

# Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen Epstein-Barr Virus-assoziierte Antigene bei Blutspendern mit einem neuartigen Enzymimmunoassay

Determination of IgG- and IgM-antibodies to Epstein-Barr virus associated antigens in blood donors by a novel enzyme-linked immunosorbent assay

H. J. Wagner<sup>1</sup>, M. Horne<sup>1</sup>, J. Feldner<sup>2</sup> und H. Kirchner<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Medizinische Universität zu Lübeck

<sup>2</sup> Behringwerke AG, Marburg

## Zusammenfassung:

In dieser Studie wurde die Untersuchung von 283 Blutspendern auf Epstein-Barr-Virus (EBV) spezifische IgG- und IgM-Antikörper mit neuartigen Enzymimmunoassays (ELISAs; Enzygnost Anti-EBV/IgG und IgM) der Bestimmung des EBV-Immunstatus von 430 Blutspendern mit der herkömmlichen Indirekten Immunofluoreszenz (IF) gegenübergestellt. Hierbei war das ELISA-System aufgrund einer exakten Standardisierung und objektiven Auswertung der Testergebnisse zur Untersuchung des EBV-Serostatus der IF überlegen. Mit dem ELISA-System wurden unmittelbar quantitativ Anti-EBV-IgG-Titer ermittelt, während mit vergleichbarem Arbeitsaufwand in der IF nur qualitative Aussagen möglich waren. Dabei zeigten sich signifikant höhere Anti-EBV-IgG-Titer bei Frauen im Vergleich zu Männern ( $p < 5\%$ ), was in der Bewertung von Titern im Rahmen der Diagnostik berücksichtigt werden sollte.

## Schlüsselwörter:

Epstein-Barr Virus – Immunstatus – Enzymimmunoassay – indirekte Immunfluoreszenz

## Summary:

In this study the examination of 283 blood donors for Epstein-Barr Virus (EBV) specific IgG- and IgM-antibodies by a novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Enzygnost Anti-EBV/IgG and IgM) was compared with the determination of the EBV-immunostatus of 430 blood donors by standard indirect immunofluorescence (IF). Due to exact standardisation and objective evaluation of test results the ELISAs were superior to IF for the examination of the EBV-serostatus. By means of the ELISA-system, anti-EBV-IgG-titers were directly measured quantitatively, whereas only qualitative statements were possible with the same work effort by using IF. Females had significantly higher anti-EBV-IgG-titers measured by ELISA than males ( $p < 5\%$ ), which should be taken into consideration in interpretation of test results for diagnostic purposes.

## Keywords:

Epstein-Barr virus – immunostatus – enzyme-linked immuno-sorbent assay – indirect immunofluorescence

## Einleitung

Das Epstein-Barr Virus (EBV), ein ubiquitär verbreitetes menschliches Herpesvirus, verursacht die infektiöse Mononukleose (IM) und ist assoziiert mit zahlreichen

Malignomen wie dem Burkitt-Lymphom, dem Nasopharynxkarzinom und B-Zelllymphomen bei Immunsupprimierten. Nach Primärinfektion persistiert das Epstein-Barr Virus im menschlichen Körper und führt zu einer lebenslangen latenten Infektion. Von den EBV-

induzierten Erkrankungen wird die IM am häufigsten in Industrieländern diagnostiziert (1). Einfach erfolgt die Diagnose der IM durch den Nachweis heterophiler Antikörper (Paul-Bunnell Reaktion) in Patientenserum, wobei die Aussagekraft dieses Verfahrens durch falsch-positive und – besonders bei Kindern – durch falsch-negative Ergebnisse eingeschränkt wird. Eine zweite allgemein gebräuchliche Methode stellt die Indirekte Immunfluoreszenz mit auf Objektträgern fixierten EBV-positiven Zelllinien dar. Hierbei beeinflussen jedoch subjektive Einflüsse, beispielsweise bei der Unterscheidung zwischen schwach positiver und negativer Immunfluoreszenz, die Beurteilung der Testergebnisse (2).

Ziel dieser Studie war es, die Vor- und Nachteile eines neuartigen ELISA-Systems (Enzygnost Anti-EBV/IgG und IgM, Behringwerke, Marburg) zur serologischen Reihenuntersuchung von Blutspendern im Vergleich zur herkömmlichen Indirekten Immunfluoreszenz (IF) zu überprüfen. Hierbei wurden besonders die objektive Auswertung der Tests sowie die Praktikabilität der Durchführung berücksichtigt.

## Material und Methoden

283 Seren gesunder Blutspender (195 Männer, 88 Frauen im Alter von 18 bis 65 Jahren) wurden mit Hilfe der Enzygmunoassays (ELISA) Enzygnost Anti-EBV/IgG und Enzygnost Anti-EBV/IgM (Behringwerke AG, Marburg) parallel untersucht. Dabei handelt es sich um indirekte ELISAs des heterogenen Typs. Die Testplatten sind mit EBV-Antigenen beschichtet, die aus TPA-induzierten lymphoblastoiden Zelllinien gewonnen wurden und spezifisch Anti-EBV-Antikörper gegen das virale Kapsidantigen (VCA), die D-Komponente des Early-Antigen-Komplex (EA-D) und gegen Epstein-Barr nukleäre Antigene (EBNA) binden. Kontrollantigene derselben Zelllinie, die an der Expression von EBV-Antigenen gehindert wurden, dienen zur Erkennung unspezifischer Bindung humaner Antikörper. Das Detektionssystem besteht aus Anti-Human-Antikörpern (Kanninchen), die mit Peroxidase (POD) konjugiert sind (3). Die Zugabe der Konjugate, die Waschschritte und die photometrische Auswertung wurde automatisch mit Hilfe des Behring Elisa Prozessors II (BEP II, Behringwerke AG, Marburg) durchgeführt (4). Die Validierung der ELISAtests sowie die Berechnung der Titer erfolgte nach der alpha-Methode unter Einsatz der Behring ELISA System Software (5). Für den statistischen Vergleich der Anti-EBV-IgG-Titer bei Männern und Frauen wurde der Mann-Whitney U-Testes herangezogen.

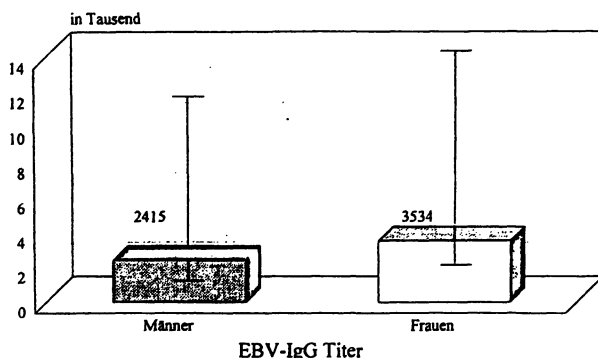
Ferner wurden 430 Seren gesunder Blutspender (320 Männer, 110 Frauen im Alter von 18 bis 65 Jahren) mit herkömmlichen Indirekten Immunfluoreszenztests (IF) auf VCA-IgG (Freka-Fluor EBV-CA IgG IFT, Fresenius, Oberursel) und auf VCA-IgM (Freka-Fluor EBV-CA IgM IFT, Fresenius, Oberursel) qualitativ gemäß den Arbeitsanleitungen des Herstellers untersucht.

Sämtliche Blutspendenserum, die im ELISA Anti-EBV-IgG negativ waren, wurden mit der IF auf VCA-IgG getestet. Ebenso wurden alle Anti-EBV-IgM (ELISA) positiven Proben auf VCA-IgM (IF) getestet.

## Ergebnisse und Diskussion

Von den 283 Blutspendenserum wurden durch den IgG-ELISA 257 als positiv bewertet. 26 im ELISA EBV-IgG negative Seren wurden mit der IF nachgetestet: 10 Seren waren VCA-IgG positiv und 16 VCA-IgG negativ. Damit ergibt sich, vorausgesetzt die im ELISA als sicher positiv bewerteten Seren waren richtig bestimmt, eine Sensitivität des ELISA von 96,3% (257 richtig positiv detektierte Seren von 267) verglichen mit der IF. 94,3% der 283 Blutspender, untersucht mit Hilfe des ELISAs, waren also EBV-seropositiv. Ein vergleichbarer Wert von 96,0% zeigte sich in der IF beim qualitativen Nachweis von VCA-IgG bei 430 Blutspendern (413 seropositive Seren von 430). Beide Ergebnisse entsprechen der nach Literaturangaben erwarteten EBV-Durchseuchung in der Erwachsenenbevölkerung von Industrieländern (6).

Mit beiden Testen, Elisa oder IF, konnten etwa 80 Seren in vier Stunden auf IgM- und IgG-Antikörper mit jeweils einer Verdünnung/Bestimmung pro Serum untersucht werden. Dabei wurden mit dem ELISAsystem unmittelbar quantitativ Anti-EBV-IgG-Titer ermittelt, wohingegen mit dem vergleichbareren Arbeitsaufwand in der IF nur qualitative Aussagen möglich waren. In der Auswertung der Anti-EBV-IgG-Titer (ELISA) zeigte sich ein signifikanter Geschlechtsunterschied: Frauen hatten mit einem Median von 3534 signifikant höhere Titer als Männer mit einem Median von 2415 ( $p < 5\%$ , Abbildung 1), was in der Diagnostik bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte. In der Bestimmung von Anti-EBV-



$p < 5\%$ , Darstellung von Median sowie 10- und 90-Perzentile

Abb. 1: Signifikant höhere Anti-EBV-IgG-Titer, gemessen mittels Elisa, bei Frauen im Vergleich zu Männern ( $p < 5\%$ ).

IgG-Titer können mit dem ELISA kleinere Schwankungen erkannt werden, als es mit der IF durch geometrische Reihenverdünnungen möglich ist. Die Anti-EBV-IgG-Titer (ELISA) und ihr zeitlicher Verlauf müssen jedoch für sich selbst beurteilt werden und können nicht auf VCA-IgG-Titer der IF übertragen werden, da im ELISA IgG-Antikörper gegen VCA, EA-D und EBNA gemessen werden.

Beim Nachweis von IgM-Antikörpern zeigten vier von 283 Seren (1,4%) im ELISA ein positives EBV-IgM, wovon nur zwei in der Nachtestung mit der IF VCA-IgM positiv waren. Ebenso fand sich bei der Untersuchung von 430 Blutspendern mittels IF nur eine VCA-IgM positive

Person (0,2%). Hier zeigte sich eine höhere Sensitivität des ELISAs beim Nachweis von Anti-EBV-IgM-Antikörpern gegenüber der IF, da bekannterweise bei der Bestimmung von VCA-IgM Antikörpern (IF) falsch-negative Ergebnisse auftreten können (7).

Der Einsatz des beschriebenen ELISA-Systems, verbunden mit der Anwendung des BEP II und der Behring Elisa System Software, erlaubte eine exakte Standardisierung der Tests und objektive Bestimmung der Ergebnisse zur Serodiagnose der Epstein-Barr Virusinfektion. Die Auswertung erfolgte hierbei unabhängig von subjektiven Einflüssen im Gegensatz zum Ablesen der Ergebnisse in der Indirekten Immunofluoreszenz. Somit scheint das Elisasystem der Indirekten Immunofluoreszenz zur Bestimmung der EBV-Immunstatus, wie beispielsweise in dieser Studie für die Reihenuntersuchung von Blutspendern, überlegen zu sein.

#### Anschrift für die Verfasser:

H.-J. Wagner  
Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin  
Medizinische Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

#### Literatur:

1. Schuster, V. & Kreth H. W. (1992): Epstein-Barr virus infection and associated diseases in children. I. Pathogenesis, epidemiology and clinical aspects. *Eur. J. Pediatr.* 151, 718-7125.
2. Schuster, V. & Kreth H. W. (1992): Epstein-Barr virus infection and associated diseases in children. II. Diagnostic and therapeutic strategies. *Eur. J. Pediatr.* 151, 794-798.
3. Engelhardt, W. (1993): Bericht zur Titervergleichs-Studie virologischer Enzygnost AP-/POD-Teste. *Lab. med.* 17, 367-370.
4. Steinmann, J.; Milbrandt, H.; Steinkopf, A. et al. (1988): Multi-centre evaluation of the Behring Elisa Processor 2. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 26, 43-56.
5. Giesendorf, B. & Dopatka, H.-D. (1993): Alpha-Methode: Bestimmung von Antikörperaktivitäten in der Mikrobiologie mit dem Enzymimmunoassay. *Lab. med.* 17, 423.
6. de-The, G.; Day, N.E.; Geser, A. et al. (1975): Seroepidemiology of the Epstein-Barr virus: preliminary analysis of an international study - a review. In: *Oncogenesis and Herpesviruses II* (de-The, G., Epstein, M.A., zur Hausen, H., eds) IARC Scientific Publikation No. 11 (2), Lyon, France. pp. 3-15.
7. Schillinger, M.; Kampmann, M.; Henninger, K. et al. (1993): Variability of humoral immune response to acute Epstein-Barr Virus (EBV) infection: Evaluation of the significance of serological markers. *Med. Microbiol. Lett.* 2, 296-303.