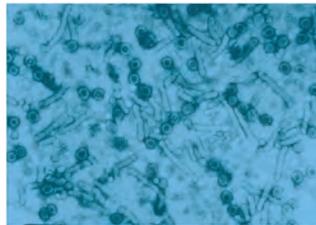
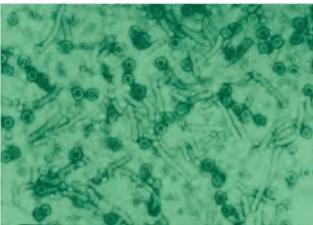
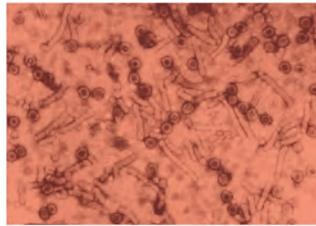
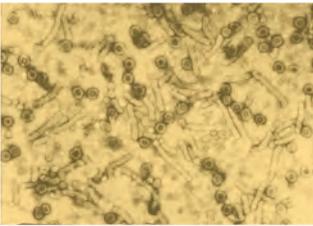


# DIE BEDEUTUNG VON ANTI-PRÄS2-ANTIKÖRPERN IN DER DIAGNOSTIK DES HEPATITIS-B-VIRUS

**FABIAN MATTHIAS FAUPEL**



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

# Die Bedeutung von Anti-präS2-Antikörpern in der Diagnostik des Hepatitis-B-Virus

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Fabian Matthias Faupel  
aus Fritzlar

Gießen 2010

Aus dem Institut für Medizinische Virologie  
des Zentrums für Medizinische Mikrobiologie und Virologie  
am Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen  
Institutsleiter: Prof. Dr. med. John Ziebuhr  
(Institutsleiter bis 31.03.2010: Prof. Dr. phil. nat. Dr. h. c. Wolfram H. Gerlich)

Gutachter: Professor Dr. phil. nat. Dr. h. c. Wolfram H. Gerlich

Gutachter: Professor Dr. med. Michael Kracht

Tag der Disputation: 13. Januar 2011

*Meiner Frau  
und meinen Eltern  
gewidmet*

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Hepatitis B.....	2
1.1.1	Epidemiologie und Übertragung.....	2
1.1.2	Klinik und Verlauf.....	4
1.1.3	Serologische Diagnostik.....	6
1.1.4	Therapie und Prophylaxe.....	8
1.1.5	Medizinische Bedeutung des HBsAg.....	10
1.2	Das Hepatitis-B-Virus.....	12
1.2.1	Struktur und Genomorganisation.....	12
1.2.2	Strukturproteine des HBV.....	15
1.2.3	HBV-Genotypen und HBsAg-Subtypen.....	17
1.3	Varianten und Mutanten des HBsAg.....	20
1.4	Probleme der HBsAg-Diagnostik.....	21
1.5	Fragestellung.....	24
2	Material .....	25
2.1	Chemikalien.....	25
2.2	Puffer.....	25
2.3	Blutproben.....	26
2.4	HBV-Serokonverter-Panels.....	27
2.5	HBV-Genotypen-Panels.....	27
2.6	HBs-Antigen-Präparationen.....	28
2.7	Antikörper.....	28
2.7.1	Primäre Antikörper.....	28
2.7.2	Sekundäre Antikörper.....	29
2.8	Assay-Reagenzien.....	29
2.9	Geräte und Hilfsmittel.....	30
3	Methoden.....	31
3.1	Architect®.....	31
3.2	AxSYM®.....	32
3.3	Laurell-Immunelektrophorese modifiziert nach Gerlich.....	32
3.4	SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting.....	33
3.4.1	SDS-Gelelektrophorese.....	33
3.4.2	Western Blotting.....	34
3.5	Auswertung.....	35

---

4 Ergebnisse.....	36
4.1 Spezifitätsmessungen.....	36
4.1.1 Blutspender.....	36
4.1.2 Hospitalisierte Patienten .....	39
4.1.3 Dialysepatienten.....	39
4.1.4 Schwangere.....	40
4.2 Serokonverter-Panels.....	42
4.3 Sensitivitätsbestimmung mit HBsAg-Standards.....	46
4.3.1 Laurell-Standard.....	47
4.3.2 Paul Ehrlich-Standard.....	47
4.3.3 2ter WHO-Standard.....	48
4.4 Diagnostische Sensitivität.....	50
4.5 Genotypen-Panels.....	51
4.6 HBsAg-Mutanten.....	61
4.7 Bindungsmuster der Anti-HBs-Antikörper im Western Blot.....	63
5 Diskussion.....	66
5.1 Sensitivität und Spezifität der HBsAg-Testverfahren.....	66
5.2 Nachweis der Serokonversion.....	70
5.3 Diagnostische Bedeutung von HBV-Genotyphen und HBsAg-Mutanten.....	72
5.4 Schlußbetrachtung und Ausblick.....	76
6 Literaturverzeichnis.....	78
7 Appendix.....	87
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	87
7.2 Zusammenfassung.....	91
7.3 Summary.....	92
7.4 Erklärung gemäß §11 (6) der Promotionsordnung des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.....	93
7.5 Publikation.....	94
Danksagung.....	95



## 1 Einleitung

*"Wenn das Blut ungestüm austritt, die Farbe sich der gelben nähert, das ganze Blut schwammartig und schaumig ist, wenn es Blasen auf der Oberfläche vor sich trägt und ein gelbes Wasser hat. Der Kranke wird am Orte des Ursprungs durch Stechen gequält, durch Schwere und alle übrigen Zeichen dieser Art."* (Paracelsus [ASCHNER B., 1993])

So beschrieb Theophrastus Bombastus von Hohenheim, genannt Paracelsus, Anfang des 16. Jahrhunderts das Blut eines an Gelbsucht erkrankten Menschen. Aber auch schon weit vor seiner Zeit wurde das Auftreten der Gelbsucht in vielen Epochen der Menschheit beschrieben. So fand die Gelbsucht bereits im 5. Jahrhundert v. Chr. im babylonischen Talmud Erwähnung. Die Ägypter und Babylonier wiesen Edelsteinen eine heilende Kraft gegen die Gelbsucht zu: *„Wasser und Wein mit dem Diamanten behandelt, sind heilkräftig bei Gicht, Gehirnschlag und Gelbsucht* [FUEHNER H., 1902].“ Papst Zacharias (679-752) empfahl bei Ausbruch einer Gelbsucht die Isolierung der Erkrankten [CALLAHAN J. R., 2010].

Diese Empfehlung lässt darauf schließen, dass die Gelbsucht - welcher Genese auch immer - zur damaligen Zeit als Seuche angesehen wurde. Dass es sich allerdings um eine infektiöse Erkrankung handelte, wurde erst 1885 ersichtlich. Lürmann beschrieb „Eine Ikerusepidemie“ von Werftarbeitern in Bremen, nachdem diese einen mit menschlicher Lymphe versehenen Pockenimpfstoff erhalten hatten. Lürmann nannte diese Form der übertragbaren Gelbsucht „Serum-Hepatitis“ [LÜRMANN A., 1885]. Nach heutigem Erkenntnisstand handelte es sich dabei um einen Ausbruch der Hepatitis B.

Ab den 1940er Jahren schließlich unterschied man zwei Hepatitisformen: Die sogenannte epidemische Hepatitis und die Serum-Hepatitis. MacCallum führte 1947 für die epidemische Hepatitis die Bezeichnung „Hepatitis A“ und für die Serum-Hepatitis „Hepatitis B“ ein [MACCALLUM F. O., 1947]. Erst 1967 konnte Saul Krugman schließlich in seiner Willowbrook-Studie beweisen, dass diese zwei verschiedenen Hepatitisformen durch unterschiedliche Erreger hervorgerufen werden [KRUGMAN S. ET AL., 1967].

Der erste Schritt, der zur Entdeckung des Hepatitis-B-Virus führte, ist einem Zufall zu verdanken. Harvey Alter in der Forschergruppe des Arztes und Anthropologen Baruch S. Blumberg entdeckte 1965 bei der Suche nach Blutgruppen-Polymorphismen im Serum verschiedener Ethnien ein besonderes Protein bei australischen Ureinwohnern (ALTER H. J. UND BLUMBERG B. S., 1966). Blumberg nannte dieses Protein Australia-Antigen und konnte es zudem im Serum von an Leukämie erkrankten Patienten nachweisen

[BLUMBERG B. S. ET AL., 1965]. Bei den folgenden Untersuchungen mit dem Australia-Antigen verwendete seine technische Assistentin Barbara Werner ihr eigenes Blut als Negativkontrolle. Nach einiger Zeit wurde ihre verwendete Negativkontrolle positiv, und sie entwickelte in der Folgezeit eine akute Hepatitis. Diese und andere Beobachtungen zeigten den Zusammenhang mit der Hepatitisinfektion auf.

Das von Blumberg entdeckte Australia-Antigen bestand aus 20 nm großen Partikeln ohne Nukleinsäure. Obwohl diese Partikel keine Infektion hervorrufen konnten, beschrieb er bereits 1969 in einer Patentschrift, dass diese Partikel eine schützende Immunität induzieren konnten und diese einen Impfstoff darstellen könnten.

1970 entdeckte David S. Dane im Elektronenmikroskop zusätzliche 42 nm große Partikel, welche das Australia-Antigen auf ihrer Oberfläche trugen [DANE D. S. ET AL., 1970]. June D. Almeida wies anhand von gereinigten Dane-Partikeln nach, dass mit HBV infizierte Patienten Antikörper gegen ein im Inneren des Dane-Partikels gelegenes Hüllprotein (Core) bildeten [ALMEIDA J. D. ET AL., 1971]. Diese Entdeckung zeigte, dass die Dane-Partikel als Erreger der Hepatitis B anzusehen sind und sich neben dem bereits von David S. Dane auf ihrer Außenseite nachgewiesenen Australia-Antigen im Inneren zusätzlich ein Kapsid-Antigen befindet. In den Jahren 1973 und 1974 gelang es schließlich William S. Robinson innerhalb des Dane-Partikels eine DNA-Polymerase und eine DNA nachzuweisen [KAPLAN P. M. ET AL., 1973].

Nach diesen Entdeckungen bezeichnete man das Australia-Antigen als *Hepatitis B surface antigen* (HBsAg) und das Dane-Partikel als Hepatitis-B-Virus (HBV). Das Kapsid-Antigen, nachgewiesen von June D. Almeida, wurde als *Hepatitis B core antigen* (HBcAg) bezeichnet. Antikörper gegen das Core-Antigen (Anti-HBc), das HBs-Antigen (Anti-HBs), sowie das HBsAg selbst bilden bis heute die Basis der serologischen HBV-Diagnostik. Die Parameter bergen jeweils eine eigene Problematik; so sind beispielsweise die Spezifität des Anti-HBc-Nachweises und die Variabilität des HBsAg bis heute Herausforderungen bei der Entwicklung von Testverfahren.

## 1.1 Hepatitis B

### 1.1.1 Epidemiologie und Übertragung

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO zeigen mehr als zwei Milliarden Menschen der Weltbevölkerung einen serologischen Hinweis auf eine gegenwärtige oder ausgeheilte HBV-Infektion (Prävalenz von Anti-HBc). Davon sind je nach Quelle etwa 300 bis 420 Millionen chronische Träger des Hepatitis-B-Virus (Prävalenz von HBsAg). Es wird

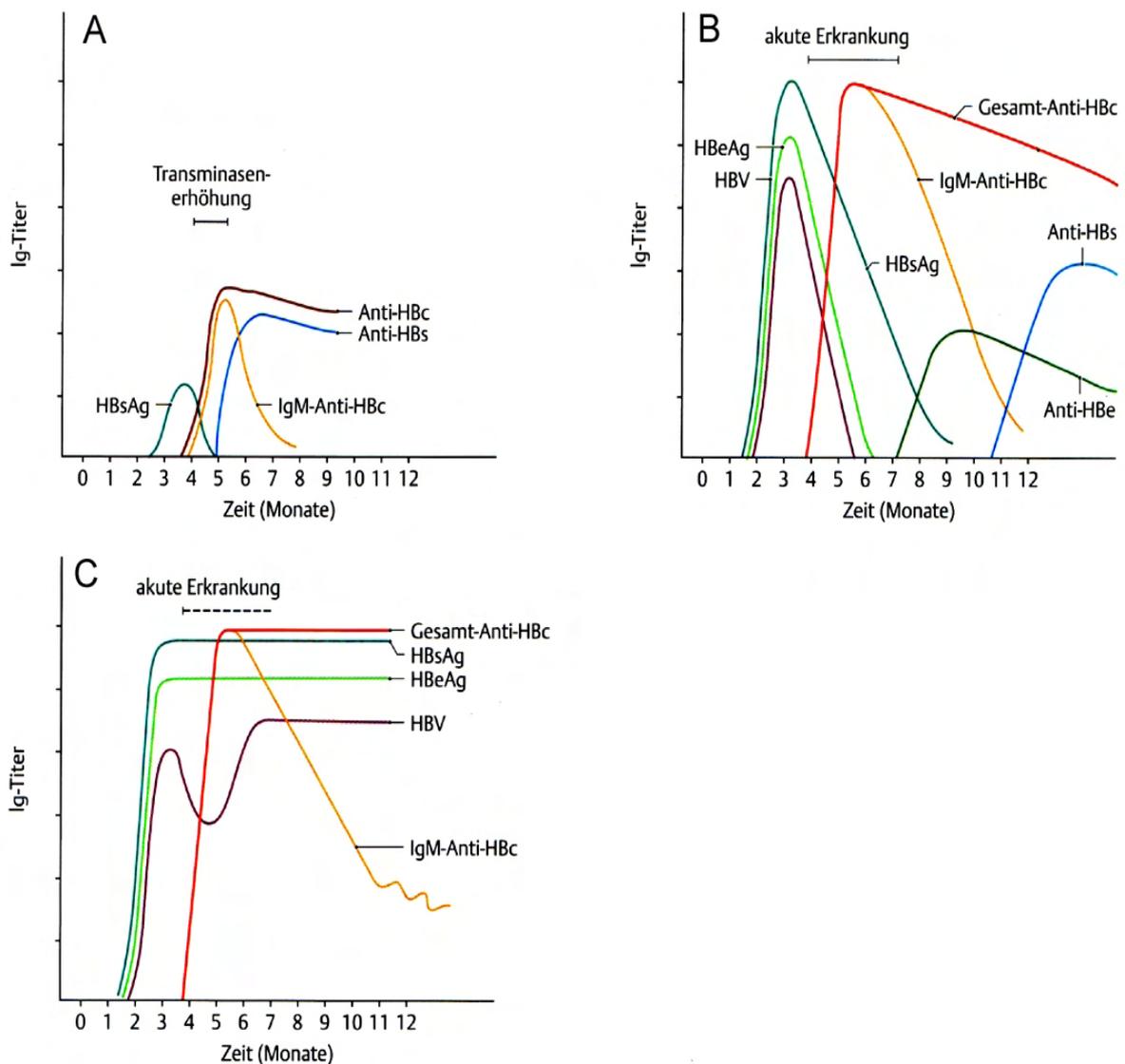
angenommen, dass ungefähr 30 % aller Leberzirrhosen und 53 % aller hepatozellulären Karzinome Folge einer Infektion mit HBV sind. Im Jahr 2008 wurden in Deutschland 1.850 Fälle einer akuten Hepatitis-B-Infektion gemeldet, wovon 44 % der aktuell gültigen Referenzdefinition entsprachen. Die übrigen gemeldeten Fälle erfüllten entweder nicht das klinische Bild einer akuten Hepatitis, oder es lagen keine ausreichenden Angaben vor. Die Inzidenz betrug somit eine Erkrankung auf 100.000 Einwohner. Im Vergleich zu den letzten Jahren ist ein deutlicher Rückgang der akuten Hepatitis-B-Infektionen zu verzeichnen, so lag die Anzahl der gemeldeten Fälle im Jahr 1997 immerhin noch bei 6.135 [RKI, 2009]. Zu beachten bleibt allerdings die Tatsache, dass neu diagnostizierte chronische HBV-Infektionen innerhalb des deutschen Meldesystems gemäß Infektionsschutzgesetz keine Berücksichtigung finden [INFEKTIONSSCHUTZGESETZ, 2000]. Ebenso sind die Fälle eines akuten, klinisch auffälligen und damit zur Meldung führenden Verlaufs seltener als gering oder nicht symptomatische Verläufe mit nachfolgender Chronifizierung. Damit wird das Problem der chronisch Infizierten als eigentliche epidemiologisch relevante Quelle für weitere Infektionen aus juristischen Gründen außer Acht gelassen.

Die Seroprävalenz von HBsAg lag im Jahr 1998 in Deutschland gemittelt bei 0,6 %, die für Anti-HBc, als Marker einer stattgehabten HBV-Infektion, bei 7,7 % in den alten und bei 4,3 % in den neuen Bundesländern. Daraus ergibt sich trotz einer niedrigen Prävalenz für HBsAg eine nicht zu vernachlässigende Zahl von Betroffenen [THIERFELDER W. ET AL., 2001]. Marschall et al. konnten im Jahr 2005 aufzeigen, dass ein nennenswerter Teil der in Deutschland lebenden chronischen Hepatitis-B-Infizierten einen Migrationshintergrund hat und aus Ländern mit einer höheren Prävalenz als Deutschland kommt [MARSCHALL T. ET AL., 2005].

Die Übertragung des HBV erfolgt parenteral oder sexuell. Das infektiöse Virion ist in wechselnder, zum Teil sehr hoher Zahl (bis  $10^{10}$  infektiösen Einheiten/ml bei chronischen HBeAg-positiven Trägern) in Blutplasma beziehungsweise Serum vorhanden. Bedingt durch diese außergewöhnlich hohe Viruslast sind ebenfalls Sperma, Urin, Speichel, Tränenflüssigkeit, Muttermilch und Vaginalsekret virushaltig. In den hochendemischen Regionen Afrikas und Asiens mit bis zu 20 % Trägerraten erfolgt die Infektion meist perinatal oder in der frühen Kindheit, wohingegen die Übertragung des Virus in Regionen mit niedrigerer Trägerrate von unter 5 %, wie beispielsweise Europa und den USA, meist sexuell oder durch Kontakt mit Blut erfolgt. 2004 konnte Katayama zeigen, dass bereits 20 Virusgenome ausreichend sind, um eine Hepatitis-B-Infektion zu verursachen [KATAYAMA K. ET AL., 2004].

### 1.1.2 Klinik und Verlauf

Die Klinik einer Hepatitis B steht in sehr engem Zusammenhang mit der Reaktion des Immunsystems auf das Virus. Abhängig vom Zeitpunkt und der Intensität der Immunreaktion können sich unterschiedliche Infektionsverläufe entwickeln (Abb. 1A-C). Neben der bei einer Infektion übertragenen Virusmenge ist vor allem der Immunstatus des Infizierten dafür ausschlaggebend, welcher Infektionsverlauf sich im Weiteren entwickelt. So ist beispielsweise bei einer Infektion durch mukokutanem Kontakt mit geringer Virusdosis oft ein asymptomatischer Verlauf zu beobachten. Die daraus resultierende Leberschädigung ist meist nur minimal, da das Immunsystem zu einem Zeitpunkt aktiviert wird, wenn die Anzahl der infizierten Leberzellen noch sehr gering ist [GERLICH W.H. UND SCHÜTTLER C. G., 2007].



**Abbildung 1A-C:** Verlaufsformen einer subklinischen (A), akut, ausheilenden (B) und akut, chronisch verlaufenden HBV-Infektion (C) [GERLICH W. H. UND CASPARI G., 2009].

Die Inkubationszeit der Hepatitis B kann zwischen zwei und sechs Monaten variieren. Den eigentlichen klinischen Symptomen, wie Ikterus und rechtsseitige Oberbauchschmerzen, gehen meist Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen und Gelenkbeschwerden voraus. Jedoch verlaufen über zwei Drittel der Infektionen inapparent und gehen in eine nachfolgende Immunität über (Abb. 1A). Dieser Verlauf tritt meistens bei Erwachsenen mit einem kompetenten Immunsystem und einer Infektion mit geringer Viruszahl oder -konzentration auf. Bei Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten verläuft die Hepatitis B in vielen Fällen auch inapparent, allerdings persistiert das Virus in fast 90 % der Fälle.

Nach einer Infektion mit einer hohen Viruskonzentration, beispielsweise Inokulation mit infiziertem Blut, tritt meist ein akuter Verlauf auf (Abb. 1B). Die Dauer der akuten Krankheitsphase schwankt zwischen zwei und zwölf Wochen, wobei es bei 90 bis 95 % der Erkrankten zu einer Ausheilung der Hepatitis B kommt. Labordiagnostisch ist eine starke Erhöhung der Transaminasen auf Werte zwischen 400 und 4000 U/l zu beobachten. Dabei ist typischerweise die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) stärker erhöht als die Glutamat-Oxalat-Transaminase (GOT). Andere leberspezifische Enzyme, wie die alkalische Phosphatase (AP) und die  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT), sind meistens nur geringfügig erhöht. Das Gesamtbilirubin im Serum kann Werte bis zu 400  $\mu\text{mol/l}$  (Normalwert:  $< 5,1 \mu\text{mol/l}$ ) erreichen, wobei direktes und indirektes Bilirubin etwa zu gleichen Anteilen ansteigt. Dabei ist erwähnenswert, dass die stattfindende Zytolyse der Hepatozyten aufgrund der sehr geringen Zytotoxigenität des HBV nicht durch das Virus selbst, sondern hauptsächlich durch zytotoxische  $\text{CD8}^+$ -T-Lymphozyten verursacht wird.

Bei 0,5 - 1 % der manifesten Erkrankungen kommt es zu einem fulminanten Verlauf der Hepatitis B mit einer 70-prozentigen Letalität. Innerhalb von wenigen Tagen entwickeln sich aufgrund der nicht kompensierbaren Einschränkung der hepatischen Stoffwechsellistung unter anderem eine hepatische Enzephalopathie und eine Gerinnungsstörung. Laborchemische Zeichen für die sich entwickelnde Leberinsuffizienz sind eine verminderte Syntheseleistung, welche zum einen durch eine Verminderung von Cholinesterase, zum anderen durch einen niedrigen Quick-Wert ersichtlich ist, sowie eine schlechtere Entgiftung, welche anhand der Erhöhung von Ammoniak im Serum deutlich wird.

Die Entstehung eines chronischen Verlaufes ist abhängig von Alter, Immunstatus, Infektionsdosis und Infektionsweg. Etwa 1 % aller sonst gesunden Erwachsenen entwickeln eine chronische Hepatitis B, wohingegen Neugeborene in bis zu 90 % chronifizieren (Abb. 1C). In vielen Fällen entwickelt sich ein chronischer Verlauf aus einer akuten Hepatitis B heraus; bei Neugeborenen, Kleinkindern und Immunsupprimierten fehlt jedoch meistens

eine akute Phase. Definiert ist eine chronische HBV-Infektion durch den Nachweis von HBsAg im Serum über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten. Klinisch unterscheidet man drei Typen chronischer HBV-Träger, wobei die Übergänge als fließend anzusehen sind. Man unterscheidet einen immuntoleranten HBV-Träger mit positivem HBeAg und hoher Viruslast, einer damit verbundenen hohen Infektiösität, jedoch geringen Entzündung, sowie einen chronischen Virusträger mit zeitlich variierender Virusreplikation und Immunpathogenese und schließlich den sogenannten „gesunden HBsAg-Träger“ mit negativem HBeAg und niedriger Viruslast. Die chronische Hepatitis B führt in den meisten Fällen langfristig zu der Entwicklung einer Leberzirrhose und/oder zum hepatozellulären Karzinom.

Bei einer Hepatitis-B-Infektion kann es zusätzlich zu einer Simultan- oder Superinfektion mit dem Hepatitis-D-Virus (HDV) kommen. HDV ist ein defektes Virus und hat kein eigenes Hüllprotein. Aus diesem Grund ist das Virus für den vollständigen Zusammenbau eines infektiösen Partikels auf das HBsAg des HBV angewiesen. Klinisch führt eine Simultaninfektion von HBV und HDV häufiger als bei alleiniger Infektion mit HBV zu einem fulminanten Verlauf mit deutlich erhöhter Mortalität. Bei Superinfektion einer bestehenden chronischen Hepatitis-B-Infektion entwickelt sich häufig eine chronische Hepatitis D mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eine Leberzirrhose zu entwickeln.

### **1.1.3 Serologische Diagnostik**

Bedingt durch die unterschiedlichen Verlaufsmuster und die vielen serologischen Parameter der Hepatitis-B-Infektion gestaltet sich eine qualitativ hochstehende Diagnostik sehr komplex. Je nach Fragestellung müssen unterschiedliche Parameter untersucht werden.

Allgemein lässt sich sagen, dass dem Nachweis von HBsAg, den Antikörpern gegen HBsAg (Anti-HBs) und gegen HBcAg (Anti-HBc) eine zentrale Rolle in der serologischen Diagnostik der Hepatitis B zukommen. Diese drei serologischen Marker können einen ersten Hinweis darauf geben, ob eine Hepatitis-B-Infektion vorliegt oder ausgeschlossen werden kann.

Das HBsAg ist üblicherweise als erster serologischer Marker bei einer Infektion mit HBV nachweisbar. Das Antigen ist normalerweise vor und während der Krankheitsphase im Serum vorhanden. Somit lässt der sichere Nachweis von HBsAg im Serum eines Patienten - abgesehen von seltenen Fällen von noch zirkulierendem HBs-Impfantigen - auf eine Infektion mit HBV schließen. Normalerweise liegt die HBsAg-Konzentration zwischen 30.000 und 150.000 ng/ml, immuntolerante Träger können jedoch Werte weit über 1.000.000 ng/ml erreichen. In der Inkubationszeit steigt die HBsAg-Konzentration

logarithmisch bis zu Werten zwischen 10.000 und 100.000 ng/ml an und fällt bei Ausheilung meist innerhalb der ersten vier Wochen der akuten Hepatitis um mindestens 50 % ab. Bei Chronifizierung bleibt dieser Rückgang allerdings aus. Infolgedessen stellt das Testen auf HBsAg eine gute Möglichkeit dar, eine Prognose über den Verlauf der Hepatitis B zu treffen.

Antikörper gegen das HBsAg können regelmäßig nach einer ausgeheilten HBV-Infektion nachgewiesen werden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass nicht schon während einer akuten oder chronischen HBV-Infektion diese Antikörper gebildet werden. Aufgrund der biologischen Besonderheit des HBV, das HBsAg in bis zu 10.000fachem Überschuss im Vergleich zu den eigentlichen Virionen bildet, werden die Antikörper gegen das HBsAg von der Menge des Antigens gebunden und entziehen sich so überwiegend der Nachweisbarkeit. Daher ist es im Normalfall nur möglich, einen der beiden Parameter, Anti-HBs oder HBsAg, spezifisch nachzuweisen.

Anti-HBc ist als serologischer Marker dann nachweisbar, wenn entweder eine akute, eine ausgeheilte oder eine chronische Hepatitis B vorliegt. Um genauere Aussagen über den Status der Infektion machen zu können, ist ein Test auf Anti-HBc-IgM möglich. Die Interpretation des IgM-Nachweises wird aber dadurch eingeschränkt, dass das Anti-HBc-IgM auch bei bis zu 39 % der chronisch Infizierten dauerhaft nachweisbar bleibt, wenn auch mit signifikant geringerer Konzentration [GERLICH W. H. ET AL., 1986]. Bei einer akuten Hepatitis B liegen normalerweise eine hohe Anti-HBc-IgM-Konzentration sowie ein erhöhter GPT-Wert (> 300 U/l) vor. Bei isoliertem Anti-HBc und negativem HBsAg und Anti-HBs kann entweder ein falsch positives Ergebnis, eine ausgeheilte oder eine okkulte Hepatitis-B-Infektion vorliegen. Letzteres konnte durch den Nachweis von HBV-DNA im Serum bei etwa 10 % jener Patienten gezeigt werden, bei denen serologisch nur eine isolierte Anti-HBc-Positivität nachweisbar war [KNOLL A. ET AL., 2006].

Bei einer chronischen Hepatitis B mit Nachweis von HBsAg und Anti-HBc sollten weitere Laborparameter untersucht werden, darunter das HBeAg, Antikörper gegen HBeAg (Anti-HBe) und HBV-DNA. Der Nachweis von HBeAg lässt Rückschlüsse auf die Replikationsaktivität von HBV und die immunmodulatorischen Abläufe im Patienten zu. Neben HBeAg-positiven gibt es auch HBeAg-negative Varianten, welche durch eine Mutation im Bereich des Core-Promotors oder Inaktivierung der präCore-Sequenz bei einer Neuinfektion nicht persistieren und häufiger mit einem schweren akuten Verlauf bis zur fulminanten Hepatitis B einhergehen. Des Weiteren sprechen HBe-negative Mutanten schlechter auf Interferon an [GERLICH W. H. UND CASPARI G., 2009]. Normalerweise bildet das Immunsystem bei einer akuten Hepatitis B mit einer HBeAg-positiven Variante nach sechs bis

neun Monaten Anti-HBe. Bleibt das Anti-HBe aus, ist dies ein Zeichen dafür, dass das Immunsystem nicht ausreichend aktiviert wurde. Dies stellt einen möglichen Anhaltspunkt für einen Übergang in einen chronischen Verlauf dar. Dennoch ist es möglich, dass eine chronische Infektion eine sogenannte HBe-Serokonversion durchläuft, also Anti-HBe gebildet wird. In seltenen Fällen, bei denen ein zweifelhaft positiver Anti-HBc Test mit gleichzeitig negativem HBsAg und Anti-HBs vorliegt, stützt der Nachweis von Anti-HBe die Spezifität des Anti-HBc Ergebnisses.

Bei der quantitativen HBV-DNA-Bestimmung sind Werte über  $10^6$  Genome/ml als hoch anzusehen, unter  $10^3$  als niedrig. Patienten mit einer hohen Viruskonzentration gelten auch bei mukokutaner Übertragung als infektiös. In Deutschland gilt für medizinisches Personal, welches in operativen Bereichen tätig ist, dass bei Konzentrationen kleiner  $10^3$  Genome/ml keine, bei über  $10^5$  Genome/ml eine generelle Einschränkung der übertragungsträchtigen Tätigkeit zu empfehlen ist. Eine individuelle Fallentscheidung wird bei Testergebnissen zwischen  $10^3$  und  $10^5$  getroffen [DVV, 2004].

Neben dem akuten und chronischen Verlauf einer Hepatitis B besteht außerdem die Möglichkeit der Entstehung einer okkulten HBV-Infektion. Bei einem natürlichen Verlauf einer Hepatitis B verschwinden nach der akuten Phase sowohl das HBsAg als auch die HBV-DNA vollständig aus dem Blut des Infizierten. Dennoch bleibt in den meisten Fällen die HBV-DNA in episomaler Form als cccDNA (covalently closed circular DNA) im Nukleoplasma von einigen Hepatozyten dauerhaft präsent. Üblicherweise kommt es aber nicht zu einer Virämie, und bei einer Anti-HBs-Positivität gilt die Infektion als ausgeheilt. Bei einer alten Infektion ohne ausreichende Bildung von Anti-HBs kann es gelegentlich zu einer erneuten Replikation des Virus, begleitet von einer geringgradigen Virämie, kommen [ALLAIN J. P., 2004]. Eine okkulte HBV-Infektion ist immer dann anzunehmen, wenn nach einer Infektion ein Test auf Anti-HBc spezifisch positiv ausfällt und das Anti-HBs nicht nachweisbar ist. Allerdings ist bei einem negativen Anti-HBc nach bewiesener Infektion eine andauernde okkulte Infektion nicht auszuschließen [GERLICH W. H. UND SCHÜTTLER C. G., 2007].

#### **1.1.4 Therapie und Prophylaxe**

Eine chronische Hepatitis B sowie fulminante Verläufe und Reaktivierungen des HBV sind Indikationen für eine antivirale Therapie [CORNBURG M. ET. AL., 2007]. Das Behandlungsziel ist im günstigsten Falle die Serokonversion zu einer klinisch ausgeheilten Infektion (Anti-HBc und Anti-HBs positiv). Weil dies aber nur in wenigen Fällen gelingt, versucht man eine Reduktion der Viruskonzentration oder eine Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe zu

erreichen. Eine HBeAg-Negativität ist in der Folge mit geringeren Folgeschäden und einer niedrigeren Inzidenz eines HCC assoziiert [YANG H. I. ET AL., 2002].

Für die Therapie der Hepatitis B sind zurzeit neben  $\alpha$ -Interferonen (Interferon- $\alpha$ -2a, -2b und pegyliertem Interferon- $\alpha$ -2a) verschiedene Nukleosid- und Nukleotidanaloga zugelassen. Eine Behandlung mit Interferonen stellt dabei die einzige Möglichkeit dar, eine dauerhafte Unterdrückung der Virämie und eine Serokonversion zu Anti-HBs zu erreichen. Die empfohlene Therapiedauer beträgt zwischen vier und sechs Monaten für Interferon- $\alpha$ -2a und -2b sowie 48 Wochen für das pegylierte Interferon- $\alpha$ -2a. Der Wirkmechanismus ist im Detail noch nicht geklärt. Jedoch wird davon ausgegangen, dass  $\alpha$ -Interferone den Einbau des RNA-Prägenoms in die Core-Partikel hemmt [SCHAEFER S. ET AL., 2009]. Durch die begrenzte Wirkung auf die Elimination der HBV-cccDNA im Kern ist nach Absetzen der Therapie häufig ein Rückfall zu beobachten [SCHAEFER S. ET AL., 2009]. Überdies scheint das Ansprechen auf eine Interferontherapie abhängig vom jeweiligen Genotypen zu sein [KAO J. H. ET AL., 2000; JANSSEN H. L. ET AL., 2005; ERHARDT A. ET AL., 2005]. Durch die Kopplung des Interferons mit Polyethylenglykol (PEG-Interferon) ist eine Verbesserung der Wirksamkeit über eine veränderte Pharmakokinetik erreicht worden [COOKSLEY W. G. ET AL., 2003].

Viele der zur Therapie der HBV-Infektion zugelassenen Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga wurden ursprünglich für die Therapie gegen das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) entwickelt. Die derzeit am häufigsten verwendeten sind Lamivudin, Adefovir, Telbuvudin, Tenovofir und Entecavir. Gemein ist allen, dass sie die RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) des HBV hemmen. Dadurch bewirken sie einen raschen Abfall der HBV-DNA-Konzentration im Serum, eine Elimination der viralen cccDNA gelingt jedoch nicht. Daher ist im Gegensatz zu der zeitlich begrenzten Therapie mit  $\alpha$ -Interferonen eine dauerhafte Therapie notwendig [SCHAEFER S. ET AL., 2009]. Ein Ziel der Therapie mit Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga ist die Induktion einer HBe-Serokonversion. Als prognostisch günstige Kriterien haben sich deutlich erhöhte Transaminasen, eine niedrige Ausgangsviruslast sowie ein jüngeres Alter herausgestellt [PERRILLO R. P. ET AL., 2002; CHIEN R. N. ET AL., 2003; LAI C.-L. ET AL., 2005]. Des Weiteren ist das Ansprechen der Therapie mit Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga unabhängig vom HBV-Genotyp [WESTLAND C. ET AL., 2003; CHANG T. T. ET AL., 2006; LAI C.-L. ET AL., 2006; WIEGAND J. ET AL., 2008].

Ein großes Problem bei der Monotherapie mit Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga stellt die Resistenzentwicklung dar. Gegen alle zurzeit verwendeten Wirkstoffe sind Aminosäureaustausche innerhalb der Reversen Transkriptase des HBV bekannt [SCHAEFER S. ET AL., 2009]. Die Wahrscheinlichkeit der Resistenzentwicklung ist für die unterschiedlichen Wirkstoffe sehr

verschieden. Nach einer Therapiedauer von vier Jahren weisen beispielsweise bei Lamivudin 71 % der Behandelten eine Resistenzvariante auf, bei Entecavir sind es 1,2 % [MÜLLER C., 2009]. Tenney konnte zeigen, dass sich bei Lamivudin-resistenten Infektionen in 50 % eine Resistenz gegen Entecavir entwickelt [TENNEY D. J., 2009]. Gegebenenfalls könnte eine weitere Verbesserung von Kombinationstherapien mit Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga oder sequentielle Therapieschemata mit PEG-Interferon  $\alpha$ -2a, therapeutischer Impfung und Nukleosidanaloga die Resistenzentwicklungen vermindern und so einen Fortschritt in der Therapie gegen Hepatitis B bewirken.

Zur Prophylaxe einer Hepatitis-B-Infektion stehen neben hygienischen Maßnahmen eine aktive und passive Immunisierung zur Verfügung. Die seit 1985 verfügbaren rekombinanten HBV-Impfstoffe basieren meist auf dem SHBsAg des Genotypen A2 mit dem HBsAg-Subtyp *adw2*. Die durch die Impfung induzierten Antikörper schützen nicht gegen alle HBV-Subtypen gleich gut, insbesondere bilden die Impfantigene nicht jene Genotypen ab, die weltweit prädominant sind. Eine Verbesserung des Impfschutzes könnte möglicherweise durch die Hinzunahme anderer HBV-Genotypen, die Expression des SHBs in animalen Zellkulturen oder die Anwendung neuer Adjuvantien erreicht werden [SCHAEFER S. ET AL., 2009]. Zur Abschätzung des Impferfolges der HBV-Impfung dient der Nachweis von Anti-HBs. Die protektive Wirkung der HBV-Impfung stellt zugleich die erste Impfung gegen eine menschliche Krebserkrankung, das HCC, dar.

Bei der passiven Impfung werden hohe Dosen Anti-HBs-Immunglobulin (HBIG) gegeben. Erfolgt die passive Immunisierung innerhalb von 48 Stunden nach Kontakt mit HBV, kann eine mögliche Infektion meist verhindert werden. Neugeborene von HBsAg-positiven Müttern bekommen nach Empfehlungen der STIKO unmittelbar nach der Geburt HBIG und den rekombinanten HBV-Impfstoff. Daneben wird HBIG außerdem bei HBV-Infizierten während und nach einer Lebertransplantation gegeben.

### **1.1.5 Medizinische Bedeutung des HBsAg**

Seit Entdeckung der HBsAg und Einführung des HBsAg-Screenings von Blutprodukten 1970 sowie Aufnahme in die Mutterschaftsrichtlinien 1994 hat sowohl die Zahl der Neuinfektionen durch Blutprodukte als auch die Infektionen von Neugeborenen in Deutschland in den letzten Jahrzehnten erheblich abgenommen [OFFERGELD R., 2006].

Neben dem Stellenwert als Infektionsmarker für den klinischen Verlauf einer Hepatitis B kommt dem HBsAg-Screening vor allem im Bereich der Blutspenden eine wesentliche Bedeutung zu. Durch die stetige Weiterentwicklung und Verbesserung der HBsAg-Tests sind

Infektionen durch Blutprodukte in industrialisierten Ländern selten geworden. Allerdings ist das Restrisiko von ungefähr 1:200.000 ohne zusätzliche Untersuchung mittels Nukleinsäureamplifikationstechnik (NAT) bzw. 1:600.000 mit NAT im Vergleich zu HIV- und HCV-Infektionen noch immer ungleich höher [OFFERGELD R. ET AL., 2005]. Ausgehend davon, dass ein Großteil dieser Infektionen in Deutschland durch okkulte persistierende Infektionen hervorgerufen werden [ROTH W. K. ET AL., 2002], wurde im Jahr 2006 das Anti-HBc Screening von Blutspender zusätzlich eingeführt [BURGER R. ET AL., 2005]. Blutprodukte von Anti-HBc positiven Spendern werden seit diesem Zeitpunkt nicht mehr verwendet. Allerdings gelten Organe Anti-HBc-positiver und HBV-DNA-negativer Spender unter Abwägung des hohen Bedarfs, außer bei einer positiven Spenderleber, als akzeptabel und bis zum heutigen Kenntnisstand als mutmaßlich mit keinem erhöhten HBV-Risiko verbunden [GERLICH W. H. UND SCHÜTTLER C. G., 2007]. Nach Empfehlungen der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) besteht nur dann eine Kontraindikation für eine mögliche Organspende, wenn beim Spender eine akute HBV-Infektion vorliegt.

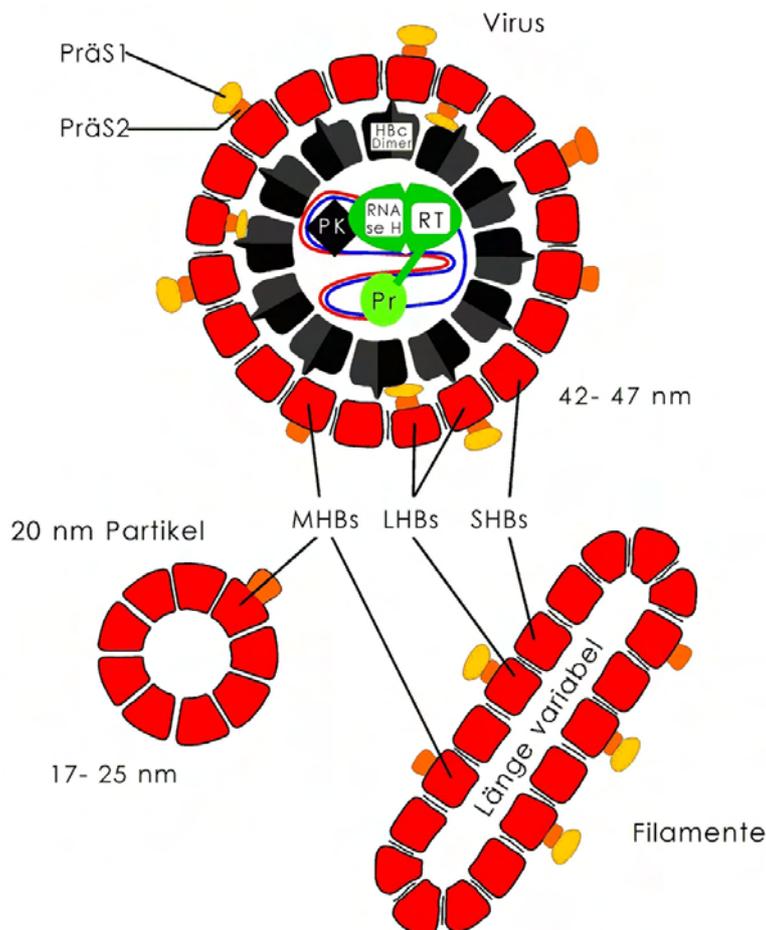
Eng mit der Organspende in Zusammenhang steht die chronische Niereninsuffizienz. Seit 1995 hat sich die Zahl der Dialysepatienten in Deutschland um fast 50 % erhöht. Im Jahr 2005 benötigten ungefähr 65.000 Menschen ein Dialyseverfahren. Da bei Dialyseverfahren immer noch ein erhöhtes Risiko parenteraler Infektionen gegeben ist, ist die Prävalenz von Hepatitis-B-Infektionen im Vergleich zur gesunden Bevölkerung erhöht [MATZKIES F. K. ET AL., 2000]. Durch Screening auf HBsAg ergibt sich zumindest die Möglichkeit, HBV-Infizierte an gesonderten Dialysemaschinen zu behandeln und die Infektionswahrscheinlichkeit noch nicht infizierter Dialysepatienten auch durch HBV-Impfungen zu senken.

Einen weiteren zu beachtenden Übertragungsweg stellt die Infektion Neugeborener durch HBsAg-positive Mütter dar. Ausgehend von ungefähr 750.000 Geburten pro Jahr in Deutschland und einer Häufigkeit von HBV-infizierten Personen von 0,6 bis 0,8 % werden zwischen 3.000 und 6.000 Kinder HBV-infizierter Mütter geboren [RKI, 2004]. Durch das in den Mutterschaftsrichtlinien verankerte Screening auf HBsAg und einer Simultanimpfung gefährdeter Neugeborener können bis zu 95 % der möglichen Infektionen verhindert werden. Die Fälle eines falsch negativen HBsAg-Tests werden bei dieser minimalen Form des Schwangeren-Screenings jedoch nicht erfasst.

## 1.2 Das Hepatitis-B-Virus

### 1.2.1 Struktur und Genomorganisation

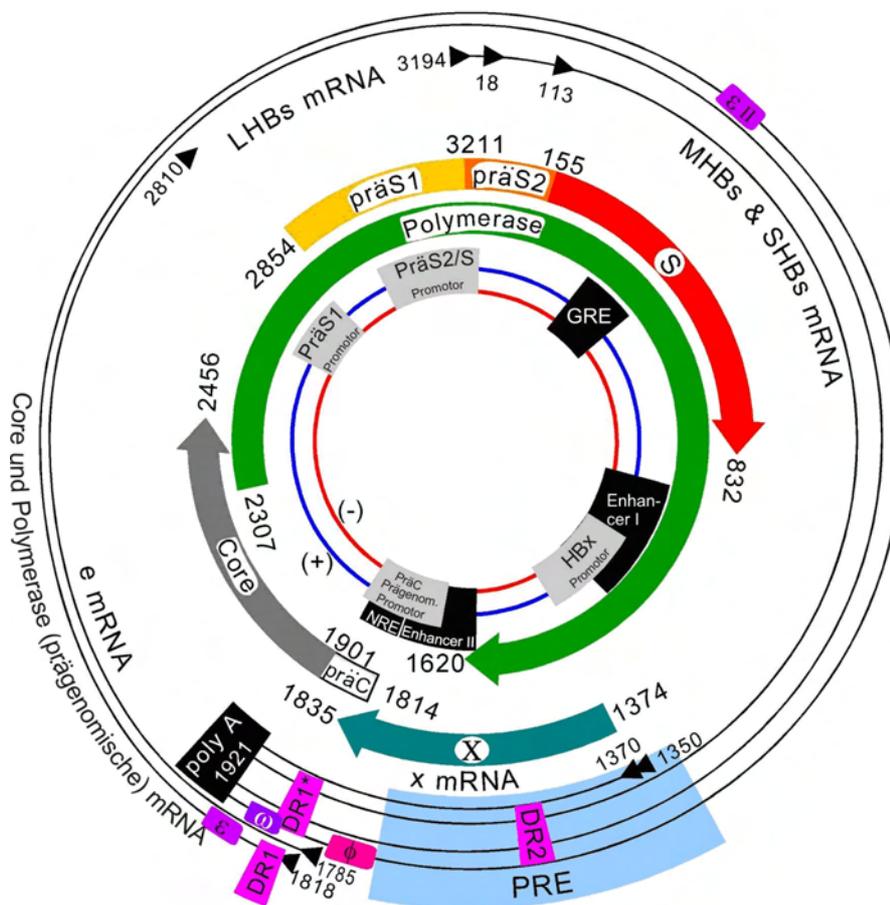
Das Hepatitis-B-Virus gehört zur Familie der *Hepadnaviridae* und dem Genus *Orthohepadnavirus*. Die *Hepadnaviridae* stehen entwicklungsgeschichtlich den echten Retroviren aufgrund vieler Gemeinsamkeiten im Replikationszyklus nahe, weshalb seit einigen Jahren die Einführung einer neuen Ordnung Retrovirales diskutiert wird [HANSEN C. N. UND HESLOP-HARRISON J. S., 2004]. Aufgrund der replikativen Gemeinsamkeiten wird vermutet, dass beide Familien evolutionär aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgegangen sind. Alle Mitglieder der *Hepadnaviridae* sind weitgehend speziesspezifisch und streng hepatotrop. Die Mitglieder der Orthohepadnaviren haben neben dem Menschen jeweils auch Menschenaffen, Wollaffen und Nagetiere zum Wirt.



**Abbildung 2:** Strukturmodell des HBV-Virions und subviraler Partikel mit den drei Hüllproteinen SHBs, MHBs, LHBs, dem Core-Protein (HBc), der Reversen Transkriptase (RT) und der kovalent an die 3,2 kb lange DNA gebundene Primerdomäne (Pr). PK: Proteinkinase. Die zellulären Chaperone im Inneren des Cores wurden weggelassen [modifiziert nach SCHAEFER S. ET AL., 2009].

Das Hepatitis-B-Virus ist ein umhülltes Virus mit einem Durchmesser von 42 bis 45 nm (Abb. 2) [DANE D. S. ET AL., 1970]. In hydratisierter Form, so wie es im Serum vorliegt, beträgt

dieser 50 nm (Stokes-Durchmesser) [JONAS T. R., 2005]. Die Virushülle besteht aus drei eng gepackten Strukturproteinen (S-, M- und LHBs) und zellulären Lipiden. Im Inneren befindet sich das regulär aus 240 Core-Proteinuntereinheiten bestehende 34 nm große Kapsid. Die Kapsomere lagern sich spontan als Dimere in einer ikosaedrischen Symmetrie (T=4) zusammen. Im Serum akut oder chronisch infizierter Patienten werden typischerweise außerdem eine große Anzahl subviraler Partikel gefunden. Diese DNA-freien sphärischen oder filamentösen Partikel bestehen ausschließlich aus HBs-Proteinen und Lipiden und sind nicht infektiös.



**Abbildung 3:** Genomorganisation des HBV. Transkriptionsstartstellen (▶) in der HBV-cccDNA für die mRNA der entsprechenden Proteine, Prägenom-RNA (äußerer Kreis), Encapsidationssignal  $\epsilon$ ; PRE: posttranslationales Regulationselement; GRE: Glucocorticoid-responsibles Element; NRE: negativ-regulatorisches Element; DR1\*: 3' terminal direct repeat 1 in der prägenomischen und HBe-mRNA.  $\epsilon 2$  und  $\Phi$  sind Sequenzelemente, die für die Genomreifung benötigt werden [SCHAEFER S. ET AL., 2009].

Das Kapsid enthält in seinem Inneren eine partiell doppelsträngige DNA (etwa 3,2 kb) als Genom (Abb. 3). An diese DNA ist am 5'-Ende des kodierenden Minusstranges kovalent die Primerdomäne der viralen Reversen Transkriptase (RT) gebunden. Die DNA wird durch eine Überlappung von Plus- und Minusstrang über 234 bp zusammengehalten. Der kodierende

Minusstrang umfasst die komplette Länge des Genoms. Der noch inkomplette Plusstrang hingegen weist am 3'-Ende eine variierende Länge auf. Nach Freisetzung des Kapsids im Zytosol und Transport des Genoms in den Kern der Wirtszelle wird zunächst eine kovalent geschlossene, zirkuläre virale DNA gebildet (cccDNA), welche wiederum als Matrize für die zelluläre RNA-Polymerase II zur Verfügung steht. In der Replikation des HBV dient die von der RNA-Polymerase II gebildete zweitlängste mRNA als prägenomisches Intermediat. Dieses Intermediat wird mit Hilfe der viralen RT in vielen Schritten innerhalb der Core-Partikel in eine partiell doppelsträngige DNA umgeschrieben.

Das Hepatitis-B-Virus hat ein sehr kleines Genom, das trotzdem für eine Vielzahl von viralen Genprodukten codiert. Die viralen Proteine leiten sich aus vier überlappenden Leserahmen (*open reading frame*, ORF) ab, welche durch unterschiedliche Leseraster definiert sind. Dies ermöglicht eine hohe Konzentration genetischer Informationen auf einem einzelnen DNA-Strang.

Die Translationsprodukte der vier ORFs sind das HBe- und Core-Protein (HBe/HBc), drei carboxyterminal identische Oberflächenproteine (LHBs, MHBs, SHBs), die virale DNA-Polymerase mit Primerdomäne, Reverser Transkriptase und RNase H sowie das X-Protein (HBx). Außerdem verfügt das Genom über zwei Enhancer (Enh I, Enh II), vier Promotoren (P), eine Bindungsstelle für Glucocorticoide (GRE) und ein negatives Regulationselement (NRE). Das gesamte Genom beinhaltet nur ein einziges Transkriptionsstoppsignal (TATAAA-Sequenz), wodurch alle viralen mRNAs koterminale sind. Ein posttranskriptionelles regulatorisches Element (PRE) sorgt dafür, dass Spleißen vermieden und eine hohe Akkumulation von viraler mRNA im Zytoplasma erreicht wird.

Die Transkription der viralen ORFs wird durch die im viralen DNA-Genom gelegenen Promotoren und Enhancer reguliert. Der leberspezifische Core-Promoter führt zu einer 3,5 kb langen mRNA, wobei diese entweder unterhalb oder oberhalb des präCore-Startcodons beginnt. Enthält die gebildete mRNA die präCore-Sequenz, so entsteht aus der im Anschluss folgenden Translation das HBe-Protein, bei Fehlen dieses Codons wird das HBc-Protein hergestellt. Für die die Oberflächenproteine codierenden mRNAs existieren zwei Promotoren. Der erste sogenannte präS1-Promotor liegt etwa 30 Nukleotide vor dem Startcodon für das große Oberflächenprotein (LHBs) und bewirkt die Synthese einer 2,4 kb langen mRNA. Die anderen beiden Oberflächenproteine (MHBs, SHBs) verfügen über einen präS2/S-Promoter, welcher sich direkt vor dem präS2-Startcodon befindet. Das Transkriptionsprodukt hat abhängig von der Startstelle eine ungefähre Länge von 2,1 kb. Im Gegensatz zum präS1-Promotor ist der präS2/S-Promotor nicht leberspezifisch. Auch das HBx-Protein verfügt über

einen Promotor. Dieser HBx-Promotor ist ebenfalls nicht leberspezifisch und veranlasst die Bildung einer 0,7 kb langen mRNA.

### 1.2.2 Strukturproteine des HBV

Das HBV verfügt über die genannten vier Strukturproteine: Das HBc-Protein und drei HBs-Proteine. Das vom HBc abgeleitete HBe-Protein ist nicht am Aufbau des Virions beteiligt, gleichwohl das „e“ mitunter fälschlicherweise als „envelope“ missgedeutet wird.

Das HBc-Protein besteht bei den meisten HBV-Genotypen aus 183 Aminosäuren. Einzig bei Genotyp A weist das Protein eine Länge von 185 Aminosäuren auf [STEVEN A. C. ET AL., 2005]. Einzelne HBc-Proteine lagern sich spontan im Zytoplasma zu Dimeren zusammen, welche durch Cysteinbindungen stabilisiert werden. Selbst in Abwesenheit von anderen viralen Komponenten bilden die in hoher Konzentration vorliegenden einzelnen Dimere eine ikosaedrische Form [ZLOTNICK A. ET AL., 1999] in T3- und/oder T4-Symmetrie. Ist die virale prägenomische RNA (pg RNA) vorhanden, wird diese mit der viralen DNA-Polymerase und einer Proteinkinase in einen Komplex, bestehend aus HBc-Proteinen, verpackt. Die pgRNA bindet dabei an das argininreiche C-terminale Ende des Proteins. Im Verlauf des Replikationszyklus löst sich die pgRNA davon ab, vermutlich durch Phosphorylierung der an der Innenseite des Kapsids gelegenen HBc-Moleküle [GERLICH W. H. ET AL., 1982; KANN M. UND GERLICH W. H., 1994]. Das Kapsid des HBV bietet durch seine Konformation fünf oder mehr Epitope für die Bildung von Antikörpern [BELNAP D. M. ET AL., 2003]. Das immundominante Epitop wird von den Aminosäuren 78 bis 83 gebildet. Die von diesen Aminosäuren gebildete Struktur innerhalb des Kapsids ist nach außen gerichtet und so gut für immunologische Zellen erreichbar [CONWAY J. F. ET AL., 1998]. Obwohl Patienten aufgrund der regelmäßigen Anordnung des HBc im Kapsid eine starke Immunantwort auf den Kontakt mit HBcAg zeigen [ALMEIDA J. D. ET AL., 1971], schützen diese Antikörper nicht vor einer Hepatitis B Infektion.

Beinhaltet die für das HBc-Protein codierende mRNA zusätzlich die präCore-Sequenz, wird das HBe-Protein translatiert. Dieses Protein besitzt durch die präCore-Sequenz an seinem N-terminalen Ende weitere 29 Aminosäuren, welche das Protein in das endoplasmatische Retikulum (ER) einschleusen [STANDRING D. N. ET AL., 1988]. Durch die Signalpeptidase werden 19 Aminosäuren am N-terminalen Ende abgespalten. Die restlichen 10 Aminosäuren verhindern die Zusammenlagerung der einzelnen HBe-Proteine zu einem Kapsid. [WASENAUER G. ET AL., 1992]. Nachdem am C-terminalen Ende die an Position 149 befindliche Aminosäure entfernt worden ist, wird das nun lösliche HBe-Protein in das Serum sezerniert. Bedingt durch den identischen Leserahmen des HBc- und des HBe-Proteins, weisen beide die

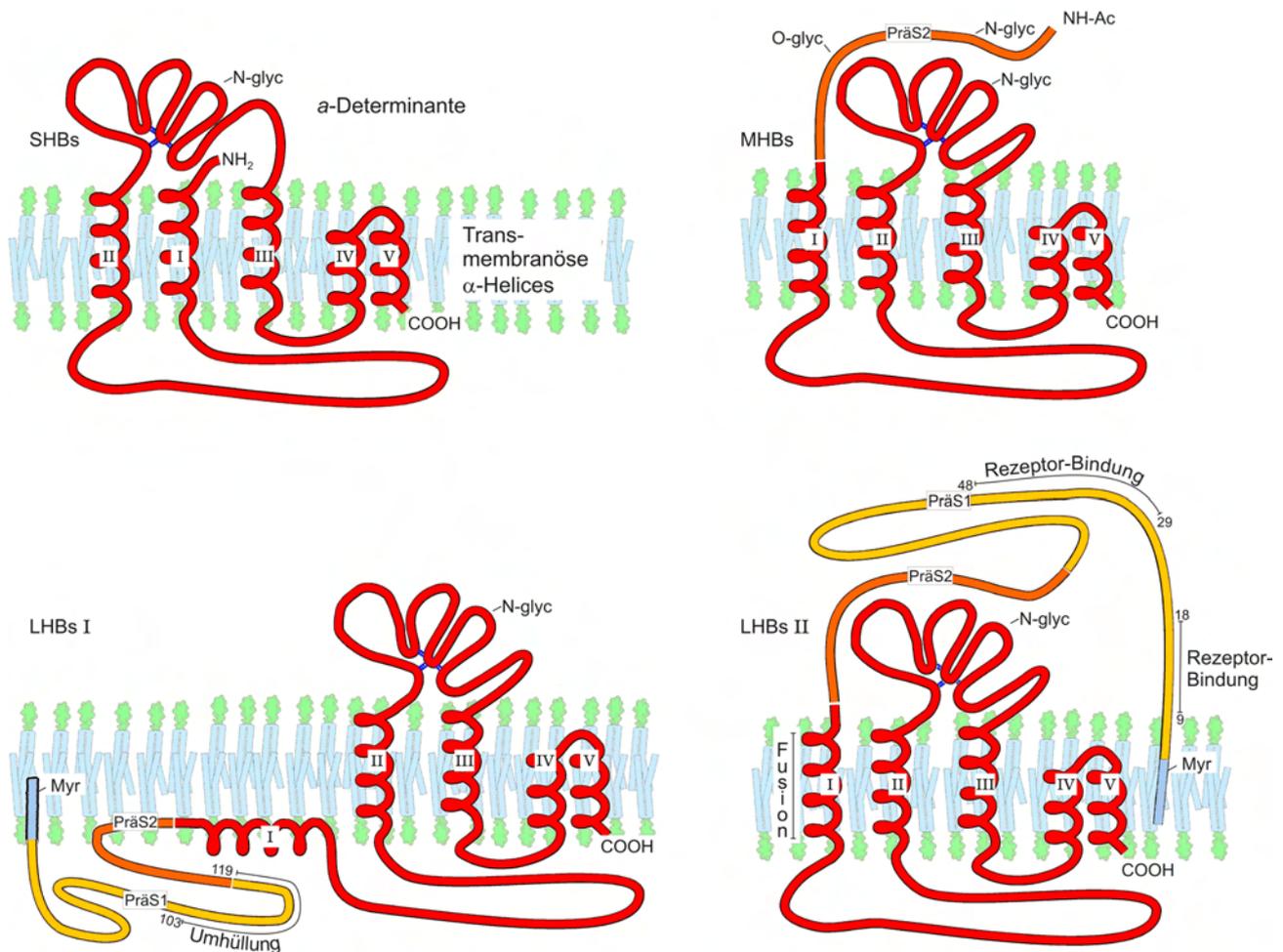
gleichen immunologischen T-Zellepitope auf. Die B-Zellepitope unterscheiden sich jedoch aufgrund einer unterschiedlichen Proteinfaltung. Die eigentliche Funktion des HBe-Proteins ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Es spielt weder bei der Bildung des Virions, noch bei der Replikation, noch bei dem Infektionsvorgang eine Rolle. Neuere Erkenntnisse sprechen dafür, dass es eine immunmodulatorische Eigenschaft besitzt. So konnte gezeigt werden, dass es bei HBeAg-positiven Mäusen zu einer verminderten T-Zell-Aktivität gegen das HBcAg kam [CHEN M. ET AL., 2005]. Klinische und experimentelle Untersuchungen zeigen, dass eine Infektion mit HBeAg-negativen Mutanten zu einem akuten oder fulminanten Verlauf der Erkrankung führt, ein chronischer Verlauf jedoch ausbleibt [MILICH D. UND LIANG T. J., 2003].

Das HBV besitzt drei Oberflächenproteine [L(arge)-, M(iddle)-, S(mall)-HBs], die alle in einem ORF codiert sind. Alle HBs-Proteine besitzen ein einheitliches C-terminales Ende, da ihre Startcodons auf der viralen DNA im gleichen Leseraster liegen. Die Sequenz für das kleine SHBs-Protein ist sowohl in der MHBs- als auch in der LHBs-Sequenz enthalten. Diese bildet den S-Bereich der HBs-Proteine. Das MHBs enthält zusätzlich eine präS2-Sequenz, LHBs neben dieser eine weitere präS1-Sequenz. SHBs besitzt eine innere (Aminosäure 28 - 79) und eine äußere (Aminosäure 99 - 170) Schleife und ist mit bis zu vier hydrophoben Helices in die Membran integriert. Die äußere, durch Cystein in einer festen Konformation gehaltene Schleife, bildet die sogenannten HBsAg-Determinanten (Abb. 4).

Sowohl bei LHBs (90 %), MHBs (30 %) als auch bei SHBs (50 %) kann in Position 146 des S-Bereiches ein Asparagin-gekoppeltes Oligosaccharid gebunden sein. Im Gegensatz dazu ist im präS2-Bereich an Position 4 nur bei MHBs ein solches Oligosaccharid nachweisbar [SCHMITT S. ET AL., 1999; SCHMITT S. ET AL., 2004]. Die Funktionalität des MHBs ist noch nicht genau aufgeklärt. Allerdings führt eine Rücknahme der Glykosilierung zu einer verminderten Sekretion des Virus und der subviralen Partikel [BLOCK T. M. ET AL., 1998]. Die präS-Domäne des LHBs-Proteins, bestehend aus präS1 und präS2, liegt in zwei topologischen Varianten vor (Abb. 4). Kurz nach der Synthese liegt diese Domäne im Zytosol, später, wahrscheinlich im Trans-Golgi-Apparat, klappt ein Teil um und ragt aus der Oberfläche heraus [BRUSS V. ET AL., 1994; LAMBERT C. ET AL., 2001; SCHMITT S. ET AL., 2004]. Für die Umhüllung des Virus sind LHBs-Proteine mit im Zytosol gelegenen präS-Domänen nötig. Diese führen zu einer Bindung und nachfolgenden Umhüllung der ausgereiften Core-Proteine [GERELSAIKHAN T. ET AL., 1996].

SHBs bildet in allen drei Partikeln des HBV die Hauptkomponente, MHBs in weit geringerer Zahl eine Nebenkompente. Der Anteil von LHBs an der Bildung von Virushüllen,

Filamenten und sphärischen Partikeln ist verschieden. In Filamenten und Virushüllen sind relativ viele LHBs-Proteine vorhanden, in den sphärischen Partikeln hingegen wenige. Bei einer Überexpression von LHBs im Vergleich zu SHBs findet keine Sekretion des Virus oder subviraler Partikel statt, sondern eine Anhäufung im ER.



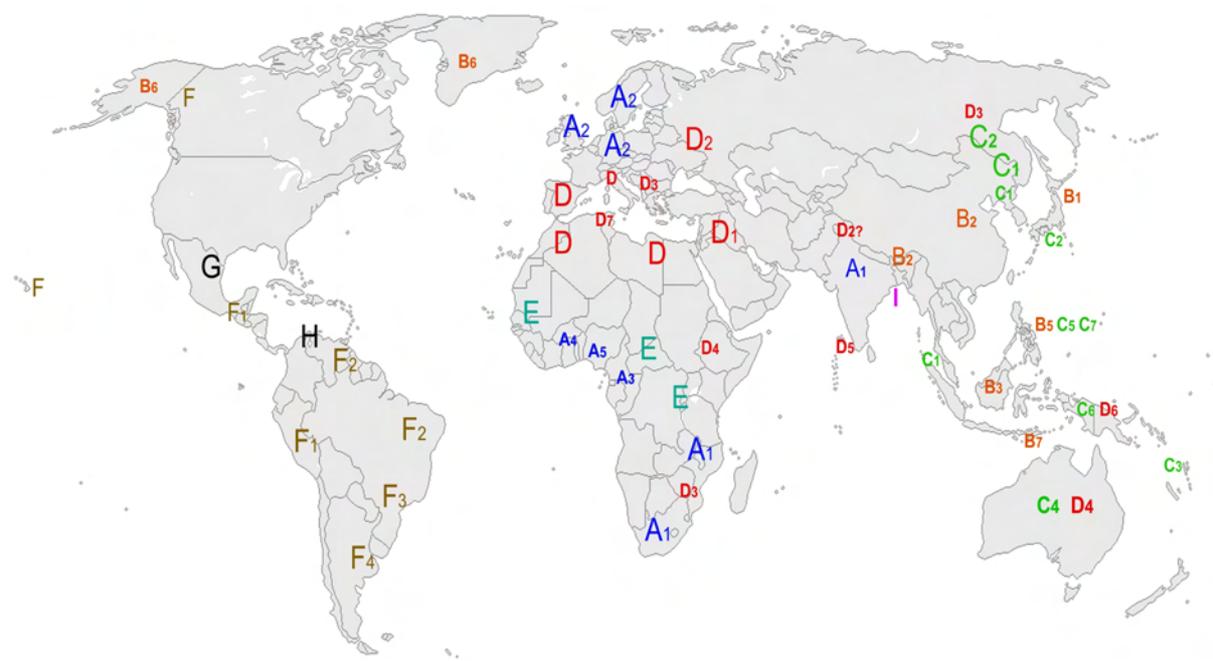
**Abbildung 4:** Topologisches Modell der HBs Proteine an der ER-Membran bzw. in den HBsAg-Partikeln bzw. der HBV-Hülle (Myr = Myristinsäurerest am Aminoende; N-glyc = asparagingekoppeltes Oligosaccharid; NH-Ac = Acetyl-Rest am Aminoende; O-glyc = Threonin-gekoppeltes Oligosaccharid) LHBs hat eine duale Topologie. Posttranslational liegt zunächst LHBs I vor. Im HBV-Partikel bzw. den HBsAg-Partikeln liegen ca. 50 % als LHBs II vor [SCHAEFER S. ET AL., 2009].

### 1.2.3 HBV-Genotypen und HBsAg-Subtypen

Im Verlauf des Replikationszyklus von HBV wird zuerst durch die zelluläre RNA-Polymerase II die pgRNA gebildet, welche später durch die virale RT in eine partiell doppelsträngige DNA umgeschrieben wird. Weil sowohl die RNA-Polymerase II als auch die virale RT über keine Korrekturmechanismen verfügen, sind Mutationen des HBV Genoms viel häufiger als bei anderen DNA-Viren. Wenn man davon ausgeht, dass bei einer durchschnittlichen, chronischen Infektion 1 bis  $5 \times 10^{13}$  Viruspartikel im gesamten Körper



Vielzahl von Epitopen, welche in fast allen Genotypen identisch sind [NAINAN O. V. ET AL., 2002]. Diese werden unter dem Begriff Determinante a zusammengefasst. Untersuchungen von HBV-Varianten deuten darauf hin, dass der konservierte Bereich der HBs-Antigenität von Aminosäure 100 bis 200 gebildet wird [GERLICH W. H., 2004]. Alle Subtypen haben eine für sie spezifische Anordnung der Aminosäuresequenz in zwei bestimmten Positionen. Dabei handelt es sich um Position 122 (Determinante d oder y für Aminosäure K oder R) und 160 (Determinante w oder r für Aminosäure K oder R). Die Determinante w wird zusätzlich in w<sub>1</sub>, w<sub>2</sub> (P 127), w<sub>3</sub> (T 127) und w<sub>4</sub> (L/I 127) unterteilt [MAGNIUS L. O. UND NORDER H., 1995].



**Abbildung 6:** Geographische Verteilung der Hepatitis-B-Virus-Genotypen und Subgenotypen des Menschen in autochthonen Populationen [Erweitert und modifiziert nach SCHAEFER S. ET AL., 2009].

Durch Analysen der Genome von weltweit vorkommenden Hepatitis-B-Viren wurde eine Einteilung in neun Genotypen (A - I) vorgenommen, welche in mehr als 8 % ihres Genoms Abweichungen zueinander aufweisen [MIYAKAWA Y. ET AL., 1997; CHU C. J. UND LOK A. S., 2002; SCHAEFER S., 2005; OLINGER C. M. ET AL., 2008; ARANKALLE V. A. ET AL., 2010]. Eine weitere Untergliederung in Subgenotypen (A1-A2, B1-B6, C1-C7, D1-D7, E, F1-F4, G, H und I) wird anhand von Unterschieden innerhalb des S-Gens getroffen, wobei diese mindestens 4 % betragen [NORDER H. ET AL., 2004; KRAMVIS A. ET AL., 2005]. In letzter Zeit wurden immer mehr Subgenotypen identifiziert und ihren jeweiligen Genotypen zugeordnet, wobei für die Genotypen E, G, H und I bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine Subgenotypen entdeckt wurden. Genotypen und Subgenotypen zeigen eine klare geografische Verteilung (Abb. 6), welche zum einen zum weiteren Verständnis der Herkunft und der Ausbreitung des HBV beiträgt, zum anderen das regional unterschiedliche Ansprechen auf Therapien erklärt.

### 1.3 Varianten und Mutanten des HBsAg

Seit der Entdeckung des Australia-Antigens 1963 sind viele unterschiedliche Varianten und Mutationen des HBsAg entdeckt worden. Dabei zeigt sich, dass neben natürlich vorkommenden Varianten auch aufgrund aktiver und passiver Impfung und nicht zuletzt durch Medikamente induzierte Mutanten selektiert werden.

Als typische Eigenschaft der späten Phase einer chronischen Infektion ist die Herausbildung von Varianten, bedingt durch Deletionen und/oder Mutationen, innerhalb der HBV-DNA zu sehen. Dabei scheinen unterschiedliche Mutationsmuster charakteristisch für die verschiedenen Stadien zu sein [GÜNTHER S. ET AL., 1999]. Diese betreffen vor allem die Regionen für die Genprodukte HBeAg, HBcAg, HBsAg und HBx [KANN M. UND GERLICH W. H., 1998]. Somit unterliegen Aminosäuresequenzen, welche für die Immunantwort durch B- und T-Zellen eine entscheidende Rolle spielen, einer hohen Mutationsrate [BASUNI A. A. UND CARMAN W. F., 2004].

Das Aufkommen von HBsAg-Mutanten bei erfolgreich Geimpften wurde 1988 erstmals in Italien entdeckt [ZANETTI A. R. ET AL., 1988]. Carman et al. zeigten, dass eine Substitution von Glycin zu Arginin an Position 145 (G145R) in den meisten Fällen vorlag [CARMAN W. F. ET AL., 1990]. Im Laufe der letzten Jahre wurden einige weitere Mutationen bekannt, wie beispielsweise P120S und P127S [MELE A. ET AL., 2001] sowie D144A und P120S/T/A [GERLICH W. H., 2004]. Jedoch stellt sich die Mutation G145R als die häufigste und stabilste heraus. Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Bildung dieser Mutationen im direkten Zusammenhang mit der Gabe von HBIG steht. Bei einer Studie mit 2.000 Neugeborenen Hepatitis-B-infizierter Mütter wurden 33 Kinder chronische Träger. Beachtenswert war die Tatsache, dass unter diesen 33 keine einzige Mutation gefunden worden ist. Da alle diese Neugeborenen nach Geburt lediglich mit dem aktiven Hepatitis-B-Impfstoff immunisiert wurden, bestätigt diese Studie den Verdacht, dass die Mutationen auf die Applikation von HBIG zurückzuführen sind [GERLICH W. H., 2004].

Die Variabilität der natürlich entstehenden HBsAg-Varianten ist um einiges größer als jene Mutationen, die sich unter aktiver und passiver Impfung bilden [GERLICH W. H. ET AL., 2007]. Diese das HBsAg betreffenden Varianten zeigen zu einem großen Teil im Bereich der Aminosäuren 124 bis 147 Mutationen, häufig vorkommende sind Q129L, Q129R, N131P, M133T, C137W, P142L, D144A und G145R [GERLICH W. H., 2004].

Durch eine stetige Weiterentwicklung und Anwendung von neuen Medikamenten gegen eine Hepatitis-B-Infektion wurden weitere Mutationen selektiert und im Verlaufe der letzten Jahre erkannt. Dabei sind einige Mutationen für ein Medikament spezifisch, andere hingegen treten

bei vielen bis zum heutigen Zeitpunkt verwendeten Medikamenten auf. Die betroffenen Regionen codieren dabei nicht nur für die HBV-DNA-Polymerase, sondern auch für das HBsAg. Dabei kann es vorkommen, dass eine Mutation im S-Gen gleichzeitig eine Mutation für die DNA-Polymerase bedingt. Dies liegt an der Überlappung der einzelnen proteinkodierenden Sequenzen für die beiden Virusproteine (Abb. 3).

Das Auftreten von Mutationen kommt bei der Therapie mit Lamivudin im Vergleich zu Adefovir häufiger vor. Unter der Therapie mit Lamivudin entwickelt fast ein Viertel der Patienten nach einem Jahr eine Resistenz, nach vier Jahren sogar fast drei Viertel [MÜLLER C., 2009]. Die häufigste dabei auftretende Mutation betrifft das bekannte YMDD-Motiv der C-Domäne der DNA-Polymerase [BARTHOLOMEW M. M. ET AL., 1997]. Weitere bekannte Mutationen sind rtV173L, rtL180M, rtM204V/I [VAN BÖMMEL F. ET AL., 2006]. Sowohl bei Lamivudin als auch Adefovir auftretende Mutationen im S-Gen sind E164D und I195M [GERLICH W. H., 2004]. Bei Adefovir werden außerdem Veränderungen in der äußeren HBsAg-Schleife beobachtet. Häufig vorkommende sind P120, M133, S143, D144, G145. Vermutet wird ein Zusammenhang dieser Mutationen mit der immunstimulierenden Wirkung von Adefovir [GERLICH W. H., 2004]. Schildgen et al. veröffentlichten im Jahr 2006 eine weitere Mutation rtI233V, die zwar seltener vorkommt, aber ebenfalls zur Resistenz gegen Adefovir führen kann. Die Besonderheit dabei ist, dass diese Mutation nicht durch die Therapie mit Adefovir selektioniert wurde, sondern unabhängig davon bereits bestand [SCHILDGEN O. ET AL., 2006].

#### **1.4 Probleme der HBsAg-Diagnostik**

Zur Beurteilung eines Nachweisverfahrens dienen sowohl die diagnostische und analytische Sensitivität, als auch die diagnostische Spezifität. Im Idealfall betragen diagnostische Sensitivität, d. h. ein positives Testergebnis bei einer infizierten Person, und diagnostische Spezifität, d. h. ein negatives Testergebnis bei einer nicht infizierten Person, 100 %. Jedoch weist kein Nachweisverfahren diese Idealwerte auf, da bei jedem Test aufgrund unspezifischer Bindungen, Inhibitionen oder technischer Mängel falsch positive und falsch negative Ergebnisse auftreten. Darüber hinaus gewinnt die analytische Sensitivität zur Beurteilung von Nachweisverfahren immer mehr an Bedeutung. Diese ist als jene Konzentration des Analyten definiert, bei der das Testverfahren noch ein positives Ergebnis liefert.

Unter Berücksichtigung dieser Begrifflichkeiten sind die Probleme der HBsAg-Analytik als sehr vielschichtig und komplex anzusehen. In diesem Zusammenhang zu nennen sind die beiden Standardpräparationen (WHO- und PEI-Standard) für HBsAg, der Zeitpunkt der Nachweisbarkeit von HBsAg bei frischer Infektion und schließlich die Zunahme falsch

negativer Testergebnisse durch das vermehrte Auftreten von HBsAg-Mutanten.

Alle kommerziellen Testkits, die derzeit für die HBsAg-Diagnostik zugelassen sind, wurden anhand einer Standardpräparation standardisiert. Als internationaler Standard (IS) dient zur Zeit ein von der WHO verwendetes inaktiviertes HBsAg [LELIE P. N. ET AL., 1987] mit dem Genotyp A2 und HBsAg-Subtyp *adw2* (*Second International Standard for HBsAg*). Der IS deckt somit nicht alle Genotypen und Subtypen ab. Für die Beurteilung von Tests, die für die Erfassung eines anderen Genotypen oder Subtyps hergestellt wurden, ist eine weitere Prüfung erforderlich [NIBSC, 2004<sub>A</sub>]. Bei der Untersuchung des für den IS verwendeten Materials konnte gezeigt werden, dass dieses biochemisch und antigenetisch unzureichend definiert ist und daher nur eine begrenzte Aussagekraft hat. Darüber hinaus enthält dieser Standard nur sehr wenige prä-S-Epitope und ist somit nicht für die Eichung und Bewertung von Tests geeignet, welche für den Nachweis von HBsAg auch andere Antikörper als gegen SHBs benutzen [SCHÜTLER C. G. ET AL., 2010].

Des Weiteren ergeben sich Probleme bei der Vergleichbarkeit der verwendeten Einheiten IU/ml (WHO) und PEI-U/ml (Paul Ehrlich-Institut) für das HBsAg. Bezogen auf den ursprünglichen Paul Ehrlich-Standard, welcher von Wolfram H. Gerlich und Reiner Thomssen entwickelt wurde, entsprechen 0,58 PEI-U/ml genau 1 IU/ml. Bei dem derzeit erhältlichen Standard sind es jedoch nur noch 0,43 PEI-U/ml [FERGUSON M. ET AL., 2003]. Darüber hinaus lehnt die WHO mittlerweile die früher häufig verwendete Einheit ng HBsAg-Protein/ml ab, da sich bei einem internationalen Ringversuch Abweichungen der Nanogramm-Angaben der unterschiedlich geeichten Referenzpräparate bis zu einem Faktor von 10 ergaben [FERGUSON M. ET AL., 2003].

Ein weitaus größeres Problem in der HBsAg-Analytik stellt der Zeitpunkt der Nachweisbarkeit von HBsAg im Infektionsverlauf dar. Dabei liegen zwischen den einzelnen Tests sehr große Unterschiede bezüglich der Nachweisgrenze. Diese reicht von 0,018 bis 0,100 IU/ml HBsAg [Scheiblauer H. et al., 2006]. Des Weiteren ergeben sich sowohl aus der mangelnden Nachweismöglichkeit von HBsAg bei Werten unterhalb von 0,07 ng/ml HBsAg in Plasma oder Serum als auch aus der Abhängigkeit von einer erfolgten Serokonversion beim Patienten falsch negative Ergebnisse („diagnostisches Fenster“). Die Empfindlichkeit von modernen, in der Routine angewandten Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) liegt bei 12 bis 40 Genomen/ml und ist aufgrund eines internationalen Standardpräparates für HBV-NATs sehr gut vergleichbar [NIBSC, 2004<sub>B</sub>]. Bedingt durch diese hohe Empfindlichkeit, können akute HBV-Infektionen mittels NAT meist früher diagnostiziert werden als durch den alleinigen Nachweis von HBsAg. Kuhns et al. konnten allerdings bei Blutspendern aufzeigen,

dass ein Verzicht auf das HBsAg-Screening und die alleinige Durchführung einer NAT in bis zu drei Prozent der Blutspenden eine frische HBV-Infektion unentdeckt bleibt [KUHNS M. C. ET AL., 2004].

Die zunehmende Zahl an falsch negativen Ergebnissen liegt allerdings auch an der Zunahme von Varianten und Mutanten des HBsAg. Viele Studien konnten belegen, dass die einzelnen handelsüblichen Testkits für HBsAg zum einen unterschiedlich auf Varianten bzw. Mutanten reagieren, zum anderen eine Abhängigkeit des Ergebnisses vom jeweiligen Genotypen existiert. Dabei reichten die Ergebnisse von falsch negativ über grenzwertig positiv bis zu stark positiv [LA'ULU S. L. UND ROBERTS W. L., 2006; LY T. D. ET AL., 2006; SCHEIBLAUER H. ET AL., 2006; WEBER B., 2005; WEBER B., 2006].

Beide Aspekte des HBsAg-Nachweises, hohe Sensitivität und Nachweis auch von natürlich und unter Therapie auftretenden Mutanten, sind entscheidende Kriterien für die Bewertung von Testverfahren. Eine hohe Sensitivität und hohe Spezifität des HBsAg-Nachweises sind entscheidend für die Zuverlässigkeit bei Screening-Untersuchungen, beispielsweise im Bereich der Transplantations- und Transfusionmedizin sowie bei dem immer mehr an Bedeutung gewinnenden Therapie-Monitoring von HBV-Patienten mittels quantitativer HBsAg-Messung.

## 1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die Hinzunahme von Anti-präS2-Antikörper in ein diagnostisches Nachweisverfahren für das HBsAg die analytische und diagnostische Sensitivität unter Beibehaltung einer akzeptablen Spezifität zu steigern vermag. Dies soll mit zwei am Markt befindlichen Testsystemen (Abbott AxSYM® und Abbott Architect®) überprüft werden, die jeweils in der herkömmlichen Version und in der Version mit zusätzlichem monoklonalem Antikörper gegen ein konserviertes präS2-Epitop eingesetzt wurden. Die durch die Hinzunahme dieser Antikörper möglicherweise erniedrigte Spezifität soll mit negativen Proben von Patienten und von Blutspendern überprüft werden. Zusätzlich soll die Spezifität in Proben von Dialysepatienten und Schwangeren untersucht werden, also jenen Patientenkollektiven, die häufig in der serologischen Diagnostik zu falsch positiven Ergebnissen führen. Der Einfluss der präS2-Antikörper auf die diagnostische Sensitivität des HBsAg-Nachweises soll mit seriellen Proben von HBsAg-Serokonvertern und die analytische Sensitivität mittels Verdünnungsreihen gereinigter HBsAg-Präparate und nativer Plasmen verschiedener Genotypen untersucht werden. Eine mögliche Verbesserung der Testverfahren im Sinne eines breiteren Reaktionsspektrums soll mit Proben von Patienten geprüft werden, die natürliche SHBsAg-Mutanten entwickelt haben.

Das Bindungsverhalten des in den Testsystemen verwendeten Anti-präS2-Antikörpers gegenüber SHBsAg, MHBsAg und LHBsAg verschiedener Genotypen soll mit gut charakterisierten monoklonalen Antikörpern mittels Western Blot verglichen werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

DTT (1,4-Dithiothreitol)	Fa. Roth, Karlsruhe Katalognummer: 6908.1
ECL Western Blotting Substrate	Pierce, Rockford USA Katalognummer: 32209
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Fa. Invitrogen, Karlsruhe Katalognummer: LC5925

Sämtliche anderen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma Chemie (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Für das Ansetzen aller Puffer und Lösungen wurde Wasser aus der Reinstwasseranlage (Fa. Millipore, Eschborn) des Institutes für Medizinische Virologie, Gießen, verwendet.

### 2.2 Puffer

Blockpuffer	1x Roti-Block® 10 % BSA, Fraktion V 1x PBS	Fa. Roth, Karlsruhe Katalognummer: A151.1 Fa. Roth, Karlsruhe Katalognummer: 8076.1
MOPS-Laufpuffer	50 ml NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x) ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O	
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)		Fa. Invitrogen, Karlsruhe Katalognummer: NP0007
NuPAGE® Antioxidant		Fa. Invitrogen, Karlsruhe Katalognummer: NP0005
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)		Fa. Invitrogen, Karlsruhe Katalognummer: NP0001
PBS (10x)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O (eingestellt mit NaOH auf pH 7,4)	

AxSYM® Probe cleaning solution		Fa. Abbott, Wiesbaden Katalognummer: 9A35-04
AxSYM® Solution 1 MUP (4-Methylumbelliferylphosphat)		Fa. Abbott, Wiesbaden Katalognummer: 8A47-04
AxSYM® Solution 3 Matrix cell wash		Fa. Abbott, Wiesbaden Katalognummer: 8A81-04
AxSYM® Solution 4 Line diluent		Fa. Abbott, Wiesbaden Katalognummer: 8A46
TNE-Puffer (10x)	24,22 g Tris-Base 81,80 g NaCl 3,7 g EDTA ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O (eingestellt mit NaOH auf pH 7,4)	
Transferpuffer	14,4 g Glycin 3 g Tris-Base 150 ml Methanol ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O	
Waschpuffer	1 % Tween20 0,5 % BSA 1x PBS	

### 2.3 Blutproben

Die verwendeten HBV-positiven Serum- und Plasmaproben stammen aus der Sammlung des Institutes für Medizinische Virologie im Rahmen der Aufgaben als Nationales Konsiliarlabor für Hepatitis B und D. Als Proben von Dialysepatienten und Schwangeren wurden Restmengen anonymisierter Patientenproben aus der diagnostischen Abteilung des Institutes verwendet. Proben von Blutspendern wurden uns als Restproben dankenswerterweise vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen überlassen. Als Negativplasma diente eine Blutspende, die serologisch negativ war bezüglich HIV (Anti-HIV-1/2), HCV (Anti-HCV, HCV-Core-Antigen) und HBV (Anti-HBs, Anti-HBc, Anti-HBe und HBsAg).

Für die wissenschaftliche Verwendung von nicht mehr verwendetem Probenmaterial liegen eine allgemeine Einwilligung der Patienten wie auch eine Genehmigung der Ethikkommission (Aktenzeichen 112/05) des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität vor.

## 2.4 HBV-Serokonverter-Panels

Die getesteten Serokonverter-Panels sind alle kommerziell erhältlich und wurden freundlicherweise von der Firma Abbott Diagnostics bereitgestellt.

HBV11003 (Subtyp nicht ermittelt)	Fa. ZeptoMetrix
HBV11006 (Subtyp nicht ermittelt)	Fa. ZeptoMetrix
HBV11011 (Subtyp nicht ermittelt)	Fa. ZeptoMetrix
HBV11012 (Subtyp nicht ermittelt)	Fa. ZeptoMetrix
PHM910 (Subtyp ad)	Fa. Boston Biomedica
PHM923 (Subtyp ay)	Fa. Boston Biomedica
PHM931 (Subtyp nicht ermittelt)	Fa. Boston Biomedica
PHM933 (Subtyp nicht ermittelt)	Fa. Boston Biomedica
PHM934 (Subtyp ad)	Fa. Boston Biomedica

## 2.5 HBV-Genotypen-Panels

Ein Teil der verwendeten Genotypenproben entstammt der Serumverwaltung des Nationalen Konsiliarlabors (NKL) für Hepatitis B und D am Institut für Medizinische Virologie. Daneben wurden der 2. WHO-Standard (NIBSC code 00/588) und ein Genotypen-Panel mit 14 Proben untersucht, das vom NKL und dem Paul Ehrlich-Institut im Auftrag der WHO zusammengestellt wurde (Tabelle 1). Die Einstellung der einzelnen Seren auf die gewünschte Arbeitskonzentration erfolgte mit HBV-, HIV- und HCV-negativem Humanserum.

**Tabelle 1:** Genotypen des WHO-Panels mit Bezeichnung, Herkunft und Charakterisierungsdaten.

Genotyp/ Subtyp	Bezeichnung	Herkunft	HBsAg [µg/ml]	Architect [KIU/ml]	Laurell [PEI-KU/ml]	HBV-DNA [Genom/ml]
A1/adw2	N4542	Südafrika	119,84	131,92	75,3	3,28E+09
A1/adw2	N4407	Brasilien	92,69	94,00	70,0	3,52E+09
A2/adw2	N4879	Deutschland	64,23	74,30	57,0	3,96E+09
B1/adw2	N4214	Japan	29,82	51,40	39,8	8,01E+08
B2/adr	N4222	Japan	80,46	95,30	50,1	1,54E+09
C2/Ce adr	N4227	Japan	84,02	70,20	63,3	2,16E+09
C2/Ce adr	N4229	Japan	47,48	47,00	46,1	6,76E+08
C2/Ce adr	N3825	Russland	50,37	54,40	50,2	1,58E+09
D1/ayw2	N4203	Deutschland	119,70	130,40	87,3	6,32E+09
D1/ayw2	KG	Deutschland	93,47	125,19	100,0	5,00E+09
D3/ayw2	N4595	Südafrika	41,88	63,80	46,1	5,63E+08
E/ayw4	N4881	Westafrika	85,56	82,60	74,8	5,10E+09
F3/adw4	N4457	Brasilien	24,79	39,80	28,0	5,00E+03
H/adw4	K1146	Deutschland	107,88	342,07	77,2	6,00E+09

## 2.6 HBs-Antigen-Präparationen

AxSYM® HBsAg-Kontrollen

Fa. Abbott, Wiesbaden

Architect® HBsAg-Kontrollen

Fa. Abbott, Wiesbaden

HBsAg Genotyp A2, HBsAg-Subtyp adw2: Konzentration im Ausgangsmaterial 127 PEI-KU/ml (Immundiffusion nach Laurell), Aufreinigung durch Dichtezentrifugation in Saccharose von S. Broehl, Institut für Medizinische Virologie, Gießen. Konzentration nach Aufreinigung 1,73 µg/µl in TNE.

HBsAg Genotyp C, HBsAg-Subtyp adr: Konzentration im Ausgangsmaterial 50 PEI-KU/ml (Laurell), Aufreinigung wie oben von S. Broehl, Institut für Medizinische Virologie, Gießen. Konzentration nach Aufreinigung 2,0 µg/µl in TNE.

HBsAg Genotyp D, HBsAg-Subtyp ayw: Konzentration im Ausgangsmaterial 100 PEI-KU/ml (Laurell), Aufreinigung wie oben von U. Wend, Institut für Medizinische Virologie, Gießen.

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Primäre Antikörper

Als gereinigte monoklonale Antikörper standen MA 18/07, Q 19/10, 2-11B1, 1-9C1, H166 und 116-34 zur Verfügung, zusätzlich wurde polyklonales Anti-HBs-IgG aus einem Schafserum verwendet. Ausgenommen von H166 und 116-34 (von Abbott bezogen) wurden alle Antikörper im Institut für Medizinische Virologie hergestellt und charakterisiert.

### Polyklonales Anti-HBs

Polyklonales Anti-HBs-IgG aus Schafserum. Herstellung siehe Abschnitt 3.3. Für die Immunfärbung 1:500 in TNE/0,1 % FKS verdünnt.

### Anti-präS1-Antikörper:

Monoklonaler Antikörper MA 18/7 [HEERMANN K. H. ET AL., 1984], erkennt präS1 bei Genotyp D (aa 19-23) [GERMASCHEWSKI V. UND MURRAY K., 1995]. Für die Immunfärbung 1:1000 in TNE/0,1 % FKS verdünnt.

**Anti-präS2-Antikörper:**

Monoklonaler Antikörper 2-11B1, erkennt präS2 (aa 3-12) [SOBOTTA D. ET AL., 2000]. Für die Immunfärbung 1:1000 in TNE/0,1% FKS verdünnt.

Monoklonaler Antikörper 116-34 [MIMMS L. T. ET AL., 1990]. Für die Immunfärbung 1:4000 in TNE/0,1 % FKS verdünnt.

Monoklonaler Antikörper Q 19/10, erkennt N-glykosiliertes präS2 [HEERMANN K. H. ET AL., 1988]. Für die Immunfärbung wurde ein unverdünnter Hybridomzellkultur-Überstand verwendet.

**Anti-SHBs-Antikörper:**

Monoklonaler Antikörper 1-9C1, erkennt ein sequenzielles Epitop von R122 [SOBOTTA D. ET AL., 2000]. Für die Immunfärbung wurde ein unverdünnter Hybridomzellkultur-Überstand verwendet.

Monoklonaler Antikörper H166, erkennt SHBs (aa121-124), bevorzugt mit K122 [PETERSON D. L. ET AL., 1984]. Für die Immunfärbung 1:4000 in TNE/0,1 % FKS verdünnt.

**2.7.2 Sekundäre Antikörper**

Goat anti-Mouse IgG-HRP

Für die Immunfärbung 1:1000 in TNE/0,1 % FKS verdünnt.

Donkey anti-Sheep IgG-HRP

Für die Immunfärbung 1:00 in TNE/0,1 % FKS verdünnt.

Fa. Santa Cruz, Heidelberg

Katalognummer: sc-2005

Fa. Dianova, Hamburg

Katalognummer:

713-035-147

**2.8 Assay-Reagenzien**

Architect® HBsAg (II) Calibrators

Architect® HBsAg (II) Controls

Architect® HBsAg (II) Reagent Kit

Architect® HBsAg (II plus anti-präS2) Calibrators

Architect® HBsAg (II plus anti-präS2) Controls

Architect® HBsAg (II plus anti-präS2) Reagent Kit

AxSYM® HBsAg (V2) Calibrators

Fa. Abbott, Wiesbaden

AxSYM® HBsAg (V2) Controls	Fa. Abbott, Wiesbaden
AxSYM® HBsAg (V2) Reagent Kit	Fa. Abbott, Wiesbaden
AxSYM® HBsAg (V2 plus anti-präS2) Calibrators	Fa. Abbott, Wiesbaden
AxSYM® HBsAg (V2 plus anti-präS2) Controls	Fa. Abbott, Wiesbaden
AxSYM® HBsAg (V2 plus anti-präS2) Reagent Kit	Fa. Abbott, Wiesbaden

## 2.9 Geräte und Hilfsmittel

Abbott Architect i2000SR	Fa. Abbott, Wiesbaden
Abbott AxSYM	Fa. Abbott, Wiesbaden
Automatischer Filmentwickler Curix 60 AGFA	Fa. Mortsel, Belgien
Autoradiographie Kassetten (18 x 24cm)	Fa. Amersham, Buckinghamshire
Blotting-Pads	Fa. Whatman, Maidstone
EPS 601 (Spannungsquelle)	Fa. GE Healthcare, Uppsala
Kodak® BioMax™ MR Film	Fa. Sigma-Aldrich, Seelze
Heizblock	Werkstatt des Institutes
PVDF Membran (Immobilon Transfer Membrane)	Fa. Millipore, Bedford
Matrix cells (AxSYM®)	Fa. Abbott, Wiesbaden
NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel, 1.0 mm, 10 Well	Fa. Invitrogen, Karlsruhe Katalognummer: NP0301BOX
NuPAGE® Xcell Mini-Cell-Gerät	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Xcell II Blot Module	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Reaction vessels (Architect®, AxSYM®)	Fa. Abbott, Wiesbaden
Sample cups (Architect®, AxSYM®)	Fa. Abbott, Wiesbaden
Tischzentrifuge Eppendorf 5417C	Fa. Eppendorf, Hamburg

## 3 Methoden

### 3.1 Architect®

Das Messprinzip des Architect® HBsAg-Testverfahrens beruht auf der Technik des automatisierten Chemilumineszenz-Mikropartikel-Immunassays (CMIA) [KHALIL O. S. ET AL., 1991]. Dabei bindet im ersten Schritt das HBsAg an monoklonale Antikörper (Anti-HBs-IgM/-IgG), die mit ihrem Fc-Teil auf der Oberfläche von Mikropartikeln kovalent gebunden sind. Nach erfolgtem Waschgang wird ein Acridinium-markiertes, polyklonales Anti-HBs-Konjugat hinzugegeben (Anti-HBs-IgG von Ziegen). Im Anschluss daran erfolgt abermals ein Waschgang, bevor zuerst eine Lösung mit Wasserstoffperoxid und direkt daran anschließend eine Lösung mit Natriumhydroxid hinzugefügt werden. Das bei der Chemilumineszenzreaktion entstehende Lichtsignal wird von jeder einzelnen Probe in *relative light units* (RLUs) gemessen und verhält sich proportional zu der in der Probe befindlichen HBsAg-Menge. Jedes Messergebnis wird mit einem Grenzwert verglichen, welcher durch die Architect® HBsAg-Index-Kalibrierung bestimmt wurde.

Alle Proben (Serum oder Plasma) wurden vor der Testung zentrifugiert, um Erythrozyten oder andere feste Blutbestandteile und Niederschläge zu entfernen. Eingefrorene und erneut aufgetaute Proben (0,5 bis 1 ml) sowie Proben für Wiederholungs- oder Bestätigungstests wurden mindestens 10 Minuten bei 20.000 g (Rt) in einer Tischzentrifuge mit Festwinkelrotor zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde ein Mindestprobenvolumen von 125 µl in einen Probenbecher für das automatisierte System pipettiert, bei zusätzlichen HBsAg-Tests pro Test weitere 75 µl.

Die Ergebnisse der einzelnen Tests wurden in Form des Quotienten aus Probewert (Signal, S) dividiert durch den Grenzwert (Cut-off, CO) ausgegeben und ausgewertet. Der dabei verwendete Grenzwert berechnet sich aus dem mit zwei multiplizierten Mittelwert des in Fünffachbestimmung getesteten Index-Kalibrators. Proben, welche einen S/CO-Wert von unter 1,00 aufweisen, sind negativ, wohingegen Proben mit S/CO-Werten größer oder gleich 1,00 als reaktiv gelten. Messergebnisse mit S/CO-Werten im Bereich  $0,80 \leq x < 1,00$  wurden als grenzwertig angesehen.

Zum Nachweis von HBsAg wurde der Architect® HBsAg-(II)-Test und der Architect® HBsAg-(II plus präS2)-Test angewandt. Die jeweils verwendeten monoklonalen Antikörpergemische für die Bindung des HBsAg an die Mikropartikel unterschieden sich dabei. Waren Proben in den einzelnen Testverfahren wiederholt positiv, wurde ein Architect® HBsAg-Neutralisationstest durchgeführt. Bei diesem Test wird die entsprechende Probe, bevor sie in Kontakt mit den Mikropartikeln und dem Konjugat kommt, mit polyklonalem

Anti-HBs-IgG inkubiert. Sollte sich HBsAg in der Probe befinden, wird dieses durch die Antikörper neutralisiert und die Bindung an die mit Anti-HBs beschichteten Mikropartikel und dem mit Acridiniumorange markierten Anti-HBs-Konjugates verhindert. Dies führt zu einer Verminderung des Lichtsignals. Eine Probe gilt dann als spezifisch positiv, wenn das Signal um 50 % oder mehr durch die Neutralisation vermindert ist.

### 3.2 AxSYM®

Das Grundprinzip des AxSYM® HBsAg-Testverfahrens beruht auf der Technik des automatisierten Mikropartikel-Enzymimmunoassays (MEIA). Bei diesem Verfahren wird das zu detektierende HBsAg zusammen mit Mikropartikeln, welche mit einem monoklonalen Anti-HBs beschichteten sind, sowie mit Biotin-markiertem polyklonalem Anti-HBs inkubiert. Nach dem Transfer auf absorbierende Matrixzellen (*matrix cells*) werden mit alkalischer Phosphatase markierte Anti-Biotin-Antikörper hinzugegeben. Im Anschluss daran erfolgt ein Waschgang, bevor das Substrat 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP) hinzugefügt wird. Das bei der Umsetzung des Substrates durch die alkalische Phosphatase entstehende Fluoreszenzsignal der jeweiligen Probe wird gemessen und mit einem zuvor durch eine AxSYM® HBsAg-Index-Kalibrierung festgelegten Grenzwert verglichen.

Die Präanalytik der Proben erfolgte in derselben Weise wie bei den Messungen mit dem Architect®. Ein Unterschied bestand lediglich in der Probenmenge, welche in den Probenbecher pipettiert wurde. Als Mindestvolumen waren bei diesen Messungen 190 µl nötig, für jeden weiteren Test zusätzliche 140 µl.

Der HBsAg-Nachweis erfolgte mit dem AxSYM® HBsAg-(V2)-Test und dem AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test. Auch hier unterschieden sich die Tests durch ihre monoklonalen Antikörpermischungen für die Bindung des HBsAg an die Mikropartikel.

Analog zu den Messungen mit dem Architect® erfolgte die Angabe des Messergebnisses in S/CO und die Durchführung eines Neutralisationstests bei positiven Proben, deren Spezifität bestimmt werden musste.

### 3.3 Laurell-Immunelektrophorese modifiziert nach Gerlich

Bei der erstmals von Gerlich und Thomssen beschriebenen quantitativen Immunelektrophorese für HBsAg aus Plasma oder Serum handelt es sich um eine modifizierte Gelelektrophorese nach Laurell [GERLICH W.H. UND THOMSEN R., 1975]. Diese Methode wurde von Gerlich et al. weiterentwickelt und benutzt zum Nachweis polyklonales Anti-HBs-IgG [GERLICH W.H. ET AL., 2004].

Die von Carl-Bertil Laurell entwickelte Methode [LAURELL C.-B., 1966] beinhaltet eine Kombination aus Elektrophorese und immunologischer Ausfällung in Agarosegelen. Um eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers im Gel zu ermöglichen, wird dieser bereits in die flüssige Agarose gegeben und diese auf Glasträger gegossen, wo sie zu einem Gel erstarrt. Die einzelnen Antigenproben werden in dafür vorgesehene Aussparungen pipettiert. Die Protein-Antigene wandern im elektrischen Feld durch das Gel. Abhängig von der Konzentration des Antigens in der Probe entstehen durch die Präzipitation und den Verbrauch der eingegossenen Antikörper annähernd Raketen-ähnliche Strukturen unterschiedlicher Länge, wobei die Länge zur Konzentration proportional ist.

Das von Gerlich et al. verwendete polyklonale Anti-HBs-IgG stammt aus einem hochtitrigen Schafserum ( $>10^5$  IU/l). Um möglichst viele HBV-Genotypen mit diesen Antikörpern gleich gut zu erfassen, wurde das Schaf nacheinander mit den Genotypen A, C und D immunisiert [GERLICH W. H. ET. AL., 2004]. Dabei wurden jeweils 100 µg aufgereinigtes HBsAg von HBeAg-positiven Trägern zu unterschiedlichen Zeitpunkten dem Schaf injiziert, abschließend zur Boosterung ein Gemisch aus den verwendeten drei Genotypen.

## **3.4 SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting**

### **3.4.1 SDS-Gelelektrophorese**

Von den drei aufgetauten Antigen-Proben wurden jeweils 2 µl in ein Eppendorf-Cup vorgelegt und mit 10 µl DTT und 38 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) auf insgesamt 50 µl aufgefüllt. Die einzelnen Proben wurden in einem Heizblock für 10 Minuten auf 70° C erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine vor der Elektrophorese zu erreichen.

Für die Elektrophorese wurden drei NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gele (10 cm x 10 cm; 1 mm) verwendet. Diese wurden in das NuPAGE® Xcell Mini-Cell-Gerät eingebaut und sowohl die äußeren Kammern als auch die innere Kammer mit dem MOPS-Laufpuffer gefüllt. In die innere Kammer wurden zusätzlich 500 µl NuPAGE® Antioxidans gegeben, um reduzierende Bedingungen zu erreichen. Im Folgenden wurden pro Gel in die erste Geltasche der Marker (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard) pipettiert und in die verbleibenden neun eine Antigen-Probe. Anschließend wurden die drei Gele mit einer Spannung von 200 V und einer Laufzeit von 50 Minuten gestartet. Die durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden danach im Western Blotting auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (siehe 3.4.2 Western Blotting) transferiert.

### 3.4.2 Western Blotting

Das Western Blotting ist eine Methode, um Proteine mit Hilfe von Antikörpern nachweisen zu können. Nach der erfolgten Auftrennung der Proteine (siehe 3.4.1 SDS-Gelelektrophorese) werden diese durch Blotten auf einen geeigneten Träger, hier eine poröse PVDF-Membran, übertragen.

Für das Western Blotting wurden das NuPAGE® Xcell Mini-Cell-Gerät, das NuPAGE® Xcell II Blot Modul, Blotting-Pads und PVDF-Membranen verwendet.

Nach der erfolgten SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel blasenfrei mit einer PVDF-Membran in das Blot-Modul eingebaut, auf jeder Seite umrahmt von zwei Filterpapieren und zwei Blotting-Pads. Die innere Kammer wurde mit Transferpuffer gefüllt, die äußeren beiden mit destilliertem Wasser. Für den Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde eine Spannung von 30 Volt für eine Dauer von 90 Minuten angelegt. Im Anschluss an den Transfer wurden die PVDF-Membranen über Nacht bei 4° C in eine Blocklösung eingelegt. Dadurch sollte eine Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen erreicht werden.

Vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Membranen für 2x 5 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in 0,5 cm breite Streifen geschnitten. Jeder Blotstreifen wurde mit einem der sieben primären Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die unter 2.7.1 angegebenen Konzentrationen verwendet wurden. Danach erfolgte die Entfernung überschüssiger Antikörper durch fünf Waschgänge. Dabei wurde jeweils für 5 Minuten zu Beginn und am Ende mit PBS, bei den drei mittleren mit 1 % Tween 20/0,5 % BSA gewaschen. Im nächsten Schritt wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit den sekundären Antikörpern inkubiert. Diese können sich nach Anlagerung des primären Antikörpers an die entsprechende Proteinstruktur an diesen binden. Verwendet wurden die Antikörper MA 18/07, Q 19/10, 2-11B1, 1-9C1, H166, 116-34 und ein anti-Mouse IgG-HRP Antikörper, außerdem ein polyklonaler Anti-HBs Antikörper (anti-Sheep-HRP). Im Anschluss an die Inkubation wurden erneut fünf Waschgänge mit identischem Ablauf, wie bereits zuvor beschrieben, vorgenommen.

Zum Nachweis der HRP-markierten sekundären Antikörper wurde die ECL (*Enhanced Chemiluminescence*)-Methode benutzt. Die einzelnen Blotstreifen wurden hierzu zusammen mit dem ECL Western Blotting Substrat zwischen zwei durchsichtigen Folien blasenfrei für 10 Minuten inkubiert, danach die Lösung entfernt und die Blotstreifen mit Filmfolie in eine Autoradiographie-Kassette gelegt. In den meisten Fällen genügte eine Expositionsdauer von 5 bis 60 Sekunden. Die Entwicklung der Filmfolien erfolgte im Anschluss in einem automatischen Entwickler.

### 3.5 Auswertung

Die gesamte Auswertung, sowie die statistische und graphische Darstellung der gewonnenen Messdaten erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft® Excel 2002 , SPSS® 14.0 und Sigmaplot® 9.0.

Zur besseren Beschreibung und Interpretation wurden bei den Spezifitätsmessungen die jeweiligen Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung ( $\sigma$ ), sowie das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) zur Beurteilung eines linearen Zusammenhanges angegeben. Des Weiteren erfolgte bei diesen Daten die Berechnung des Quotient aus (1 - Mittelwert) dividiert durch die Standardabweichung. Dies ergibt die Anzahl an Standardabweichungen bis zum Cut-off ( $S/CO = 1,0$ ) und wird im Weiteren als SDtoCO (*standard deviation to Cut-off*) bezeichnet. Dieser Parameter stellt neben der Anzahl von falsch positiven Testergebnissen einen weiteren wichtigen Hinweis auf die Spezifität eines klinischen Tests dar. Der SDtoCO gibt den Sicherheitsabstand der Verteilung der negativen Werte zum jeweiligen Cut-off an und ist in der Beurteilung diagnostisch-serologischer Tests eine klassische Kenngröße.

Zu den jeweiligen Spezifitäts- und Sensitivitätswerten wurde das dazugehörige 95 %-Konfidenzintervall (KI) angegeben.

Zur Untersuchung auf statistische Signifikanz der Messdaten wurden der t-Test für gepaarte Stichproben (Mittelwertunterschiede bei den Spezifitätsmessungen) und der McNemar-Test (Spezifitäts- und Sensitivitätsunterschiede) herangezogen. Das Signifikanzniveau wurde bei allen Tests auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

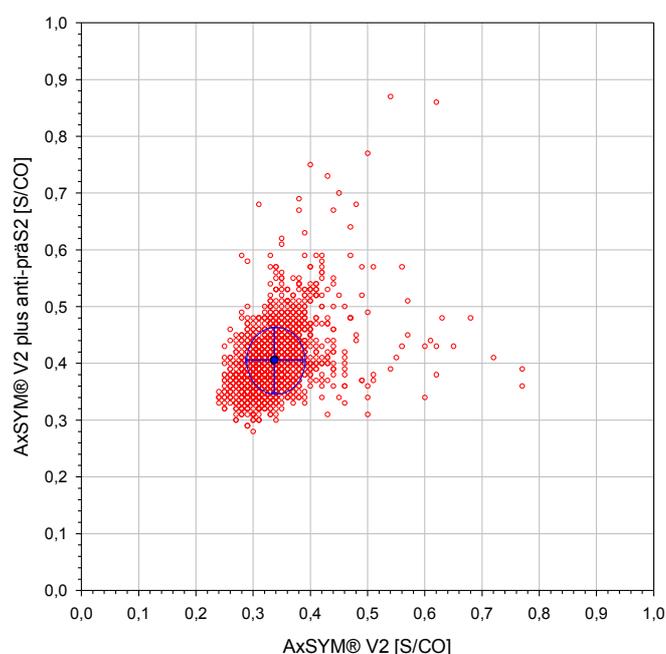
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Spezifitätsmessungen

Zur Ermittlung der Spezifität der Tests wurden verschiedene Patientenkollektive gewählt. Als wichtigstes Kollektiv gilt hier im Allgemeinen die Untersuchung von gesunden Blutspendern, die nicht nach Vorergebnissen anderer Testverfahren vorsortiert wurden (randomisierte Blutspender). Andere wichtige Kollektive, bei denen erfahrungsgemäß ein Spezifitätsproblem auftreten könnte, sind hospitalisierte Patienten, Dialysepatienten und schwangere Frauen. Allerdings wurden diese nur mittels AxSYM® untersucht.

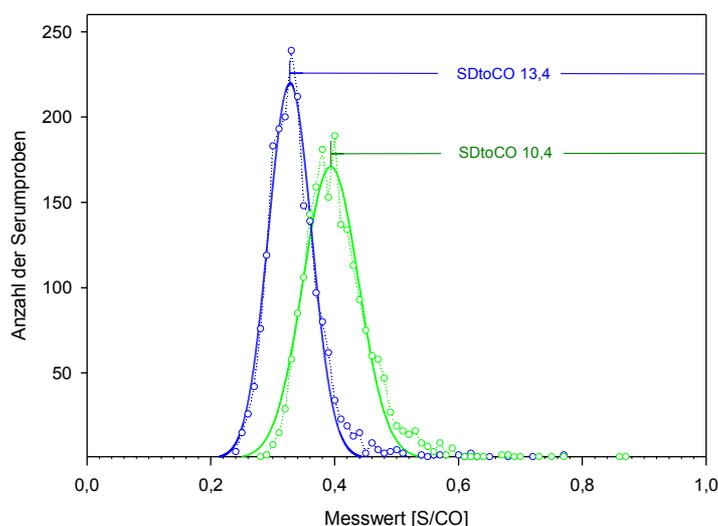
#### 4.1.1 Blutspender

Im AxSYM® wurden frische Plasmaproben von 2000 Blutspendern mit dem AxSYM® HBsAg-(V2)- (im folgenden Ax-V2) und mit dem AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test (im folgenden Ax-präS2) getestet. Initial reaktiv ( $S/CO \geq 1,0$ ) zeigten sich bei Ax-V2 vier, bei Ax-präS2 sechs Proben. Diese wurden nach hochtouriger Zentrifugation (10 Minuten bei 20.000 g) erneut getestet und es verblieb von den initial positiven Proben jeweils nur eine reaktive. Bei der Nachtestung dieser beiden Proben auf eine mögliche tatsächliche Infektion kam es zu keiner Hemmung des Signals im Neutralisationstest sowie zu negativen Anti-HBc und HBV-NAT Ergebnissen. Grenzwertig reaktiv ( $0,80 \leq x < 1,00$ ) zeigten sich auch nach wiederholter Messung im Ax-V2 eine Probe und im Ax-präS2 zwei.



**Abbildung 7:** Vergleich des AxSYM® HBsAg-(V2)-Tests mit dem AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test bei negativen Blutspendern (initial  $S/CO < 1,0$ ),  $n=1990$ . Mittelwert aller Messungen mit Standardabweichung (blau).

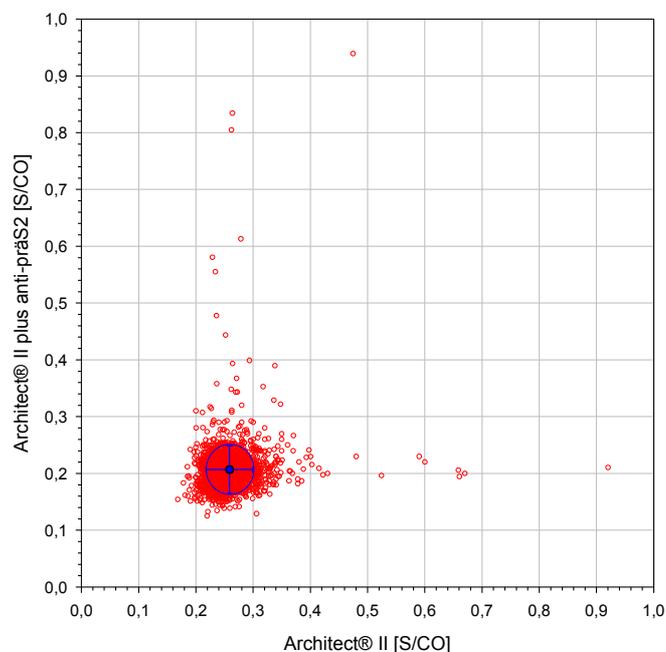
Die Signale von den 1990 initial negativen Proben ( $S/CO < 1,0$ ) sind in Abbildung 7 dargestellt. Ein linearer Zusammenhang der  $S/CO$ -Werte liegt nicht vor ( $r^2 = 0,165$ ). Die Auswertung dieser Messergebnisse ergab einen signifikant größeren Mittelwert des Ax-präs2 im Vergleich zu Ax-V2 ( $n = 1990$ ;  $T = -52,413$ ;  $p < 0,001$ ). Es ergibt sich für den Ax-V2 ein Mittelwert von  $0,34 S/CO$  ( $\sigma = 0,05$ ) und für den Ax-präs2 von  $0,41 S/CO$  ( $\sigma = 0,06$ ). Daraus resultiert für den Ax-V2 ein  $SDtoCO$ -Wert von  $13,4$  und für den Ax-präs2 von  $10,4$  (Abb. 8). Insgesamt ergab sich für beide Tests eine Spezifität von  $99,95\%$  (KI  $99,58 - 100,00\%$ ) bezogen auf alle gemessenen Blutspenderseren (Tab. 2).



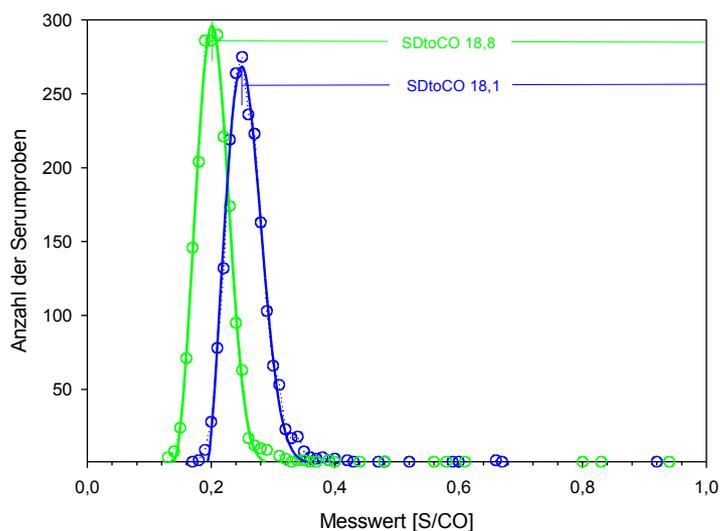
**Abbildung 8:** Mittelwert und Standardabweichung des AxSYM® HBsAg-(V2)-Tests (blau) und des AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präs2)-Tests (grün) bei negativen Blutspendern,  $n=1990$ . Mit angegeben ist jeweils der  $SDtoCO$ .

Im Architect® wurden 1949 Seren mittels Architect® HBsAg-(II)- (im folgenden Ar-II) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präs2)-Test (im folgenden Ar-präs2) untersucht. Hier zeigten sich initial reaktiv ( $S/CO \geq 1,0$ ) drei Proben, allesamt jedoch nur im Ar-präs2. Nach erfolgter hoctouriger Zentrifugation blieben zwei reaktive Proben übrig. Da sich für beide sowohl in der HBV-NAT als auch in der Anti-HBc-Testung ein negatives Ergebnis zeigte, und sich keine Hemmung der Singale im Neutralisationstest ergab, ist von falsch positiven Testergebnissen auszugehen. Die initial negativen 1946 Testergebnisse sind in Abbildung 9 aufgeführt. Das Vorliegen eines sehr kleinen  $r^2$  ( $0,014$ ) zeigt keinen linearen Zusammenhang an. Ein grenzwertig reaktives Ergebnis ergab sich im Ar-II für zwei Proben, im Ar-präs2 für drei. Aus den durchgeführten Untersuchungen der Blutspenderseren ergaben sich unterschiedliche Spezifitäten, deren Unterschied keine Signifikanz aufwies. Der Ar-II hat für dieses Kollektiv eine Testspezifität von  $> 99,99\%$  (KI  $99,95 - 100,00\%$ ), der Ar-präs2 von  $99,90\%$  (KI  $99,76 - 100,00\%$ ) (Tab. 2).

Bei signifikant unterschiedlichen Mittelwerten ( $n = 1946$ ;  $T = 41,701$ ;  $p < 0,001$ ) zeigt sich im Vergleich zu den beiden AxSYM® Tests ein geringerer Unterschied bei den SDtoCO-Ergebnissen der beiden Architect® Tests (Abb. 10). Hier ergibt sich ein deutlich besserer SDtoCO für den Ar-II von 18,1 (Mittelwert = 0,26 S/CO;  $\sigma = 0,04$ ) und für den Ar-präs2 von 18,8 (Mittelwert = 0,21 S/CO;  $\sigma = 0,04$ ).



**Abbildung 9:** Vergleich des Architect® HBsAg-(II)-Tests mit dem Architect® HBsAg-(II plus anti-präs2)-Test bei negativen Blutspendern (initial S/CO < 1,0),  $n=1946$ . Mittelwert aller Messungen mit Standardabweichung (blau).

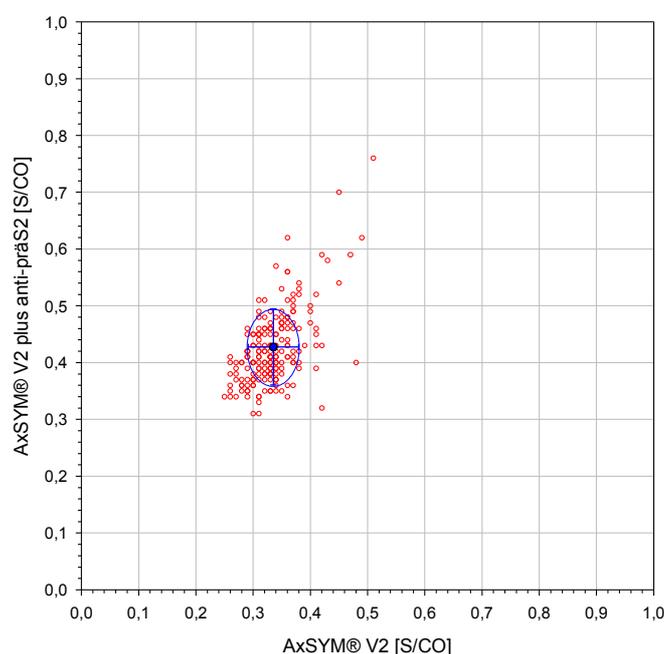


**Abbildung 10:** Mittelwert und Standardabweichung des Architect® HBsAg-(II)- (blau) und des Architect® HBsAg-(II plus anti-präs2)-Tests (grün) bei negativen Blutspendern,  $n=1946$ . Mit angegeben ist jeweils der SDtoCO.

### 4.1.2 Hospitalisierte Patienten

Unter den getesteten 200 frischen EDTA-Plasmaproben hospitalisierter Patienten ergaben sich bei beiden Tests jeweils vier auch mittels HBV-NAT bestätigt positive Ergebnisse; dabei handelte es sich in beiden Tests jeweils um die gleichen Proben. Die einzelnen S/CO-Werte lagen zwischen 9,62 und 194,15. Des Weiteren ergab sich im Ax-V2 auch nach wiederholter Messung eine reaktive Probe, die allerdings im Ax-präs2, der HBV-NAT und im Anti-HBc-Test negativ war. Im HBsAg-Neutralisationstest war das Signal nicht hemmbar, was auf eine falsch positive Reaktivität schließen ließ. In beiden HBsAg-Tests ergaben sich keine grenzwertigen Ergebnisse. Die Ergebnisse der 195 initial negativ gemessenen Plasmaproben sind in Abbildung 11 dargestellt. Es besteht kein linearer Zusammenhang ( $r^2 = 0,356$ ). Die Testspezifität innerhalb dieses Kollektivs liegt für den Ax-V2 bei 99,50 % (KI 98,52 - 100,00 %), für den Ax-präs2 bei > 99,99 % (KI 99,85 - 100,00 %) (Tab. 2).

Der Mittelwert für den Ax-V2 lag für die 195 Plasmaproben bei 0,34 S/CO ( $\sigma = 0,04$ ), für den Ax-präs2 bei 0,43 S/CO ( $\sigma = 0,07$ ). Daraus ergab sich ein signifikant größerer Mittelwert des Ax-präs2 ( $n = 195$ ;  $T = -23,818$ ;  $p < 0,001$ ). Die SDtoCO-Werte lagen für den Ax-V2 bei 15,1 und für den Ax-präs2 bei 8,5 (Tab. 2).



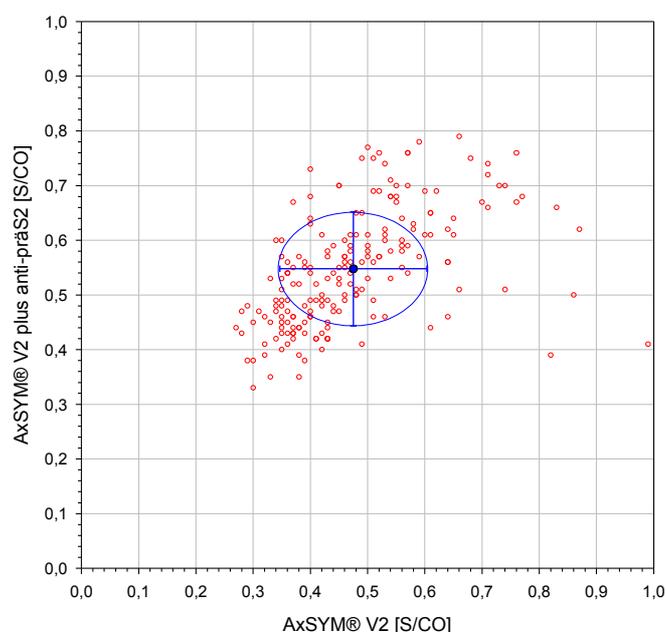
**Abbildung 11:** Vergleich des AxSYM® HBsAg-(V2)-Tests mit dem AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präs2)-Test bei hospitalisierten Patienten (initial S/CO <1,0), n=195. Mittelwert aller Messungen mit Standardabweichung (blau).

### 4.1.3 Dialysepatienten

Insgesamt wurden 200 EDTA-Plasmaproben von dialysepflichtigen Patienten getestet. Dabei ergaben sich keine echt positiven Ergebnisse. Jedoch lagen auch nach erneuter Testung vier

Patientenproben mit einem falsch positiven Messergebnis vor (HBV-NAT negativ, Anti-HBc negativ, Neutralisationstest negativ). Nur einer dieser vier Patienten war in beiden Tests positiv, die anderen drei einzig im Ax-V2. Grenzwertig reaktive Proben zeigten sich auch nur im Ax-V2. Die Gesamtheit belief sich auf fünf Proben. Innerhalb dieses Kollektivs ergab sich ein nicht unerheblicher, aber nicht signifikanter Unterschied in der Testspezifität (Ax-V2 98,00 % (KI 96,06 - 99,94 %), Ax-präs2 99,50 % (KI 98,52 - 100,00 %)) (Tab. 2).

Für die Messungen der 196 Proben (Abb. 12) ergaben sich ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte ( $n = 196$ ;  $T = -8,753$ ;  $p < 0,001$ ) sowie kein linearer Zusammenhang ( $r^2 = 0,271$ ). Die jeweiligen Mittelwerte lagen für den Ax-V2 bei 0,48 S/CO ( $\sigma = 0,13$ ) und für den Ax-präs2 bei 0,55 S/CO ( $\sigma = 0,10$ ). Im Gegensatz zu den Blutspendern und dem hospitalisierten Patientenkollektiv ergaben sich für die Dialysepatienten relativ niedrige SDtoCO-Werte für beide Tests, für den Ax-V2 von 4,1 und für den Ax-präs2 4,3 (Tab. 2).

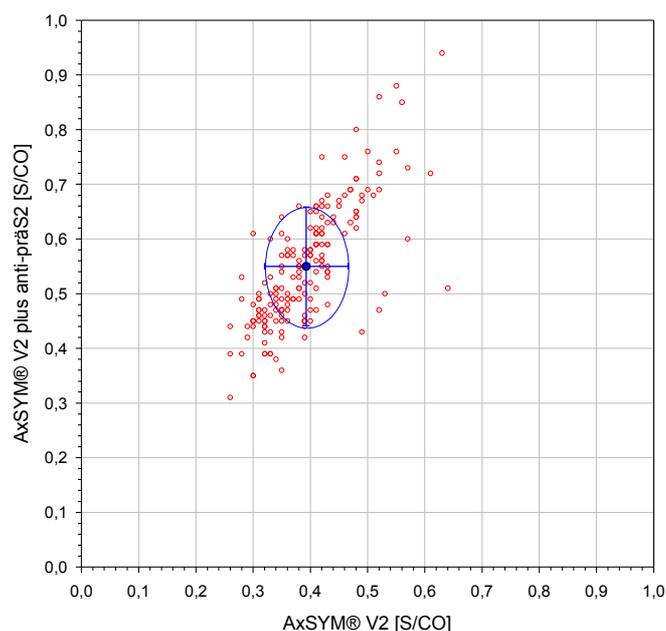


**Abbildung 12:** Vergleich des AxSYM® HBsAg-(V2)-Tests mit dem AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präs2)-Test bei dialysepflichtigen Patienten (initial S/CO <1,0),  $n=196$ . Mittelwert aller Messungen mit Standardabweichung (blau).

#### 4.1.4 Schwangere

Es wurden 187 Plasmaproben von schwangeren Patientinnen getestet. In beiden Tests ergab sich in einem Fall ein bestätigt positives Ergebnis für die gleiche Probe. Des Weiteren zeigten sich keine initial reaktiven Messergebnisse, jedoch für den Ax-präs2 fünf Proben mit grenzwertiger Reaktivität. Für beide Tests liegt die Spezifität in diesem Kollektiv bei  $> 99,99\%$  (99,85 - 100,00 %) (Tab. 2). Bei einem  $r^2$  von 0,564 besteht ein geringer linearer Zusammenhang der einzelnen S/CO-Werte (Abb. 13).

Bedingt durch die fünf grenzwertigen Ergebnisse, lag der Mittelwert für den Ax-präS2 bei 0,55 S/CO ( $\sigma = 0,11$ ), für den Ax-V2 hingegen bei 0,39 S/CO ( $\sigma = 0,07$ ). Wie bei allen anderen Patientenkollektiven zeigt sich auch hier ein signifikant größerer Mittelwert des Ax-präS2 ( $n = 186$ ;  $T = -29,623$ ;  $p < 0,001$ ). Ähnlich den SDtoCO-Werten der Dialysepatienten liegen diese auch für die untersuchten Plasmen von Schwangeren im Vergleich zu den anderen Kollektiven niedrig. Der SDtoCO-Wert des Ax-präS2 liegt mit 4,1 noch etwas niedriger als bei den Dialysepatienten, der des Ax-V2 mit 8,3 im Vergleich jedoch ungefähr doppelt so hoch (Tab. 2).



**Abbildung 13:** Vergleich des AxSYM® HBsAg-(V2)-Tests mit dem AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test bei schwangeren Patientinnen (initial S/CO <1,0),  $n=186$ . Mittelwert aller Messungen mit Standardabweichung (blau).

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der Spezifitätsmessungen des AxSYM® HBsAg-(V2)- und des AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Tests sowie des Architect® HBsAg-(II)- und des Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Tests.

	N	initial positiv	falsch positiv	grenzwertig	Spezifität [%] (95 %-Konfidenzintervall)	SDtoCO
<b>Blutspender</b>						
Ax-V2	2000	4	1	1	99,95 (99,85-100,00)	13,4
Ax-präS2	2000	6	1	2	99,95 (99,85-100,00)	10,4
Ar-II	1949	0	0	2	> 99,99 (99,95-100,00)	18,1
Ar-präS2	1949	3	2	3	99,90 (99,76-100,00)	18,8

**Fortsetzung Tabelle 2:** Zusammenfassung der Spezifitätsmessungen des AxSYM® HBsAg-(V2)- und des AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Tests sowie des Architect® HBsAg-(II)- und des Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Tests.

	N	initial positiv	falsch positiv	grenzwertig	Spezifität [%] (95 %-Konfidenzintervall)	SDtoCO
<b>hospitalisierte Patienten</b>						
Ax-V2	200	5	1	0	99,50 (98,52-100,00)	15,1
Ax-präS2	200	4	0	0	> 99,99 (99,85-100,00)	8,5
<b>Dialysepatienten</b>						
Ax-V2	200	4	4	5	98,00 (96,06-99,94)	4,1
Ax-präS2	200	1	1	0	99,50 (98,52-100,00)	4,3
<b>Schwangere</b>						
Ax-V2	187	1	0	0	> 99,99 (99,85-100,00)	8,3
Ax-präS2	187	1	0	5	> 99,99 (99,85-100,00)	4,1

## 4.2 Serokonverter-Panels

Mit Hilfe von mehreren kommerziell erhältlichen Serokonverter-Panels sollte die diagnostische Sensitivität der Tests bestimmt und dargestellt werden (Tab. 3 bis 11). Nach Angaben der Hersteller sind die Eigenschaften der Plasmaproben bezüglich HBV-spezifischer Antikörper unterschiedlich. So wurden beispielsweise die Panels PHM910, PHM923, PHM931, 11003, 11011 und 11012 negativ auf Anti-HBe getestet, die übrigen zeigten im Verlauf diesbezüglich eine Serokonversion. Die im Rahmen der Messungen erhobenen Daten sind dabei dem jeweiligen Blutentnahmetag zugeordnet. Der Tag „0“ entspricht dabei nicht dem Zeitpunkt der Exposition beziehungsweise Infektion, sondern dem Zeitpunkt der ersten verfügbaren Blutentnahme. Die Auswertung erfolgte anhand eines vom Paul Ehrlich-Institut etablierten Berechnungsmodells [MÜHLBACHER A. ET AL., 2008]. Dieses beinhaltet, dass die Serokonversion theoretisch am ersten Tag nach der letzten negativ gemessenen Probe erfolgen kann.

Insgesamt wurden neun Serokonverter-Panels mit den beiden AxSYM®-Tests untersucht. Beide Tests erkannten in allen Panels im Verlauf ein Auftreten des HBsAg. Bei den beiden Panels PHM923 (Tab. 4) und PHM933 (Tab. 6) erkannten beide Tests das HBsAg erstmalig in der gleichen Probe. In den übrigen sieben geschah dies zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Der Ax-präS2 detektierte das HBsAg in den Panels PHM910 (Tab. 3), PHM931 (Tab. 5),

PHM934 (Tab. 7), 11003 (Tab. 8), 11011 (Tab. 10) und 11012 (Tab. 11) mindestens eine Serumprobe früher als der Ax-V2. Lediglich bei Panel 11006 (Tab. 9) war dies umgekehrt.

Analog zu den AxSYM® Messungen erkannten auch die beide Architect®-Tests in allen untersuchten Serokonverter-Panels das Auftreten von HBsAg. In vier der fünf Untersuchungsreihen (PHM923 (Tab. 4), PHM933 (Tab. 6), 11003 (Tab. 8) und 11012 (Tab. 11)) ergab sich für die gleiche Patientenprobe ein erstes positives Ergebnis. Einzig bei Panel 11011 (Tab. 10) detektierte der Ar-präs2 das HBsAg früher als der Ar-II.

Vergleiche der fünf Serokonverter-Panels, welche mit allen vier Testverfahren untersucht wurden, zeigen, dass bei zwei Panels (11011 und 11012) einer oder beide Architect® Tests die Serokonversion früher als der Ax-V2 oder Ax-präs2 nachweisen können. Einzig bei Panel PHM923 ist dies umgekehrt. Bei Panel 11003 weisen die Tests Ax-präs2, Ar-II und Ar-präs2 in der selben Probe das HBsAg nach, Ax-V2 hingegen erst in der darauf folgenden.

Bei beiden Testverfahren mit der zusätzlichen Anti-präs2-Komponente (Ax-präs2 und Ar-präs2) sind die gemessenen S/CO-Werte nach Überschreiten des Cut-offs um etwa den Faktor zwei bis drei höher als bei den anderen beiden Testverfahren (Ax-V2 und Ar-II).

**Tabelle 3:** Ergebnisse des Serokonverter-Panels PHM910 gemessen mit dem AxSYM® HBsAg-(V2)- und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präs2)-Test. Erster positiver HBsAg-Nachweis der Messreihe ist unterlegt.

Tag	Ax-V2 [S/CO]	Ax-präs2 [S/CO]
0	0,65	0,74
18	0,98	1,09
35	1,92	3,95
42	6,01	16,55
46	10,85	32,05
49	15,66	46,74

**Tabelle 4:** Ergebnisse des Serokonverter-Panels PHM923 gemessen mit dem AxSYM® HBsAg-(V2)-, AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präs2)-, Architect® HBsAg-(II)- und dem Architect® HBsAg-(II plus anti-präs2)-Test. Erster positiver HBsAg-Nachweis der Messreihe ist unterlegt.

Tag	Ax-V2 [S/CO]	Ax-präs2 [S/CO]	Ar-II [S/CO]	Ar-präs2 [S/CO]
0	0,77	0,82	0,36	0,34
7	1,18	1,07	0,46	0,56
15	1,03	2,48	1,85	3,56
21	1,69	3,61	3,08	5,91

**Tabelle 5:** Ergebnisse des Serokonverter-Panels PHM931 gemessen mit dem AxSYM® HBsAg-(V2)- und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test. Erster positiver HBsAg-Nachweis der Messreihe ist unterlegt.

Tag	Ax-V2 [S/CO]	Ax-präS2 [S/CO]
0	0,53	0,64
5	0,54	0,74
12	0,65	1,02
14	0,65	1,14
19	0,96	2,21
21	1,58	3,58
26	3,91	11,45
28	8,49	22,45

**Tabelle 6:** Ergebnisse des Serokonverter-Panels PHM933 gemessen mit dem AxSYM® HBsAg-(V2)-, AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-, Architect® HBsAg-(II)- und dem Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test. Erster positiver HBsAg-Nachweis der Messreihe ist unterlegt.

Tag	Ax-V2 [S/CO]	Ax-präS2 [S/CO]	Ar-II [S/CO]	Ar-präS2 [S/CO]
0	-	-	-	-
2	0,67	0,95	0,65	0,93
7	1,03	2,12	2,20	3,81
9	1,70	3,67	4,57	8,69
16	6,15	14,96	19,94	40,13
144	157,80	225,39	1614,14	2305,71

**Tabelle 7:** Ergebnisse des Serokonverter-Panels PHM934 gemessen mit dem AxSYM® HBsAg-(V2)- und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test. Erster positiver HBsAg-Nachweis der Messreihe ist unterlegt.

Tag	Ax-V2 [S/CO]	Ax-präS2 [S/CO]
0	0,79	1,36
3	1,21	2,49
7	3,15	7,99
10	6,68	19,76
14	18,10	51,16
84	115,20	191,02

**Tabelle 8:** Ergebnisse des Serokonverter-Panels 11003 gemessen mit dem AxSYM® HBsAg-(V2)-, AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-, Architect® HBsAg-(II)- und dem Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test. Erster positiver HBsAg-Nachweis der Messreihe ist unterlegt.

Tag	Ax-V2 [S/CO]	Ax-präS2 [S/CO]	Ar-II [S/CO]	Ar-präS2 [S/CO]
0	0,46	0,41	0,30	0,30
84	0,65	0,42	0,33	0,23
125	0,63	0,47	0,34	0,33
133	0,81	0,58	0,57	0,71
135	0,81	0,66	0,69	0,81
142	0,90	1,28	1,58	2,70
149	2,40	5,18	7,58	12,97
152	4,86	11,15	16,63	31,13

**Tabelle 9:** Ergebnisse des Serokonverter-Panels 11006 gemessen mit dem AxSYM® HBsAg-(V2)- und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test. Erster positiver HBsAg-Nachweis der Messreihe ist unterlegt.

Tag	Ax-V2 [S/CO]	Ax-präS2 [S/CO]
0	0,59	0,42
3	0,36	0,36
7	0,54	0,44
10	0,77	0,55
14	0,40	0,38
19	0,54	0,41
21	0,42	0,41
26	0,43	0,35
28	0,61	0,38
35	0,52	0,49
37	0,42	0,45
42	1,10	0,92
44	0,76	1,13
49	1,51	3,12
51	2,76	5,20
56	7,74	18,20
58	13,19	31,51

**Tabelle 10:** Ergebnisse des Serokonverter-Panels 11011 gemessen mit dem AxSYM® HBsAg-(V2)-, AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präs2)-, Architect® HBsAg-(II)- und dem Architect® HBsAg-(II plus anti-präs2)-Test. Erster positiver HBsAg-Nachweis der Messreihe ist unterlegt.

Tag	Ax-V2 [S/CO]	Ax-präs2 [S/CO]	Ar-II [S/CO]	Ar-präs2 [S/CO]
0	0,42	0,48	0,30	0,27
47	0,55	0,43	0,28	0,26
49	0,88	0,42	0,33	0,28
54	0,37	0,43	0,34	0,24
56	0,30	0,39	0,49	0,26
63	0,42	0,42	0,37	0,25
68	0,51	0,41	0,39	0,28
70	0,38	0,42	0,40	0,24
103	0,55	0,80	0,86	1,29
105	0,68	1,34	1,19	1,99
110	1,53	3,56	4,38	7,85
112	2,11	5,33	7,25	13,76
117	6,70	21,29	30,58	60,80
119	10,66	30,14	45,77	89,16

**Tabelle 11:** Ergebnisse des Serokonverter-Panels 11012 gemessen mit dem AxSYM® HBsAg-(V2)-, AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präs2)-, Architect® HBsAg-(II)- und dem Architect® HBsAg-(II plus anti-präs2)-Test. Erster positiver HBsAg-Nachweis der Messreihe ist unterlegt.

Tag	Ax-V2 [S/CO]	Ax-präs2 [S/CO]	Ar-II [S/CO]	Ar-präs2 [S/CO]
0	0,72	0,41	0,26	0,35
2	0,46	0,42	0,30	0,28
8	0,44	0,47	1,18	1,94
18	0,73	1,06	1,30	2,04
20	1,07	1,63	2,18	3,56
25	2,36	5,19	7,60	13,39

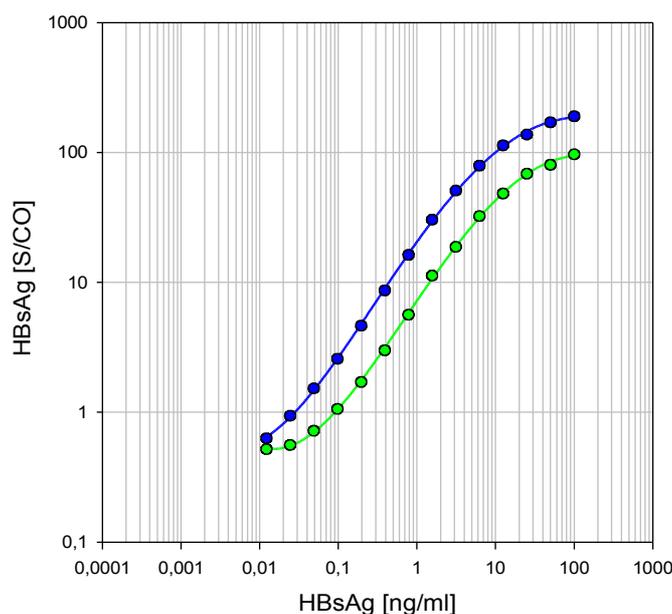
### 4.3 Sensitivitätsbestimmung mit HBsAg-Standards

Für das HBsAg existieren verschiedene Standardpräparationen, der NKL-interne Laurell-Standard [ $\mu\text{g/ml}$ ], der Paul-Ehrlich-Standard [PEI-U/ml] und der 2. WHO-Standard [IU/ml]. Im Rahmen der Sensitivitätsbestimmungen wurden mittels Ax-V2 und Ax-präs2 für alle drei Standards, mittels Ar-II und Ar-präs2 nur für den 2. WHO-Standard Verdünnungsreihen gemessen und logarithmisch dargestellt. Als analytische Nachweisgrenze wurde jener Konzentrationswert definiert, bei dem die Regressionskurve den Cut-off ( $S/CO = 1,0$ ) schneidet.

### 4.3.1 Laurell-Standard

Der ursprüngliche HBsAg-Standard für die Laurellelektrophorese wurde durch mehrfache Proteinreinigung aus einem hochtitrigen Spenderplasma hergestellt. In der hochgereinigten HBsAg-Fraktion wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt und als Standardpräparat aliquotiert. Die anfängliche HBsAg-Konzentration dieses Standards wurde für unsere Untersuchungen auf 100 ng/ml eingestellt.

Auffällig war, dass der Ax-präs2 bei allen Verdünnungsstufen dieses Laurell-Standards einen S/CO-Wert ergab, der doppelt so hoch war wie beim Ax-V2. Lediglich bei den letzten beiden Verdünnungsstufen in der Nähe des Leerwerts ( $<0,025$  ng/ml HBsAg) nahm die Differenz der Ergebnisse ab. Der Ax-V2 ergab interpoliert bereits ab  $<0,09$  ng/ml HBsAg ein negatives Ergebnis, wohingegen der Ax-präs2 bei einer ng/ml-Konzentration von 0,024 noch ein grenzwertig reaktives Ergebnis erbrachte und erst bei der nächsten Verdünnungsstufe eindeutig negativ war. Anhand der graphischen Darstellung ist ersichtlich, dass die Tests im Bereich von 0,05 bis 10 ng/ml einen nahezu linearen Verlauf aufzeigen (Abb. 14).

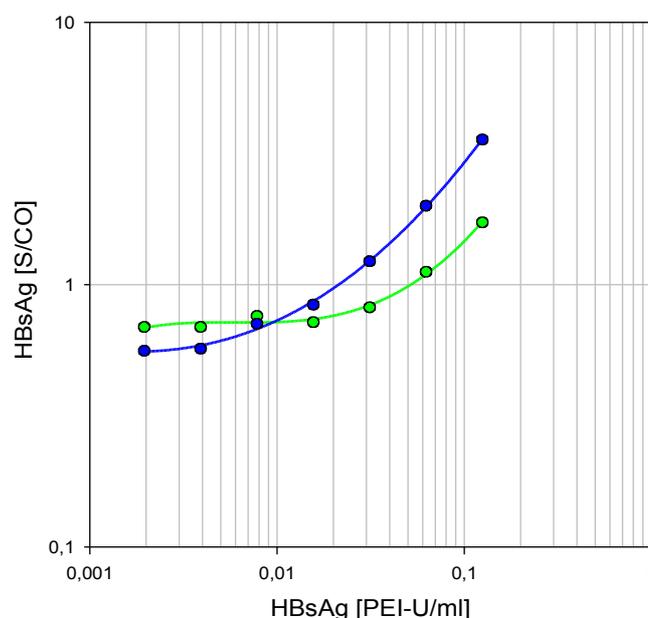


**Abbildung 14:** Darstellung der Verdünnungsreihen für den Laurell-Standard. Vergleich des AxSYM® HBsAg-(V2)-Tests (grün) mit dem AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präs2)-Test (blau).

### 4.3.2 Paul Ehrlich-Standard

Für die Messungen der Verdünnungsreihe für den Paul Ehrlich-Standard HBsAg/ad (PEI-Standard) wurde eine anfängliche Konzentration von 0,125 PEI-U/ml verwendet (Abb. 15). Für eine Konzentration von 0,0156 PEI-U/ml ergab sich im Ax-präs2 ein grenzwertig reaktives (0,84 S/CO), im folgenden Verdünnungsschritt mit 0,71 S/CO ein negatives

Ergebnis. Die Messungen mit Ax-V2 hatten jeweils eine Verdünnungsstufe zuvor zu einem grenzwertigen (0,82 S/CO bei 0,0313 PEI-U/ml) und negativen (0,72 S/CO bei 0,0156 PEI-U/ml) Ergebnis geführt. Der Schnittpunkt der Geraden zwischen noch positivem und grenzwertigem Ergebnis mit dem Cut-off lieferte eine analytische Sensitivität von 0,02 PEI-U/ml für den Ax-präs2 und 0,05 PEI-U/ml für den Ax-V2.



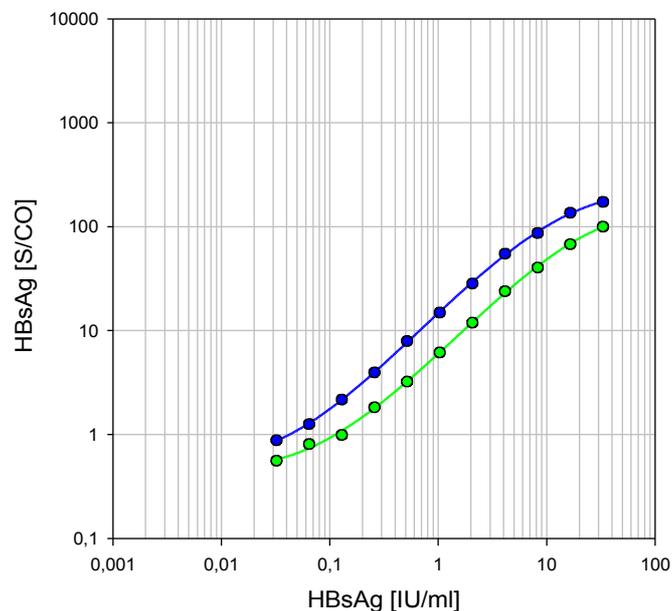
**Abbildung 15:** Darstellung der Verdünnungsreihen für den PEI-Standard. Vergleich des AxSYM® HBsAg-(V2)-Tests (grün) mit dem AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präs2)-Test (blau).

### 4.3.3 2<sup>ter</sup> WHO-Standard

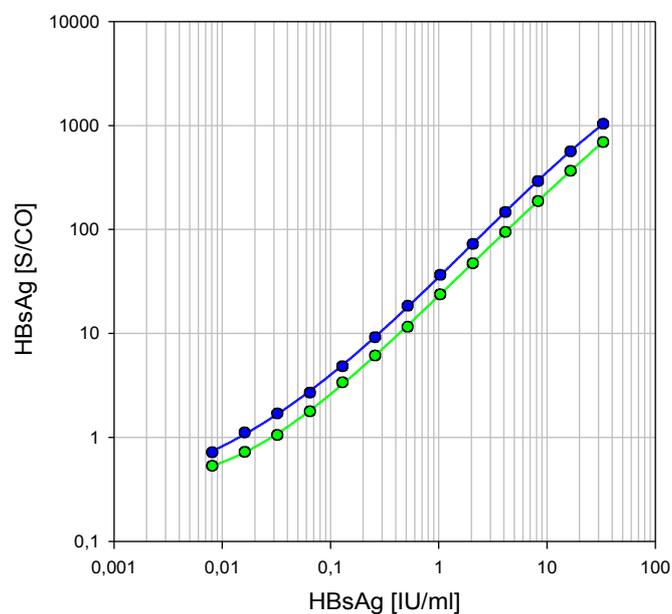
Die HBsAg-Konzentration zu Beginn beider Messreihen betrug 33 IU/ml. Sowohl für den AxSYM®, als auch für den Architect® lässt sich auch bezogen auf den 2. WHO-Standard feststellen, dass die beiden Tests mit der zusätzlichen Anti-präs2 Komponente eine höhere Empfindlichkeit aufweisen. Bezogen auf die beiden AxSYM® Tests liegt diese ungefähr um den Faktor 2 höher, bezogen auf den Architect® um das eineinhalbfache (Abb. 16 und 17).

Vergleiche aller vier Test gegeneinander lassen erkennen, dass sowohl der Ar-II-, als auch der Ar-präs2 eine höher analytische Empfindlichkeit haben. Beide Tests ergaben erst bei einer Konzentration von 0,0161 IU/ml bzw. 0,0081 IU/ml ein negatives Ergebnis; die beiden auf dem AxSYM® verwendeten Tests bereits bei 0,0322 IU/ml (Ax-V2) und 0,0161 IU/ml (Ax-präs2). Darüber hinaus lässt sich anhand der graphischen Darstellung erkennen, dass sich für die gemessenen Konzentrationen für den Architect® ein fast linearer Verlauf der einzelnen S/CO-Werte ergibt, für den AxSYM® ein sigmoidaler. Dies ist für dieses Messsystem aufgrund einer raschen Sättigung der Analytbindung charakteristisch.

Die analytische Sensitivität kann aus den Kurven wie folgt abgelesen werden: 0,04 IU/ml für den Ax-präS2, 0,1 IU/ml für den Ax-V2, 0,014 IU/ml für den Ar-präS2 und 0,03 IU/ml für den Ar-II.



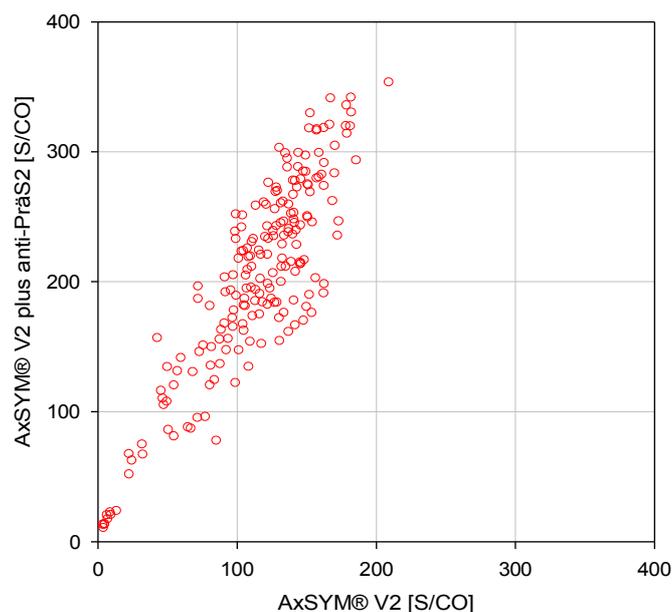
**Abbildung 16:** Darstellung der Verdünnungsreihen für den 2. WHO-Standard. Vergleich des AxSYM® HBsAg-(V2)-Tests (grün) mit dem AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test (blau).



**Abbildung 17:** Darstellung der Verdünnungsreihen für den 2. WHO-Standard. Vergleich des Architect® HBsAg-(II)-Tests (grün) mit dem Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).

#### 4.4 Diagnostische Sensitivität

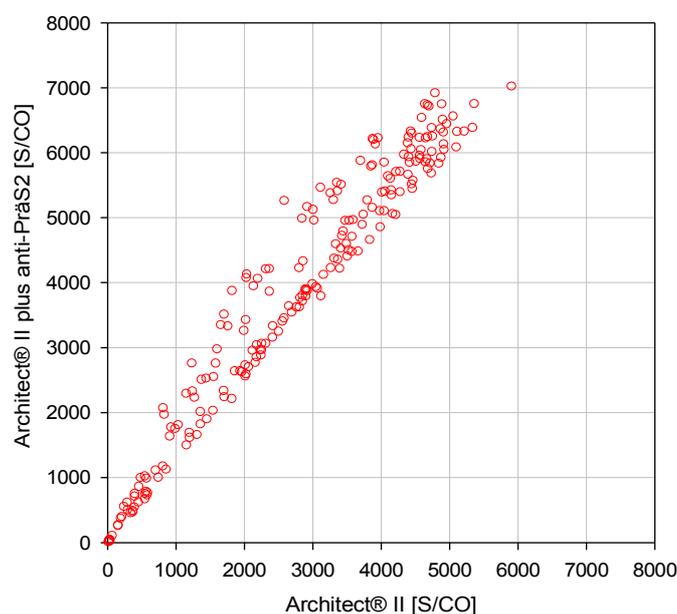
Für die Bestimmung der Sensitivität der einzelnen Tests wurden eingefrorene Blutseren aus dem Institut für Medizinische Virologie verwendet, welche in diagnostischen Suchtests bereits bestätigt positiv für HBsAg getestet worden waren. Dabei wurden für die Messungen mittels AxSYM® und Architect® jeweils unterschiedliche Seren untersucht. Die Auswahl der positiven Seren war unabhängig vom Stadium der Infektion (akut, chronisch) oder einer eventuellen Verlaufsbeobachtung unter Therapie.



**Abbildung 18:** Vergleich der Ergebnisse von 200 HBsAg-positiven, eingefrorenen Patientenproben nach Messung der HBsAg-Konzentration mittels AxSYM® HBsAg-(V2)-Test und mittels AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test.

Bei den Messungen der 200 eingefrorenen Seren mittels Ax-V2 und Ax-präS2 zeigte sich kein Unterschied der Sensitivität. Beide Tests ergaben für alle Serumproben ein positives Ergebnis und somit eine Sensitivität von  $> 99,99\%$  (KI 99,85 - 100,00 %). Jedoch zeigt sich im Vergleich der Messergebnisse, dass der Ax-präS2 im Schnitt ein um den Faktor 1,9 höheren S/CO-Wert angab als der Ax-V2 (Abb. 18). Dies galt vor allem für niedrige S/CO-Werte. Bei einem  $r^2$  von 0,777 stellte sich ein linearer Zusammenhang der Werte dar. Wie bei den AxSYM®-Messungen ergab sich auch für die 217 untersuchten Seren mittels Architect® kein Sensitivitätsunterschied der beiden Tests (Abb. 19). Beide Tests haben alle als positiv bekannten Seren mit einem S/CO-Wert größer oder gleich 1 gemessen. Daraufhin ergab sich (unter Berücksichtigung der Stichprobengröße) eine Sensitivität von  $> 99,99\%$  (KI 99,86 - 100,00 %). Bei einem besseren linearen Zusammenhang ( $r^2 = 0,947$ ) schien allerdings auch in dieser Untersuchung auffällig, dass der Test mit der zusätzlichen Anti-präS2

Komponente höhere S/CO-Werte ergab als jener ohne. Im Schnitt waren diese unabhängig von der eigentlichen Höhe des S/CO-Wertes gemittelt um den Faktor 1,5 größer.



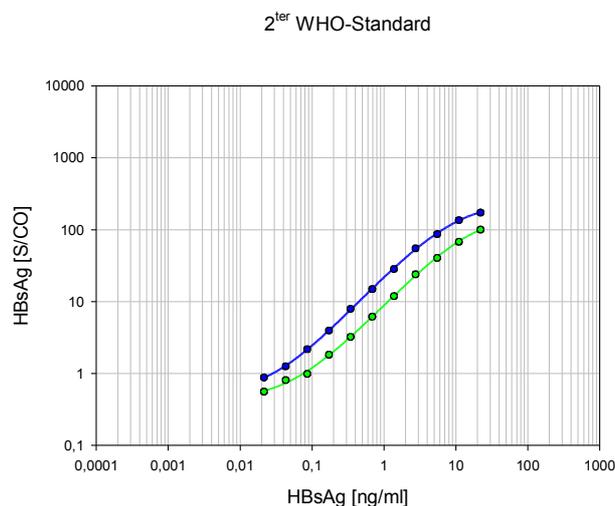
**Abbildung 19:** Vergleich der Ergebnisse von 217 HBsAg-positiven, eingefrorenen Patientenproben nach Messung der HBsAg-Konzentration mittels Architect® HBsAg-(II)-Test und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test.

## 4.5 Genotypen-Panels

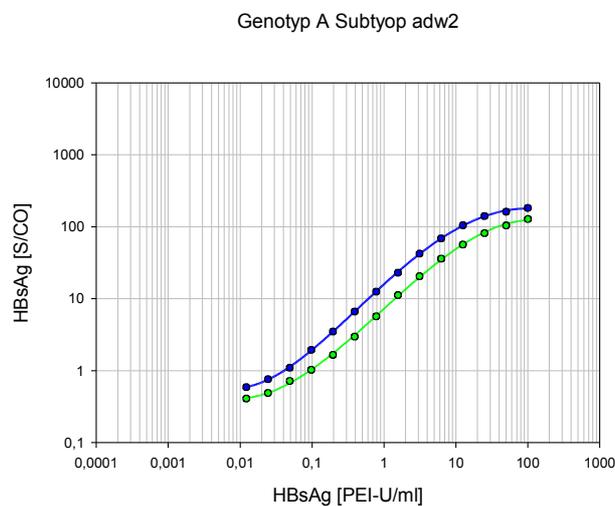
In den letzten Jahren wurden fortwährend neue Sequenzdaten von HBV-Isolaten veröffentlicht. Dies ermöglicht eine zunehmend verfeinerte Klassifikation der HBV-Genotypen. Da bislang alle Testverfahren an dem 2. WHO-Standard kalibriert und verglichen wurden, der jedoch nur den Genotyp A2 repräsentiert, ist eine Messung der analytischen Sensitivität bei verschiedenen Genotypen sinnvoll. Die Genotypen unterscheiden sich insbesondere in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz im S-Bereich, wodurch sie sich allein eindeutig klassifizieren lassen. Es ist daher evident, dass eine unterschiedliche Reaktivität der HBsAg-Tests zu erwarten sein könnte. Anhand der nachfolgend beschriebenen Messungen sollte untersucht werden, ob die verwendeten Tests eine unterschiedliche analytische Sensitivität bei einzelnen Genotypen aufweisen.

Für die Genotypen A bis G wurde im AxSYM® jeweils eine Serumprobe in einer Verdünnungsreihe gemessen (Abb. 20a-h). Die HBsAg-Konzentration der genotypisierten Seren wurden zur besseren Vergleichbarkeit mittels Laurell-Gelelektrophorese quantifiziert und auf eine Arbeitskonzentration von 100 PEI-U/ml eingestellt. Als Nachweisgrenze ist wiederum jener Konzentrationswert angegeben, bei dem die Regressionskurve den Cut-off (1,0 S/CO) schneidet (Tab. 12).

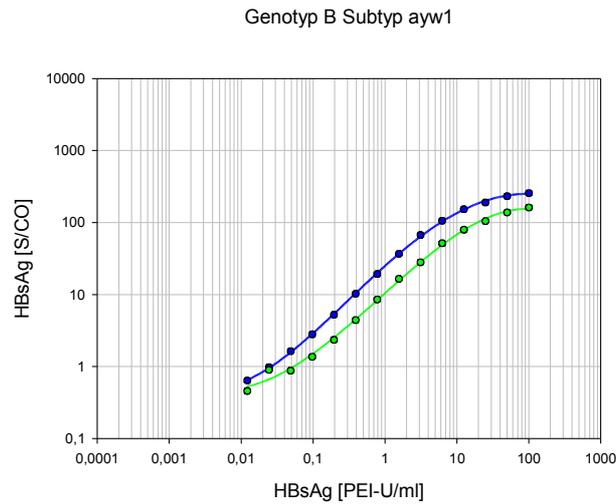
Bei der Betrachtung der Messergebnisse der beiden Tests für den AxSYM® ist festzustellen, dass der Ax-präS2 eine höhere analytische Sensitivität aufweist. Dabei liegt die Empfindlichkeit dieses Tests im Mittel um den Faktor 2,51 höher als die des Ax-V2. Auffallend ist hierbei der Empfindlichkeitsunterschied für den Genotypen C. Der Ax-präS2 hat eine um den Faktor 3,40 höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Ax-V2.



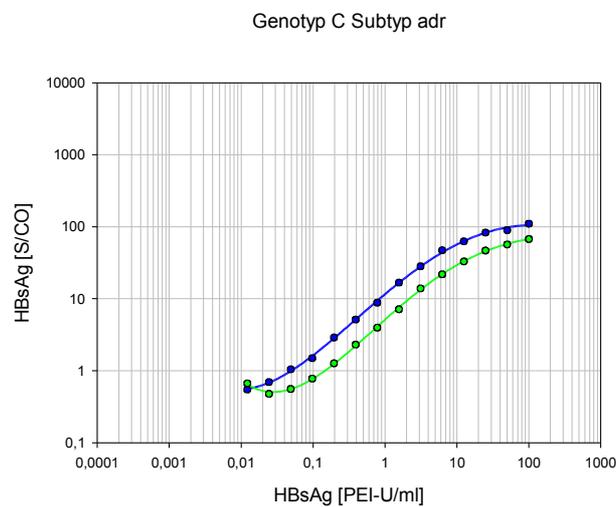
**Abbildung 20a:** Verdünnungsreihe für die HBV-Genotypen des Nationalen Konsiliarlabors für Hepatitis B und D gemessen mittels AxSYM® HBsAg-(V2)- (grün) und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test (blau).



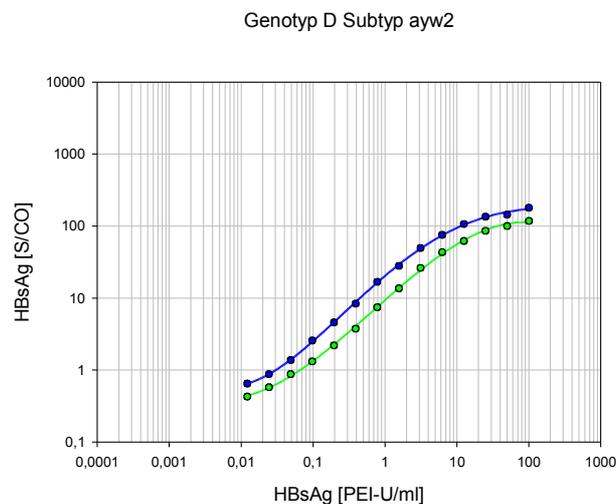
**Abbildung 20b:** Verdünnungsreihe für die HBV-Genotypen des Nationalen Konsiliarlabors für Hepatitis B und D gemessen mittels AxSYM® HBsAg-(V2)- (grün) und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test (blau).



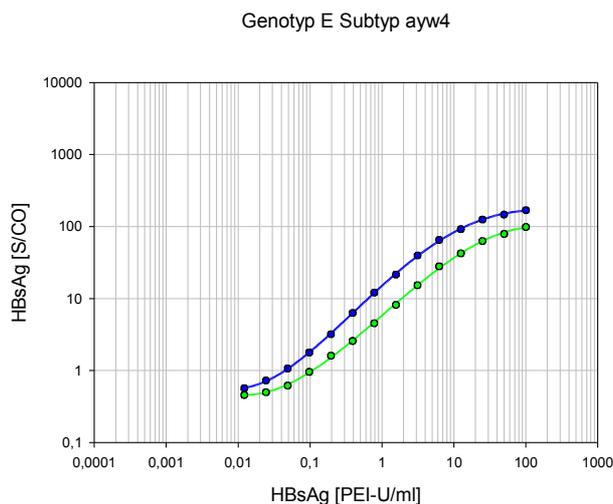
**Abbildung 20c:** Verdünnungsreihe für die HBV-Genotypen des Nationalen Konsiliarlabors für Hepatitis B und D gemessen mittels AxSYM® HBsAg-(V2)- (grün) und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test (blau).



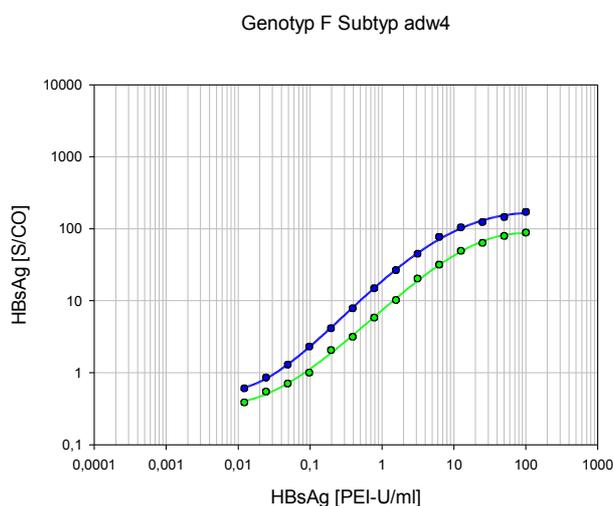
**Abbildung 20d:** Verdünnungsreihe für die HBV-Genotypen des Nationalen Konsiliarlabors für Hepatitis B und D gemessen mittels AxSYM® HBsAg-(V2)- (grün) und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test (blau).



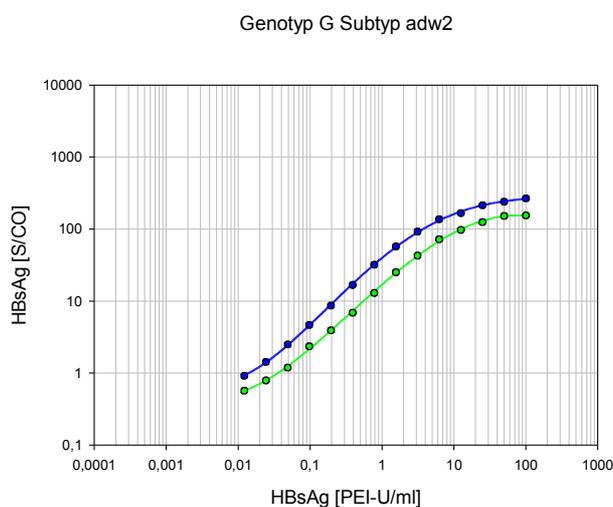
**Abbildung 20e:** Verdünnungsreihe für die HBV-Genotypen des Nationalen Konsiliarlabors für Hepatitis B und D gemessen mittels AxSYM® HBsAg-(V2)- (grün) und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test (blau).



**Abbildung 20f:** Verdünnungsreihe für die HBV-Genotypen des Nationalen Konsiliarlabors für Hepatitis B und D gemessen mittels AxSYM® HBsAg-(V2)- (grün) und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test (blau).



**Abbildung 20g:** Verdünnungsreihe für die HBV-Genotypen des Nationalen Konsiliarlabors für Hepatitis B und D gemessen mittels AxSYM® HBsAg-(V2)- (grün) und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test (blau).



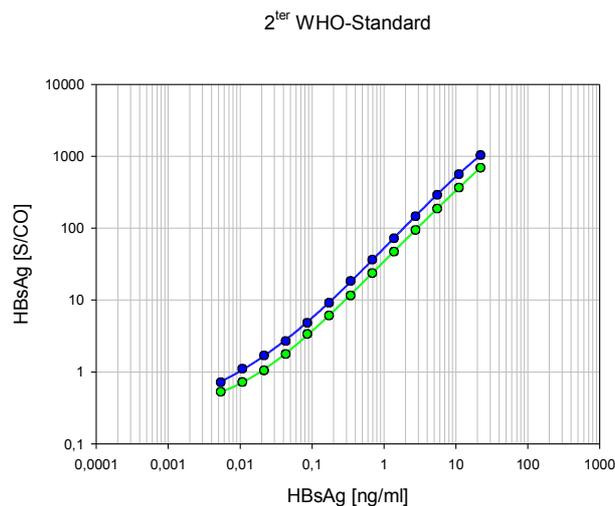
**Abbildung 20h:** Verdünnungsreihe für die HBV-Genotypen des Nationalen Konsiliarlabors für Hepatitis B und D gemessen mittels AxSYM® HBsAg-(V2)- (grün) und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test (blau).

**Tabelle 12:** Empfindlichkeitsgrenzen für die HBV-Genotypen gemessen mittels AxSYM® HBsAg-(V2)- und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präs2)-Tests. Höchste und niedrigste Werte der Messreihen sind unterlegt. Daten für das Referenzpanel des Nationalen Konsiliarlabors für Hepatitis B und D. Der Quotient der Empfindlichkeitsgrenzen ist in der letzten Spalte angeführt. A: Angabe in ng/ml.

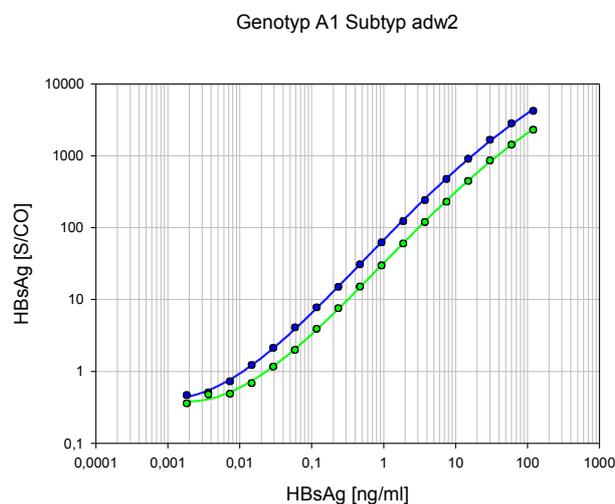
AxSYM®			
Genotyp/Subtyp	Ax-V2 [PEI-U/ml]	Ax-präs2 [PEI-U/ml]	Ax-V2/Ax-präs2
2. WHO-Standard	0,080 <sup>A</sup>	0,030 <sup>A</sup>	2,67
A2/adw2	0,100	0,040	2,50
B/ayw1	0,057	0,028	2,04
C/adr	0,170	0,050	3,40
D/ayw2	0,070	0,030	2,33
E/ayw4	0,110	0,047	2,34
F/adw4	0,090	0,035	2,57
G/adw2	0,038	0,016	2,38
Mittelwert (ohne 2. WHO-Standard)	0,091	0,035	2,51
Standardabweichung (ohne 2. WHO-Standard)	0,043	0,012	-

Bei den Messungen mit dem Architect® wurden für die Genotypen A bis D mehrere Seren in Verdünnungsreihen untersucht, für die Genotypen E, F und H jeweils nur eines (Abb. 21a-o). Die Ausgangskonzentration des HBsAg wurde bei diesen Messungen nicht auf eine einheitliche Ausgangskonzentration eingestellt. Die Konzentrationen der Plasmen lagen zwischen 25 und 120 µg HBsAg pro ml. Dies wiederum führte dazu, dass bei einigen Plasmen mehr Verdünnungsschritte bis zur Negativität gemessen werden mussten, als bei anderen (Tab. 13). Die Messergebnisse des Architect® zeigen wie jene des AxSYM® eine höhere analytische Sensitivität für den Test mit der zusätzlichen Anti-präs2 Komponente. Im Mittel liegt hier die Empfindlichkeit des Ar-präs2 um den Faktor 2,2 höher als die des Ar-II. Auffällig erscheint auch hier der Empfindlichkeitsunterschied im Genotyp C. Vergleichbar mit den AxSYM® Ergebnissen weist der Ar-präs2 mit einem gemittelten Faktor von 2,83 eine höhere Empfindlichkeit bei Genotyp C auf.

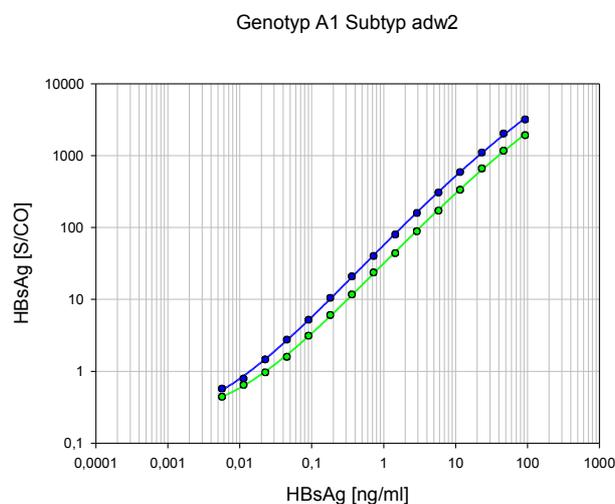
Die Nachweisgrenze für HBsAg differiert bei den einzelnen Tests. Von wenigen Ausnahmen in bestimmten Präparationen abgesehen, entspricht 1 PEI-U/ml in etwa 1 ng/ml. Demnach ist festzustellen, dass beide Tests für den Architect® eine niedrigere Konzentration von HBsAg nachweisen können als die des AxSYM®. Im Mittel kann der Ax-V2 bis zu einer Konzentration von ungefähr 0,091 PEI-U/ml HBsAg nachweisen, der Ax-präs2 bis zu einer Konzentration von 0,035 PEI-U/ml. Die anderen beiden Tests (Ar-II 0,021 ng/ml, Ar-präs2 0,009 ng/ml) liegen hier deutlich niedriger (Tab. 12 und 13).



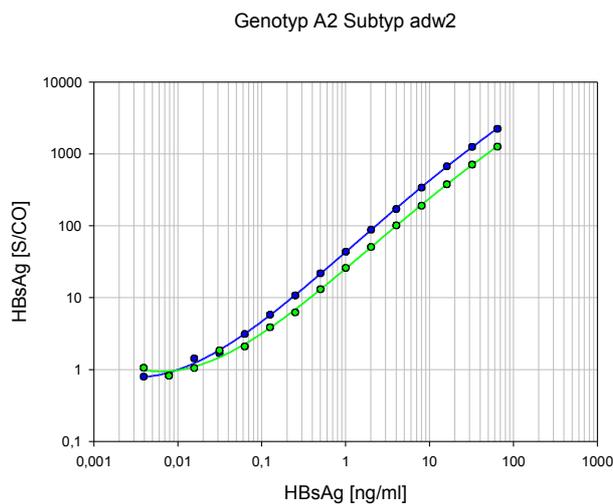
**Abbildung 21a:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



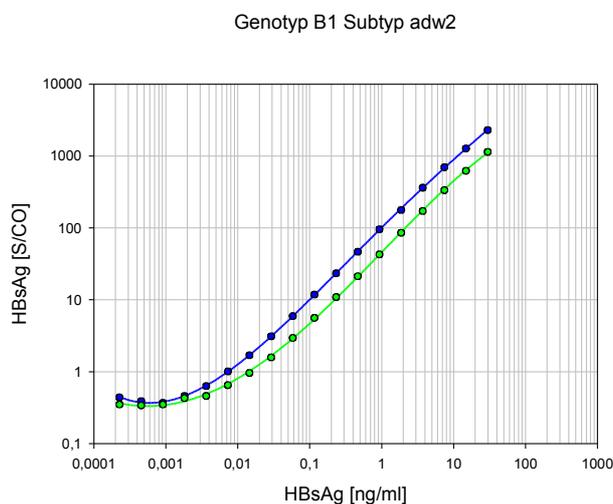
**Abbildung 21b:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



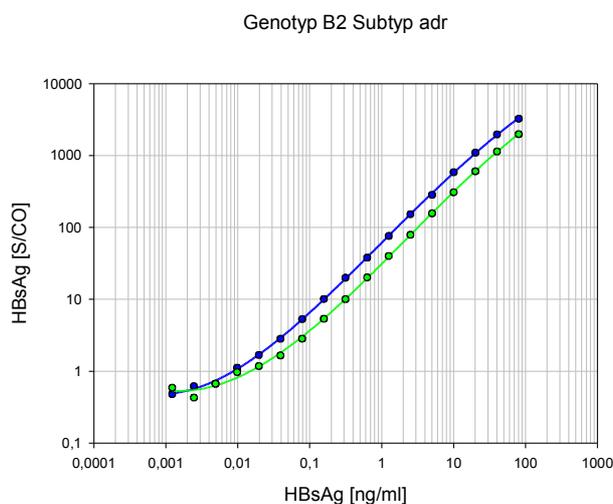
**Abbildung 21c:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



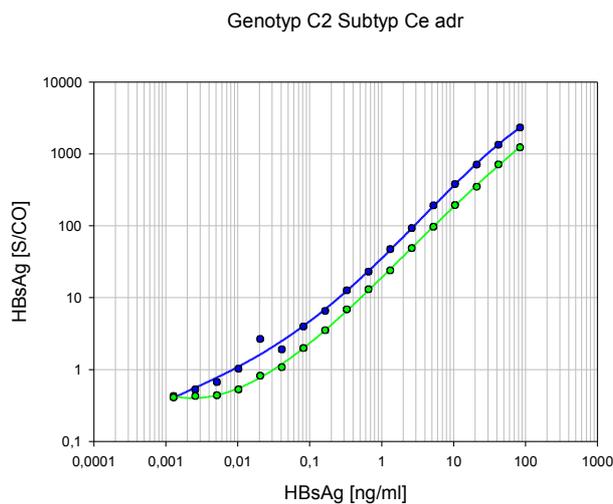
**Abbildung 21d:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



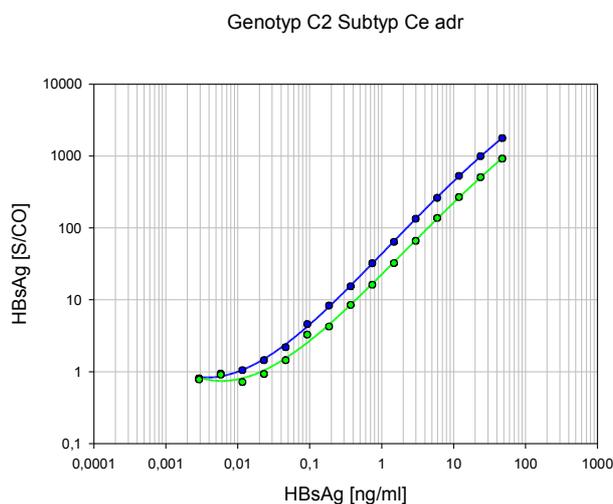
**Abbildung 21e:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



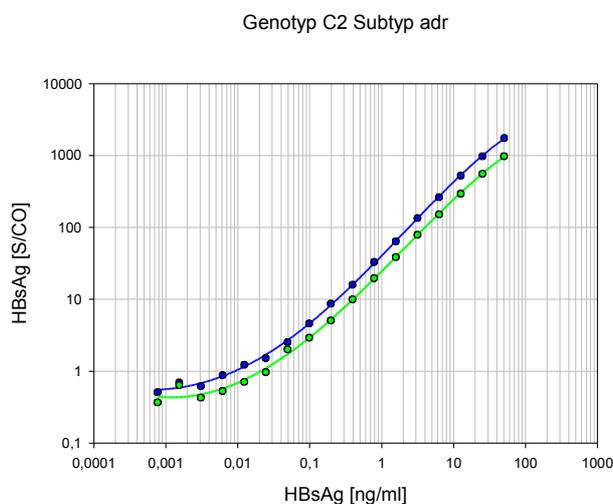
**Abbildung 21f:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



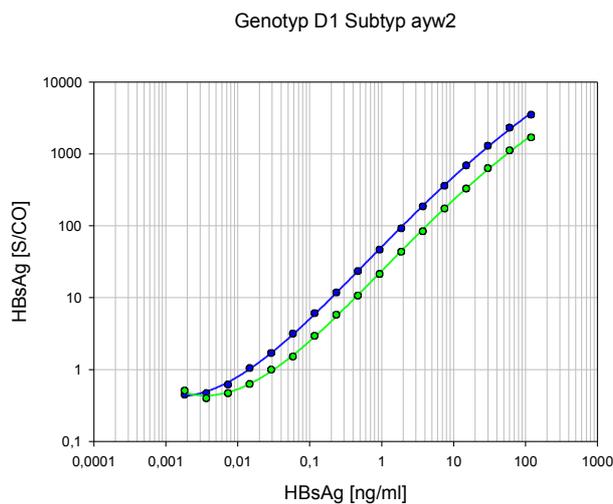
**Abbildung 21g:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



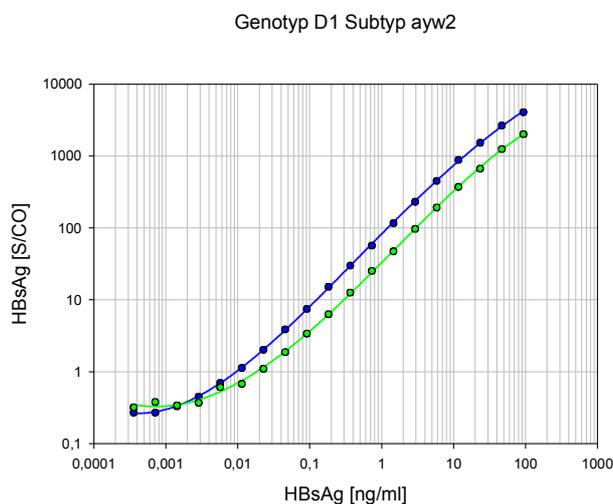
**Abbildung 21h:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



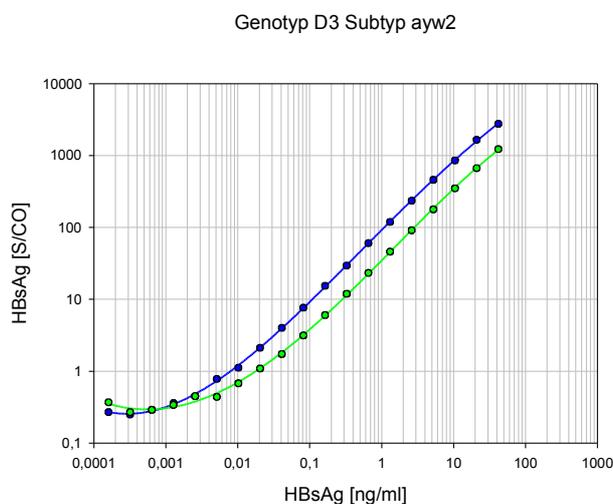
**Abbildung 21i:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



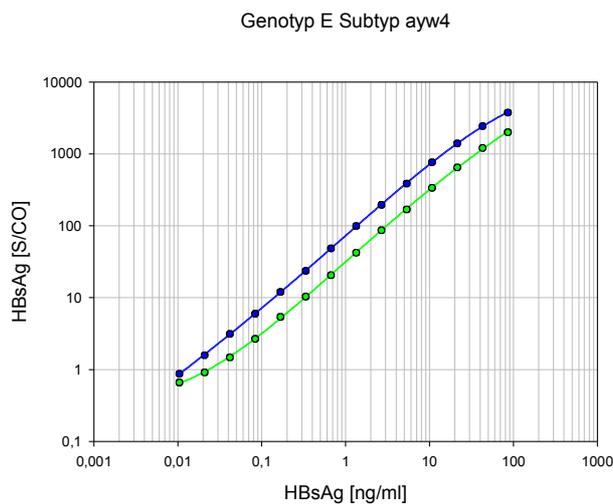
**Abbildung 21j:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



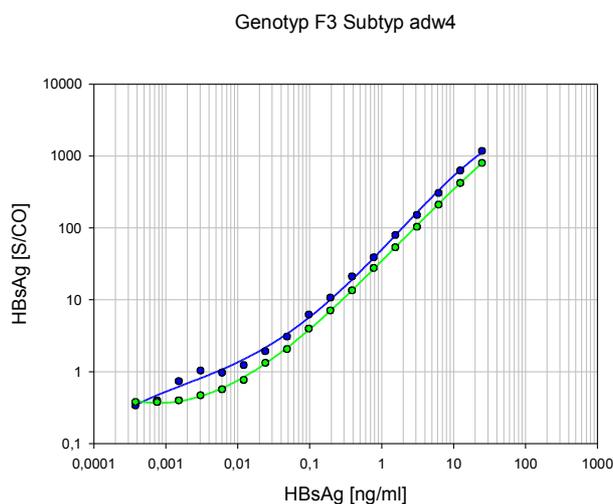
**Abbildung 21k:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



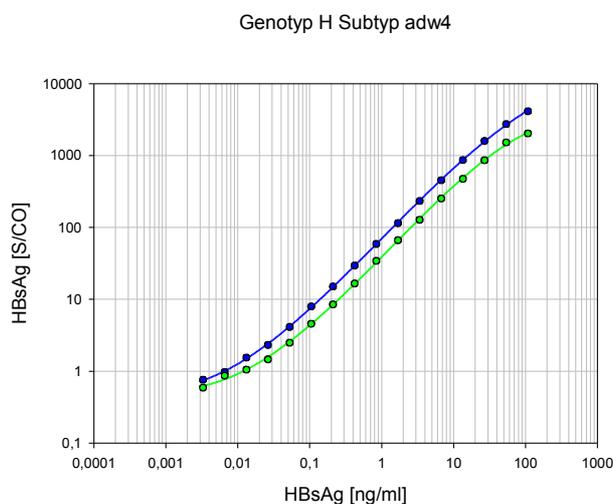
**Abbildung 21l:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



**Abbildung 21m:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



**Abbildung 21n:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).



**Abbildung 21o:** Verdünnungsreihe der Genotypen für das WHO-Panel gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- (grün) und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test (blau).

**Tabelle 13:** Empfindlichkeitsgrenzen für die Genotypen des WHO-Panels gemessen mittels Architect® HBsAg-(II)- und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Tests. Höchste und niedrigste Werte der Messreihen sind unterlegt. Der Quotient der Empfindlichkeitsgrenzen ist in der letzten Spalte angeführt.

Architect®				
Genotyp/Subtyp	Land	Ar-II [ng/ml]	Ar-präS2 [ng/ml]	Ar-II/Ar-präS2
2. WHO-Standard	Niederlande	0,020	0,010	2,00
A1/adw2	Südafrika	0,024	0,011	2,18
A1/adw2	Brasilien	0,024	0,012	2,00
A2/adw2	Deutschland	0,017	0,010	1,70
B1/adw2	Japan	0,014	0,007	2,00
B2/adr	Japan	0,010	0,008	1,25
C2 Ce/adr	Japan	0,033	0,010	3,30
C2 Ce/adr	Japan	0,027	0,010	2,70
C2 Ce/adr	Russland	0,024	0,010	2,50
D1/ayw2	Deutschland	0,030	0,014	2,14
D1/ayw2	Deutschland	0,020	0,010	2,00
D3/ayw2	Südafrika	0,019	0,008	2,38
E/ayw4	Westafrika	0,020	0,008	2,50
F3/adw4	Brasilien	0,015	0,006	2,50
H/adw4	Deutschland	0,011	0,007	1,57
Mittelwert	-	0,021	0,009	2,19
Standardabweichung	-	0,006	0,002	-

#### 4.6 HBsAg-Mutanten

Mit der nachfolgend beschriebenen Untersuchung sollte gezeigt werden, ob Testverfahren durch die Hinzunahme eines weiteren Antikörpers im präS2-Bereich auch Hepatitis-B-Viren mit Mutationen innerhalb ihres S-Gens besser oder schlechter detektieren können als Verfahren ohne erweitertes Antikörperspektrum. Die dabei verwendeten Mutanten wurden bereits im Rahmen diagnostischer Untersuchungen sequenziert und besonders häufig vorkommende wie auch bekanntermaßen problematische Mutanten ausgewählt. Die für die einzelnen Nachweisverfahren problembehafteten Mutationen sind dabei abhängig von der Auswahl der verwendeten mAk. Exemplarisch seien hier Probleme bei der Nachweisbarkeit des HBsAg der Testverfahren von Abbott Diagnostics bei Veränderungen innerhalb der Aminosäuresequenz 121 bis 124 und von Bayer HealthCare bei der Mutation G145R angeführt. Die einzelnen Mutationen innerhalb der präS- und S-Region mit dem dazugehörigen Messergebnis (S/CO) sind tabellarisch dargestellt (Tab. 14 und 15).

Für die Proben K259, K301, K342, K575, K616, K644 und K654 ergaben die Tests übereinstimmend ein korrekt positives Ergebnis. Im Durchschnitt wies der Ax-präS2 einen etwa um den Faktor 1,5 größeren S/CO-Wert auf als der Ax-V2. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Messungen des Architect® ein umgekehrtes Bild. Hier waren die ermittelten Werte des Ar-II etwa um den Faktor 1,4 größer als die des Ar-präS2. Für das mutierte HBsAg der Proben K587 und K650 ergab sich in allen verwendeten Testverfahren ein eindeutig negatives Signal. Allerdings haben bis zum jetzigen Zeitpunkt alle kommerziell erhältlichen Testkits für HBsAg bei diesen beiden Mutanten das HBsAg nicht detektieren können.

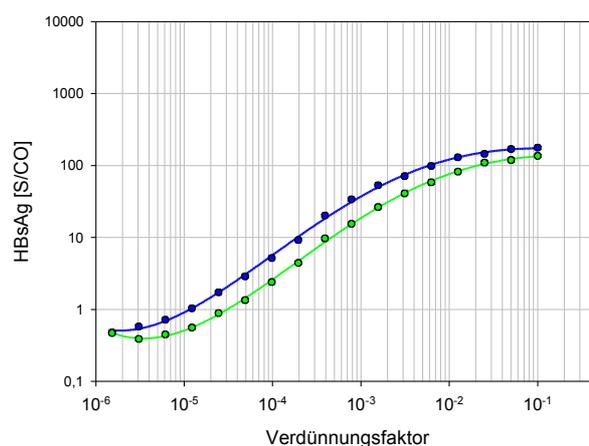
**Tabelle 14:** Messergebnisse der einzelnen HBsAg-Mutanten mittels AxSYM® HBsAg-(V2)- und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Tests. Falsch negative Messergebnisse sind hinterlegt.

AxSYM®				
Mutant	Genotyp/Subtyp	Mutationen innerhalb der präS-/S-Region	Ax-V2 [S/CO]	Ax-präS2 [S/CO]
K259	D/ayw4	sP/T127I	177,58	247,56
K301	A und G	(Genotyp-gemischte Koinfektion)	126,42	240,27
K342	A2/adw2	sL109V, sP127T, sM133T, sD144G, sW182L, sT189I, sV190A, sS210R	136,22	176,83
K575	D/ayw3	sF8Y, sT45S, pS98T, pM109V, sT118A, sL173F, sV177A, sS207R, sV224A	145,54	208,17
K587	D/ayw2	pA28T, pF130L, sS193L, sS204R	0,45	0,48
K616	D/ayw2	sF8L	114,42	159,10
K650	A2/adw2	pL16R, pD27E, pL30V, pL67F, pP92T, sT118S, sK122R, sT126I, pG138D, sP142H, sD144T, pS146F, pG149E, sI150T, pV151L, pN174H, sS174N, sG185E, sS204R	0,36	0,37
K644	D/ayw2	pA79T	154,04	198,31
K654	D/ayw3	sT118A, sS207N, sS210R	200,83	353,20

**Tabelle 15:** Messergebnisse der einzelnen HBsAg-Mutanten mittels Architect® HBsAg-(II)- und Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Tests. Falsch negative Messergebnisse sind hinterlegt.

Architect®				
Mutant	Genotyp/Subtyp	Mutationen innerhalb der präS-/S-Region	Ar-II [S/CO]	Ar-präS2 [S/CO]
K575	D/ayw3	sF8Y, sT45S, pS98T, pM109V, sT118A, sL173F, sV177A, sS207R, sV224A	5710,13	4211,94
K650	A2/adw2	pL16R, pD27E, pL30V, pL67F, pP92T, sT118S, sK122R, sT126I, pG138D, sP142H, sD144T, pS146F, pG149E, sI150T, pV151L, pN174H, sS174N, sG185E, sS204R	0,20	0,20

Anhand der HBV-Mutante K342 mit acht Mutationen im SHBs-Protein sollte exemplarisch untersucht werden, ob neben dem qualitativ gleichförmigen Ergebnis möglicherweise ein Unterschied in der analytischen Sensitivität bei Verdünnung des mutierten HBsAg besteht. Eine Verdünnungsreihe der Probe und Messung mit den beiden AxSYM® Tests wurde durchgeführt und graphisch dargestellt (Abb. 22). Der Ax-präS2 lieferte höhere Signalwerte und eine höhere Messempfindlichkeit, die jedoch bei der Mutante nicht signifikant von den jeweils unterschiedlichen Nachweisgrenzen der Wildtypen abwich.



**Abbildung 22:** Verdünnungsreihe der HBV-Mutante K342 gemessen mittels AxSYM® HBsAg-(V2)-Test (grün) und AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test (blau).

#### 4.7 Bindungsmuster der Anti-HBs-Antikörper im Western Blot

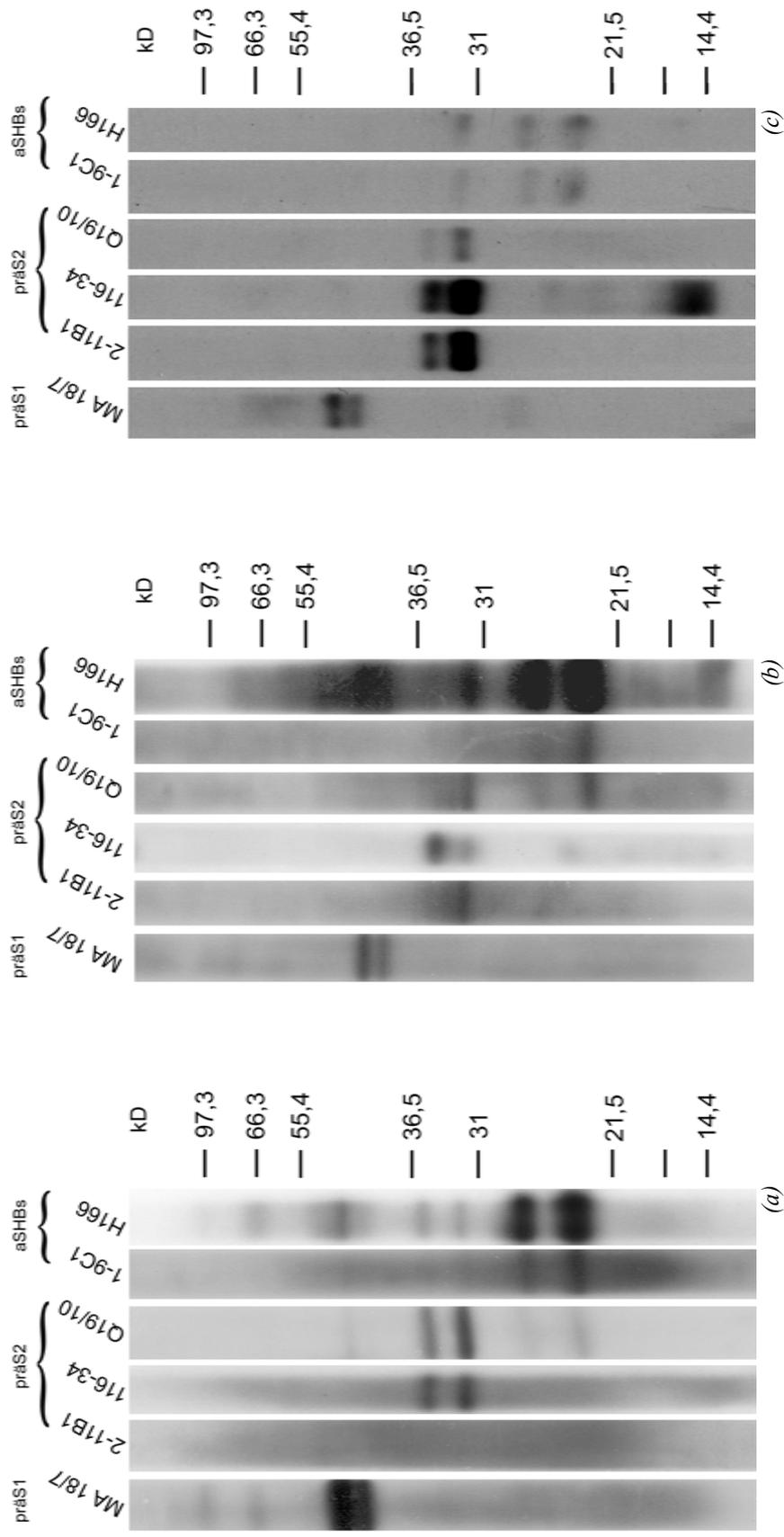
Die unterschiedlichen Bindungsmuster der Anti-HBs-Antikörper bei verschiedenen Genotypen sollte in einer SDS-Gelelektrophorese und nachfolgendem Western Blotting untersucht werden. Hierfür wurden die bereits vorher im Institut für Medizinische Virologie, Gießen aufgereinigten HBs-Antigene der Genotypen A, C und D verwendet. Die eingestellte Konzentration nach Aufreinigung des Genotyp A lag bei 1,73 µg/µl, des Genotypen C bei 2,00 µg/µl und die des Genotypen D vor Aufreinigung bei 100 µg/µl. Es wurden jeweils 2 µl Probe der einzelnen Genotypen aufgetragen. Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese und Transfer auf eine Membran wurde jeder Genotyp getrennt mit insgesamt sechs verschiedenen Primärantikörpern und im Anschluss mit einem jeweils passendem Sekundärantikörper inkubiert. Unter den ausgewählten monoklonalen Primärantikörpern befanden sich ein Anti-präS1-Antikörper (MA 18/7), drei Anti-präS2-Antikörper (2-11B1, 116-34, Q 19/10) und zwei Anti-SHBs-Antikörper (1-9C1, H166). Die dabei jeweils verwendeten Konzentrationen der einzelnen Antikörper sind in Abschnitt 2.7. aufgeführt. Die Sekundärantikörper (Anti-Maus-IgG aus Ziege, Anti-Schaf-IgG aus Esel) wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

Das Hepatitis-B-Virus verfügt, wie bereits in der Einleitung erläutert, über drei verschiedene HBs-Antigene (L-, M- und SHBs). Der S-Anteil von LHBs, MHBs sowie SHBs liegt jeweils in einer glykosylierten und in einer nicht-glykosylierten Form im Serum vor. Zusätzlich ist MHBs nicht aber LHBs aufgrund seiner Membrantopologie im präS2-Teil glykosyliert. Daraus ergeben sich typischerweise für alle drei HBs-Proteine Doppelbandenstrukturen im Western Blot. Diese Doppelbanden liegen für das LHBs bei einem Molekulargewicht von 39 und 42 kD, die für das MHBs bei 33 und 36 kD und für das SHBs bei 24 und 27 kD.

Bei der Auswertung der Western Blots (Abb. 23) zeigten sich mehrerer Auffälligkeiten. So kam es bei den präS2- und S-Antikörpern zu unterschiedlichen Bindungsmustern. Der für die präS1-Region verwendete Antikörper MA 18/7 zeigte hingegen ein identisches Bindungsmuster sowohl bei der nicht-glykosylierten als auch bei der glykosylierten Form des LHBs für alle drei Genotypen.

Bei der Betrachtung der präS2-Antikörper zeigten sich sehr deutliche Unterschiede. Bei Genotyp D band der Antikörper 166-34 gut. Zusätzlich kam es zu einer Bande im Bereich von 16 kD. Demgegenüber kam es bei Genotyp A nur zu einer sehr schwachen und bei Genotyp C zu keiner Bindung. Die Bande bei Genotyp C bei 37 kD war mutmaßlich unspezifisch, da bei einer spezifischen Reaktion die 33 kD-Bande üblicherweise stärker zur Abbildung kommt. Antikörper 2-11B1 reagierte nur bei Genotyp D und dies sehr gut. Die Bindung von Q19/10 war bei den beiden Genotypen A und D gut, bei Genotyp C fiel diese schwächer aus.

Die Antikörper 1-9C1 und H166, beide spezifisch für die SHBs-Region, wiesen ebenfalls unterschiedliche Bindungsmuster auf. Der Antikörper 1-9C1 band bei allen drei Genotypen deutlich an die nicht glykosylierte und glykosylierte Form des SHBs. Bei den anderen beiden HBs-Oberflächenproteinen war keine Bindung erkennbar. Im Gegensatz dazu markierte H166 neben der nicht glykosylierten und glykosylierten Form des SHBs bei Genotyp D zusätzlich die einfach glykosylierte Form des MHBs und bei Genotyp A beide Glykosilierungsformen des MHBs. Außerdem kam es bei Genotyp A bei 50 kD zu einer Bindung an mutmaßliche MHBs-Dimere. Bei Genotyp C kam es vergleichbar mit Genotyp D zu einer Bindung an die einfach glykosylierte Form des MHBs sowie vergleichbar mit Genotyp A zur Bindung an die mutmaßlichen MHBs-Dimere.



**Abbildung 23:** Western Blots des HBsAg der Genotypen A (a), C (b) und D (c). Größenmarker Mark12®. Beschreibung der Antikörper und Bindungsmuster im Text.

## 5 Diskussion

### 5.1 Sensitivität und Spezifität der HBsAg-Testverfahren

Eine qualitativ hochwertige virologische Diagnostik der Hepatitis-B-Infektion gestaltet sich aufgrund der vielen serologischen Parameter, der unterschiedlichen Verlaufsmuster und der mitunter unzureichenden Sensitivität und Spezifität einzelner Testverfahren sehr schwierig. Da der Nachweis von HBsAg weltweit durchgeführt wird und er ein wichtiger Parameter bei der Abklärung des Infektionsstatus und des Therapieverlaufs darstellt, erscheint es nicht verwunderlich, dass es sehr viele kommerziell erhältliche Testverfahren zum Nachweis des HBsAg gibt. In der EU sind derzeit 25 Nachweisverfahren erhältlich, die vom Paul Ehrlich-Institut evaluiert sind [NICK S. UND SCHEIBLAUER H., 2007], jedoch kommt in der routinemäßigen Diagnostik nur eine geringe Anzahl zur breiten Anwendung. Unter diesen am weitesten verbreiteten HBsAg-Testverfahren sind der Abbott AxSYM®-HBsAg, der Abbott PRISM®-HBsAg und der Abbott Architect®-HBsAg zu nennen, außerdem der Roche ELECSYS®-HBsAg und der ADVIA Centaur®-HBsAg der Firma Bayer HealthCare (Tab. 16).

**Tabelle 16:** Vergleich der diagnostischen Spezifitäten und Sensitivitäten sowie der Nachweisgrenzen verschiedener HBsAg-Tests. Angaben nach S. Nick und H. Schleiblauer, 2007. Ergebnisse dieser Arbeit farblich hinterlegt. A: Mühlbacher A. et al., 2008: 99,97 % nur im Blutspenderkollektiv; B: Herstellerangabe Siemens Healthcare Diagnostics, Studie von 2002 an 5262 Proben; C: vom Hersteller angegebene und von S. Nick und H. Schleiblauer übernommene Nachweisgrenze; D: Mühlbacher A. et al., 2008.

Testverfahren	Spezifität [%]	Sensitivität [%]	Nachweisgrenze	
			2. WHO-Standard [IU/ml]	PEI-Standard ad [PEI-U/ml]
Abbott				
Architect® HBsAg-(II)	99,87	99,52	0,050 <sup>C</sup>	0,016
	> 99,99	> 99,99	0,030	-
Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)	99,90	> 99,99	0,014	-
AxSYM® HBsAg-(V2)	99,95	kA	0,045	0,018
	99,95	> 99,99	0,100	0,050
PRISM® HBsAg	99,99	100,00	0,030	0,009
Roche				
ELECSYS® HBsAg-II	> 99,88 <sup>A</sup>	> 99,99 <sup>A</sup>	0,023	0,010
Bayer HealthCare				
ADVIA Centaur® HBsAg	99,94 <sup>B</sup>	> 99,99 <sup>B</sup>	0,025 <sup>D</sup>	< 0,001 <sup>D</sup>

Dass das HBV aufgrund seiner DNA-Replikation über die Zwischenstufe der prägenomischen RNA mithilfe einer Reversen Transkriptase eine hohe Mutationsrate besitzt und dass der Nachweis des HBsAg mit einem oder wenigen monoklonalen Antikörpern naturgemäß Mutationen und damit Infektionen nicht erkennt, wird von Virologen schon seit langem beschrieben. Im Laufe der letzten Jahre konnte durch immer bessere technische Möglichkeiten des Nachweises von HBsAg auch in der klinischen Anwendung aufgezeigt werden, dass die Zahl der falsch negativen Ergebnisse durch natürlich vorkommende, bis dahin unbekannte oder unerkannte Varianten und Mutanten des HBsAg in einem nicht unerheblichen Maße hervorgerufen wird [LA'ULU S. L. UND ROBERTS W. L., 2006; LY T. D. ET AL., 2006; SCHEIBLAUER H. ET AL., 2006; WEBER B., 2005; WEBER B., 2006]. Das Auftreten dieser HBV-Varianten und -Mutanten steht sowohl in engem Zusammenhang mit der Durchführung der aktiven und passiven Immunisierung gegen HBV als auch den immer besser werdenden medikamentösen Therapieoptionen, welche zu einer zunehmenden Selektion führen. Um zu gewährleisten, dass auch diese nachgewiesen werden können, kommt es zu einer stetigen Weiterentwicklung von HBsAg-Testverfahren, durch welche sich die Hersteller eine Verbesserung der diagnostischen und analytischen Sensitivität besonders bei diesen problematischen Proben versprechen, wobei die in allen Testverfahren hohe Spezifität erhalten bleiben sollte.

In den erhobenen Daten der AxSYM®- und Architect®-Messungen wurde jeweils ein etablierter, kommerziell erhältlicher HBsAg-Test gegen eine Version mit zusätzlichem Antikörper verglichen. Die Modifikation bestand dabei in der Hinzunahme eines monoklonalen Antikörpers, welcher spezifisch für ein Epitop der präS2-Region des HBsAg ist.

Bei den Spezifitätsmessungen von insgesamt 1.949 (Architect®) beziehungsweise 2.000 Blutspendern (AxSYM®) zeigt sich eine sehr gute Spezifität aller Nachweisverfahren. Mit > 99,99 % für den Ar-II, 99,90 % für den Ar-präS2 und 99,95 % sowohl für den Ax-V2 als auch für den Ax-präS2 ergeben sich vergleichbare Werte zu den in Tabelle 16 genannten Charakteristiken anderer Testverfahren. Die ermittelten SDtoCO-Werte, welche Rückschlüsse auf den Abstand der Negativwertverteilung zum Cut-off zulassen, weisen zusätzlich mit Werten von 10,40 bis 18,15 einen ausreichenden Abstand auf.

Durch die Hinzunahme von Anti-präS2-Antikörpern in ein Testsystem könnte die Häufigkeit von falsch positiven Ergebnissen aufgrund zusätzlicher unspezifischer Bindungen erhöht sein. Diese Problematik konnte in der vorliegenden Arbeit für die verwendeten Testsysteme jedoch

verneint werden. Bei der Untersuchung der Blutspenderkollektive wurden beim Ar-präS2 zwei, beim Ar-II keine und bei den beiden AxSYM®-Tests jeweils nur eine falsch positive Probe gefunden. Dieses Ergebnis ist anhand der Stichprobengröße als gleichwertig anzusehen.

Trotz vergleichbar hoher Spezifitätswerte bei den Messungen der Serumproben hospitalisierter Patienten, Schwangerer und Dialysepflichtiger ergaben sich bei diesen drei Patientenkollektiven sehr viel kleinere SDtoCO-Werte als bei den gesunden Blutspendern. Eine Ausnahme stellt die Messung der hospitalisierten Patienten mit dem Ax-V2 dar, welche einen zu den Blutspendern vergleichbar hohen SDtoCO-Wert von 15,1 aufweist (vgl. Tab. 2, S. 41), was auf eine höhere Zuverlässigkeit auch bei diesem problematischen Kollektiv hindeutet. In den übrigen fünf Messreihen der Problemgruppen liegen die ermittelten SDtoCO-Werte zwischen 4,1 und 8,5 (vgl. Tab. 2, S. 41). Als Grund dieser im Vergleich zu dem Blutspenderkollektiv geringeren SDtoCO-Werte können mehrere Faktoren in Frage kommen: Bei Schwangeren könnte es beispielsweise aufgrund der hormonellen Situation und der dadurch resultierenden Veränderung des immunologischen Status zu einer Beeinflussung des Nachweisverfahrens kommen. Dialysepatienten, welche ebenfalls einen veränderten Immunstatus aufweisen, erhalten in zunehmendem Maße eine multimodale medikamentöse Therapie. Die dadurch im Blut befindlichen Arzneistoffe und deren Derivate könnten außerdem selbst in Betracht kommen. Die Ursachen einer unspezifischen Reaktion gegen immunologische Testverfahren sind vielgestaltig und reichen von der Bildung von Anti-Antikörper (Anti-IgG) verschiedener Spezies, dem Kontakt mit kreuzreagierenden Antigenen (Beispiel Hefepilz- oder Mäuse-Exposition), variierenden angeborenen antigenetischen Eigenschaften von Plasmaproteinen bis hin zur Exposition gegenüber kreuzreagierenden Umweltallergenen [WELINDER H. ET AL., 1988].

Aufgrund einer bei Dialysepatienten höheren Prävalenz von Hepatitis-B-Infektionen [MATZKIES F. K. ET AL., 2000] und bei Schwangeren mit dem Risiko einer vertikalen HBV-Infektion mit einer bis zu 90 %igen Chronifizierungsrate beim Neugeborenen ist es sinnvollerweise vorgeschrieben, neben Blutprodukten und Spenderorganen, vor allem diese beiden Patientenkollektive regelmäßig und zuverlässig auf HBsAg zu untersuchen.

Neben einer hohen Spezifität zeichnet sich ein gutes Nachweisverfahren auch durch eine hohe diagnostische und analytische Sensitivität aus. Die diagnostische Sensitivität aller vier Testverfahren wurde mittels bereits für HBsAg bestätigt positiver Proben ermittelt. Diese Vorselektionierung asservierter klinischer Proben erfolgte notwendigerweise durch ein älteres

und leider unempfindlicheres Nachweisverfahren, was ein generelles und häufig nicht beachtetes Problem in der klinischen Sensitivitätsprüfung darstellt.

Bei den Messungen dieser Patientenproben (AxSYM® n = 200, Architect® n = 217) weisen alle vier Testverfahren die aufgrund der beschriebenen Problematik der Vorselektionierung erwarteten positiven Ergebnisse auf. Die Sensitivität liegt somit unter Berücksichtigung des verwendeten Stichprobenumfangs bei > 99,99 %. Auffällig erscheint allerdings, dass die gemessenen S/CO-Werte in ihrer Höhe sehr unterschiedlich ausfallen. Vergleiche aller S/CO-Werte zeigen, dass die beiden Nachweisverfahren mit dem zusätzlichen Anti-präS2-Antikörper einen höheren S/CO-Wert ergeben als jene ohne. Für den AxSYM® errechnet sich ein Durchschnittsfaktor von 1,9, für den Architect® von 1,5. Unterschiedlich ist beiden Messverfahren, dass sich bei den im AxSYM® ermittelten S/CO-Werten ein höherer Faktor vor allem bei Werten nahe am Cut-off zeigt. Eine derartige Tendenz liegt beim Architect® nicht vor. Anzunehmen ist, dass die größeren S/CO-Werte von der zusätzlich verwendeten Anti-präS2-Komponente herrühren, welche neben dem bereits verwendeten Antikörper eine zusätzliche Bindung an das HBsAg bedingt. Dies wiederum führt zu einer Verstärkung des gemessenen Signals, und zwar über den gesamten Meßbereich, der dadurch größer wird.

Entgegen den bisherigen Ergebnissen mit vergleichbarer diagnostischer Spezifität und Sensitivität für alle vier Testverfahren zeigt sich bei der analytischen Sensitivität ein signifikanter Unterschied. Um die analytische Sensitivität der einzelnen HBsAg-Testverfahren zu vergleichen, wurden Verdünnungsreihen des 2. WHO-Standards (NIBSC code 00/588) und des Paul Ehrlich-Standards angefertigt. Die ermittelten Nachweisgrenzen (Schnittpunkte der Regressionsgerade im linearen Messbereich mit dem Cut-off) zeigen eine Verbesserung durch die Hinzunahme des Anti-präS2-Antikörpers sowohl für den AxSYM® als auch für den Architect® (Tab. 16).

Vergleiche mit den beschriebenen Sensitivitätswerten von S. Nick und H. Schleiblauer zeigen für den Ax-V2 und den Ar-II abweichende Ergebnisse. Während S. Nick und H. Schleiblauer eine Sensitivität von 0,045 IU/ml und 0,018 PEI-U/ml für den Ax-V2 angeben (Tab. 16), wurden in der vorliegenden Arbeit um den Faktor 2,2 bzw. 2,7 höhere Werte ermittelt. Die Daten des PEI können nicht nachvollzogen werden, da einerseits nicht angegeben wurde, in welchen Verdünnungsschritten gemessen und in welchem Medium der Standard verdünnt wurde (Puffer, Serum oder verdünntes Serum). Andererseits wäre nach den Ergebnissen des PEI auch die Sensitivität des AxSYM® gegenüber dem Architect® etwa gleich, was nicht dem Verhalten beider Testverfahren bei der Messung rekombinanter HBsAg-Präparate und

dem Genotypen-Panel entspricht. Der Unterschied zwischen der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Sensitivität des Ar-II und den Angaben bei S. Nick ist darin begründet, dass dieser Wert von S. Nick nicht gemessen wurde, sondern die vom Hersteller vorgeschlagene Nachweisgrenze übernommen wurde. Hier konnte also gezeigt werden, dass die analytische Empfindlichkeit dieses Testverfahrens um den Faktor 1,7 niedriger liegt als die angegebene Nachweisgrenze, aber wohl um Schwankungen bei der Testqualität aufzufangen auf einen höheren Wert festgelegt wurde. Daraus ergibt sich die Konsequenz, dass bei der Interpretation von Befunden mit dem Ar-II auch jene Ergebnisse, die als grenzwertig zwischen 0,03 und 0,05 IU/ml erhoben werden, einer zusätzlichen Abklärung bedürfen.

Im Vergleich zu den von S. Nick und H. Schleiblauer sowie Mühlbacher et al. charakterisierten weiteren Nachweisverfahren (Abbott PRISM®, ADVIA Centaur® HBsAg, ELECSYS® HBsAg-II) hat der Ar-II bei der Messung des 2. WHO-Standards eine deutlich geringere Sensitivität. Durch Hinzunahme der Anti-präS2-Komponente im Ar-präS2 ergibt sich hingegen eine um den Faktor 1,6 bis 2,1 niedrigere Nachweisgrenze von 0,014 IU/ml.

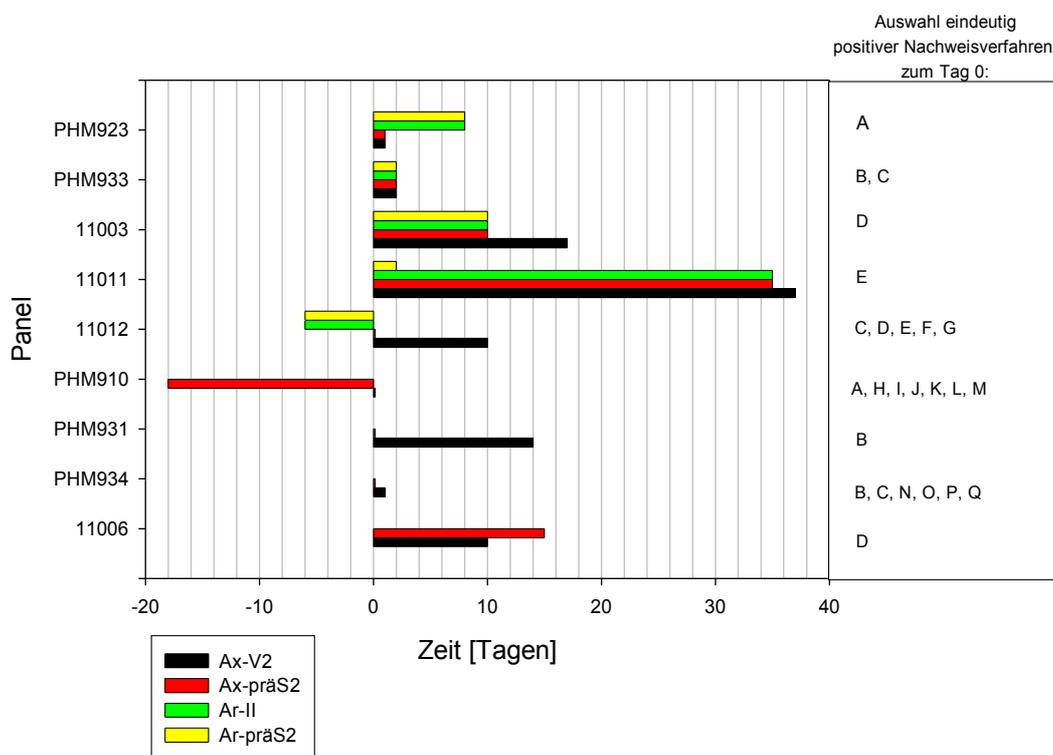
## 5.2 Nachweis der Serokonversion

In der klinischen Anwendung ist ein möglichst früher Nachweis einer frischen HBV-Infektion wünschenswert. Ein Testverfahren wird dann das diagnostische Fenster verkürzen können, wenn der Analyt auch hinreichend empfindlich nachgewiesen werden kann. Daher ist eine hohe analytische Sensitivität eine notwendige aber nicht hinreichende Voraussetzung für eine hohe diagnostische Sensitivität. Die anerkannte aber problematische Vorgehensweise zum Vergleich der diagnostischen Sensitivität von Testverfahren ist die Verwendung von kommerziell erhältlichen Serokonverter-Panels.

Die vorgelegte Arbeit zeigt auf, dass durch die Hinzunahme eines Anti-präS2-Antikörpers ein früherer Nachweis der Serokonversion beim AxSYM® in sechs der neun untersuchten Panels ermöglicht wird (vgl. Tab. 3 bis 11; S. 43 bis 46). Im Architect®-System zeigt sich hingegen nur bei einem der fünf untersuchten Serokonverter-Panels ein früherer Nachweis (Tab. 4, 6, 8, 10 und 11; S. 43 bis 46). Es ist daher ersichtlich, dass trotz verbessertem Effekt bei der analytischer Sensitivität keine Verbesserung in der Erkennung der Serokonversion in den hier verwendeten Panels erzielt wurde.

Bei der Auswertung der Serokonverter-Panels wurde wie in der Literatur vielfach beschrieben als erster positiver Abnahmetag („bleedingday“) jener Tag angenommen, der ein Tag nach der letzten negativ getesteten Probe liegt (Modell des Paul Ehrlich-Institutes). Der Zeitpunkt  $t = 0$  ist jener Abnahmetag einer Probe, bei der ein Test einen Infektionshinweis liefert, unabhängig

ob es sich um einen Antigentest oder eine PCR handelt. Die Angaben über das Verhalten anderer Testverfahren wurden vom Hersteller der Panels mitgeteilt. Um die Ergebnisse übersichtlich darzustellen, wird die zeitliche Differenz der hier untersuchten Testverfahren zum Zeitpunkt  $t = 0$  der Panels als Balkendiagramm dargestellt (Abb. 24).



**Abbildung 24:** Zeitlicher Unterschied bis zum positiven HBsAg-Nachweis der hier untersuchten Tests in Bezug zu dem/den ersten Nachweisverfahren mit eindeutig positivem HBsAg- oder HBV-DNA-Nachweis (Angaben von den jeweiligen Serokonverter-Panel-Hersteller). A: HBV-DNA PCR (kA); B: Roche Amplicor HBV Monitor<sup>TM</sup>; C: Abbott PRISM HBsAg; D: Roche CAP-G/CTM HBV; E: Abbott Murex HBsAg Version 3; F: DADE Behring Enzygnost HBsAg 5.0; G: Sorin ETI-MAK 4; H: Abbott Auszyme; I: Behring (kA); J: Ortho (kA); K: Roche (kA); L: Sanofi/Diag.Past. (kA); M: Sorin (kA); N: Gen. Sys. HBsAg; O: Abbott Dynamic; P: DiaSorin ETI-MAK III; Q: Roche Elecsys.

Bei zwei von neun Serokonvertern wird das Vorliegen einer Infektion durch die hier untersuchten Testverfahren früher erkannt: Der Konverter 11012 bei beiden Architect®-Tests und der Konverter PHM910 bei Verwendung des Ax-praS2. Bei den restlichen Konvertern waren die Testverfahren dem HBV-DNA-Nachweis und/oder dem HBs-Antigennachweis in anderen Systemen unterlegen oder wurden zum gleichen Zeitpunkt positiv. Die unterschiedliche Reaktivität der Tests bei den Konvertern ist daher zum einen, wie oben dargelegt, nicht nur in der analytischen Sensitivität, sondern auch in dem quantitativ unterschiedlichen Auftreten des Analyts bei verschiedenen Patienten begründet sowie der unterschiedlichen Maskierung des HBsAg durch zeitlich unterschiedlich auftretende Anti-HBs-Antikörper. Die Konverter zeigen daher sehr plastisch, dass nicht jede

HBV-Infektion mit der gleichen Kinetik von Virusantigenen, Antikörpern und nachweisbaren Genomen verläuft.

### 5.3 Diagnostische Bedeutung von HBV-Genotyphen und HBsAg-Mutanten

Für die Sensitivität und die immer bedeutsamer werdende Quantifizierung des HBsAg muss ein Testverfahren auch das HBsAg der verschiedenen bekannten Genotypen korrekt detektieren. Dies erfordert neben einer geringen Variabilität der Testergebnisse bei verschiedenen Genotypen auch einen neuen internationalen Standard, der als Panel den Vergleich aller Genotypen in gut standardisierter und biochemisch exakt charakterisierter Form erlaubt. Diese Erfordernisse sind durch den 1. und 2. WHO-Standard und auch den PEI-Standard nicht erfüllt. Die unzureichende Charakterisierung der Testverfahren wird dadurch deutlich, dass gegenwärtig alle kommerziell erhältlichen HBsAg-Tests anhand des 2. WHO-Standards geeicht und zugelassen werden, welcher lediglich Genotyp A2 und Subtyp *adw2* beinhaltet und durch physikalische und biochemische Behandlung in seinen antigenetischen Eigenschaften nicht mehr dem natürlichen HBsAg entspricht [SCHÜTTLER C. G. ET AL., 2010].

In der vorliegenden Arbeit wurden Verdünnungsreihen von HBV-Genotypen verwendet, deren Ausgangsmaterialien zukünftig als neuer WHO-Standard weltweit zugänglich sein sollen und vom Institut für Medizinische Virologie im Auftrag der WHO und des PEI zusammengestellt und charakterisiert wurden. Die ermittelten Nachweisgrenzen der Testverfahren und der Verwendung dieses neuen Standardpanels und weiterer aufgereinigter HBsAg-Präparationen zeigten deutliche Unterschiede in der Reaktivität (vgl. Tab. 12 und 13, S. 55 und 61). Bei der Mittelung aller einzelner Nachweisgrenzen ergaben sich für den Ax-V2 0,091 PEI-U/ml, für den Ax-präS2 0,035 PEI-U/ml, für den Ar-II 0,0021 ng/ml und für den Ar-präS2 0,009 ng/ml. Hieraus ergibt sich jeweils für das Testverfahren mit der zusätzlichen Anti-präS2-Komponente eine um den Faktor 2,51 (AxSYM®) und 2,19 (Architect®) höhere Empfindlichkeit für den HBsAg-Nachweis.

Vergleiche der einzelnen Nachweisgrenzen zeigen außerdem, dass durch die Hinzunahme des präS2-Antikörpers eine, im Vergleich zu den anderen Genotypen, überdurchschnittliche Verbesserung der Empfindlichkeit bei Genotyp C erzielt werden konnte. Offenbar zeigten die alten Versionen der Tests eine bislang nicht bekannte geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Genotyp C bzw. unterschätzten die HBsAg-Konzentration. Lag die Nachweisgrenze beim Ax-V2 für den Genotyp C noch bei 0,170 PEI-U/ml deutlich über dem Mittelwert (0,091 PEI-U/ml), so konnte durch den Anti-präS2-Antikörper dies um den Faktor 3,4 auf 0,050 PEI-U/ml verbessert werden (Mittelwert 0,035 PEI-U/ml). Dasselbe konnte bei dem

Ar-präS2 erreicht werden. Hier zeigt sich eine Verbesserung der Empfindlichkeit um den Faktor 2,83 auf 0,010 ng/ml. Dies lässt vermuten, dass der verwendete monoklonale Anti-präS2-Antikörper das Nachweisdefizit bezüglich Genotyp C auszugleichen vermag.

Ein unterschiedliches Verhalten der Antikörper konnte auch mittels Western Blot gereinigter HBs-Antigene der Genotypen A, C und D gezeigt werden. Auch wenn prinzipiell die Charakteristika von Antikörpern bei EIA-, Mikropartikel- und Western Blot-Verfahren nicht immer vergleichbar sind, so zeigen sich doch auffällige Unterschiede der verwendeten Antikörper.

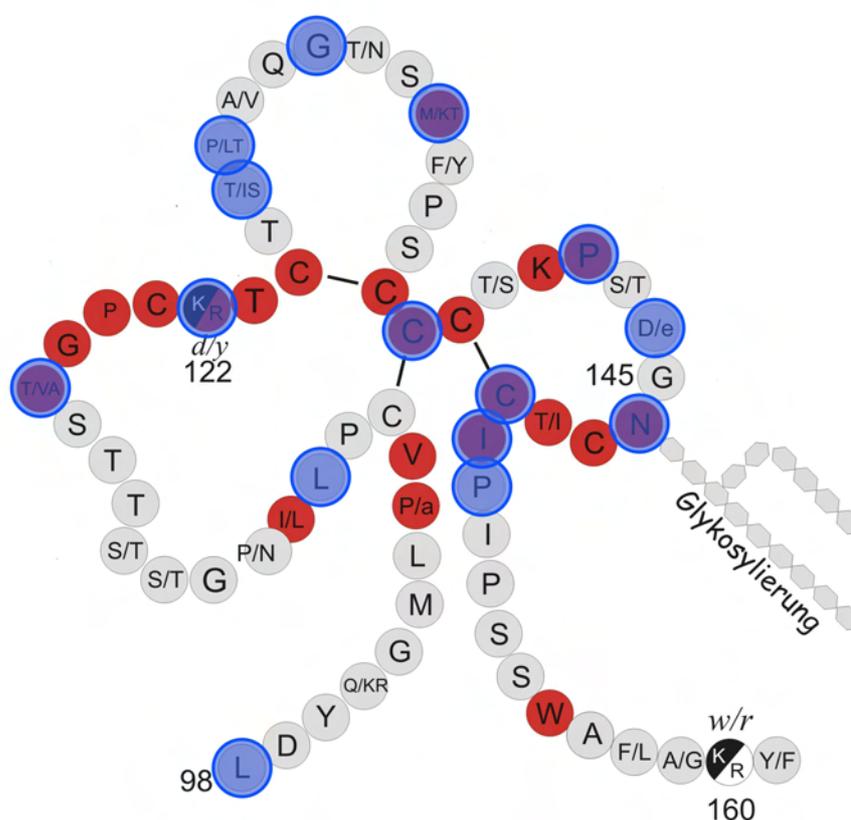
Im Gegensatz zu MA 18/7, welcher im präS1-Bereich das Aminosäuremotiv DPAF in allen drei Genotypen gleich gut erkennt, weisen die präS2-Antikörper sehr deutliche Unterschiede auf (vgl. Abb. 23, S. 65). 2-11B1, welcher in präS2 ein Epitop von Aminosäure 3 bis 11 erkennt, reagiert nur mit Genotyp D sehr gut. Hier gibt es zwischen verschiedenen HBV-Stämmen Polymorphismen, die offensichtlich über die Bindungsfähigkeit entscheiden [GERLICH W. H., MÜNDLICHE MITTEILUNG]. Noch besser bindet bei Genotyp D der Antikörper 116-34, während er bei Genotyp A schwächer und bei Genotyp C fast gar nicht bindet. Die Bande bei Genotyp C bei 37 kD ist mutmaßlich unspezifisch, da bei einer spezifischen Reaktion die 33kD-Bande immer stärker zur Abbildung kommt. Die 16 kD-Bande bei Genotyp D ist mutmaßlich ein Spaltprodukt von MHBs. Die Bindung des Antikörpers Q19/10 an MHBs von Genotyp A und D ist, wie erwartet und bereits in der Literatur beschrieben, gut [DEEPEN R. ET AL., 1990]. Die unerwartet schwache Bindung bei Genotyp C ist vermutlich auf einen geringeren MHBs-Gehalt zurückzuführen. Jedoch ist gerade dieser Antikörper dafür bekannt, dass seine Bindung von Glykosylierungsmustern abhängt, insbesondere dass eine Entfernung der Glykosylierung an Position 4 (Asparagin) zu einem Verlust der Reaktivität bei einem EIA führt [HEERMANN ET AL., 1988].

Die unterschiedlichen Bindungsmuster bei MHBs und SHBs zeigen, dass das Signal bei der zusätzlichen Verwendung von Anti-präS2-Antikörper in diagnostischen Tests nicht nur von der Aminosäuresequenz - und damit von Genotypen oder Mutationen - abhängt, sondern dass auch unterschiedliche Glykosylierungsmuster der Antigene einen erheblichen Einfluss auf die Detektion haben können.

Neben der Verbesserung der analytischen Sensitivität steht in den letzten Jahren besonders die Detektion mutierter HBs-Antigene im Vordergrund der Entwicklung von Testsystemen. Da die überwiegend in der Praxis verwendeten Testverfahren einen oder mehrere monoklonale Antikörper als Capture-Antikörper und polyklonale Antikörper zur Detektion als Konjugat

verwenden [LY T. D. ET AL., 2006], kann besonders eine Veränderung an der Erkennungssequenz für die monoklonalen Capture-Antikörper zu einem vollständigen Detektionsverlust führen.

In die von uns untersuchten HBsAg-positiven Proben wurden solche eingeschlossen, die einen breiten Bereich von natürlich vorkommenden Mutationen abdecken (vgl. Tab. 14 und 15, S. 62, sowie Abb. 25), darunter auch zwei Seren (K587 und K650), deren mutiertes HBsAg bislang in keinem kommerziellen Test detektierbar war, so auch in den von uns untersuchten Testverfahren nicht. Die Ergänzung der Tests mit zusätzlichen Anti-präS2-Antikörpern zeigte bei den verwendeten HBsAg-Mutanten keine Verschlechterung, aber auch keine Verbesserung der Detektion.



**Abbildung 25:** Modell der HBs-Antigenschleife (modifiziert nach Abb. 5): Rot kennzeichnet Aminosäuren, die essentiell für die Infektiosität sind [Salisse J. und Sureau C., 2009], blaue Kreise markieren jene Aminosäuren, die in den untersuchten Patientenproben als Mutation vorlagen.

Die beiden nicht erkannten HBsAg-Mutanten in K587 und K650 besitzen nur eine gemeinsame Mutation sS204R, die sich jedoch außerhalb der präS-Region befindet. Immerhin konnte S. Schaefer zeigen, dass auch Mutationen im Bereich aa 100-200 die Nachweisverfahren beeinflussen können [GERLICH W. H., 2004]. Im Falle des K650 kann auch die Vielzahl der mutierten Positionen dazu führen, dass die Konformation insgesamt so

verändert ist, dass eine Bindung der Antikörper trotz möglicherweise unveränderter Primärsequenz im Bereich der Antikörperbindungsstelle erschwert wird. Als mögliche ursächliche Mutation kann aber auch sK122R im Motiv CKTC (aa 121-124) angesehen werden, welches sich innerhalb des für den konformationellen mAk H166 beschriebenen Epitops befindet [GERLICH W. H., 2004; LY T. D. ET AL., 2006]. In nativer Form reagiert dieser mAk mit dem Epitop CK/RTC. Im Western Blot jedoch, wie in dieser Arbeit bei Genotyp D aufgezeigt, bindet H166 viel besser mit CKTC als mit CRTC (vgl. Abb. 23c, S. 65). Des Weiteren könnte allerdings auch die geringe Virus- und HBsAg-Konzentration der Mutanten für das falsch negative Messergebnis verantwortlich sein. Die oftmals beschriebene Escapemutante an Position 144 wird in der Form sD144G in der Probe K342 detektiert. Im Bereich der häufig durch Immunselektion veränderten Region aa 140-146 sind die Positionen 142, 144 und 146 in den Seren vertreten, wobei die Mutante sD144G in der Probe K342 sicher nachgewiesen werden kann. Durch Verdünnungsreihen ausgewählter Proben mit mutiertem HBsAg konnte ergänzend gezeigt werden, dass diese Mutationen auch keinen Einfluss auf die analytische Sensitivität haben, wovon auszugehen wäre, wenn nur die Affinität an diese Epitope vermindert wäre.

In verschiedenen Arbeiten wurden Bereiche beschrieben, die zu falsch negativen Testergebnissen in verschiedenen Testverfahren führen [LY T. D. ET AL., 2006; MOERMAN B. ET AL., 2004; MÜHLBACHER A. ET AL., 2008; WEBER B., 2006]. Bei diesen Studien wurde teilweise rekombinantes HBsAg aus Hefezellen zur Charakterisierung herangezogen, um auch die äußerst selten natürlich vorkommenden mutierten Positionen wie aa 124 oder 123 mit erheblichem Einfluss auf die Bindung der Capture-Antikörper zu untersuchen. Veränderungen der Aminosäureketten durch Insertionen an Position 122 sowie Substitutionen an 120 - 124 und 144 - 149 schränken die Nachweisfähigkeit des HBsAg erheblich ein und führen zu falsch negativen Ergebnissen. Mühlbacher et al. beschreiben außerdem, dass der AxSYM® HBsAg-V2 Mutanten nicht erkennt, welche eine Mutation im Bereich 122 und 123 haben. Ly et al. beschreiben, dass im AxSYM® HBsAg-V2 der mAk H166 verwendet wird, welcher bei aa 121-124 bindet. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit getesteten Mutanten zeigt sich, dass selbst durch Hinzunahme der monoklonalen Anti-präS2-Komponente als Capture-Antikörper diese Problematik anscheinend nicht vollständig behoben werden konnte.

## 5.4 Schlußbetrachtung und Ausblick

Die Anforderungen bei der Zulassung von HBsAg-Tests nach der Richtlinie 98/79/EG der Europäischen Union (CE-Zertifizierung, *common technical specification for in vitro assays*) sehen vor, dass eine Nachweisgrenze von 0,26 IU/ml HBsAg nicht überschritten werden darf und jeweils lokal häufig vorkommende Varianten und Subtypen nachweisbar sein müssen [RICHTLINIE 98/79/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES VOM 27. OKTOBER 1998 ÜBER IN-VITRO-DIAGNOSTIKA, 1998]. Spezifizierte, problematische Mutationen oder im jeweiligen Land nicht endemische Subtypen müssen für eine Zulassung derzeit nicht überprüft werden. Dies ist angesichts steigender globaler Mobilität und immer häufiger auftretender Mutanten unter Therapie, Immunsuppression oder Impfdurchbrüchen keine befriedigende Regelung.

Es ist insgesamt begrüßenswert, dass die meisten Hersteller von HBsAg-Tests das Problem der Mutanten zwischenzeitlich soweit wahrgenommen haben und für kommerziell bedeutsam genug halten, um dies im Design der Testverfahren zu berücksichtigen, eine Problematik, die schon seit den frühen 1990er Jahren von Virologen untersucht und angemahnt wurde. Diese begrüßenswerten Erfolge und Weiterentwicklungen dürfen aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass auch eine Verbesserung der Sensitivität virologisch notwendig und klinisch geboten ist. Die Sensitivitätssteigerung von HBsAg-Tests im niedrigen Faktorenbereich genügt dabei aber langfristig nicht, um auch problematische Proben und frisch Infizierte ausreichend gut zu erkennen. Um hier eine klinisch spürbare Verbesserung zu erreichen, wären um den Faktor 50 bis 100 empfindlichere Verfahren wünschenswert, was technisch durch moderne branched-konjugierte Antikörper und Fluoreszenzverfahren – die bei anderen Analyten wie dem HCV-Core-Antigen bereits verfügbar sind – realisierbar wäre. Dies würde die bisherige Nachweisgrenze des HBsAg von derzeit etwa 10 bis 30 pg/ml auf weniger als 0,1 pg/ml herabsetzen und die Sicherheit in der HBV-Diagnostik damit ganz entscheidend verbessern. Es ist auch davon auszugehen, dass eine um Größenordnungen bessere Sensitivität auch falsch negative Testergebnisse bei Screeninguntersuchungen aufgrund von HBsAg-Varianten und -Mutanten verhindern könnte, da davon auszugehen ist, dass bei Patienten mit einem quantitativ überwiegend mutierten HBsAg rein statistisch auch kleinste Mengen anderer Mutanten und Wildtyp-HBsAg zirkulieren. Dies legen Abschätzungen der Mutationsrate der viralen RT nahe.

Eine qualitativ hochwertige serologische Diagnostik insbesondere des HBs-Antigens ist nicht ausschließlich von guten Kennzahlen der verwendeten Testverfahren abhängig. Die häufigsten

Fehler ergeben sich aus einer unkritischen, EDV-automatisierten Übernahme von positiv/negativ-Ergebnissen ohne Beurteilung verdächtiger Grenzbereiche oder untypischer serologischer Gesamtkonstellationen im Einzelfall. Ohne eine fachlich erfahrene und kritische Beurteilung der Ergebnisse bleibt die Diagnostik einer HBV-Infektion bezüglich Korrektheit und klinischer Relevanz stets auf dem unzureichenden Niveau rein apparativer Befunde stehen.

## 6 Literaturverzeichnis

**Allain J. P.:** Occult hepatitis B virus infection. *Transfusion Clinique et Biologique* 2004; 11:18-25

**Almeida J. D., Rubenstein D., Stott E. J.:** New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* 1971; 2(7736):1225-7

**Alter H. J., Blumberg B. S.:** Further Studies on a "New" Human Isoprecipitin System (Australia Antigen). *Blood* 1966; 27:297-309

**Arankalle V. A., Gandhe S. S., Borkakoty B. J., Walimbe A. M., Biswas D., Mahanta J.:** A novel HBV recombinant (genotype I) similar to Vietnam/Laos in a primitive tribe in eastern India. *Journal of Viral Hepatitis* 2010; in Druck

**Aschner B.:** Paracelsus Sämtliche Werke in 4 Bänden (1930); *Anger Verlag* 1993; I/942

**Bartholomew M. M., Jansen R. W., Jeffers L. J., Reddy K. R., Johnson L. C., Bunzendahl H., Condreay L. D., Tzakis A. G., Schiff E. R., Brown N. A.:** Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1997; 349:20-2

**Basuni A. A., Carman W. F.:** HBV vaccine-escape variants. *Methods in Molecular Medicine* 2004; 95:115-24

**Belnap D. M., Watts N. R., Conway J. F., Cheng N., Stahl S. J., Wingfield P. T., Steven A. C.:** Diversity of core antigen epitopes of hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100:10884-10889

**Block T. M., Lu X., Mehta A. S., Blumberg B. S., Tennant B., Ebling M., Korba B., Lansky D. M., Jacob G. S., Dwek R. A.:** Treatment of chronic hepatitis B infection in a woodchuck animal model with an inhibitor of protein folding and trafficking. *Nature Medicine* 1998; 4:610-614

**Blumberg B. S., Alter H. J., Visnich S.:** A "New" Antigen in Leukemia Sera. *Journal of the American Medical Association* 1965; 191:541-546

**Bruss V., Lu X., Thomssen R., Gerlich W. H.:** Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO Journal* 1994; 13(10):2273-9

**Burger R., Offergeld R.:** Testing plasma donations for hepatitis B core antigen (anti-HBc) in order to improve safety of cellular blood components and of quarantined fresh frozen plasma. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2005; 48(6):698-9

**Callahan, J. R.:** Hepatitis B and C. *J. R. Callahan (ed.) 2010: Emerging biological threats – a reference guide, Greenwood Publishing Group St. Barbara CA (USA), S. 43, ISBN 978-0-313-37209-4*

**Carman W. F., Zanetti A. R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., Zuckerman A. J., Thomas H. C.:** Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336:325-9

**Chang T. T., Gish R. G., de Man R., Gadano A., Sollano J., Chao Y. C., Lok A. S., Han K. H., Goodman Z., Zhu J., Cross A., DeHertogh D., Wilber R., Colonno R., Apelian D.; BEHoLD AI463022 Study Group:** A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine* 2006; 354(10):1001-10

**Chen M., Sallberg M., Hughes J., Jones J., Guidotti L. G., Chisari F. V., Billaud J. N., Milich D. R.:** Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *Journal of Virology* 2005; 79:3016-3027

**Chien R. N., Yeh C. T., Tsai S. L., Chu C. M., Liaw Y. F.:** Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2003; 38(5):1267-73

**Chu C. J., Lok A. S.:** Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology* 2002; 35:1274-1276

**Conway J. F., Cheng N., Zlotnick A., Stahl S. J., Wingfield P. T., Belnap D. M., Kangiesser U., Noah M., Steven A. C.:** Hepatitis B virus capsid: localization of the putative immunodominant loop (residues 78 to 83) on the capsid surface, and implications for the distinction between c and e-antigens. *Journal of Molecular Biology* 1998; 279:1111-1121

**Cooksley W. G., Piratvisuth T., Lee S. D., Mahachai V., Chao Y. C., Tanwandee T., Chutaputti A., Chang W. Y., Zahm F. E., Pluck N.:** Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Journal of Viral Hepatitis* 2003; 10(4):298-305

**Cornberg M., Protzer U., Dollinger M. M., Petersen J., Wedemeyer H., Berg T., Jilg W., Erhardt A., Wirth S., Schirmacher P., Fleig W. E., Manns M. P.:** Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus (HBV) infection: the German guidelines for the management of HBV infection. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2007; 45(12):1281-328

**Couroucé A. M., Holland P., Muller P. V., Soulier J. P.:** HBs antigen subtypes: proceedings of the International Workshop on HBs antigen subtypes. *Bibliotheca haematologica* 1976; 42:1-158

**Dane D. S., Cameron C. H., Briggs M.:** Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1(7649):695-8

**Deepen R., Heermann K.-H., Uy A., Thomssen R., Gerlich W. H.:** Assay of preS epitopes and preS1 antibody in hepatitis B virus carriers and immune persons. *Medical Microbiology and Immunology* 1990; 179(1):49-60

**Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV):** Empfehlungen der DVV zur Prävention der nosokomialen Übertragung von Hepatitis B-Virus (HBV) und Hepatitis C-Virus (HCV) durch im Gesundheitswesen Tätige (Stand: Januar 2004). R. S. Roß, M. Roggendorf (eds.) 2007: *Übertragungsrisiko von HBV, HCV und HIV durch infiziertes medizinisches Personal, 2te Auflage, Pabst Science Publishers Lengerich*

**Erhardt A., Blondin D., Hauck K., Sagir A., Kohnle T., Heintges T., Häussinger D.:** Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005; 54(7):1009-13

**Ferguson M., Heath A., Lelie N., Nübling M., Nick S., Gerlich W., Decker R., Padilla A.. WHO Working Group on Hepatitis and HIV Diagnostic Kits:** Report of a collaborative study to 1) assess the suitability of a candidate replacement International Standard for HBsAg and a reference panel for HBsAg and 2) to calibrate the candidate standard in IU. 2003; <http://who.int/bloodproducts/cs/en/031987.pdf>

**Fuehner, H.:** Lithotherapie: Historische Studien über die medizinische Verwendung der Edelsteine. H. Fuehner (ed.) 1902, Calvary & Co Verlag Berlin, S. 79

**Funk M. L., Rosenberg D. M., Lok A. S.:** World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *Journal of Viral Hepatitis* 2002; 9:52-61

**Gerelsaikhan T., Tavis J. E., Bruss V.:** Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *Journal of Virology* 1996; 70:4269-4274

**Gerlich W. H.:** Diagnostic problems caused by HBsAg mutants-a consensus report of an expert meeting. *Intervirology* 2004; 47(6):310-3

**Gerlich W. H., Caspari G.:** Hepatitis-B-Virus. B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun, P. Kimmig (eds.) 2009: *Mikrobiologische Diagnostik, 2te Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York, S. 810 ff, ISBN: 978-3-13-743602-7*

**Gerlich W. H., Goldmann U., Müller R., Stibbe W., Wolff W.:** Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase. *Journal of Virology* 1982; 42(3):761-6

**Gerlich W. H., Schüttler C. G.:** Vermeintlich überstandene Hepatitis-B-Virusinfektion - mögliche Probleme. H. Selmaier, M. P. Manns (eds.) 2007: *Virushepatitis als Berufskrankheit, 3te Auflage, Ecomed Verlag Landsberg, S. 126 ff, ISBN: 978-3-609-16198-3*

**Gerlich W. H., Thomssen R.:** Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume. *Developments in Biological Standardization* 1975; 30:78-87

**Gerlich W. H., Uy A., Lambrecht F., Thomssen R. :** Cutoff Levels of Immunoglobulin M Antibody against Viral Core Antigen for Differentiation of Acute, Chronic, and Past Hepatitis B Virus Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 1986, 24(2):288-293

**Gerlich W. H., Wagner F. F., Chudy M., Harritshoj L. H., Lattermann A., Wienzek S., Glebe D., Saniewski M., Schüttler C. G., Wend U. C., Willems W. R., Bauerfeind U., Jork C., Bein G., Platz P., Ullum H., Dickmeiss E.:** HBsAg Non-Reactive HBV Infection in Blood Donors: Transmission and Pathogenicity. *Journal of Medical Virology* 2007, 79(S1):32-36

**Gerlich W. H., Wend, U., Glebe, D.:** Quantitative assay of hepatitis B surface antigen in serum or plasma using Laurel electrophoresis. Lau, J., Hamatake, R. (eds.) 2004: *Hepatitis B Virus protocols book, Humana press, Totowa, N.J., S. 57 ff, ISBN: 978-1-58829-105-9*

**Germaschewski V., Murray K.:** Screening a monoclonal antibody with a fusion-phage display library shows a discontinuity in a linear epitope within PreS1 of hepatitis B virus. *Journal of Medical Virology* 1995; 4 5(3):300-5

**Günther S., Fischer L., Pult I., Sterneck M., Will H.:** Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Advances in Virus Research* 1999; 52:25-137. Review

**Günther S., Sommer G., Von Breunig F., Iwanska A., Kalinina T., Sterneck M., Will H.:** Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from samples from patients with low levels of viremia: frequency and functional consequences of PCR-introduced mutations. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36(2):531-8

**Hansen C. N., Heslop-Harrison J. S.:** Sequences and Phylogenies of Plant Pararetroviruses, Viruses and Transposable Elements. *Advances in Botanical Research* 2004; 41:165-193

**Heermann K. H., Goldmann U., Schwartz W., Seyffarth T., Baumgarten H., Gerlich W. H.:** Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S-sequence. *Journal of Virology* 1984; 52:396-402

**Heermann K. H., Waldeck F., Gerlich W. H.:** Interaction between native human serum and the preS2 domain of hepatitis B virus surface antigen. *A. J. Zuckerman (ed.), 1988: Viral Hepatitis and Liver Disease: Proceedings, Wiley-Liss Verlag, New York, ISBN: 978-0471612704*

**Infektionsschutzgesetz vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045)**, das durch den Artikel 2a des Gesetzes vom 17. Juli 2009 (BGBl. I S. 2091) geändert worden ist.

**Janssen H. L., van Zonneveld M., Senturk H., Zeuzem S., Akarca U. S., Cakaloglu Y., Simon C., So T. M., Gerken G., de Man R. A., Niesters H. G., Zondervan P., Hansen B., Schalm S. W.:** Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005; 365(9454):123-9

**Jonas, T. R.:** Grösse und Populationsverteilung des Hepatitis-C-Virus - Eine nanometrische Anwendung der Gel-Ausschluß-Chromatographie -. *Dissertation des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen 2005, ISBN: 978-3896874559*

**Kann M., Gerlich W. H.:** Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *Journal of Virology* 1994; 68(12):7993-8000

**Kann M., Gerlich W. H.:** Hepatitis B. *L. Collier, A. Balows, M. Sussman (eds.), 1998: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Volume 1: Virology, 9te Auflage, Arnold, Mitglied der Hodder Headline Group, London, S. 745 ff, ISBN: 978-0340663165*

**Kao J.H., Wu N.H., Chen P.J. et al.:** Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *Journal of Hepatology* 2000; 33:998-1002

**Kaplan P.M., Greenman R.L., Gerin J.L., Purcell R.H., Robinson W.S.:** DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *Journal of Virology* 1973; 12(5):995-1005

**Katayama K., Kumagai J., Komiya Y., Mizui M., Yugi H., Kishimoto S., Yamanaka R., Tamatsukuri S., Tomoguri T., Miyakawa Y., Tanaka J., Yoshizawa H.:** Titration of hepatitis C virus in chimpanzees for determining the copy number required for transmission. *Intervirology* 2004; 47(1):57-64

**Khalil O. S., Zurek T. F., Pepe C., Genger K., Huff D. G., Coleman C., Hanna C., Hu R., Mackowiack J., Bennett L.:** Detection apparatus for multiple heterogeneous chemiluminescence immunoassay configurations. *Analytical Biochemistry* 1991; 196(1):61-8

**Knoll A., Hartmann A., Hamoshi H., Weislmaier K., Jilg W.:** Serological pattern 'anti-HBc alone': characterization of 552 individuals and clinical significance. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 12(8):1255-1260

**Kramvis A., Kew M., Francois G.:** Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 2005; 23:2409-423

**Krugman S., Giles J. P., Hammond J.:** Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *Journal of the American Medical Association* 1967; 200:365-373

**Kuhns M. C., Kleinman S. H., McNamara A. L., Rawal B., Glynn S., Busch M. P., REDS Study Group.:** Lack of correlation between HBsAg and HBV DNA levels in blood donors who test positive for HBsAg and anti-HBc: implications for future HBV screening policy. *Transfusion* 2004; 44(9):1332-9

**La'ulu S. L., Roberts W. L.:** The analytic sensitivity and mutant detection capability of six hepatitis B surface antigen assays. *Journal of Clinical Pathology* 2006; 125(5):748-51

**Lai C.-L., Gane E., Hsu C.-W., Liaw Y.-F., Thongsawat S., Wang Y., Chen Y., Heathcote E. J., Rasenack J., Bzowej N., Naoumov N., Chao G., Fielman Constance B., Brown N. A.:** Telbivudine (LdT) vs. lamivudine for chronic hepatitis B: First-year results from the international phase III GLOBE Trial. *Hepatology* 2005; 42:748A (abstract)

**Lai C.-L., Gane E., Hsu C.-W., Thongsawat S., Wang Y., Chen Y., Heathcote E. J., Rasenack J., Bzowej N., Naoumov N., Zeuzem S., Di Bisceglie A., Chao G., Fielman Constance B., Brown N. A. and the Globe Study Group:** Two-year results from the GLOBE trial in patients with hepatitis B: greater clinical and antiviral efficacy for telbivudine (LdT) vs. lamivudine. *Hepatology* 2006; 44(4 suppl 1):222A (abstract)

**Lambert C., Prange R.:** Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:22265-22272

**Laurell C. B.:** Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analytical Biochemistry* 1966; 15(1):45-52

**Lelie P. N., Reesink H. W., Niessen J., Brotman B., Prince A. M.:** Inactivation of 10(15) chimpanzee-infectious doses of hepatitis B virus during preparation of a heat-inactivated hepatitis B vaccine. *Journal of Medical Virology* 1987; 23(3):289-95

**Lürmann A.:** Eine Ikterusepidemie. *Berliner klinische Wochenschrift* 1885; 22:20-23

**Ly T. D., Servant-Delmas A., Bagot S., Gonzalo S., Ferey M. P., Ebel A., Dussaix E., Laperche S., Roque-Afonso A. M.:** Sensitivities of four new commercial hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) assays in detection of HBsAg mutant forms. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44(7):2321-6

**MacCallum F. O.:** Homologous serum jaundice. *Lancet* 1947; 2:691-692

**Magnius L. O., Norder H.:** Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38(1-2):24-34. Review

**Marschall T., Prüfer-Krämer L., Mikolajczyk R., Kretschmar M.:** Erhöhen Migrationen aus hohen und mittleren Endemiegebieten die Hepatitis B-Prävalenz in Deutschland? Epidemiologische Schätzung der HBsAg-Prävalenz bei verschiedenen erwachsenen Bevölkerungsgruppen. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2005; 130:2753-2758

**Matzkies F. K., Bahner U., Weizenegger M., Bartel J., Cullen P., Schäfer R. M.:** Prevalence of hepatitis G in patients on chronic hemodialysis. *Clinics in Laboratory Medicine* 2000; 46:247-50

**Mele A., Tancredi F., Romano L., Giuseppone A., Colucci M., Sangiuolo A., Lecce R., Adamo B., Tosti M. E., Taliani G., Zanetti A. R.:** Effectiveness of hepatitis B vaccination in babies born to hepatitis B surface antigen-positive mothers in Italy. *The Journal of Infectious Diseases* 2001; 184(7):905-8

**Milich D., Liang T. J.:** Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2003; 38:1075-1086

**Mimms L.T., Floreani M., Tyner J., Whitters E., Rosenlof R., Wray L., Goetze A., Sarin V., Eble K.:** Discrimination of hepatitis B virus (HBV) subtypes using monoclonal antibodies to the PreS1 and PreS2 domains of the viral envelope. *Virology* 1990; 176(2):604-19

**Miyakawa Y., Okamoto H., Mayumi M.:** The molecular basis of hepatitis B e antigen (HBeAg)-negative infections. *Journal of Viral Hepatitis* 1997; 4:1-8

**Moerman B., Moons V., Sommer H., Schmitt Y., Stetter M.:** Evaluation of sensitivity for wild type and mutant forms of hepatitis B surface antigen by four commercial HBsAg assays. *Clinical laboratory* 2004; 50(3-4):159-62

**Mühlbacher A., Weber B., Bürgisser P., Eiras A., Cabrera J., Louisirochanakul S., Tiller F. W., Kim H. S., v Helden J., Bossi V., Echevarria J. M.:** Multicenter study of a new fully automated HBsAg screening assay with enhanced sensitivity for the detection of HBV mutants. *Medical Microbiology and Immunology* 2008; 197(1):55-64

**Müller C.:** Therapie der chronischen Hepatitis B: Resistenzmechanismen gegen Hemmer der HBV-Polymerase. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 2009; 7(4),7-10

**Nainan O. V., Khristova M. L., Byun K., Xia G., Taylor P. E., Stevens C. E., Margolis H. S.:** Genetic variation of hepatitis B surface antigen coding region among infants with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Medical Virology* 2002; 68(3):319-27

**NIBSC (2004A):** Second International Standard for HBsAg, subtyp adw2, genotyp A NIBSC code number: 00/588. *National Institute for Biological Standards and Control, Version 1, 24 February 2004, Hertfordshire EN6 3QG, United Kingdom*

**NIBSC (2004B):** WHO International Standard for Hepatitis B Virus DNA for Nucleic acid amplification technology (NAT) assays, NIBSC code number: 97/746. *National Institute for Biological Standards and Control, Version 6, 09 February 2004, Hertfordshire EN6 3QG, United Kingdom*

**Nick S., Schleiblauer H.:** Sensitivities of CE-Marked HIV, HCV, and HBsAg. Assays. *Journal of Medical Virology* 2007; 79:59-64

**Norder H., Couroucé A. M., Coursaget P., Echevarria J. M., Lee S.D., Mushahwar I. K., Robertson B. H., Locarnini S., Magnius L. O.:** Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47(6):289-309

**Offergeld R., Faensen D., Ritter S., Hamouda O.:** Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. *Euro Surveillance* 2005; 10(2):8-11

**Offergeld R., Ritter S., Hamouda O.:** The Risk of Transfusion Transmitted Infections – Current Aspects. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2006; 33(2):130-134

**Olinger C. M., Jutavijittum P., Hübschen J. M., Yousukh A., Samountry B., Thammavong T., Toriyama K., Muller C. P.:** Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerging Infectious Diseases* 2008; 14(11):1777-80

**Perrillo R. P., Lai C.-L., Liaw Y. F., Dienstag J. L., Schiff E. R., Schalm S. W., Heathcote E. J., Brown N. A., Atkins M., Woessner M., Gardner S. D.:** Predictors of HBeAg loss after lamivudine treatment for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002; 36(1):186-94

**Peterson D. L., Paul D. A., Lam J., Tribby I. I., Achord D. T.:** Antigenic structure of hepatitis B surface antigen: identification of the "d" subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies. *Journal of Immunology* 1984; 132(2):920-7

Richtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Oktober 1998 über In-vitro-Diagnostika: Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, L 331/1 vom 7.12.1998.

**Robert Koch-Institut:** Epidemiologisches Bulletin Nr. 20; 18. Mai 2009 / Nr. 20

**Robert Koch-Institut:** Hepatitis B Merkblatt für Ärzte, 2004

**Roth W. K., Weber M., Petersen D., Drosten C., Buhr S., Sireis W., Weichert W., Hedges D., Seifried E.:** NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. *Transfusion* 2002; 42(7):869-75

**Salisse, J., and Sureau, C.:** A function essential to viral entry underlies the hepatitis B virus "a" determinant. *Journal of Virology* 2009; 83(18):9321-8

**Schaefer S.:** Hepatitis B virus – significance of genotypes. *Journal of Viral Hepatitis* 2005; 12:111-124

**Schaefer S., Glebe D., Gerlich W. H.:** Hepatitis B Virus (Hepadnaviridae). *H. W. Doerr, W. H. Gerlich (eds.) 2009: Medizinische Virologie, 2te Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York, S. 345 ff, ISBN: 978-3131139627*

**Scheiblaue H., Soboll H., Nick S.:** Evaluation of 17 CE-marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection. *Journal of Medical Virology* 2006; 78 (S1):66-70

**Schildgen O., Sirma H., Funk A., Olotu C., Wend U. C., Hartmann H., Helm M., Rockstroh J. K., Willems W. R., Will H., Gerlich W. H.:** Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *New England Journal of Medicine* 2006;354(17):1807-12

**Schmitt S., Glebe D., Alving K., Tolle T. K., Linder M., Geyer H., Linder D., Peter-Katalinic J., Gerlich W. H., Geyer R.:** Analysis of the pre-S2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:11945-11957

**Schmitt S., Glebe D., Tolle T. K., Lochnit G., Linder D., Geyer R., Gerlich W. H.:** Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *The Journal of General Virology* 2004; 85:2045-2053

**Schüttler C. G., Wend U. C., Faupel F. M., Lelie P. N., Gerlich W. H.:** Antigenic and physicochemical characterization of the 2nd International Standard for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). *Journal of Clinical Virology* 2010; 47(3):238-242

**Sobotta D., Sominskaya I., Jansons J., Meisel H., Schmitt S., Heermann K. H., Kaluza G., Pumpens P., Gerlich W. H.:** Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype. *The Journal of General Virology* 2000; 81(Pt 2):369-78

**Standring D. N., Ou J. H., Masiarz F. R., Rutter W. J.:** A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85(22):8405-8409

**Steven A. C., Conway J. F., Cheng N., Watts N. R., Belnap D. M., Harris A., Stahl S. J., Wingfield P.T.:** Structure, assembly, and antigenicity of hepatitis B virus capsid proteins. *Advances in Virus Research* 2005; 64:125-164

**Tenney D. J., Rose R. E., Baldick C. J., Pokornowski K. A., Eggers B. J., Fang J., Wichroski M. J., Xu D., Yang J., Wilber R. B., Colonno R. J.:** Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* 2009; 49(5):1503-14

**Thierfelder W., Hellenbrand W., Meisel H., Schreier E., Dortschy R.:** Prevalence of markers for hepatitis A, B and C in the German population. Results of the German National Health Interview and Examination Survey 1998. *European Journal of Epidemiology* 2001; 17(5):429-35

**van Bömmel F., Zollner B., Sarrazin C., Spengler U., Huppe D., Moller B., Feucht H. H., Wiedenmann B., Berg T.:** Tenofovir for patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus (HBV) infection and high HBV DNA level during adefovir therapy. *Hepatology* 2006; 44(2):318-25

**Wasenauer G., Kock J., Schlicht H. J.:** A cysteine and a hydrophobic sequence in the noncleaved portion of the pre-C leader peptide determine the biophysical properties of the secretory core protein (HBe protein) of human hepatitis B virus. *Journal of Virology* 1992; 66(9):5338-46

**Weber B.:** Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. *Journal of Medical Virology* 2006; 78(S1):59-65

**Weber B.:** Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32(2):102-12. Review

**Welinder H., Nielsen J., Bensryd I., Skerfving S.:** IgG antibodies against polyisocyanates in car painters. *Clinical Allergy* 1988; 18(1):85-93

**Westland C., Delaney W. 4th, Yang H., Chen S. S., Marcellin P., Hadziyannis S., Gish R., Fry J., Brosgart C., Gibbs C., Miller M., Xiong S.:** Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology* 2003; 125(1):107-16

**Wiegand J., Hasenclever D., Tillmann H. L.:** Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antiviral Therapy* 2008; 13(2):211-20

**Yang H. I., Lu S. N., Liaw Y. F., You S. L., Sun C. A., Wang L. Y., Hsiao C. K., Chen P. J., Chen D. S., Chen C. J.; Taiwan Community-Based Cancer Screening Project Group:** Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 2002; 347(3):168-74

**Zanetti A. R., Tanzi E., Manzillo G., Maio G., Sbreglia C., Caporaso N., Thomas H., Zuckerman A. J.:** Hepatitis B variant in Europe. *Lancet* 1988; 2(8620):1132-3

**Zlotnick A., Johnson J. M., Wingfield P. W., Stahl S. J., Endres D.:** A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly. *Biochemistry* 1999; 38:14644-14652

## 7 Appendix

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

SI-Einheiten und daraus abgeleitete Einheiten werden nach der üblichen Art abgekürzt. Nukleotide und Aminosäuren wurden gemäß der internationalen Nomenklatur abgekürzt. Aminosäuren wurden im Einbuchstaben-Code wiedergegeben.

aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Anti-HBc	Antikörper gegen das Hepatitis-B-Core-Antigen
Anti-HBe	Antikörper gegen das Hepatitis-B-Virus-E-Antigen
Anti-HBs	Antikörper gegen das Hepatitis-B-surface-Antigen
AP	alkalische Phosphatase
Ar-II	Architect® HBsAg-(II)-Test
Ar-präS2	Architect® HBsAg-(II plus anti-präS2)-Test
Ax-präS2	AxSYM® HBsAg-(V2 plus anti-präS2)-Test
Ax-V2	AxSYM® HBsAg-(V2)-Test
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cccDNA	covalently closed circular DNA
CMIA	Chemilumineszenz-Mikropartikel-Immunassays
CO	Cut-off
d. h.	das heißt
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR1	3' terminal direct repeat
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

---

Enh	Enhancer
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
Fa.	Firma
FKS	Foetales Kälberserum
g	Schwerebeschleunigung
GOT	Glutamat-Oxalat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
GRE	Glucocorticoid-responsibles Element
HBcAg	Hepatitis-B-Core-Antigen
HBeAg	Hepatitis-B-Virus-E-Antigen
HBIG	Anti-HBs-Immunglobulin
HBsAg	Hepatitis-B-surface-Antigen, Hepatitis-B-Oberflächenprotein
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	Hepatitis-B-X-Protein
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus, Delta-Agens
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IgM/-G	Immunglobulin der Klasse M/G
IS	Internationaler Standard
IU	Internationale Einheiten
kA	keine Angaben
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KI	95 %-Konfidenzintervall
LHBs	Large-Hepatitis-B-surface-Antigen
mAk	monoklonaler Antikörper
MEIA	Mikropartikel-Enzymimmunoassays
MHBs	Middle-Hepatitis-B-surface-Antigen
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

---

Myr	Myristinsäurerest
n	Grundgesamtheit
NAT	Nukleinsäureamplifikationstechnik
N-glyc	asparagingekoppeltes Oligosaccharid
NH-Ac	Acetyl-Rest am Aminoende
NKL	Nationales Konsiliarlabor
NRE	negativ-regulatorisches Element
O-glyc	Threonin-gekoppeltes Oligosaccharid
ORF	open reading frame
P	Promotor
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Paul Ehrlich-Institut
PEI-U	Paul Ehrlich internationale Einheiten
pgRNA	prägenomische Ribonukleinsäure
PK	Proteinkinase
PRE	posttranskriptionelles regulatorisches Element
Pr	Primerdomäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Redundanz
RKI	Robert Koch-Institut
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
S	Signal
S.	Seite
SDtoCO	standard deviation to Cut-off
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHBs	Small-Hepatitis-B-surface-Antigen
STIKO	ständige Impfkommision

---

T	Testprüfgröße
Tab.	Tabelle
TNE	Tris-Natriumchlorid-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v. Chr.	vor Christus
vgl.	vergleiche
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## 7.2 Zusammenfassung

Seit der Entdeckung des HBsAg vor mehr als 45 Jahren und seiner Etablierung als Marker für Hepatitis-B-Infektionen kommt dem HBsAg-Screening von Blut- und Organspendern eine immer größere Bedeutung zu. In den letzten Jahren wurde erkannt, dass die verfügbaren HBsAg-Tests versagen können, da sie nur das SHBs-Antigen erkennen. Dieses ist mitunter mutiert und reagiert dann nicht mehr mit den Anti-HBs-Antikörpern der Testsysteme. Durch die Hinzunahme eines monoklonalen Antikörpers gegen ein weiteres Antigen, dem präS<sub>2</sub>-Antigen, auf dem Hepatitis-B-Virus in etablierte HBsAg-Nachweisverfahren (Abbott AxSYM® und Abbott Architect®) sollen falsch negative Ergebnisse aufgrund von Mutationen im S-Gen verhindert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Hinzunahme eines Antikörpers gegen das virale präS<sub>2</sub>-Antigen in die untersuchten Nachweisverfahren zu keinem nennenswerten Verlust der Spezifität kam ( $\geq 99,50\%$ ). Gleichwohl fiel auf, dass der Sicherheitsabstand der Messwerte zum jeweiligen Cut-off ( $S/CO = 1,0$ ) (ermittelt als *standard deviation to Cut-off*) bei hospitalisierten und dialysepflichtigen Patienten, sowie Schwangeren im Vergleich zu Blutspendern deutlich niedriger war.

Die analytische Sensitivität der beiden Nachweisverfahren wurde anhand von zwei unterschiedlichen Genotypen-Panels ermittelt und zeigte eine Verbesserung um die Faktoren 2,51 (Abbott AxSYM®) und 2,19 (Abbott Architect®). Trotz der etwas geringeren Verbesserung der analytischen Sensitivität beim Architect® durch den Anti-präS<sub>2</sub>-Antikörper ist dieser Test mit einer Nachweisgrenze von 0,009 ng/ml drei- bis vierfach empfindlicher als der Abbott AxSYM® mit Anti-präS<sub>2</sub>. Bei beiden Tests ergab die Hinzunahme von Anti-präS<sub>2</sub>-Antikörpern eine besonders deutliche Verbesserung der Empfindlichkeit für HBV-Genotyp C.

Ein Fortschritt in der diagnostischen Sensitivität konnte durch Untersuchung von HBsAg-Serokonverter-Panels nicht gezeigt werden. Auch bestimmte S-Gen-Mutanten wurden nicht besser erkannt. Allerdings wurden die in dieser Studie nicht detektierten HBsAg-Mutanten bislang auch von keinem anderen verfügbaren HBsAg-Nachweisverfahren erkannt.

Das mittels Western Blot nach denaturierender Gelelektrophorese untersuchte Bindungsverhalten des in den Testsystemen zusätzlich verwendeten Anti-präS<sub>2</sub>-Antikörpers 166-34 zeigte deutliche Unterschiede der Bandenmuster bei den einzelnen Genotypen: Bei Genotyp D band der monoklonale Antikörper sehr gut, wohingegen es bei Genotyp A nur zu einer schwachen und bei Genotyp C zu fast gar keiner Bindung kam.

### 7.3 Summary

Since the discovery of HBsAg more than 45 years ago and its establishment as a marker of hepatitis B infections the HBsAg screening of blood and organ donors is of growing importance. In recent years it has been noticed, that the available HBsAg assays may fail inasmuch as they detect only the SHBs antigen. This antigen may be mutated and can no longer be bound by the anti-HBs antibodies used in the assay systems. With the addition of a monoclonal antibody against another hepatitis B virus antigen, the preS2 antigen, to the established detection methods false negative results caused by mutations in the S gene should be overcome.

This study could show that there was no significant loss of specificity through adding an antibody against the viral preS2 antigen to the investigated detection methods ( $\geq 99.50\%$ ). Nevertheless it has been shown that the safety margin of the values to the cut-off ( $S/CO = 1.0$ ) calculated as the standard deviation to cut-off was clearly lower in hospitalized patients, dialysis patients, and pregnant compared to blood donors.

The analytical sensitivity of the two detection methods was evaluated with two different genotype panels and showed an improvement of the factor 2.51 (Abbott AxSYM®) and 2.19 (Abbott Architect®), respectively. Despite the minimal improved analytical sensitivity using anti-preS2 antibodies in the Architect® this test showed a three to fourfold higher sensitivity with a detection limit of 0.009 ng/ml as the AxSYM® with added anti-preS2. The supplementation of anti-preS2 antibodies demonstrated a distinctly improved sensitivity with HBV genotype C in both assays.

In respect of HBs antigen seroconverter panels an improvement in diagnostic sensitivity could not be shown. Likewise certain mutants of the S gene have not been detected superiorly. However, these mutants could not be recognized by any other available HBsAg assay.

The binding characteristics of the anti-preS2 antibody 166-34 added to the assays demonstrated by western blotting after denaturing gel electrophoresis revealed distinct differences in the protein pattern of several genotypes: The monoclonal antibody showed an excellent binding with genotype D, whereas genotype A and C exhibited lower or almost no binding, respectively.

#### **7.4 Erklärung gemäß §11 (6) der Promotionsordnung des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Fabian M. Faupel

## 7.5 Publikation

**Schüttler C. G., Wend U. C., Faupel F. M., Lelie P. N., Gerlich W. H.:** Antigenic and physicochemical characterization of the 2nd International Standard for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). *Journal of Clinical Virology* 2010; 47(3):238-242

## Danksagung

Herrn Professor Dr. phil. nat. Dr. h. c. Wolfram H. Gerlich möchte ich recht herzlich für die Überlassung dieser Doktorarbeit danken. Ebenfalls möchte ich mich bei Ihm für die Unterstützung meiner virologischen Ausbildung ganz herzlich bedanken.

Herrn Dr. med. Christian G. Schüttler möchte ich für die hervorragende Betreuung und die stetige Aufmunterung bei der Durchführung der einzelnen Versuche und dem Verfassen dieser Promotionsarbeit danken. Ohne seine Hilfe wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Ein herzlicher Dank geht außerdem an einigen Mitarbeiterinnen des Institutes für Medizinische Virologie. Bei Frau Julia Schultheis, MTA, und Frau Kyra Naumann, MTA, möchte ich mich für die Unterstützung bei den unzähligen Messungen der Patientenproben bedanken; bei Frau Ulrike Wend, MTA, und bei Frau Karin Schultheiß, MTA, für die Unterstützung bei den Recherchen der Proben des Nationalen Konsiliarlabors für Hepatitis B und D.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meiner Frau, meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Patentante. Sie alle haben mich auf unterschiedlichste Art und Weise in meinem bisherigen Lebensweg unterstützt und es mir ermöglicht, jener Mensch zu werden, der ich heute bin. Sie alle haben mir bei meinen Wünschen und Vorhaben stets vertraut und standen mir bei der Verwirklichung immer zur Seite.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5706-0



9 783835 195706 0