper-Befunde im HAH-Test sowie im IgM-Röteln-Antikörper-EIA; in der RIH sowie im IgG-Röteln-Antikörper-EIA sind in diesem Fraktionierungsbereich keine Röteln-Antikörper nachweisbar.

Der zweite Antikörper-peak weist identische Antikörper-Grenzen im HAH-/RIH-Test, sowie im IgG-Röteln-Anti-

körper-EIA auf; IgM-Antikörper sind in der zweiten Antikörper-Zone im IgM-Röteln-Antikörper-EIA nicht nachweisbar. IgM- und IgG-Antikörper sind durch mehrere Antikörper-freie Fraktionen getrennt (Abb. 2).

Bei Proband A besteht eine frische Röteln-Immunität mit positiven IgM/IgG-Röteln-Antikörper-Befunden; das Exanthem war Röteln-bedingt.

Proband B (22jährige Gravide) Blutentnahme 1 Woche nach rubeoliformem Exanthem (Röteln-Antikörper-Titer HAH<sup>-1</sup>/RIH-Test 256, IgG-Röteln-Antikörper-EIA positiv, IgM-Röteln-Antikörper-EIA negativ). Das Röteln-Antikörper-Profil des HPLC-Eluats weist im HAH-/RIH-Test sowie im IgG-Röteln-Antikörper-EIA nur eine Röteln-Antikörper-Zone im IgG-Antikörper-Bereich auf; bei hohem Antikörper-Titer ist die IgG-Zone gering verbreitert. Im Bereich der IgM-Antikörper-Fraktion sind mit keiner Analysenmethode Röteln-Antikörper nachweisbar (Abb. 3).

Bei Proband B besteht eine „alte“ Röteln-Immunität; das Exanthem war nicht Röteln-bedingt.

Proband C (40jährige Frau) 6 Wochen vor Blutentnahme bestand ein rubeoliformes Exanthem. Röteln-Antikörper-Titer HAH<sup>-1</sup>/RIH 512, IgG-Röteln-Antikörper-EIA posi-

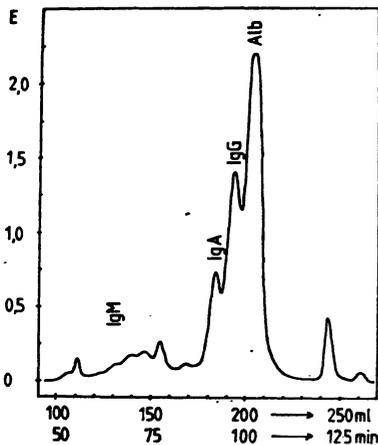


Abb. 1: HPLC-Serumprotein-Elutionsspektrum Chromatographie von 1 ml Serum an LKB Ultropac TSK G 4000 SW, Chromatographieschwindigkeit 2 ml PBS/min, Photometrische Registrierung bei 280 nm Aufs 2,56; Säulenmaße 2,15x60 cm mit Vorsäule 2,15x7,5 cm

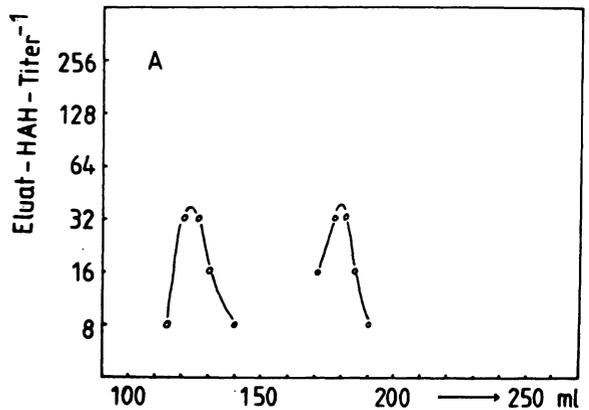


Abb. 2: Proband A. Röteln-Antikörper-Elutionsspektrum, HAH-Test, akute Röteln-Infektion, Blutentnahme 5 Tage nach Exanthembeginn

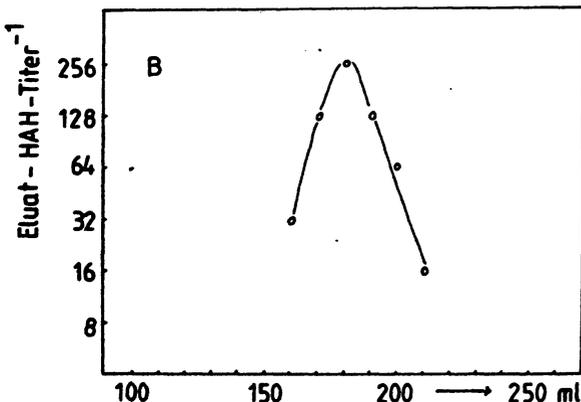


Abb. 3: Proband B. Röteln-Antikörper-Elutionsspektrum, HAH-Test, „alte Röteln-Immunität“

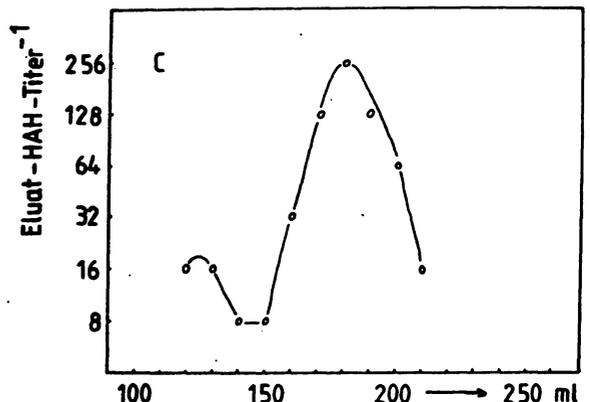


Abb. 4: Proband C. Röteln-Antikörper-Elutionsspektrum, HAH-Test, Blutentnahme 6 Wochen nach Exanthem

tiv - IgM-Röteln-Antikörper-EIA nach Grenzwertdefinition des Herstellers negativ.

( $E_{\text{Proband}} : E_{\text{s.p. Kontrolle}} = 0,8$ ).

Die Analyse der aufkonzentrierten Eluatfraktionen weist ein Zgipfeliges Röteln-Antikörper-Profil auf: die Fraktionen des IgM-Antikörper-Bereichs ergeben positive HAH- und IgM-Röteln-Antikörper-EIA-Reaktionen, die Fraktionen des IgG-Antikörper-Bereichs positive HAH/RIH und IgG-Röteln-Antikörper-EIA-Befunde (Abb. 4).

Bei Proband C sind nach Grenzwertdefinition des Herstellers bei Analyse des nativen Serums im IgM-Röteln-Antikörper-EIA keine Röteln-Antikörper nachweisbar. Das auf 250  $\mu\text{l}$ , also um den Faktor 4 gegenüber Serum aufkonzentrierte HPLC-IgM-Antikörper-Präparat ergibt dagegen sowohl im HAH-Test als auch im IgM-Röteln-Antikörper-EIA positive IgM-Röteln-Antikörper-Befunde.

Das beobachtete Exanthem war wahrscheinlich Rubeeolen-bedingt.

Proband D (27jährige Gravide) Röteln-Antikörper-Titer-HAH-Test<sup>-1</sup>/RIH 256, IgG-Röteln-Antikörper-EIA positiv, IgM-Röteln-Antikörper-EIA negativ ( $E_{\text{Proband}} : E_{\text{s.p. Kontrolle}} = 0,6$ ). Die aufkonzentrierten HPLC-Eluatfraktionen ergeben im HAH-Test, in der RIH, sowie im IgG-Röteln-Antikörper-EIA nur im IgG-Bereich positive Befunde. Im IgM-Bereich ist bei negativem HAH-Test im IgM-Röteln-Antikörper-EIA ein unterhalb des Grenzwerts gelegenes Extinktionsmaximum zu beobachten.

Gemäß Grenzwertdefinition des Herstellers des IgM-Röteln-Antikörper-EIA ist in Übereinstimmung mit dem IgM-HPLC-HAH-Befund der beschriebene IgM-Röteln-Antikörper-Befund als negativ zu werten, doch kann der unterschwellige EIA-Extinktionsgipfel im IgM-Bereich durch eine geringe IgM-Röteln-Antikörper-Konzentration bei länger zurückliegender Rötelninfektion bedingt sein.

Die Röteln-Antikörper-Analyse der HPLC-Eluatfraktionen mit verschiedenen Analysetechniken bestätigt die bei vorangegangenen Analysen (10) beobachtete HPLC-Trennqualität für IgM/IgG-Antikörper: mit Hilfe der HPLC-Technik ist es möglich, durch sterische Ausschlußchromatographie an LKB Ultropac TSK G 4000 SW in kurzer Zeit IgM/IgG-Antikörper quantitativ zu trennen. Die isokratische Chromatographie ermöglicht eine rasche Trennfolge ohne zwischenzeitige Regeneration des Trennmaterials.

Bisher analysierten wir Seren von 50 Probanden mit Rötelnverdacht unter den beschriebenen Versuchsbedingungen: bei 29 Seren (58%) beobachteten wir sowohl im IgM-Röteln-Antikörper-EIA als auch im HPLC-IgM-Antikörper-Präparat im HAH-Test positive IgM-Röteln-Antikörper-Befunde.

Bei 2 Probanden (4%) waren nach Grenzwertdefinition des Herstellers im IgM-Röteln-Antikörper-EIA keine Röteln-Antikörper nachweisbar, dagegen ergab das aufkonzentrierte IgM-HPLC-Eluat sowohl im HAH-Test als auch im IgM-Röteln-Antikörper-EIA positive IgM-Röteln-Antikörper-Befunde. - Bei 2 Probanden (4%) ergab der IgM-Röteln-Antikörper-EIA positive Befunde bei negativem HPLC-IgM-Röteln-Antikörper-HAH-Test (und negativem Rheumafaktor): 4% positive IgM-Röteln-Antikörper-EIA-Befunde, die nicht durch den HAH-Test am IgM-HPLC-Präparat bestätigt werden konnten, wurden als unspezifisch positive IgM-Röteln-Antikörper-EIA-

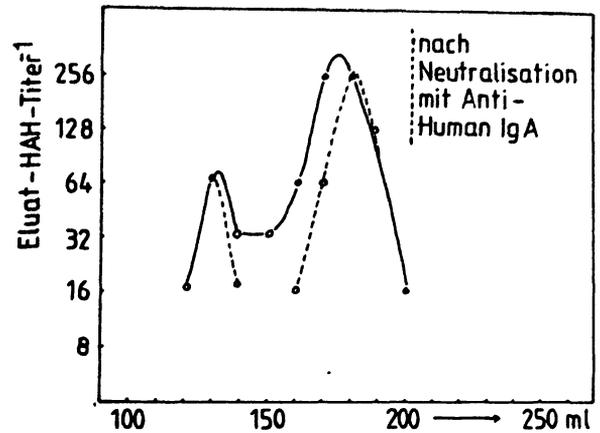


Abb. 5: Proband E. Röteln-Antikörper-Elutionsspektrum, HAH-Test, akute Röteln-Infektion, Antikörper-Spektrum vor und nach Neutralisation von IgA-Antikörpern mit Anti-IgA

Befunde gewertet. Bei 17 Probanden (34%) waren in keinem Analysenverfahren IgM-Röteln-Antikörper nachweisbar. Bei 38% der Probanden war das Exanthem nicht Röteln-bedingt.

Nach Angabe des Herstellers ist der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte IgM-Röteln-Antikörper-EIA so eingestellt, daß innerhalb einer Zeitspanne von 8-21 Tage nach Exanthembeginn positive IgM-Röteln-Antikörper-Befunde zu erwarten sind. Nach Verstreichen dieser Zeitspanne beobachteten wir bei mehreren Probanden bei nach Grenzwertdefinition des Herstellers der IgM-Röteln-Antikörper-EIAs negativen Befunden im HPLC-IgM-Antikörper-Präparat positive HAH-Röteln-Antikörper-Titer; andererseits wurden positive Röteln-Antikörper-EIA-Befunde wiederholt nicht im HPLC-IgM-Röteln-Antikörper-HAH-Test bestätigt.

#### IgA-Röteln-Antikörper bei akuter Röteln-Infektion

Bei akuten Röteln-Infektionen beobachteten wir bei einigen Probanden zwischen IgM- und IgG-Fractionen eine Zone von Röteln-Antikörpern, die nur im HAH-Test, nicht dagegen in der RIH, sowie weder im IgM- noch im IgG-Röteln-Antikörper-EIA dargestellt wurden (Abb. 5, Proband E). Diese Röteln-Antikörper sind durch Anti-IgA-Antikörper neutralisierbar, gehören also zur Immunglobulinklasse IgA. In einer früheren Studie (10) hatten wir beobachtet, daß IgA-Antikörper mit kürzerer Retentionszeit als die IgG-Antikörper von LKB Ultropac TSK G 4000 SW eluiert werden.

Nach Neutralisation der IgA-Röteln-Antikörper ist das Röteln-Antikörper-HPLC-Elutionsprofil identisch mit Abb. 2.

Im Serum IgM-Röteln-Antikörper negativer Probanden mit alter Röteln-Immunität sind im HPLC-Eluat im IgM/IgG-Intervall keine Röteln-spezifischen IgA-Antikörper nachweisbar (10 Probanden): IgA-Röteln-Antikörper sind wie IgM-Antikörper nur bei akuter Röteln-Infektion zu beobachten.

#### Analyse von Serum von Schwangeren ohne Röteln-Verdacht

1000 Seren von Schwangeren mit positiven HAH-Röteln-Antikörper-Befunden analysierten wir unabhängig von der HAH-Antikörper-Titerhöhe mit einem kom-

merziellen IgM-Röteln-Antikörper-EIA. Da wir bei IgM-Röteln-Antikörper-Analytik bei Probanden mit Röteln-Verdacht wiederholt auch bei niedrigen HAH-Röteln-Antikörper-Titern – je nach Zeitpunkt der Blutentnahme nach Symptombeginn – IgM-Antikörper beobachteten und bei der Suche nach als stiller Feiung abgelaufenen oder ablaufenden Rötelninfektionen jeder HAH-Röteln-Antikörper-Titer mit IgM-Antikörpern kombiniert sein kann, führten wir eine ergänzende IgM-Röteln-Antikörper-Analytik nicht nur bei hohen HAH-Titern durch, die auch durch Boosterung einer „alten“ Rötelnimmunität bedingt sein können. Da wir weiterhin bei mehreren Probanden bei einem Grenzquotienten von 0,8 im HPLC-IgM-HAH-Röteln-Antikörper-Test IgM-Röteln-Antikörper nachweisen konnten, isolierten wir abweichend von den Grenzwertangaben der Hersteller ab Grenzquotient  $E_{\text{Proband}} : E_{\text{pos. Kontrolle}} \geq 0,8$  die IgM-Antikörper durch sterische HPLC-Ausschlußchromatographie an LKB Ultrapac TSK G 4000 SW.

Bei 9 Probanden wurde der von uns gewählte Grenzwert von 0,8 überschritten, bei 7 der Grenzwert des Herstellers. Die HAH-Röteln-Antikörper-Titer<sup>-1</sup> der Seren lagen zwischen 32–512. Die aufkonzentrierten IgM-HPLC-Eluate wurden im HAH-Test sowie erneut im IgM-Röteln-Antikörper-EIA analysiert: Bei 14 ergänzend analysierten Probandenserien waren im HPLC-IgM-Röteln-Antikörper-HAH-Test keine Röteln-Antikörper nachweisbar. Bei 2 Probanden (beide HAH<sup>-1</sup>-Titer 128) ergab der HPLC-IgM-Röteln-Antikörper-HAH-Test positive IgM-Röteln-Antikörper-Befunde: bei 1 Probandin bestand bis zur Blutentnahme zur serologischen Analyse eine unauffällige Anamnese; bereits 1 Woche später erfolgte ein wahrscheinlich Röteln-induzierter Spontanabort. Bei der zweiten Schwangeren mit positivem IgM-Röteln-Antikörper-Befund war ca. 4 Monate vor Analyse eine aktive Röteln-Impfung durchgeführt worden: DD verlängerte IgM-Röteln-Antikörper-Persistenz nach aktiver Röteln-Impfung/Rötelninfektion bei Impfersager,

Mit dem IgM-Röteln-Antikörper-EIA gelingt es als stille Feiung abgelaufene Rötelninfektionen zu diagnostizieren. Die Quote grenzwertiger IgM-Röteln-Antikörper-EIA-Befunde bei 1000 Probanden lag bei 1,6%, die Quote durch unabhängige Analyseverfahren bestätigter IgM-Röteln-Antikörper-Befunde bei 0,2%. Die Anzahl positiver und grenzwertiger IgM-Röteln-Antikörper-Befunde ist durch längere Analysenserien weiter abzuklären; jahreszeitlich bedingte Differenzen sind zu erwarten.

Hervorzuheben ist besonders eine erhebliche Zahl grenzwertiger Befunde im IgM-Röteln-Antikörper-EIA, die einer ergänzenden Abklärung bedürfen.

## Diskussion

Trotz aktiver Röteln-Immunsierung und serologischer Schwangerenbetreuung wird das Risiko einer Rötelninfektion in der Frühschwangerschaft in der BRD auf 0,12–0,15% (11), die Röteln-bedingte Mißbildungsquote auf 1–2 pro 1000 Lebendgeburten (12) geschätzt. Da eine diagnostizierte Rötelninfektion in der Frühschwangerschaft eine Indikation zur Interruptio darstellt, ist die z. Zt. noch bestehende Röteln-bedingte Mißbildungsrate wahrscheinlich überwiegend durch subklinische Rötelninfektionen bedingt: ca. 50% der Rötelninfektionen verlaufen als stille Feiung. Durch ergänzende IgM-Röteln-Antikörper-Bestimmung sollte es möglich sein, während der Schwangerschaft subklinisch verlaufende Infektionen zu erkennen und so die noch bestehende

Röteln-bedingte Mißbildungsrate zu senken. Eine über präparative Isolierung der IgM-Antikörper verlaufende IgM-Röteln-Antikörper-Analytik ist wegen des technischen und zeitlichen Aufwands auf kleine Analysenserien begrenzt. Kommerzielle IgM-Röteln-Antikörper-EIAs eröffnen dagegen die Möglichkeit, große Analysenserien zu untersuchen. Die mit z. Zt. zur Verfügung stehenden IgM-Röteln-Antikörper-EIA-Kits erzielten Ergebnisse sind beim Screening im Rahmen der Schwangerenbetreuung in mehrfacher Hinsicht kritisch zu werten:

1. Nach Angabe des Herstellers besitzt der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte IgM-Röteln-Antikörper-EIA eine optimale Nachweisempfindlichkeit innerhalb einer Zeitspanne von 1–3 Wochen nach Symptombeginn; bereits 3 Wochen nach Röteln-Manifestation soll mit hoher Wahrscheinlichkeit die IgM-Röteln-Antikörper-Konzentration unter der Grenze der Nachweisbarkeit liegen. Dagegen beobachtete Eggers (13) bei einer Verlaufsstudie nach Rötelninfektion bzw. -Impfung in jedem Fall bis 10 Wochen nach Immunsierung im HAH-Test IgM-Röteln-Antikörper bei Isolierung der IgM-Antikörper durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation; bei einigen Probanden persistierten IgM-Röteln-Antikörper bis 1 Jahr post infectionem. Bei negativem IgM-Röteln-Antikörper-EIA beobachteten wir wiederholt im HAH-Test am IgM-HPLC-Präparat positive IgM-Röteln-Antikörper-Befunde. Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte IgM-Röteln-Antikörper-EIA zielt auf die Diagnostik einer akuten Rötelninfektion. Die analytische Empfindlichkeit dieses IgM-Röteln-Antikörper-EIAs ist erheblich geringer als die bei Dichtegradientenpräparation mit folgendem klassischem Antikörper-Nachweis. Unter Berücksichtigung der Halbwertszeit der IgM-Antikörper und der hohen Empfindlichkeit von EIAs bei der Quantifizierung anderer Antikörper sollte durch Modifizierung des bestehenden Analyseverfahrens eine Steigerung der Empfindlichkeit dieser IgM-Röteln-Antikörper-EIA möglich sein. So sollte es gelingen, die ausgewiesene 3-Wochenfrist des IgM-Röteln-Antikörper-Nachweises nach Rötelninfektion auf eine größere Zeitspanne zu erweitern. Im Rahmen der Schwangerenbetreuung wäre ein zuverlässiger Rückblick auf das erste Trimenon zu fordern.

2. Andererseits ist die Definition eines IgM-Röteln-Antikörper-Grenzwertes problematisch. Die Richtlinien zur ärztlichen Betreuung während der Schwangerschaft definieren einen HAH-Grenztiter, der eine bestehende Röteln-Immunität beweisen soll: IgG-Röteln-Antikörper-EIAs sind auf diesen Grenztiter kalibrierbar.

Ein positiver IgM-Röteln-Antikörper-Befund gilt unabhängig von der Konzentration der Röteln-spezifischen IgM-Antikörper als Beweis für eine kürzlich abgelaufene Rötelninfektion. Es gilt aber zu vermeiden, daß das Ungeborene etwa mit einer bereits vor Schwangerschaftsbeginn abgelaufenen Rötelninfektion belastet wird. Versuche, durch IgM-Röteln-Antikörper-Titration oder durch Quotientenbildung IgM/IgG-Röteln-Antikörper-Titer den Zeitpunkt der Rötelninfektion einzugrenzen (13, 14) führten bislang nicht zu einer klaren Definition. Individuelle unterschiedliche Intensität der Antikörperbildung sowie unterschiedliche Dauer der Antikörper-Persistenz erschweren eine Eingrenzung des Infektionszeitpunktes.

3. Bei der IgM-Röteln-Antikörper-Analytik mit dem EIA eines anderen Herstellers beobachtete Lennartz (5) bei Vergleich mit dem HAH-Test am Dichtegradienten-Ultrazentrifugations-Präparat 8% unspezifische positive Befunde. Bei dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten EIA registrierten wir eine Unspezifitätsquote von 4%.

Wegen der Möglichkeit von unspezifisch positiven sowie falsch negativen IgM-Röteln-Antikörper-EIA-Befunden ist zur Bestätigung eines positiven sowie zur Klärung eines zweifelhaften EIA-Befundes eine unabhängige zweite Analysenmethode zur IgM-Röteln-Antikörper-Analytik unverzichtbar.

Die in der vorliegenden Studie angewandte Chromatographietechnik sowie das geprüfte Trennmedium sind hinsichtlich Trennqualität und Trenngeschwindigkeit anderen Trennverfahren deutlich überlegen und zur Trennung von IgM/IgG-Antikörpern für serologische Fragestellungen, insbesondere zur Klärung der Röteln-Immunitätslage gut geeignet. Die verlustfreie, quantitative Isolierung der IgM-Antikörper von den IgG-Antikörpern gewährleistet die bestmögliche Nutzung der Empfindlichkeit einer der Antikörper-Präparation folgenden spezifischen Antikörper-Analytik.

Die sterische Ausschlußchromatographie mit Hilfe der HPLC ist eine gleichwertige Alternative zur Dichtegradienten-Ultrazentrifugation.

Anschrift des Verfassers:

Dr. med. et rer. nat. W. Gräßmann  
DRK-Blutspendedienst  
2073 Lütjensee



Schrifttum:

1. BURKHARDT, F., SCHILT, U., SANER, H.: Virologische Diagnostik der Rötelninfektion. *Schweiz. med. Wschr.* **110**, 555-562 (1980).
2. DONNERHACK, N.: Richtlinien zur ärztlichen Betreuung während der Schwangerschaft. *Deutsches Ärzteblatt* **1981**, 309 (1981).
3. MÜHLENBERG, W., MÜLLER-PRASUHN, C., HÖPKEN, W.: Möglichkeiten und Grenzen des IgM-FTA-ABS-Tests in der Routine-Serodiagnostik der Lues. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. A* **249**, 104-123 (1981).
4. SCHMIDT, B. L.: Der Einsatz der Hochdruckflüssigkeitschromatographie in der Syphilis-Serologie. *Wien. med. Wschr.* **132**, 547-550 (1982).
5. LINDENSCHMIDT, E. G., LENNARTZ, H., LAUFS, R.: Vergleichende Studie über den Nachweis von Röteln-spezifischen IgM-Antikörpern mit unterschiedlichen Methoden. *Lab. Med.* **6**, 54-58 (1982).
6. WOLFF, M. H., SENGFELDER, H., BUCK, Th., SCHNEEWEIS, K. E.: Nachweis von Röteln-spezifischen IgM-Antikörpern nach Trennung der Immunglobuline durch Ionenaustauschchromatographie. *Ärztl. Lab.* **29**, 40-44 (1983).
7. SJÖDAHL, J.: High resolution liquid Chromatography of Proteins. *Science Tools* **27**, 54-56 (1980).
8. FERNANDEZ, J. L., GERTOLINI, M. J.: A Comparison of the Analytic Ultracentrifuge and HPLC for the Determination of Molecular Weight Distributions of Plasma Protein-Fraction (Human). *Vox Sang* **44**, 225-230 (1983).
9. SANN, G., SCHNEIDER, G., LOEKE, S., DOERR, H. W.: Rapid Fractionation of Serum Immunglobulines by High Pressure liquid Gel Permeation Chromatography. Applications to Routine serologic Procedures. *J. Immunol. Meth.* **59**, 121-127 (1983).
10. GRÄSSMANN, W., SONNTAG, M.: Trennung von 19s/7s-Immunglobulinen mit Hilfe der HPLC. *Lab. Med.* **8**, 49-51 (1983).
11. SPIESS, H., DEINHARDT, F.: Pränatale und Postnatale Virusinfektionen. *Deutsches Ärzteblatt* **1981**, 2347-2352 (1981).
12. EGGERS, H. J.: Die Sache mit den Kits - Dargestellt am Beispiel der Röteldiagnostik. *Deutsches Ärzteblatt* **1982**, 44 (1982).
13. LEIDEL, J., MERTENS, Th., EGGERS, H. J.: Auftreten und Persistenz Röteln-spezifischer IgM-Antikörper. *Dtsch. med. Wschr.* **102**, 1418-1421 (1977).
14. DIBBERT, H. J.: Antikörper der Immunglobuline 19s und 7s bei der Röteln-Diagnostik. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A* **234**, 145-158 (1976).