



# Vergleichbarkeit kommerzieller Anti-HBs- Testverfahren

Dr. med. Daniela Huzly  
Abt. Virologie

Institut für Medizinische Mikrobiologie und  
Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg

# Messung von Anti-HBs

- Bestimmung des Impftiters
- Aussage über Immunschutz
- Bestimmung des Antikörpergehalts in Immunglobulinpräparaten
- Messung des passiven Immunschutzes von Transplantierten unter Hyperimmunglobulin



# Bestimmung des Immunschutzes

- Allgemein anerkannt: mind. 10 IU/ Anti-HBs
- „Gute Impfantwort“: 100 IU/
- „low level“ Antwort: 10-100 IU/  
– 4 Wochen nach 3. oder 4. Impfung



# Impf-Politik in Deutschland



- Messung des Titers 4-8 Wochen nach der 3. Impfung
- $>10\text{IU/l}$ : Impfantwort vorhanden
- $< 100\text{IU/l}$ : 4. Impfung (ggf. 5.+6.)
- $> 100\text{IU/l}$ : Gute Impfantwort, Schutzdauer für ca.10 Jahre angenommen

# Impf-Politik Hepatitis B nach Exposition



- Wenn  $>100$  nach Impfung, innerhalb 5 Jahren keine Maßnahme, nach 5-10 Jahren Booster,  $>10$ J nach Impfung Testung
- $<10$  IU/l: Booster + Immunglobulin
- $>10 < 100$  IU/l: Booster
- $>100$  IU/l: keine Maßnahme

# Vorraussetzung:

- Quantifizierung von Anti-HBs ausreichend genau
  - ⇒ Standardisierung an internationalem Standardpräparat
  - ⇒ Weitestgehend automatisierte Testverfahren

👍 Gute Voraussetzungen – oder?



# Vergleich von 9 verschiedenen Anti-HBs Testsystemen

- 3 EIAs (DiaSorin, Behring, Biorad)
- 6 Automatenteste (Abbott Axsym, Abbott Architect i2000, Siemens Centaur, DiaSorin Liaison, Roche Elecsys, Ortho ECI)



# Untersuchungsmaterial

- 200 Seren von Patienten und Beschäftigten im Krankenhaus (unselektiert)
- Gepooltes Serum für Interassay Variabilität (ca. 100 IU)
- 1st international standard preparation in Verdünnungen von 500 IU bis 7,5 IU (in negativem Serum)
- Mit 100 IU gespiktes hämolytisches und lipämisches Serum



# Wer hat Recht???



- Kein Goldstandard
- Impfanamnese von allen Patienten/  
Beschäftigten
- Anti-HBc-Testung von allen Seren
- Statistischer Trick: Mehrheitsbildung
  - Wenn mind. 6 von 9 Testen negativ/positiv sind, wird Serum als richtig negativ/positiv eingestuft

# Ergebnisse - Spezifität

- **n=31** Sicher negativ: Anti-HBc-neg., sicher keine Impfung
  - 96,8%-100% (jeweils 1 Serum bei 4 Systemen zw. **10,3** und **14,7 IU** gemessen)
- **n=17** wahrscheinlich negativ, keine Impfanamnese, >6 Systeme messen negativ
  - Jeweils einzelne Systeme messen niedrig positive Werte zwischen 0 und 19,1 IU/ml



<b>Serum No.</b>	<b>Mean IU/l</b>	<b>Positive Measurement IU/l</b>	<b>Range in other systems</b>	<b>Patient information</b>
No.5	5.5	LIAISON: 11.2	4x < 5 IU/l 4x > 5 IU/l	History of vaccination, renal transplant patient
No.15	4.8	Axsym: 13.5	6x < 5 IU/l 2x > 5 IU/l	Anti-HBc-positive
No.42	8.0	Architect, Axsym, Roche: 13.4 – 14.3	3x < 5 IU/l 3x > 5 IU/l	History of vaccination, health care professional
No.45	5.0	LIAISON: 11.0	4x < 5 IU/l 4x > 5 IU/l	Anti-HBc-positive
No.61	6.5	LIAISON, Roche: 12.1 – 15.6	4x < 5 IU/l 3x > 5 IU/l	History of vaccination, health care professional
No.81	8.3	LIAISON, Axsym, Roche: 13.5 – 19.1	3x < 5 IU/l 3x > 5 IU/l	History of vaccination, health care professional
No.94	5.9	LIAISON, Axsym: 10.1 – 10.8	4x < 5 IU/l 3x > 5 IU/l	History of vaccination, renal transplant patient
No.101	1.9	Behring: 10.1	8x < 5 IU/l	History of vaccination, health care professional
No.144	7.2	ECL, Bio-Rad, Axsym: 10.3 – 14.7	3x < 5 IU/l 3x > 5 IU/l	History of vaccination, health care professional
No.166	20.5	Centaur: 170 (not dilutable)	8x < 5 IU/l	Anti-HBc-positive
No. 178	4.9	Axsym 11.4	5x < 5 IU/l 3x > 5 IU/l	History of vaccination

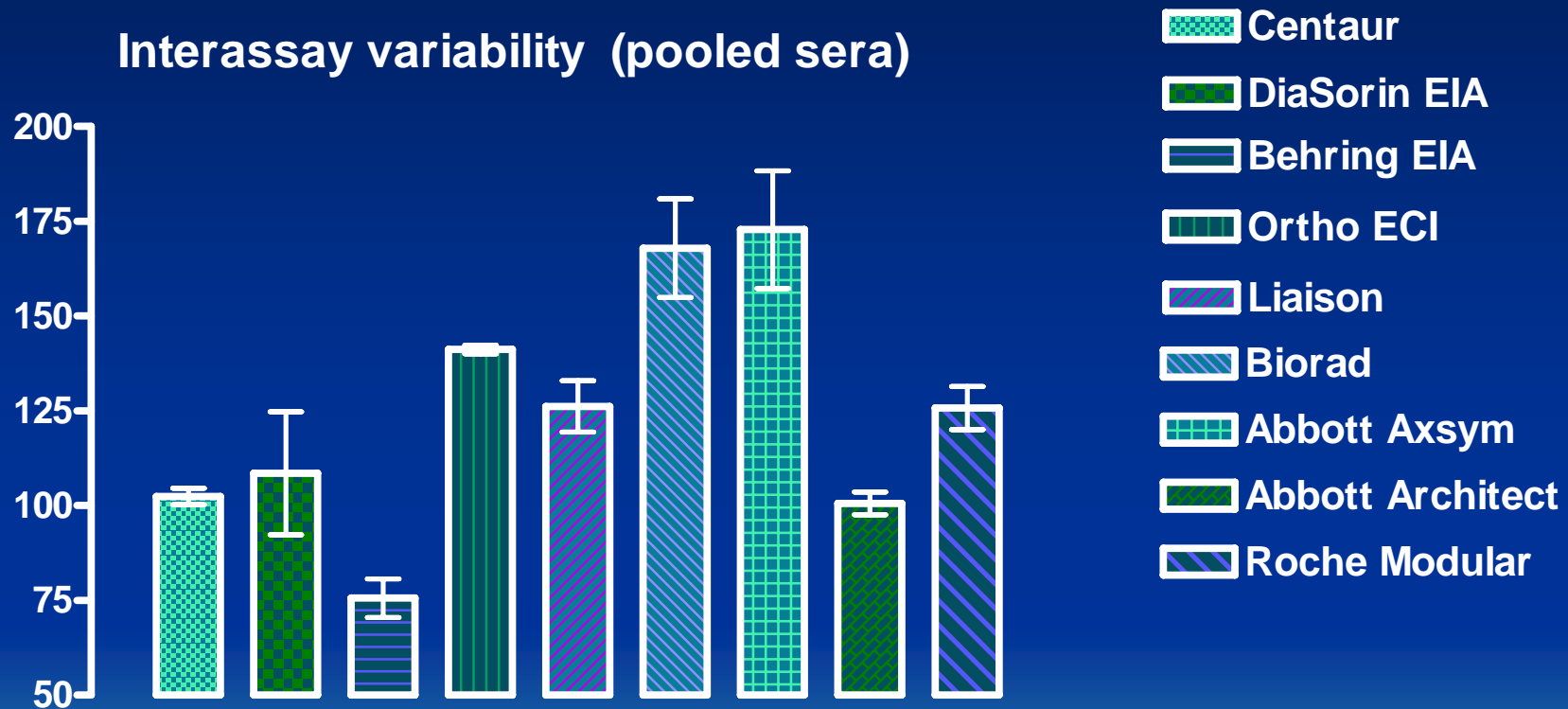
# Ergebnisse – Sensitivität

- Bei 139 Seren wurden von der Mehrheit der Teste Werte über 10 IU/l gemessen
- 5 Assays mit 100% Sensitivität
- 4 Assays finden zwischen 2 und 9 Seren negativ (93,5 – 98,5%)
  - 3 davon sind EIAs



<b>Serum No.</b>	<b>Mean IU/l</b>	<b>Negative Measurement IU/l</b>	<b>Range in other systems</b>	<b>Patient information</b>
No.7	29.3	Bio-Rad: 9.7	11.1 – 53.3	Anti-HBc-positive patient
No.12	11.9	Sorin, Behring, Bio-Rad: 7.8 – 9.0	10.1 – 17.8	History of vaccination, health care professional
No.55	14.5	Bio-Rad	10.1 – 23.0	History of vaccination, health care professional
No.113	29.4	Sorin, ECI, Bio-Rad: 0.0 – 9.1	11.0 – 63.0	History of vaccination, health care professional
No.114	37.5	ECI: 8.6 (test definition: borderline)	24.7 – 63.3	History of vaccination, transplant patient
No.131	26.6	Sorin, Bio-Rad: 4.0	11.5 – 69.7	History of vaccination, health care professional
No.132	20.6	Sorin, Bio-Rad: 9.0	11.5 – 44.4	Anti-HBc-positive patient
No.133	45.7	Sorin: 7.3	13.0 – 84.5	Anti-HBc-positive patient
<b>No.175</b>	<b>46.2</b>	<b>Sorin: 8.0</b>	<b>11.8 – 135.0</b>	<b>History of vaccination, health care professional</b>
No.194	12.7	Sorin, Bio-Rad, Behring: 8.0 – 9.9	13.0 – 17.3	No documentation of vaccination, anti-HBc-negative patient

# Ergebnisse: Quantifizierung Interassay Variabilität



# Ergebnisse: Quantifizierung Variabilität zwischen den unterschiedlichen Systemen

- Einige Seren mit sehr hoher Variabilität
- mittlerer Variationskoeffizient (CV) 47,1% (15,0 - 201)
- Unterschiede zwischen Faktor 2,8 und 105 zwischen einzelnen Messungen



# Ergebnisse - Quantifizierung

- Niedrigste CVs bei Seren mit Werten zwischen 101 und 1000 IU/l ( $p=0.003$ ), jedoch auch hier Seren mit starken Diskrepanzen
- Kein Unterschied in den CVs von anti-HBc pos./neg., Patienten und Beschäftigten
- Anscheinend kein Einfluss durch Antigenherkunft (human/recombinant)
- Lipämie und Hämolyse kein besonderer Einfluss



<b>Serum No.</b>	<b>Range of measured values IU/l(factor of multiplication)</b>	<b>CV between measurements (%)</b>
8	68.3 – 354 (5.2)	60.6
11	150 – 1664 (11.1)	90.6
17	190 – 2230 (11.7)	86.0
57	210 – 5114 (24.4)	63.0
79	33.7 – 170 (5.0)	47.3
81	1.0 – 19.1 (19.0)	92.8
102	17.0 – 189.0 (11.1)	63.2
113	1.0 – 82.4 (82.4)	99.4
114	8.6 – 63.3 (7.4)	47.7
126	65.0 – 331.0 (5.1)	44.3
127	1.0 – 105.0 (105)	97.1
133	7.3 – 84.5 (11.6)	65.5
134	90.0 – 509.0 (5.7)	56.3
148	44.0 – 228.0 (5.2)	57.7
175	7.9 – 135.0 (17)	91.6
183	68.9 – 2280.0 (33.1)	201.0
185	57.1 – 455.8 (8.0)	75.7
200	28.2 – 227 (8.1)	73.4

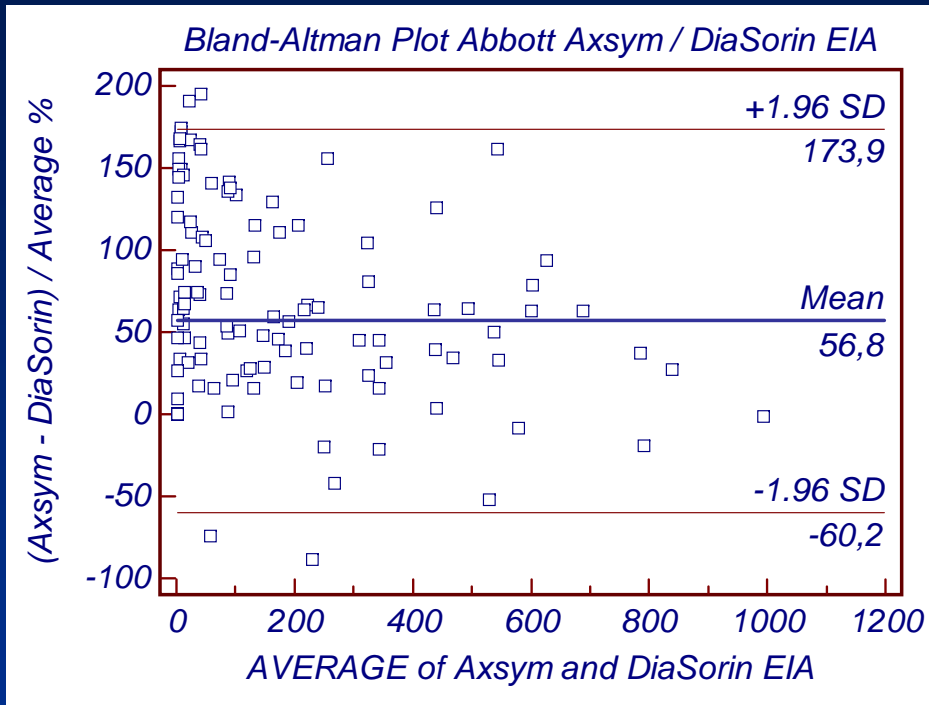
# Ergebnisse - Variabilität

- 43% der Seren wären von unterschiedlichen Systemen unterschiedlich eingruppiert worden (negativ, <100, >100, >1000)
- Bei 27,5% der Geimpften wären unterschiedliche Konsequenzen gezogen worden (Booster, passiv/aktiv)



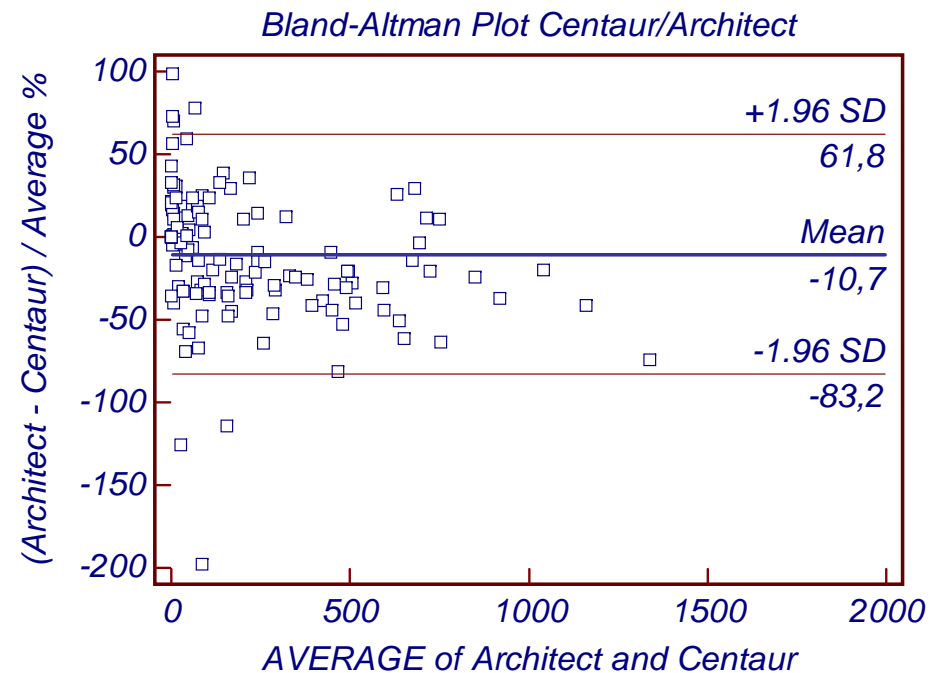
# Testvergleich

## Bland-Altman Analyse



Unterschiedliche Testsysteme: große Unterschiede in den Ergebnissen (Bsp. Axsym/DiaSorin EIA)

Ähnliche Testsysteme: kleinere Unterschiede in den Ergebnissen (Bsp. Centaur/Architect)





## Internationaler Standard – Was ist das?

- Standard-Präparation wurde ursprünglich zur Quantifizierung von Ig-Präparaten hergestellt (1977!)
- Schon bei Herstellung fielen mit den damaligen Testsystemen deutliche Diskrepanzen bei den Messungen auf
- Es handelt sich um ein Immunglobulin-Präparat

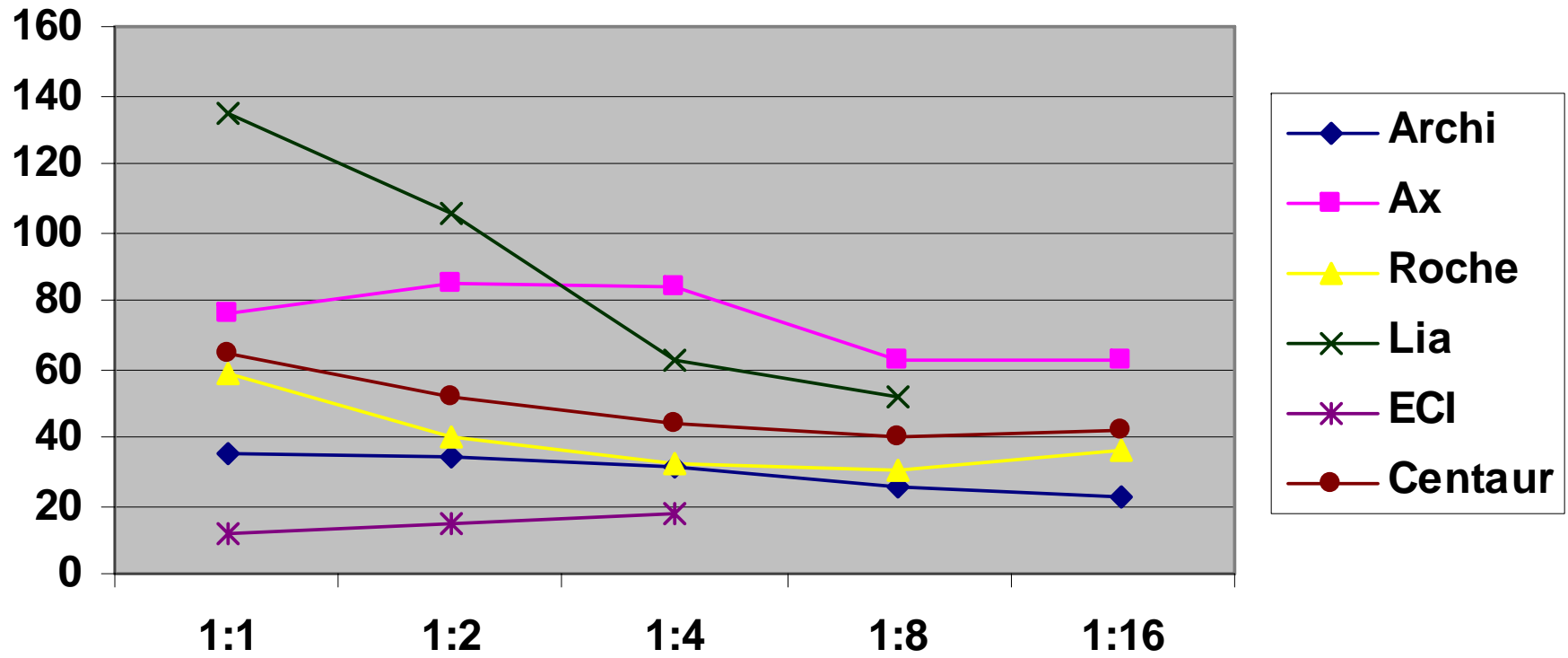


# Ursachenforschung

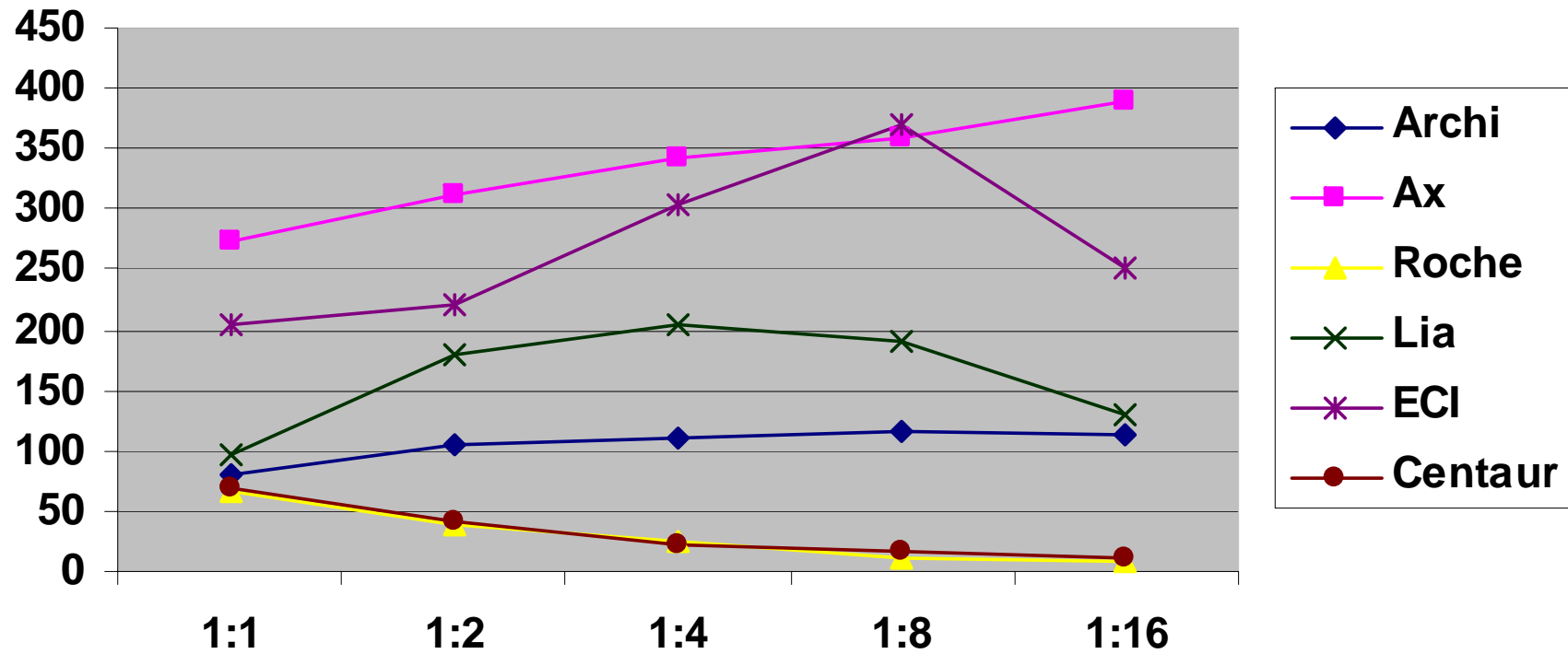
- Matrixeffekte?
- „Hook“-Effekte?
  - ⇒ Verdünnung der auffälligen Seren
  - ⇒ Bei höherer Verdünnung müsste der Unterschied geringer werden



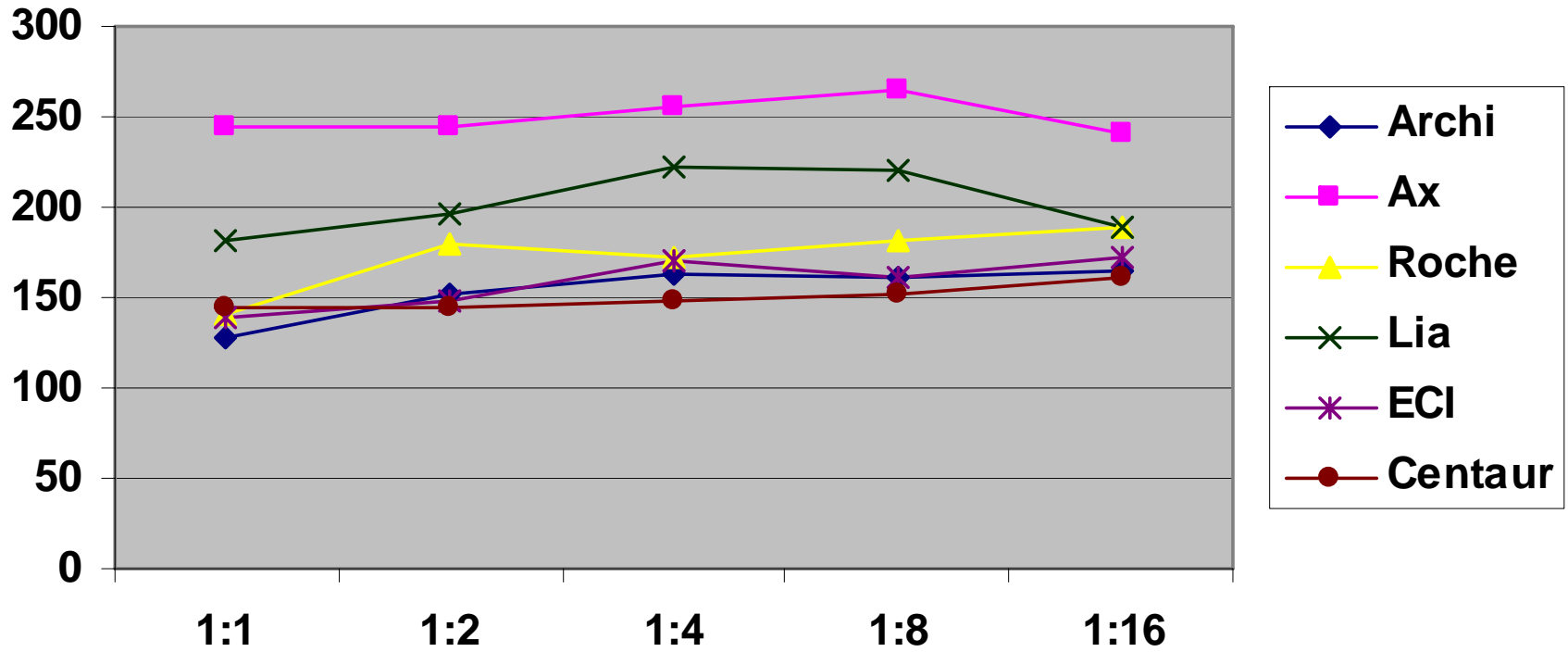
# linearity of dilution: sample 175



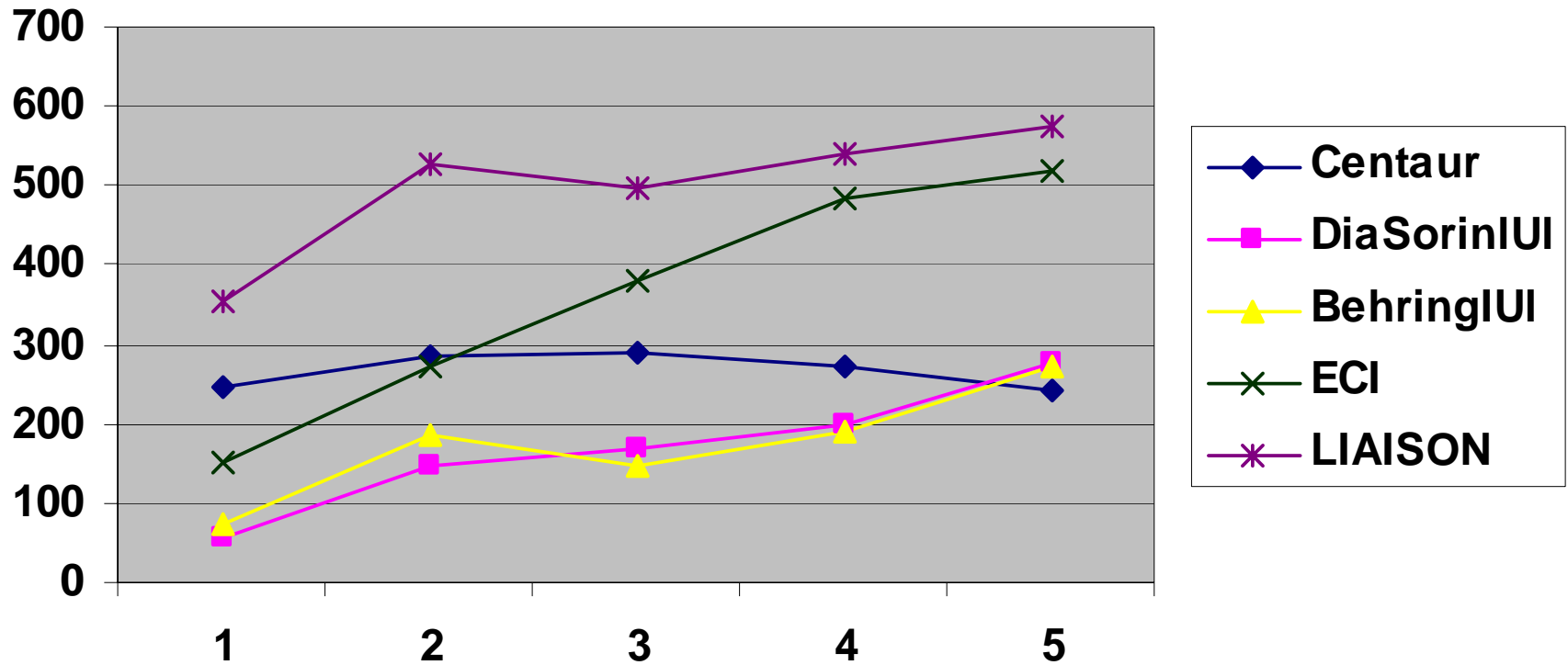
### linearity of dilution: sample 183



# linearity of dilution: sample 160



## linearity of dilution: sample 180



# Erklärungsmodelle

- Unterschiedliche Antigenpräparationen
- Unterschiedliche Testsysteme (Festphase, Marker, Puffer etc.)
- Unterschiede in den Puffersalzen –  
Messung unterschiedlicher Anteile niedrig  
aviden Antikörper
- Fazit: Quantifizierung schwierig.  
⇒ Das qualitative Ergebnis muss stimmen!



# ROC Analyse

Assay system	Calculated cut-off (IU/l)	Sensitivity	Specificity
Architect	13.4	97.1%	100%
Axsym	19.1	93.2%	100%
Behring	9.7	97.3%	100%
Bio-Rad	12.0	94.0%	100%
Centaur	9.9	99.3%	97.9%
DiaSorin EIA	4.5	98.0%	100%
ECI	8.3	98.7%	97.9%
LIAISON	13.5	99.3%	100%
Roche	15.6	98.0%	97.9%

# Schlussfolgerung

- Werte  $< 20$  IU/l sollten vorsichtig interpretiert werden
  - Grauzone zwischen 7 und 20 IU
- Verschiedene Assays können völlig unterschiedliche Werte messen (Vergleiche nur im selben System möglich)
- EIAs messen tendenziell niedriger



Danke...

