

Kurzmitteilung

Bestimmung der IgG-Subklassen mit einem kommerziellen ELISA-KIT.

Vergleich der Referenzbereiche zwischen RID und ELISA

Estimation of IgG Subclasses with a Commercial ELISA-KIT.
Comparison of Reference Ranges between RID and ELISA

S. Zielen, P. Ahrens, D. Hofmann

Einleitung

Die Untersuchung der IgG-Subklassen entwickelt sich zur Routinediagnostik bei Patienten mit chronischen pulmonalen Erkrankungen (1, 2). Der häufigste Befund bei einem IgG2-Mangel sind rezidivierende Infektionen der tiefen Atemwege (3). Die Diagnose eines IgG-Subklassenmangels wird erschwert durch unterschiedliche Referenzbereichsangaben, besonders für die Subklassen IgG3 und IgG4 (4). Diese Unterschiede beruhen nur zum Teil auf der biologischen Variation der Referenzkollektive, zumeist sind sie auf die Methodik sowie die verwandten Antikörper (polyklonal versus monoklonal) zurückzuführen (5, 6). Somit ergibt sich die Notwendigkeit, für jede Technik eigene Referenzbereiche zu ermitteln.

Neue kommerziell erhältliche ELISA-Kits ermöglichen rascher und wesentlich sensitiver als die radiale Immundiffusion (RID) die Bestimmung der IgG-Subklassen. Die vorliegende Arbeit vergleicht die mit dem ELISA-Kit der Firma Binding Site erhaltenen Referenzbereiche mit denen der RID.

Patienten und Methodik

Bei 133 gesunden deutschen Kindern (87 männliche, 46 weibliche) im Alter von 3 Monaten bis 13 Jahren wurden vor chirurgischen Wahleingriffen die IgG-Subklassen mit der RID und einem ELISA-KIT bestimmt. Der ELISA-KIT der Firma Binding Site, Birmingham/UK (Vertrieb durch Labor Diagnostika GmbH/Heiden), besteht aus monoklonalen Antikörpern mit charakterisierter Spezifität (7). Die RID wurde nach Mancini (8) mit polyklonalen Schaf-Antikörpern durchgeführt, die vom Holländischen Roten Kreuz (Janssen Pharmaceutika, Beerse/Belgien) hergestellt werden. Diese Methode ist in unserem Labor etabliert, und die entsprechenden Referenzbereiche wurden bereits publiziert (9). Zur Standardisierung wurde das WHO-Serum 67/97 benutzt. Die Interassayvarianz der RID liegt für die einzelnen Subklassen bei 6,4% IgG1, 6,9% IgG2, 5,1% IgG3 und 5,5% IgG4, für den ELISA bei 8% IgG1, 7,1% IgG2, 10,1% IgG3 und 9,7% IgG4. Als Gütemaß für die Korrelation wurde der Produkt-Momentkorrelationskoeffizient (R) ermittelt und in der ranggeordneten Stichprobe für jede Altersgruppe die Perzentilenwerte bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Analyse der Mittelwerte (Tab. 1) zeigt bei den IgG-Subklassen in der Reihenfolge IgG2 > IgG1 > IgG4 einen altersabhängigen Anstieg. Das IgG3 zeigt keine Altersabhängigkeit, und IgG3-Spiegel unter 5 mg/dl werden bei allen Altersklassen als erniedrigt angesehen. Die IgG1- und IgG4-Spiegel erreichen in der Altersgruppe der 7- bis 10jährigen den Erwachsenenwert. Die IgG2-Werte steigen kontinuierlich, und der Erwachsenenwert wird in der Pubertät erreicht. Unsere Ergebnisse stimmen bis auf höhere IgG1-Spiegel weitgehend mit früheren Untersuchungen überein (10, 11).

Die prozentuale Verteilung der IgG-Subklassen am Gesamt-IgG lag bei den Kindern bei 75% IgG1, 17,6% IgG2, 3,5% IgG3 und 3,7% IgG4. Diese Verteilung zeigt, daß es auch bei gesunden Kindern zu einer Ausreifung des Immunsystems kommt mit einer relativen Zunahme von IgG2, da der Erwachsenenanteil des IgG2 bei 25 bis 28% liegt (1, 4).

Tab. 1: Referenzbereiche der Altersgruppen im ELISA, Mittelwerte und Spannweiten (mg/dl).

Altergruppe (Jahre)	n	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
3 Mon.-1	19	304 131-708	63,8 30-320	24,5 5-62	5,6 0,2-26
1-2	19	484 189-960	96,8 21-252	27,5 13-87	8,2 0,1-75
2-3	19	530 312-864	108 41-218	33 6-79	15,8 0,2-49
3-5	22	708 261-1080	184 51-518	37,5 7-87	42,6 1-199
5-7	21	682 366-1200	174 67-322	35,7 11-72	38 3-108
7-10	18	873 546-1176	201 61-435	27,9 9-74	50,8 6-176
10-13	15	920 570-1184	234 74-615	26,6 5-53	66,4 3-315

In der ranggeordneten Stichprobe (n = 20) entspricht die Spannweite der 5. und 95. Perzentile

Der Methodenvergleich (Abb. 1) zeigt für das IgG4 eine gute, für die anderen Subklassen eine mäßige Korrelation. Im Einzelfall fanden sich Abweichungen um den Faktor 2,5. Die Diskrepanz zwischen beiden Methoden ist in der Literatur mehrfach belegt und wird auch in unserer Untersuchung (siehe Vergleich der 5. Perzentilen, Abb. 2) deutlich. Es fällt auf, daß die 5. Perzentile, gemessen mit dem ELISA, im allgemeinen unterhalb der RID liegt. Verschiedene Gründe werden als Ursache diskutiert. Polyklonale Antikörper richten sich gegen unterschiedliche Epitope des gleichen Antigens und unterscheiden sich in der Avidität und Konzentration. Hieraus resultieren Kreuzreaktivität und Änderung der Spezifität, so daß der Gehalt der IgG-Subklassen möglicherweise zu hoch bestimmt wird (5, 6). Monoklonale Antikörper sind strukturell identisch, erkennen aber wegen ihrer Epitoprestriktion bestimmte Allotypen der IgG-Subklassen nicht, so daß die Subklassenbestimmung quantitativ zu niedrig ausfallen kann (12). Diese methodischen Unterschiede erklären die

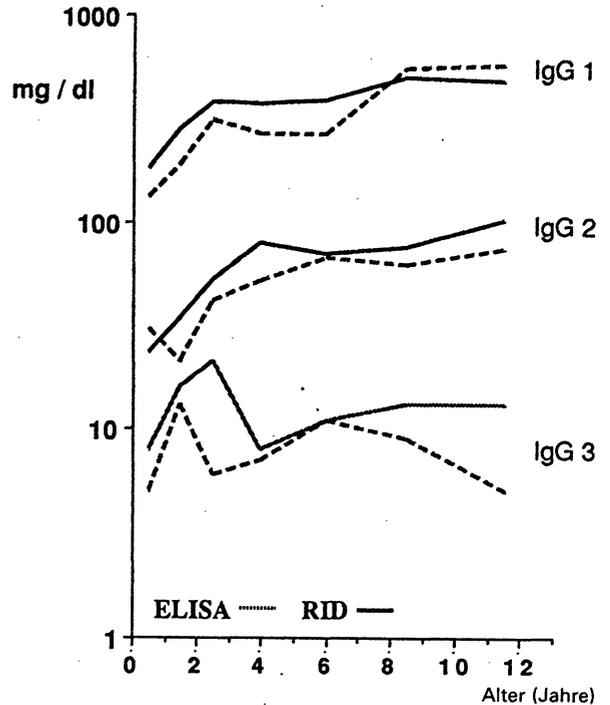


Abb. 2: 5. Perzentile der Referenzwerte im Vergleich

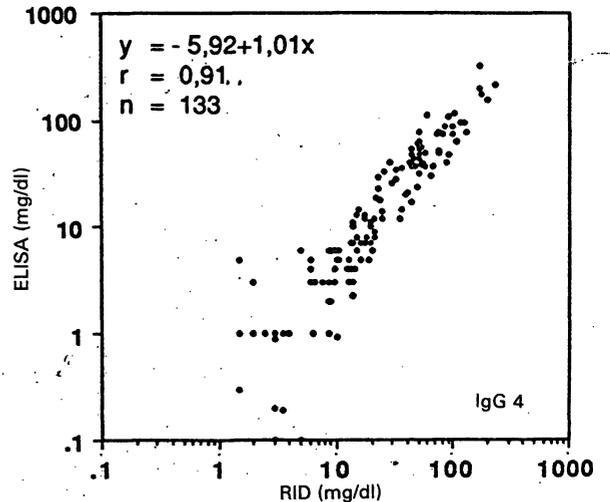
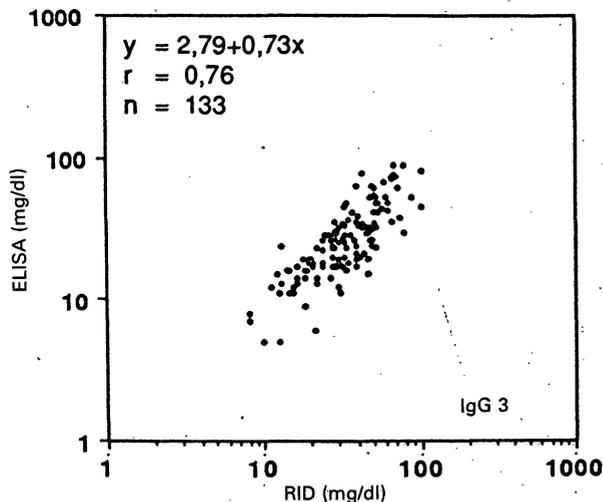
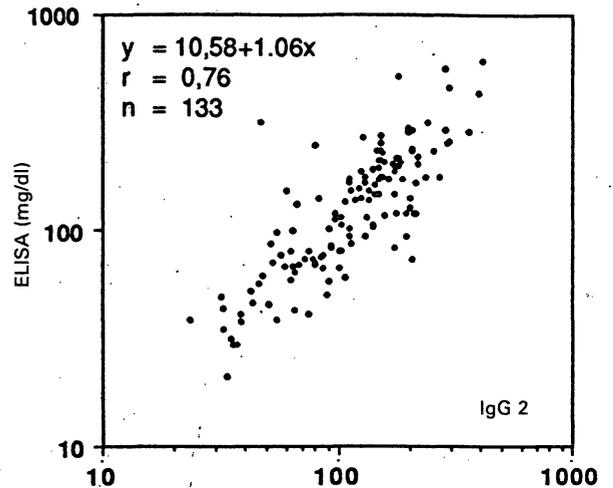
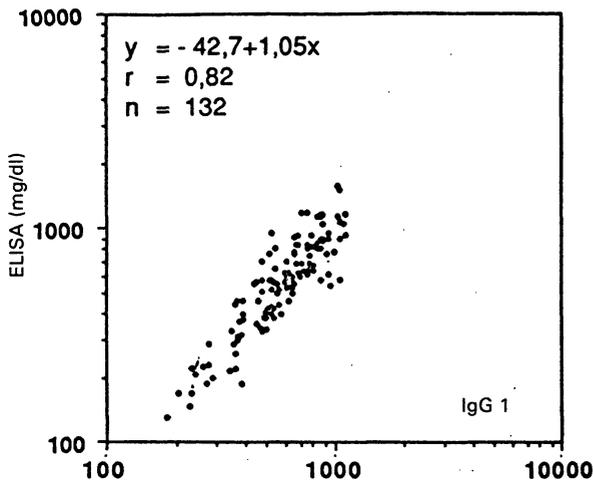


Abb. 1: Methodenvergleich zwischen ELISA und RID

unvollständige Übereinstimmung der Ergebnisse und die Notwendigkeit eigene Referenzwerte zu erstellen. Die vorliegenden Referenzbereiche des ELISA-Kits ermöglichen eine altersbezogene Analyse der IgG-Subklassenkonzentration von deutschen Kindern. Ein selektiver Subklassenmangel liegt vor Erniedrigung einer oder mehrerer Subklassen unterhalb der altersentsprechenden 5. Perzentile.

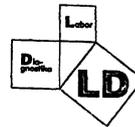
Schrifttum:

1. HEINER, D. C.: Significance of immunoglobulin-G-subclasses. *Am. J. Med.* **30**, 1-6 (1984).
2. ZIELEN, S., WÖNNE, R., GEREIN, V., KOTITSCHKE, R., ZEIDLER, R., HOFMANN, D.: Klinische Relevanz der Immunglobulin-Subklassen bei Kindern mit chronisch pulmonalen Erkrankungen. *Monatsschr. Kinderheilkd.* **135**, 775-779 (1987).
3. HANSON, L. A., SÖDERSTRÖM, R., AVANZINI, A., BENGTSOON, U., BJÖRKANDER, J., SÖDERSTRÖM, T.: Immunglobulin subclass deficiency. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 17-21 (1988).
4. LEE, S. I., HEINER, D. C., WARA, D.: Development of serum IgG subclass levels in children. *Monogr. Allergy* **19**, 108-121 (1986).
5. PLEBANI, A., UGAZIO, A. G., AVANZINI, M. A., MASSIMI, P., ZONTA, L., MONAFO, V., BURGIO, G. R.: Serum IgG subclass concentrations in healthy subjects at different age: age normal percentile charts. *Eur. J. Pediatr.* **149**, 164-167 (1989).
6. FERRANTE, A., BEARD, L. J.: IgG subclass assays with polyclonal antisera and monoclonal antibodies. *Monogr. Allergy* **23**, 61-72 (1988).
7. JEFFERIS, R., REIMER, C., SKRAVIL, F., et al.: Evaluation of monoclonal antibodies heaving specificity for human IgG subclasses: results of an IVIS/WHO collaborative study. *Immunology Letters* **10**, 223-252 (1985).
8. MANCINI, G., CARBONARA, A. O., Hereman, I. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**, 235-254 (1965).
9. ZIELEN, S., AHRENS, P., KOTITSCHKE, R., RIEBARTSCH, C., BAUSCHER, P., HOFMANN, D.: IgG-Subklassenspiegel bei gesunden Kindern. *Monatsschr. Kinderheilkd.* **138**, 377-380 (1990).
10. SCHUR, P. H., ROSEN, F., NORMAN, M. E.: Immunglobulin subclasses in normal children. *Pediatr. Res.* **13**, 181-183 (1979).
11. VAN DER GIESSEN, M., ROSSOUW, E., ALGRA VAN VEEN, T., VAN LONGHEM, E., ZEGERS, B. J. M., SANDER, P. C.: Quantification of IgG subclasses in sera of normal adults and healthy children between 4 and 12 years of age. *Clin. Exp. Immunol.* **21**, 501-509 (1975).
12. OXELIUS, V. A.: Antigenic variants of human IgG subclasses; restriction of murine monoclonal IgG subclass antisera. *Scand. J. Immunol.* **25**, 169-174 (1987).

Anschrift für die Verfasser:

Dr. med. S. Zielen
 Zentrum der Kinderheilkunde des
 Universitätsklinikums Frankfurt/M.
 Abtlg. f. Allgemeine Pädiatrie II
 Theodor-Stern-Kai 7
 6000 Frankfurt am Main 70

□



LD Labor Diagnostika
 Industriestr. 12
 4284 Heiden
 Tel. (0 28 67) 80 83
 Fax (0 28 67) 84 77

Auszug aus dem Lieferprogramm

THE BINDING SITE
University of Birmingham
Research Institute

○ **IgG Subklassen**

ELISA

Radiale Immundiffusion (RID)
 Single Dilution:
 alle 4 Subklassen
 aus einer Verdünnung

Monoklonale und polyklonale
 Testkits – Meßbereiche
 normal und low level.

in Vorbereitung:
 Turbo RID
 mit Latexverstärktem
 Diffusionsgel:

- kürzere Inkubation
- erhöhte Empfindlichkeit für niedrige Meßbereiche.

○ **Funktionelle Immunglobuline (ELISA)**

○ **Reagenzien für die Immunfixation einschließlich IgG Subklassen.**

○ **β2 Mikroglobulin (Turbo RID)**

○ **sCD 23 (ELISA)**

Wir senden Ihnen gern weitere Informationen.

LD Labor Diagnostika
 Industriestraße 12 · 4284 Heiden
 Tel. (02867) 8083 · FAX (02867) 8477