

# Über die Grenzen des Aussagewertes reverser und indirekter Testsysteme zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen Toxoplasma gondii

W. Mühlenberg

Staatliches Medizinaluntersuchungsamt Hannover (Leiter: Prof. Dr. J. Sander)

## Zusammenfassung:

*Der Aussagewert und die Praktikabilität von vier Testsystemen zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen Toxoplasma gondii – reverser und indirekter ELISA, ISAGA und IgM-IIFT – werden aufgrund eigener Untersuchungen und einer Auswertung der Literatur beurteilt. Der reverse ELISA erreicht zwar bei Verwendung von F(ab')<sub>2</sub>-Konjugaten bzw. von konjugierten Antigenen eine sehr hohe Spezifität, wird aber in seiner Sensitivität durch das Verhältnis vom spezifischen IgM zum Gesamt-IgM beeinflußt und kann bei niedriger Konzentration von Toxo-IgM-Antikörpern und hohem Gesamt-IgM-Gehalt falsch-negativ sein, z. B. bei AIDS-Patienten mit polyklonaler Aktivierung der B-Zellen. Der ISAGA ist empfindlicher, zeigt allerdings im Bereich niedriger Konzentrationen von Toxo-IgM-Antikörpern eine schlechte Quantifizierbarkeit, die sich in plötzlichen Titerstürzen ausdrückt. Der durch Vorbehandlung der Seren mit Anti-Human-IgG modifizierte IgM-IIFT zeichnet sich durch hohe Sensitivität und Spezifität aus, ist jedoch wegen seines hohen Arbeitsaufwandes und der Subjektivität bei der Auswertung für Routine-laboratorien wenig geeignet. Vom Prinzip her könnte ein durch Anti-Human-IgG-Vorbehandlung modifizierter indirekter ELISA eine optimale Methode sein. Ein käuflicher Reagenzien-satz wies aber eine so hohe Hintergrundreaktivität auf, daß seine Spezifität und Sensitivität erheblich beeinträchtigt waren. Diese Störung war wahrscheinlich durch die Bindung von IgM-Autoantikörpern (AMA/ANA u. dgl.) an Antigene des Zellinneren von Toxoplasmen und/oder durch natürliche kreuzreagierende IgM-Antikörper gegen Epitope der Zellmembran bedingt. Deshalb wird empfohlen, für den indirekten ELISA gereinigte oder gentechnologisch hergestellte spezifische Toxoplasmaproteine zu verwenden.*

## Schlüsselwörter:

*Nachweis von Toxo-IgM-Antikörpern – Störungen des reversen und indirekten Toxo-IgM-ELISA*

## Summary:

*Predictive value and practicability of four techniques for detection of IgM antibodies to Toxoplasma gondii – reverse and indirect ELISA, ISAGA and IIFT – are evaluated, based on own investigations and on a survey of publications. The reverse IgM-ELISA attains very high specificity, using F(ab')<sub>2</sub>-conjugates or conjugated antigens. Its sensitivity however is influenced by the ratio of specific to total IgM, which is causing false-negative reactions in sera with low levels of Toxo-IgM-antibodies and high contents of total IgM as for instance in patients with AIDS and polyclonal activation of B-cells. ISAGA is more sensitive, but shows poor quantifiability in sera with low concentrations of Toxo-IgM-antibodies and sudden falls of titers. IgM-IIFT modified by pretreatment of sera with anti-human-IgG is an excellent test concerning sensitivity and specificity, but because of its poor practicability and the subjectivity of interpretation it is not recommendable for routine laboratories. The indirect Toxo-IgM-ELISA freed from interferences also by anti-human-IgG fundamentally might be the optimum method. A commercial kit however showed a high background reactivity, which strongly lowered its specificity and sensitivity. This interference probably was caused by binding of IgM-autoantibodies to internal antigens of Toxoplasma (AMA, ANA etc.) and/or by natural cross reacting IgM antibodies against epitopes of the cell membrane. Therefore it is advisable, to use specific Toxoplasma proteins, purified or produced by gentechnology, for the indirect ELISA.*

## Keywords:

*Detection of Toxo-IgM-antibodies – Interferences of reverse and indirect Toxo-IgM-ELISA*

## Einleitung

Wegen der großen Bedeutung des Nachweises erreger-spezifischer IgM-Antikörper für die frühe Diagnose akuter und konnataler Infektionen – insbesondere der Toxoplasmose und Syphilis – sollten IgM-Teste einen hohen Grad an Zuverlässigkeit aufweisen. Durch inzwischen bekannt gewordene Störungen ist aber früher der Aussage-wert der indirekten Testsysteme, d. h. der indirekten Im-

munfluoreszenz bzw. des indirekten ELISA, erheblich beeinträchtigt worden. Denn ihre Sensitivität wird durch Blockierung der Epitope des Testantigens durch IgG-Antikörper gemindert (18, 19) und ihre Spezifität durch IgM-Rheumafaktoren (11, 23) sowie durch Anti-Allo-typ-Antikörper, welche bei infizierten Neugeborenen und Kleinkindern vorkommen und gegen Gm-Determinanten des mütterlichen IgG gerichtet sind (29, 35). Zur Vermeidung der genannten Störungen werden heute Fraktionie-

rungsverfahren wie Ultrazentrifugation oder Säulenchromatographie eingesetzt, neuerdings auch die Präzipitation des IgG durch Anti-Human-IgG, wodurch IgG-Aggregate entstehen, an die sich die IgM-Rheumafaktoren mit großer Avidität binden (10, 20, 21, 47).

Eine Steigerung von Sensitivität und Spezifität des IgM-ELISA wurde auch durch die Einführung reverser Testsysteme (IgM-capture-Methoden mit Anti-Human-IgM an der Festphase) erreicht (7, 24). Aber auch bei diesem Verfahren ist eine Minderung der Sensitivität durch Blockierung des Anti-IgM durch unspezifisches IgM bei hohem Gesamt-IgM-Gehalt möglich (7, 11). Ferner können falsch-positive Ergebnisse bei hohem Gehalt der Seren an IgM-Rheumafaktoren vorkommen, welche vom Anti-IgM der Festphase gebunden werden und sich dann ihrerseits an das Fc-Fragment des Konjugates binden (25, 40). Während diese Störung durch Verwendung von  $F(ab')_2$ -Konjugaten (24, 39, 44) bzw. von konjugierten Antigenen (5, 8, 14, 40) vermeidbar ist, handelt es sich bei der Dämpfung der Sensitivität um eine systemimmanente, nicht korrigierbare Interferenz reverser Testsysteme.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, das Ausmaß der Sensitivitätseinbuße des reversen Toxo-IgM-ELISA bei Seren mit hohem Gehalt an Gesamt-IgM zu bestimmen. Ferner sollte geprüft werden, inwieweit die Vorbehandlung der Seren mit Anti-Human-IgG den Aussagewert des indirekten Toxo-IgM-IIFT zu verbessern vermag und ob ein kommerzieller, gleichfalls durch Anti-IgG-Vorbehandlung modifizierter indirekter Toxo-IgM-ELISA den anderen Testen überlegen ist.

## Material und Methoden

### *Seren*

5 Seren stammten von 4 Patienten mit frischer Toxoplasmose, 2 davon von einem kurze Zeit danach an Hirn-Toxoplasmose verstorbene HIV-Infizierten. 5 Seren waren zur Verlaufskontrolle eines dieser Patienten eingesandt worden. Ein weiteres Serum, das nur Toxo-IgG-Antikörper enthielt, stammte von einem Neugeborenen. Ein im Toxo-IgM- und -IgG-IIFT negatives Serum mit hohem Gehalt an Rheumafaktoren (RAHA-Titer 1:640) wurde nach Vermischung mit dem Neugeborenenserum zur Prüfung der Effektivität des Rheumafaktor-Absorbens benutzt. 5 Seren mit unterschiedlichem Gesamt-IgM-Gehalt, die in allen Toxo-Serotesten negativ waren, wurden zur Verdünnung eines Serums mit hohem Gehalt an Toxo-IgM-Antikörpern für den reversen Toxo-IgM-ELISA verwendet. 22 weitere, ebenfalls in allen Toxo-Serotesten negative Seren wurden im indirekten Toxo-IgM-ELISA untersucht, ebenso 23 Seren von Patienten mit frischer Syphilis, 10 Seren von Patienten mit heterophilen Antikörpern, die in der Serumkontrolle des TPHA-Testes positiv und im FTA-ABS-Test negativ waren, ferner 23 Seren von Schwangeren, die zur Vorsorge eingesandt worden waren. Als positives Kontrollserum für den IIFT und die KBR diente ein Referenzserum aus dem Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn. Alle Seren wurden bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### *Reverser Toxo-IgM-ELISA*

Der reverse Toxo-IgM-ELISA wurde nach den Angaben und mit den Reagenzien und Geräten der Firma Organon Teknika mit Mikrotiterstreifen durchgeführt, die mit Anti-

Human-IgM (vom Schaf) beschichtet waren. Die Berechnung der Titer und des Grenzwertes (Cut-off) erfolgte durch einen Computer (Microelsa Comp) aufgrund der Extinktionswerte der Patientenserien und der jeweils im Doppelansatz mitgeführten negativen, schwach-positiven und stark-positiven Kontrollen.

### *Indirekter Toxo-IgG-ELISA*

Der indirekte Toxo-IgG-ELISA wurde ebenfalls nach den Angaben und mit den Reagenzien und Geräten der Firma Organon Teknika durchgeführt, und zwar mit Toxoplasma-Antigen beschichteten Mikrotiterstreifen.

### *Indirekter Toxo-IgM-ELISA*

Der indirekte Toxo-IgM-ELISA wurde nach den Angaben und mit den Reagenzien der Firma Viramed nach Vorbehandlung der Seren mit Anti-Human-IgG durchgeführt, und zwar parallel mit Toxo-Antigen und in mit Kontroll-Antigen beschichteten Mikrotiterstreifen.

### *Immunosorbent Agglutination Assay (ISAGA)*

Der ISAGA wurde nach den Angaben und mit den Reagenzien der Firma api bioMerieux mit monoklonalem Anti-Human-IgM (von der Maus) beschichteten Mikrotiterstreifen durchgeführt.

### *Indirekter Immunfluoreszenztest*

Der Toxo-IIFT wurde mit Toxoplasma gondii-Trophoziten der Firma api bioMerieux durchgeführt. Als Konjugate wurden verwendet für den Toxo-IIFT FITC-markiertes Antihuman-Globulin von der Ziege (api bioMerieux), für den Toxo-IgM-IIFT FITC-markiertes Anti-Human-IgM von der Ziege (api bioMerieux) und für den Toxo-IgG-IIFT FITC-markiertes Anti-Human-IgG vom Kaninchen (DAKOPATTS). Für den IgM-IIFT wurden die Seren mit Anti-Human-IgG vom Schaf (Rheumafaktor-Absorbens; Behring) vorbehandelt: Je 100  $\mu\text{l}$  mit PBS 1:6 verdünntes Serum wurde mit der gleichen Menge Rheumafaktor-Absorbens gemischt und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Zentrifugation mit einer Eppendorf-Zentrifuge bei etwa 11 000 U/min wurde der Überstand in PBS weiterverdünnt.

### *Direkte Agglutination (DA)*

Die direkte Toxoplasma-Agglutination wurde nach den Angaben und mit den Reagenzien der Firma api bioMerieux nach Vorbehandlung der Seren mit 2-Mercaptoäthanol in Mikrotiterplatten mit konischen Böden durchgeführt.

### *Komplementbindungsreaktion*

Die Toxo-KBR wurde nach der DGHM-Richtlinie quantitativ mit Toxoplasma-Antigen vom Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn durchgeführt.

### *Untersuchung auf IgM- und IgG-Autoantikörper gegen Mitochondrien und Kernbestandteile (AMA und ANA)*

Die Untersuchung einiger Seren auf AMA und ANA wurde mit der indirekten Immunfluoreszenz nach den Angaben und mit den Reagenzien der Firma BIOSIGMA durchgeführt. Als Antigene dienten Rattennierenschnitte und hEP-Zellen. Das Anti-IgM-Konjugat stammte von der Firma api bioMerieux.

## Bestimmung des Immunglobulingehaltes der Seren

Der Gehalt der Seren an IgM, IgG und IgA wurde durch radiale Immundiffusion in HC-, Nor-, S- und LC-Partigen-Platten (Behring) bestimmt.

## Vorbehandlung der Seren mit Aerosil 200

Einigen Seren mit hohen unspezifischen Extinktionswerten im indirekten IgM-ELISA wurde zur Ausschaltung von Störungen durch Lipoproteine 30 mg Aerosil 200 (Degussa) pro ml zugesetzt (32, 36, 38). Nach vierstündigem Schütteln auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur wurden die Seren bei etwa 11 000 U/min zentrifugiert.

## Vorbehandlung der Seren mit Gewebepulver

Einige Seren wurden zur Absorption von Autoantikörpern mit Gewebepulvern vorbehandelt. Je 100 mg Leberpulver (Merck, Art.-Nr. 5347) bzw. Nierenpulver (Paul-Bunnell-Davidsohn-Antigene, api bioMerieux) wurden in 1,0 ml Verdünnungspuffer (Viramed), dem 50 µl 10%iges Rinderalbumin zugesetzt war, für eine Stunde bei 37°C vorinkubiert, um den Verlust spezifischer IgM-Antikörper durch Adsorption an die Pulver einzuschränken (41). Danach wurden die Seren jeweils 1:40 mit diesem Absorptionsmedium verdünnt und eine Stunde bei 37°C und über Nacht bei 4°C inkubiert.

## Ergebnisse

### Abhängigkeit der Sensitivität des reversen Toxo-IgM-ELISA vom Gesamt-IgM-Gehalt der Seren

Das Serum eines Patienten mit frischer Toxoplasmose und sehr hohem Titer an Toxo-IgM-Antikörpern (1:12800 im quantitativen Versuchsanansatz des reversen IgM-ELISA) wurde mit drei Seren ohne Toxo-Antikörper und unterschiedlichem Gesamt-IgM-Gehalt im Verhältnis 1:4 gemischt, so daß die drei Mischseren B, C und D zwar die gleiche Konzentration an Toxo-IgM-Antikörpern, aber unterschiedliche Konzentrationen an Gesamt-IgM (90, 230 bzw. 430 mg/dl) aufwiesen. Zum Vergleich wurde das positive Serum A auch mit PBS 1:4 verdünnt. Die Extinktionswerte und die vom Computer errechneten Titer dieser Seren differierten trotz gleichen Toxo-IgM-Antikörpergehaltes beträchtlich, d.h. sie sanken in klarer Abhängigkeit vom Gesamt-IgM-Gehalt (Abb. 1). Diese Störung verlor an Einfluß, wenn die Seren mit PBS weiterverdünnt wurden. Infolgedessen liefen die Titrationskurven fächerförmig aufeinander zu (Abb. 2), und die vom Computer errechneten Titer unterschieden sich — bei Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe — immer weniger von dem „wahren“ Titer von 1:3200, der durch Weiterverdünnung des mit PBS 1:4 vorverdünnten positiven Ursprungsserums A gemessen worden war (Tab. 1). Durch Weiterverdünnung der drei Mischseren B, C und D mit drei Seren ohne Toxo-Antikörper und mit jeweils gleichem Gesamt-IgM-Gehalt wurden die Veränderungen der Extinktionen simuliert, wie sie sich nach einer Infektion ergeben würden, wenn die Konzentration der Toxo-IgM-Antikörper — bei etwa gleichbleibendem Gesamt-IgM — jeweils um die Hälfte abnehmen würde (Abb. 3). Schon nach der ersten Halbierung des Toxo-IgM-Antikörpergehaltes sanken die Extinktionswerte der Seren mit hohem Gesamt-IgM — C und D — unter die Cut-off-Linie, obwohl in diesen Verdünnungen noch recht hohe Konzentrationen an spezifischen IgM-Anti-

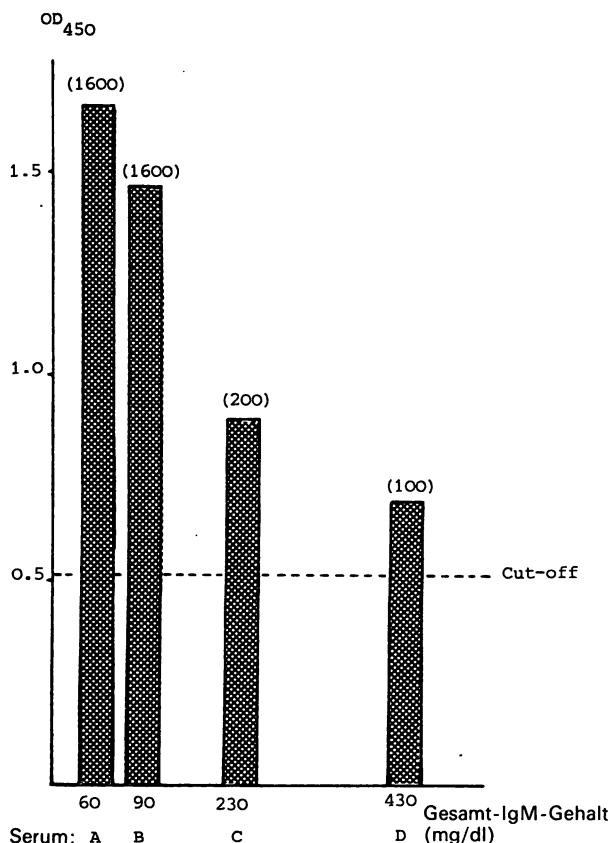


Abb. 1: Extinktionswerte des reversen Toxo-IgM-ELISA von vier Seren mit gleichem Gehalt an Toxo-IgM-Antikörpern, aber unterschiedlichem Gehalt an Gesamt-IgM (in Klammern: vom Computer errechnete reziproke Titer)

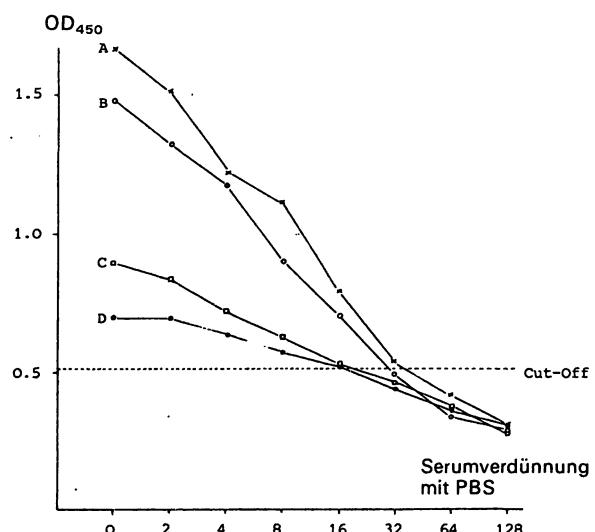


Abb. 2: Extinktionswerte des reversen Toxo-IgM-ELISA von den vier mit PBS weiterverdünnten Seren A, B, C und D (s. Abb. 1) mit gleichem Gehalt an Toxo-IgM-Antikörpern, aber unterschiedlichem Gehalt an Gesamt-IgM (A = 60, B = 90, C = 230, D = 430 mg/dl)

körpern vorhanden waren, wie die Werte der zum Vergleich mitgeführten PBS-Verdünnungsreihe des Ursprungsserums A zeigen. Der mit denselben Verdünnungsstufen durchgeführte ISAGA hatte zwar zunächst noch hohe Titer, machte aber im Verlaufe eines einzigen Verdünnungsschrittes einen Titersturz von 1:1600 auf unter 1:100 – also in die Negativität – durch (Abb.4). Hingegen zeigte der durch Anti-Human-IgG-Vorbehandlung des Serums modifizierte Toxo-IgM-IIFT – in Abb.4 invers eingetragen – einen den Verdünnungsstufen entsprechenden gleichmäßigen Titerabfall. Auch bei den Verlaufskontrollen eines Patienten mit Lymphadenitis toxoplasmotica und mit einem über ein Jahr lang erhöhten Gesamt-IgM-Gehalt von etwa 200 mg/dl wurde der

reverse IgM-ELISA als erster negativ (Abb.5). Der ISAGA und der IgM-IIFT hatten zu diesem Zeitpunkt – etwa 3½ Monate nach der Erstuntersuchung – noch Titer von 1:3200 bzw. von 1:48.

Ein kurze Zeit nach der letzten Untersuchung an Hirn-Toxoplasmose verstorberer HIV-infizierter 31jähriger Patient, der im April 1987 noch in allen Toxo-Serotesten negativ gewesen war, hatte am 6. 10. 1987 erhöhte Titer in der KBR, im IIFT und in der direkten Agglutination, war aber im reversen IgM-ELISA negativ (Tab.2). Der ISAGA zeigte hingegen Toxo-IgM-Antikörper mit einem Titer von 1:1600 an. Der Gesamt-IgM-Gehalt war zu diesem Zeitpunkt stark erhöht, er betrug 618 mg/dl. Kurz vor dem Tode sank das Gesamt-IgM auf 370 mg/dl, und der reverse IgM-ELISA wurde mit einem Titer von 1:100 schwach-positiv.

#### *Optimierung des indirekten Toxo-IgM-IIFT durch Vorbehandlung der Seren mit Anti-Human-IgG*

Zur Prüfung der Effektivität der IgG-Entfernung durch Anti-Human-IgG wurde das Serum eines Patienten mit

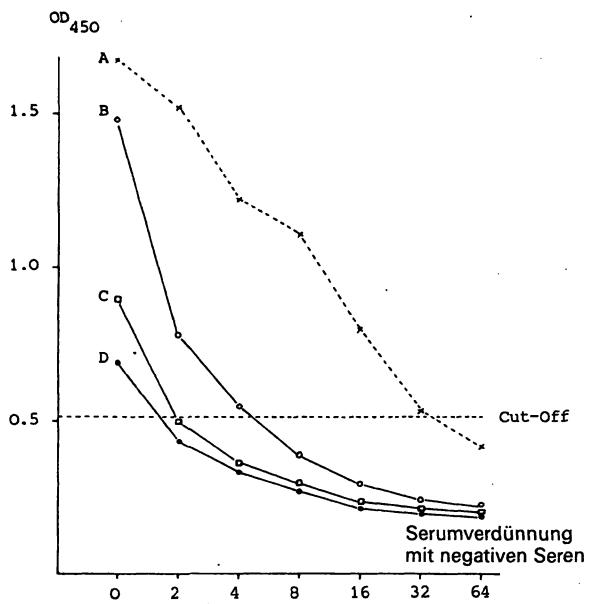
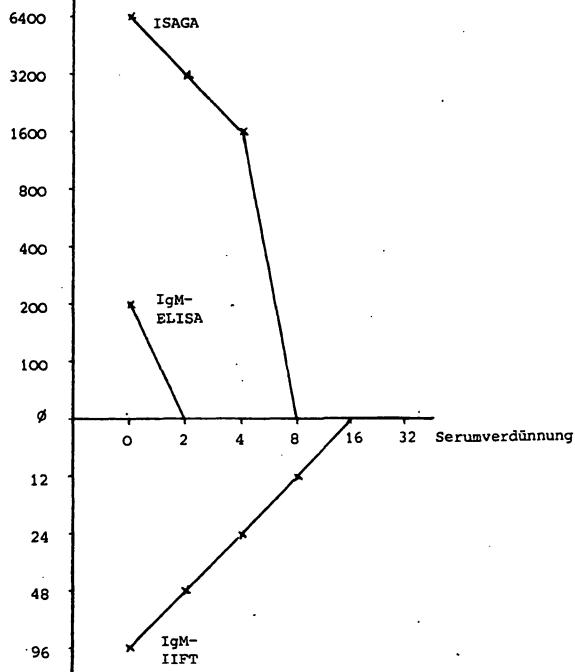


Abb. 3: Extinktionswerte des reversen Toxo-IgM-ELISA der mit negativen Seren gleichen Gesamt-IgM-Gehaltes weiterverdünnten Seren B, C und D sowie des zum Vergleich mit PBS weiterverdünnten Serums A

Tab. 1: Verhältnis der für die einzelnen Verdünnungsstufen des Mischserums C errechneten Titer des reversen Toxo-IgM-ELISA zum durch Weiterverdünnung des Ursprungsserums A gemessenen Titer von 1:3200

Verdünnungsstufe des Serums C	errechneter reziproker Titer	Verhältnis des errechneten zum gemessenen Titer
0	200	1:16
2	200	1:8
4	100	1:8
8	100	1:4
16	100	1:2

rezipr. Titer des ISAGA und errechneter rezipr. Titer des reversen Toxo-IgM-ELISA



rezipr. Titer des Toxo-IgM-IIFT

Abb. 4: Ergebnisse des ISAGA, des reversen Toxo-IgM-ELISA sowie des Toxo-IgM-IIF-Testes mit Serum C, das mit einem negativen Serum gleichen Gesamt-IgM-Gehaltes verdünnt wurde

Tab. 2: Ergebnisse (reziproker Titer) verschiedener Toxo-Seroteste – der KBR, des indirekten Immunfluoreszenztests (IIFT), der direkten Agglutination (DA), des Immunosorbent Agglutination Assay (ISAGA) und des reversen und indirekten IgM-ELISA – sowie Gesamt-IgM-, Gesamt-IgG- und Gesamt-IgA-Gehalt (mg/dl) im Serum bei einem an Hirn-Toxoplasmose erkrankten HIV-infizierten Patienten

Eingangs-datum	KBR	IIFT	DA	ISAGA	reverser IgM-ELISA	indirekter IgM-ELISA	Gesamt-IgM	Gesamt-IgG	Gesamt-IgA
23. 04. 87	0	0	0	0	0	0	425	2260	529
6. 10. 87	40	4096	5120	1600	0	0	618	2650	445
22. 10. 87	40	4096	5120	1600	100	0	370	2340	406

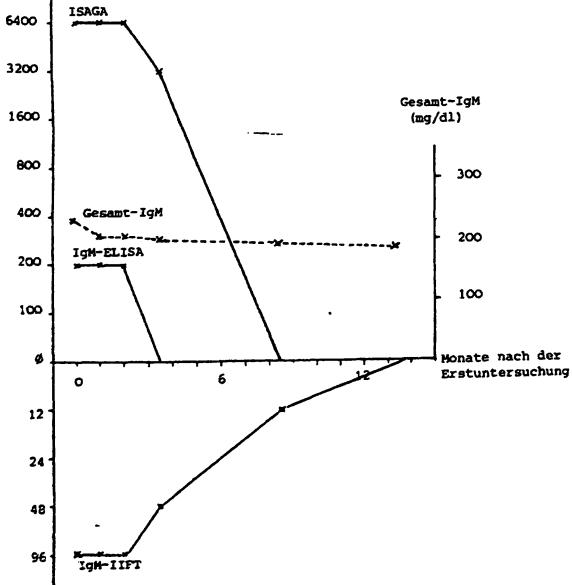
Lymphadenitis toxoplasmatica verwendet. Beim unbehandelten Serum blockierten die in hoher Konzentration vorhandenen Toxo-IgG-Antikörper die Bindung der Toxo-IgM-Antikörper, sodaß der Toxo-IgM-IIFT in der ersten Verdünnungsstufe nur ein grenzwertiges Ergebnis brachte (Abb.6). Nach der Behandlung des Serums mit Anti-Human-IgG (Rheumafaktor-Absorbens) zeigte der IgG-IIFT nur noch in der ersten Verdünnungsstufe eine grenzwertige Fluoreszenz, während der IgM-IIFT nun einen Titer von 1:192 hatte.

Zur Prüfung der Effektivität der Entfernung von IgM-Rheumafaktoren wurde das Serum eines Neugeborenen, das nur Toxo-IgG-, aber keine Toxo-IgM-Antikörper enthielt, mit einem in allen Toxoserotesten negativen Serum mit hohem Titer an IgM-Rheumafaktoren zu gleichen Teilen gemischt. Der IgG-IIFT-Titer des Mischserums betrug 1:768. Vor der Behandlung mit Anti-Human-IgG war es im Toxo-IgM-IIFT falsch-positiv mit einem Titer von 1:96, danach sowohl im Toxo-IgM- als auch im Toxo-IgG-IIFT negativ.

#### Indirekter Toxo-IgM-ELISA

Alle Untersuchungen wurden nach Vorbehandlung der Seren mit Anti-Human-IgG durchgeführt. Auffallend war, daß Seren, die in den anderen Toxo-Serotesten negativ waren, in der Regel recht hohe Extinktionen hatten, die bis 0,8 reichten. Die nach Vorschrift des Herstellers errechneten Cut-off-Werte lagen so hoch, daß geringere Konzentrationen von Toxo-IgM-Antikörpern mit diesem Testsystem noch schlechter zu erkennen waren als mit dem reversen IgM-ELISA, wie u.a. die falsch-negativen Ergebnisse bei dem HIV-Patienten zeigen (Tab.2). Eine Vorbehandlung der Seren mit Aerosil 200 zur Vermeidung unspezifischer Bindungen von Immunglobulinen an die Festphase durch Lipoproteine (34) brachte keine nen-

rezipr. Titer des ISAGA und errechneter rezipr. Titer des reversen Toxo-IgM-ELISA



rezipr. Titer des Toxo-IgM-IIFT

Abb. 5: Ergebnisse des ISAGA, des reversen Toxo-IgM-ELISA und des Toxo-IgM-IIF-Testes sowie Gesamt-IgM-Gehalt von Seren eines an Lymphadenitis toxoplasmatica erkrankten Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Erstuntersuchung

nenswerte Abnahme dieser unspezifischen Extinktionen. Die Werte der parallel mit Kontroll-Antigen durchgeföhrten Teste lagen dagegen generell sehr niedrig – in der Regel unter 0,1, meistens unter 0,05.

Seren von 23 Syphilitikern wiesen einen höheren Mittelwert der Extinktionen auf als 23 im gleichen Ansatz untersuchte Seren von Schwangeren etwa gleichen Alters, die als Kontrollgruppe dienten, wenn auch der Unterschied nicht signifikant war. 4 der 23 im IgM-IIFT und ISAGA negativen Syphilitikerseren waren im indirekten Toxo-IgM-ELISA positiv, aber nur eines von 23 Schwangerenserien. Allerdings war auch dieser Unterschied im Chi-Quadrat-Test mit Yates-Korrektur nicht signifikant. Interessanterweise ergab sich aber eine Signifikanz für die Unterschiede der Extinktionen ( $P < 0,02$ ) und der Positiven-Quoten ( $P < 0,01$ ) im indirekten Toxo-IgG-ELISA.

Von 6 bisher mit der indirekten Immunfluoreszenz auf IgM- und IgG-Autoantikörper untersuchten Seren mit unspezifisch erhöhten Extinktionen zeigten 5 – darunter 2 Syphilitikerseren – mit Anti-IgM- und Anti-IgG-Konjugaten in Rattenriemenschnitten und in hEp-Zellen eine deutliche cytoplasmatische feinkörnige Fluoreszenz, wie sie für antimitochondriale Antikörper typisch ist.

5 der 10 Seren von Patienten mit heterophilen Antikörpern, die in einem weiteren Ansatz zusammen mit den 23 Schwangerenserien im indirekten IgM-ELISA untersucht wurden, waren positiv (Tab.3). Die Positiven-Quoten der Kollektive unterschieden sich damit signifikant, die Mittelwerte der Extinktionen sogar hoch signifikant ( $P < 0,001$ ). Im indirekten IgG-ELISA waren hingegen keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

rezipr. Titer des Toxo-IgM- bzw. IgG-IIFT

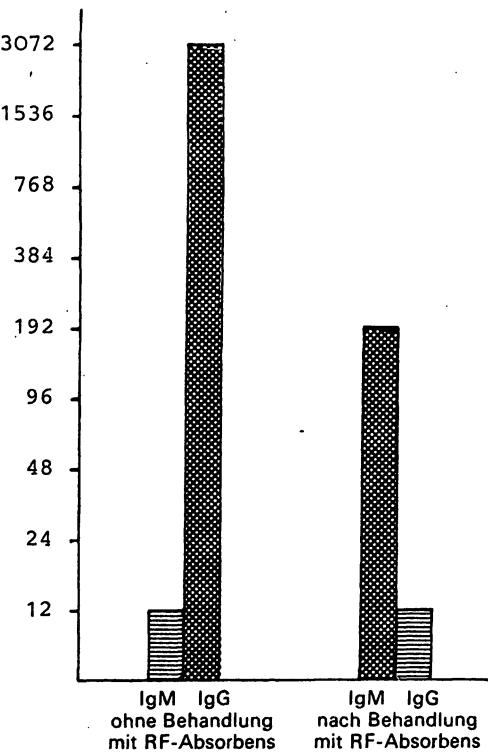


Abb. 6: Beseitigung der kompetitiven Hemmung der Toxo-IgM-Antikörper durch Behandlung eines Serums mit Rheumafaktor-Absorbens (█ positives Ergebnis, L] = grenzwertiges Ergebnis des Toxo-IgM- bzw. -IgG-IIFT-Testes)

Die Vorabsorption der Seren mit Gewebepulver brachte zwar die unspezifischen Extinktionen des indirekten Toxo-IgM-ELISA zum Verschwinden, senkte aber auch die Extinktionswerte von Seren mit Toxo-IgM-Antikörpern beträchtlich.

## Diskussion

Der reverse Toxo-IgM-ELISA erreicht, sofern die Vorschriften zur Vermeidung technisch falsch-positiver Reaktionen strikt eingehalten werden und  $F(ab')_2$ -Konjugate oder konjugierte Antigene verwendet werden, einen sehr hohen Grad an Spezifität und Reproduzierbarkeit (5, 8, 25, 44). Auch seine gute Praktikabilität stellt einen Fortschritt gegenüber dem IgM-IIFT dar (43). Was aber seine Sensitivität angeht, so zeigten sich durch die vorliegenden Untersuchungen die bereits von Heinz et al. (7) und Kurstak et al. (11) erwähnten Grenzen dieses Verfahrens: Infolge konkurrierender Bindung des unspezifischen IgM an das Anti-IgM der Festphase sind die Extinktionswerte der einzelnen Seren vom jeweiligen molaaren Verhältnis des spezifischen IgM zum Gesamt-IgM abhängig. Das führt dazu, daß niedrige bis mittlere Toxo-IgM-Antikörperkonzentrationen bei hohem Gesamt-IgM-Spiegel nicht erkannt werden (Abb. 3 u. 4). Auch wurde deutlich, daß beim reversen IgM-ELISA eine auf den Extinktionswerten basierende Quantifizierung mittels Eichkurven nicht möglich ist, da Konzentrationsänderungen der spezifischen IgM-Antikörper bzw. des Gesamt-IgM stark verzerrte Änderungen der Extinktionen zur Folge haben (Abb. 1 u. 3).

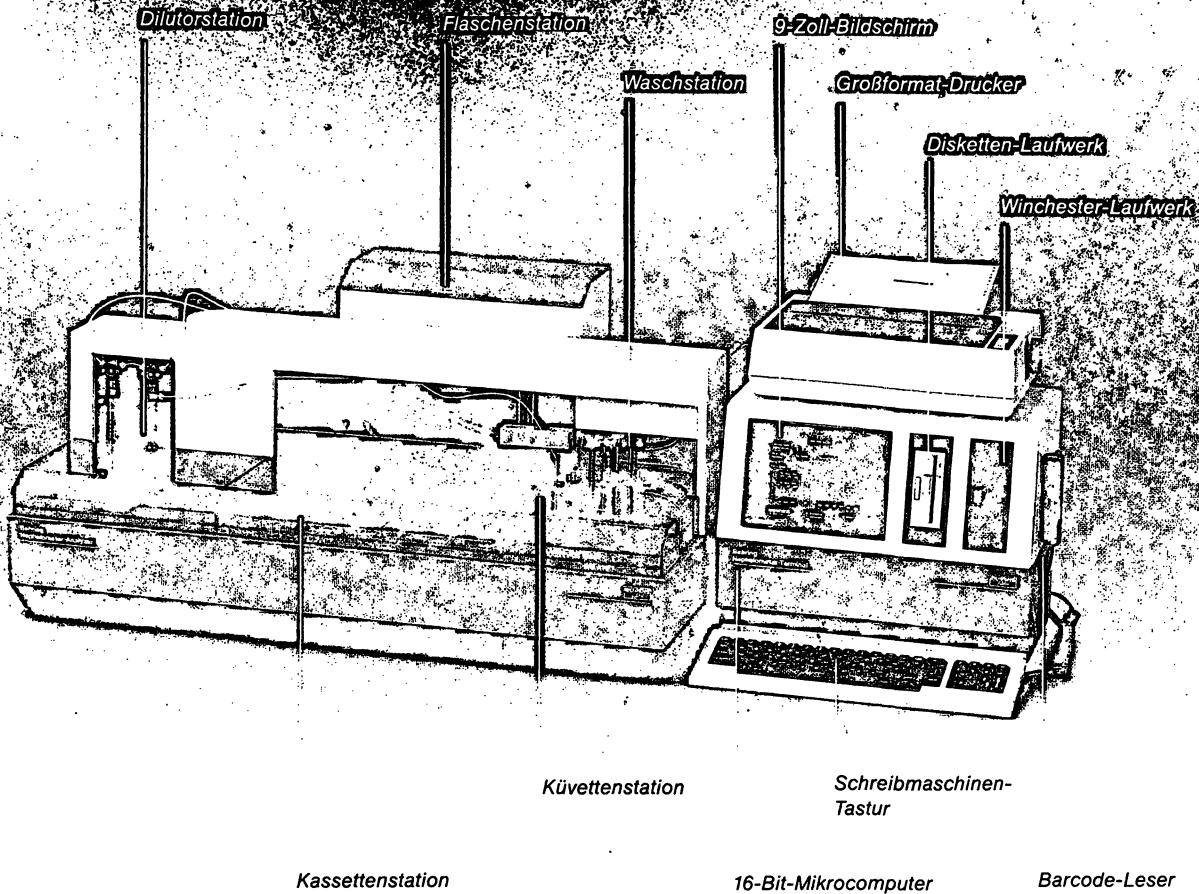
Die in den Versuchen gewählten hohen IgM-Konzentrationen der Mischseren C und D von 230 mg/dl bzw. 430 mg/dl lagen im Bereich der von uns bisher bei 16 Patienten mit frischer Toxoplasmose beobachteten Variationsbreite, die von 116 bis 618 mg/dl reichte — bei einem Medianwert von 247 mg/dl. Ob dieser hohe Medianwert allerdings repräsentativ ist, müßte erst noch durch Gesamt-IgM-Bestimmungen bei einem größeren Patientenkollektiv ermittelt werden. Dabei müßte auch durch

Paralleluntersuchungen mit den anderen Toxo-IgM-Tests geprüft werden, inwieweit die hier bei Mischseren festgestellte Sensitivitätsminderung durch hohe Gesamt-IgM-Konzentrationen für die Routinediagnostik relevant ist. In unserem Labor haben wir vorerst nur einzelne Fälle entdeckt, bei denen der genannte Störmechanismus sich ausgewirkt haben könnte. Zum Beispiel hatte das Serum eines Patienten mit frischer Toxoplasmose zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung im reversen ELISA einen ebenso niedrigen Titer von 1:200 wie das Mischserum C — bei gleichem Gesamt-IgM-Gehalt von 230 mg/dl und bei gleichen Titern im ISAGA von 1:6400 bzw. im IgM-IIFT von 1:96 (Abb. 4 u. 5). Bei den Verlaufskontrollen wurde der reverse ELISA bereits nach 3½ Monaten negativ, und zwar bei den gleichen Titern von ISAGA (1:3200) und IgM-IIFT (1:48), bei denen auch das Mischserum C negativ geworden war, d.h. etwa nach Halbierung der Ausgangskonzentration der Toxo-IgM-Antikörper. Das molekulare Verhältnis des spezifischen IgM zum Gesamt-IgM hatte bei dieser Konstellation offenbar jenen kritischen Wert unterschritten, von dem an die Extinktionswerte unter der Cut-off-Linie liegen. Die geringfügige gleichzeitige Abnahme des Gesamt-IgM-Gehaltes auf etwa 200 mg/dl konnte diese Störung nicht verhindern. Der IgM-Verdrängungsmechanismus könnte möglicherweise auch die niedrigen Titer des reversen ELISA von 1:100 und 1:200 bei der Erstuntersuchung in einigen weiteren Fällen von Lymphadenitis toxoplasmotica mit verursacht haben, zum Teil auch die von uns in Übereinstimmung mit van Loon et al. (40) beobachtete große Variationsbreite der Verschwindezeit der im reversen ELISA nachweisbaren IgM-Antikörper. Sie reichte von 2½ Monaten bis über 15 Monate. Für diese retrospektiv entdeckten Fälle fehlen aber Paralleluntersuchungen mit den anderen IgM-Tests sowie Bestimmungen des Gesamt-IgM. Gelegentlich wurde der vorher negative reverse ELISA während einer Kontrolluntersuchung positiv. Einen dieser Fälle haben wir näher untersucht. Es handelte sich um einen AIDS-Patienten mit frischer Toxoplasmose (Tab. 2). Bei ihm hatte der reverse ELISA zu einem Zeitpunkt versagt, als der Gesamt-IgM-Gehalt einen sehr hohen Wert von 618 mg/dl hatte. Erst nach Absinken des IgM-Spiegels kurz vor dem Tode auf 370 mg/dl reichte

Tab. 3: Ergebnisse verschiedener Toxo-Seroteste bei 10 Patienten mit heterophilen Antikörpern und bei 23 Schwangeren

	Patienten mit heterophilen Antikörpern (n = 10)	Schwangere (n = 23)	Ergebnisse der Signifikanzteste für Unterschiede der Kollektive (Student- bzw. Chi-Quadrat-Test)
<b>IgM-Teste</b>			
Indirekter IgM-ELISA:			
Mittelwerte der Extinktion positive Befunde	1,054	0,484	$t = 4,374 = \text{signifikant } (0,001 > P > 0,0001)$
positive Befunde	5	1	$\chi^2 = 6,94 = \text{signifikant } (0,01 > P > 0,001)$
IgM-IIFT: positive Befunde	0	0	
ISAGA: positive Befunde	0	0	
<b>IgG-Teste</b>			
Indirekter IgG-ELISA:			
Mittelwerte der Extinktion positive Befunde	0,374	0,309	nicht signifikant
positive Befunde	4	7	nicht signifikant
IIFT: positive Befunde	4	6	
Direkte Agglutination: positive Befunde	4	6	
<b>Alter der Kollektive in Jahren:</b>			
Altersspannen	23–39	18–32	
Mittelwerte	29	26	
Medianwerte	27	25	

# Das System, das die Antigen-Antikörpersprache beherrscht.



84 Jahre nachdem Emil von Behring den Nobelpreis für Medizin erhielt, präsentieren wir ein System, das die Antigen-Antikörpersprache so schnell und perfekt dechiffriert wie keins zuvor: den neuen Behring

Nephelometer-Analyser. Seine konzeptionelle Überlegenheit dokumentiert sich in der Praxis durch ein Höchstmaß an Analysendurchsatz, Flexibilität und Anwenderfreundlichkeit.

Haupt Einsatzgebiete sind die Protein- und die Rheumadiagnostik. Sowohl Präzipitations- als auch Agglutinations-

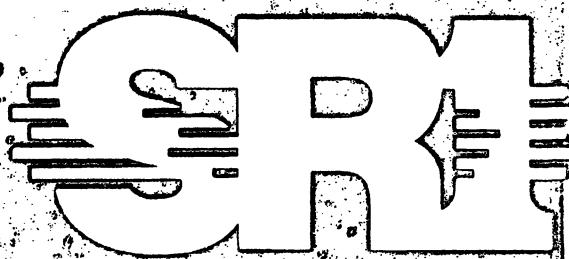
reaktionen können gemessen werden. Menü-Programmsteuerung, Küvettenrotor und die Fix-Time-Meßmethode ermöglichen ein enormes Arbeitstempo: bis zu 225 Teste pro Stunde.

Weitere technische Highlights, machen die Klasse dieses neuen Systems deutlich: Zwei Meßmethoden – Fixed-Time und Endpunkt. Mehrpunkt- und Einpunkt-Kalibrierung. Antigenüberschüßfreie Messung. Probenorientierte Arbeitsweise (bis zu 30 Teste selektiv aus einer Probe). Automatische

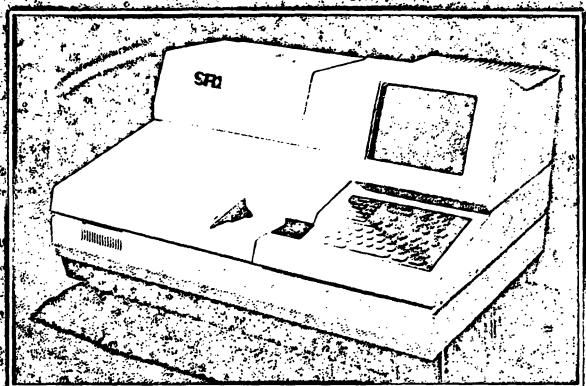
Wiederholungsmessung bei extrem abweichenden Ergebnissen. Bedienerführung im Dialogverfahren. Umfangreiches Reagenzien-Programm. Ausführliche Informationen schicken wir Ihnen gern zu.

Behringwerke AG  
Medizinische Information  
und Vertrieb  
6230 Frankfurt/Main 80

# Das Ergebnis unserer Erfahrung ist Fortschritt in Ihrer Hand



**Das vollautomatische  
Enzymimmunoassay (EIA) Testsystem  
für Serien- und Selektivanalyse!**



MEDICA '88  
10.-11.11.1988  
München, FRG

**Serono**  
DIAGNOSTICS

Erfahrung  
schafft  
Fortschritt

In Deutschland:  
Serono Diagnostika G.m.b.H.  
Merzhauser Str. Bei 134  
D-7800 Freiburg  
Tel. Zentrale (0761) 401

In Österreich:  
Serono Diagnostika G.m.b.H.  
Informationsbüro Wien  
Diesterweggasse 13  
A-1140 Wien  
Telefon (02 22) 82 03 73

© 1988 Serono Diagnostika G.m.b.H. All rights reserved.  
Printed on recycled material.

das etwas verbesserte molare Verhältnis des spezifischen IgM zum Gesamt-IgM offenbar gerade aus, um ein schwach-positives Ergebnis mit einem Titer von 1:100 zu ermöglichen. Der hier beschriebenen Störung könnte bei AIDS-Patienten eine besondere Bedeutung zukommen. Denn bei ihnen kann neben dem Gesamt-IgG- und -IgA-Gehalt auch der Gesamt-IgM-Gehalt infolge polyklonaler B-Zellaktivierung stark erhöht sein (12, 26, 33, 46), während die Produktion spezifischer Toxo-IgM-Antikörper in der Regel beeinträchtigt ist (2, 13, 15). Bei der Untersuchung von Neugeborenen dürfte es hingegen wegen des noch sehr niedrigen Gesamt-IgM von 11 bis 35 mg/dl (37) kaum zu einer Minderung der Sensitivität kommen.

Obwohl die Sensitivität des auch nach dem IgM-capture-Prinzip funktionierenden ISAGA (4, 30, 31) ebenfalls vom Verhältnis des spezifischen IgM zum Gesamt-IgM abhängig ist (42), erwies sich dieser Test als deutlich empfindlicher als der reverse IgM-ELISA. Er war sowohl in einem Verdünnungsversuch (Abb. 4) als auch bei Verlaufskontrollen (Abb. 5) und bei dem HIV-Patienten (Tab. 2) noch bei Toxo-IgM-Konzentrationen positiv, bei denen der reverse ELISA bereits negativ war. Seine Quantifizierbarkeit wurde allerdings im Bereich niedriger IgM-Antikörperkonzentrationen gleichfalls durch den IgM-Verdrängungsmechanismus gestört, was sich in einem plötzlichen steilen Titerabfall im Verlauf eines Verdünnungsschrittes auswirkt (Abb. 4), wie es auch in der Literatur beschrieben wird (30).

Die Vorbehandlung der Seren mit Anti-Human-IgG bringt für indirekte IgM-Nachweisverfahren einen erheblichen Zuwachs an Sensitivität und Spezifität (20, 21, 47). Eigene Versuche zeigten, daß durch diese Methode der gleichzeitigen Entfernung der konkurrierenden IgG-Antikörper und der IgM-Rheumafaktoren falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse des Toxo-IgM-IIFT recht zuverlässig ausgeschaltet werden können. Die Konzentration der Toxo-IgG-Antikörper wurde um mehr als das 250fache gesenkt, wodurch das molare Verhältnis von IgM zu IgG um etwa dieselbe Größenordnung zugunsten des IgM verändert wurde, wie es beim 19S-IgM-IIFT durch Ultrazentrifugation oder Chromatographie mit Ultrogel AcA34 möglich ist (17). Zur Vermeidung falsch-positiver Resultate durch Rheumafaktoren ist dieses Verfahren wahrscheinlich sogar besser geeignet als die Fraktionierungsmethoden, da die IgM-Rheumafaktoren nach der Literatur sowie nach eigenen Untersuchungen selbst bei sehr hohen Konzentrationen noch zuverlässig entfernt werden (21, 47), während sie nach Ultrazentrifugation oder Säulenchromatographie unverändert in der 19S-IgM-Fraktion bleiben und dort bei hohen Titern spezifischer IgG-Antikörper durchaus noch stören können (14, 17). Wegen des hohen Arbeitsaufwandes und wegen der Subjektivität der Ablesung ist der Toxo-IgM-IIFT aber trotz der genannten Vorteile für Routine-laboratorien wenig geeignet.

Einen Fortschritt könnte vielleicht ein durch Anti-Human-IgG-Vorbehandlung der Seren modifizierter indirekter Toxo-IgM-ELISA bringen, der in einem laboreigenen Testsystem einen hohen Grad an Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit erreichte (10, 21) und vom Prinzip her mittels Eichkurven quantifizierbar sein müßte. Aus Mangel an Laborkapazität konnte in unserem Institut vorerst nur ein kommerzieller Testkit auf seine Brauchbarkeit untersucht werden. Wegen der vom Hersteller vorgeschriebenen hohen Cut-off-Werte war seine Sensitivität noch geringer als die des reversen ELISA, was z.B. zu

falsch-negativen Ergebnissen bei dem Patienten mit Hirn-Toxoplasmose führte (Tab. 2). Wahrscheinlich waren die Cut-off-Werte deshalb so hoch festgelegt, weil viele in allen anderen Toxo-Serotesten negative Seren in diesem Kit recht hohe Extinktionen hatten. Es ist möglich, daß diese die Sensitivität und Spezifität erheblich störende Hintergrundreaktivität auf Autoantikörper zurückzuführen ist, welche sich an Antigene des Zellinnern der Toxoplasmen — Kernbestandteile (24) oder Mitochondrien — binden, die durch Ultraschallbehandlung freigelegt wurden. Für eine Beteiligung solcher Autoantikörper könnte sprechen, daß Syphilitikseren im indirekten IgM- und IgG-ELISA höhere Extinktionswerte und Positiven-Quoten aufwiesen als die im selben Ansatz mitgetesteten Seren eines Vergleichskollektivs von Schwangeren. Im IgG-ELISA waren sie in einem signifikant höheren Prozentsatz (fast 80%) positiv als im IIFT (21,7%) bzw. in der direkten Agglutination (26,1%) und als es in Deutschland für diese Altersgruppe zu erwarten ist, wo die Durchseuchungsrate etwa dem Lebensalter entspricht (27). Seren von Syphilitikern enthalten häufig IgM- und IgG-Autoantikörper, und es ist wahrscheinlich, daß ein wesentlicher Anteil der Lipoidantikörper gegen Strukturen von Mitochondrienmembranen (z. B. das Cardiolipin) wirtseigener Zellen gerichtet ist (1, 6, 16, 22, 45). Auch die deutliche feinkörnige Fluoreszenz mit Anti-IgM- und Anti-IgG-Konjugaten in Rattenierenschnitten und in hEp-Zellen bei 5 der 6 bisher untersuchten Seren mit unspezifisch erhöhten Extinktionen läßt eine Beteiligung von antimitochondrialen Antikörpern als möglich erscheinen. Ferner könnten auch sogenannte natürliche, mit Determinanten der Zellmembran von Toxoplasmen kreuzreagierende IgM-Antikörper zusätzlich eine Rolle spielen. Denn es ist schon länger bekannt, daß solche natürlichen IgM-Antikörper als „polare Faktoren“ den IIFT stören können, ebenso den direkten Agglutinations-test (3, 9). Sie sind gegen verschiedene Antigene der Zellmembran von Toxoplasmen gerichtet (28). Der hohe Mittelwert der Extinktionen bei 10 Patienten mit heterophilen Antikörpern (Tab. 3) und die hohe Positiven-Quote dieses Kollektivs von 50% lassen vermuten, daß sich auch Forssman-Antikörper an Epitope der Toxoplasma-Zellmembran binden können. Vielleicht sind sie sogar mit den natürlichen Antikörpern identisch.

Zur Optimierung des indirekten Toxo-IgM-ELISA, d.h. zur Erhöhung seiner Spezifität und — infolge der dadurch ermöglichten Senkung der Cut-off-Linie — auch der Sensitivität sind theoretisch zwei Wege möglich, und zwar die Vorbehandlung der Seren mit Gewebepulver (41) oder die Verwendung von gereinigten Antigenkomponenten von *Toxoplasma gondii*, wie sie bereits im reversen IgM-ELISA eingesetzt werden (14). Da die Voraussorption mit Gewebepulver nach eigener Erfahrung die Sensitivität durch unspezifische Adsorption von Toxo-IgM-Antikörpern erheblich beeinträchtigen kann, sollte der zweiten Methode der Vorzug gegeben werden. Voraussetzung ist allerdings, daß nur solche Antigen-Komponenten zur Beschichtung verwendet werden, an die sich keine natürlichen, kreuzreagierenden Antikörper binden (28). Ideal wäre es, wenn solche definierten spezifischen Proteine gentechnologisch produziert werden könnten, wie z.B. die rekombinannten Antigene, die bereits im indirekten HIV-ELISA zur Anwendung kommen.

#### Schrifttum:

1. ANONYMUS: Auto-Antikörper. BIOSIGMA info WBA (INAI) 10.83/rai/1/1.
2. BINIEK, R., BROCKMEYER, N., BALZER, K., GESEMANN, M., SCHEIERMANN, N., GERHARD, L., LEHMANN, H. J.: Neurologische Erkrankungen bei HIV-Infektion. Dt. Ärztebl. 84, 1895—1900 (1987).

3. DESMONTS, G., BAUFINE-DUCROCQ, H., COUZINEAU, P., PELOUX, Y.: Anti-corps toxoplasmiques naturels. *Nouv. Presse Med.* 3, 1547–1549 (1974).
4. DESMONTS, G., NAOT, Y., REMINGTON, J. S.: Immunoglobulin M-immunoabsorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: Diagnosis of acute congenital and acquired Toxoplasma infections. *J. Clin. Microbiol.* 14, 486–491 (1981).
5. FRANCO, E. L., WALLS, K. W., SULZER, A. J.: Reverse enzyme immunoassay for detection of specific anti-Toxoplasma immunoglobulin M antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 13, 859–864 (1981).
6. GUARNIERI, M., STECHMILLER, B., LEHNINGER, A. L.: Use of an antibody to study the location of cardiolipin in mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 246, 7526–7533 (1971).
7. HEINZ, F. X., ROGGENDORF, M., HOFMANN, H., KUNZ, C., DEINHARDT, F.: Comparison of two different enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin M antibodies against tick-borne encephalitis virus in serum and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 14, 141–146 (1981).
8. HERBRINK, P., VAN LOON, A. M., ROTMANS, J. P., VAN KNAPEN, F., VAN DIJK, W. C.: Interlaboratory evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay, antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of immunoglobulin M antibodies to Toxoplasma gondii. *J. Clin. Microbiol.* 25, 100–105 (1987).
9. HOBBES, K. M., SOLE, E., BETTELHEIM, K. A.: Investigation into the immunoglobulin class responsible for the polar staining of Toxoplasma gondii in the fluorescent antibody test. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* A 239, 409–413 (1977).
10. KILIAN, M.: Vergleichende Untersuchungen über den diagnostischen Wert der ELISA-Technik zum Nachweis spezifischer IgG- und IgM-Antikörper bei der Toxoplasmosis des Menschen. Dissertation, Hamburg (1986).
11. KURSTAK, E., TIJSSEN, P., KURSTAK, C., MORISSET, R.: Enzyme immunoassays and related procedures in diagnostic medical virology. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 64, 465–479 (1986).
12. LANE, H. C., MASUR, H., EDGAR, L. C., WHALEN, G., ROOK, A. H., FAUCI, A. S.: Abnormalities of B-cell-activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 309, 453–458 (1983).
13. LEVY, R. M., BREDESEN, D. E., ROSENBLUM, M. L.: Neurological manifestations of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J. Neurosurg.* 62, 475–495 (1985).
14. LINDENSCHMIDT, E. G.: Demonstration of immunoglobulin M class antibodies to Toxoplasma gondii antigenic component p35000 by enzyme-linked antigen immunoabsorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 24, 1045–1049 (1986).
15. LUFT, B. J., BROOKS, R. G., CONLEY, F. K., McCABE, R. E., REMINGTON, J. S.: Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 252, 913–917 (1984).
16. MUHLENBERG, W., HÖPKEN, W.: Untersuchungen zur Bewertung der Empfindlichkeit und Spezifität der Lues-Seroreaktionen mit Lipoid- und Treponema-Antigenen. *Off. Gesundh.-Wesen* 37, 622–641 (1975).
17. MUHLENBERG, W., MÜLLER-PRASUHN, G., HÖPKEN, W.: Möglichkeiten und Grenzen des IgM-FTA-Tests in der Routine-Serodiagnostik der Lues. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* A 249, 104–123 (1981).
18. MÜLLER, F., LOA, P. L.: Neue Möglichkeiten in der immunologischen Diagnostik der Treponemen-Infektion (Syphilis). *Infektion* 2, 127–131 (1974).
19. MÜLLER, F.: Syphilis-Serodiagnostik aus der Sicht des Immunologen. *Hautarzt* 28, 167–172 (1977).
20. MÜLLER, F., MOSKOPHIDIS, M., BORKHARDT, H. L.: Detection of immunoglobulin M antibodies to Treponema pallidum in a modified enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6, 35–39 (1987).
21. MÜLLER, F., KILIAN, M.: Vergleichende Untersuchungen über den diagnostischen Wert des indirekten und reversen ELISA zum Nachweis spezifischer IgM-Antikörper bei der Toxoplasmosis des Menschen. *Immun. Infect.* 15, 66–71 (1987).
22. MUSTAKALLIO, K. K., LASSUS, A., WAGNER, O.: Auto-immune phenomena in syphilitic infection. *Int. Arch. Allergy* 31, 417–426 (1967).
23. NAOT, Y., REMINGTON, J. S.: An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to Toxoplasma gondii: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 142, 757–766 (1980).
24. NAOT, Y., BARRETT, E. V., REMINGTON, J. S.: Method for avoiding false-positive results occurring in immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays due to presence of both rheumatoid factor and antinuclear antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 14, 73–78 (1981).
25. NAOT, Y., DESMONTS, G., REMINGTON, J. S.: IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital Toxoplasma infection. *J. Pediatr.* 98, 32–36 (1981).
26. PAHWA, S. G., QUILOP, M. T. J., LANGE, M., PAHWA, R. N., GRIECO, M. H.: Defective B-lymphocyte function in homosexual men in relation to the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* 101, 757–763 (1984).
27. PIEKARSKI, G.: Die Toxoplasmosis. *Med. Welt* 28, 1582–1586 (1977).
28. POTASMAN, I., ARAUJO, F. G., REMINGTON, J. S.: Toxoplasma antigens recognized by naturally occurring human antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 24, 1050–1054 (1986).
29. REIMER, C. B., BLACK, C. M., PHILLIPS, D. J., LOGAN, L. C., HUNTER, E. F., PENDER, B. J., MCGRUE, B. E.: The specificity of fetal IgM: antibody or anti-antibody? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 354, 77–93 (1978).
30. SAATHOFF, M.: Serologische Grundbegriffe der Toxoplasmosis. *mta praxis* 31, 721–732 (1985).
31. SAATHOFF, M., SEITZ, H. M.: Untersuchungen zum Nachweis von Toxoplasma-spezifischen IgM-Antikörpern – Vergleich von ISAGA- und Immunfluoreszenzergebnissen. *Z. Geburtsh. u. Perinat.* 189, 73–78 (1985).
32. SCHMIDT, B.: The 19S IgM-FTA-ABS test in the serum diagnosis of syphilis. *WHO/VD/RES/79/362*.
33. SCHNITTNER, S. M., LANE, H. C., HIGGINS, S. E., FOLKS, T., FAUCI, A. S.: Direct polyclonal activation of human B-lymphocytes by the acquired immune deficiency syndrome virus. *Science* 233, 1084–1086 (1986).
34. SHILLITOE, E. J.: Decline in specificity of ELISA due to storage of serum, and its recovery by adsorption with kaolin. *J. Virol. Methods* 4, 241–248 (1982).
35. SPEISER, P.: New aspects of immunogenic relations between child and mother. *Ann. Paediat.* 207, 20–35 (1966).
36. STEPHAN, W., ROKA, L.: Adsorption von Lipoproteinen. *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.* 6, 186–190 (1968).
37. THOMAS, L.: Proteindiagnostik. *Behring-Diagnostika* (1982).
38. TIJSSEN, P., KURSTAK, E.: Basic techniques in advanced immunochemistry towards the use of enzymatically active Fab fragments as tracers. *Aus: Viral Immuno-diagnosis v. E. Kurstak u. R. Morisset. Acad. Press, New York, London* (1974).
39. TOMASI, J. P., SCHLITZ, A. F., STAATSBAEDER, S.: Rapid double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human immunoglobulin M anti-Toxoplasma gondii antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 24, 849–850 (1986).
40. VAN LOON, A. M., VAN DER LOGT, J. Th., HEESSEN, F. W. A., VAN DER VEEN, J.: Enzyme-linked immunosorbent assay that uses labeled antigen for detection of immunoglobulin M and A antibodies in toxoplasmosis: comparison with indirect immunofluorescence and double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 17, 997–1004 (1983).
41. WAGNER, M.: Fluoreszierende Antikörper und ihre Anwendung in der Mikrobiologie. *G. Fischer Verlag, Jena* (1967).
42. WERK, R.: Serologie der Toxoplasmosis. *mta-journal* 5, 496–504 (1983).
43. WERNER, H., JANITSCHKE, K.: Aktuelle Probleme der Serodiagnostik der Toxoplasmosis unter besonderer Berücksichtigung der Schwangerenvorsorge. *Bundesgesundhbl.* 28, 240–243 (1985).
44. WIELAARD, F., VAN GRUIJTHUISEN, H., DUERMAYER, W., JOSS, A. W. L., SKINNER, L., WILLIAMS, H., VAN ELVEN, E. H.: Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 17, 981–987 (1983).
45. WUEPPER, K. D., BODILY, H. L., TUFFANELLI, D. L.: Serologic tests for syphilis and the false-positive reactor. *Arch. Derm.* 94, 152–155 (1966).
46. YARCHOAN, R., REDFIELD, R. R., BRODER, S.: Mechanisms of B cell activation in patients with acquired immunodeficiency syndrome and related disorders. *J. Clin. Invest.* 78, 439–447 (1986).
47. ZIEGELMAYER, R., BIEKER, R., BEHRENS, F., VERMEER, H.: Diagnostik akuter Infektionen: IgM-Antikörperbestimmung ohne Rheumafaktor-Interferenz. *Behring-Laboratoriumsblätter* 33, 19–25 (1983).

#### Anschrift des Verfassers:

Dr. med. W. Mühlberg  
Staatl. Medizinialuntersuchungsamt  
Roesebeckstraße 4  
3000 Hannover 91

# PRCGEN

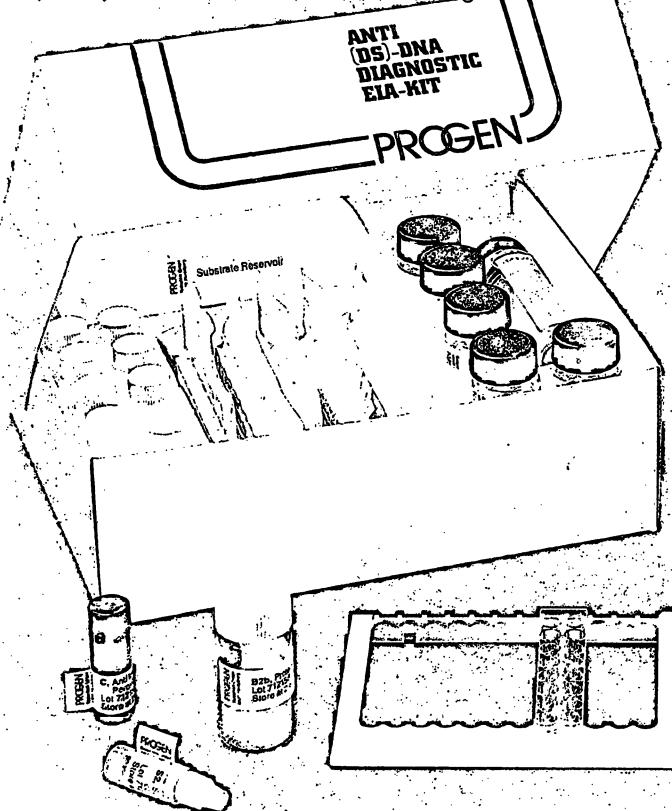
# Forschung für innovative Produkte

**Anti-ds-DNA Antikörper sicher bestimmen.**

Anti-ds-DNA Antikörper gehören zu den Laborparametern mit hohem Krankheitsaussagewert. Sie kommen fast ausschließlich beim Lupus erythematoses

disseminatus ( SLE) vor und gehören deshalb neben einem Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) zu den revidierten Kriterien für eine diagnostische Absicherung.

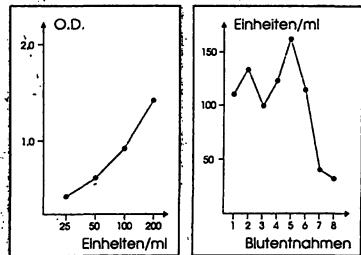
Da Anti-Doppelstrang DNS-Antikörper auch bei negativem ANA-Test vorkommen können, sollte der Test parallel zum ANA durchgeführt werden.



**PROGEN** ist ein Team von Wissenschaftlern aus der molekularen und zellbiologischen Forschung, die neue Reagenzien, Substanzen und Testverfahren für die Diagnostik und Therapie entwickeln. PROGEN setzt Methoden der Bakteriengenetik, Molekularbio-

logie, Mikrobiologie, Immunologie und Biochimie ein - mit Arbeitsschwerpunkten im humanmedizinischen Bereich.

Das Ergebnis ist ein ständig wachsendes Programm mit inzwischen mehr als 50 Produktentwicklungen.



Eichkurve mit den im Kit enthaltenen Komponenten

## Anti-ds-DNA-Antikörper: Verlauf des Titers bei einer SLE-Patientin

GEN

**PROGEN Biotechnik GmbH**  
Im Neuenheimer Feld 519  
Technologiepark  
D-6900 Heidelberg  
**Telefon:** 06221/4035-0  
**Telex:** 4 61124  
**Telefax:** 06221/403535

**Exklusivvertrieb für die Bundesrepublik:**

**LD Labor Diagnostika GmbH**  
Industriestraße 12 • D-4284 Heiden /Westf.  
Telefon 02867/ 80 83 + 84 77  
Telefax 8477, Telex 813423

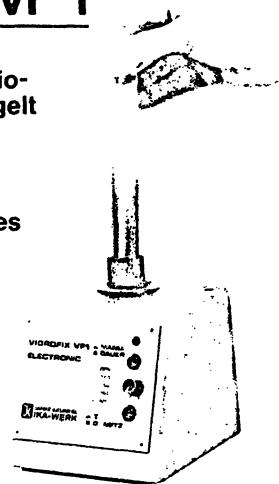
# ORIGINAL IKA®

Spitzenqualität aus dem Schwarzwald

Beispiel:

## IKA®-Vibrofix VF 1

- Antrieb und alle Funktionen elektronisch geregelt oder geschaltet.
- Drehzahlstabil von 500-2500 1/min.
- Einfaches und schnelles Arbeiten garantiert.
- Robuste und funktionelle Ausführung auch für den harten Laboreinsatz.
- IKA® - denkt für seine Kunden.



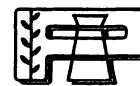
Beratung und Lieferung durch den Fachhandel oder direkt durch:

JANKE & KUNKEL GMBH & CO KG · IKA-LABORTECHNIK,  
D-7813 Staufen • 07633/831-0 • Teletex 763317 → Ikastr

PHOTOMETRISCH ACE COLORIMETRIC  
ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME

QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON ACE  
IM SERUM  
ZUR SARCOIDOSE DIAGNOSTIK UND ZUR  
THERAPIEÜBERWACHUNG BEI HYPERTONIE.

- |                 |   |
|-----------------|---|
| PHOTOMETRISCH   | - deshalb geringer apparativer Aufwand  |
| SCHNELL         | - rasche Ergebnisse bei kleinstem Arbeitsaufwand  |
| KOSTENGÜNSTIG   | - minimale Testkosten durch methodische Effizienz, nur 1 Kontrolle pro Testserie - mehrere Testserien pro Kit sind möglich, außerst attraktiver Kit-Preis |
| SICHER          | - hohe Sensitivität, geringe Fehlermöglichkeiten  |
| VERGLEICHBAR    | - durch konstante Umrechnungsfaktoren zu anderen Verfahren  |
| GEBRAUCHSFERTIG | - kompletter Satz bereits in Lösung befindlicher Reagenzien   |

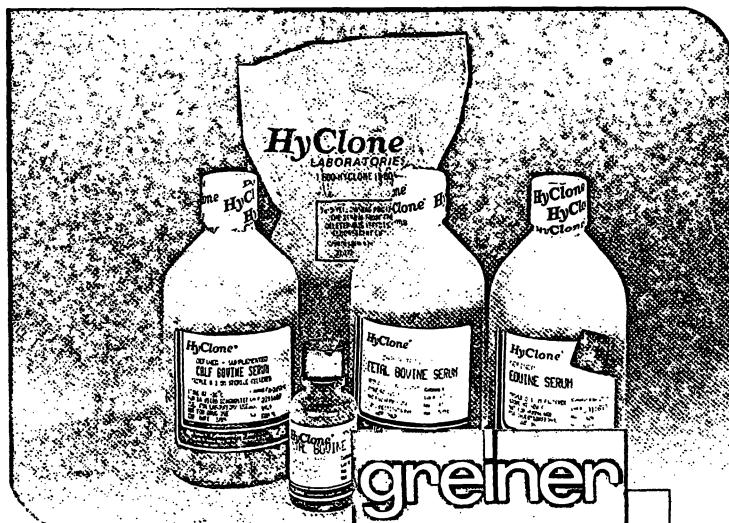


**PAESEL**  
GmbH & Co

BIOCHEMIKA · DIAGNOSTIKA · PHARMAZENTIKA

Borsigallee 6 · Postfach 63 03 47 · 6000 Frankfurt (Main) 63  
Telefon (0 69) 42 20 97 · Telex 413 202 paesel d  
Telefax (0 69) 42 30 84

## TC-Seren



greiner  
diagnostica

C. A. Greiner und Söhne  
GmbH & Co KG  
Maybachstraße  
D-7443 Frickenhausen  
Telefon 0 70 22 / 5 01-0  
Telex 7 267 788  
Telefax 0 70 22 / 5 01-514

Mit Seren und Zellkulturmedien bietet GREINER nunmehr neben den bewährten Kunststoffprodukten ein komplettes Programm für den Einsatz bei Zell- und Gewebekulturen an.

Hyclone® Definierte Seren sind als fetales Rinderserum, bovinus Kälberserum und Pferde-serum erhältlich.