

Wissenschaft und Fortbildung

Nachweis von HBsAg-Immunkomplexen in kommerziellen Immunglobulinen

M. Uppenkamp, G. Höltz und R. v. Lohr

Aus dem Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe (Präsident: Prof. Dr. med. H. D. Brede)

Zusammenfassung:

Es wurden 34 polyvalente Immunglobulinpräparate zur i.m. und i.v. Anwendung verschiedener Hersteller und verschiedener Chargen sowie 9 spezifische Tetanus-Immunglobulinpräparate auf das Vorhandensein von HBsAg-Immunkomplexen untersucht. Möglicherweise vorhandene Immunkomplexe wurden vorher mit der sauren Dissoziationsmethode gespalten. Der anschließende Nachweis von HBsAg erfolgte mit dem von uns modifizierten AUSRIA[®] II-125-Test der Firma Abbot. Von den polyvalenten Immunglobulinen wurden 22 positiv für HBsAg gefunden. Von den spezifischen Immunglobulinen waren 3 positiv.

Schlüsselwörter:

HBsAg – Immunkomplexe – Saure Dissoziation – Kommerzielle Immunglobuline

Summary:

34 polyvalent immunoglobulin preparations for i.m. and i.v. application from various manufacturers and different lots as well as 9 specific tetanus-immunoglobulin were studied in regards to HBsAg immune complexes. The immune complexes were separated by acidic dissociation, and the presence for HBsAg was demonstrated by a modified AUSRIA[®] II 125 test from Abbott. 22 of the polyvalent immunoglobulin preparations were found to be positive for HBsAg where as only 3 of the specific preparations were positive.

Keywords:

HBsAg – Immune Complexes – Acidic Dissociation – Commercial Immunoglobulins

Einleitung

Zirkulierende HBsAg-anti-HBs Immunkomplexe wurden bei verschiedenen Formen der HBV Infektion nachgewiesen (1–3). Es wurde außerdem die Schwere der Erkrankung in Zusammenhang mit der akuten immunologischen Schädigung der Leberzellen durch die Immunkomplexe gebracht (4, 5). Die pathogenetische Rolle der zirkulierenden Immunkomplexe bleibt jedoch bei der entzündlichen Lebererkrankung unklar (6–9). Mit dem steigenden Interesse an Immunkomplexen und ihrer pathogenetischen Rolle wuchs auch die Zahl der Nachweismethoden für die Immunkomplexe (10, 11).

Zu den wichtigsten Antigen-unspezifischen Methoden gehören:

Die Präzipitation mit Polyäthylenglycol (12, 13), der C1q-Bindungstest (14, 15), der Rheumafaktorenbindungstest (16, 17), der Bindungstest mit RAJI-Zellen (18, 19) und neuerdings die Lasernephelometrie (20). Ein spezifischer Nachweis von Immunkomplexen gelingt dann, wenn das im Immunkomplex enthaltene Antigen bekannt ist und das Antigen aus dem Immunkomplex abgespalten und anschließend nachgewiesen wird. Zur Spaltung der HBs-Immunkomplexe wurde

eine modifizierte saure Dissoziation nach Geserick (21, 22) angewendet.

Material und Methoden

Die Wirksamkeit der Methode wurde an in vitro hergestellten Komplexen geprüft. Dazu wurde als HBsAg das nationale Referenzmaterial des Paul-Ehrlich-Instituts und ein hochtitriges Hepatitis B Immunglobulin mit bekanntem Gehalt an internationalen Einheiten verwendet (Inkubation 1 Std. bei 45° C). Die so hergestellten Immunkomplexe wurden mit Glycin-Puffer (0,1 mol Glycin, 0,1 n NaCl + 0,1 n HCl pH-Wert 1,2) auf einen pH-Wert von 2,4 angesäuert, 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 5 min bei +70° C im Wasserbad inkubiert. Zur anschließenden Neutralisation wurde 0,1 n NaOH verwendet. Bei dieser Behandlungsweise wird aus den Komplexen so wenig wie möglich Antigen immunologisch zerstört und so viel wie möglich an Antikörpern. Unter diesen Bedingungen gehen 30% der Bindungsfähigkeit des HBsAg Subtyp ad verloren, für den Subtyp ay kann keine eindeutige Abnahme der Reaktionsfähigkeit beobachtet werden. Der Antikörper wird unter diesen Bedingungen zu 88% zerstört. Die Untersuchungen auf

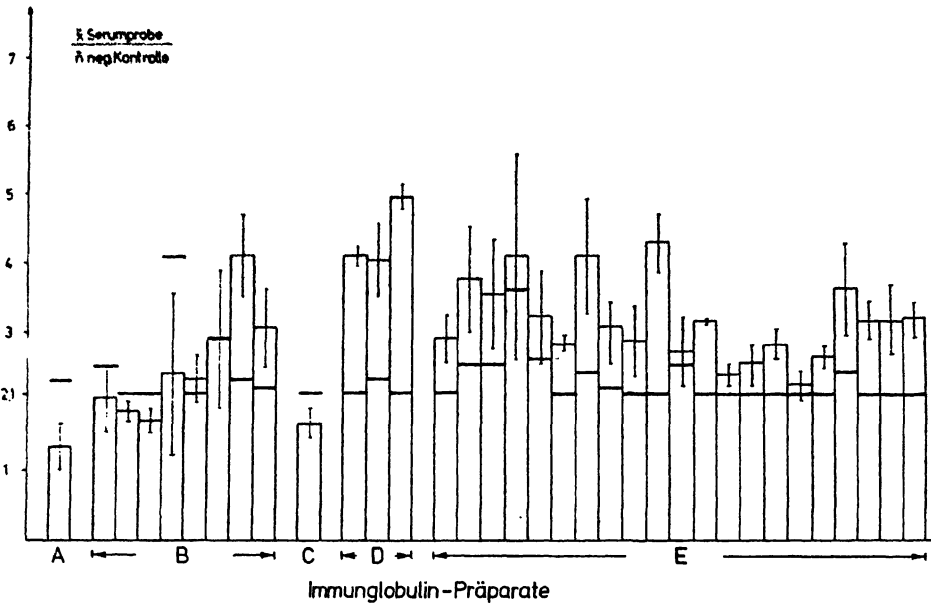


Abb. 1: Saure Dissoziation von 34 polyvalenten Immunglobulinen 5 verschiedener Hersteller (A, B, C, D, E) und Nachweis des freigesetzten HBsAg mit dem AUSRIA® II-125. Alle Präparate, deren Standardabweichung 1 s über dem errechneten Grenzwert G liegen, sind als HBsAg positiv einzustufen

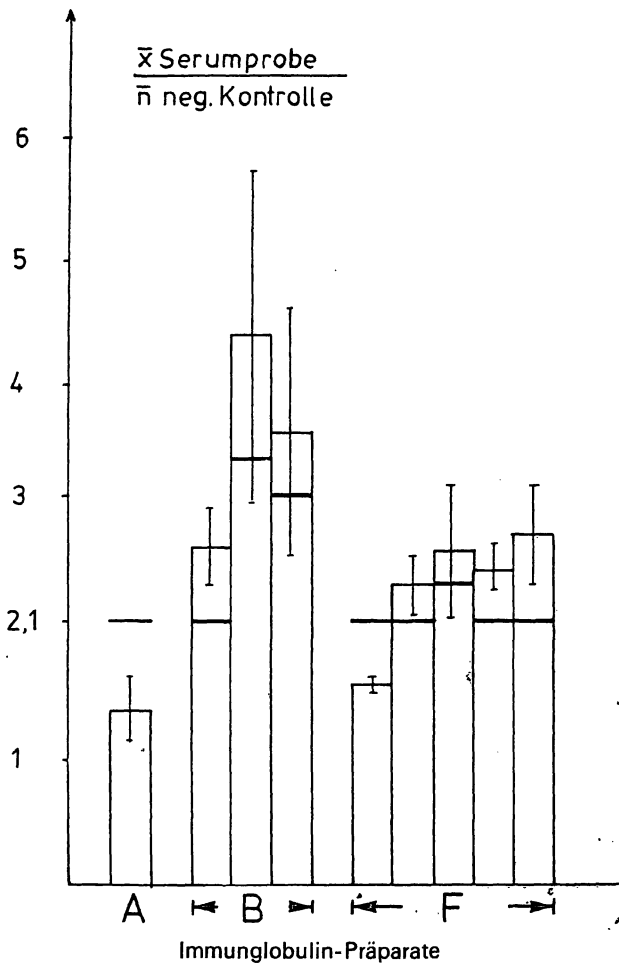


Abb. 2: Saure Dissoziation von 9 spezifischen Immunglobulinen (Tetanus-Immunglobulin) 3 verschiedener Hersteller (A, B, F) mit anschließendem Nachweis des freigesetzten HBsAg mit dem AUSRIA® II-125. Alle Präparate, deren Standardabweichung - 1 s über dem errechneten Grenzwert G - liegen, sind als HBsAg positiv einzustufen

HBsAg wurden mit dem AUSRIA® II-125, die auf anti-HBs mit dem AUSAB® der Firma Abbott gemacht. Die Berechnung des Grenzwertes (cut off) wurde gegenüber der Arbeitsanleitung des Herstellers etwas verändert. So hat es sich als notwendig erwiesen, die negativen Kontrollen des Herstellers ebenso der kombinierten Säure- und Hitzebehandlung zu unterwerfen, da die Impulsraten (Ipm) nach Behandlung etwa doppelt so hoch waren.

Die Berechnung des Grenzwertes nach den Vorschriften des Herstellers erfolgt durch Bestimmung des Mittelwertes der negativen Kontrollen und durch Multiplikation dieses Mittelwertes mit dem Faktor 2,1. Als statistische Grundlage dient dazu die Formel:

$$G = \bar{x} + \frac{7 \cdot VK \cdot \bar{x}}{100}$$

G = Grenzwert

\bar{x} = Mittelwert der Negativkontrolle

VK = Variationskoeffizient

Der Faktor 2,1 entsteht durch Verwendung der 7fachen Standardabweichung und eines maximalen Variationskoeffizienten von 15%. Zum Nachweis von HBsAg aus Immunglobulinen kommerzieller Hersteller wurde als Negativkontrolle die behandelte Negativkontrolle verwendet. Der VK wurde bei der Bestimmung des Grenzwertes für die einzelnen Präparate individuell berücksichtigt. Wurde bei der Bestimmung eines kommerziellen Immunglobulins ein VK von 30% gefunden, so war der Faktor zur Berechnung des cut off 3,1.

Ergebnisse

Es wurden 34 polyvalente Immunglobuline verschiedener Hersteller und verschiedener Chargen untersucht (Abb. 1). Es wurden außerdem 9 Tetanus-Immunglobuline verschiedener Hersteller und verschiedener Chargen untersucht (Abb. 2). Abb. 1 zeigt, daß von 34 polyvalenten Immunglobulinen zur i.m. und i.v. Anwendung bei diesen Versuchsbedingungen 22 positiv für HBsAg sind. 3 von 9 spezifischen Immunglobulinen sind ebenfalls positiv für HBsAg. Alle diese Präparate reagierten ohne Behandlung im normalen Radioimmunoassay nicht positiv für HBsAg. Ein Teil der positiv

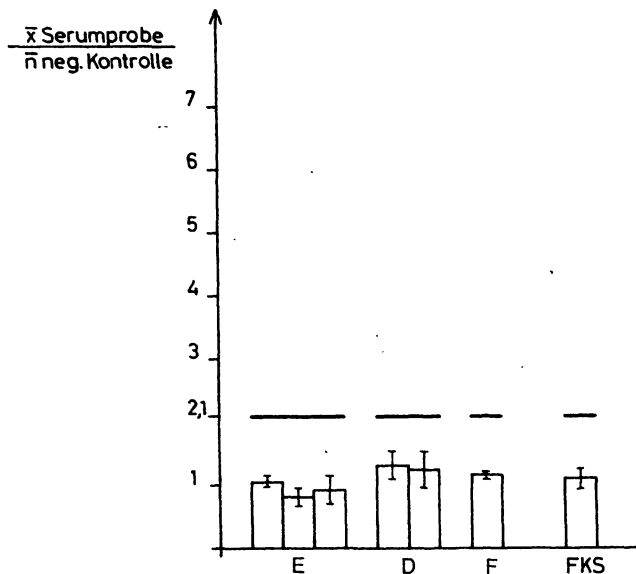


Abb. 3: Bestätigungstest der positiv reagierenden polyvalenten und spezifischen Immunglobuline (E, D, F) verschiedener Hersteller unter Verwendung eines hochtitrigen HBs-Antikörperpräparates. FKS: Fötale Kälberserum. Alle Immunglobulinpräparate liegen unter dem 2,1fachen des Mittelwertes der nativen negativen Kontrollen

reagierenden polyvalenten und spezifischen Immunglobuline wurden einem Bestätigungstest unterzogen. Dabei wurden die Präparate nach der sauren Dissoziation eine Stunde bei +45°C mit einem hochtitrigen HBs-Antikörper inkubiert. Die anschließende Messung in AUSRIA® II-125 ergab keinen Nachweis für HBsAg (Abb. 3). Somit kann angenommen werden, daß der vorherige positive Befund spezifisch war.

Diskussion

Als hepatitissicher werden Immunglobulinlösungen angesehen (23), sofern sie nach der COHN-Fraktionierung gewonnen werden. Dennoch gibt es auch hier Fälle, in denen HBsAg in Immunglobulinpräparaten nachgewiesen wurde (24–26) und sogar HBV-Infektionen nach Gabe von Immunglobulinen auftraten (27, 28).

Für polyvalente Immunglobuline werden Plasmapools von mehr als 1000 Spendern benötigt. Diese enthalten bei einem Durchseuchungsgrad der Bevölkerung an anti-HBs von 8% unterschiedliche Mengen an anti-HBs und möglicherweise auch HBsAg, welches durch die meist im Überschuß vorhandenen HBs-Antikörper neutralisiert wird und somit auch mit sehr empfindlichen Nachweismethoden (RIA) nicht gefunden werden kann (29–30). Bei diesen HBs-Immunkomplexen kann es sich wahrscheinlich nicht um infektiöse Partikel handeln, da HBV-Infektionen nach Gabe von Immunglobulinen sehr selten sind (30, 32).

Durch eine routinemäßige Nachkontrolle von Probanden, die polyvalente Immunglobuline erhalten, müßte geprüft werden, ob Serokonversion im Sinne einer passiv-aktiven Immunisierung zu anti-HBs auftritt, ohne Nachweis von HBsAg und temporärem Ausfall des anti-HBs-Nachweises. Dies wäre dann ein Beweis für eine aktiv-passive Immunisierung (26). In erster Linie kann jedoch angenommen werden, daß die dem Körper zugeführten HBs-Immunkomplexe nicht gespalten und enzymatisch abgebaut werden und nicht in Antigenen

Antikörper dissoziieren (32). Eine möglicherweise auftretende Erkrankung müßte daher eindeutig abgesichert und andere Infektionsmöglichkeiten ausgeschlossen werden.

Schrifttum:

- ALMEIDA, J. D., WATERSON, A. P.: Immune complexes in hepatitis. *The Lancet* II, 983–986 (1969).
- PURCELL, R. H., HOLLAND, P. V., WALSH, J. H., WONG, D. C., MORROW, A. G., CHANOCK, R. M.: A complement fixation test for measuring Australia antigen and antibody. *J. Infect. Diseases* 120, 383–386 (1969).
- MILLMAN, J., LONDON, W. T., SUTNICK, A. J., BLUMBERG, B. S.: Australia antigen-antibody complexes. *Nature* 226, 83–84 (1970).
- BEDARIDA, G., ZACCHI, T., TASSI, G. C.: Preliminary observations on Au-anti-Au immune complex research by a modified electrosynthesis method. *Boll. Ist. Sieroter. Milanese* 50, 74–82 (1971).
- NOWOSLAWSKI, A., KRAWCZYNSKI, K., BRZOSKO, W. J., MADALINSKI, K.: Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Am. J. Path.* 68, 31–48 (1972).
- PRINCE, A. M., TREPO, C.: Role of immune complexes involving SH-antigen in pathogenesis of chronic active hepatitis and polyarteritis nodosa. *The Lancet* I, 1309–1312 (1971).
- TREPO, C. G., ZUCKERMAN, A. J., BIRD, R. C., PRINCE, A. M.: The role of circulating hepatitis B antigen/antibody immune complexes in the pathogenesis of vascular and hepatic manifestations in polyarteritis nodosa. *J. clin. Path.* 27, 863–868 (1974).
- HÜTTEROTH, T. H., ARNOLD, W., HOPF, U., MEYER zum BÜSCHENFELDE, K. H.: Zirkulierende Immunkomplexe bei akuter Virushepatitis, chronisch-aktiver Hepatitis und Periarthritis nodosa. *Z. Gastroenterol.* 16, 395–402 (1978).
- MEYER zum BÜSCHENFELDE, K. H.: Virushepatitiden. *Bundesgesundheitsbl.* 22, Nr. 3, 53–60 (1979).
- ZUBLER, R. H., LAMBERT, P. H.: Detection of immune complexes in human diseases. *Prog. Allergy*, vol. 24, 1–24 (Karger, Basel, 1978).
- SODOMANN, C.-P., PROKEIN, K. G., SCHMIDT, R.: Nachweis zirkulierender Immunkomplexe: Methoden, Fehlerquellen, Bedeutungen. *Lab. med.* 4, 121–127 (1980).
- HARRINGTON, J. C., FENTON, J. W., PERT, J. H.: Polymer-induced precipitation of antigen-antibody complexes: "precipitex" reactions. *Immunochemistry* 8, 413–421 (1971).
- CREIGHTON, W. D., LAMBERT, P. H., MIESCHER, P. A.: Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. *J. Immunol.* 111, 1219–1227 (1973).
- NYDEGGER, E., LAMBERT, P. H., GERBER, H., MIESCHER, P. A.: Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B antigen. *J. clin. Invest.* 54, 297–309 (1974).
- SODOMANN, C.-P., PROKEIN, K., SCHMIDT, H., MARTINI, G. A.: Zirkulierende Immunkomplexe bei Lebererkrankungen. *Z. Gastro.* 16, 501–511 (1978).
- WINCHESTER, R. J., KUNKEL, H. G., AGNELLO, V.: Occurrence of globulin complexes in serum and joint fluid of rheumatoid arthritis patients: Use of monoclonal rheumatoid factors as reagents for their demonstration. *J. exp. Med.* 4, 121–127 (1971).
- GILEAD, E., SULITZANU, D.: A technique for the purification of immune complexes using rheumatoid factor. *J. Immunol. Methods* 30, 11–22 (1979).
- THEOFILOPOULOS, A. N., EISENBERG, R. A., DIXON, F. J.: Isolation of circulating immune complexes using Raji cells. *J. clin. Invest.* 61, 1570–1581 (1978).
- HÜTTEROTH, T. H., MEYER zum BÜSCHENFELDE, K. H.: Detection of circulating immune complexes with a modified Raji cell technique. *Klin. Wschr.* 55, 899–901 (1977).
- HÖFFKEN, K., BESTEK, U., SPERBER, U., SCHMIDT, C. G.: Quantitation of immune complexes by nephelometry. *J. Immunol. Meth.* 29, 237–244 (1979).
- GESERICK, G.: Das Australia-Antigen (Au/SH/HAA). Serologische Untersuchungen zu Nachweismethodik, Vorkommen, Eigenschaften und Bedeutungen des Antigens. Dissertationsschrift, Humboldt-Universität, Berlin 1973.
- GESERICK, G., MARTH, H.: Einfache Reinigung des Australia-Antigens durch saure Dissoziation von Antigen-Antikörper-Komplexen. *Acta biol. med. germ.* 31, 727–731 (1973).
- WORLD HEALTH ORGANISATION: Advances in viral hepatitis. Report of the WHO Committee on Viral Hepatitis. Technical Report Series 602 (1977).
- LEVEQUE, P., DROUET, J., SCHMITTHÄUSLER, R., NORTH, M. L., AMOUCH, P., MALGRAS, J.: HBs-antigen in human plasma fractions. *Vox sang.* 28, 1–8 (1975).
- BERG, R., BJÖRLING, H., BERNTSEN, K., ESPMARK, A.: Recovery of Australia antigen from human plasma products separated by a modified Cohn fractionation. *Vox sang.* 22, 1–13 (1972).
- HOOFNAGLE, J. H., SEEFF, L. B., BALES, Z. B., WRIGHT, E. C., ZIMMERMAN, H. J., and THE VETERANS ADMINISTRATION COOPERATIVE STUDY GROUP, Bethesda, Maryland; and Washington, D. C.: Passive-active immunity from Hepatitis B immune globulin. *Ann. of Intern. Med.* 91, 813–818 (1979).
- PETRILLI, F. L., CROVARI, P., de FLORA, S.: Hepatitis B in subjects treated with a drug containing immunoglobulins. *J. Infect. Diseases* 135, 252–258 (1977).
- TABOR, E., GERETY, R. J.: Transmission of Hepatitis B by immune serum globulin. *The Lancet*, Dec. 15, 1293 (1979).
- ANH-TUAN, N., NOVAK, E., HOLLAN, S.-R.: Hepatitis B surface antigen circulating immune complexes (HBsAg-CICs) in patients with bleeding disorders. *Vox sang.* 40, 12–16 (1981).
- WATT, J. G.: Epidemic hepatitis B caused by commercial human immunoglobulin. *The Lancet*, 30, 1399 (1979).
- FROSNER, G., HAAS, H.: Die serologische Diagnostik der Virushepatitis. *Ärzt. Lab.* 23, 419–424 (1977).
- TABOR, E., ARONSON, D. L., GERETY, R. J.: Removal of Hepatitis B-virus infectivity from factor-IX complex by Hepatitis-B immune globulin. *The Lancet*, July 12, 68–70 (1980).

Anschriften der Verfasser:

Michael Uppenkamp
Universitätsklinik der Gesamthochschule Essen,
Abtl. für Hämatologie, Hufelandstraße 55, D-4300 Essen 1

Dr. Gerhard Höltz
Chemotherapeutisches Forschungsinstitut, Georg-Speyer-Haus,
Paul-Ehrlich-Straße 42–44, D-6000 Frankfurt 70

Dr. Reimer von Lohr
Paul-Ehrlich-Institut, Paul-Ehrlich-Straße 42–44,
D-6000 Frankfurt 70



Hinweise für Autoren zur Abfassung von Manuskripten zum Teil Wissenschaft und Fortbildung der Zeitschrift Laboratoriumsmedizin

Die Zeitschrift LABORATORIUMSMEDIZIN erscheint 11mal jährlich, für die Monate Juli/August als Doppelheft.

Veröffentlicht werden Originalarbeiten, Übersichtsbeiträge und Kurzmitteilungen auf dem Gebiete der Laboratoriumsmedizin (Medizinische Chemie, Bakteriologie-Serologie, Immunologie, Hämatologie, Zytologie, Zytochemie).

Annahmebedingungen für Originalarbeiten

1. Die wissenschaftlichen Ergebnisse dürfen noch nicht veröffentlicht sein, die Autoren müssen das Urheberrecht besitzen.
2. Umfang des Manuskriptes bis 10 Schreibmaschinenseiten inklusive Literatur, Abbildungen und Tabellen.
3. Gliederung in:
 - Zusammenfassung (deutsch und englisch),
 - Schlüsselwörter (deutsch und englisch),
 - Einleitung, Untersuchungsmethoden, Reagenzien und Geräte, Ergebnisse, Diskussion, Literatur.
 Der Ergebnisteil muß auch die Interpretation der Ergebnisse beinhalten. In der Diskussion sollen die Ergebnisse kritisch zu den Arbeiten anderer Arbeitsgruppen gleicher Forschungsrichtung beurteilt werden, ferner soll ein Bezug zur klinischen Anwendung hergestellt werden.
4. Arbeiten, die einen direkten Beitrag zu aktuellen Fragestellungen der Laboratoriumsmedizin liefern, werden bevorzugt angenommen und schneller veröffentlicht.

Annahmebedingungen für Übersichtsreferate

1. Das Thema muß aktuell sein und außer Ärzte für Laboratoriumsmedizin und Naturwissenschaftler im medizinischen Labor mindestens eine weitere Gruppe von Fachärzten oder Allgemeinärzten ansprechen.
2. Umfang des Manuskriptes bis 10 Schreibmaschinenseiten inklusive Literatur, Abbildungen und Tabellen.
3. Die Gestaltung ist frei, zwingend sind jedoch: Zusammenfassung (deutsch und englisch), Schlüsselwörter (deutsch und englisch), Einleitung, Methodenübersicht, Schlußbetrachtung.

Annahmebedingungen für Kurzreferate

1. Vorwiegend methodische oder klinisch-diagnostische Arbeiten, Erfahrungen oder Hinweise zur Praxis oder Fortbildung auf dem Gebiete der Laboratoriumsmedizin werden angenommen.
2. Umfang des Manuskriptes bis 4 Schreibmaschinenseiten.
3. Gestaltung wie Originalarbeiten.
4. Veröffentlichung innerhalb von 2 Monaten nach Annahmedatum.

Gestaltung der Manuskripte

Schrift: Maschinenschrift mit Zweizeilenabstand, 4 cm Rand rechtsseitig, fortlaufend nummerierte Blätter (DIN A4).

1. *Seite:* Titel des Beitrages, abgekürzter Vorname und Nachname der Autoren (bei Frauen ausgeschriebener Vorname), Klinik, Institut.

2. *Seite:* Zusammenfassung, Schlüsselwörter.

Letzte Seite: Schrifttumsverzeichnis und Autorenanschriften.

Die Referenzen werden in fortlaufender Reihenfolge nummeriert, also nicht alphabetisch und nicht chronologisch. Die Literaturstellen werden durch Name, Vorname, Titel der Arbeit, Zeitschriftenname, Band-Nummer, Seite, Erscheinungsjahr in dieser Reihenfolge gekennzeichnet. Die Zeitschriftentitel sollen entsprechend dem Index Medicus abgekürzt werden.

Am Ende des Manuskriptes sollen aufgeführt werden: Ausgeschriebene Vor- und Nachnamen sowie Anschriften aller Autoren, und zwar zuerst der Name jenes Autors, bei dem Sonderdrucke angefordert werden können.

Abbildungen, Tabellen und Diagramme: Die Abbildungen sollen reproduktionsreif sein. Für Originale übernimmt der Verlag keine Haftung. Symbole, Einheiten, Buchstaben und Zahlen müssen in Rundschrift und so groß gezeichnet werden, daß sie auch nach der Verkleinerung gut lesbar sind.

Die Legenden zu den Abbildungen und Tabellen sollen auf einem gesonderten Blatt beigelegt werden. Abbildungen müssen auf der Rückseite die Nummer der Abbildung, den Namen des ersten Autors und die gewünschte Position im Text tragen.

Kosten für eventuell verlangte Farblithos gehen zu Lasten der Autoren.

Schreibweise: maßgebend ist der Duden.

Begutachtung

Der verantwortliche Schriftleiter entscheidet über die Annahme nach Einholung von 2 sachverständigen Gutachten. Die Gutachter bleiben gegenüber den Autoren anonym und urteilen unabhängig. Die Autoren erhalten eine Kopie der Gutachten. Die Liste der Gutachter wird jeweils im Dezemberheft veröffentlicht. Die Autoren erhalten spätestens 2 Monate nach Eingang des Manuskriptes die Entscheidung über Annahme oder Ablehnung sowie einen vorläufigen Termin der Veröffentlichung.

Korrekturen

Dem federführenden Autor werden die Druckfahnen zur Korrektur übersandt. Er hat dafür Sorge zu tragen, daß auch im Falle seiner Abwesenheit die korrigierten Fahnen innerhalb von maximal 2 Wochen dem Verlag zurückgesandt werden. In den Druckfahnen soll nur in Ausnahmefällen und bei eindeutigen Fehlern, deren Korrekturen übersehen wurden, berichtigt werden. Deshalb darf jedes Manuskript erst nach sorgfältiger Prüfung aller Gesichtspunkte zur endgültigen Fassung der Schriftleitung eingereicht werden. Nachträgliche Textänderungen dürfen 2 Prozent des Textes nicht überschreiten.

Einsendung: Original und 2 Kopien an:

Schriftleitung Wissenschaft und Fortbildung
der Zeitschrift LABORATORIUMSMEDIZIN
Prof. Dr. L. Thomas, Krankenhaus Nordwest
Steinbacher Höhl 2-26, D-6000 Frankfurt 90