

Bestimmungsmethoden der Hepatitis B-Antigene und ihrer Antikörper¹

WOLFRAM GERLICH

Mit 4 Abbildungen

1. Nomenklatur der Hepatitis B-Antigene

Der Erreger der Hepatitis B (HB) ist noch nicht endgültig charakterisiert, jedoch ist durch indirekte Schlüsse ein weitgehend gesicherter Kandidat für das Hepatitis B-Virus (HBV), nämlich das Dane-Partikel, gefunden (1). Die äußere Hülle der etwa 45 nm großen sphärischen Partikel bildet das „Hepatitis B-Oberflächen (englisch surface) Antigen“, abgekürzt HBsAg (2). Die innere Komponente des Dane-Partikels, die dem Nucleocapsid entsprechen mag, wird als Hepatitis B-Core-Antigen bezeichnet, abgekürzt HBcAg. Die entsprechenden Antikörper sollen mit anti-HBs und anti-HBc abgekürzt werden (2). Eine Strukturkomponente mit möglicher Antigenität ist die partikelgebundene DNS-Polymerase des Dane-Partikels (3). Möglicherweise entspricht sie einem weiteren, für die HB spezifischen Ag/Ak-System, das durch das HB e-Antigen gebildet wird, dessen funktionelle Bedeutung aber noch nicht endgültig geklärt ist (4).

2. Nachweis von HBsAg

HBsAg tritt während akuter und chronischer Infektionen mit dem HBV häufig in großen Mengen als überschüssiges Hüllprotein im Blut auf und bildet hier 12–30 nm große runde Partikel. Ein großer Teil der chronisch infizierten Personen ist klinisch gesund, und daher wurde HBsAg zunächst bei genetischen Studien in gesunden Personen durch Agardiffusion – AGD – von BLUMBERG entdeckt. Nachdem der Zusammenhang mit der Hepatitis B gesichert war, wurden die etwas empfindlicheren Methoden Überwanderungselektrophorese – ÜE – (5), Komplexbindungsreaktion -KBR- (6), später der Festphasenradioimmuntest -FPRIT- (7) und die reverse passive Hämagglutination -RPHA- (8) zum Nachweis des HBsAg an vielen Stellen eingeführt.

Da die Aussonderung von HBsAg positiven Blutkonserven heute zu den Routinemaßnahmen der Blutbanken gehört, muß die Nachweisttechnik bei größtmöglicher Empfindlichkeit und Spezifität in kurzer Zeit mit geringem Arbeitsaufwand durchzuführen sein.

2.1 Vergleich der Nachweisempfindlichkeit der wichtigsten Methoden

In einem Ringversuch des Hygiene-Instituts Göttingen untersuchten 74 Laboratorien der BRD einen identischen Satz von codierten HBsAg-Proben mit ver-

¹ Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

schiedenen Methoden. Die Konzentration der Proben reichte in Zweierstufen von 16 000 ng spezifischem Antigenprotein pro ml Serum bis 0,02 ng/ml. Die Konzentration, die in einem Labor mit einer Methode gerade noch ein sicher positives Ergebnis erbrachte, wurde als individuelle Nachweisgrenze aufgefaßt. Die Streuung der Nachweisgrenzen von Labor zu Labor und ihre Medianwerte sind für die einzelnen Methoden in Abb. 1a dargestellt. Mit allen Methoden traten große Schwankungen der Empfindlichkeit auf, die stärksten bei der ÜE, die geringste mit der PHA „Hepanosticon“. Erwartungsgemäß war der FPRIT in allen Laboratorien am empfindlichsten, während die anderen Verfahren in weiten Bereichen Überlappungen der Nachweisgrenzen aufwiesen. Anhand der Medianwerte kann jedoch die Reihenfolge FPRIT, RPHA, KBR, ÜE und AGD für die Empfindlichkeit festgelegt werden. Bei der RPHA verwendeten die meisten Teilnehmer des Ringversuchs ein etwas unempfindlicheres Reagenz und lasen schwach positive Reaktionen zu vorsichtig ab, so daß hier wohl die Empfindlichkeit der RPHA nicht ganz ausgeschöpft wurde.

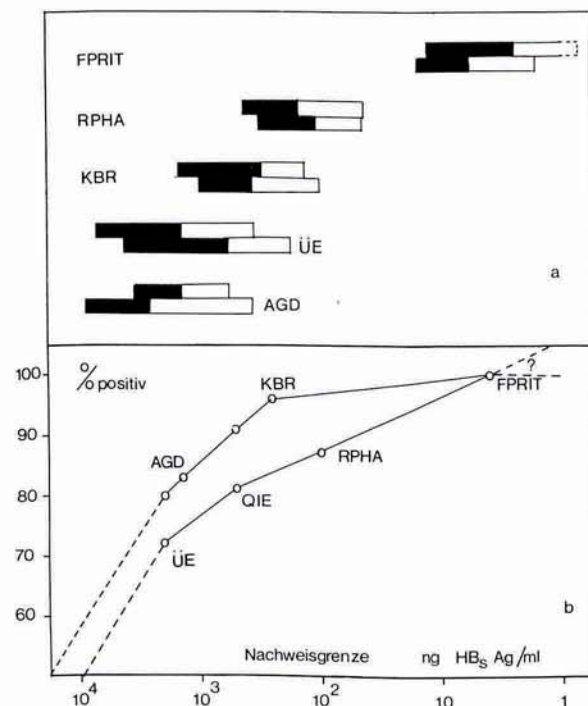


Abb. 1a. Medianwerte und Streuung der Nachweisgrenzen für HBsAg bei dem Vergleich von 74 Laboratorien und verschiedenen Methoden. Die Hell-Dunkelgrenze gibt die Konzentration in ng Antigenprotein/ml Serum wieder, die von 50% der Untersucher gefunden wurde, während die Untergrenze dem 95% Wert und die Obergrenze dem 5% entspricht.

Abb. 1b. Zusammenhang zwischen der prozentualen Ausbeute an positiven Ergebnissen und der Empfindlichkeit der Nachweismethode. Untersucht wurden FPRIT positive Seren von 60 Blutspendern und 271 HB Patienten zu Beginn der akuten Phase. Die 50% Ausbeute wurde aus der Konzentrationsverteilung der Proben, gemessen durch QIE, geschätzt (16).

In Abb. 1b ist die Ausbeute der Tests dargestellt, d. h. wieviel im FPRIT positive Fälle bei der Verwendung weniger empfindlicher Techniken im Hygiene-Institut Göttingen nicht erfaßt werden. Gerade die Blutspender weisen häufig niedrige HBsAg-Spiegel auf, so daß bei geringer Empfindlichkeit der Nachweistechnik viele Träger unerkannt bleiben. Mit den unempfindlichsten Durchführungsarten der ÜE würden z. B. nur 50% der Träger entdeckt werden, die mit dem FPRIT erfaßt werden. Zu Beginn der akuten Hepatitis werden dagegen meistens höhere HBsAg-Werte beobachtet, so daß die Empfindlichkeit einer gut eingestellten KBR zur Erfassung der meisten HB-Fälle ausreichen mag. Für eine sichere Entscheidungsgrundlage „Hepatitis B“ oder „Nicht B“ wird dennoch der empfindlichste Test vorzuziehen sein.

2.2 Standardisierung der HBsAg-Bestimmung

Die starke Schwankung der Nachweisgrenze von Labor zu Labor, auch bei identischen Methoden, läßt eine einheitliche Kontrolle der HBsAg-Bestimmung notwendig erscheinen.

Hierfür werden Standardproben benötigt, deren HBsAg-Gehalt nach Möglichkeit unabhängig von den zu standardisierenden Methoden, also nicht nur serologisch, festgelegt ist. Der Gehalt eines Serums an HBsAg spezifischem Protein kann nach quantitativer Isolierung in reiner Form durch UV-Extinktionsmessung bestimmt werden (9). Dieser physikalisch-chemisch bestimmte Meßwert korreliert in einer größeren Zahl von Proben verschiedener Herkunft ausgezeichnet mit den serologisch gemessenen Konzentrationswerten im Ausgangsserum (siehe Abb. 2). Es erscheint daher sinnvoll, die serologische Reaktivität von Standardpräparaten

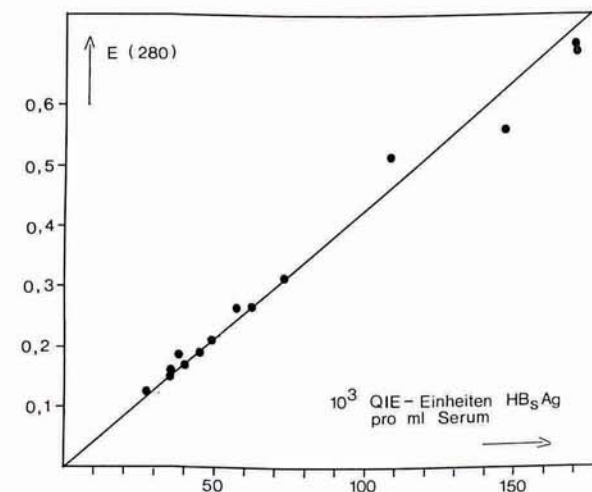


Abb. 2. Relation zwischen dem Ergebnis der QIE für das Ausgangsmaterial und der auf die Ausgangsmenge bezogenen Extinktion E (280), gemessen nach quantitativer Reinisolierung des HBsAg. Die Gerade gibt die theoretische Beziehung bei E 1 mg/ml = 4,29 wieder (16).

in physikalisch definierten Einheiten pro ml anzugeben, wobei wir vorschlagen, eine Einheit als ng natives Antigen-Protein zu definieren.

Mit Hilfe von Standardreagenzien kann die Mindestempfindlichkeit einer Nachweisttechnik exakt bestimmt und laufend überprüft werden (10). Bei quantitativen Verfahren sollten Titer bzw. willkürliche Einheiten durch exakt definierte Einheiten ersetzt werden. Als Verfahren mit guter Reproduzierbarkeit und Genauigkeit ist die quantitative Immunelektrophorese nach LAURELL (QIE) zur Gewinnung serologisch definierter Substandards mit hoher HBsAg-Konzentration geeignet (9). Die etwas empfindlichere KBR bewährte sich im erwähnten Ringversuch als quantitatives Verfahren weniger, da sowohl die Absolutangaben der Titer stark variierten als auch die Erkennung der wahren Konzentrationsverhältnisse oft nicht befriedigte.

2.3 Spezifität des HBsAg-Nachweises

Die meisten präzipitierenden Antiseren besitzen überwiegend Antikörper gegen die gemeinsame Determinante a des HBsAg. Daher sind starke qualitative Unterschiede bezüglich des Nachweises verschiedener HBsAg-Subtypen im allgemeinen nicht zu erwarten. Eine Ausnahme sind Antiseren von Meerschweinchen, die regelmäßig etwa 4 bis 8 mal soviel Antikörper gegen die Subtypendeterminanten d bzw. y bilden. Bei den Gelpräzipitationsverfahren AGD, ÜE und QIE wird die Spezifität der Reaktion in erster Linie durch die Spezifität des Antiserums bestimmt. Antikörper humaner Herkunft können bei natürlicher Immunisierung neben anti-HBs eventuell anti-HBc, anti-e oder ganz allgemein Antikörper gegen Antigene aufweisen, die ähnlich wie HBsAg im Blut vorkommen könnten. Bei Antiseren von polytransfunden Personen können zudem Antikörper gegen polymorphe Serumproteine auftreten. Als Beispiel einer solchen unspezifischen Reaktion fanden wir in einem Serum, das in der ÜE und KBR gegen zwei humane Antikörper positiv reagierte, das aber mit 3 tierischen Antiseren und einem weiteren humanen Antiserum negativ reagierte. Tierische Antiseren die durch Immunisierung mit gereinigtem HBsAg hergestellt werden, können demnach mehr Sicherheit bezügl. der Spezifität bieten. Die Abtrennung der menschlichen Serumproteine von HBsAg durch physikalische Trennverfahren oder enzymatische Behandlung gelingt jedoch nicht immer vollständig, so daß mitunter Absorption mit negativem Humanserum notwendig ist. Während heute für die Gelpräzipitationsverfahren und für die RPHA vorwiegend tierische Antiseren verwendet werden, stehen für die KBR meistens nur menschliche Antiseren zur Verfügung. Bei der RPHA und bei dem FPRIT kommt zur eventuellen Unspezifität der Antiseren noch die Möglichkeit falsch positiver Reaktionen durch Faktoren wie anti-Immunglobuline oder bakterielle Produkte (11). Bei der RPHA sind daher spezifische Kontrollen positiver Ergebnisse durch Absorption oder Hemmung unumgänglich, während bei dem FPRIT im Gegensatz zum Ausria I heute mit dem Ausria II kaum noch unspezifische positive Ergebnisse beobachtet werden. Wir fanden bei mehr als 10 000 Proben nur 4, bei denen ein schwach positives Ergebnis des FPRIT nicht durch humanes anti-HBs gehemmt werden konnte. Falsch negative Resultate, d. h. negativer Ausfall trotz hoher HBsAg-Konzentration durch Prozonophänomene kann bei Verwendung zu schwach oder zu stark verdünnter Antiseren bei allen Gelpräzipitationsverfahren und der KBR auftreten. Bei dem FPRIT und der RPHA kann nur bei unsachgemäßer Durchführung ein falsch negativer Ausfall erfolgen.

Eine quantitative Verminderung des Ergebnisses wird jedoch bei hohen HBsAg-Konzentrationen beobachtet, so daß quantitative Aussagen auf der Basis des Ausria II nur nach einer Titration erfolgen sollten.

3. Nachweis von anti-HBs

Mit den unempfindlicheren Verfahren AGD, ÜE und KBR kann anti-HBs nur sehr selten und zwar bei solchen Personen nachgewiesen werden, denen mehrfach HBsAg als Verunreinigung von Blutprodukten verabreicht wurde, z. B. Hämo-philien.

Mit den empfindlicheren radioimmunologischen Methoden und der PHA werden auch bei der Normalbevölkerung mit zunehmendem Alter in der BRD bis zu 15 %, bei Risikogruppen, wie z. B. medizinischem Personal, entsprechend mehr anti-HBs-Träger gefunden. Nach akuter Hepatitis B bildet die Mehrzahl aller Rekonvaleszenten anti-HBs (12). Sowohl aktiv (13) als auch passiv (14) erworbenes anti-HBs soll gegen Infektionen mit dem HBV schützen. Sein Nachweis hat daher nicht nur für die Epidemiologie und Diagnose der HB, sondern auch für die aktive und passive Immunisierung größte Bedeutung.

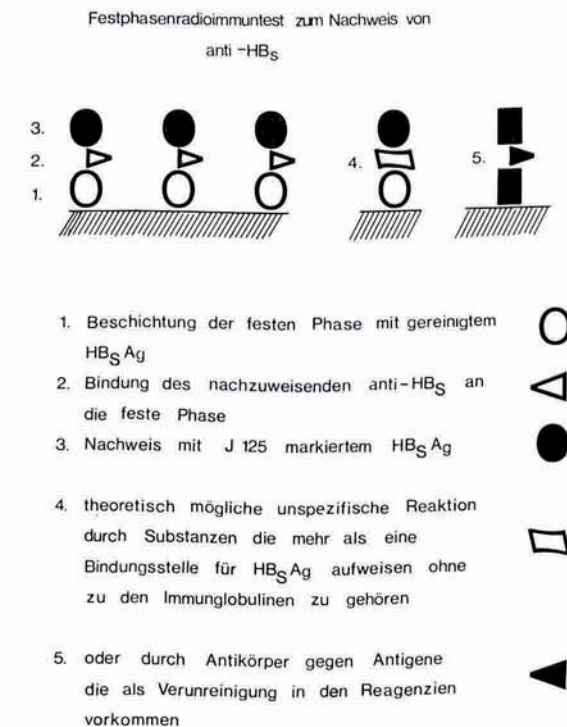


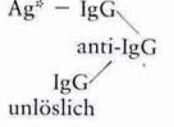
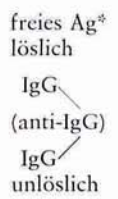
Abb. 3. Testprinzip des FPRIT auf anti-HBs und theoretische Möglichkeiten unspezifischer Reaktionen.

3.1 Nachweisempfindlichkeit der Methoden

Die Nachweisempfindlichkeit eines Tests ist gerade bei der Bestimmung des anti-HBs besonders wichtig. Bislang wurde am häufigsten die PHA mit HBsAg beschichteten nativen Humanerythrozyten verwendet (15), deren Nachteile vorwiegend in der Instabilität des Reagenz und der Subjektivität der Ablesung liegen. Seit einiger Zeit ist auch ein käuflicher FPRIT erhältlich, der in ähnlicher Form am Hygiene-Institut Göttingen seit mehreren Jahren durchgeführt wird (12). Das Testprinzip ist in Abb. 3 dargestellt.

Daneben wurde anti-HBs auch durch Inhibition des HBsAg-Nachweises im Ausria II nachgewiesen (16). Ein empfindlicher Test ist auch die Radioimmunpräzipitation RIP nach der Doppelantikörpermethode (17), deren Prinzip in Tab. 1

Tabelle 1. Reaktionsschema der Radioimmunpräzipitation nach der Doppelantikörpermethode

Reaktionsschritt	spezifischer Antikörper liegt vor	nicht vor
1. markiertes Ag* + Serum	Ag* - IgG löslicher Komplex + freies IgG	freies Ag* freies IgG
2. + anti-IgG		
3. Zentrifugation	Ag* im Präzipitat	Ag* im Überstand

erläutert ist. Ein Vergleich der relativen Empfindlichkeit der genannten Methoden wurde in Zusammenarbeit mit zwei weiteren Laboratorien mit identischen Proben im Blindversuch durchgeführt. Die Resultate sind in Tab. 2 aufgeführt. Der FPRIT ist hierbei das empfindlichste Verfahren. Die anderen Verfahren sind jedoch nur wenig unterlegen. Die Ergebnisse dieses Vergleichs stimmen sinngemäß mit einem Ringversuch des Bureau of Biologics überein, bei dem die PHA ebenfalls etwas unterlegen war. In welchem Maß die Zahl positiver Befunde bei den verschiedenen Personengruppen von der Testempfindlichkeit dieser Verfahren beeinflusst wird, ist noch nicht exakt untersucht worden. Die Verteilung der Meßergebnisse des FPRIT zeigt jedoch, daß etwa 10% der positiven Proben so wenig anti-HBs enthalten, daß es mit den weniger empfindlichen Verfahren vermutlich nicht entdeckt worden wäre.

Tabelle 2. Vergleich verschiedener Nachweismethoden für anti-HBs. Von allen Seren wurden Verdünnungsstufen in Zweierschritten hergestellt, die dann blind getestet wurden. Die PHA wurde von Herrn Dr. med. FRÖSNER (Tübingen) ausgeführt, die Ausria II-Hemmung von Herrn Dr. MÜLLER (Hannover)

anti-HBs vom	letzte positive Verdünnungsstufe 1: PHA	FPRIT	Ausria II Hemmung	RIP	AGD
Kaninchen	20480	81920	-	-	64
Meerschweinchen	5120	20480	-	-	16
Menschen	2560	8192	4096	8192	2

3.2 Spezifität des anti-HBs-Nachweises

Für die PHA, den direkten FPRIT und den RIP-Test wird gereinigtes HBsAg benötigt. Der Reinheitsgrad des HBsAg beeinflusst die Spezifität, da im Untersuchungsgut Antikörper gegen kontaminierende Humanserumproteine vorliegen können. Bei der PHA können außerdem Antikörper gegen die Trägererythrozyten oder bakterielle Verunreinigung falsch positive Reaktionen hervorrufen.

Eine weitere denkbare Ursache für unspezifische Reaktionen mag darauf beruhen, daß Serumproteine, die nicht zu den Immunglobulinen gehören, ebenfalls eine Affinität zu HBsAg aufweisen (18) und so bei der PHA und dem FPRIT zu Agglutination bzw. zur Bindung des radioaktiven HBsAg an die feste Phase führen können. Wir fanden jedoch bei dem FPRIT, daß nur bei weniger als einem Prozent der reproduzierbar positiven Reaktionen nicht durch Zusatz von ungereinigtem HBsAg gehemmt werden konnten. Trotzdem sollte der RIP-Test aus theoretischen Gründen spezifischer sein. Falsch negative Resultate können dann auftreten, wenn in der Probe vorwiegend Antikörper gegen eine spezielle subtypenspezifische Determinante vorliegen, die im zum Nachweis verwendeten HBsAg nicht enthalten ist. Daher sollte für den anti-HBs-Nachweis ein Gemisch von mehreren HBsAg-Subtypen als Reagenz verwendet werden. Für die vorläufige Standardisierung der anti-HBs-Bestimmung kann ein Panel mit 20 Proben des Bureau of Biologics dienen, das stark positive, schwach positive und negative Plasmaproben umfaßt. Aber auch eine quantitative Standardisierung des anti-HBs-Gehalts über die Bindungsfähigkeit des HBsAg in ng/ml scheint möglich zu sein. Eine Bindungsfähigkeit von 10 000 ng HBsAg/ml Antiserum entspricht dabei nach unseren Erfahrungen in etwa einem AGD-Titer von 1 : 2.

4. Nachweis von Dane-Partikeln

Der Nachweis von Dane-Partikeln als dem allgemein anerkannten HBV-Kandidaten ist von besonderem Interesse, da er einem Nachweis vermutlicher Infektiosität gleichkommt. Voraussetzung für einen solchen Nachweis ist immer eine positive Reaktion auf HBsAg, zumal auch geringste Mengen von Dane-Partikeln zusätzlich von einem Überschuß an HBsAg-Hüllmaterial begleitet sind.

4.1 Elektronenmikroskopischer Nachweis

Die direkte Nachweismethode für Dane-Partikel ist die Immunelektronenmikroskopie unter Verwendung von anti-HBs (1). Die EM-Präparate können direkt aus Serum auf Agarose, nach Sedimentation der Dane-Partikel oder nach isopyknischer Reinigung von Immunkomplexen angefertigt werden (R. THOMSEN, pers. Mitteilung). Die Dane-Partikel werden oft zu Beginn einer akuten HB gefunden, ihre Zahl verringert sich jedoch meist innerhalb weniger Tage unter die Nachweisgrenze. Bei chronischen HBsAg-Trägern werden in gesunden Personen kaum, bei chronischen Leberkranken und bei Personen mit Immundefizienz häufig Dane-Partikel gefunden (R. THOMSEN, pers. Mitteilung).

4.2 Nachweis mit Hilfe der DNS-Polymerase

Die Dane-Partikel enthalten nach KAPLAN und Kollegen eine DNS-Polymerase, die ohne Zusatz einer Starter- oder Matrix-DNS H^3 -Thymidin in ein säureunlösliches Produkt einbaut (3). Nach KAPLAN et al. und MORITSUGU et al. enthalten etwa 8% der chronischen HBsAg-Träger eine meßbare DNS-Polymerase-Aktivität im Serum (3, 19). Da die Zahl der Dane-Partikel nicht sehr hoch ist und die Serumproteine hohe Hintergrundabsorption von H^3 -Thymidin bewirken, ist für einen empfindlichen Nachweis eine vorherige Anreicherung der Dane-Partikel durch Sedimentation zu empfehlen. Die Entfernung des nicht eingebauten H^3 -Thymidins aus dem Reaktionsansatz, die für die Empfindlichkeit der Reaktion kritisch ist, scheint auf DEAE-Papier besser als nach saurer Fällung zu gelingen (19). Da ein positiver Nachweis nur in der Hälfte der Fälle HBsAg spezifisch ist, kann der Nachweis der HBV spezifischen Polymerase nur dann als gesichert gelten, wenn das markierte Produkt in einem RIP-DA-Test mit anti-HBs spezifisch präzipitiert wird (19).

Der Nachweis von freier HB spezifischer DNS-Polymerase, die nicht an Partikel gebunden ist, ist noch nicht eindeutig gelungen. Sowohl in HBsAg negativen wie auch in positiven Proben fanden wir jedoch eine echte oder scheinbare Aktivität mit niedriger S-Konstante. Wenn die positive DNS-Polymerase Reaktion als indirekter Nachweis für Dane-Partikel gesichert werden soll, ist es daher wohl am günstigsten, die Partikel vorher durch Sedimentation in Sucrosegradienten zu charakterisieren. Die Dane-Partikel spezifische DNS-Polymerase bzw. das radioaktive Produkt tritt dann an der Sedimentationsfront der nachweisbaren HBsAg-Aktivität auf (s. Abb. 4).

5.1 Nachweis von HBcAg aus Serum

Der erste Nachweis des HBcAg/Ak-Systems durch Almeida erfolgte mit der Immunelektronenmikroskopie und der KBR (20), wobei das HBcAg mit Detergentien aus dem Dane-Partikel freigelegt wurde. PURCELL und Kollegen entwickelten einen FPRIT für HBcAg mit J125-markiertem anti-HBc (21). Eine positive Reaktion konnte damit immer nur nach zwanzigfacher Anreicherung und Spaltung der Dane-Partikel mit Detergentien gefunden werden. Da bei den bisher nachweisbaren Infektionen mit dem HBV nach Eintreten der akuten Phase offensichtlich immer anti-HBc mit hohen Titern gebildet wird (22), wurde das HBcAg in freier Form bisher im Serum noch nicht gefunden (23).

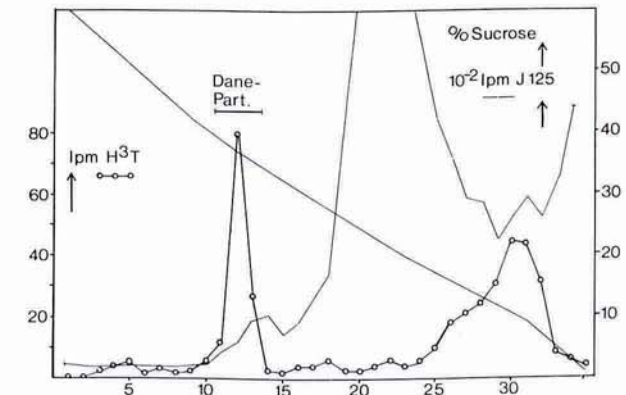


Abb. 4. Verteilung der HB spezifischen DNS-Polymerase. 0,5 ml Serum eines künstlich infizierten Schimpansen wurden 4 h bei 37000 Upm und bei 4 °C im SW 40 Rotor in einem Sucrosegradienten aufgetrennt. Die DNS-Polymerase wurde nach der Methodik von KAPLAN et al. bestimmt. Die relative HBsAg-Konzentration wurde im FPRIT bestimmt, die Dane-Partikel elektronenoptisch nachgewiesen.

5.2 Nachweis von HBcAg in der Leber

In den Zellkernen von HBV infizierten Hepatozyten ist HBcAg häufig durch Immunfluoreszenz (24) oder Elektronenmikroskopie nachzuweisen (25). Die Isolierung von HBcAg aus Homogenisaten von Lebern wurde mehrfach beschrieben (26, 27, 28). Sie gelingt aber oftmals nicht, da Personen mit apparenten HBV-Infektionen fast immer große Mengen anti-HBc im Blut aufweisen, das das HBcAg maskiert. So konnten wir in den Homogenisaten von vier Lebern, in denen HBcAg durch Immunfluoreszenz nachgewiesen worden war, (ARNOLD, pers. Mitteilung) kein HBcAg durch KBR oder ÜE gegen Referenz anti-HBc nachweisen.

Anti-HBc als Reagenz für den HBcAg-Nachweis in der Leber durch Immunhistologische Verfahren kann von HB-Rekonvaleszenten dagegen leicht erhalten werden. Anti-HBs tritt im allgemeinen erst einige Wochen nach dem Verschwinden des HBsAg auf, während anti-HBc bereits bei dem Höhepunkt der Erkrankung in hohen Titern auftritt (29). Auf diese Weise kann ein Reagenz erhalten werden, das keine Kreuzreaktion mit HBsAg aufweist.

6.1 Nachweis von anti-HBc mit Leber-HBcAg

Wie bereits erwähnt, kann HBcAg als Reagenz für den anti-HBc-Nachweis aus der Leber nur dann gewonnen werden, wenn reichlicher HBcAg-Gehalt mit einem geringen anti-HBc-Spiegel zusammentrifft. Da Lebern von HBV infizierten Personen oder Schimpansen ohnehin nicht häufig zu erhalten sind, ist diese Möglichkeit als zuverlässige generelle verfügbare HBcAg-Quelle weitgehend limitiert. In einem Einzelfall wurde von BARKER et al. jedoch soviel HBcAg aus einer Schimpansenleber isoliert, daß damit anti-HBc durch KBR oder ÜE oft in hohen Titern nachgewiesen werden konnte und zudem Versuchstiere immunisiert wurden (26). Radioimmunteste auf anti-HBc wurden bislang mit HBcAg aus Leber nicht durchgeführt, da die direkte Jodmarkierung offensichtlich die Antigenstruktur schädigt.

(J. HOOFNAGLE, pers. Mitteilung). Außerdem sollen die 27 nm großen HBcAg-Partikel – nach Angaben von HIRSCHMANN – keine DNS-Polymerase besitzen (30).

6.2 Nachweis von anti-HBc mit H^3 -Thymidin-markierten Core-Partikeln

Die zur Zeit empfindlichste und wahrscheinlich auch spezifischste Nachweismethode für anti-HBc ist der RIP-Test, der H^3 -Thymidin-markiertes HBcAg aus Dane-Partikeln verwendet (19, 31). Von dem geringen Prozentsatz HBsAg-positiver Träger, der eine ausreichende Zahl von Dane-Partikeln im Serum aufweist, ist wiederum nur ein kleiner Anteil für die Antigenpräparation geeignet, da nach den Experimenten von MORITSUGU et al. außerdem keine zu hohen anti-HBc-Titer auftreten dürfen. Andernfalls bilden sich bei der Aufspaltung der Dane-Partikel Antigen/Antikörper-Komplexe, die naturgemäß für den RIP-Test ungeeignet sind. Auf diese Weise konnten MORITSUGU und Mitarbeiter von über 1600 Proben 8 gewinnen, die nach isopyknischer Reinigung bis zu 20 000 spezifischer Impulse pro 1 ml Plasma ergaben (19). Da für einen Test nur etwa 500 cpm benötigt werden und die Durchführung nicht allzu schwierig ist, scheint eine breite Anwendung dieses RIP-DA-Tests denkbar, wenn geeignete Blutspender zur Verfügung stehen.

Bei der Suche nach solchen HBcAg-Quellen fanden wir unter 80 HBsAg-positiven Blutspendern nur 3, die eine spezifische DNS-Polymerase-Reaktion aufwiesen. Von diesen konnten jedoch nach Entfernung des anti-HBc wiederum nur einige 100 cpm/ml Ausgangsplasma als HBcAg gewonnen werden. Etwa 3000 cpm H^3 -Thymidin/ml markiertes HBcAg/ml Plasma konnten wir aus dem Blut eines künstlich mit dem HBV infizierten Schimpansen erhalten. Dieses Antigen war für den RIP-Test geeignet. Eine vielleicht ergiebiger Quelle für HBcAg könnte Blut von Patienten sein, die eine HBV-Infektion bei gleichzeitiger Immundefizienz aufweisen.

7. e-Antigene und -Antikörper

Sowohl e-Ag als auch anti-e sind bisher nur bei HBsAg-positiven Personen gefunden worden (4). Während der akuten Phase der HB und bei chronisch erkrankten Personen wird öfters e-Ag beobachtet, während bei gesunden Trägern öfters anti-e gefunden wird (32). Der Nachweis des Ag/Ak-Systems erfolgt bisher ausschließlich durch AGD oder ÜE. Da bisher gereinigte Präparate von e-Ag nicht vorliegen, ist zur Spezifitätssicherung eine Identitätslinie mit einem Bezugspräparat der AGD zu fordern.

8. Nachweis von HBV-Infektionen

Das Hepatitis B Virus kann wie viele andere Krankheitserreger ein breites Spektrum verschiedenartiger Wirtsreaktionen hervorrufen. Die vermutlich häufigste Reaktion ist die Entwicklung einer humoralen Immunität gegen HBcAg und HBsAg ohne Vorliegen von klinischen Erscheinungen. Wie lange die beiden Antikörper im Durchschnitt nach inapparenten Infektionen nachweisbar bleiben, kann nur durch Langzeitbeobachtungen geprüft werden. Ob oder wie oft vorübergehende inapparente Infektionen mit dem HBV mit einer kurzzeitigen HBs Antigenämie verbunden sind, ist nicht bekannt. Gemessen an dem Prozentsatz anti-

HBs-positiver Blutspender ist der Anteil gesunder kurzzeitig HBsAg-positiver Blutspender jedoch gering.

Die akute Hepatitis B ist nach heutiger Erkenntnis immer mit einem starken Abfall des HBsAntigens während der akuten Phase verbunden. Viele akute HB-Fälle mögen jedoch auch ohne nachweisbare HBsAntigenämie verlaufen. So bilden etwa 10 % der Hepatitispatienten sofort oder nach der Rekonvaleszenz anti-HBs, ohne daß vorher HBsAg nachzuweisen gewesen wäre. Der Nachweis von anti-HBc würde unter Umständen noch mehr Hepatitisserkrankungen als Typ B identifizieren. Ähnliche Verhältnisse liegen möglicherweise auch bei chronischen Erkrankungen vor.

Eine breite Anwendung des Nachweises von anti-HBc ist z. Zt. nicht möglich, aber auch wenn HBcAg als Reagenz ausreichend zur Verfügung stehen sollte, wird der Nachweis des anti-HBc die HBsAg-Bestimmung nur ergänzen, nicht aber ersetzen können, da im Verlauf der HBV-Infektion HBsAg früher im Blut auftritt.

Ob durch die Elimination von anti-HBc positiven Blutkonserven die Zahl der posttransfusionellen Hepatitisfälle reduziert werden kann, müßte geprüft werden. Die Anwesenheit von anti-HBs in Blutkonserven soll dagegen nach allgemeiner Ansicht kein Infektionsrisiko bergen.

Die diagnostische Bedeutung der anderen spezifischen Parameter wie der DNS-Polymerase und des e-Antigens und seines Antikörpers muß noch geprüft werden.

Literatur

1. DANE, D.S., C.H. CAMERON, and M. BRIGGS: Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen associated hepatitis. *Lancet* 1 (1970) 695
2. Committee on Viral Hepatitis of the National Research Council / National Academy of Sciences, USA. Nomenclature of antigens associated with viral hepatitis type B. *Inter-virology* 2 (1973/74) 134-135
3. KAPLAN, P.M., R.L. GREENMAN, J.L. GERIN, R.H. PURCELL, and W.S. ROBINSON: DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virol.* 12 (1973) 995-1005
4. MAGNIUS, L.O. and A. ESPMARK: A new antigen complex co-occurring with Australia-antigen. *Acta path. microbiol. scand. (Sect. B)* 80 (1972) 335
5. PESENDORFER, F., O. KRASSNITZKY und F. WEWALKA: Immunelektrophoretischer Nachweis von Hepatitis-Associated Au/SH-Antigen. *Klin. Wschr.* 48 (1970) 58
6. PURCELL, R.H., P.V. HOLLAND, J.H. WALSH et al.: A complement-fixation test for measuring Australia antigen and antibody. *J. infect. Dis.* 120 (1969) 383-386
7. LING, C.M. and L.R. OVERBY: Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmune assay with J125-antibody. *J. Immunol.* 109 (1972) 834-841
8. CAYZER, I., D.S. DANE, C.H. CAMERON, and J.V. DENNING: Rapid haemagglutination test for hepatitis B antigen. *Lancet* 1 (1974) 947-949
9. GERLICH, W. and R. THOMSEN: Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume, in: *Developments in Biological Standardization*, Eds.: F. PERKINS and R. REGAMEY (in Druck)
10. GERLICH, W., B. STAMM, and R. THOMSEN: Quantitative Standardization of the determination of hepatitis B surface antigen: Results from a collaborative study with 74 laboratories. *J. biol. standard.* (im Druck)
11. PRINCE, A.M., B. BROTMAN, D. JASS, and H. IKRAM: Specificity of the direct solid-phase radioimmunoassay for the detection of hepatitis B antigen. *Lancet* 1 (1973) 1346-1350
12. SCHÖBER, A., R. BISWAS, and R. THOMSEN: Frequency of anti-HBs antibody in persons

- with and without history of hepatitis as detected by a specific and sensitive direct solid-phase radioimmunoassay, in: *Developments in Biological Standardization*, Eds.: F. PERKINS and R. REGAMEY (im Druck)
13. PURCELL, R. H.: Diskussionsbeitrag zum Thema 'Aktive Immunisierung gegen Hepatitis B'. Symposium Viral Hepatitis, Washington 1975. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* (im Druck)
 14. DESMYTER, J., A. F. BRADBURN, C. VERMYLEN, R. DANEELS, and J. BOELAERT: Hepatitis B immunglobulin in prevention of HB_s antigenaemia in haemodialysis patients. *Lancet* 2 (1975) 377-379
 15. VYAS, G. N., and N. R. SHULMAN: Haemagglutination assay for antigen and antibody associated with viral hepatitis. *Science* 170 (1970) 332-333
 16. MÜLLER, R.: Anti-HB_sAg assay using the Ausria II® system with standard antigen dilutions, in: *Developments in Biological Standardization*, Eds.: F. PERKINS and R. REGAMEY (im Druck)
 17. HACKER, E. J., and R. D. AACH: Detection of hepatitis-associated-antigen und anti-HAA. *J. Amer. med. Ass.* 223 (1973) 414-417
 18. NEURATH, A. R., A. M. PRINCE, and A. LIPPIN: Hepatitis B antigen: antigenic sites related to human serum proteins revealed by affinity chromatography. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 71 (1974) 2663-2667
 19. MORITSUGU, Y., J. W. M. GOLD, J. WAGNER, R. Y. DODD, and R. H. PURCELL: Hepatitis B core antigen. Detection of antibody by radioimmunoprecipitation. *J. Immunol.* 114 (1975) 1792-1798
 20. ALMEIDA, J. D., D. RUBENSTEIN, and E. J. STOTT: New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* 2 (1971) 1225-1227
 21. PURCELL, R. H., J. L. GERIN, J. D. ALMEIDA, and P. V. HOLLAND: Radioimmunoassay for the core of the Dane Particle and antibody to it. *Intervirology* 2 (1973/74) 231
 22. HOOFNAGLE, J. H., R. J. GERETY, and L. F. BARKER: Antibody to hepatitis-B-virus core in man. *Lancet* 2 (1973) 869
 23. HOLLINGER, F. B.: Diskussionsbeitrag zum Thema 'Post-Transfusionshepatitis', Symposium Viral Hepatitis, Washington 1975. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* (im Druck)
 24. ARNOLD, W., K. H. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, G. HESS, and J. KNOLLE: The diagnostic significance of intra hepatocellular hepatitis B-surface-antigen (HB_sAg), hepatitis B-core-antigen (HB_cAg) and IgG for the classification of inflammatory liver diseases. *Klin. Wschr.* (im Druck)
 25. BARKER, L. F., F. V. CHISARI, P. P. MCGRATH et al.: Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees. *J. infect. Dis.* 127 (1973) 648-662
 26. BARKER, L. F., J. D. ALMEIDA, J. H. HOOFNAGLE et al.: Hepatitis B Core Antigen: Immunology and Electronmicroscopy. *J. Virol.* 14 (1974) 1552-1558
 27. HIRSCHMAN, S. Z., M. GERBER, and E. GARFINKEL: Purification of naked intranuclear particles from human liver infected by hepatitis B virus. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 71 (1974) 3345-3349
 28. DESMYTER, J. and A. F. BRADBURN: Core-antibodies and other parameters of hepatitis B virus infection in a tropical population, in: *Developments in Biological Standardization*, Eds.: F. PERKINS and R. REGAMEY (im Druck)
 29. BRZOSKO, W. J., J. MIKULSKA, J. CIANCARA and L. BABINEK: Immunglobulin classes of antibody to hepatitis B core antigen. *J. infect. Dis.* 132 (1975) 1-5
 30. HIRSCHMAN, S. Z.: Integrator enzyme hypothesis for replication of hepatitis B virus. *Lancet* 2 (1975) 436-438
 31. GREENMAN, R. L., W. S. ROBINSON, and G. M. VYAS: A sensitive test for antibody against the hepatitis B core antigen (anti-HB_c). *Vox. Sang* 29 (1975) 77-80
 32. MAGNIUS, L. O., A. LINDHOLM, P. LUNDIN, and S. IWARSON: A new antigen-antibody system. *J. Amer. med. Ass.* 231 (1975)

Dr. W. GERLICH, Hygiene-Institut, Kreuzbergg. 57, D-3400 Göttingen