Zeitschrift: Acta Tropica

Herausgeber: Schweizerisches Tropeninstitut (Basel)

Band: 29 (1972)

Heft: 2

Artikel: Miscellanea : Indirekte Immunofluoreszenzmethode bei Schlafkrankheit ("T. rhodesiense") mit "Trypanosoma brucei" als Antigen

Autor: Suter-Kopp, Vlasta / Fricker, Françoise

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-311798

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Indirekte Immunofluoreszenzmethode bei Schlafkrankheit *(T. rhodesiense)* mit *Trypanosoma brucei* als Antigen

VLASTA SUTER-KOPP und FRANÇOISE FRICKER

Schweizerisches Tropeninstitut Basel

Abstract

15 sera of patients suffering from sleeping sickness *(T. rhodesiense)* were tested with antigens *T. rhodesiense* Stabilate E.A.T.R.O. 1293 and *T. brucei* strain Lab. 110, STI B 30. Both antigens showed positive reactions with 10 sera using the indirect immunofluorescence method. The specificity of this method is discussed.

Einleitung

Die indirekte Immunofluoreszenzmethode (IFM) wird von mehreren Autoren für diagnostische und epidemiologische Untersuchungen der afrikanischen (BAILEY et al., 1967; COURTOIS & BIDEAU, 1966; LUCASSE, 1970; MAYENDE & OGADA, 1969; ONYANGO, 1967; ONYANGO & MAYENDE, 1967; RAADT et al., 1966; ROBERTS et al., 1970; SADUN et al., 1963; WÉRY et al., 1970a; WÉRY et al., 1970b) und amerikanischen (FIFE & MUSCHEL, 1959; SADUN et al., 1963; SOUZA & CAMARGO, 1966) Trypanosomiasen verwendet. Antikörper können mit der IFM entweder im Serum oder im trockenen Blut auf Filterpapier festgestellt werden. Die letzte Technik, die sich besonders für die Tropen eignet, wurde nach der Methode ANDERSON et al. (1961) in die Immunodiagnose der Schlafkrankheit eingeführt (BAILEY et al., 1967) und vor allem als «Screening-Test» bei Untersuchungen einer größeren Zahl von Bewohnern endemischer Gebiete benützt (ONYANGO, 1967; ONYANGO & MAYENDE, 1967; ROBERTS et al., 1970; WÉRY et al., 1970b). Wie bei serologischen Untersuchungen mit der IFM wurden Antikörper auch im Liquor von Patienten mit afrikanischer Schlafkrankheit festgestellt (LUCASSE, 1964).

Auch Immunoglobulin-Bestimmungen wurden im Serum und Liquor vorgenommen (COURTOIS & BIDEAU, 1966; DEBROISE et al., 1968; LUMSDEN, 1965; MANNWEILER et al., 1969; MATTERN, 1964; RAADT et al., 1966; WÉRY et al., 1970b). Von diagnostischem Wert erwies sich, besonders im Liquor, eine Erhöhung der IgM (DEBROISE et al., 1968; MATTERN, 1964). Manche Autoren (COURTOIS & BIDEAU, 1966; WÉRY et al., 1970b) vertreten die Ansicht, einem Nachweis von Antikörpern mit der IFM komme höhere Spezifität zu als einer erhöhten Konzentration der IgM, da eine solche auch im Serum von Patienten mit andern Krankheiten nachweisbar ist (COURTOIS & BIDEAU, 1966; RAADT et al., 1966).

Kreuzreaktionen mit der IFM zwischen verschiedenen Trypanosomenarten sind bekannt und werden für praktische immunologische Untersuchungen benützt. So beobachtete SADUN et al. (1963) bei der Untersuchung von Patientenseren mit afrikanischen und amerikanischen Trypanosomiasen Kreuzreaktionen zwischen *T. gambiense, T. rhodesiense, T. cruzi* und *T. lewisi.* Sie wollten deshalb *T. lewisi,* eine für den Menschen nicht infektiöse Spezies, in die Immunodiagnose der Schlafkrankheit einführen. Weitere Versuche mit Kreuzreaktionen führten WILSON et al. (1966) mit *T. brucei, T. rhodesiense, T. congolense* und *T. vivax* durch. Sie prüften das Serum eines mit *T. brucei* infizierten Rindes mit den Antigenen der erwähnten Arten mehrmals. Sie fanden keinen Unterschied in den Antikörper-Titern gegen *T. brucei* und *T. rhodesiense;* dagegen waren die Titer mit den Antigenen *T. congolense* und *T. vivax* wesentlich niedriger. MAYENDE & OGADA (1969)

berichteten ebenfalls über die Möglichkeit, *T. brucei*-Antigen für die immunologische Untersuchung der *T. rhodesiense*-Schlafkrankheit einzuführen, wobei diese Autoren auf Filterpapier getrocknetes Blut benützten. Mit Erfolg verwendeten WÉRY et al. (1970a; 1970b) *T. brucei*-Antigen in der Immunodiagnose der *T. gambiense*-Schlafkrankheit und empfehlen dieses Antigen als weniger gefährlich als das homologe Antigen zu diesem Zwecke. Dagegen beschrieben SCHINDLER & SACHS (1970), daß die Differenzierung von *T. brucei* und *T. congolense* mit der IFM möglich sei.

Die Spezifität der IFM bei Trypanosomiasis wurde von verschiedenen Autoren mehrmals geprüft. Es wurden relativ wenig falsch-positive oder zweifelhafte Reaktionen mit Seren von Patienten beobachtet, die an anderen Krankheiten, auch Tropenkrankheiten (SADUN et al., 1963; WÉRY et al., 1970a) litten.

Bei 130 Kontrollpersonen fanden BAILEY et al. (1967) falsch-positive Resultate mit Antigen von *T. rhodesiense* bei 6 %, und RAADT et al. (1966) fanden solche bei 6,5 % von 106 Personen. ONYANGO (1967) stellte in einem Gebiet, in welchem ein Fall *T. rhodesiense*-Schlafkrankheit entdeckt worden war, bei 19 von 650 untersuchten Personen IF Antikörper gegen *T. rhodesiense* fest. Selbst bei einer gründlichen Untersuchung konnten weder Trypanosomen noch klinische Symptome bei den Betreffenden gefunden werden. Ähnliche Resultate erhielten ONYANGO & MAYENDE (1967) auch in einem Gebiet mit *T. gambiense*. IF-Positivität wurde bei 56 von 1424 serologisch untersuchten Personen beobachtet; dies bedeutete, daß über 1 % der Menschen Antikörper gegen *T. gambiense,* jedoch weder Trypanosomen noch klinische Symptome aufwiesen. ROBERT et al. (1970) fanden in einem *T. rhodesiense*-endemischen Gebiet bei 67 klinisch und parasitologisch unauffälligen Personen 14 positive Seren. Dagegen prüften WÉRY et al. (1970b) 1170 Menschen in einem *T. gambiense*-endemischen Gebiet und fanden 22 davon (2 %) Immunofluoreszenz positiv. Diese Schlafkrankheits-Verdächtigen wurden mehrmals während drei Monaten untersucht, und in 17 Fällen gelang es Trypanosomen nachzuweisen.

Wir haben uns mit der Frage der Kreuzreaktion zwischen *T. rhodesiense* und *T. brucei* schon früher (1970, unveröffentlicht) in Tierversuchen befaßt und eine Kreuzreaktion dieser beiden Trypanosomen-Arten feststellen können. In der vorliegenden Arbeit prüften wir Seren von *T. rhodesiense*-Patienten sowohl mit *T. rhodesiense*- wie mit *T. brucei*-Antigenen.

Material und Methoden

Patientenseren: Es wurden Seren von an Schlafkrankheit *(T. rhodesiense)* erkrankten Afrikanern im Alter von 14 bis 60 Jahren beiderlei Geschlechtes, aus dem E.A.T.R.O.-Spital in Tororo, Uganda, untersucht. Von 15 wiesen 14 Patienten klinische Symptome auf. Beim 15., einem symptomlosen Mann, wurden Trypanosomen anläßlich einer Präventiv-Untersuchung im Blut gefunden. Die Seren für die IF-Untersuchung wurden bei allen Patienten vor Beginn der Therapie gewonnen. Sie wurden bis zu ihrer Verwendung bei –20 °C aufbewahrt. Zu Vergleichszwecken wurden die Seren von 10 Afrikanern mit *Onchocerca volvulus*-Filariose und diejenigen von 10 gesunden Europäern getestet.

Antigene: Als Antigene dienten Blutausstriche von Mäusen NMRI am 3. Tag nach der Infektion mit *T. rhodesiense,* Stabilat E.A.T.R.O. 1293 und *T. brucei*-Stamm, Lab. 110, Stabilat STI B 30. Die Objektträger mit dem Antigen wurden in dünnes Papier eingepackt, in Plastikbeutel eingeschmolzen und bei –20 °C gelagert.

Indirekte Immunofluoreszenzmethode nach Coons: Wir verwendeten im wesentlichen das Verfahren von AMBROISE-THOMAS (1969). In einigen Vorversuchen haben wir verschiedene Fixierungsmittel von Blutausstrichen, z. B. 0,01 % HCl oder

0,5–10 % Formalin nach WILLIAMS et al. (1963), verglichen, stellten jedoch fest, daß eine Fixierung mit Aceton (AMBROISE-THOMAS, 1969) bessere Resultate ergab.

Für den Test wurden die Blutausstriche auf silikonisierten Objektträgern mit einem Ventilator bei Zimmertemperatur getrocknet und 10 min im Aceton-Bad fixiert. Dann zeichnete man mit einem Holzstäbchen kleine Kreise (⌀ 6 mm) auf den Objektträger, wo Serum tropfenweise aufgetragen wurde. Mit Phosphatpuffer pH 7.2 wurden Serumverdünnungen von 1/10 bis 1/1280 zubereitet, auf Antigen-Objektträger gebracht und 30 min bei 37 °C in feuchter Kammer belassen. Nach Waschen (10 min) mit Puffer-Lösung wurde der Antigen-Antikörper-Komplex mit einem Tropfen 1/40 verdünnten Konjugates (mit Fluoresceinisothiocyanat gekoppeltes Anti-Menschen-Globulin Institut Pasteur, Paris) überschichtet. Eine Gegenfärbung der Präparate wurde mit Evans-Blau in einer Verdünnung 1 : 10 000 durchgeführt. Evans-Blau diente zugleich zur Verdünnung des Konjugates. Nach erneutem Inkubieren und Waschen wurden die Objektträger getrocknet und mit gepuffertem Glyzerin eingedeckt.

Die Resultate wurden im Blaulicht des Fluoreszenzmikroskops Wild M-20 (Quecksilberbrenner HBO 200, Erregerfilter BG 12/4 mm, Sperrfilter OG 1/2 mm) ausgewertet. Als Antikörpertiter wurde der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung genommen, die mit dem Antigen noch eine brillante Fluoreszenz ergab.

Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse des parasitologischen Nachweises, der Immunofluoreszenz und weiterer Untersuchungen aufgeführt. Wie daraus hervorgeht, wurden bei 10 von 15 Patienten Antikörper festgestellt, und zwar in einer Serumverdünnung von 1/10 bis 1/640, dies sowohl mit Antigen *T. rhodesiense* als auch mit dem Antigen *T. brucei*. Wir konnten weder in den Antikörpertitern noch in der Intensität der Fluoreszenz wesentliche Unterschiede beobachten.

Die 10 Vergleichsseren von Afrikanern mit *Onchocerca volvulus*-Infektionen sowie die Seren der 10 gesunden Europäer ergaben allesamt, mit beiden Antigenen, bei einer Verdünnung von 1/10, negative Resultate.

Unsere Untersuchungen mit der IFM zielten eher auf einen Vergleich der Antigeneigenschaften von *T. rhodesiense* und *T. brucei* ab als auf ein Erfassen der Serumantikörper in Fällen parasitologisch nachweisbarer *T. rhodesiense*-Infektion. Unsere Ergebnisse mit menschlichen Seren bestätigen unsere früheren Versuche an Labortieren. Sie entsprechen auch der bereits erwähnten Arbeit von WILSON et al. (1966) und unterstützen die Ansicht von MAYENDE & OGADA (1969). Obschon Kreuzreaktionen auch mit weiteren Trypanosomen-Arten nachgewiesen wurden (SADUN et al., 1963; WILSON et al., 1966), scheint es doch, daß die Kreuzreaktion unter Arten derselben Gruppe wie *T. brucei, T. rhodesiense* und *T. gambiense,* wesentlich stärker ist und die Immunofluoreszenz deutlicher zum Ausdruck kommt als bei Trypanosomen unterschiedlicher Untergattungen.

Falsch-positive Resultate konnten wir bei Vergleichsseren keine feststellen. Dies entspricht der Ansicht anderer Autoren (SADUN et al., 1963; WÉRY et al., 1970a), nach welcher solche verhältnismäßig selten sind. Nach ROBERTS et al. (1970) stellt sich die Frage, ob es sich bei falsch-positiven Ergebnissen in endemischen Gebieten nicht eher um eine partielle Immunität gegen Trypanosomen handle.

Zur Bedeutung der IFM in der Immunodiagnose der Schlafkrankheit *(T. rhodesiense)* können wir mit Rücksicht auf die niedrige Anzahl unserer Fälle nichts Endgültiges aussagen. Wir verzichten auf einen Vergleich der Antikörpertiter und der klinischen und übrigen Befunde. Die Ergebnisse anderer Autoren mit *T. rhodesiense*-Antigen sind in dieser Beziehung uneinheitlich. SADUN et al. (1963) fanden IF-Antikörper in 60 von 82 Fällen und BAILEY et al. (1963) in 92 % von 46 *T. rhode-*

Tabelle 1. Resultate der Untersuchungen von 15 Afrikanern mit Schlafkrankheit *(Trypanosoma rhodesiense)*

Nr. der Patienten	Parasitologischer Nachweis von Trypanosomen in			Untersuchung des Liquors		IF Antikörpertiter (reziprok.) auf Antigene		Bemerkungen
	Blut	Lymphknoten	Liquor	Zellen/ mm³	Protein* mg %	*T. rhodesiense*	*T. brucei*	
479	+	0	0	–	–	40	80	4. Rückfall
504	–	–	+	31	25	320	80	
511	+	0	0	5	15	40	40	
593	+	+	0	2	16	negativ	negativ	
631	+	+	+	4	18	negativ	negativ	
640	+	+	0	2	8	negativ	negativ	
674	+	+	+	11	25	negativ	negativ	
680	+	+	+	19	40	negativ	negativ	
684	0	+	+	32	20	10	20	
691	+	+	0	7	28	40	20	
784	+	+	+	75	50	80	80	
904	0	0	+	126	45	160	160	
921	+	–	+	6	20	640	640	
922	0	0	+	414	71	160	160	† nach 5 Tagen
924	+	0	0	39	25	20	40	ohne Sympt.

– Nicht untersucht.
* Total Eiweiß nach der Sicard-Cantaloube-Methode.

siense-Patienten. Dagegen erwähnen RAADT et al. (1966) IF-Positivität nur in 58% von 67 *T. rhodesiense*-Patienten.

Bei *T. gambiense*-Schlafkrankheit beobachteten WÉRY et al. (1970b) bei 135 Neuerkrankungen neben 133 positiven nur 2 Fälle zweifelhafter IF-Positivität.

Die Frage der praktischen Bedeutung der IFM in der Diagnose der Schlafkrankheit *(T. rhodesiense)* bleibt vorläufig offen. Der Umstand aber, daß die Immunodiagnose der *T. rhodesiense*-Schlafkrankheit mit *T. brucei*-Antigen gelingt, ermutigt zu weiteren Untersuchungen in dieser Richtung.

Der E.A.T.R.O. in Tororo, Uganda, danken wir herzlich für die Überlassung der Patientenseren und der nötigen Unterlagen.

Literatur

AMBROISE-THOMAS, P. (1969). Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immuno-fluorescence. – Thèse, Lyon.

ANDERSON, R. I., SADUN, E. H. & WILLIAMS, J. S. (1961). A technique for the use of minute amounts of dried blood in the fluorescent antibody test for schistosomiasis. – Exp. Parasit. *11*, 111–116.

BAILEY, N. M., CUNNINGHAM, M. P. & KIMBER, C. D. (1967). The indirect fluorescent antibody technique applied to dried blood, for the use as a screening test in the diagnosis of human trypanosomiasis in Africa. – Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *61*, 696–700.

COURTOIS, D. & BIDEAU, J. (1966). L'immunofluorescence appliquée au diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine. Valeur comparative avec le titrage de l'immunoglobuline IgM. – Bull. Soc. Path. exot. *59,* 809–817.

DEBROISE, A., DEBROISE-BALLEREAU, C., SATGE, P. & REY, M. (1968). La trypanosomiase du jeune enfant. – Arch. franç. Pédiat. *25,* 703–720.

FIFE, E. H. & MUSCHEL, L. H. (1959). Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. – Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), *101,* 540–543.

LUCASSE, C. (1964). Fluorescent antibody test as applied to cerebrospinal fluid in human sleeping sickness. – Bull. Soc. Path. exot. *57,* 283–291.

LUCASSE, C. (1970). Fluorescent antibody test applied to serum of patients with Gambian sleeping sickness. – Trop. geogr. Med. *22,* 227–236.

LUMSDEN, W. H. (1965). The estimation of IgM immunoglobulin in serum in the diagnosis of human trypanosomiasis. – WHO/Tryps/Inf/1.

MANNWEILER, E., GEISTER, R. & KRAMPITZ, H. E. (1969). Immunoglobulin-Konzentrationen in Seren ostafrikanischer Schlafkranker, Lepröser und Gesunder. – Z. Tropenmed. Parasit. *20,* 123–131.

MATTERN, P. (1964). Technique et intérêt épidémiologique du diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine par la recherche de la β2-macroglobuline dans le sang et dans le L.C.-R. – Ann. Inst. Pasteur, *107,* 415–421.

MAYENDE, P. & OGADA, T. (1969). Replacement of *T. rhodesiense* with *T. brucei* as antigen in I.F.T. – E.A.T.R.O. ann. Report, p. 29.

ONYANGO, R. J. (1967). Human trypanosomiasis discovered in Teso District, Uganda. – E.A.T.R.O. ann. Report, p. 43.

ONYANGO, R. J. & MAYENDE, P. (1967). Serological survey of the population living in an old epidemic focus of *T. gambiense* in Uganda. – E.A.T.R.O. ann. Report, p. 43–44.

RAADT, P., HART, G., GRAINGE, E. B., MBWABI, D. & KWEYAMA. (1966). Serologic tests in *T. rhodesiense* infections. – E.A.T.R.O. ann. Report, p. 39–43.

ROBERTS, C. J., GELFAND, M. & SADUN, E. H. (1970). Possible immunity in man to *Trypanosoma rhodesiense.* Estimation of antibody titre by fluorescent antibody test. – Cent. Afr. J. Med. *16,* 81–83.

SADUN, E. H., DUXBURY, R. E., WILLIAMS, J. S. & ANDERSON, R. I. (1963). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American trypanosomiasis in man. – J. Parasit. *49,* 385–388.

SCHINDLER, R. & SACHS, R. (1970). Serologische Untersuchungen bei Hunden nach einer Infektion mit *Trypanosoma brucei.* – Z. Tropenmed. Parasit. *21,* 339–346.

SOUZA, S. L. & CAMARGO, M. E. (1966). The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American trypanosomiasis serodiagnosis *(T. cruzi).* – Rec. Inst. Med. trop. São Paulo, *8,* 255–258.

WÉRY, M., WÉRY-PASKOFF, S. & VAN WETTERE, P. (1970). The diagnosis of human African trypanosomiasis *(T. gambiense)* by the use of fluorescent antibody test. Standardisation of an easy technique to be used in mass surveys. – Ann. Soc. belge Méd. trop. *50,* 613–634.

WÉRY, M., VAN WETTERE, P., WÉRY-PASKOFF, S., VAN MEIRVENNE, N. & MESATEWA, M. (1970). The diagnosis of human African trypanosomiasis *(T. gambiense)* by the use of the fluorescent antibody test. First results of field application. – Ann. Soc. belge Méd. trop. *50,* 711–730.

WILLIAMS, J. S., DUXBURY, R. E., ANDERSON, R. I. & SADUN, E. H. (1963). Fluorescent antibody reactions in *Trypanosoma rhodesiense* and *T. gambiense* in experimental animals. – J. Parasit. *49,* 380–384.

WILSON, A. J., CUNNINGHAM, M. P. & KIMBER, C. D. (1966). The indirect fluorescent antibody test applied to bovine trypanosomiasis. – E.A.T.R.O. ann. Report, p. 28–29.