Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen mittels eines fluormetrischen C_{1q} -solid-phase-assays (FIAX)

J. Bartel, E. Maier, B. Maisch* und P. A. Berg

Medizinische Klinik der Universität Tübingen, Abt. II und Medizinische Klinik der Universität Würzburg

Zusammenfassung:

Eine Methode zum Nachweis von Immunkomplexen wird beschrieben, bei der C_{1q} , das an einer polymeren Oberfläche fixiert ist, mit Patientenserum inkubiert wird, wobei die gebundenen Immunkomplexe durch fluoreszenzmarkierte Antikörper fluorometrisch nachgewiesen werden. Diese Methode erlaubt eine große Anzahl von Seren innerhalb einiger Stunden auf Immunkomplexe zu testen und ist gut reproduzierbar. Untersucht wurden vor allem Seren von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes und primär-biliärer Zirrhose, in denen das Vorkommen von Immunkomplexen in hoher Konzentration bekannt ist, sowie Seren von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis.

Schlüsselwörter:

Zirkulierende Immunkomplexe – fluorometrischer Immunoassay (FIAX)

Summary:

A method will be described for the detection of immune complexes incubating C_{1q} fixed to a polymere surface with patients sera followed by the fluorometric identification of the fixed immune complexes by fluorescein-conjugated antibodies. This method allows to test a great number of sera within a few hours and is well reproducible. Sera of patients with systemic lupus erythematosus and primary biliary cirrhosis known for their high concentration of immune complexes were investigated as well as sera of patients with acute and chronic hepatitis.

Keywords:

Circulating immune complexes – fluorometric immunoassay (FIAX)

Der Nachweis von Immunkomplexen stützt sich auf verschiedene Methoden wie die Raji-Zell-Technik, den Conglutinin-Assay sowie eine Reihe von C_{1q} -Methoden. Diese Untersuchungen sind zeitlich sehr aufwendig und routinemäßig nur schwer durchführbar (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Klinisch kommt jedoch dem Nachweis von Immunkomplexen vor allem bei Patienten mit Kollagenerkrankungen erhebliche Bedeutung zu. Obwohl die pathogenetische Bedeutung der Immunkomplexe bei diesen Erkrankungen nicht eindeutig geklärt ist, scheinen sie doch eine gestörte Immunregulation widerzuspiegeln oder können Ausdruck einer ver-

minderten Funktionsfähigkeit des retikuloendothelialen Systems sein.

Im folgenden wird eine Methode beschrieben, die relativ einfach und mit geringem Zeitaufwand zuverlässig den Nachweis von Immunkomplexen erlaubt. Die Untersuchungen wurden an Seren von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes und verschiedenen Lebererkrankungen durchgeführt.

Methode und Patienten

Die Messungen wurden mit dem FIAx-Fluorometer (IDT-Europe) durchgeführt. Als Probenträger dien-

ten zweiseitige mit Celluloseacetat beschichtete Stiqs. Die Pipettierungen wurden mit Kolbenpipetten ausgeführt.

Für den Nachweis der Immunkomplexe und die Beschichtung der Stiqs wurde C_{1q} verwandt, das uns von den Behringwerken Marburg zur Verfügung gestellt wurde. Das Reagenz wurde bei -70°C aufbewahrt. Immunelektrophoretisch enthielt es noch Spuren von IgG. Für den Nachweis der Immunkomplexe wurden ferner FITC-markierte affinitätschromatographisch gereinigte anti-IgG Antikörper vom Kaninchen ($F[ab]_2$ -Fragmente) (Medac, Hamburg) verwendet.

Zur Standardisierung der Methode wurde aggregiertes humanes IgG (AHG) nach den WHO-Empfehlungen (7) präpariert.

Getestet wurden Seren von 45 Patienten mit systemischem Lupus erythematodes, 17 mit akuter Virus-B-Hepatitis, 19 mit HBs_{Ag} -positiver chronisch aggressiver Hepatitis, 16 mit HBs_{Ag} -negativer chronisch aggressiver Hepatitis und von 83 Patienten mit primär-biliärer Zirrhose. Als Kontrollen dienten Seren von 24 Blutspendern.

Die Seren stammten entweder von Patienten aus der Medizinischen Klinik in Tübingen oder von Patienten von auswärtigen Krankenhäusern, die uns zur serologischen Untersuchung zugesandt worden waren. In allen Fällen lagen uns die klinischen und biochemischen bzw. morphologischen Ergebnisse vor. Die Diagnose der primär-biliären Zirrhose stützte sich auf histologische Ergebnisse sowie den Nachweis von antimitochondrialen Antikörpern in der Immunfluoreszenz oder in der Komplementbindungsreaktion (8).

Die Durchführung des Nachweises von Immunkomplexen im FIAX-System richtete sich nach den von der Firma IDT herausgegebenen Angaben zum Nachweis von anti-DNS-Antikörpern.

Die Stiqs wurden auf einer Seite mit $1\text{ }\mu\text{g}$ C_{1q} beschichtet und anschließend in Veronalpuffer, dem 1% Rinderalbumin zugesetzt worden war, gewaschen. Die Stiqs wurden mit Patientenserum in einer Verdünnung von 1:35 für 30 Minuten inkubiert (20 μl Serum und 680 μl EDTA-Puffer und 0,4% Triton X 100). Die Stiqs wurden erneut mit dem EDTA-Triton X 100-Puffer für 10 Minuten gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit dem konjugierten Anti-IgG-Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde in einer 1:50-Verdünnung zugesetzt (15 μl der $F[ab]_2$ -anti-IgG-Lösung und 735 μl Phosphatpuffer, der 1% Rinderalbumin und 0,4% Triton X 100 enthält). Dieser Komplex wurde erneut für 10 Minuten in Phosphatpuffer gewaschen. Im Anschluß daran erfolgte die fluorometrische Messung der gebundenen konjugierten $F(ab)_2$ -Fragmente im FIAX.

Aus der Differenz der Fluoreszenzsignale (FSU) zwischen der C_{1q} -beschichteten Vorderseite und der unbeschichteten Rückseite wurde die Konzentration der zirkulierenden Immunkomplexe im Serum bestimmt.

Ergebnisse

Bei der Bestimmung der Bindung von Immunkomplexen an C_{1q} erwies sich die Beschichtung der Stiqs mit $1\text{ }\mu\text{l}$ C_{1q} als optimale Menge für deren Nachweis. Bei geringeren Konzentrationen ließen sich keine eindeutigen Signale registrieren, bei größeren Mengen nahmen die unspezifischen Reaktionen dage-

Abb. 1:

Standardkurve für aggregiertes IgG. Auf der Abszisse ist die Menge des AHGs aufgetragen, die zu 25 μl Normalserums zugegeben wurde. Die Ordinate gibt die gemessenen Fluoreszenzsignaleinheiten (FSU) an.

gen zu. Es ist anzunehmen, daß dafür die in der C_{1q}-Präparation enthaltenen IgG-Verunreinigungen verantwortlich waren.

Aggregiertes humanes IgG (AHG) wurde als Äquivalent für den Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen im Patientenserum verwandt. Dem AHG wurde frisches Normalserum als Komplementquelle zugesetzt.

In Abb. 1 ist die Standardkurve für AHG aufgezeigt. Es fand sich eine nahezu lineare Beziehung zwischen den verschiedenen Konzentrationen an AHG und den im FIAX-Fluorometer gemessenen Fluoreszenzsignalen. Die Bestimmung erfolgte jeweils unter Zusatz einer konstanten Menge Normalserums (25 µl). Wie aus der Abbildung hervorgeht, lag die Nachweisgrenze von AHG mit dieser Methode unter 1 µg, obwohl in dem zugesetzten Normalserum etwa 250 µg IgG gleichzeitig zur potentiellen Bindung zur Verfügung stand. Um störende Hintergrundfluores-

zenzen auszuschalten, war es wichtig, affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper zu verwenden, und zwar nur deren F(ab)₂-Fragmente, damit eine direkte Bindung der Antikörper an das C_{1q} ausgeschlossen werden konnte. Ferner war die Verwendung von Triton X 100 eine wichtige Voraussetzung zur Durchführung dieses Testes, da dadurch eine direkte Diffusion von Immunglobulinen aus den Seren an die Oberfläche der Stiqs verhindert werden konnte. So konnte ohne die Verwendung von Triton X 100 vielfach kein eindeutiger Unterschied zwischen den C_{1q}-beschichteten und unbeschichteten Seiten der Stiqs bei der Testung der Seren beobachtet werden.

Die klinische Relevanz dieses Testsystems ist in Abb. 2 aufgezeigt. Getestet wurden Seren von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes und mit verschiedenen Lebererkrankungen. Die höchsten Konzentrationen an Immunkomplexen konnten beim LE und bei der primär-biliären Zirrhose beobachtet werden. Patienten mit akuter Virushepatitis, meist getestet im späteren Stadium der Erkrankung, waren unauffällig, und HB_s Ag-negativen chronisch aggressiven Hepatitiden hatten häufiger Immunkomplexe als die HB_s Ag-positiven. Als positiv wurden Signale bewertet, die außerhalb des 90% Vertrauensbereichs der Kontrolle lagen.

Abb. 2:

Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen in Seren von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes und verschiedenen Formen von Lebererkrankungen.

Diskussion

Dem FIAX-System liegt die Kombination der Immunfluoreszenztechnik und der Adsorption von Proteinen an polymeren Oberflächen zugrunde. Dabei erlaubt die fluorometrische Bestimmung der an den Immunkomplex gebundenen fluoreszenzkonjugierten Antikörper eine quantitative Aussage über die Höhe der Konzentration der zirkulierenden Immunkomplexe.

Wie aus den Untersuchungen hervorgeht, hängt die Sensibilität dieser Methode wesentlich vom Reinheitsgrad von C_{1q} ab. Mit der von den Behringwerken zur Verfügung gestellten Präparation erwies sich eine Proteinmenge von 1 µg als am günstigsten für die Bestimmung der Immunkomplexe.

Unspezifische Bindungen können aber auch durch die Adsorption normaler Immunglobuline an die polymere Oberfläche der Stiqs hervorgerufen werden. Der Zusatz von 0,4% Triton X 100 zu der Pufferlösung verhindert diese unspezifische Proteinbindung.

Die FIAX-Methode entspricht mit der Nachweisgrenze von 1 µg AHG der Sensibilität radioimmunologischer Methoden. Gegenüber dem Raji-Zell-Test hat die FIAX-Methode den Vorteil, daß antilymphozytäre Antikörper, die häufig in Seren von Patienten mit autoimmunen Erkrankungen nachzuweisen

sind, nicht mit dem Nachweis der Immunkomplexe interferieren, z. B. durch die Bindung dieser Antikörper an Raji-Zellen. Allerdings werden mit dieser Methode nur Immunkomplexe nachgewiesen, die den klassischen Komplementweg aktivieren, nicht jedoch den alternativen Komplementweg. Ferner binden sich bei diesem Solid-phase-Test vorwiegend größere Immunkomplexe.

Die Anwendung dieses Testsystems an Patientenkollektiven, bei denen das häufige Vorkommen von Immunkomplexen bereits beschrieben ist, zeigt eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Daten (9, 10). Während der Nachweis der Immunkomplexe beim systemischen Lupus erythematosus von der Aktivität des Krankheitsbildes abhängt, kommen bei der primär-biliären Zirrhose,

unabhängig vom jeweiligen Stadium der Erkrankung, in einem sehr hohen Prozentsatz Immunkomplexe vor. Die eindeutigen Unterschiede zwischen dem Nachweis der Immunkomplexe bei der akuten und der chronischen Hepatitis legen nahe, daß zirkulierenden Immunkomplexen bei der chronischen Hepatitis eine pathogenetische Rolle zukommt.

Nach unseren Erfahrungen stellt die FIAX-Methode eine neue Möglichkeit dar, um zuverlässig und schnell eine große Anzahl von Seren auf Immunkomplexe zu testen. Darüber hinaus wird der Kontakt mit radioaktivem Material vermieden und die Standardisierung von FITC-konjugierten Antikörpern ist leichter möglich als bei radioaktiv markierten Antikörpern.

Schrifttum:

1. LAMBERT, P. H.: Problems with the detection of immune complexes Behring Inst. Mitt. 64, 4-10 (1979).
2. LAMBERT, P. H.: A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum. J. Lab. Clin. Immunol. 1, 1-15 (1978).
3. HAY, F. C., NINEHAM, L. J. and ROITT, I. M.: Routine assay for the detection of immune complexes of known immunoglobulin class using solid phase C1q. Clin. exp. Immunol. 24, 396-400 (1976).
4. ANDERSON, C. L. and STILLMAN, W. S.: Raji-cell assay for immune complexes. J. Clin. Invest. 66, 353-360 (1980).
5. GUPTA, R. C., DICKSON, E. R., McDUFFIE, F. C. and BAGGENSTOSS, A. H.: Circulating immune complexes in primary biliary cirrhosis: A serial study in forty patients followed for two years. Clin. exp. Immunol. 34 19-27 (1978).
6. SODOMANN, C.-P., PROKEIN, K., SCHMIDT, H. und MARTINI, G. A.: Zirkulierende Immunkomplexe bei Lebererkrankungen. Zeitschr. Gastroenterol. 8, 501-511 (1978).
7. MACKAY, I. R.: Immune complexes in human serum. WHO/Imm. Tech./79.1, p III, 2.
8. SAYERS, T. J., BINDER, T. and BERG, P. A.: Heterogeneity of anti-mitochondrial antibodies: characterization and separation of the antigen associated with the pseudo-lupus erythematosus syndrom. Clin. exp. Immunol. 37, 68-75, (1979).
9. NYDEGGER, U. E., LAMBERT, P. H., GERBER, H. and MIESCHER, P. A.: Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and carriers of hepatitis-B-antigen. J. Clin. Invest. 54, 297-309 (1974).
10. WANDS, J. R., DIENSTAG, J. L., BHAN, A. K., FELLER, E. R. and ISSELBACHER, K. J.: Circulating immune complexes and complement activation in primary biliary cirrhosis. N. Engl. J. Med. 298, 233-241 (1978).

Anschrift der Verfasser:

Peter A. Berg, Jan Bartel, Ewald Maier
Immunpathologie, Medizinische Klinik,
D-7400 Tübingen

Bernd Maisch
Medizinische Klinik
D-8700 Würzburg

Methodische Fortschritte im Laboratorium

Kurzreferate vom Kongreß der Deutschen Gesellschaft
für Laboratoriumsmedizin, Berlin 1981,
in Broschürenform.

128 Seiten, kart., DM 10,- zuz. Versandkosten.

Verlag Kirchheim, Postfach 25 24, 6500 Mainz.

**Methodische Fortschritte
im
Laboratorium**
Kurzreferate

Kongreß der Deutschen
Gesellschaft für
Laboratoriumsmedizin

Berlin 3. 5.—7. 5. 1981