

Ein neuer indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis Rötelnvirus-spezifischer IgG- und IgM-Antikörper

A new indirect immunofluorescence test for the detection of Rubella virus specific IgG- and IgM-antibodies

H. Dangel¹, Ingrid Rapp¹, Gabriele Döller², Christa Merk¹, W. Merk¹

Zusammenfassung

Die Rötelnvirusdiagnostik hat besondere Bedeutung in der Schwangerschaft: Bei der Bestimmung des Immunstatus oder der Diagnose einer akuten Infektion, einer Rötelnvirus-Reinfektion nach einer früheren Impfung oder eines kongenitalen Röteln-Syndroms.

Für die serologische Diagnostik akuter Rötelnvirusinfektionen und zur Bestimmung des Immunstatus stehen verschiedene vom Paul-Ehrlich-Institut zugelassene Testverfahren zur Verfügung.

Mit dem hier vorgestellten, neuen, indirekten Immunfluoreszenztest „Fluorimmun-Rubella“ können sowohl Rötelnvirus-IgM-Antikörper als auch Rötelnvirus-IgG-Antikörper nachgewiesen und somit zur Diagnose einer akuten Rötelnvirusinfektion und zur Abklärung des Rötelnimmunstatus eingesetzt werden.

Insgesamt wurden 663 Seren mit dem neuen IFT und mit den zugelassenen Tests Hämagglutinationshemmtest, Hämolyse in Gel-Test, indirekter Enzymimmunoassay und μ -Capture-ELISA geprüft.

Der Methodenvergleich ergab für die IgM-Bestimmung im „Fluorimmun-Rubella“ eine Spezifität von 99,6 %, bei einer Sensitivität von 90,8 % und einen Vorhersagewert von 98,6 %. Für die IgG-Bestimmung wurde eine Spezifität von 92,9 % bei einer Sensitivität von 97,1 % und einem Vorhersagewert von 96,8 % errechnet. Aufgrund der Ergebnisse ist dieser Test bei der Rötelnvirus-IgM- und IgG-Bestimmung mit den zum Vergleich verwendeten Routinetests vergleichbar.

Schlüsselwörter

Röteln – indirekter Immunfluoreszenztest – IgG- und IgM-Antikörperbestimmung – Serologie

Summary

The ability to detect rubella virus in determining immune status or diagnosing acute infection, rubella virus reinfection following vaccination or congenital rubella syndrome is particularly important during pregnancy. Various serological assays are available for use in diagnosing acute rubella infection which have been approved by the Paul Ehrlich Institute.

The new indirect immune fluorescence test „Fluorimmun-Rubella“ (IFT) presented here is designed for detecting both rubella IgM antibodies and rubella infection and clarifying rubella immune status.

In this study 663 sera were tested using IFT and compared with the following approved rubella assays: hemagglutination-inhibition-test, hemolysis in gel-test, indirect enzyme immunoassay and μ -capture-ELISA.

A total of 663 serum samples were tested in this study using the new IFT and compared with the following approved tests: hemagglutination inhibition test, hemolysis in gel test, indirect enzyme immunoassay, and μ -capture-ELISA. Fluorimmun-Rubella-IgM showed a specificity of 99.6 %, a sensitivity of 90.8 % and a predictive value of 98.6 % for the detection of rubella virus IgM antibodies. For the detection of rubella virus IgG antibodies, Fluorimmun-Rubella-IgG showed a specificity of 92.9 %, a sensitivity of 97.1 % and a predictive value of 96.8 %. Our results demonstrate that this test is comparable with other licensed rubella assays used in routine diagnosis.

Key words

Rubella – indirect immunofluorescence test – IgG- and IgM-antibody detection – serology

Anschriften der Autoren:

¹ Labor Dr. Koch – Dr. Merk, Ochsenhausen

² Abteilung Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Hygiene-Institut, Tübingen

Korrespondenz-Adresse:

Dr. Werner Dangel, Labor Dr. Koch – Dr. Merk, Schloßstraße 9, 88416 Ochsenhausen

Einleitung

Rötelnvirusinfektionen verursachen meist eine harmlos verlaufende Kinderkrankheit, wobei es zu einer Krankheitshäufung bei Kindern zwischen dem dritten und zehnten Lebensjahr kommt.

Rötelnvirusinfektionen sind jedoch in der Schwangerschaft aufgrund ihrer teratogenen Wirkung sehr gefürchtet, da sie, vor allem bei einer Infektion im ersten Trimenon, zu schweren kongenitalen Defekten führen können [1]. Rötelnvirusinfektionen lassen sich aufgrund der Symptomatik oft nur schwer klinisch diagnostizieren. Darüber hinaus verlaufen 30–40 % der Infektionen inapparent bzw. subklinisch [2]. Auch bei Auftreten eines Exanthems ist die Diagnose „Röteln“ nicht sicher, da andere Viren z.B. Echo-, Adeno-, Epstein-Barr-, Influenza- und Cocksackieviren ähnliche Hauterscheinungen hervorrufen können. Die serologische Diagnostik kann jedoch Aufschluß geben, ob kürzlich eine Rötelnvirusinfektion stattgefunden hat oder ob Immunität gegen Röteln vorliegt. Hierzu stehen verschiedene Testmethoden zur Verfügung, z.B. Hämagglutinationshemmtest (HHT) [3], Hämolysen in Gel-Test (HiG), indirekter Enzymimmunoassay (ELISA) oder μ -capture-ELISA. Von den derzeit geltenden Mutterschaftsrichtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen wird zur Überprüfung des Immunstatus ein HHT in Deutschland vorgeschrieben [4]. Zur serologischen Erfassung einer akuten Infektion ist der Nachweis Rötelnvirus-spezifischer IgM-Antikörper erforderlich oder der Nachweis eines Titeranstieges Rötelnvirus-spezifischer IgG-Antikörper um 2 oder mehr als 2 Titerstufen zwischen Erst- und Zweitserum (im Abstand von 2–4 Wochen).

Die vorliegende Studie sollte ermitteln, ob der indirekte Immunfluoreszenztest „F-Rubella“, dem ein anderes Testprinzip als den vorgenannten Tests zugrunde liegt, zur Erkennung einer akuten Rötelnvirusinfektion durch den Nachweis spezifischer IgM-Antikörper und zur Bestimmung des Immunstatus durch Nachweis spezifischer IgG-Antikörper geeignet ist.

Material und Methoden

Seren

Insgesamt wurden 663 Seren untersucht. Das Serumpanel für den IgM-Nachweis bestand aus 307 Seren, darunter Seren von Patienten mit Verdacht auf akute oder kürzlich zurückliegende Rötelnvirusinfektion und Seren mit fehlenden Rötelnvirus-IgM-Antikörpern. Die Seren wurden mit verschiedenen zugelassenen IgM-ELISAs ausgetestet.

Das Serumpanel für den IgG-Nachweis bestand aus 356 Seren, darunter Seren mit HHT-Titer $\geq 1:32$, HHT-Titer 1:8 oder 1:16 und Seren mit HHT-Titer $< 1:8$. Die IgG-Seren wurden im zugelassenen HiG, ELISA oder HHT untersucht. Bei 48 Seren aus dem IgM-Serumpanel und bei 24 Seren aus dem IgG-Serumpanel waren pathologische Serumveränderungen, die möglicherweise mit dem F-Rubella interferieren könnten, bekannt. In diesen Seren wurden C-reaktives Protein (CRP zwischen 7 und 139 mg/l), Antistreptolysin (ASL zwischen 187 und 266 IE/ml) oder Rheumafaktoren (RF zwischen 23 und 161 mU/ml oder positiv im Rapi-Test®) nachgewiesen (Medizinisch-Diagnostisches Labor PD Dr. R. Wepler, Ulm).

Immunfluoreszenztest

Der Röteln-Immunfluoreszenztest (IFT, F-Rubella) wurde in Anlehnung an den Fluorimmun-Influenza als indirekter Immunfluoreszenztest entwickelt [5, 6, 7]. Grundlage des Tests ist die Bindung Rötelnvirus-spezifischer Serum-Antikörper an die mit Rötelnvirusantigenen beschichteten Kükenerythrozyten auf Objektträgern. Gebundene Antikörper werden anschließend mit FITC-markierten anti-human-IgM- bzw. -IgG-Antikörpern nachgewiesen. Die Bewertung „positiv“ oder „negativ“ und die Erkennung unspezifischer Fluoreszenz wurde durch die überwiegende Anzahl der mit Kontrollantigen beschichteten Erythrozyten im gleichen Blickfeld erleichtert. 10–20 % Rötelnvirusantigen beschichtete und 80–90 % Kontrollantigen beschichtete, konservierte Erythrozyten wurden auf Objektträger fixiert. Die Herstellung von Kontrollantigen erfolgte in der gleichen Weise wie Rötelnvirusantigen, als Ausgangsmaterial wurde Zellkultur-Überstand aus nicht infizierter Zellkultur verwendet.

Im F-Rubella-IgM (qualitativer IgM-Nachweis) wurden die Seren nach Rheumafaktorabsorption gemäß den Herstellerangaben (RF-Absorbens von Behringwerke AG, Marburg) und nach Verdünnung mit PBS (Endverdünnung 1:12) eingesetzt (10 μ l pro Objektträgerfeld). Nach 90 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer wurden die

Abkürzungen:

IFT	= indirekter Immunfluoreszenztest
HHT	= Hämagglutinationshemmtest
HiG	= Hämolysen in Gel-Test
F-Rubella	= FLUORIMMUN®-Rubella

Objektträger gewaschen. Beim Waschen wurden die Objektträger kurz einmal in PBS getaucht und danach 10 Minuten in PBS bei Raumtemperatur unter Rühren stehen gelassen. Anschließend wurden die Objektträger in deionisiertem Wasser 1 Minute bei Raumtemperatur unter Rühren stehen gelassen. Nach dem Waschen wurden die Objektträger mit einem Fön getrocknet. Anschließend wurden pro Objektträgerfeld 10 µl FITC markierte anti-human-IgM-Antikörper (Labor Dr. Koch – Dr. Merk, Ochsenhausen) zugegeben und 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Objektträger gewaschen, getrocknet (s.o.) und mit Spezial-Einbettungsmedium (Labor Dr. Koch – Dr. Merk, Ochsenhausen) eingebettet. Der Nachweis gebundener Rötelnvirus-spezifischer IgM-Antikörper erfolgte im Fluoreszenz-Mikroskop (s.u.). Rötelnvirus-IgM-positives und -negatives Serum wurden als Kontrollen mitgeführt.

Im F-Rubella-IgG (semiquantitativer IgG-Nachweis) wurden die Seren in den Verdünnungen 1:40, 1:80 und 1:160 eingesetzt (10 µl pro Objektträgerfeld). Inkubations-, Wasch- und Einbettungsbedingungen waren die gleichen wie im F-Rubella-IgM-Test. Der Nachweis gebundener Rötelnvirus-spezifischer IgG-Antikörper erfolgte mit FITC markierten anti-human-IgG-Antikörpern (Labor Dr. Koch – Dr. Merk, Ochsenhausen).

Die Reproduzierbarkeit des Immunfluoreszenztests wurde durch die Titration von IgM- und IgG-Standardseren geprüft. Als Grenztiter galt diejenige Verdünnung, bei der gerade noch eine positive Reaktion abgelesen wurde.

Mikrophotographie und Mikroskopie

Zur Standardisierung der Test-Ablesung und -Beurteilung wurden photographische Aufnahmen verschieden starker Fluoreszenzen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop Laborlux K (Fa. Leitz, Wetzlar) mit Auflicht und der Filterkombination für FITC angefertigt. Die mikrophotographischen Aufnahmen wurden mit einer Nikon F 601 Kamera angefertigt [Filterkombination: I 2 (BP 450–490, LP 515); Film: Kodak Ektachrom 400, Tageslicht; Adapter: MPS 12; Objektiv: 160/0,17 EF 40/0,65 (Fa. Leitz, Wetzlar), ohne Okular, mit Spezial-Einbettungsmedium (Labor Dr. Koch – Dr. Merk, Ochsenhausen)].

Vergleichsmethoden

Als Vergleichsmethoden wurden folgende vom Paul-Ehrlich-Institut zugelassene Testkits eingesetzt: Hämolyse in Gel-Test (HiG) (Labor Dr. Koch – Dr. Merk, Ochsenhausen), Röteln-HHT Rubenosticon

(Fa. Organon Teknika, Eppelheim), die ELISA-Kits Eri-Rubek M reverse (anti-µ-Prinzip) und Eri-Rubek G (indirekter ELISA, Fa. Sorin, Düsseldorf) sowie Enzygnost-Rubella IgM bzw. IgG (indirekter ELISA, Fa. Behringwerke AG, Marburg). Die Testdurchführungen erfolgten nach Testvorschrift des jeweiligen Herstellers. Die Ergebnisse wurden als „positiv“, „negativ“ oder „grenzwertig“ angegeben.

Ergebnisse

Ablesung des Immunfluoreszenztestes

Die Ablesung eines Immunfluoreszenztestes wird oft als subjektiv empfunden. Als Möglichkeit zur Standardisierung der Ablesung wurden mikrophotographische Aufnahmen von stark-positiven, schwach-positiven und negativen Seren unter vergleichbaren Bedingungen hergestellt. Die Abbildungen 1–4 zeigen die Reaktionsbilder von stark-positiv (+++) bis negativ. Eine stark-positive Reaktion (+++ oder ++, Abb. 1, 2) zeigte eine deutlich gelbgrüne Fluoreszenz, eine gerade noch positive Reaktion (+, = Titer in Abb. 3) eine schwach gelbgrüne Fluoreszenz der mit Rötelnvirusantigen beschichteten Erythrozyten, die sich von den negativen, rot erscheinenden Kontrollerythrozyten, unterschieden. Mögliche unspezifische Reaktionen konnten dadurch sofort erkannt werden. Eine negative Reaktion zeigte keine gelbgrüne Fluoreszenz, alle Erythrozyten fluoreszierten durch die Gegenfärbung mit Evans blue rot.

IgM-Nachweis

Der F-Rubella-IgM wurde als Testmethode zum qualitativen Nachweis von Rötelnvirus-spezifischen IgM-Antikörpern bei Patienten mit akuter oder kürzlich zurückliegender Rötelnvirusinfektion geprüft. Rheumafaktoren (RF) können in indirekten Immunoassays, mit denen erregerspezifische IgM-Antikörper bestimmt werden, ein falsch-positives Ergebnis verursachen und wurden durch Vorbehandlung des Serums mit RF-Absorbens entfernt [8].

In der IgM-Studie wurde der F-Rubella-IgM mit einem µ-Capture-ELISA (Eti-Rubek M reverse) (206 Seren) sowie mit einem indirekten IgM-ELISA (Enzygnost-Rubella IgM) (101 Seren) verglichen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung bei insgesamt 307 (206/101) Seren.

Der F-Rubella-IgM und der Eti-Rubek M reverse zeigten eine Übereinstimmung bei 96,6 % der Seren (n = 206). 47 Seren waren übereinstimmend IgM-positiv und 152 Seren übereinstimmend IgM-nega-

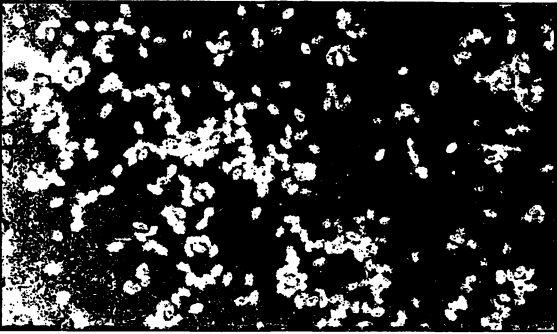


Abb. 1. „+++“-Reaktion. Deutlich gelbgrüne Fluoreszenz der mit Rötelnvirusantigenen beschichteten Erythrozyten, die sich von den negativen, rot erscheinenden Kontrollerythrozyten unterscheiden

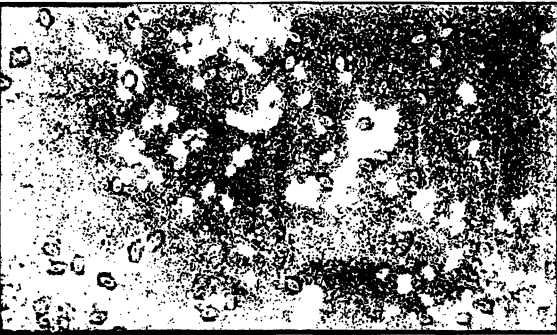


Abb. 2. „+++“-Reaktion. Gelbgrüne Fluoreszenz der mit Rötelnvirusantigenen beschichteten Erythrozyten, die sich von den negativen, rot erscheinenden Kontrollerythrozyten unterscheiden



Abb. 3. „+“-Reaktion = Titer. Schwach gelbgrüne Fluoreszenz der mit Rötelnvirusantigenen beschichteten Erythrozyten, die sich von den negativen, rot erscheinenden Kontrollerythrozyten unterscheiden. Bei dieser Reaktion ist der Serumtiter erreicht

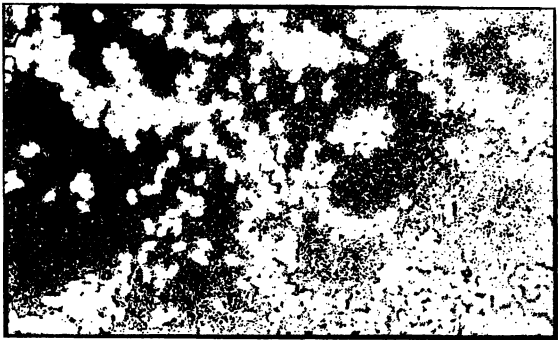


Abb. 4. „-“-Reaktion = negativ. Keine gelbgrüne Fluoreszenz, alle Erythrozyten fluoreszieren rot

tiv. Zwei Ergebnisse waren abweichend. Die beiden Seren wurden im F-Rubella-IgM einmal und im μ -capture-ELISA zweimal nachgeprüft. Bei einem der Seren war der F-Rubella-IgM insgesamt zweimal negativ und der μ -capture-ELISA insgesamt zweimal positiv und einmal in der Grauzone. Bei dem

Tabelle 1. Vergleichende Prüfung auf Rötelnvirus-spezifische IgM-Serum-Antikörper im Fluorimmun-Rubella-IgM und den Vergleichsmethoden Eti-Rubek M reverse und Enzygnost-Rubella IgM

Ergebnisse im Fluorimmun-Rubella-IgM und der Vergleichsmethode	Vergleichsmethoden	
	Eti-Rubek M reverse n = 206 (100 %)	Enzygnost-Rubella IgM n = 101 (100 %)
gemeinsam positiv	47	22
gemeinsam negativ	152	73
gesamt (%)	199 (96,6 %)	95 (94,1 %)
Fluorimmun-Rubella-IgM und Vergleichsmethode abweichend:		
positiv im Fluorimmun-Rubella-IgM und negativ in der Vergleichsmethode	1	0
negativ im Fluorimmun-Rubella-IgM und positiv in der Vergleichsmethode	1	6
gesamt (%)	2 (1 %)	6 (5,9 %)
Prüfergebnis im Fluorimmun-Rubella-IgM und der Vergleichsmethode grenzwertig	5 (2,4 %)	0 (0 %)

zweiten Serum war der F-Rubella-IgM zweimal positiv und der μ -capture-ELISA einmal negativ und zweimal positiv. Bei 5 Seren konnte bei beiden Testmethoden keine klare Zuordnung gemacht werden; drei der 5 Seren zeigten im F-Rubella-IgM eine positive Reaktion und im μ -capture-ELISA einen Grenzwert. Bei den beiden anderen Seren handelte es sich um Rheumafaktor-positive Seren (vgl. auch Tabelle 2).

Beim Vergleich des F-Rubella-IgM mit dem indirekten ELISA Enzygnost-Rubella IgM zeigte sich bei den untersuchten Seren ($n = 101$) eine Übereinstimmung der Ergebnisse von 94,1 % (= 95 Seren). 22 Seren waren übereinstimmend IgM-positiv und 73 Seren übereinstimmend IgM-negativ. Die 6 abweichenden Seren zeigten alle im indirekten ELISA einen schwach-positiven Titer (Grenztiter), während die Ergebnisse im F-Rubella-IgM negativ waren. Hier stellt sich die Frage der relevanten IgM-Antikörper-Konzentration in Hinsicht auf den Untersuchungsauftrag in der Praxis. Eines der 6 Seren war vor RF-Behandlung Rheumafaktor-positiv (s. Tabelle 2).

In Tabelle 2 sind 48 der 307 Seren aus dem IgM-Serumpanel dargestellt, bei denen pathologische Serumveränderungen nachgewiesen wurden (s. Material und Methoden). Bei den 48 Seren handelte es sich, wie in Tabelle 2 dargestellt, überwiegend um IgM-negative Seren. Es war zu prüfen, ob die Spezifität in Bezug auf falsch-positive Ergebnisse durch pathologische Serumveränderungen beeinflusst

wird. Beim Vergleich des F-Rubella-IgM mit dem Eti-Rubek M reverse waren 22 Seren (92 %) übereinstimmend negativ. Zwei Seren (8 %) mit nachgewiesenen Rheumafaktoren wichen nur geringfügig ab, das heißt, der μ -capture-ELISA bewegte sich in der Grauzone, während der F-Rubella-IgM einmal negativ und einmal positiv reagierte. Beim Vergleich des F-Rubella-IgM mit dem Enzygnost-Rubella IgM waren 23 Seren (96 %) übereinstimmend negativ. Das eine abweichende Serum zeigte im indirekten ELISA einen schwach-positiven Titer von 1:40, während das Ergebnis im F-Rubella-IgM negativ war.

Die Ergebnisse zeigen, daß auch bezüglich falsch-positiver Ergebnisse – möglich z. B. bei Seren mit Rheumafaktoren – der F-Rubella-IgM den beiden ELISA-Tests Eti-Rubek M reverse und Enzygnost-Rubella IgM gleichwertig war. Zwei der drei abweichenden Seren konnten auch nach Nachprüfungen im F-Rubella-IgM und im Eti-Rubek M reverse nicht klar zugeordnet werden.

In der Studie mit insgesamt 307 Seren zeigte der F-Rubella-IgM im Vergleich mit den beiden ELISA-Tests eine Übereinstimmung bei 294 Seren (95,8 %). 8 Seren (2,6 %) zeigten eine Abweichung, die in einigen Fällen nur geringfügig war (Grenztiterbereich). Bei 5 (1,6 %) der 307 Seren konnte auch nach Nachprüfungen in beiden Testmethoden kein klares Ergebnis erzielt werden. Für die Bestimmung der Sensitivität, der Spezifität und des Vorhersagewertes wird eine klare Zuordnung der Testergebnisse vor-

Tabelle 2. Vergleichende Prüfung auf Rötelnvirus-spezifische IgM-Antikörper in Seren mit bekannten pathologischen Serumveränderungen (RF = Rheumafaktor, CRP = C-reaktives Protein, ASL = Antistreptolysin) im Fluorimmun-Rubella-IgM und den Vergleichsmethoden Eti-Rubek M reverse und Enzygnost-Rubella IgM.

A: Vergleich Fluorimmun-Rubella-IgM mit Eti-Rubek M reverse
24 Seren mit verschiedenen pathologischen Serumveränderungen

Parameter	Anzahl der Seren	Fluorimmun-Rubella-IgM		Eti-Rubek M reverse		Zuordnung unklar
		positiv	negativ	positiv	negativ	
CRP	12	0	12	0	12	0
RF	5	0	3	0	3	2*
ASL	3	0	3	0	3	0
CRP und RF	4	0	4	0	4	0

B: Vergleich Fluorimmun-Rubella-IgM mit Enzygnost-Rubella IgM
24 Seren mit Rheumafaktoren

Parameter	Anzahl der Seren	Fluorimmun-Rubella-IgM		Enzygnost-Rubella IgM		Zuordnung unklar
		positiv	negativ	positiv	negativ	
RF	24	0	24	1 (4 %)	23 (96 %)	0

* Die beiden Seren konnten auch nach Nachprüfungen im Fluorimmun-Rubella-IgM und im Eti-Rubek M reverse keiner Testmethode klar zugeordnet werden. Der μ -capture ELISA bewegte sich bei beiden Seren in der Grauzone. Der Fluorimmun-Rubella-IgM zeigte einmal ein positives und einmal ein negatives Ergebnis.

ausgesetzt, d.h. „positiv“ oder „negativ“ in der jeweiligen Testmethode. Diese fünf Seren (1,6 %) wurden daher in die Berechnung nicht einbezogen.

IgG-Nachweis

Bei der Untersuchung auf Rötelnimmunstatus wird gemäß den Mutterschaftsrichtlinien bei Seren mit einem Hämagglutinationshemmtest-Titer von $\geq 1:32$ „Immunität angenommen“; bei einem HHT-Titer von 1:8 oder 1:16 kann „Immunität angenommen“ werden, wenn das Testergebnis mit einer weiteren Methode positiv ausfällt.

Die Festlegung der Grenzwerte des F-Rubella-IgG wurde in der klinischen Prüfung ermittelt. Bei einem IgG-Titer 1:40 wird „keine Immunität angenommen“; bei einem IgG-Titer von 1:80 wird „Immunität angenommen“, wenn mit einem zweiten Testsystem ein positives Ergebnis erhalten wird; bei einem IgG-Titer $\geq 1:160$ kann „Immunität angenommen“ werden.

Insgesamt wurden 356 Serumproben vergleichend mit den vom Paul-Ehrlich-Institut zugelassenen Testsystemen HHT ($n = 27$), HiG ($n = 155$), Enzygnost-Rubella IgG ($n = 74$) und Eti-Rubek G ($n = 100$) untersucht. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Seren zur Beurteilung des Rötelnimmunstatus mit dem F-Rubella-IgG und den Vergleichsmethoden

Hämolyse in Gel-Test, Enzygnost-Rubella IgG, Eti-Rubek G und HHT Rubenosticon dargestellt.

HiG und F-Rubella-IgG zeigten eine Übereinstimmung bei 148 (= 95,5 %) der untersuchten Seren ($n = 155$). Bei 97 Seren wurde übereinstimmend „Immunität kann angenommen werden“, bei 51 Seren wurde übereinstimmend „keine Immunität vorhanden“ nachgewiesen. Bei zwei Seren (1,3 %) konnten auch in Nachprüfungen mit anderen Testmethoden keine eindeutigen Befunde erzielt werden.

Fünf Seren (3,2 %) zeigten abweichende Ergebnisse: drei dieser fünf Seren ließen im F-Rubella-IgG „Immunität kann angenommen werden“ und im HiG, laut Definition, „keine Immunität vorhanden“ erkennen. Die HiG-Ergebnisse dieser drei Seren zeigten, auf den HHT-Titer umgerechnet, jeweils einen Titer von 1:8/16, sie lagen also im Grenztiterbereich. Der Eti-Rubek G zeigte für diese Seren, wie auch der F-Rubella-IgG, „Immunität kann angenommen werden“ an. Die restlichen zwei der fünf abweichenden Seren zeigten im HiG „Immunität“ und im F-Rubella-IgG „keine Immunität vorhanden“. Die Nachprüfungen mit dem Eti-Rubek G bestätigten hier das HiG-Ergebnis.

Der Eti-Rubek G und der F-Rubella-IgG zeigten eine Übereinstimmung bei 96 von 100 der untersuchten Seren. Bei 65 Seren wurde übereinstimmend „Immunität kann angenommen werden“, bei 31 Seren „keine Immunität vorhanden“ festgestellt. Ein

Tabelle 3. Vergleichende Prüfung von Seren auf Rötelnimmunstatus im Fluorimmun-Rubella-IgG und den Vergleichsmethoden Hämolyse in Gel-Test, Eti-Rubek G, Enzygnost-Rubella IgG und HHT Rubenosticon.

Fluorimmun-Rubella-IgG und der Vergleichsmethode übereinstimmend =	Vergleichsmethoden			
	Hämolyse in Gel-Test $n = 155$	Eti-Rubek G $n = 100$	Enzygnost-Rubella IgG $n = 74$	HHT Rubenosticon $n = 27$
Immunität vorhanden	97	65	72	0
negativ	51	31	0	22
gesamt (%)	148 (95,5 %)	96 (96 %)	72 (97,3 %)	22 (81,5 %)
Fluorimmun-Rubella-IgG und Vergleichsmethode abweichend =				
Immunität vorhanden im Fluorimmun-Rubella-IgG und negativ in der Vergleichsmethode	3	0	0	5*
negativ im Fluorimmun-Rubella-IgG und Immunität vorhanden in der Vergleichsmethode	2	3	2	0
gesamt (%)	5 (3,2 %)	3 (3 %)	2 (2,7 %)	5* (18,5 %)
Prüfergebnis im Fluorimmun-Rubella-IgG und der Vergleichsmethode unklar =	2 (1,3 %)	1 (1 %)	0	0

* Die 5 abweichenden Seren wurden im Enzygnost-Rubella IgG nachgeprüft. 4 der 5 Seren zeigten in der Nachuntersuchung übereinstimmende Ergebnisse im Fluorimmun-Rubella-IgG und im Enzygnost-Rubella IgG.

Serum lieferte auch in Nachprüfungen mit anderen Methoden keinen eindeutigen Befund. Die drei abweichenden Seren zeigten im Eti-Rubek G „Immunität kann angenommen werden“ und im F-Rubella-IgG „keine Immunität vorhanden“. Der HiG bestätigte hier zweimal den Eti-Rubek G und einmal den F-Rubella-IgG.

Beim Vergleich zwischen dem F-Rubella-IgG und dem Enzygnost-Rubella IgG wurden Rötelnvirus-IgG-positive Proben verglichen ($n = 74$). 72 der Seren (97,3 %) waren bei beiden Methoden übereinstimmend positiv. Zwei Seren (2,7 %) waren abweichend: im F-Rubella-IgG negativ, im Enzygnost-Rubella IgG positiv. Eine weitere Abklärung erfolgte nicht.

Seren mit überwiegend „fraglicher Immunität“ (HHT-Titer 1:8 oder 1:16) wurden vergleichend im F-Rubella-IgG und im HHT Rubenosticon untersucht ($n = 27$). Nur 22 der Seren (81,5 %) zeigten übereinstimmend „keine Immunität vorhanden“. Die fünf abweichenden Seren (18,5 %) waren im HHT negativ und im F-Rubella-IgG positiv. Der Enzygnost-Rubella IgG bestätigte jedoch viermal den F-Rubella-IgG und nur einmal den HHT. Die vier im F-Rubella-IgG und Enzygnost-Rubella IgG-positiven Seren lagen im Grenztiterbereich.

Unter den Seren der Vergleichsstudie des HiG mit dem F-Rubella-IgG waren 24 Seren, bei denen pathologische Serumveränderungen [CRP ($n = 13$), RF ($n = 4$), ASL ($n = 3$), CRP + RF ($n = 4$)] nachgewiesen wurden. Bei den 24 Seren handelte es sich um Seren, bei denen Immunität gegen Rötelnvirusinfektionen angenommen werden kann. Beide Methoden zeigten bei allen 24 Seren (100 %) übereinstimmende Ergebnisse.

Beim Vergleich des F-Rubella-IgG und -IgM mit den hier verwendeten, zugelassenen Rötelnvirus-IgM- bzw. Rötelnvirus-IgG-Tests wurden für den F-Rubella je nach Vergleichsmethode unterschiedliche Werte für Spezifität, Sensitivität und Vorhersagewert errechnet.

Beim IgM-Nachweis zeigt der Vergleich zwischen F-Rubella-IgM und Eti-Rubek M reverse eine Sensitivität von 97,9 %, eine Spezifität von 99,3 % bei einem Vorhersagewert von 97,9 %. Der Vergleich zwischen F-Rubella-IgM und Enzygnost-Rubella IgM ergibt eine Sensitivität von 78,6 %, eine Spezifität von 100 % und einen Vorhersagewert von 100 %. Der Gesamtvergleich von beiden ELISA-Methoden zusammen mit dem F-Rubella-IgM ergibt eine Sensitivität von 90,8 %, eine Spezifität von 99,6 % und einen Vorhersagewert von 98,6 %.

Beim IgG-Nachweis war das Verhältnis von positiven zu negativen Seren beim Vergleich F-Rubella-IgG/HHT Rubenosticon (überwiegend negative Seren) und beim Vergleich F-Rubella-IgG/Enzygnost-Rubella IgG (nur positive Seren) jeweils einsei-

tig, d.h. eine Berechnung von Spezifität, Sensitivität und Vorhersagewert ist nicht möglich. Anders beim Vergleich F-Rubella-IgG/HiG. Hier errechnet sich eine Sensitivität von 98 %, eine Spezifität von 94,4 % und ein Vorhersagewert von 97 %. Der Vergleich zwischen F-Rubella-IgG und Eti-Rubek G zeigt eine Sensitivität von 95,6 %, eine Spezifität von 100 % und einen Vorhersagewert von 100 %. Faßt man die Ergebnisse der vier Nachweismethoden HHT, HiG, Eti-Rubek G und Enzygnost-Rubella IgG zusammen und vergleicht sie mit dem F-Rubella-IgG, so errechnet sich eine Sensitivität von 97,1 %, eine Spezifität von 92,9 % und ein Vorhersagewert von 96,8 %.

Diskussion

In dieser Arbeit wird eine neue Methode zum Nachweis von Rötelnvirus-spezifischen IgG- und IgM-Antikörpern vorgestellt. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Methoden, bei denen das Rötelnvirusantigen in der Regel an Polystyrolchloridträger (Mikrotiterplatten, Kugeln) oder an Mikropartikel über unterschiedliche Methoden gebunden wurde [9], werden in dem hier vorgestellten Immunfluoreszenztest „F-Rubella“ Küken-Erythrozyten als Virusantigenträger verwendet.

Die Standardisierung eines Immunfluoreszenz-Testes wird mitunter als schwierig angesehen. Aus Abbildung 1–4 ist jedoch zu erkennen, daß eine spezifische Reaktion mit dem Fluoreszenzmikroskop rasch und zweifelsfrei erkannt werden kann, da nur 10–20 % der im Blickfeld erscheinenden Erythrozyten mit Virusantigen beschichtet sind und deshalb nur diese bei positiver Reaktion gelbgrün fluoreszieren dürfen. Unspezifische Immunfluoreszenzreaktionen sind dadurch deutlich von einer spezifischen Reaktion unterscheidbar. Mögliche Reaktionen zwischen anti-nukleären- oder anti-DNA-Antikörpern und den Zellkernen oder der DNA der Kükenerythrozyten konnten in einer früheren Studie ausgeschlossen werden [5].

Im F-Rubella wird die Intensität der Fluoreszenz der mit Virusantigen-beschichteten Erythrozyten ausgewertet. Die charakteristische, scharf begrenzte Form der Küken-Erythrozyten und die abgestufte Fluoreszenzintensität erleichtern die Bewertung. Der Serumtiter wird definiert als diejenige Serumverdünnung, die gerade noch eine „+“ Reaktion (Abb. 3) aufweist. Zur besseren Vergleichbarkeit der subjektiven Ablesung wurden zum einen Farbphotos der Reaktionen +++, ++, + und negativ als Ablesehilfe verwendet, zum anderen wurden in jedem Tagesansatz Kontrollseren mit bestimmten Soll-Titern mitgeprüft.

Bei der Prüfung auf Rötelnvirus-IgM-Antikörper wird von den Tests eine hohe Sensitivität und Spezifität verlangt, um möglichst frühzeitig eine akute Infektion diagnostizieren zu können. Als Vergleichsmethoden zum F-Rubella-IgM wurden deshalb ein indirekter ELISA (Enzygnost-Rubella IgM) und ein μ -capture-ELISA (Eti-Rubek M reverse) gewählt. In der vorliegenden Studie stimmten die Ergebnisse des F-Rubella-IgM mit den beiden Enzymimmunassays zu 96,6 % (μ -capture-ELISA) bzw. 94,1 % (indirekter ELISA) überein (Tabelle 1).

Beim Vergleich μ -capture-ELISA (Eti-Rubek M reverse) zu F-Rubella-IgM war ein Serum positiv im ELISA und negativ im F-Rubella-IgM, hingegen war das zweite abweichende Serum positiv im F-Rubella-IgM und negativ im ELISA. Beim Vergleich indirekter ELISA (Enzygnost-Rubella IgM) zu F-Rubella-IgM zeigte der ELISA in 6 Fällen ein knapp über dem „cut off“-Bereich liegendes positives Ergebnis, wohingegen die Seren im F-Rubella-IgM negativ reagierten. Aufgrund dieser Ergebnisse erhebt sich die Frage nach dem klinisch relevanten „cut-off“-Wert. Der Vergleich mit dem μ -capture-ELISA hat gezeigt, daß der F-Rubella-IgM vergleichbare Ergebnisse liefert und die Sensitivität des F-Rubella-IgM-Testes zur Erfassung einer akuten Infektion ausreichend ist. Die Untersuchung von Seren mit pathologischen Serumveränderungen (z. B. Rheumafaktoren) zeigte ebenfalls eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem Immunfluoreszenztest und den Enzymimmunassays (Tabelle 2). Beim Vergleich des F-Rubella-IgM mit dem Eti-Rubek M reverse konnten 2 von 22 Seren keiner Testmethode klar zugeordnet werden. Hier bewegte sich der ELISA in der Grauzone, während der F-Rubella-IgM einmal positiv und einmal negativ reagierte. Beim Vergleich des F-Rubella-IgM mit dem Enzygnost-Rubella IgM war nur eines von 24 Rheumafaktor-positiven Seren abweichend. Der IFT reagierte negativ, während der ELISA ein schwach positives Ergebnis zeigte (knapp über „cut-off“-Bereich).

Die Untersuchung auf Anwesenheit von Rötelnvirus-IgG-Antikörper soll den Immunstatus klären und aufzeigen, ob der Schutz vor einer Infektion ausreichend ist oder nicht. Infektionsschutz kann nur dann angenommen werden, wenn die grenzwertigen Titer im HHT von 1:8 oder 1:16 durch eine weitere Methode positiv bestätigt werden. In den Mutterschaftsrichtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen wurde festgelegt: „Ein positiver Antikörper-Nachweis gilt ohne zusätzliche Untersuchungen als erbracht, wenn der HHT-Titer mindestens 1:32 beträgt. Bei niedrigeren Titern ist die Spezifität des Antikörper-Nachweises durch eine andere geeignete Methode zu sichern, für welche die benötigten Reagenzien staatlich zugelassen sind“ [4]. In der Laborpraxis stellt sich häufig das Pro-

blem grenzwertiger Titer nach Impfung und die Bewertung des Immunschutzes im Hinblick auf das Reinfektionsrisiko [10, 11]. Der F-Rubella-IgG zeigte im Vergleich mit drei bewährten Methoden (Hämolysen in Gel-Test, Enzygnost-Rubella IgG, Eti-Rubek G) eine Übereinstimmung von 95–97 % (Tabelle 3), wobei pathologische Seren das Ergebnis nicht beeinflussen.

Insgesamt reagierten die beiden ELISAs (Enzygnost-Rubella IgG, Eti-Rubek G) sensitiver als der F-Rubella-IgG (Sensitivität = 95,6 %). Sie reagierten bei fünf Seren positiv (drei Seren im Eti-Rubek G bzw. zwei Seren im Enzygnost-Rubella IgG), bei denen der F-Rubella-IgG negative Ergebnisse zeigte. Beim Vergleich F-Rubella-IgG/HiG war die Ergebnisverteilung bei der Sensitivität (98 %) dagegen ausgeglichen. Bei drei Seren reagierte der F-Rubella-IgG positiv und der HiG negativ; bei zwei Seren reagierte der HiG positiv und der F-Rubella-IgG negativ.

Auch beim IgG-Test muß man den „cut-off“-Wert kritisch hinterfragen. Sensitivität und Spezifität hängen von den jeweils festgelegten „cut-off“-Werten der miteinander verglichenen Testmethoden ab. Die IgG-Studie zeigt, daß der für den F-Rubella-IgG festgesetzte „cut-off“-Wert beim Vergleich der Sensitivität (98 %) näher beim „cut-off“-Wert des HiG liegt und beim Vergleich der Spezifität (100 %) eher dem „cut-off“-Wert des Eti-Rubek G gleichkommt.

Wie in unserer Studie im Vergleich mit verschiedenen zugelassenen Testmethoden gezeigt werden konnte, ist der hier vorgestellte F-Rubella-IgM geeignet zur Erfassung einer akuten Infektion mit zwar geringerer Sensitivität als der indirekte IgM-ELISA (Enzygnost-Rubella IgM), jedoch mit einer Spezifität von 100 %. Dagegen ist die Sensitivität des F-Rubella-IgM mit 97,9 % gleich hoch wie die Sensitivität des μ -Capture-ELISA.

Bei den IgG-Tests zeigen die Ergebnisse, daß die Sensitivität des F-Rubella-IgG im Vergleich zum HiG mit 98 % Sensitivität besser abschneidet als im Vergleich zum indirekten IgG-ELISA mit 95,6 % Sensitivität.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der neue F-Rubella in der vergleichenden Untersuchung sowohl bei der IgM- als auch bei der IgG-Prüfung zuverlässige Ergebnisse geliefert hat. Im Gegensatz zum ELISA ist beim F-Rubella-IgM und -IgG ein direkter Vergleich von spezifischer und unspezifischer Bindung durch das Vorliegen von Antigen und Kontrollantigen beschichteten Erythrozyten im gleichen Blickfeld möglich. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, falsch-positive Befunde sofort zu erkennen. Dies ist ein Vorteil gegenüber Enzymimmuntests, bei denen diese Möglichkeit der Überprüfung einer unspezifischen Bindung mit dem Kontrollantigen oft nur schwer möglich ist. Beim F-Rubella kön-

nen ferner Röteln-IgM- und -IgG-Antikörper in einem Testansatz auf einem Objektträger durchgeführt werden. Die Reaktionsschritte und die Reagenzien sind bis auf das Konjugat identisch. Der neue Immunfluoreszenztest eignet sich aus unserer Sicht als Zusatztest oder alternative Methode zur weiteren Abklärung bei unklarer Immunitätslage (HIIT-Titer 1:8 und 1:16) bzw. unklarem Rubella-IgM Befund im ELISA.

Literatur

1. Bellanti JA, Artenstein MS, Olson LC, Buescher EL, Luhrs CE, Milstead KL (1965) Congenital Rubella. *Amer. J. Dis. Child.* **110**, 464–472
2. Enders G (1986) Röteln. In: *Klinische Virologie* (Gsell O, Krech U, Mohr W ed.) Urban & Schwarzenberg, München, Germany. pp 157–172
3. Stewart GL, Parkman PD, Hopps HE, Douglas RD, Hamilton JP, Meyer HM (1967) Rubella-virus hemagglutination-inhibition test. *New Eng. J. Med.* **276**, 554–557
4. Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung (Mutterschafts-Richtlinien) in der geänderten Fassung vom 4. Dezember 1990 (letzte Änderung veröffentlicht im Bundesarbeitsblatt 2/1991 vom 31. Januar 1991)
5. Döller PC, Döller G, Gerth H-J (1985) Immunofluorescence test with antigen-loaded erythrocytes: detection of influenza virus specific IgG, IgA and IgM antibodies. *Med. Microbiol. Immunol.* **173**, 291–302
6. Döller G, Döller PC, Gerth H-J (1986) Diagnostic significance of influenza subtype-specific IgG, IgA and IgM antibodies. *J. Biol. Standard.* **14**, 163–175
7. Döller G, Merk C, Gerth H-J (1988) Serologische Influenza-Diagnostik: Ist der Immunfluoreszenztest eine Alternative zum Hämagglutinationshemmtest beim stammspezifischen Antikörpernachweis? *Lab. med.* **12**, 372–377
8. Feldner J (1990) RF-Absorbens: IgM-Antikörperbestimmung ohne Rheumafaktor-Interferenz. *Lab. med.* **154**, 283–288
9. Dimech W, Betolli A, Eckert D, Francis B, Hamblin J, Kerr T, Ryan C, Skurrie I (1992) multicenter evaluation of five commercial Rubella virus immunoglobulin G kits which report in international units per milliliter. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 633–641
10. Enders G (1988) Röteln. In: *Infektionen und Impfungen in der Schwangerschaft*. Urban & Schwarzenberg, München, Germany. pp 18–21
11. Enders G (1991) Diagnostik von Rötelninfektionen in der Schwangerschaft durch konventionelle, immunologische und molekularbiologische Methoden. In: *Neues in der Virusdiagnostik* (F. Deinhardt, G. Maass, H. Spiess ed.). Deutsches Grünes Kreuz, Marburg, Germany. pp 133–152