Bestimmung des Hepatitis-B-Oberflächen-Antikörpers im Radioimmunoassay

R. Stute, H. Trobisch, B. M. E. Kuntz, H. Brüster

Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. H. Brüster

Zusammenfassung:

Bislang war für die Bestimmung der Antikörper gegen das Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen eine Zeit von 24 Stunden erforderlich. Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur und Verwendung eines Schüttelwasserbades kann die Methode bei ähnlicher Empfindlichkeit verkürzt werden:

1. Inkubation +45°C Schüttelwasserbad: 3 Stunden,
2. Inkubation +37°C ohne Schütteln: 2 Stunden.

Die Verwendung von Heparinplasmen zur Verhinderung der Gerinnung stört die Bestimmung der Antikörper nicht.

Schlüsselwörter:

Transfusion – RIA, HBs-Antikörper – Heparinplasma.

Summary:

The original RIA-technique for detecting anti-HBs is time consuming. Elevation of the reaction temperature and the use of a shaking waterbath led to a similar sensitivity of the test:

1. incubation +45°C shaking waterbath 3 hours,
2. incubation +37°C without shaking 2 hours.

Heparinized plasma can be taken.

Key words:

Transfusion – RIA, Anti-HBs – Heparinized plasma.

Die Bestimmung des Antikörpers gegen das Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen ist ins Blickfeld des medizinischen Interesses gerückt, da u. a. Einblicke in die epidemiologischen Zusammenhänge erhalten werden konnten. Nur Antikörper gegen das Oberflächen-Antigen sind protektiv und können zur passiven Immunisierung verwendet werden. Die Konzentration der spezifischen Antikörper kann mit Hilfe eines Testsystems bestimmt werden. Am empfindlichsten ist z. Zt. der Radioimmunoassay, der jedoch zeitaufwendig ist.

In der vorliegenden Studie werden einige Modifikationen der Analysetechnik aufgezeigt.

Materialien und Methoden:

Alle Untersuchungen wurden mit einem solid face Test (AUSAB der Fa. Abbott) durchgeführt, der auf der Sandwich-Technik basiert.

Polystyrolkugeln sind mit HBs-Antigen beschichtet und werden mit den zu untersuchenden Seren und Plasmen inkubiert. Vorhandene Antikörper binden sich an das fixierte Antigen und können in einer zweiten Inkubation nach einem Waschprozeß mittels eines Jodmarkierten Antigens nachgewiesen werden.

Eine Probe gilt als positiv, wenn ihre Impulsrate höher als das 2,1fache des Mittelwertes der negativen Kontrollen ist.

Benutzt wurde ein thermostatisiertes Wasserbad mit einer Temperaturkonstanz $\pm 0,5^\circ\text{C}$ und ein Schüttelwasserbad mit horizontaler Schüttelamplitude (Köttermann). Zum Waschen wurde ein Filamatiksystem mit fünfarmigem Waschkopf verwandt.

Jede Probe wurde mit 15 ml destilliertem Wasser gewaschen.

Ergebnisse:

1. Wirkung von Ammoniumheparinat

Um zu prüfen, ob Ammoniumheparinatplasma zur Vermeidung der Gerinnung ohne Nachteil verwandt werden können, verglichen wir die Antikörper-Bestimmung jeweils von 1000 negativen und 100 positiven Proben sowohl aus Serum als auch aus Plasma. Der Mittelwert der negativen Proben betrug 59 CPM, der Mittelwert der negativen Plasmen 64 CPM.

Der Mittelwert der positiven Proben ergab bei der Bestimmung aus Serum 4439 CPM, bei der Bestimmung aus Plasma 4265 CPM. Im Wilcoxon-Rangtest konnten weder bei den positiven noch bei den negativen Proben unterschiedliche Verteilungen nachgewiesen werden. Es ergaben sich auch keine falsch-negativen oder falsch-positiven Resultate.

2. Verkürzung der Inkubationsdauer

Bei der Untersuchung des Temperaturoptimums ermittelten wir $+45^\circ\text{C}$ für die Vorinkubation und $+37^\circ\text{C}$ für die Nachinkubation.

Die Bindungsrate der Vorinkubation ließ sich noch durch die Verwendung eines Schüttelwasserbades erhöhen.

Bei der Nachinkubation bewirkte der Schüttler eine Ablösung des gebundenen Antigens von der Kugeloberfläche, wie sich mit Hilfe eines J^{125} -markierten HBs-Antikörpers leicht nachweisen ließ. Die Impulsraten der negativen Proben veränderten sich durch die Inkubationsänderungen nur unwesentlich.

Aus diesen Resultaten wurde folgende Modifikation erstellt:

1. Inkubation $+45^\circ\text{C}$ Schüttelwasserbad: 3 Stunden,
2. Inkubation $+37^\circ\text{C}$ ohne Schütteln: 2 Stunden.

Ergebnisse mit der verkürzten Methode:

In einer Vergleichsserie wurden 1083 Proben am gleichen Tag mit der Original- und modifizierten Methode untersucht, 103 Proben waren positiv, 980 negativ. Der Mittelwert der negativen Proben betrug im Originalansatz 123 CPM, der Mittelwert der aus der Modifikation 98 CPM.

Mittelwert der positiven Proben original: 4775 CPM, modifiziert: 3626 CPM.

Der Quotient Mittelwert pos. Probe/Mittelwert neg. Probe als Maß für die Empfindlichkeit ergab im Originalansatz 38,8, in der modifizierten Bestimmung 37,0.

Alle positiven Proben des Originalansatzes waren auch in der modifizierten Methode positiv, alle negativen Proben in beiden Ansätzen negativ. ✓

Diskussion:

Im Originalansatz weisen die positiven Proben höhere Impulsraten auf als in der Modifikation, dafür sind die negativen Proben ebenfalls höher.

Der geringe Unterschied des Quotienten aus positiven und negativen Kontrollen spricht für die Gleichwertigkeit beider Methoden.

Insgesamt ist es auf diese Weise möglich, den Antikörperbefund innerhalb eines Tages zu erstellen, ohne daß dadurch die Empfindlichkeit der Methode leidet.

Schrifttum:

1. GRADY, G. F.: Passive immunization against viral hepatitis status and prospects. Am. J. Med. Sci. 270, 369 (1975).
2. DESMYTER, J., BRADBURN, A. F. et al.: Hepatitis B immunoglobulin in prevention of HBs antigenemia in haemodialysis patients. Lancet 2, 377 (1975).
3. GINSBERG, A., CONRAD, M., BANCROFT, W., LING, C., OVERBY, L.: Antibody to Australia Antigen: Detection with a Simple Radioimmune Assay, Incidence in Military Populations and Role in the Prevention of Hepatitis B with Gamma Globulin. J. Lab. Clin. Med. 82, (2), 317 (1973).

Anschrift des Verfassers:

Akademischer Oberrat Dr. med. Reinhard Stute
Institut für Blutgerinnung und Transfusionsmedizin
der Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf
Moorenstraße 5
4000 Düsseldorf 1