Wissenschaft und Fortbildung

Nachweis von Hepatitis-B-Antigen mit Sepharosegel-Säulen

S. Seidl und L. Trautmann

Institut für Immunhämatologie der Universität Frankfurt/Main und Blutspendedienst Hessen

Zusammenfassung:

Die Seren von 3874 Blutspendern wurden mit einem Radioimmunoassay untersucht, bei dem das zum Nachweis erforderliche Anti-HBs an Sepharosegel-Säulen aufgebracht ist. Die damit erzielten Resultate entsprechen denjenigen, die auch mit anderen Radioimmunoassays erhalten wurden. Der wesentliche Vorteil dieses Tests besteht jedoch darin, daß der Untersucher nicht an eine bestimmte Untersuchungszahl gebunden ist, da für jede Untersuchung jeweils eine Säule genommen wird.

Schlüsselwörter:

Hepatitis-B-Antigen — Radioimmunoassay — Blutspender.

Summary:

Sera of 3874 donors were tested using a radioimmunoassay. In this particular technique anti HBs necessary to detect HBsAg is fixed on sepharosegel-columns. The results are comparable to those obtained by other radioimmunoassays. This method is advantageous in so far, as the investigator can test any number of blood specimens because one specimen requires one column.

Key words:

Hepatitis B antigen — Radioimmunoassay — Blood donors.

Zum Nachweis von Hepatitis-B-Antigen (HBsAg) werden heute praktisch nur noch Tests der sog. dritten Generation angewendet. Es handelt sich dabei um Methoden der passiven Haemagglutination, bei denen tierische oder menschliche Erythrozyten mit Anti-HBs beladen sind, so daß sie bei Vorhandensein von HBsAg agglutinieren, oder um Verfahren, die auf dem sandwich'-Prinzip beruhen, wie der Radioimmunoassay (RIA) oder der Enzymimmunoassay (EIA) (1,2,6). Bei den letzteren Methoden wird HBsAg durch Anti-HBs gebunden, das an ein bestimmtes Trägermedium fixiert ist. In einem zweiten Schritt wird beim EIA ein mit Meerrettichperoxydase markiertes Anti-HBs hinzugefügt, beim RIA wird dafür ein mit J^{125} markiertes Anti-HBs verwendet. Für den EIA werden mit Anti-HBs beschichtete Mikrotiterplatten benutzt, für den RIA im allgemeinen Röhrchen, die in ihrem unteren Abschnitt

mit Anti-HBs beschichtet sind. Weit verbreitet sind auch Polystyrolkugeln, neuerdings werden dazu auch kleinere Partikel verwendet. Die praktische Erfahrung hat gezeigt, daß zur Vermeidung unspezifisch positiver Reaktionen sowohl die Beschichtung mit Anti-HBs als auch der Träger von großer Bedeutung sind.

Seit kurzem steht ein RIA zur Verfügung, bei dem Anti-HBs an ein in einer Säule befindliches Sepharosegel* gebunden ist. Das zu untersuchende Serum oder Plasma fließt durch das Gelbett, evtl. vorhandenes HBsAg wird durch Anti-HBs gebunden und diese Bindung durch Hinzufügung eines J^{125} markierten Anti-HBs erkannt. Für jedes zu untersuchende Serum wird eine Säule verwendet (s. Abbildung). Dies ist für Kranken-

* Rialyze® Hepatitis, Fa. Miles GmbH, Frankfurt/Main.

häuser mit einer recht unterschiedlichen Untersuchungsfrequenz, für kleinere Blutspendedienste und insbesondere für Laborärzte vorteilhaft. In der vorliegenden Arbeit wurde die Brauchbarkeit des „Rialyze“-Tests für das HBsAg-Screening von Blutspenderseren überprüft.

Material und Methoden

Blutspenderseren:

Untersucht wurden 3874 Seren von Blutspendern aus Hessen. Die Seren wurden im allgemeinen 12 bis 24 Stunden nach der Blutentnahme auf das Vorhandensein von HBsAg getestet.

Prüfung gegen verschiedene Panel:

Um die Empfindlichkeit des Rialyze-Tests zu überprüfen, wurden mehrere Panel untersucht:

- I. Panel aus dem Paul-Ehrlich-Institut
Dieses Panel besteht aus je einem Standard der HBsAg-Subtypen ad und ay mit einem Gehalt von jeweils 50000 ng HBsAg. Durch Hinzufügung von menschlichem HBsAg-freiem Serum wurden fol-

gende Verdünnungen für die jeweiligen Subtypen hergestellt: 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1 (ng).

II. BOB-Panel No. 3

Das Panel enthält HBsAg negative Seren und HBsAg positive Proben verschiedener Subtypen in unterschiedlicher HBsAg-Konzentration, so daß aus ihrer Nachweisbarkeit bzw. Nichterfassung auf die Empfindlichkeit des Tests geschlossen werden kann.

III. Panel aus dem Institut für Immunhämatologie der Universität Frankfurt

Es handelt sich hierbei um positive Proben mit bekanntem HBsAg-Gehalt, die in den letzten Jahren bei Blutspendern gefunden wurden, sowie um HBsAg-negative Seren.

Alle Panelproben waren zum Teil mehrere Monate bis Jahre bei -30°C eingefroren und gelagert worden.

Technische Durchführung des „Rialyze“-Tests:

Der Test wurde nach den Richtlinien des Herstellers durchgeführt. Die dazu verwendeten Säulen wurden

Die Abbildung zeigt Sepharosegelsäulen, die in ein Abtropfgestell eingesetzt worden sind. Das Auftragen der zu untersuchenden Serum- oder Plasmaprobe (200 μl) erfolgt mit einer Mikropipette. Die erforderlichen Waschvorgänge werden mit einer Pipettiervorrichtung durchgeführt.

zunächst auf eine gleichmäßige Füllung überprüft, d. h. es wurde festgestellt, ob das Gelbett die vorgesehene Dicke hatte und ob eine ausreichende Menge Flüssigkeit oberhalb des Gelbettes vorhanden war, um ein Austrocknen zu vermeiden. Die Säulen wurden mit 200 µl der zu untersuchenden Seren versetzt und für 75 Minuten in einen Brutschrank (42°–45°C) gebracht. Anschließend wurde mit 3 ml Trispuffer gewaschen und 200 µl ^{125}J markiertes Anti-HBs zugefügt. Erneute Inkubation für 75 Minuten im Brutschrank (42°–45°C). Nach dieser zweiten Inkubationszeit wurden die Säulen fünfmal mit jeweils 3 ml Trispuffer gewaschen und danach die Radioaktivität in einem Gamma-counter (LKB 6000) bestimmt. Wie bei anderen radioimmunologischen Bestimmungsverfahren werden 3 positive und 7 negative Kontrollen mitgeführt und daraus der Grenzwert („cut-off-value“) berechnet.

Bestätigungstest (Confirmatory-Test):

Dieser Test wurde mit allen im Wiederholungstest (s. u.) positiv reagierenden Seren durchgeführt. Sein Prinzip besteht darin, daß dem zu prüfenden Serum Anti-HBs hinzugefügt wird, das mit HBsAg reagiert (Neutralisation), so daß für das nachträglich zugesetzte ^{125}J -markierte Anti-HBs kein Antigen mehr zur Verfügung steht. Eine vorher positive Probe (hohe Impulsrate im Gamma-counter) wird deshalb nach einer solchen Neutralisation weniger Impulse aufweisen. Um auch stark positive Proben zu neutralisieren, wird der Bestätigungstest sowohl mit unverdünntem Serum als auch mit einer Serumverdünnung von 1:50 durchgeführt. Eine wirklich positive Reaktion liegt dann vor, wenn die Reduktion der Impulsrate in der unverdünnten Serumprobe bzw. in der Serumverdünnung mindestens 50% beträgt.

Ergebnisse

Blutspenderseren:

Insgesamt wurden 3874 Seren von Blutspendern auf das Vorhandensein von HBsAg untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefaßt, wobei jedoch eine Unterteilung insofern durchgeführt wurde, als die 2112 Blutspenderseren getrennt aufgeführt worden sind; die mit den vom Hersteller gelieferten Versuchschargen untersucht wurden. Weitere 1762 Blutspenderseren wurden mit zwei handelsüblichen Chargen untersucht. Wesentlich für die Beurteilung eines Tests ist der Prozentsatz unspezifisch positiver Reaktionen. Er errechnet sich aus der Differenz zwischen den positiven Reaktionen im Screeningtest (2. Reihe der Tabelle) und den wirklich positiven Reaktionen (letzte Reihe der Tabelle) bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Seren. Dieser Prozentsatz lag bei den zunächst von uns verwendeten Versuchschargen bei über 2% (2,69 minus 0,47%), während er bei den handelsüblichen Chargen nur etwas mehr als 0,5% betrug (1,02% minus 0,45%). Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, wurden alle positiv reagierenden Seren zunächst nochmals untersucht, da auch von anderen radioimmunologischen Methoden bekannt ist, daß positive Reaktionen durch ungenügendes Waschen der Probe hervorgerufen werden (3,4). Nach erneutem Waschen konnte in beiden Versuchsreihen der Prozentsatz positiver Reaktionen deutlich erniedrigt werden, und zwar auf 1,37% bei Verwendung der Versuchschargen und auf 0,68% bei Benutzung der handelsüblichen Chargen. Von den 29 bzw. 12 auch nach wiederholtem Waschen positiv reagierenden Seren wurde am nächsten Tag mit einer neuen Probe nochmals der RIALYZE-Test durchgeführt. Nur 15 bzw. 10 Seren reagierten

Tabelle:

Untersuchung von 3874 Blutspendern mit dem RIALYZE-Test

	Blutspender- seren	Positiv im Screening	Positiv nach wiederholtem Waschen	Positiv nach Wiederholungs- untersuchung	Positiv nach Bestätigungs- test
Versuchs- chargen	2112	57 2,69%	29 1,37%	15 0,71%	10 0,47%
Handelsübliche Chargen	1762	18 1,02%	12 0,68%	10 0,57%	8 0,45%

erneut positiv. Mit diesen Seren wurde der Bestätigungstest durchgeführt. Davon ergaben 10 bzw. 8 eine entsprechende Reaktion, d. h. die Impulsrate wurde im unverdünnten Serum bzw. in der Serumverdünnung um mehr als 50% gesenkt. Somit betrugen die Prozentsätze wirklich positiver Reaktionen 0,47% bzw. 0,45%. Sie entsprechen dem Prozentsatz positiver Reaktionen, den wir auch mit anderen radioimmunologischen Methoden in einem unausgewählten Kollektiv von Erstspendern gewonnen haben (2,4,5). Als Vergleichstest wurde der Ausria II (Abbott) durchgeführt. Bis auf 2 Proben wurden alle im Rialyze-Bestätigungstest positiv reagierenden Seren auch im Ausria II als positiv erkannt. Diese zwei Seren, die nur im Rialyze-Test positiv reagierten, zeigten im Bestätigungstest eine Reduktion der Impulsrate von 55,2% bzw. 74,3%, d. h. es handelte sich bei beiden Seren um wirklich positive Proben.

Panel-Untersuchungen:

Paul-Ehrlich-Institut-Panel:

Insgesamt wurden während der Untersuchungsreihe vier verschiedene Chargen des Herstellers geprüft, und zwar zwei Versuchschargen und zwei handelsübliche Chargen. Die Grenze der Nachweisbarkeit lag für den Subtyp ay bei 2–4 ng, für den Subtyp ad bei 1–4 ng. Somit bestanden hinsichtlich der Empfindlichkeit zwischen den verschiedenen Chargen keine wesentlichen Unterschiede.

BOB-Panel No. 3

Mit dem Rialyze-Test wurden alle Proben als positiv erkannt, die durch einen Test der dritten Generation erfaßt werden müssen. Nicht als positiv bestimmt wurde (sowohl im Ausria II als auch im Rialyze-Test) die Serumprobe 343. Es handelt sich dabei um eine Serumprobe des BOB-Panels, die nur gelegentlich mit Tests der 3. Generation nachweisbar ist.

Instituts-Panel:

Alle vier Chargen (s. o.) wurden gegen dieses Panel geprüft. Es besteht aus 70 Seren (50 HBsAg positive und 20 HBsAg negative Seren). Es handelt sich um Blutspenderseren, die mit verschiedenen Methoden auf das Vorhandensein von HBsAg untersucht worden sind. Mit dem Rialyze-Test wurden alle HBsAg positiven Seren zweifelsfrei erkannt. Mit einer Charge wurde das Instituts-Panel nochmals untersucht, nachdem die Laufzeit bereits 4 Wochen überschritten war. Auch damit konnten alle HBsAg positiven Proben eindeutig erkannt werden, die negativen Seren reagierten negativ, d. h. unspezifisch positive Seren wurden auch nach dem Verfallsdatum der Charge nicht beobachtet. Einige der Seren waren infolge häufigen Auftauens und Einfrierens bakteriell verunreinigt, jedoch konnten auch mit diesen Seren immer eindeutige Resultate erzielt werden.

Diskussion

Von zahlreichen Blutspendediensten in der Bundesrepublik Deutschland wird heute ein Radioimmunoassay zum HBsAg-Nachweis im Spenderserum durchgeführt. Der Radioimmunoassay läßt sich relativ gut standardisieren. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Auswertung objektiv in einem Gamma-counter erfolgt. Das Ergebnis wird bei den meisten heute verwendeten Apparaturen automatisch ausgedruckt. Mehrere Radioimmunoassays stehen zur Verfügung, die hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Wesentlich für den Einsatz eines Tests ist seine Handhabung in der Routine, insbesondere der Prozentsatz unspezifisch positiver Reaktionen ist von großer Bedeutung. Es handelt sich dabei um positive Proben im Screeningtest, die jedoch in der Wiederholungsuntersuchung bzw. im Bestätigungstest negativ reagieren. Dieser Prozentsatz lag im Rialyze-Test bei Verwendung der Versuchschargen noch relativ hoch (über 2%), mit den handelsüblichen Chargen wurde jedoch nur ein Wert von 0,5% ermittelt. Ein solcher Prozentsatz ist im Routinebetrieb durchaus vertretbar und entspricht den auch bei anderen Radioimmunoassays gefundenen Werten. Auch die im Rialyze gefundenen Prozentsätze echt positiver Reaktionen sind den bei anderen Radioimmunoassays gefundenen vergleichbar (0,47 bzw. 0,45%). Der Vorteil des Rialyze-Tests besteht darin, daß der Untersucher nicht an eine durch das Kit vorgegebene Untersuchungszahl gebunden ist, wie das bei einigen radioimmunologischen und enzymimmunologischen Methoden der Fall ist. Für Massenuntersuchungen nachteilig ist, daß jede Säule einzeln gewaschen werden muß. Eine Automatisierung des Waschvorganges wäre deshalb wünschenswert. Als 'reine Testzeit', d. h. als Zeit für die Manipulation (ohne Inkubationszeit) haben wir für 100 Tests 70–80 Minuten errechnet.

Schrifttum:

1. LING, C. M., OVERBY, L. R.: Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmune assay with ^{125}I -antibody. *J. Immunol.* 109, 834–841 (1972).
2. SCRIBA, B., SEIDL, S.: Der Nachweis von Hepatitis B Antigen im Serum von Blutspendern mit der passiven Haemagglutination und dem Radioimmunoassay. *Transfus. & Immunhaem.* 2, 635–639 (1974).
3. SEIDL, S.: The present state of HBsAg detection (Without Groupomatic). *Revue Française de Transfusion et d'Immuno-hématologie*, Tome XXI., 503–508 (1978).
4. SEIDL, S., KÜHNER, J., TRAUTMANN, L., PADE, K.: Erfahrungen mit einem Enzymimmunoassay zum Nachweis von Hepatitis B Antigen bei Blutspendern. *Klin. Wschr.* 56, 521–524 (1978).
5. SEIDL, S., ZIEGLER, G. B.: Detection of hepatitis B antigen in blood donors by radioimmunoassay and three reverse passive haemagglutination techniques. *Vox Sang.* 31, 81–86 (1976).
6. WOLTERS, G., KUIJPERS, L. P. C., KAKAKI, J., SCHUURS, A. H. W. M.: Enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis B surface antigen. *The Journal of Infectious Disease* 136 (Suppl.), 311–317 (1977).

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. S. Seidl
Institut für Immunhämatologie
der Universität Frankfurt/M. u.
Blutspendedienst Hessen
Postfach 730367
6000 Frankfurt/Main 73