

Laboratoriumsdiagnostik der Hepatitis B-Virus-Infektion

Von W. GERLICH

Mit dem Virus der Hepatitis B (HBV) sind nach gegenwärtiger Kenntnis mindestens drei Antigene assoziiert, die im Verlauf der Infektion im Serum und in der Leber auftreten und gegen die Antikörper gebildet werden können. Es existieren also sechs verschiedene serologische Parameter, mit denen das Vorliegen und der Verlauf der Infektion beurteilt werden können, dazu kommt noch als enzymatischer Parameter die HBV-spezifische endogene DNS-Polymerase. Es sind zahlreiche individuelle Reaktionstypen auf eine HBV-Infektion bekannt, so daß eine eindeutige Beurteilung der klinischen Situation durch virusserologische Parameter nicht erfolgen kann. Im Folgenden wird nicht die Diagnose der Krankheit „Hepatitis B“, sondern der Infektion mit dem HBV diskutiert. Da die Diagnose zunächst fast immer an Hand einer Serumprobe erfolgen muß, wird hier auf den Nachweis der HBV-Antigene in Lebergewebe nicht eingegangen. Das HBV hat keine biologischen Eigenschaften, die wie z. B. Hämagglutination oder Zytotoxigenität leicht *in vitro* nachzuweisen wären. Lediglich der relativ komplizierte Nachweis der endogenen DNS-Polymerase erlaubt einen – allerdings wenig empfindlichen – Nachweis des HBV. Die Virusantigene werden jedoch in großem Überschuß gebildet und erlauben so indirekt einen immunologischen Nachweis des HBV in einem Individuum. Die offiziellen Bezeichnungen dieser Antigene sind HBsAg, HBcAg und HBeAg, die entsprechenden Antikörper werden mit anti-HBs, anti-HBc und anti-HBe gekennzeichnet. Ältere Bezeichnungen für HBsAg wie Australia- oder SH-Antigen sollten nicht mehr verwendet werden.

Im Prinzip ist jede immunologische Reaktion zum Nachweis dieser Antigene oder Antikörper geeignet, wenn die entsprechenden Reagenzien in der benötigten Reinheit und Spezifität vorliegen. Im Folgenden sollen zunächst die Vor- und Nachteile der häufiger angewendeten Labormethoden diskutiert werden, dann Möglichkeiten zu ihrer Standardisierung und schließlich die klinische und epidemiologische Wertigkeit bestimmter Serumparameter.

Testmethoden

Welches immunologische Verfahren für ein spezielles Nachweisproblem angewendet wird, hängt von zahlreichen Faktoren ab: Anforderungen an Empfindlichkeit, Genauigkeit, Spezifität und Schnelligkeit auf der einen Seite, Arbeitsaufwand, Kosten, Verfügbarkeit von Reagenzien oder Testsätzen, technische und personelle Voraussetzungen auf der anderen Seite.

Immunpräzipitation in Agar

Die drei in der HBV-Diagnostik wichtigsten Techniken dieser Methodik sind die radiale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY mit der Variante Rheophoresis, die Überwanderungselektrophorese und die quantitative Immunelektrophorese nach LAURELL.

Mit der radialen Doppeldiffusion wurden das HBsAg [1], seine Subtypen [2] und das HBe-System entdeckt [3]. Diese Fakten beweisen, wie wichtig diese Technik bei der Suche nach neuen Antigen-Antikörpersystemen ist. Man benötigt keine gereinigten Reagenzien, die Methode ist einfach und mit wenig Arbeitsaufwand durchzuführen, bei geeigneter Anordnung der Referenzproben können Antigen und Antikörper simultan bestimmt werden, und die Spezifität der Reaktion kann direkt durch die Konfluenz der Präzipitatlinien demonstriert werden. Daher wird die radiale Doppeldiffusion an vielen Stellen, z. B. auch im Labor des Autors, für die Bestimmung der HBsAg-Subtyperdeterminanten sowie für den Nachweis des HBe-Systems verwendet. Nachteilig ist die geringe Empfindlichkeit, daraus resultierend der hohe Reagenzienverbrauch, die lange Zeitdauer bis zur endgültigen Auswertung, die bei schwachen Präzipitaten subjektive Ablesung, die Empfindlichkeit gegen unspezifische Ausfällungen, wie sie speziell bei älteren oder bakteriell kontaminierten Serumproben oder bei der paarweisen Reaktion von Plasma- und Serumproben erhalten wird. Bei schlecht balancierten Referenzproben

kann es auch zu Prozonophänomenen durch Antigen- oder Antikörperüberschuß kommen.

Diesen Nachteilen kann zum Teil dadurch begegnet werden, daß nur erfahrenes Personal unter optimaler Beleuchtung von schräg unten im abgedunkelten Raum abliest. Proben und Reagenzien müssen eventuell vor Gebrauch sterilfiltriert werden. Die Reagenzien müssen in Verdünnungsreihen eingestellt werden, wobei ein Kompromiß zwischen Nachweisgrenze, Prozonengrenze und Auswertbarkeit gefunden werden muß. Bei Verwendung der üblichen hexagonalen Anordnung der Probenlöcher mit einem Zentralloch sollte das umgebende Gel räumlich beschränkt werden, indem man das Muster z. B. in eine kleine Petrischale bringt. Diese Maßnahme erzwingt eine Diffusion vorwiegend in Richtung Zentralloch. Der Effekt kann noch verstärkt werden, indem die äußeren Probenlöcher von einem Ring mit Puffer umgeben werden, während zentral ein Teil der Gelfeuchtigkeit langsam verdunstet. Da hierbei im Gel ein Flüssigkeitsstrom in Richtung Zentralloch auftritt, der die Probesubstanzen mittransportiert, wird das Verfahren Rheophorese genannt.

Eine gewisse Steigerung der Empfindlichkeit wird durch Vergrößerung der Probenlöcher ermöglicht, wobei jedoch der verbleibende Raum für die Ausbildung der Präzipitatlinien und die geringe Diffusionsgeschwindigkeit Grenzen setzt. Im Labor des Autors wird eine Sechslöcheranordnung mit jeweils 6 mm Durchmesser und 4 mm Lochabstand in Petrischalen von 3 cm Durchmesser verwendet. Bei schwach positiven Proben ist es sinnvoll, nach 24 h die Probenlöcher zu entleeren und frische Probe einzufüllen (siehe Abb. 1).

Eine Herabsetzung der Agarosekonzentration bis auf 0,4% führt zu ziemlich klaren Gelen. Die Qualität der Agarose beeinflusst das Testergebnis entscheidend, jedoch kann keine generelle Empfehlung eines Fabrikats gegeben werden, da auch von Charge zu Charge erhebliche Unterschiede bestehen. Präzipitationsfördernde Zusätze erhöhen die Linienintensität, aber auch die Ausbildung unspezifischer Trübungen; am ehesten haben sich 2% Dextran T 200 oder 3% Polyethylenglykol 6000 bewährt. Die Zeitdauer bis zur endgültigen Ablesung kann im allgemeinen auf 40 h beschränkt werden.

Gegenüber der radialen Doppeldiffusion hat die prinzipiell ähnliche Überwanderungselektrophorese im wesentlichen den Vorteil der größeren Schnelligkeit. Unter speziellen Bedingungen kann schon nach zwanzig Minuten ein Resultat erhalten werden. Ein wesentlicher Empfindlichkeitsvorsprung ergibt sich jedoch nicht. Der Wegfall der

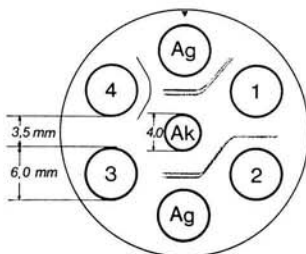


Abb. 1: Reaktionsmuster der Agardiffusion zum Nachweis von HBeAg und anti-HBe. Das Beispiel zeigt HBe-Referenzantigen oben und unten mit e1 und e2, anti-HBe1 und anti-HBe2 in Probe 1, HBeAg mit scheinbar nur einer Komponente in Probe 2. Probe 4 enthält anti-HBs, das sowohl mit dem HBsAg im Referenzantigen als auch dem im Referenzantikörper reagiert.

Spezifitätskontrolle durch Linienkonfluenz, die höhere Anfälligkeit gegenüber Prozonophänomenen und der etwas größere technische Aufwand bedeuten dagegen einen Nachteil. So ist die Überwanderungselektrophorese für den Nachweis von HBsAg heute weitgehend durch empfindlichere und einfachere Verfahren verdrängt, während für die HBsAg-Subtypisierung und das HBe-System meistens der radialen Doppeldiffusion der Vorzug gegeben wird.

Bewährt hat sich diese Methode dagegen zum semiquantitativen Nachweis von anti-HBc [4]. Verwendet man eine konstante Menge partiell gereinigtes HBcAg gegen die Probenseren, wird die Präzipitatlinie umso näher am Antigenloch gefunden, je höher der anti-HBc-Titer ist. Wenn eine Verdünnungsreihe einer Referenzprobe mitgeführt wird, können aus der Position der Präzipitate Titereinheiten abgelesen werden, ohne daß viele Verdünnungen getestet werden müssen. Die Genauigkeit des Verfahrens ist allerdings beschränkt, zudem überlagern sich Konzentration und elektrophoretische Beweglichkeit des anti-HBc. Ein größeres Problem ist der Mangel an HBcAg.

Eine echte quantitative Bestimmungsmethode ist die Immunelektrophorese nach LAURELL [5]. Die Unempfindlichkeit der Methode beschränkt ihre Anwendung in der Hepatitis B-Diagnostik auf HBsAg, das oft in recht hohen Konzentrationen im Serum gefunden wird. Da kein Testsatz erhältlich ist, findet die Methode zur Zeit nur wenig Anwendung. Die Technik ist unaufwendig, benötigt jedoch ein qualitativ hochwertiges anti-HBs-Serum mit mindestens 50 intern. Einh.; besser geeignet sind jedoch Antiseren mit etwa 500 bis 1500 intern. Einh., die zur Zeit nicht käuflich sind. Einheitliche Ergebnisse für die HBsAg-Subtypen sind nur dann zu erwarten, wenn das Antiserum keine oder nur ausgewogene Mengen Antikörper gegen die Subtyperdeterminanten erhält; dies ist nicht bei allen käuflichen tierischen anti-HBs-Seren der Fall.

Der Nachweisbereich einer im Labor des Autors routinemäßig verwendeten Technik [6] reicht von 0,5 bis 60 µg HBsAg-Protein/ml. Im Bereich zwischen 10 und 60 µg/ml hat die Methode einen Variationskoeffizienten von 6% (Abb. 2).

Agglutinationsmethoden

Bei den Agglutinationsmethoden wird die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper dadurch sichtbar gemacht, daß lichtmikroskopisch erkennbare Teilchen mit dem vorgegebenen Reaktionspartner beschichtet werden. Der nachzuweisende Reaktionspartner bewirkt eine makroskopisch erkennbare Vernetzung der Teilchen.

Als Trägerteilchen werden meistens native oder Aldehyd fixierte Erythrozyten verschiedener Spezies verwendet, daneben auch Latexpartikel. Native Humanerythrozyten ermöglichen eine hohe Nachweisempfindlichkeit, sind jedoch wenig haltbar und schwierig zu beschichten. Geflügelythrozyten haben den Vorteil schneller Sedimentationsgeschwindigkeit und somit kurzer Reaktionszeit. Schaferythrozyten haben den Nachteil, bei infektiöser Mononukleose mit den heterophilen Antikörpern falsch positiv zu reagieren. Zum Nachweis von HBsAg sind eine Reihe kommerziell erhältlicher Testsätze mit anti-HBs beschichteten Erythrozyten im Handel [7, 8, 9]. Alle Tests erfordern eine relativ hohe Endverdünnung des Probeserums, sind empfindlich gegen bakterielle Kontamination der Probe

und können durch anti-IgG unspezifisch positiv werden. Die Entscheidung zwischen negativ und schwach positiv muß visuell getroffen werden und ist mitunter schwer zu treffen. Alle positiven Reaktionen müssen durch Absorption und/oder Inhibition sowie durch eine Inkubation mit Kontrollzellen gesichert werden. Die technischen Vorteile dieser Teste wie Einfachheit und Schnelligkeit werden durch diese Nachteile weitgehend aufgewogen. Die Nachweisempfindlichkeit der Teste ist jedoch auch bei großzügiger Ablesung, die falsch positive Resultate weitgehend vermeidet, etwa um den Faktor 5 bis 20 besser als die einer optimalen Gelpräzipitationsmethode [10]. Frühere Erfahrungen mit anti-HBs beschichteten Latexpartikeln waren negativ, da weder die Spezifität noch die Empfindlichkeit zufriedenstellen konnten [11]. Ein neuentwickelter Latextest (Antigex TG) zeigt diese Nachteile offensichtlich nicht mehr. Er ist bei guter Spezifität und Ablesbarkeit etwas empfindlicher als die Hämagglutinationsteste (W. GERLICH, nicht publizierte Resultate).

Ein sehr empfindlicher Hämagglutinationstest mit HBsAg beschichteten Erythrozyten zum Nachweis von anti-HBs [12] verliert inzwischen an Bedeutung, da der Radioimmuntest wegen der objektiven Auswertung vorgezogen wird.

Neuerdings wurde eine passive Hämagglutination zum Nachweis von HBeAg beschrieben [13], die aber nicht käuflich ist.

Alle passiven Agglutinationsverfahren ergeben nur dann befriedigende Resultate, wenn hochgereinigte oder zumindest hochaktive Reagenzien zur Beschichtung der Teilchen verwendet werden. Im nichtspezialisierten Labor ist die Anwendung dieser Techniken auf käufliche Testsätze beschränkt.

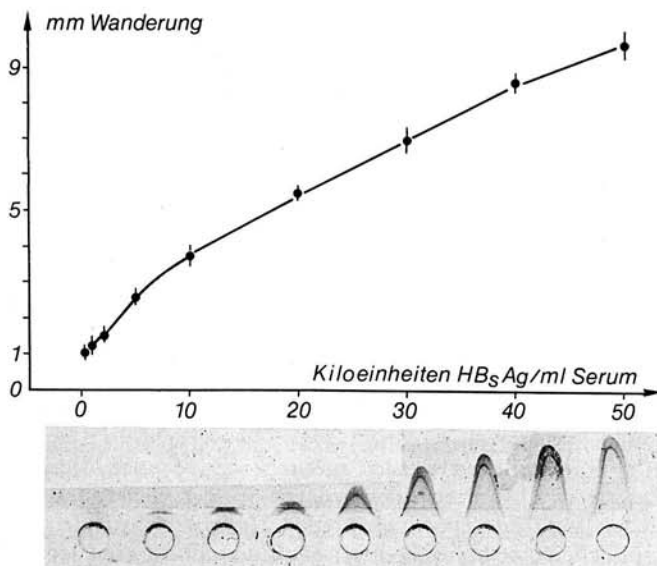


Abb. 2: Quantitative Immunelectrophorese nach LAURELL zur Bestimmung von HBsAg. Die Reaktion wurde auf Objektträgern (25 × 75 mm) durchgeführt. Die Probenlöcher erhielten von links nach rechts 500, 1000, 2000, 5000, 10 000, 20 000, 30 000, 40 000 und 50 000 Einheiten HBsAg pro ml Serum. Der obere Teil der Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs verschiedenen Testläufen.

Eine interessante Variante der Agglutinationsreaktion ist die Immunadhärenzhämagglutination von humanen O-Erythrozyten, die durch Immunkomplexe in Gegenwart von Komplement abläuft. Diese universell für Antigen und Antikörper anwendbare Reaktion ist sehr empfindlich, wenig arbeitsaufwendig und benötigt nur mäßig gereinigte Reagenzien. Nachteilig ist die biologische Variabilität der Reagenzien, besonders der verwendeten Erythrozyten, und die Empfindlichkeit gegen Störfaktoren, die zahlreiche Kontrollen nötig macht. Ein prinzipieller Nachteil scheint darin zu liegen, daß nur Antikörper der IgG-Klasse, nicht aber der IgM-Klasse nachgewiesen werden [14]. So ist die Methode, die zum Nachweis von anti-HBc [15], anti-HBs [16] oder anti-HA [14] verwendet wurde, für die Diagnostik akuter Infektionen wohl weniger geeignet.

Teste mit chemisch modifizierten Reaktionspartnern

Diese Gruppe von Verfahren hat seit etwa zehn Jahren auch in der medizinischen Mikrobiologie zunehmend Anwendung gefunden. Gemeinsames Prinzip ist die chemische Veränderung eines vorgelegten Reaktionspartners (Antigen oder Antikörper) unter Erhaltung der immunologischen Spezifität mit dem Ziel, diese Substanz möglichst einfach und empfindlich nachweisen zu können. Das älteste Verfahren dieser Art ist die Kopplung eines Antigens oder Antikörpers mit Fluorescein. Einen empfindlichen Nachweis erlaubt die Markierung mit radioaktivem Jod 125 oder in neuerer Zeit auch mit verschiedenen Enzymen, wie z. B. Meerrettichperoxidase [17], Glucose 6-phosphat-oxidase [18] oder alkalische Phosphatase [19].

Die Trennung zwischen Immunkomplex-gebundenem und freiem Reagens erfolgt durch ein präzipitierendes Antiglobulin (Doppelantikörpermethode) eventuell mit einem Zusatz von Polyethylenglykol, mit Staphylokokken A Protein [20] oder durch chemische Trennmethode.

Diese Reaktionen in homogener Phase sind im Bereich der Hepatitis-Diagnostik weitgehend durch Festphasenmethoden verdrängt. Der vorgelegte Reaktionspartner wird durch physikalische Adsorption oder durch kovalente Bindung auf einen festen Träger gebracht. Je nach Reaktionsprinzip vermittelt oder inhibiert die nachzuweisende Substanz die Bindung des chemisch markierten Reagens an die feste Phase. Eine Reihe von Prinzipien ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. Vorteil der Festphasenmethode ist, daß die Trennung von gebundenem und freiem Reagens durch einfaches Waschen erfolgen kann. Das markierte Reagens muß im Gegensatz zu den Testen in homogener Phase nicht von perfekter Reinheit sein, da unspezifische Anteile sehr viel gründlicher als bei Präzipitationsmethoden entfernt werden können.

Zum Nachweis von HBsAg wird heute fast ausschließlich der direkte zweistufige Sandwichassay verwendet [21] (Abb. 3). Die feste Phase wird mit hochtitrigem anti-HBs-Serum beschichtet. Der lösliche Antikörper der zweiten Inkubationsstufe wird vor der Markierung von allen Testkit-Herstellern bis auf einen (Organon) durch Immunkomplexspaltung gereinigt (Fa. Abbott, Electronucleonics, LS, pers. Mitt.).

Diese immunologische Vorreinigung erhöht den Anteil des anti-HBs-Antikörpers im gesamten markierten Immunglobulin von maximal einigen Prozent auf 20% und mehr.

Ein Nachteil dieser Prozedur ist die selektive Aktivitätseinbuße des anti-HBs gegenüber dem HBsAg-Subtyp ayw. Wegen dieses selektiven Spezifitätsverlustes wird bislang bei Festphasenimmuntesten, die mit spezifisch gereinigtem anti-HBs arbeiten, HBsAg/ayw um den Faktor 2 bis 4 unempfindlicher als HBsAg/adw nachgewiesen. Eindeutige quantitative Daten können mit diesen Testen nur erhalten werden, wenn der Subtyp bekannt ist. Dieser Nachteil entfällt bei der Verwendung der gesamten anti-HBs-IgG-Fraktion, wenn Antisera geeigneter Spezifität ausgewählt wurden [22]. Jedoch ist die Nachweisempfindlichkeit insgesamt etwas geringer und die Anfälligkeit gegen unspezifische Resultate etwas höher (GERLICH, nicht publizierte Resultate).

Zum Nachweis von HBcAg [23] und HBeAg [24] kann im Prinzip wie zum Nachweis von HBsAg verfahren werden. Hochtitriges anti-HBc oder anti-HBe als Reagens können von gesunden HBsAg-Trägern leicht erhalten werden. Eine spezifische Reinigung durch Immunkomplexspaltung wird wegen der Schwierigkeit, größere Mengen Antigen zu erhalten, nicht durchgeführt. Testsätze für die HBcAg- oder HBeAg-Bestimmung sind noch nicht erhältlich.

Anti-HBs kann wie HBsAg auf einfache Weise im zweistufigen Sandwichassay [25] bestimmt werden, da das HBsAg zur Beschichtung der festen Phase und zur Markierung leicht in ausreichender Reinheit und Menge hergestellt werden kann.

Bei anti-HBc und anti-HBe wird eine Inhibition des HBcAg- bzw. HBeAg-Nachweises verwendet, da diese Antigene nicht in ausreichender Menge und Reinheit für diagnostische Zwecke verfügbar sind. Der nachzuweisende Antikörper inhibiert die Bindung des markierten Antikörpers an eine kleine Menge vorgelegten Antigens. Es gibt drei Varianten dieser Inhibition: Blocking (3 b), Kompetition (3 c) oder Neutralisation (1 d). Blocking ergibt die relativ beste Empfindlichkeit, ist jedoch in quantitativer Hinsicht schwieriger zu standardisieren.

Kompetition ist quantitativ besser auswertbar und technisch am einfachsten. Jedoch ist die Technik relativ unempfindlich und erfaßt eventuell langsam diffundierende, weniger avide Antikörper der IgM-Klasse schwächer. Die Neutralisation steht in der Empfindlichkeit und Genauigkeit zwischen beiden Verfahren, ist jedoch wesentlich umständlicher. Alle diese Inhibitionsverfahren erreichen nicht die Empfindlichkeit der direkten Sandwichassays, sind jedoch klassischen Testverfahren klar überlegen.

Als feste Phasen für die Immunoassays werden die unterschiedlichsten Träger verwendet: Polystyrolröhrchen [21], flexible [25] oder starre [22] Mikrotiterplatten, Plastikstäbchen [26], Filterscheiben, poröse Glaskugeln und zahlreiche andere Träger. Für große Probenzahlen haben sich Mikrotiterplatten im Labor des Verf. bewährt, da 96 Ansätze mit einem Handgriff weiter verarbeitet werden können. Plastikkugeln ergeben eine etwas gleichmäßigere Be-

Bestimmung von Antikörpern im Festphasensandwichimmunassay

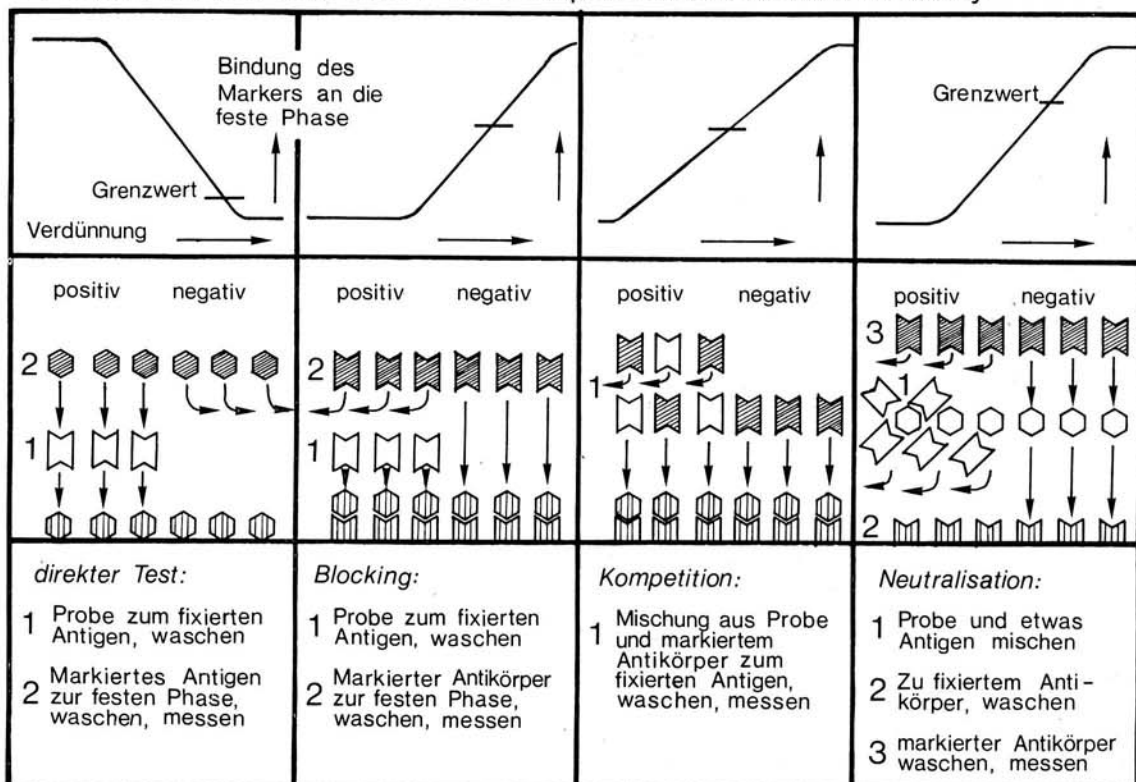


Abb. 3: Schematische Darstellung des Reaktionsablaufs, des Testprinzips und der Titrationskurven von vier verschiedenen Versionen des Festphasensandwichassays zum Nachweis von Antikörpern. Der direkte Test benötigt gereinigtes Antigen zur Beschichtung und zur Markierung, die drei Inhibitionsmethoden hochtitriges spezifisches Gammaglobulin. FRIT und EIA unterscheiden sich nur in der Art der Markierung.

schichtung. Kleinere Partikel als Träger sind wegen der großen Oberfläche zwar sehr reaktiv, jedoch unpraktisch in der Verarbeitung. Wichtiger als die Unterschiede bei der festen Phase sind die Unterschiede bei der Art der Markierung des Reagens in der löslichen Phase. Die Markierung mit Jod 125 hat sich vielfach bewährt. Die Radioimmunte Austria II, Ausab und Corab sind bereits Standardmethoden in Wissenschaft und Diagnostik geworden. Für HBsAg gibt es außerdem eine Reihe käuflicher Testsätze oder jodmarkierte Reagenzien, die diesen Standard ebenfalls erreichen. Jod 125 gehört zu den Isotopen mit hoher Radiotoxizität, so daß unter Umständen schon ein einziger Testansatz die Freigrenze überschreitet. Die Notwendigkeit der Umgangserlaubnis mit allen Sicherheitsvorkehrungen, teure Zählapparaturen, lange Zählzeiten, kurze Haltbarkeit der Testsätze, umständliche Abfallbeseitigung, Personalprobleme sind die bekannten Nachteile der Jodmarkierung.

Die enzymatische Markierung von Antigenen und Antikörpern ist dabei, in vielen Bereichen die Jodmarkierung zu verdrängen. Die genannten Nachteile entfallen hier, während die Empfindlichkeit des RIA in etwa gehalten werden kann. Dennoch haften auch dem EIA gewisse Nachteile an: Der Nachweis des festphasengebundenen Enzyms erfordert mit dem Zusatz des Substrats und dem Stoppen der Reaktion zwei zusätzliche Dosier- und einen Inkubationsschritt. Zur Quantifizierung der Farbreaktion sind die in den Laboratorien vorhandenen Photometer oft nur auf umständliche Weise einsetzbar. Einfache Photometer für den EIA müssen erst entwickelt werden und bedeuten, wenn sie verfügbar sind, zunächst eine erhebliche Investition. Die von einem Hersteller (Organon) empfohlene visuelle Auswertung der Farbreaktion ist möglich, beraubt den Test jedoch eines seiner wesentlichen Vorteile gegenüber dem Agglutinationsverfahren, der objektiven Auswertung. Für das wissenschaftliche Labor bedeutet es einen Nachteil, daß die in industriellen Labors entwickelten optimierten Kopplungsmethoden für Enzyme nicht allgemein bekannt sind. Die bekannten Techniken ergeben dagegen oftmals schlechtere Resultate als die chemisch gesehen simple Jodmarkierung. Enzyme haben außerdem eine größere sterische Ausdehnung und können so die Reaktivität der Reagenzien stärker beeinträchtigen als eine Jodmarkierung. Trotz dieser Einwände werden jedoch Enzymimmunoassays auch in der Hepatitis B-Diagnostik die Radioimmunteste ersetzen, wenn nicht gänzlich neue Techniken wiederum den EIA verdrängen.

Eine der ältesten Methoden der chemischen Markierung von Antigenen und Antikörpern ist die Kopplung mit fluoreszierenden Farbstoffen. Die Methode wird praktisch nur zusammen mit partikulären Substraten verwendet, die im UV-Mikroskop betrachtet werden. In der Sero-diagnostik werden gelegentlich HBcAg positive Leberschnitte zum Nachweis von anti-HBc in der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt. Die Methode ist wenig empfindlich und nur subjektiv auswertbar. Sie sollte im wesentlichen auf den Nachweis der HBV-Antigene in Gewebe beschränkt werden, wo sie unersetzlich ist.

Standardisierung der Testergebnisse

Die Standardisierung der HBV-Diagnostik ist eine der vordringlichen Aufgaben bei der Bekämpfung der Hepatitis B.

Testempfindlichkeit

Die Standardisierung der Testempfindlichkeit ist, auch wenn nur ein qualitatives Ergebnis angestrebt wird, ein quantitatives Problem. Da es keinen Grenzwert für die Konzentration von HBV-spezifischen Antigenen oder Antikörpern gibt, unterhalb dessen ein positives Resultat nicht mehr relevant wäre, kommt der Nachweisgrenze der Technik eine zentrale Bedeutung zu. Die Empfindlichkeit einer Bestimmung wird bei allen Techniken mit der Charge des Reagens und der Exaktheit der Durchführung mehr oder weniger variieren. Entscheidend für die Qualitätsbeurteilung ist nicht der mögliche Optimal- oder Durchschnittswert der Nachweisgrenze, sondern die geforderte Mindestempfindlichkeit, die bei jedem Bestimmungsansatz mit einer geeigneten positiven Kontrolle kontrolliert werden muß. Die Konzentration der positiven Kontrolle gibt die Konzentration an, die bei einer Bestimmung mit Sicherheit erkannt werden kann. Bei einem negativen Ausfall dieser positiven Kontrolle ist das Testergebnis insgesamt zu verwerfen oder zumindest sehr kritisch zu beurteilen, selbst wenn stark positive Proben einwandfrei erkannt wurden. Jeder käufliche Testsatz enthält Kontrollproben. Leider werden oft keine quantitativen Angaben zu den Kontrollproben gegeben. Meist liegt ihre Konzentration erheblich höher als die sicher erreichbare Nachweisgrenze, so daß mit diesen Proben bei rein qualitativer Auswertung nur eine massive Unterschreitung der erreichbaren Testempfindlichkeit erkannt werden kann. Wenn Testsätze neben der „normalen“ positiven Kontrolle noch eine schwach positive Kontrolle enthalten, kann man davon ausgehen, daß deren Konzentration der Nachweisgrenze entspricht. Wenn eine solche Probe nicht enthalten ist, sollte der Anwender selbst durch Verdünnen eine solche Kontrollprobe einstellen und regelmäßig mitführen.

Definition von Mengeneinheiten

Für HBsAg wurden vom Paul-Ehrlich-Institut zwei Referenzproben für die Subtypen adw und ayw definiert, die im Bereich der Bundesrepublik Deutschland Gültigkeit haben. Sie enthalten jeweils 50 000 HBsAg-Einheiten pro Milliliter.

Die Einheiten sind nach dem Prinzip des Standards an Hand einer Referenzprobe festgelegt, jedoch wurde bei ihrer Definition ein naturwissenschaftlicher Bezug hergestellt. Eine HBsAg-Einheit entspricht einem Nanogramm (10^{-9} Gramm) Antigenprotein mit einer serologischen Aktivität, wie sie bei stark positiven Seren normalerweise gefunden wird [6].

Die Nachweisgrenze verschiedener Techniken ist in Tab. 1 in HBsAg-Einh./ml Serum angegeben. Die großen Bereiche der Nachweisgrenze für einige Verfahren entstehen durch Unterschiede zwischen den Produkten verschiedener Hersteller, zwischen verschiedenen Chargen und Laboratorien [10]. Das Paul-Ehrlich-Institut als nationale Prüfbehörde fordert die Hersteller von Testsätzen auf, die garantierte Nachweisgrenze in HBsAg-Einh. zu deklarieren. Eine im Testsatz enthaltene Kontrollprobe sollte auf diese Konzentration eingestellt sein. Laboratorien, die eigene Reagenzien für den HBsAg-Nachweis verwenden oder käufliche Testsätze modifizieren, müssen entsprechend labor-eigene Referenzproben mitführen, deren Gehalt an den

Referenzproben des Nationalen Referenzlabors für die Virushepatitis oder des Paul-Ehrlich-Instituts eingestellt ist. Bei der Mitteilung eines negativen HBsAg-Befunds ist korrekterweise neben der verwendeten Bestimmungsmethode auch die Nachweisgrenze anzugeben, da ein negatives Ergebnis nicht die Abwesenheit von HBsAg garantiert, sondern bestenfalls, daß ein eventuell vorhandenes HBsAg mit einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze vorliegt.

Für anti-HBs existiert ein von der WHO entwickeltes internationales gültiges Standardpräparat, dessen Gehalt auf 100 Einheiten anti-HBs pro Milliliter festgelegt ist. Diese Einheiten sind willkürlich definiert und dienen in erster Linie für die objektive Gehaltsbestimmung von Hepatitis B-Immunglobulinpräparaten für die Hepatitis B-Prophylaxe. Jedoch basiert die Gehaltsangabe auf dem Ergebnis des d-FRIT für anti-HBs, so daß dieses Standardpräparat indirekt auch für die quantitative Standardisierung der anti-HBs-Bestimmung verwendet werden kann. Analog zur HBsAg-Bestimmung wären hier für jede Nachweisteknik Nachweisgrenzen und Kontrollproben festzulegen. Da der Gehalt der internationalen Referenzprobe sehr hoch ist, ist es sinnvoll, die Nachweisgrenzen für anti-HBs in Milli-Einheiten pro ml oder Einheiten/l anzugeben.

Die anti-HBs-Einheit der WHO ist zwar willkürlich definiert, weist jedoch eine eindeutige Beziehung zur HBsAg-Einheit des Paul-Ehrlich-Instituts auf. Und zwar ist eine Einheit anti-HBs in der Lage, ungefähr 1 Mikrogramm HBsAg-Protein, d. h. 1000 HBsAg-Einheiten zu binden; oder umgekehrt, eine Milli-Einheit anti-HBs entspricht etwa einer Einheit HBsAg. Genaue Messungen ergaben die Neutralisation von 900 HBsAg-Einheiten pro anti-HBs-Einheit, wenn aus 40 000 HBsAg-Einheiten gerade 50% durch den zugegebenen Antikörper entfernt wurden. Die

HBsAg-Restaktivität wurde durch QIE gemessen (B. STAMM et al., nicht publizierte Ergebnisse).

Für HBcAg, anti-HBc, HBeAg und anti-HBe sind bislang Standardpräparate mit definierten Mengeneinheiten nicht verfügbar. Mengenangaben für diese Substanzen sind daher bislang wenig vergleichbar und müssen in Titern oder willkürlichen Einheiten erfolgen.

Quantitative Messungen

Mengenangaben von HBsAg und anti-HBs haben bevorzugt in Einh./ml zu erfolgen. Sofern objektiv auswertbare Methoden verwendet werden wie QIE, FRIT oder EIA, ist mit definierten Referenzproben eine Eichkurve zu erstellen und die Konzentration einer Probe daraus zu ermitteln. Bei HBsAg sind für die Subtypen adw und ayw getrennte Eichkurven zu erstellen. Das Meßergebnis muß im Proportionalbereich der Eichkurve liegen, ansonsten müssen Verdünnungen hergestellt werden. Die Angabe von Endtitern bei objektiv auswertbaren Methoden ist unsachgemäß, da gerade im Bereich der Nachweisgrenze die quantitative Beziehung zwischen Meßergebnis und Probenkonzentration ziemlich unexakt ist. Bei Unkenntnis des Subtyps ist die quantitative HBsAg-Bestimmung im FRIT problematisch.

Für sehr genaue Bestimmungen, z. B. bei der Einstellung von Referenzpräparaten, Vakzinen oder Immunglobulinpräparaten, ist die „Parallellinien – Technik“ anzuwenden (L. F. BARKER et al., pers. Mitteilung). Hierzu werden Titrationskurven im FRIT oder EIA im doppellogarithmischen Maßstab für die Probe und den Standard erstellt (Bindung des markierten Reagens gegen Verdünnungsfaktor). Dann wird geprüft, ob für beide Proben annähernd parallele Geraden erhalten werden und die Regressionsgeraden unter der Voraussetzung der Parallelität ermittelt.

Tabelle 1*:

Methode	1. Empf. E/ml	2. Spez.	3. Dauer	4. Obj. Abl.	5. Arb. Aufw.	6. techn. Voraus.	Anwendung
AGD	1000	+	—	—	+	+	HBe, HBs-Subtyp
ÜE	500	—	+	—	+	+	HBs-Schnelltest ⁸
QIE	500	+	○	+	+	+	quant. HBs ⁸
KBR	100	○	○	○	○	○	quant. HBs ⁸
rPHA	15–100	—	+	—	+	+	HBs-Schnelltest ⁷
PHA	5	○	+	—	+	+	anti-HBs ⁷
PLA	5	○	+	—	+	+	HBsAg ⁷
IAHA	n. a.	○	+	—	○	+	universell
RIP	n. a.	+	—	+	—	—	universell
d-FRIT	0,1–10	+	+	+	—	—	HBsAg, anti-HBs ⁷
i-FRIT n	3	+	(+)	+	—	—	HBsAg ⁷
i-FRIT k	n. a.	+	+	+	—	—	anti-HBc ⁷
i-FRIT b	n. a.	+	+	+	—	—	anti-HBc ⁷
d-EIA	2–6	(+)	(+)	—/+	○	+ / ○	HBsAg ⁷

*Übersicht über verschiedene immunologische Nachweismethoden (Agardiffusion AGD, Überwanderungselektrophorese ÜE, quantitative Immunelektrophorese nach LAURELL QIE, reverse passive Hämagglutination rPHA, passive Latexagglutination PLA, Immunadhärenzhämagglutination IAHA, Radioimmunpräzipitation RIP, direkter Festphasenradioimmuntest d-FRIT, indirekter FRIT durch Neutralisation n, Konkurrenz k, Blocking b, sowie direkter Enzymimmunoassay EIA). 1. Die Empfindlichkeit ist durch die Nachweisgrenze in HBsAg- bzw. anti-HBs-Einh./ml angegeben (n. a. = nicht angegeben). 2. Die Spezifität wird als + gewertet, wenn der Test entweder eine

direkte Spezifitätskontrolle automatisch ergibt oder unspezifische Resultate sehr selten auftreten (< 1%). 3. Die Testdauer wird positiv bewertet, wenn der Test innerhalb von 5 h beendet sein kann. 4. Objektive Ablesung ist nur gegeben, wenn eine unaufwendige Messung des Reaktionsausfalls in einem allgemein verfügbaren Gerät möglich ist. 5. Der Arbeitsaufwand pro Test wurde subjektiv vom Autor bewertet und berücksichtigt bereits die Verwendung technischer Hilfsmittel. 6. Die technischen Voraussetzungen sind hoch (—), wenn teure Geräte, nicht käufliche Reagenzien oder spezielle Lizenzen nötig sind. 7. Testsätze sind erhältlich. 8. Reagenzien sind erhältlich.

Der Abstand der beiden Geraden auf der Verdünnungsskala gibt direkt den relativen Gehalt der Probe („Potency“) bezogen auf die Standardprobe. Diese für alle FRIT- und EIA-Methoden geeignete Methode kann auch bei der Auswertung der QIE eingesetzt werden, wenn die Probe mehr als 10 000 HBsAg-Einh. bzw. mehr als 20 anti-HBs-Einheiten aufweist.

Wenn für semiquantitative Bestimmungen subjektiv auszuwertende Methoden verwendet werden, wie z. B. ÜE, KBR, IAHA, PHA oder PLA, ist wie üblich eine definierte Referenzprobe mitzuführen. Die Angabe erfolgt hier wohl besser als Verdünnungstiter, jedoch sollte die Titerangabe noch durch den Titer und den Gehalt der Vergleichsprobe ergänzt werden. „Korrigierte“ Titer sollten nicht verwendet werden, da der Titer an sich nichts anderes als die Verdünnung einer bestimmten Probe in einer ganz speziellen Meßreihe darstellt, nicht aber eine objektive Konzentrationsangabe. Allenfalls wäre von Titereinheiten zu sprechen, die dann immer auf eine Referenzprobe bezogen sein müssen.

Spezifität

Die Spezifität des HBsAg ist seit seiner Entdeckung durch zahlreiche inoffizielle Referenzproben, später auch durch verschiedene Serumpaneln der amerikanischen FDA definiert worden. Seit kurzem existiert ein offizielles Panel der WHO, in dem die Subtypenspezifitäten des HBsAg gemäß eines Expertenbeschlusses [27] repräsentiert sind. Alle HBsAg-Subtypen weisen definitionsgemäß die gruppenspezifische Antigenkomponente a auf. Da auch in Mitteleuropa zumindest drei verschiedene HBsAg-Subtypen vorkommen, die routinemäßig im allgemeinen nicht differenziert werden, sind für den qualitativen und noch mehr für den quantitativen Nachweis des HBsAg möglichst Antikörper der Spezifität anti-HBs/a zu verwenden. Menschliche Antiseren enthalten im allgemeinen wenig subtypspezifische Antikörper, ebenso Hyperimmunseren vom Schaf oder der Ziege. Antiseren von Kaninchen oder Meerschweinchen enthalten relativ viel subtypspezifischen Antikörper und sollten nur dann eingesetzt werden, wenn mit einer ausgewogenen Mischung der HBsAg-Subtypen immunisiert wurde [22]. Leider werden nach einer affinitätschromatographischen Reinigung des anti-HBs vorwiegend Antikörper gegen den Subtyp adw erhalten, so daß die meisten Teste mit solchen Antikörpern die Subtypen unterschiedlich nachweisen [22].

Das Fehlen von Antikörpern gegen menschliche Serumproteine muß bei geeigneten Reagenzien vorausgesetzt werden. Wenn dies der Fall ist, können unspezifische Reaktionen bei Festphasenimmuntesten nur durch Anti-Immunglobuline entstehen, die den markierten Antikörper binden. Durch Zusatz von nicht markiertem neutralem Immunglobulin ist das Spezifitätsproblem bei diesen Testen weitgehend gelöst. Bei den Agglutinationstesten und der KBR sind dagegen im positiven Fall immer mehrere Kontrollreaktionen durchzuführen.

Während bei der HBsAg-Bestimmung keine prinzipiellen Schwierigkeiten bei der Spezifitätssicherung auftreten, sind bei anti-HBs-Bestimmung durchaus solche Probleme zu beachten. HBsAg enthält neben den HBV-spezifischen

Peptiden Glykosidanteile und eventuell Wirtsproteine. Serumsubstanzen oder Antikörper, die gegen die Glykoside oder Wirtsproteine gerichtet sind, werden im Prinzip auch mit dem als Reagens verwendeten HBsAg reagieren, ohne deswegen virusspezifisch zu sein. Solche unspezifischen anti-HBs-ähnlichen Substanzen wurden bei tierischen Seren häufig beobachtet [23] und mögen auch bei Menschen gelegentlich vorkommen. Eine Inhibierbarkeit durch HBsAg in einem Spezifitätstest ergibt leider keinen Hinweis für die HBV-Spezifität einer solchen Serumaktivität. Erst wenn anstelle des kompletten gereinigten HBsAg-Partikels gereinigte HBs-Peptide eingesetzt würden, ließe sich die Spezifität aller Befunde sichern, solche Reagenzien sind jedoch zur Zeit nicht verfügbar. Es gibt Hinweise, daß die unspezifischen Befunde im allgemeinen nur schwach positiv sind und nur mit dem HBsAg von bestimmten Spendern reagieren. Die Aktivität findet sich nach Ultrazentrifugation meistens in der IgM-Fraktion (U. BÖTTCHER, pers. Mitt.). Dies spricht dafür, daß es sich um Antikörper gegen Glykoside handeln könnte.

Bei HBcAg und anti-HBc sind solche Spezifitätsprobleme nicht bekannt. Voraussetzung ist, daß gereinigtes HBcAg aus Serum oder Leber bzw. anti-HBs und anti-HBe-armes Serum mit hohem HBc-Titer als Reagens verwendet wird.

Da sich für die anti-HBc-Bestimmung vermutlich der Festphaseninhibitionstest durchsetzen wird, sind vom Prinzip her kaum unspezifische Reaktionen zu erwarten.

Bei dem HBe-System ist die Phase der Spezifitätssicherung noch nicht abgeschlossen. Inzwischen unterscheidet man e1, e2 und e3-Antigen [29]. Ein Referenzpanel der WHO enthält e1 und e2. Mit vielen Proben ist in der Immunodiffusion jedoch nur eine Linie zu sehen, deren Zugehörigkeit zu e1 bis e3 oft nur schwer erkannt werden kann. Sofern aber eine Identitätslinie mit einer der Referenzlinien beobachtet wird, muß die Reaktion als HBe-spezifisch gewertet werden. Die Spezifität der verschiedenen Agglutinations- und Radioimmunteste für das HBe-System muß erst noch ausgewertet und gesichert werden.

Ein spezielles Spezifitätsproblem stellt die Bestimmung der HBV-assoziierten endogenen DNS-Polymerase dar. Nur wenn die Aktivität durch eine Vorinkubation mit anti-HBs spezifisch entfernt wird, ist eine Reaktion als Nachweis für das Dane-Partikel zu werten [30]. Standardproben für dieses Enzym wird es wegen seiner Labilität vermutlich auch in Zukunft nicht geben.

Für alle positiven Nachweisreaktionen gilt die Forderung, daß sie durch Wiederholung, gegebenenfalls auch durch Inhibition, gesichert werden müssen. Die Häufigkeit nicht reproduzierbarer positiver Befunde hängt vorwiegend von der Qualität der Testdurchführung, daneben auch von der Festlegung des Grenzwertes, der Qualität der Proben, besonders aber auch vom Verhältnis der unspezifischen Bindung zur Gesamtmenge an markiertem Protein ab. Subjektiv abzulesende Techniken neigen naturgemäß auch zu Fehlbeurteilung bei grenzwertigem Reaktionsausfall. Obwohl solche falsch positiven Resultate bei der obligatorischen Wiederholungsuntersuchung leicht erkannt werden, sind sie in der diagnostischen Praxis äußerst lästig. Techniken, mit denen mehr als 1% nicht reproduzierbar positive

Resultate erhalten werden, sind abzulehnen oder in der Durchführung entscheidend zu verbessern. Eine Zusammenfassung der wünschenswerten Eigenschaften eines Testsystems ist in Tab. 2 angegeben.

Klinische Wertigkeit serologischer Parameter

Im Folgenden sollen der günstigste Einsatz verschiedener Nachweis-Methoden und deren Interpretation bei bestimmten diagnostischen Fragestellungen diskutiert werden.

Typisierung der akuten Virushepatitis

In Abb. 4 ist das serologische Verlaufsspektrum der akuten Virushepatitis B dargestellt. HBsAg ist meistens, aber nicht immer, vorhanden. Es erreicht jedoch im allgemeinen während der Prodromal- und der Frühphase hohe Werte, die im weiteren Verlauf noch während der akuten Phase exponentiell mit einem Faktor von 2 bis 10 pro Woche abfallen.

Der zuverlässigste Indikator einer HBV-Infektion ist das Auftreten von anti-HBc. Bereits in der frühen akuten Phase der Erkrankung ist es in wechselnd hohem, meist steil ansteigendem Titer nachweisbar. Das Titermaximum wird meist einige Wochen nach Ausbruch der Erkrankung, oft aber schon zu Beginn erreicht. Während dieser Zeit ist anti-HBc regelmäßig in der IgM-Fraktion der Immunglobuline nachweisbar.

Im allgemeinen wird es das Ziel sein, möglichst rasch durch den serologischen Befund die klinische Diagnose „Virushepatitis“ zu verifizieren und zwischen den Virustypen A und B, bzw. „unbekannt“ zu differenzieren. Man wird daher bei einer Erstuntersuchung HBsAg, anti-HBc und anti-HA parallel mit möglichst empfindlichen Methoden bestimmen. Die Bestimmung des anti-HBc ist bedeutsam, da etwa 12% der akuten Hepatitis B-Fälle ohne nachweisbares HBsAg verlaufen [4]. Zudem ist ein positiver anti-HBc-Befund in gewisser Weise eine Bestätigung eines qualitativen HBsAg-Befundes, während umgekehrt HBsAg ohne anti-HBc nach Ausbruch einer akuten Hepatitis B praktisch nie beobachtet wird.

Wenn HBsAg und anti-HBc nachgewiesen werden, kann es sich entweder tatsächlich um eine akute Hepatitis B handeln oder um eine Non B-Hepatitis eines chronischen HBV-Trägers. Angesichts der niedrigen HBV-Trägerrate in unserem Lande dürfte erstere Interpretation fast immer

Tabelle 2:
Anforderungen an Nachweismethoden für HBsAg und anti-HBs

1. Spezifität:	< 0,2% unspez. Resultate
2. Nachweisgrenze:	< 10 Einheiten HBsAg/ml < 10 Einheiten anti-HBs/Liter
3. Auswertung:	Durch einfache Meßgeräte, möglichst nicht qualitativ
4. Reproduzierbarkeit:	< 1% falsch pos. Resultate
Quantitativ:	< 10% Variationskoeffizient
5. Testdauer:	unter 5 Stunden
6. Arbeitsaufwand:	unter 1 Minute/Test
7. Technische Voraussetzungen:	Keine Radioaktivität, preiswerte Meßgeräte
8. Verfügbarkeit:	Kommerziell erhältlich

zutreffen. Bei Patienten aus Gebieten mit hoher HBsAg-Trägerrate ist die zweite Interpretation in Betracht zu ziehen. Folgende Bestimmungen erlauben zusätzliche Aussagen: Bei einer akuten Hepatitis B werden sehr häufig zu Beginn HBsAg-Konzentrationen über 25 000 Einheiten/ml erreicht [33] und, je nach Nachweisempfindlichkeit, bei 20 bis 85% der Fälle HBeAg gefunden [24]. Anti-HBc wird zu Beginn fast ausschließlich in der IgM-Klasse gefunden [31], erst nach 6 Wochen ist es vorwiegend in der IgG-Klasse, aber selbst nach 6 Monaten sind immer noch Spuren anti-HBc in der IgM-Fraktion nachzuweisen (GERLICH u. LÜER, nicht publ. Resultate). Bei gesunden HBsAg-Trägern werden diese Merkmale nicht gefunden.

Eine serologische Differenzierung zwischen akuter und chronischer Hepatitis B ist dagegen auf der Basis eines Einzelbefundes im allgemeinen nicht möglich, da auch bei chronisch HBV-infizierten Personen mit einer Lebererkrankung häufig hohe HBsAg-Konzentrationen, HBeAg und sogar anti-HBc in der IgM-Klasse gefunden werden [31 u. eigene nicht publizierte Ergebnisse]. Es könnte sich also theoretisch bei einer akuten HBsAg positiven Hepatitis auch um eine akute Non B-Hepatitis auf dem Boden einer

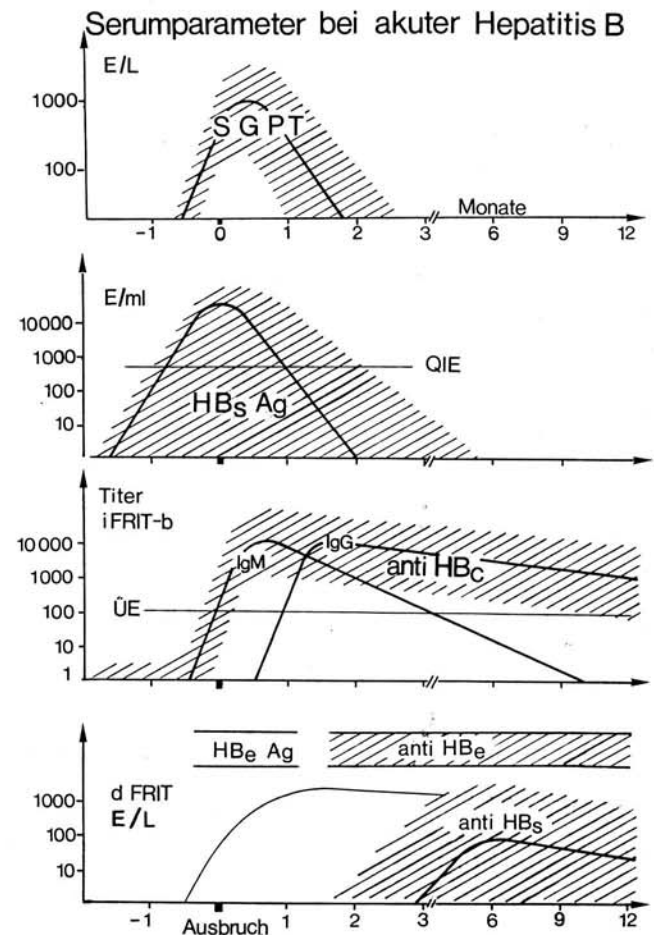


Abb. 4: Schematischer Verlauf der Serumparameter bei akuter Hepatitis B. Die schraffierten Flächen geben den Bereich der individuellen Streuung von Fall zu Fall. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den typischen Verlauf der Serumparameter.

chronischen Hepatitis B handeln. Eine Klärung dieser Situation kann nur die histologische Untersuchung bringen.

Wenn zu Beginn einer akuten Hepatitis nur anti-HBc, nicht aber HBsAg nachweisbar ist, handelt es sich entweder um eine akute HBV-Infektion ohne HBs-Antigenämie oder um eine länger zurückliegende HBV-Infektion, die nicht in Bezug zur aktuellen Erkrankung steht. In diesem Fall sollte sich zur weiteren Abklärung eine Bestimmung des anti-HBc-Titers und wenn möglich eine Bestimmung des anti-HBc der IgM-Fraktion anschließen. Außerdem sollte anti-HBs im Radioimmuntest bestimmt werden. Eine akute Hepatitis B dieser Art gibt sich durch anti-HBc in der IgM-Fraktion, einen hohen Titer während der akuten Phase, gelegentlich auch durch Titeranstieg während der ersten Wochen zu erkennen. Anti-HBs wird zu Beginn selten gefunden, erscheint jedoch fast regelmäßig in der Rekonvaleszenz. Zurückliegende Infektionen zeigen kein anti-HBc in der IgM-Fraktion, niedrige Titer und häufig (etwa 80 %) anti-HBs von Anfang an.

Die serologische Differenzierung einer Typ B-Hepatitis von einer Non B-Hepatitis bei Vorliegen eines oder mehrerer HBV-Parameter ist in Tab. 3 dargestellt.

Verlaufskontrolle der akuten oder chronischen Hepatitis B

Da etwa 8 bis 10 % der akuten Hepatitis B-Fälle einen chronischen oder zumindest protrahierten Verlauf nehmen [32], ist bei der Hepatitis B auf die Verlaufskontrolle besonders zu achten. HBsAg negative Hepatitis B-Fälle oder Fälle mit einem sehr frühen Auftreten des Anti-HBs heilen im allgemeinen rasch und vollständig aus. Das gleiche gilt auch für die Fälle mit einer sehr schnellen Eliminationsrate des HBsAg, auch wenn hohe Anfangswerte vorlagen [33].

Fast alle chronischen Verläufe sind dadurch gekennzeichnet, daß HBsAg positiv bleibt, zum Teil auch HBeAg, und daß der anti-HBc-Titer nicht abfällt. Die schnellste prognostische Aussage erhält man wohl durch die wöchentliche Kontrolle der HBsAg-Konzentration. Ein Anstieg der HBsAg-Konzentration spricht für eine sehr frühe Phase der Erkrankung oder bereits für die Ausbildung einer chronischen HBV-Infektion. Fehlt ein klarer Abfall der HBsAg-Konzentration um mehr als 60 % innerhalb der ersten 4 Krankheitswochen, ist fast mit Sicherheit die Entwicklung zu einer chronischen Lebererkrankung durch das HBV zu erwarten. Bei sehr hohen Anfangskonzentrationen über 60 000 HBsAg-Einh./ml wird dreimal häufiger die Entwicklung einer HBV-Persistenz beobachtet als bei

Tabelle 3:
Unterscheidung von Hepatitis B und Non B bei Vorliegen von HBV-Merkmalen

Parameter	Typ B		Non B	
	Akut	Chron.	Ges. Tr.*	Immun**
anti-HBc	++	++	++	+
IgM	+	+/-	-	-
HBsAg	++(-)	++(-)	+	-
Konzentration	Fallend	Variabel	Konstant	-
HBeAg	+(-)	+/-	-	-
anti-HBe	-(+)	-(+)	++	+/-
anti-HBs	-(+)	-(+)	-	+(+)

* gesunde HBsAg-Träger

** zurückliegende HBV-Infektion

Fällen mit einer niedrigeren Anfangskonzentration [33]. Über den Schweregrad und die Spätprognose der resultierenden chronischen Hepatitis kann aus serologischen Parametern jedoch bislang nicht geschlossen werden.

Wie mehrere Studien zeigen [32, 34], werden bei der Mehrzahl der Fälle von chronischer Hepatitis in Deutschland Zeichen einer chronischen HBV-Infektion gefunden. Das virusserologische Muster ähnelt – wie bereits besprochen – weitgehend dem der akuten Hepatitis B. So gesehen kann man eine akute Hepatitis B mit nachfolgender HBsAg-Persistenz als Frühphase einer chronischen Hepatitis B betrachten. Interessanterweise haben die leichter verlaufenden chronisch persistierenden Fälle im Mittel höhere HBsAg-Werte und sind häufiger HBeAg-positiv als Fälle chronisch aggressiver Hepatitis oder Zirrhose (DFG-Studie). Prognostische Schlüsse können daher aus den HBV-Serumparametern kaum gezogen werden.

Epidemiologische Wertigkeit HBV-spezifischer Parameter

Identifizierung von Hepatitis B-Virus-Trägern

Ein zentrales Ziel der Hepatitis-Bekämpfung muß die Identifizierung von Virus-Trägern sein. Da das HBV nur in geringer Menge in Körperausscheidungen vorliegt, dagegen massenhaft im Serum, ist bei Blutübertragungen der höchste Suchaufwand nach Trägern zu betreiben. Selbst bei niedrigem Virustiter ist eine Infektion angesichts des großen übertragenen Blutvolumens wahrscheinlich. Falls die Übertragung der Infektion durch Schmier- oder Kontaktinfektion erfolgt, sind wahrscheinlich hohe Serumtiter notwendig.

Der direkte Nachweis kompletter HBV-Partikel ist durch die Bestimmung der viralen endogenen DNS-Polymerase oder durch elektronenmikroskopischen Nachweis der Dane-Partikel möglich. Abgesehen davon, daß beide Methoden zu aufwendig für ein Screeningprogramm sind, reicht ihre Empfindlichkeit mit Sicherheit nicht aus, um auch nur die Mehrzahl der Virusträger zu erkennen. Auch das HBsAg reicht unter Umständen nicht aus, um das Vorliegen von Viruspartikeln im Serum auszuschließen. Zahlreiche inapparente und ein Teil der apparenten Hepatitis B-Fälle verlaufen ohne HBs-Antigenämie. In einigen Fällen wurde eine Infektion mit dem HBV nach Bluttransfusionen von anti-HBc-positivem Blut beobachtet [35]. Es bleibt daher zu erwägen, alle Blutspender nicht nur auf HBsAg, sondern auch auf anti-HBc zu untersuchen. Spenderblut mit hohem anti-HBc-Titer würde nicht zu verwenden sein. Diese Maßnahme würde die sogenannten „Low-HBsAg-Carrier“ (HOOFNAGLE) eliminieren, ohne daß die Empfindlichkeit des HBsAg-Nachweises weiter gesteigert werden müßte. Andererseits ist die Effizienz eines solchen anti-HBc-Screenings noch nicht erwiesen, so daß keine generelle Empfehlung für die Überwachung der Blutspender mit dem anti-HBc-Nachweis gegeben werden kann.

Es wurde beobachtet, daß in der Frühphase einer HBV-Infektion, wenn die Immunreaktion noch nicht eingetreten ist, der Virustiter bei fehlendem anti-HBc und eventuell sehr niedrigem HBsAg bereits sehr hoch sein kann [36]. Eine sichere Identifikation solcher Virusträger ist trotz eines effizienten HBsAg- und anti-HBc-Screenings nicht ge-

währleistet. Da diese Infektionsphase wohl nur kurz ist, mag die Häufigkeit solcher Träger sehr gering sein. Es bleibt jedoch die Forderung zu stellen, daß auch bei aufwendigem Screening Personen mit einem hohen Infektionsrisiko, wie z. B. nicht immunes medizinisches Personal, von der Blutspende weitgehend auszuschließen wären.

Eine größere Bedeutung als Infektionsquelle außerhalb des Blutspendewesens werden jedoch die chronischen Virusträger haben, die durch den HBsAg-Nachweis nach heutiger Kenntnis sicher erfaßt werden. Neben den Patienten mit apparenten akuten oder chronischen Lebererkrankungen sind es vor allem infizierte Personen mit inapparenten leichten Lebererkrankungen und mit einer endogenen oder exogenen Immunsuffizienz. Das Hauptproblem ist es, den Personenkreis, der zu überwachen ist, einzugrenzen. Methodisch wären hierfür keine hohen Anforderungen zu stellen, da fast alle diese Virusträger hohe HBsAg-Konzentrationen aufweisen und mit einer simplen Technik erfaßt werden können. Ein anti-HBc-Nachweis wird hier kaum zusätzliche Virusträger mit hohem HBV-Titer entdecken.

Zahlreiche Berichte deuten darauf hin, daß es zwei Gruppen von HBV-Trägern gibt: solche mit sehr hohem HBV-Titer im Blut und solche mit niedrigem oder fehlendem Titer. Am ehesten könnten die beiden Gruppen durch Bestimmung der endogenen DNS-Polymerase differenziert werden. Mehrere Studien haben gezeigt, daß zwischen der DNS-Polymerase und dem HBeAg ein korrelativer Zusammenhang besteht, darüberhinaus wird im allgemeinen auch eine höhere HBsAg-Konzentration als bei DNS-Polymerase negativen Trägern gefunden. Die Unterscheidung entspricht weitgehend der, die in Tab. 3 für gesunde und erkrankte HBV-Träger gegeben ist.

Durchseuchungsstudien

Wenn die Häufigkeit der Hepatitis B-Virusinfektionen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen kontrolliert werden soll, erhebt sich die Frage nach dem HBV-Parameter und der Nachweismethode, die die vollständigste Auskunft erlauben. Bislang wurden für Durchseuchungsstudien vorwiegend anti-HBs-Bestimmungen mit dem Radioimmunistest durchgeführt. In der gesunden Bevölkerung gibt dieser Parameter ein annähernd richtiges Bild von der relativen Häufigkeit länger zurückliegender HBV-Infektionen. Gerade ablaufende Infektionen werden dagegen mit dem anti-HBs kaum erfaßt. Abb. 5 gibt die relative Häufigkeit der Parameter HBsAg, anti-HBs und anti-HBc bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen bzw. Patientenkollektiven wieder. In allen Gruppen (bis auf Blutspender mit normalen Transaminasewerten) wird anti-HBc am häufigsten gefunden. Dies gilt für gesundes medizinisches Personal ebenso wie für Personen mit klinisch inapparenten Leberschädigungen (Blutspender mit erhöhten Transaminasen) als auch für Patienten mit apparenten akuten oder chronischen Hepatitiden. In all diesen Gruppen würde durch eine Bestimmung des anti-HBs und HBsAg ein wesentlicher Anteil von etwa 15 bis 25% der gesunden Bevölkerung und fast alle subklinischen Hepatitis B-Virus-Infektionen nicht erkannt werden. Umgekehrt sind alle HBsAg-positiven Patienten und fast alle scheinbar gesunden HBsAg-Träger anti-HBc-positiv.

Nach akuten HBV-Infektionen persistiert anti-HBc zuverlässiger als anti-HBs, wie aus Tab. 4 hervorgeht, es gibt jedoch einen Anteil von Patienten, die nach einigen Jahren auch anti-HBc negativ werden. Es ist also bei Durchseuchungsstudien darauf zu achten, daß auch mit dem anti-HBc nur ein Teil der länger zurückliegenden Infektionen erfaßt werden kann. Anders als bei der Diagnostik akuter oder chronischer Infektion ist außerdem auch auf höchstmögliche Empfindlichkeit der Nachweisttechnik für anti-HBc zu achten.

Die Häufigkeit eines positiven anti-HBc-Befundes (mit oder ohne gleichzeitigem HBsAg bzw. anti-HBs) nimmt mit dem Infektionsrisiko einer Bevölkerungsgruppe zu. Dies geht aus einem Vergleich von gesunden Blutspendern und medizinischem Personal hervor, der in Tab. 5 dargestellt ist. Der Anteil der Personen, die nur anti-HBs, nicht aber anti-HBc positiv sind, bleibt dagegen mit 1 bis 2% relativ konstant. Angesichts der bereits in Abschnitt „Standardisierung der Testergebnisse – Spezifität“ diskutierten Probleme ist anzunehmen, daß hier wohl vorwiegend Reaktionen erfaßt werden, die nicht auf eine HBV-Infektion zurückgehen. So kann sich auch die Beurteilung einer Immunität gegen HBV-Infektionen nicht ausschließlich auf die anti-HBs-Bestimmung stützen. Andererseits ist eine wiederholte ungewollte Immunisierung durch kleine Dosen HBsAg auch in der gesunden Bevölkerung nicht völlig ausgeschlossen.

Sicherlich wird durch die Verfügbarkeit eines einfachen und empfindlichen anti-HBc-Tests die Bedeutung des anti-

Tabelle 4:
Persistenz der anti-HBV-Antikörper 6 Jahre nach ausgeheilter Hepatitis B

Positiv im FRIT	Anzahl der Patienten
anti-HBs und anti-HBc	23
Nur anti-HBc	6
Nur anti-HBs	0
Keine anti-HBV-AK	4

(ANDERTEN, GERLICH U. THOMSEN)

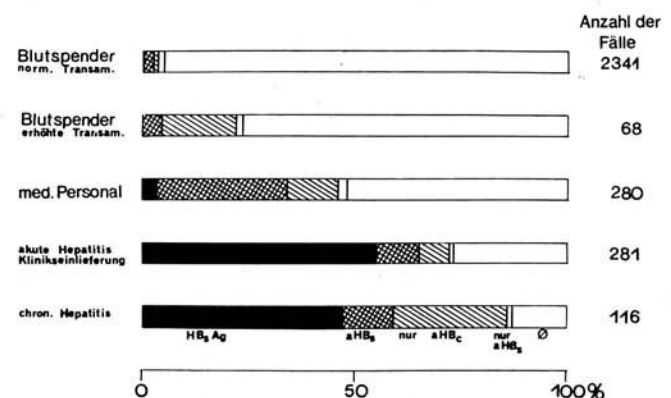


Abb. 5: Prozentuale Häufigkeit HBV-spezifischer Serumparameter bei verschiedenen Kollektiven aus dem nördlichen Bereich der Bundesrepublik Deutschland.

Tabelle 5:

Häufigkeit serologischer Muster bei gesunden Personen mit hoher und niedriger Durchseuchung

Resultat im FRIT		Medizin. Personal %	Blut-Spender %	Verhältnis Med. P./Bl.
HBsAg	+			
anti-HBc	+	3	0,2	15
anti-HBc	+			
anti-HBs	—	12,0	0,8	15
anti-HBc	+			
anti-HBs	+	30,4	2,8	11
anti-HBc	+			
Total		45,4	3,8	12
anti-HBc	—			
anti-HBs	+	2,0	1,2	1,6

HBs als Durchseuchungskriterium zurückgedrängt. Bei der Indikation und der Kontrolle von prophylaktischen Maßnahmen wie HBIG-Verabreichung und HBsAg-Vakzinierung wird es jedoch zentrale Bedeutung erlangen.

Zusammenfassung

Aktive Infektionen mit dem HBV sind in der Bundesrepublik Deutschland bei etwa 60% der akuten wie auch der chronischen Hepatitiden nachzuweisen. In etwa 85% der Fälle kann das HBV durch den HBsAg-Nachweis im Serum erkannt werden. Die restlichen Fälle können durch den Nachweis von anti-HBc erfaßt werden. Bei einem Screening auf HBV-Infektionen sollte daher neben HBsAg immer auch anti-HBc bestimmt werden.

Falls HBsAg positiv ist, sollte sich eine quantitative Bestimmung der HBsAg- und der anti-HBc-Konzentration anschließen, sowie eine Untersuchung im HBe-System. Ein Nachweis der Dane-Partikel durch Immunelektronenmikroskopie, HBcAg- oder DNS-Polymerasebestimmung ist aufwendig und relativ unsicher. Ein indirekter Hinweis auf hohe Dane-Partikelzahlen und mutmaßlich hohe Infektiosität ergibt sich wenn a) HBeAg positiv ist b) die HBsAg-Konzentration über 15 µg/ml beträgt und anti-HBe nicht nachweisbar ist c) HBsAg deutlich positiv, anti-HBc aber negativ oder nur schwach positiv ist (Frühphase oder Immunsuppression) d) biochemisch oder histologisch eine Lebererkrankung bei positivem HBsAg-Befund vorliegt. Auch wenn keines dieser Merkmale vorliegt, ist HBsAg positives Blut als potentiell infektiös zu betrachten. Unter Umständen gilt dies auch für Blut, in dem anti-HBc nicht aber anti-HBs nachweisbar ist.

Falls nur anti-HBc im Screening positiv ist, sollte sich eine semiquantitative Bestimmung des anti-HBs und des anti-HBc anschließen. Um im Zweifelsfall zwischen frischen und länger zurückliegenden Infektionen zu differenzieren, ist wünschenswert, die IgM-Antikörper zu bestimmen. Ein hoher anti-HBc-Titer spricht für eine aktive HBV-Infektion. Der positive Nachweis von anti-HBs oder anti-HBe ist bei akuten oder chronischen Lebererkrankungen durch das HBV selten, schließt diese jedoch nicht aus. Ein Abfall des HBsAg, des anti-HBc und das Auftreten von anti-HBs und/oder anti-HBe nach einer akuten Hepatitis B gelten prognostisch als günstig.

Anti-HBs-positive Personen gelten gegen eine Hepatitis B Erkrankung als geschützt. Jedoch sollte die Spezifität schwach positiver anti-HBs Befunde (unter 20 milli Einh./ml) kritisch beurteilt werden, wenn anti-HBc gleichzeitig nicht nachweisbar ist. Zurückliegende HBV-Infektionen werden am sichersten durch einen mittleren oder niedrigeren anti-HBc-Titer erkannt.

Für Screening-Untersuchungen sind möglichst empfindliche Methoden einzusetzen. Zum Nachweis von HBsAg und anti-HBs haben sich die direkten Festphasensandwichassays mit radioaktiv oder enzymatisch markierten Reagenzien bestens bewährt. Die Nachweisgrenze sollte routinemäßig mit definierten Referenzpräparaten geprüft werden, wobei diese Präparate auf höchstens 20 milli/Einh. anti-HBs bzw. 10 Einh. HBsAg pro ml eingestellt sein sollten. Zum Nachweis von anti-HBc liegt ein empfindlicher und praktikabler Testsatz vor, für das HBe-System jedoch noch nicht. Hier mag eine optimierte Immundiffusion vorübergehend einen gewissen Behelf darstellen. Die quantitative HBsAg-Bestimmung erfolgt am besten mit der Immunelektrophorese nach LAURELL oder der KBR, die meisten Festphasenimmunteste sind für den wichtigen Konzentrationsbereich zwischen 100 und 100 000 Einh/ml weniger geeignet.

Summary

Laboratory Diagnosis of Hepatitis B Virus Infection

In the Federal Republic of Germany, active HBV infection may be demonstrated in about 60% of acute and chronic cases of hepatitis. In about 85% of cases, HBV may be detected by demonstration of HBsAg in serum. The remaining cases may be accounted for by a demonstration of anti-HBc. Thus, screening for HBV infections should include, in addition to HBsAg, also a determination of anti-HBc.

In the event of HBsAg positivity, there should also be quantitative determination of the HBsAg and anti-HBc concentrations plus examination in the HBe system. Demonstration of Dane particles by immunoelectron microscopy or determination of HBcAg or DNA polymerase involve high expenditure and are relatively unreliable. High numbers of Dane particles and high infectivity may be inferred indirectly if a) there is HBeAg positivity; b) the HBsAg concentration is exceeding 15 µg/ml and anti-HBe cannot be demonstrated; c) HBsAg is clearly positive but anti-HBc negative or only weakly positive (early phase or immunosuppression); and d) liver disease has been confirmed by biochemistry and histology with simultaneous HBsAg positivity. Even if none of these criteria is present, HBsAg-positive blood should be considered as potentially infectious. Under certain conditions, this may also apply to blood in which anti-HBc, however not anti-HBs can be demonstrated. If screening reveals only anti-HBc positivity, this should be followed by a semi-quantitative determination of anti-HBs and anti-HBe. To enable a differentiation between fresh and less recent infections in doubtful cases, a determination of IgM antibody is desirable. A high anti-HBc titre would speak for active HBV infection. Anti-HBs or anti HBe positivity is rare in cases of acute or

chronic hepatic disease due to HBV, it does, however, not exclude the presence of the latter. Decreasing HBsAg and anti-HBc titres and the occurrence of anti-HBs and/or anti-HBe following acute hepatitis B are considered as signs of a favourable prognosis.

Persons showing anti-HBs positivity are considered as being protected against hepatitis B. Nevertheless, the specificity of only slightly positive anti-HBs findings (below 0.02 units/ml) should be rated critically if at the same time, anti-HBc cannot be demonstrated. Intermediate or low anti-HBc titres mean the most reliable indication of HBV infection in a patient's history.

For screening studies, highly sensitive methods should be used. The direct solid-phase sandwich assay using reagents labelled by radioactivity or enzymes have well proved their suitability for the determination of HBs Ag and anti-HBs. The detection limit should be routinely checked by means of defined reference preparations adjusted to a maximum of 0.02 units/ml anti-HBs and 0.01 units/ml HBsAg, respectively. For the determination of anti-HBc a sensitive and practicable test kit is available, however not for the HBe system. In the latter case, optimized immunodiffusion might serve as a temporary solution. For quantitative determination of HBsAg, the best results have been obtained by immunoelectrophoresis according to LAURELL or the CFT whereas most solid-phase immune reactions are less suitable for the important concentrations range between 100 and 100 000 units/ml.

Literatur:

- [1] Blumberg, B. S.: Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Sci.* **197** (1977) 17.
- [2] Le Bouvier, G. L., Mc Collum, R. W., Hierholzer, W. J. et al.: Subtypes of Australia and hepatitis B virus. *J. amer. med. Ass.* **222** (1972) 928.
- [3] Magnus, L. O. and Espmark, J. A.: New Specificities in Australia antigen positive sera. *J. Immun.* **109** (1972) 1017.
- [4] Gerlich, W. H., Biswas, R. M., Stamm, B. and Thomssen, R.: The diagnostic significance of antibodies against hepatitis B core-antigen. *Klin. Wschr.* **55** (1977) 1051.
- [5] Laurell, C. B.: Electroimmuno assay. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **29** Suppl. 124 (1972) 21.
- [6] Gerlich, W. H. and Thomssen, R.: Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume. *Develop. biol. Standard.* Vol. 30, 78. S. Karger Verlag, Basel 1975.
- [7] Cayzer, I., Dane, D. S., Cameron, C. H. and Denning, J. V.: Rapid haemagglutination test for hepatitis B antigen. *Lancet I* (1974) 947.
- [8] Schuur, A. H. and Kakaki, J.: Reversed haemagglutination test for the detection of hepatitis B surface antigen. *Vox. Sang.* **27** (1974) 97.
- [9] Hirata, A. A., Emerick, A. J. and Boley, W. F.: Hepatitis B Virus Antigen detection by reverse passive hemagglutination. *Proc. Exp. Biol. Med.* **143** (1973) 761.
- [10] Gerlich, W. H., Stamm, B. and Thomssen, R.: Quantitative standardization in the detection of hepatitis B surface antigen. Results of a collaborative study involving 74 laboratories. *J. biol. Standard.* **4** (1976) 189.
- [11] Kley, S.: Falsch positive Ergebnisse mit den Latexfixationstest auf Australia (SH)-Antigen durch Medikamente. *Dtsch. med. Wschr.* **97** (1972) 1547.
- [12] Vyas, G. N. and Shulman, N. R.: Hemagglutination assay for antigen and antibody associated with viral hepatitis. *Sci.* **170** (1970) 332.
- [13] Aikawa, T., Sairenji, H. and Furuta, S.: Seroconversion from hepatitis B e antigen to anti HBe in acute hepatitis B virus infection. *New. Engl. J. Med.* **298** (1978) 439.
- [14] Hillemann, M. R., Provost, P. J., Miller, W. J. et al.: Immune adherence and complement-fixation tests for human hepatitis A. Diagnostic and epidemiologic investigations. *Develop. biol. Standard.* Vol. 30, 383. S. Karger Verlag, Basel 1975.
- [15] Tsuda, F., Takahashi, T., Takahashi, Y. et al.: Determination of antibody to hepatitis B core antigen by means of immune adherence hemagglutination. *J. Immunol.* **115** (1975) 834.
- [16] Mayumi, M., Okochi, K. and Nishioka: Detection of Australia antigen by means of immune adherence hemagglutination test. *Vox. Sang.* **20** (1971) 178.
- [17] van Weemen, B. K. and Schuur, A. H. W. M.: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters* **15** (1971) 232.
- [18] Maiolini, R., Ferrua, B. and Masseyeff, R.: Enzymoimmunoassay of human alpha-fetoprotein. *J. Immunol. Meth.* **6** (1975) 335.
- [19] Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of IgG. *Immunochem.* **8** (1971) 871.
- [20] Figenschau, K. J. and Ulstrup, J. C.: Staphylococcal radioimmunoassay for hepatitis B antigen and antibody. *Acta path. Microbiol. Scand. Sect. B* **82 B** (1974) 422.
- [21] Ling, C. M. and Overby, L. R.: Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmune assay with J-125-antibody. *J. Immunol.* **109** (1972) 834.
- [22] Gerlich, W. H., Stamm, B. u. Thomssen, R.: Vergleich von radiojod- und peroxidase-markierten Antikörpern zum Nachweis von HBsAg im Festphasensystem. *Ärztl. Lab.* **23** (1977) 377.
- [23] Purcell, R. H., Gerin, I. L., Almeida, J. D. and Holland, P. V.: Radioimmunoassay for the detection of the core of the Dane-particle and antibody to it. *Intervirology* **2** (1973/74) 231.
- [24] Frösner, G. G., Sugg, U., Haas, U. et al.: Solid phase radioimmune assay for HBeAg and anti-HBe. *Fresenius Z. anal. Chem.* **290** (1978) im Druck.
- [25] Schober, A., Biswas, R. M. and Thomssen, R.: Direct solid-phase radioimmunoassay for detection of antibody to hepatitis B surface (HBs) antigen. *Develop. biol. Standard.* **30**, 93. S. Karger Verlag, Basel 1975.
- [26] Felgner, P.: A new technique of heterogenous enzyme-linked immunosorbent assay, stick-ELISA. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* **240** (1978) 112.
- [27] Soulier, J. P.: HBs Antigen Subtypes Discussions. *Bibl. Haematol.* **42**, 129. S. Karger Verlag, Basel 1976.
- [28] Böttcher, U. et al.: Viral hepatitis: epidemiology (discussion). *Amer. J. med. Sci.* **270** (1975) 324.
- [29] Trepo, C. G.: The e-antigen and anti e Symposium on viral hepatitis San Francisco 16. 3. 1978.
- [30] Imai, M., Tachibana, F. C. and Moritsugu, Y.: Hepatitis B Antigen-Associated Deoxyribonucleic Acid Polymerase Activity and e Antigen/anti e-System. *Infect. Immun.* **14** (1976) 631.

- [31] Houwen, B., Cnossen, J., de Gast, G. C. et al.: Antibodies to hepatitis B Core antigen (HBcAg) of IgG and IgM Class in acute and chronic hepatitis B. *Arch. Hell. Med. Sc.* **23** Suppl. (1977) 45.
- [32] Kaboth, U. et al.: Zwischenbericht über die kooperative DFG-Studie „Akute Virushepatitis“. *Verh. Ber. Dtsch. Ges. inn. Med.* **82** (1976) 399.
- [33] Gerlich, W. H., Stamm, B. u. Thomssen, R.: Prognostische Bedeutung des quantitativen HBsAg-Nachweises bei der akuten Hepatitis B. *Verh. Dtsch. Ges. inn. Med.* **83** (1977) 554.
- [34] -, Ortman, H. u. Klinge, O.: Die Ätiologische Bedeutung des Hepatitis B Virus für die chronische Hepatitis. 1. Symposium d. dtsch. Ges. f. Hygiene u. Mikrobiol., Sekt. Virol. Gießen, 15. 10. 1977.
- [35] Hoofnagle, J.: Clinical significance of anti-HBc. Symposium on Viral Hepatitis San Francisco 17. 3. 1978.
- [36] Thomssen, R., Gerlich, W. H., Stamm, B. et al.: Ätiologie der Hepatitis B: Vorläufige Ergebnisse einer Kooperation Studie. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A* **235** (1976) 242.

Anschr. d. Verf.: Dr. phil. nat. W. GERLICH, Hygiene-Institut der Universität, Kreuzberggring 57, 3400 Göttingen.