

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 26, 1988, pp. 569–572

© 1988 Walter de Gruyter & Co.
Berlin · New York

Ein neuer immunoluminometrischer Festphasen-Sandwich-Assay zum quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen das Hepatitis B-Oberflächen (HB_s)-Antigen

Von U. Missler und W. G. Wood

Klinische Laboratorien, Klinik für Innere Medizin (Direktor: Prof. P. C. Scriba), Medizinische Universität zu Lübeck

(Eingegangen am 15. Dezember 1987/26. Mai 1988)

Zusammenfassung: Die Entwicklung eines immunoluminometrischen Festphasen-Assays zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern gegen das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen wird beschrieben.

Wir entwickelten einen Immunoassay, der sich Polystyrol-Kugeln von 6.4 mm Durchmesser als Festphase bedient. Zur Beschichtung der Kugeln benutzten wir hochgereinigtes, aus dem Plasma von chronischen HB_s-Antigen-Trägern gewonnenes HB_s-Antigen. Nach Inkubation mit Serum für 1,5 h wurde wiederum HB_s-Antigen, das mit dem Luminogen 7-(4-Aminobutyl-N-ethyl)-naphthalin-1,2-dicarbonsäure-hydrazid-hemisuccinamid (ABEN-H) markiert war, zum Nachweis gebundener Antikörper verwendet. Diese zweite Inkubation dauerte eine Stunde. Notwendige Standard- bzw. Probenverdünnungen stellten wir in Seren her, die als negativ für Anti-HB_s bestimmt worden waren.

Die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei etwa 1,3 U/l, die obere Grenze des Meßbereiches bei 1000 U/l mit einem mittleren Variationskoeffizienten (VK) von 5%. Der Dynamik-Bereich (Impulsverhältnis zwischen negativen Seren und höchstem Standard) liegt bei 182:1 (4200:23 Relative Light Units). Das Verfahren erwies sich als spezifisch für Anti-HB_s; falsch-positive Reaktionen in Anwesenheit anderer Hepatitis-Marker traten in den geprüften Seren nicht auf.

A new immunoluminometric solid phase sandwich assay for antibodies to hepatitis B surface antigen

Summary: A solid phase quantitative immunoluminometric assay for antibodies to hepatitis B surface antigen (Anti-HB_sAg) is described.

This solid phase assay uses polystyrene balls of 6.4 mm diameter, coated with pure hepatitis B surface antigen (HB_sAg) obtained from the plasma of chronic HB_sAg carriers. After incubation with patient serum (90 min), HB_sAg labelled with 7-(4-aminobutyl-N-ethyl)naphthalene 1,2-dicarboxylic acid hydrazide hemisuccinamide (ABEN-H) was used as the signal carrier.

Dilutions of samples and standards were made with sera previously shown to be negative for anti HB_sAg. The lower detection limit was about 1.3 U/l the upper limit for undiluted serum about 1000 U/l. The mean coefficient of variation was 5%.

The dynamic range (expressed as the signal ratio of the highest standard: zero standard) was 182:1 and covered the range 23-4200 relative light units.

The assay was tested for specificity and gave no false-positive reactions in the presence of other hepatitis B antigens and antibodies.

Einführung

Antikörper gegen das Hepatitis B-Oberflächen (Surface)-Antigen (HB_s-Antigen) werden seit Jahren, wie schon 1973 von Ginsberg et al. (1, 2) beschrieben, routinemäßig nachgewiesen. Über die Bedeutung der Antikörper gegen das HB_s-Antigen, insbesondere im Zusammenhang mit der Immunantwort auf die aktive Hepatitis B-Impfung, wurde bereits an anderer Stelle berichtet (3–8).

Unser Ziel war es, den Verlauf der Immunantwort auf die Hepatitis B-Impfung mittels eines immunoluminometrischen Assays (ILMA) zu untersuchen.

Da die Anti-HB_s-Konzentration von nicht nachweisbar bis zu mehreren Hunderttausend Einheiten pro Liter reichen und die zur Zeit zur Verfügung stehenden Methoden zur Bestimmung der Anti-HB_s-Konzentrationen maximal 200 U/l messen, wurde versucht, ein Verfahren mit größerem Meßbereich zu entwickeln.

Material und Methoden

Polystyrol-Kugeln: Firma Spherotech Kugeln, D-6400 Fulda.

Das HB_s-Antigen wurde von uns von der Universität Göttingen und den Behringwerken, AG, Marburg zur Verfügung gestellt (Typ ad, ay).

7-(4-Aminobutyl-N-ethyl)-naphthalin-1,2-dicarbonsäure-hydrazid (ABEN) wurde im Hause synthetisiert¹⁾, Sephadex G-10-Gel stammte von Pharmacia-LKB, Uppsala, Schweden, Anti-HB_s-negative Seren stellten wir aus Fresh-Frozen-Plasma-Konserven aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck durch Recalzifizieren her, nachdem sie sich als nicht reaktiv für Anti-HB_s erwiesen hatten.

Human-Serumalbumin: Firma Sigma, Taufkirchen, D.

Inkubationsplatten von Abbott Diagnostic Products, D-6200 Wiesbaden, die Meßröhrchen (Nr. 55.484 und 55.476) wurden von Sarstedt, Nümbrecht-D, bezogen. Das Waschgerät (Proquantum) stammte ebenfalls von Abbott Diagnostic Products.

Die Katalase (Nr. 106 836) bezogen wir von Boehringer, Mannheim, die benutzten Luminometer (Typ LB 950 und LB 952) lieferte das Laboratorium Prof. Dr. Berthold, D-7547 Wildbad.

Beschichten der Polystyrolkugeln

Herstellung einer 0,05 mol/l Phosphatpufferlösung pH 7,5 (150 ml pro 1000 Kugeln), Zugabe von HB_s-Antigen (HB_s-Ag von der Universität Göttingen Subtypen ad und ay im Verhältnis 5:1, 80 µg pro 1000 Kugeln); möglichst simultanes Einbringen der zuvor abgewogenen Menge unbehandelter Polystyrol-Kugeln (141 g pro 1000 Kugeln); Inkubation im Wasserbad für 24 h bei 37 °C; Nachbeschichten mit 3 g/l Ovalbumin (No. A 5378 Fa. Sigma), Konservierung mit 0,015 mol/l NaN₃, Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank.

Herstellen des Tracers

480 µg HB_s-Ag von der Universität Göttingen Subtypen ad und ay 5:1; Aktivierung des 7-(4-Aminobutyl-N-ethyl)-naphthalin-1,2-dicarbonsäure-hydrazid wie bereits von Wood et al. beschrieben (10) mittels Bernsteinsäureanhydrid, N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid in Dimethylformamid, Konzentration der resultierenden Lösung: 50 mmol/l; Alkalisierung der HB_s-Ag Lösung mittels K₂HPO₄ (0,5 mol/l) auf einen pH von 8,9; Zugabe von 25 µl 7-(4-Aminobutyl-N-ethyl)-naphthalin-1,2-dicarbonsäurehydrazid-Lösung, Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur, anschließend Zentrifugation bei 15000 min⁻¹ für 1 min zur Entfernung entstandenen Niederschlags; chromatographische Trennung des markierten HB_s-Ag von ungebundenem 7-(4-Aminobutyl-N-ethyl)-naphthalin-1,2-dicarbonsäure-hydrazid über eine Sephadex G10 Säule (8 × 300 mm) mit Tris-HCl 0,025 mol/l pH 7,5 und 0,15 mol/l NaN₃ als Elutionspuffer; fraktioniertes Sammeln des Eluates mit einem LKB 2112 Radirac (je 15 Tropfen). Anschließend Verdünnung der Fraktionen eins bis zwanzig 1:1000 in phosphatgepuffertem Natriumchlorid mit 0,025 ml/l Tween 20, Messung von jeweils 20 µl dieser Verdünnung im Luminometer; Poolung der Fraktionen mit der höchsten Impulsrate.

Der so hergestellte Tracer wurde 1:30 in phosphatgepuffertem NaCl-Tween 20 + 60 g/l Human-Serumalbumin verdünnt, zu je 125 µl portioniert und anschließend lyophilisiert. Zur Herstellung der Tracer-Gebrauchslösung wurde das Lyophilisat mit 12,5 ml phosphatgepuffertem NaCl-Tween 20 + 60 g/l Human-Serumalbumin rekonstituiert, entsprechend einer Endverdünnung von 1:3000.

Vorbereitung der Proben

Proben unverdünnt mit 200 µl bzw. in Verdünnungen von 1:10, 1:100 etc. in Anti-HB_s negativem Serum einsetzen.

Plasmen wie folgt recalzifizieren: 9 Teile Plasma + 1 Teil CaCl₂ 0,25 mol/l, zwei Stunden Inkubation im Wasserbad bei 37 °C, Zentrifugation bzw. bei größeren Volumina bei -80 °C tiefrieren, wieder auftauen und das retrahierte Fibringerinnsel entfernen (aus Beschreibung des AUSAB EIA, Abbott).

Gewinnung der Standards

Gewinnung von Plasma mittels Plasmapherese aus dem Blut eines Impflings zwei Jahre nach abgeschlossener Immunisierung mit HB_s-Vax (MSD-Behring), das wie oben beschrieben recalzifiziert, zu 5 ml portioniert tiefgefroren, anschließend lyophilisiert und bei -80 °C gelagert wurde.

Resolubilisierung mit jeweils 5 ml H₂O, Kalibrierung am Anti-HB_s-Standard des Paul-Ehrlich-Instituts (Herstellen nach Vorschrift des Paul Ehrlich-Instituts) durch achtfach-Bestimmung in verschiedenen Verdünnungen, so bestimmte Anti-HB_s-Konzentration des eigenen Standards: 3000 U/l (mehrfach bestätigt in Wiederholungsmessungen).

Erstellen einer Standardreihe mit folgenden Anti-HB_s-Konzentrationen:

- | | |
|-------------|-------------|
| 1: 1,3 U/l | 5: 111 U/l |
| 2: 4,1 U/l | 6: 333 U/l |
| 3: 12,3 U/l | 7: 1000 U/l |
| 4: 37 U/l | |

Verwendete Kontrollen

- 1) Anti-HB_s-Standard der Behringwerke Marburg, 30 U/l, für den Enzygnost®-Anti-HB_s
- 2) Interne Kontrolle aus Anti-HB_s-positivem Frischplasma mit ca. 4,0 U/l

¹⁾ Interessierte können die Synthese unter der Korrespondenzadresse erfragen.

3) Zwei Anti-HB_e-negative Kontrollen aus verschiedenen Pools

4) Interne Kontrolle mit 750 U/l

Auf jeder ersten, dritten etc. Platte wurden Standard und Kontrollen, auf jeder zweiten, vierten etc. Platte drei Kontrollen mitgeführt.

Durchführung des Assays

1. Schritt

Pipettieren der Standards, Kontrollen und Proben (200 µl);
Zugabe von je 1 Kugel pro Vertiefung;
Abdecken mit Folie; Inkubation auf Rotationsinkubator (170 min⁻¹) für 1,5 h bei Raumtemperatur;
Waschen der Kugeln mit 2 × 6 ml H₂O

2. Schritt

Zugabe von 200 µl des HB_e-Ag-Tracers,
1:3000 verdünnt in phosphatgepuffertem NaCl-Tween 20 + 60 g/l Human-Scrumalbumin;
Abdecken mit Folie;
Inkubation für 1 h auf dem Rotationsinkubator bei Raumtemperatur;
Waschen wie im ersten Schritt; Überführen der Kugeln in Meßröhrchen;
Zugabe von 300 µl einer 5 ml/l Katalase-Lösung (stabilisiert mit 0,15 mol/l NaN₃) pro Röhrchen;
Messung im Luminometer mit 12 s Integrationszeit;
anschließend computergestützte Erstellung einer Standardkurve und quantitative Bestimmung der unbekanntenen Proben an der Standardkurve.

Ergebnisse

Spezifität des Verfahrens

Vergleichsmessungen von 300 Seren mit dem Behring Anti-HBs-Enzygnost® (qualitativ) ergaben bis auf vier Seren übereinstimmende Ergebnisse: Diese vier Seren wurden im Enzygnost® zunächst als negativ bestimmt, reagierten im ILMA mit 2–4 U/l positiv. In mehrfachen Nachmessungen maß der Enzygnost® diese Seren teils negativ, teils positiv. Daher sind die Diskrepanzen der Meßergebnisse auf die höhere Empfindlichkeit des ILMA gegenüber dem Enzygnost® zurückzuführen.

Die Anwesenheit von anderen Hepatitis B-Virus-Markern (HBs Ag, Anti HBc, HBc Ag, Anti HBc) beeinflussten die Meßergebnisse ebensowenig wie Hepatitis A-Virus-Serum-Marker.

Empfindlichkeit

Die untere Nachweisgrenze wurde durch die Messung von 20 anti-HB_e negativen Seren, Ermittlung des Mittelwertes der Messungen und anschließende Addition der dreifachen Standardabweichung zum Mittelwert ermittelt. Sie lag bei 1.3 U/l Anti-HB_e (Mittelwert 23 Relative Light Units, Standardabweichung 0.98 Re-

lative Light Units: Cutoff bei 26 Relative Light Units; die Impulsrate des 1.3 U/l-Standards betrug im Mittel von 20 Messungen 35 Relative Light Units).

Intra-assay-Varianz

Die Präzision in der Serie wurde durch Messung der gleichen Probe zwanzigmal hintereinander ermittelt. Sie lag bei VK = 8%.

Inter-assay-Varianz

Die Präzision von Tag zu Tag wurde durch Messung der angegebenen Proben in zwanzig Ansätzen an verschiedenen Tagen ermittelt. Sie lag im Mittel bei VK = 7% (s. Tab. 1).

Die durchschnittliche Doppelwertpräzision (Compound Precision Profile) ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Die Meßsignalstabilität der Standardkurvenpunkte zeigt die Tabelle 3.

Tab. 1. Interassayvarianz des Anti-HB_e-ILMA

Serum	Sollwert (U/l)	Meßwert (U/l)	s (RLU)*	VK (%)
I	4	4	0,32	8,11
II	40	38,9	2,69	6,92
III	750	762	40,0	5,26

* Relative Light Units

Tab. 2. Durchschnittliche Doppelwertpräzision des Anti-HB_e-ILMA

Meßbereich (U/l)	Anzahl der Wertepaare	Mittlerer VK (%)
1,3–10	74	2,73
11–100	112	2,82
101–500	82	2,95
501–1000	46	2,95
1,3–1000	314	2,85

Tab. 3. Meßsignalstabilität der Standardkurvenwerte des Anti-HB_e-ILMA, ermittelt über 20 Ansätze

Standard (U/l)	Mittleres Signal (RLU)*	Standardabweichung (RLU)*	VK (%)
1,3	35	2,25	6,40
4,1	58	2,64	4,57
12,3	127	7,84	6,20
37	311	13,7	4,41
111	869	19,6	2,26
333	2176	93,0	4,27
1000	4190	174	4,14

* Relative Light Units

Das Verhältnis höchster Standard zu Anti-HBs negativen Seren in Relative Light Units (Dynamik) beträgt ca. 180:1.

Richtigkeit des Verfahrens

Die Richtigkeit der Meßergebnisse wurde durch eine Vergleichsmessung mit dem ABAU-Q® (Sorin Biomedica, S. P. A. I-13040 Saluggia) ELISA überprüft, der Anti-HBs-Konzentrationen von 5–160 U/l mißt. Innerhalb dieses Meßbereichs lag der Korrelationskoeffizient bei $0,979 \text{ ILMA} = 1,97 + 1,28 \times \text{EIA}$; $\text{EIA} = 8,33 + 0,602 \times \text{ILMA}$ für $n = 37$.

Diskussion

Der Anti-HBs-ILMA hat sich uns als zuverlässiges und stabiles Meßverfahren erwiesen.

Die Abweichungen von den qualitativen Meßergebnissen des Anti-HBs-Enzygnost® sind offenbar (s. o.) auf die höhere Empfindlichkeit des ILMA und nicht auf unspezifische Reaktionen zurückzuführen.

Ein bis jetzt noch nicht gelöstes Problem stellt der bei sehr hohen Anti-HBs-Titern auftretende High-Dose-Hook-Effekt dar. Einige Seren mit Konzentrationen von 1500 bis 100 000 U/l Anti-HBs ergaben unverdünnt Meßwerte bis herab zu 350 U/l, so daß es sich empfiehlt, unbekannte Proben in zwei Verdünnungsstufen zu messen (z. B. 1:1 und 1:100). Korrelieren die Meßwerte dieser Verdünnungen nicht, so sollten noch höhere Verdünnungsstufen gemessen werden.

Die Vorteile der vorgestellten Methode gegenüber anderen, nicht isotopischen Verfahren zur Erfassung von Anti-HBs liegen vor allem in zwei Punkten:

1) Der ILMA ist in insgesamt ca. zwei bis drei (je nach Probenanzahl) Stunden durchführbar. Der En-

zygnost® und der ABAU-Q® ELISA benötigen dagegen 24–26 Stunden zur Durchführung und sind daher nicht an einem Arbeitstag durchzuführen.

2) Der Meßbereich des ILMA beträgt 1,3–1000 U/l gegenüber Meßbereichen von 2–30 U/l (Enzygnost®) bzw. 5–160 U/l (ABAU-Q®). Diese Differenz ist deshalb praktisch so interessant, weil die Anti-HBs-Konzentrationen der Proben von nicht nachweisbar bis zu mehreren Hunderttausend U/l reichen. Um diese große Spanne zu erfassen, sind je mehr Verdünnungsstufen erforderlich, desto geringer der Meßbereich ist. Mit dem Anti-HBs-ILMA sind Konzentrationen von 1,3–100 000 U/l in zwei Verdünnungsstufen (1:1, 1:1000) erfaßbar. Dies ist auch in Bezug auf die Kosten der Bestimmung interessant.

Die Herstellungskosten je 100 Einzelmessungen betragen ca. 70 DM. In Anbetracht der Kit-Preise für kommerzielle Meßbestecke stellt der ILMA auch diesbezüglich eine interessante Alternative dar.

Danksagungen

Den folgenden Personen bzw. Institutionen danken wir sehr für die Überlassung von HB_s-Antigen: Herrn Prof. Dr. W. Gerlich, Hygiene-Institut der Universität, Kreuzberggring 57, 3400 Göttingen; der Behringwerke AG Marburg sowie Smith-Kline RIT, Belgien.

Herzlich bedanken möchten wir uns auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck, sowie des Instituts für Med. Mikrobiologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, die uns Seren, Kontrollen, Frischplasmakonserven etc. überließen und ohne die die Gewinnung der Standards mittels Plasmapherese nicht möglich gewesen wäre. Nicht unerwähnt lassen möchten wir die Mitarbeiter des Instituts für Biochemie der Medizinischen Universität zu Lübeck, die uns bei den Versuchen, HB_s-Ag selbst zu gewinnen, mit Rat und Tat zur Seite standen.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) Projekt Nr. Wo 351/1-1 durchgeführt.

Literatur

- Ginsberg, A., Conrad, M., Bancroft, W. et al. (1973) *J. Lab. Clin. Med.* 82, 317.
- Lander, J., Alter, H. & Purcell, R. (1971) *J. Immunol.* 106, 1166.
- Hollinger, F. B., Adam, E., Heiberg, D. et al. (1982) In: *Viral Hepatitis 1981 International Symposium* (Szmuness, W., Maynard, J. W. & Alter, H. J., eds) The Franklin Institute Press, Philadelphia, pp. 451–466.
- Purcell, R. H. & Gerin, J. L. (1975) *Amer. J. Med. Sci.* 270, 395–399.
- Segler, K., Strohmeyer, H., Ritter, S., Gerlich, W. H. & Thomsen, R. (1982) *Develop. Biol. Standard.* 54, 179–189 (S. Karger, Basel, 1983).
- Lander, J., Holland, P., Alter, H., Chanock, R. & Purcell, R. (1972) *J. Am. Med. Ass.* 220, 1079–1082.
- Descouedres, C. (1984) *Schweiz. Med. Wochenschr.* 114, 498–505.
- Jilg, W., Schmidt, M., Zchoval, R. & Deinhard, F. (1985) *Dtsch. Med. Wochenschr.* 110, 205–209.
- Wood, W. G. & Gadow, A. (1983) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21, 789–797.
- Wood, W. G., Braun, J. & Hantke, U. (1986) *Meth. Enzymol.* 133, 354–365.

PD. Dr. W. G. Wood
Klinische Laboratorien
Klinik für Innere Medizin
Medizinische Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
D-2400 Lübeck 1