

Bestimmung von humanem Serum-CRP mit einem aviären Antikörper (IgY) im Vergleich mit einem Antikörper vom Säuger (IgG). Falsch positive Befunde durch Interferenz mit Rheumafaktoren

Antje Rieger, Wolf Bürger¹, Falk Hiepe², Rüdiger Schade

Universitätsklinikum Charité, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, D-Berlin ¹Institut für Mikrobiologie und Hygiene, ²Klinik und Poliklinik III, Abteilung Rheumatologie, D-Berlin

Zusammenfassung

Die Bestimmung von Entzündungsparametern wird häufig gestört durch Rheumafaktoren (RF), die aufgrund einer Bindung an den Fc-Teil von Immunglobulinen zu falsch positiven Reaktionen führen können. Eine derartige Bindung zwischen aviären (IgY) und mammären Antikörpern findet offensichtlich nicht statt. Hiervon ausgehend wurden jeweils aviäre anti CRP-Antikörper (C-reactive protein) mit mammären Antikörpern entsprechender Spezifität hinsichtlich falsch positiver Resultate miteinander verglichen. 70 Patientensera mit bekanntem RF-Gehalt wurden qualitativ mit dem Latex-Agglutinationstest bzw. quantitativ mit einem Enzymimmunoassay bestimmt. Es ließ sich zeigen, daß der „mammäre“ Test (Latex) in Anwesenheit von RF 39 positive Resultate erbrachte im Vergleich zum „aviären“ Test mit 22 positiven Werten. Dieser Befund zeigte sich auch im Vergleich der Werte mittels EIA. Auf der Basis dieser Daten wird eingeschätzt, daß sich aviäre Antikörper aufgrund ausbleibender Interferenzen mit RF für die Bestimmung von CRP und möglicherweise weiteren Entzündungsparametern als Substituenten eignen.

Keywords: CRP, IgY, rheumatoid factors, EIA, alternatives

Summary: Determination of human serum CRP using a chicken egg yolk antibody (IgY) to avoid interferences with rheumatoid factors. Comparison with mammalian antibodies.

The determination of reactants of inflammation frequently is interfered by rheumatoid factors (RF) which are able to bind with the Fc-part of immunoglobulins. False positive results might be due to such interference. These interference could not be observed between avian (IgY) and mammalian antibodies. Based on that observation anti C-reactive protein (CRP) antibodies raised in chickens and rabbits, respectively, were compared by means of a latex-agglutination test or an enzyme immunoassay (EIA) with respect to false positive results. A total of 70 patients sera with a defined content of RF was tested. It could be shown that using the mammalian latex test 39 sera were found to be CRP-positive in contrast to 22 positive values measured by the avian test. A similar result was obtained comparing results obtained from both the avian EIA and the mammalian EIA, respectively. Based on these data the substitution of one mammalian antibodies by an avian antibody may improve tests systems if a reduction in false positive results is concerned. That might be valid not only for CRP but also for further reactants of inflammation which are determined by use of antibodies.

1 Einleitung

Das CRP gehört zu den sogenannten „Akute-Phase-Proteinen“. Es kann bei akuten Entzündungen bzw. mit Gewebezerfall einhergehenden Prozessen innerhalb von 6–10h auf das bis zu mehr als 100-fache der Normkonzentration (oberer Wert des Normbereiches ca. 6mg/l Serum) ansteigen (Claus et al., 1976). Daraus ergibt sich die Bedeutung dieses Proteins zur frühzeitigen Erkennung von Entzündungen.

Die CRP-Bestimmung wird zur Diagnose, Verlaufskontrolle und Beurteilung von Therapieerfolgen bei akut entzündlichen Prozessen eingesetzt werden.

Rheumafaktoren sind Antikörper mit Spezifität gegen antigene Strukturen der CH2- und CH3-Domänen der Fc-Region von IgG-Molekülen (anti-IgG-Antikörper) (Johnson und Faulk, 1976). Es gibt RF, die körpereigenes IgG binden (Autoantikörper), aber auch solche, die Kreuzreaktivität mit anderen Spezies (Kaninchen) aufweisen. Beim Menschen sind RF die am häufigsten auftretenden Autoantikörper.

Neben Interferenzen durch Immunglobuline und zirkulierende Immunkomplexe können RF ebenfalls zu falschen Ergebnissen in verschiedenen Tests führen.

Deyo et al. (1980) fanden bei Untersuchungen zur CRP-Bestimmung mittels Latexagglutinationstest (unter Verwendung mammärer Antikörper) bei Proben mit hoher Konzentration an RF falsch positive bzw. falsch erhöhte CRP-Werte. Müller et al. (1985) bestätigten diese Aussage bei nephelometrischer CRP-Bestimmung, ebenfalls unter Verwendung mammärer Antikörper. Demgegenüber stehen Untersuchungsergebnisse von Montagne et al. (1992), die eine CRP-Bestimmung mittels Mikropartikel-Nephelometrie (Verwendung von Ziegenanti-human-CRP Antiserum) durchführten und dabei keine Interferenzen

durch RF (IgG-RF/IgM-RF) feststellen.

Hamilton (1989) beschreibt außerdem RF-Kreuzreaktionen für Assays auf Basis von Immunfluoreszenz, für Festphaseimmunassay, für die Immunodiffusion und auch für zelluläre Immunassays.

Nach Untersuchungen von Larsson und Sjöquist (1990) kommt es dabei zur Reaktion von RF (Fab-Fragmente) mit dem Fc-Teil der marmären Antikörper (Abb.1).

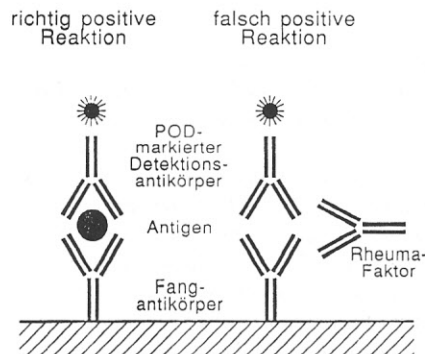


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Interferenz mit Rheumafaktoren in einem Enzymimmunassay. In der Darstellung ist nicht berücksichtigt, daß sich der Rheumafaktor an die Fc-Teile der Immunglobuline bindet.

Möglichkeiten der Reduzierung von RF-Interferenzen wurden ebenfalls von Hamilton (1989) beschrieben:

1. Bestimmung der RF-Konzentration in Seren, bevor sie in anderen Tests verwendet werden,
2. Abtrennung der RF (IgG, IgM) durch Ionenaustausch- oder Molekülgrößenchromatographie,
3. Zusatz von Anti-human IgM und/oder Anti-human IgG zu Testseren, wodurch es zur Bildung von Präzipitaten (IgM-, IgG-RF) kommt,
4. Fragmentierung von Antikörpern; Verwendung der Fab oder F(ab)₂-Bruchstücke,
5. Inaktivierung der RF durch Erhitzen in Kombination mit Dithioeritol/b-Merkaptoethanol,
6. Adsorption von IgG aus dem Serum mit Protein A von *Staphylococcus aureus*,
7. Entfernen von Immunkomplexen durch Vorbehandlung mit 7%igem Polyethylenglykol,

8. Affinitätschromatographie, selektive Isolierung der RF aus dem Serum; Bindung von IgG an die Matrix,
9. Antikörper-Produktion durch Spezies mit phylogenetischer Differenz zu Mammalia (z.B.Huhn).

2 Versuchstiere, Material und Methoden

Für die Immunisierungen wurden je fünf Hühner im Alter von 20–22 Wochen verwendet. Die Tiere entstammten der Hybridlinie „Medes White“ (Deersheim, 13. Inzuchtlinie). Untergebracht wurden die Hühner in der Landwirtschaftlichen Lehr- und Versuchstation der Humboldt-Universität zu Berlin (Damsdorf). Die Haltung erfolgte unter SPF-Status (*specific pathogen free*) in 2-Etagen-Käfigen (L-112/1) mit den Abmessungen 2x2 m in Gruppenhaltung mit je fünf Tieren, bei künstlichem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden (7⁰⁰, 19⁰⁰). Die Stalltemperatur lag zwischen 16–22°C. Die Tiere erhielten Legehennenmehl und Wasser *ad libitum*.

Die Haltung der Tiere war unter dem Gesichtspunkt des Tierschutzes nicht optimal, ließ sich jedoch zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung nicht anders realisieren.

2.1 Antigengewinnung

CRP wurde aus Humanserum (CRP-Gehalt > 60 mg/l) durch Affinitätschromatographie, modifiziert nach einer Methode von Pontet et al. (1977) unter Verwendung von Phosphorylcolamin-Sepharose gewonnen (Bürger et al., 1987).

2.2 Immunisierung

Zur Erstimmunisierung der Hühner wurden aus dem CRP-Ag (50 µg/Tier) mit Freund's komplettem Adjuvans (Difco Laboratories, USA) im Verhältnis 1:1 (je 0,5 ml) eine stabile Emulsion (1ml/Tier) hergestellt. Die Injektion der Ag-Lösung erfolgte je zur Hälfte in den linken und rechten *Musculus pectoralis*.

Im monatlichen Abstand wurden Boosterungen nach dem gleichen Modus wie bei der Erstimmunisierung, aber unter Verwendung von Freund'schem inkomplettem Adjuvans, vorgenommen.

Die gelegten Eier konnten aufgrund der Gruppenhaltung leider nicht eindeutig dem jeweiligen Tier zugeordnet werden, was sich als großer Nachteil für die folgenden Untersuchungen, wie z.B. Titerentwicklung oder Spezifitätsuntersuchungen herausstellte.

2.3 Isolierung und Reinigung der Antikörper durch Ammoniumsulfat-fällung

Die Isolierung der Antikörper aus dem Hühnereidotter erfolgte nach einer Methode von Jensenius (1981) unter Verwendung von Dextran- und Ammoniumsulfat.

2.4 Latexagglutinationstest

Der Latexagglutinationstest wird in der klinischen Praxis häufig als schnell durchzuführende qualitative Suchreaktion genutzt.

Das Prinzip des Latexagglutinationstests besteht darin, daß Ag bzw. spezifische Antikörper an Polystyrolpartikel (Latexsuspension) gebunden werden, wobei es durch die Reaktion mit dem entsprechenden Antikörper bzw. Ag zu einer sichtbaren Agglutination kommt.

Die Kopplung der Huhn-anti-human-CRP bzw. der Schaf-anti-human-CRP Antikörper an die Latexpartikel erfolgte durch kovalente Bindung über funktionelle Gruppen (Carboxylgruppen).

Präparation des Latexreagens

Die kovalente Bindung der Antikörper an carboxylierte Latexpartikel (CML, Rhone Poulenc) erfolgte über die Carbodiimid-Methode (1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-Carbodiimidmetho-p-Toluolsulfonat, Sigma) nach Hager (1974).

Der Huhn-anti-human-CRP Antikörper wurde als Dextran-/Ammoniumsulfat gereinigte Fraktion verwendet, der Schaf-Antikörper war ein monospezifischer Antikörper (nach Festphaseabsorption).

0,5ml 1% CML (Korngröße 0,8 µm)
+ 0,015M PBS pH 7,5
Zentrifugation: 10min, 3000 U/min
(Vorgang 2mal wiederholen)

↓
Pellet in 5ml A.bidest. aufnehmen
+ 5mg Carbodiimid /ml Latex,
+ 0,5ml Antikörper-Lösung (2g/l)
2h bei RT Schütteln,
↓
Zentrifugation: 10min, 3000 U/min

↓
Pellet in 0,2M Glycinpuffer (pH 7,5) aufnehmen
2h bei RT Schütteln,
↓ Zentrifugation: 10min, 3000 U/min
Waschen mit PBS
Zusatz von 1% BSA, Einstellen der Lösung auf 1% als Arbeitskonzentration

Zur Kontrolle wurde ein Latexreagens auf gleiche Weise mit BSA hergestellt. Die Reagenzien wurden bei 4°C aufbewahrt. Die Kopplung der Antikörper wurde mittels Proteinassay (BioRad) überprüft.

Durchführung des Tests

Das Latexreagens und die Proben werden auf Raumtemperatur gebracht. Ein Tropfen (ca. 30µl) Probe und ein Tropfen Antikörper-beladene Latex-Partikel (vor Gebrauch schütteln) werden auf einer schwarzen Platte vermischt und auf einem Kreisschüttler vorsichtig bewegt. Innerhalb von 3 min wird die Agglutination beurteilt.

2.5 Enzymimmunoassay zum Nachweis von CRP im Serum

Die Bestimmung von CRP im Serum sowie Untersuchungen zum Einfluß von RF auf die CRP-Werte wurden mittels EIA unter Verwendung verschiedener Antikörper durchgeführt. Dieser Test sollte neben dem Latexagglutinationstest als zweite Nachweismethode für CRP in Serum gelten. Zusätzlich zu einem CRP-Standardserum (Behring) wurde ein RF-Referenzserum (Behring) mit bekanntem Gehalt an RF verwendet.

Zur Unterscheidung zum *Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay* (ELISA) wird der EIA als Bestimmungsmethode für Antigen und Haptene vorgeschlagen, der ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper eingesetzt (Porstmann et al., 1991).

Aufbau und Durchführung

Es wurde je ein EIA auf der Basis von aviären Antikörpern sowie mammären Antikörpern aufgebaut. Der EIA wurde als direkter Zwei-Seiten-EIA durchgeführt (Porstmann et al., 1991). Als Fangantikörper diente zum einen ein Dextran-/Ammoniumsulfat gereinigter Antikörper gegen humanes CRP vom

Huhn (2,5µg/ml) und zum anderen ein monospezifischer Schaf-Antikörper (2µg/ml) gleicher Spezifität. Carbonatpuffer pH 9,6 diente als Kopplungspuffer, PBS-Triton pH 7,4 als Waschpuffer.

Im nächsten Schritt wurden die Serumproben (1:100 verdünnt in PBS pH 7,4) aufgetragen und im Anschluß daran ein mit Peroxidase (POD) markierter Antikörper (1:1500, 1:4000 in PBS pH 7,4) gleicher Spezifität zur Detektion eingesetzt. Bei einem weiteren EIA wurde ein durch Immunadsorption gereinigter Kaninchen-anti-human-CRP Antikörper (Sigma) als Fangantikörper verwendet. Dieser EIA wurde als indirekter Zwei-Seiten-EIA unter Verwendung eines POD markierten Anti-Spezies-Antikörper durchgeführt.

Der Aufbau der EIA ist schematisch in Abb.2 dargestellt.

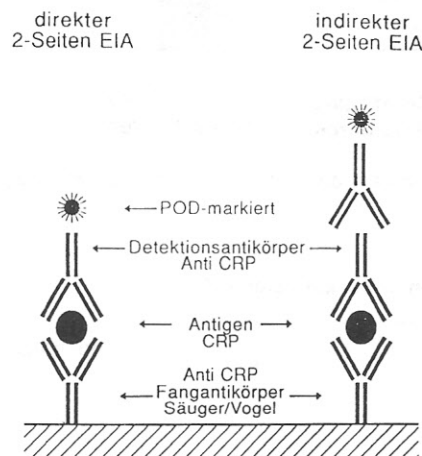


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des direkten bzw. indirekten Zwei-Seiten-EIA zur Bestimmung von CRP im Serum.

2.6 Testung von Seren

Mit dem beschriebenen EIA bzw. Latexagglutinationstest wurden 70 Humansenen mit bekanntem RF-Gehalt auf CRP untersucht. Die Proben wurden vom Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Rheumatologie, des Universitätsklinikums Charité, Berlin, bereitgestellt. Der RF-Gehalt, d.h. IgM-RF, wurde durch Latexagglutination (Immtect) und EIA unter Verwendung von humanem IgG bestimmt. Beim Latextest kam es bei Proben mit RF-Konzentration > 20 IU/ml zu einer Agglutination. Die Ergebnisse im EIA wurden ab 10 IU/ml angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Latexagglutinationstest

Die Ergebnisse des Latexagglutinationstestes mit aviären und mammären Antikörpern werden im einzelnen in der Tabelle und in Abb.3 dargestellt. Die Agglutination wurde qualitativ als positiv oder negativ beurteilt.

Unterschiede zwischen den Tests traten deutlich bei Seren mit hoher RF-Konzentration auf. Vom „mammären“ Latex-Test wurden 78% der Seren (=50 Seren) als positiv erkannt. Der aviäre Latex-Test führte bei 50% der Seren (=32 Seren) zu einer sichtbaren Agglutination. Im Vergleich zum aviären Test erkannte der mammäre Test 17 RF-positiv Seren auch als CRP-positiv.

Bei RF- und CRP-negativen Seren traten zwischen beiden Testkits kaum Abweichungen in den Ergebnissen auf.

Tabelle: Tabellarische Gegenüberstellung der mit den Latex-Agglutinationstesten (auf der Basis eines aviären bzw. mammären Antikörpers) erzielten Befunde

Mammärer Latex-Test (Schaf-Anti-human-CRP Antikörper)			
	CRP positiv	CRP negativ	
RF positiv	39	6	Σ 45
RF negativ	11	8	Σ 19
	Σ 50	Σ 14	
Aviärer Latex-Test (Huhn-Anti-human-CRP Antikörper)			
	CRP positiv	CRP negativ	
RF positiv	22	23	Σ 45
RF negativ	10	9	Σ 19
	Σ 32	Σ 32	

Von insgesamt 70 untersuchten Sera sind 6 Befunde hier nicht berücksichtigt. Bei diesen Sera blieb die Bestimmung von CRP negativ bei signifikantem RF-Gehalt.

Prozentualer Anteil der in beiden Latex-Systemen positiven Seren

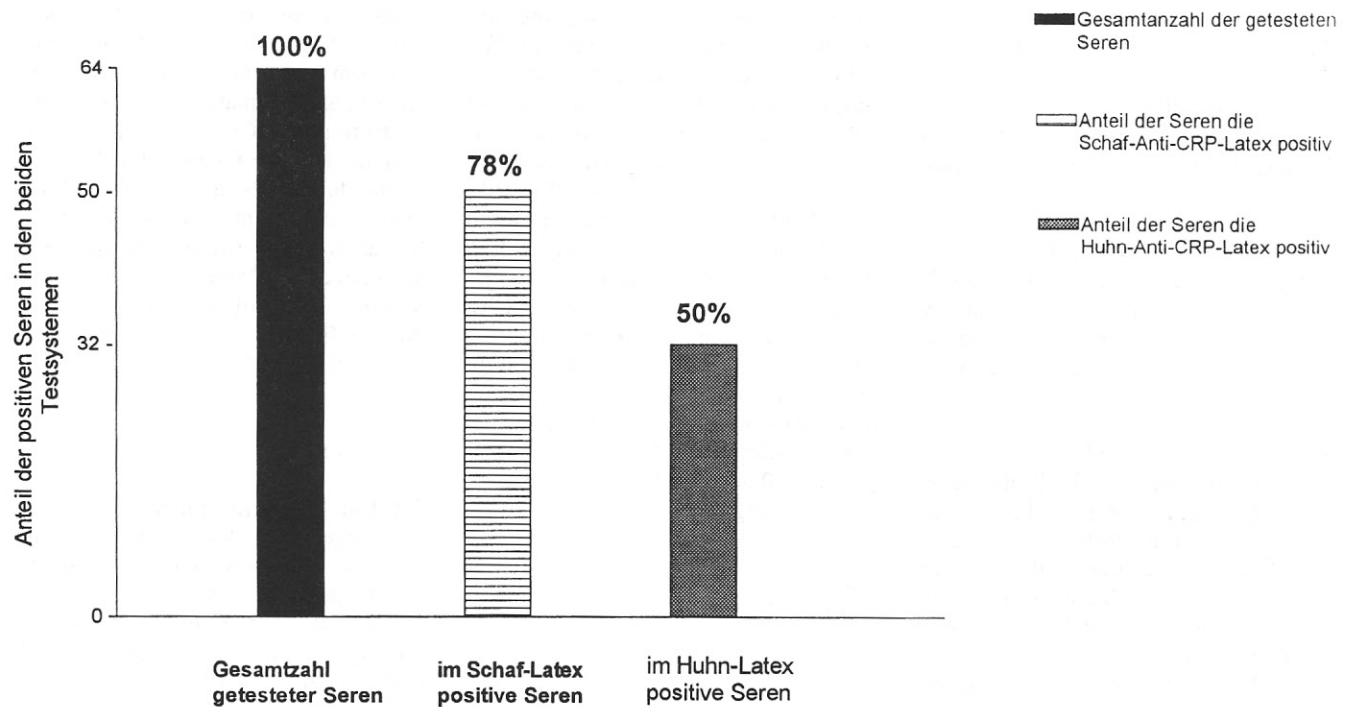
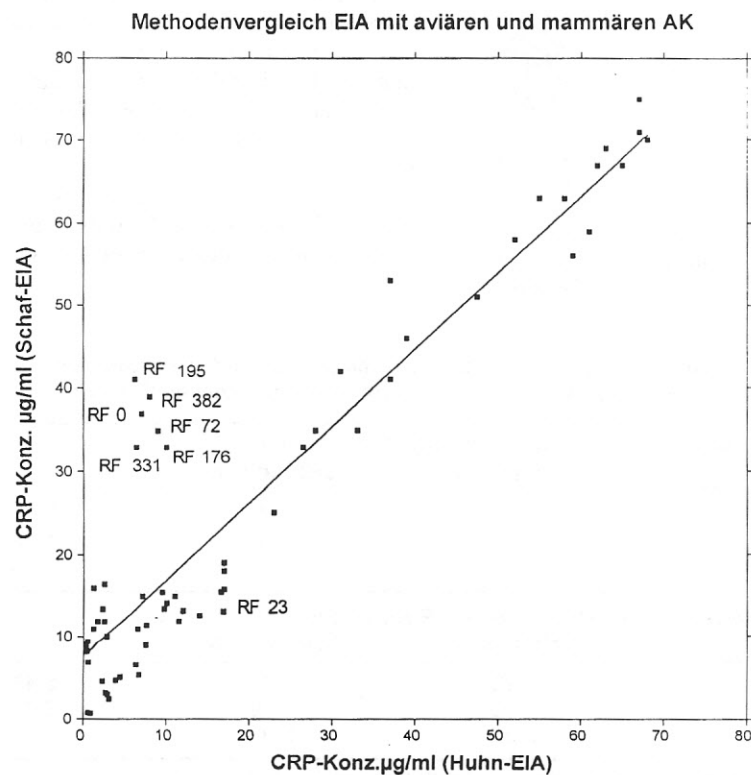


Abbildung 3: Prozentuale Darstellung der Ergebnisse des Latexagglutinationstestes (Verwendung von Huhn- bzw. Schaf-anti-human-CRP Antikörper)



RF IU/ml

Abbildung 4: Lineare Regressionsanalyse, Vergleich der Ergebnisse zwischen den verschiedenen EIA unter Verwendung von aviären und mammären Antikörpern.

3.2 EIA

Es wurden insgesamt 70 Seren bekannten RF-Gehaltes mittels direktem bzw. indirektem EIA unter Verwendung aviärer und mammärer Antikörper getestet. Es gab deutliche Unterschiede zwischen den Assays bei Seren mit hoher RF-Konzentration, wie in Abb. 4 anhand einer Regressionsanalyse (Statistikprogramm „Graph Pad Prism“) dargestellt ist. Diese Seren wiesen mit einer Ausnahme RF-Konzentrationen im Bereich von 72-382 IU/ml auf. Der RF-Gehalt korrelierte nicht mit der Extinktion der Proben im EIA. Von den 70 untersuchten Seren gab es bei 6 Proben, die CRP negativ waren, trotz hoher RF-Werte weder beim aviären noch beim mammären Test eine positive Reaktion (diese Proben sind in den Darstellungen nicht berücksichtigt).

4 Diskussion

Von Larsson et al. wird beschrieben, daß es bei Verwendung aviärer Antikörper zur Bestimmung von Plasma-proteinen z.B. CRP mittels EIA nicht zur Interferenz durch RF kommt. Nach ihrer Aussage kann im EIA schon durch Ersetzen eines mammären Antikörpers durch einen aviären (Fang- oder Detektions-Antikörper, oder beide) die Kreuzreaktion vermieden werden. Als Ursache wird die phylogenetische Differenz zwischen mammärem IgG und aviärem IgY diskutiert, da das Immunsystem beider Wirbeltierklassen in seinen Leistungen und Funktionen teilweise erheblich voneinander abweicht und auch die molekulare Struktur beider Immunglobuline voneinander abweicht.

Unsere Ergebnisse bestätigen diese Aussage insoweit, daß wir deutliche Differenzen zwischen beiden EIA (auf IgY- bzw. IgG-Basis) bei Proben mit hohen RF-Konzentrationen feststellten. Im EIA mit mammären Antikörpern sind deutlich mehr CRP-negative Seren als CRP-positiv erkannt worden.

Martins et al. (1995) kamen bei Untersuchungen von IgM in serologischen Testsystemen zu dem Ergebnis, daß nicht alle RF-positiven Seren eine Interferenz im ELISA verursachen. Unsere Untersuchungsergebnisse decken sich mit dieser Aussage.

Die im mammären EIA auftretenden falsch positiven Reaktionen werden mit großer Wahrscheinlichkeit durch RF der Serumproben verursacht. Es bleibt aber zu vermuten, daß darüber hinaus weitere im Serum vorkommende Faktoren an den beobachteten Interferenzen zumindest beteiligt sein können.

Abschließend kann eingeschätzt werden, daß der Huhn- Antikörper gegen humanes CRP zum Einsatz in den genannten Testsystemen geeignet und in seinen Leistungen mit dem Mammalia-Antikörper vergleichbar ist. Als wesentlicher Vorteil ergibt sich, daß der Einsatz des aviären Antikörpers zu einer deutlichen Reduzierung der falsch positiven Reaktionen führt.

Literatur

- Bürger, W., Schade, R., Hirschelmann, R. (1987). The rat C-reactive protein-isolation and response to experimental inflammation and tissue damage. *Agents and Actions* 21, 93-97.
- Claus, D. R., Osmand, A. P. und Gewurz, H. (1976). Radioimmunoassay of human C-reactive protein and levels in normal sera. *J. Lab. Clin. Med.* 87, 120-125.
- Jensenius, J. C., Andersen, I., Hau, J., Cronne, M. and Koch C. (1981). Eggs: Conveniently packaged antibodies. Methods for purification of egg yolk IgG. *J. Immunol. Methods* 46, 63-68.
- Larsson, A. and Sjöquist, J. (1990): Chicken IgY: Utilizing the evolutionary difference. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* 13, 199-201.
- Larsson, A., Karlsson-Parra, A. und Sjöquist, J. (1991). Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin. Chem.* 37, 411-414.
- Hager, H. (1974). U. S. Pat. 3857931.
- Hamilton, R. G. (1989). Rheumatoid factor interference in immunological methods. In F. Shakib (ed.), *Autoantibodies to Immunoglobulins. Monography Allergy Vol. 26* (27-44). Basel: Karger.
- Martins, T. B., Jaskowski, D., Mouritsen, D. L. and Hill, H. R. (1995). An evaluation of the effectiveness of three immunoglobulin G (IgG) removal procedures for routine IgM serological testing. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 98-103.
- Montagne, P., Laroche, P., Cuilliere, M. L., Varcin, P. Pau, B. and Duheille, J. (1992). Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay for human C-reactive protein. *J. Clin. Lab. Analysis* 6, 24-29.
- Müller, W., Mierau, R. and Wohltmann, D. (1985). Interference of IgM rheumatoid factor with nephelometric C-reactive protein determination. *J. Immunol. Methods* 80, 77-90.
- Pontet, M., Engler, R. and Jayle, M. F. (1977). One step preparation of both human C-reactive protein and Clt. *FEBS Letters* 88, 172-175.
- Porstmann, T. und Porstmann, B. (1991). Enzymimmunoassay. In H. Friemel (Hrsg.), *Immunologische Arbeitsmethoden* (135-188). Jena: Gustav Fischer Verlag.

Danksagung

Die Arbeit wurde durch Mittel der Erna-Graf-Stiftung für Tierschutz gefördert. Wir danken dem Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Rheumaklinik, des Universitätsklinikums Charité für die Bereitstellung der Serumproben.

Korrespondenzadresse

Antje Rieger
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universitätsklinikum Charité
Humboldt-Universität
Dorotheenstr. 94
D-10117 Berlin