

Untersuchung der frühen Immunantwort nach einer Dosis des liposomalen Hepatitis A-Impfstoffes Epaxal®

F. Ambrosch¹, B. Finkel², R. Glück², C. Herzog², Andrea Koren¹, G. Wiedermann¹

Einleitung

Die aktive Immunisierung gegen Hepatitis A ist heute eine wichtige prophylaktische Maßnahme vor Reisen in Gebiete mit dem Risiko einer Hepatitis A-Infektion (1, 2, 16). Im Laufe der letzten Jahre wurden mehrere Impfstoffe entwickelt, die zu den T-Zell-abhängigen Totimpfstoffen gehören und die Formalin-inaktiviertes Hepatitis A-Virus als Impfantigen enthalten. Zur Verstärkung der immunisierenden Wirkung werden zwei verschiedene Adjuvantien verwendet, nämlich Aluminiumhydroxid und sogenannte Liposomen.

Bei den Aluminium-adjuvierten Hepatitis A-Impfstoffen, dazu gehören Havrix® (SmithKline Beecham) (5), Avaxim® (Pasteur Merieux) (18) und Vaquta® (Merck Sharp & Dohme) (20) werden die Viruspartikel an einem aus Aluminiumhydroxid oder Aluminiumphosphat bestehenden Gel adsorbiert. Sie werden deshalb auch als Adsorbatimpfstoffe bezeichnet. Diese mineralischen Verbindungen bewirken eine leichte Gewebsirritation und fördern dadurch die Einwanderung (Migration) von Makrophagen und T-Lymphozyten und schützen die Virusantigene vor einem zu raschen Abbau (Tab. 1) (7). Allerdings ist nicht bekannt, ob und wie diese Verbindungen eliminiert werden.

Liposomen bestehen aus natürlichen Phospholipiden wie Lecithin und Kephalin und bilden unilamelläre Vesikel mit einem Durchmesser von ungefähr 150 nm. An ihre Oberfläche können sich Proteine und auch Viruspartikel binden. Aufgrund ihrer biologischen Zusammensetzung werden Liposomen leicht metabolisiert (Tab. 2).

Der vom Schweizer Serum- & Impfinstitut (Berna) entwickelte liposomale Hepatitis A-Impfstoff EPAXAL® besteht aus sogenannten IRIV's (Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virusomes), an denen außer inaktiviertem Hepatitis A-Virus auch Influenza-Haemagglutinin gebunden ist (13). Dadurch kommt es zur raschen Bindung der IRIV's an Makrophagen und T-Lymphozyten mit anschließender Phagozytose und Stimulierung von B-Lymphozyten. Außerdem ist auch ein deutlicher Depoteffekt vorhanden (7).

Tabelle 1:
Aluminium-Hydroxid als Adjuvans.

Wirkungsweise:	Gewebirritation Migration von Makrophagen und T-Lymphozyten (Th 2) Stimulierung der B-Lymphozyten
	Depotwirkung
Elimination:	ungeklärt

Tabelle 2:
Liposomen/Virosomen als Adjuvans.

Wirkungsweise:	Bindung an Makrophagen und T-Lymphozyten (Th 2) Phagozytose und Fusion mit der endosomalen Membran Stimulierung der B-Lymphozyten Depotwirkung
Elimination:	Metabolisierung

Tabelle 3:
Prinzip des Virus-Neutralisations-Tests.

<ul style="list-style-type: none"> - Anfertigung einer Serum-Verdünnungs-Reihe - Zusatz einer HAV-Suspension - Inkubation - Inokulation der Zellkultur (MHC 5) - Inkubation - Destruktion der Zellen - Nachweis der replizierten HAV-Partikel mittels Immunoassay
--

Tabelle 4:
EPAXAL®-Studie KV-9605 – Studienplan.

Tag	0	2	4	6	8	10	12	14	21	28
Impfung	x									
Blutabnahme	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ELISA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Neutr.-Test	x			x	x	x	x	x	x	x

Mit diesem Impfstoff konnte die Anzahl der für das immunologische Priming notwendigen Impfstoffdosen von zwei im Abstand von vier Wochen verabreichten Dosen auf eine Dosis reduziert und damit auch die Anzahl der für einen langjährigen Schutz erforderlichen Injektionen von drei (0, 1, 12 Monate) auf zwei (0, 12 Monate) verringert werden (3, 4, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 19). Diese Vereinfachung des Impfschemas ist aber auch bei Adsorbatimpfstoffen möglich, und zwar durch die Verwendung entsprechend hoher Antigendosen (6, 17).

Die Anwendung eines Ein-Dosis-Priming-Schemas wirkt aber, vor allem in der Reisemedizin, eine wichtige Frage auf: am wievielten Tag beginnt der Schutz vor einer klinisch manifesten Hepatitis A-Virus-Infektion, bzw. wann ist der Schutz vergleichbar mit dem nach der 2. Impfdosis bei Anwendung des Standard-Impfschemas?

Die Beantwortung dieser Frage kann nur durch sorgfältige immunologische Studien erreicht werden, in denen vor allem die Frühphase der Immunisierung untersucht wird und bei denen die gebildeten Antikörper nicht nur mit Hilfe des üblichen ELISA-Tests, sondern auch durch einen die Protektivität der Antikörper direkt messenden Virus-Neutralisationstest (NT) beurteilt werden.

Material und Methoden

Diese immunologische Studie wurde im Rahmen einer Lot-konsistenz-Studie mit dem liposomalen Hepatitis A-Impfstoff EPAXAL® des Schweizer Serum- & Impfinstituts als sogenannte „Nested Study“ an 30 Probanden durchgeführt. Die Studie war von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Wien approbiert worden.

Die Teilnehmer, vorwiegend Medizinstudenten zwischen 20 und 30 Jahren waren ausführlich über den Zweck und die Durchführung der Studie informiert worden und hatten ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie schriftlich erklärt. Sie waren körperlich gesund und hatten keine Antikörper gegen das Hepatitis A-Virus.

Der verwendete handelsübliche Impfstoff (EPAXAL® Berna) enthält in einem Volumen von 0.5 ml mindestens 500 RIA-Einheiten Formalin-inaktiviertes Hepatitis A-Virus-Antigen, 10 mcg Influenzavirushämagglutinin [Stamm A(H1N1) Singapore 6/86] sowie 350 mcg Phospholipide.

Entsprechend dem Studienplan (Tab. 3) wurde beginnend mit dem Tag der Impfung alle zwei Tage eine Blutabnahme zur Bestimmung der gebildeten Antikörper durchgeführt, weiters an den Tagen 21 und 28. Die gewonnenen Sera wurden sowohl mit Hilfe des ELISA-Tests (Enzymun Böhringer Mannheim) als auch eines von Hersteller entwickelten Virusneutralisations-Tests (Tab. 4) untersucht (4).

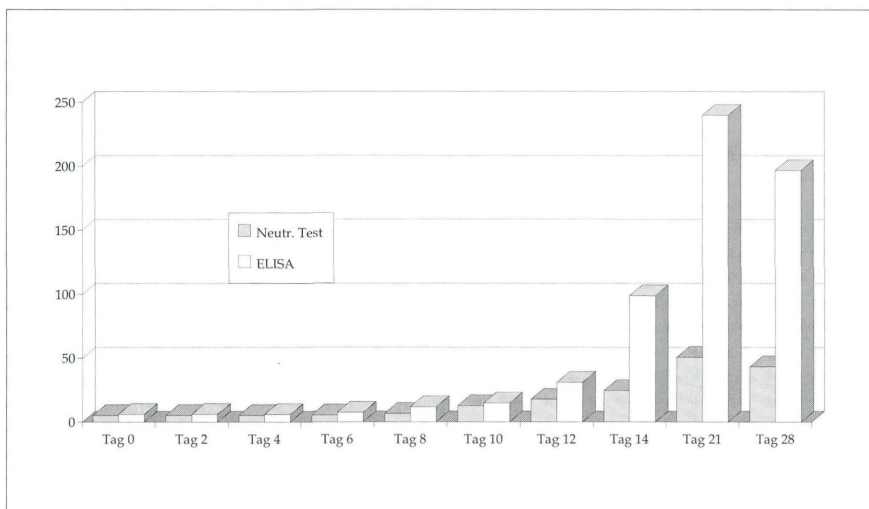


Abbildung 1:
Immunantwort nach einer Einzeldosis von EPAXAL®.
Vergleich zwischen ELISA und Neutralisationstest.

Tabelle 5:
Immunantwort nach einer Einzeldosis EPAXAL®.

Tag	0	6	8	10	12	14	21	28
Geometr. Mittelwert (mIU/ml)	5.2	5.4	6.6	12.7	17.8	24.6	50.7	43.3
Serokonversion (%)	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Ergebnisse

Bedingt durch den gewaltigen labortechnischen Aufwand, den die Durchführung des Virusneutralisations-Tests, vor allem in Anbetracht der zahlreichen Abnahmen erfordert, wurde zunächst eine zufällige Stichprobe von 12 Probanden sowohl mit Hilfe des ELISA als auch des NT untersucht (Abb. 1).

Dabei zeigte sich, daß die ELISA-Titer bereits am Tag 6 anzusteigen beginnen, am Tag 14 den erwarteten Wert von etwa 100 mIU/ml und am Tag 21 ein Maximum von etwa 250 mIU/ml erreichen. Der Anstieg der Neutralisations-Titer beginnt nur zwei Tage später am Tag 8 und erreicht ebenfalls am Tag 21 den Höhepunkt. Die für den Schutz maßgeblichen neutralisierenden Antikörper (Tab. 5) erreichen bei allen untersuchten Probanden bereits am Tag 10 die Schutzgrenze von 10 mIU/ml was einer Serokonversion bzw. Seroprotektion von 100% entspricht.

Auffällig ist, daß die Werte für den Neutralisations-Titer nur etwa ein Fünftel der Werte der ELISA-Titer betragen, obwohl bei beiden Tests der gleiche internationale Standard mitgeführt wurde.

Diskussion

Die von uns durchgeführten immunologischen Untersuchungen mit dem liposomalen Hepatitis

A-Impfstoff bestätigen die von uns in früheren Studien mit EPAXAL® (3, 4) gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Seroprotektion am Tag 14 und ermöglichen erstmals einen Einblick in die Frühphase der Immunisierung, insbesondere in die immunologischen Veränderungen in den ersten zwei Wochen.

Vergleicht man die Ergebnisse unserer ersten Studie (4) hinsichtlich dieses Stichtages mit den Ergebnissen nach einem Ein-Dosis-Priming mit dem Aluminium-hydroxid-adsorbierten Hepatitis A-Impfstoff (17), so zeigt der liposomale Impfstoff deutlich höhere Konversionsraten (Tab. 6). Rein rechnerisch beträgt die Serokonversions-, bzw. Seroprotektionsrate für den Tag 14 in der vorliegenden Studie 100%. Aufgrund der kleinen Zahl von serologisch untersuchten Probanden liegt die 95% Vertrauensgrenze jedoch zwischen 73,5 und 100%. Eine endgültige Aussage wird daher erst nach Abschluß der Untersuchungen möglich sein.

Trotz der präliminären Ergebnisse der vorliegenden Studie läßt sich jedoch bereits jetzt eine vorsichtige Antwort auf die eingangs gestellte Frage nach dem Schutzeintritt geben (Abb. 2). Ausgehend von der Tatsache, daß die Virämie, die zur Infektion der Leberzellen führt, frühestens etwa 14 Tage nach der Exposition mit dem Hepatitis A-Virus auftritt (8), kann selbst bei Exposition unmittelbar nach der Impfung ein Schutz von mindestens 95% erwartet werden. Die weiteren Untersuchungen werden zeigen, ob dieser Wert noch verbessert werden kann.

Tabelle 6:

Immunantwort nach Ein-Dosis-Priming mit inaktiviertem Hepatitis A-Impfstoff.

Serokonversion am Tag 14	Al (OH) ₃ *	Liposomen **
ELISA	71.4 - 92.6%	97.3%
Neutralisations-Test	54.2 - 61.7%	84.0 - 95.5%

*) Van Damme et al. (17)

**) Ambrosch et a. (4)

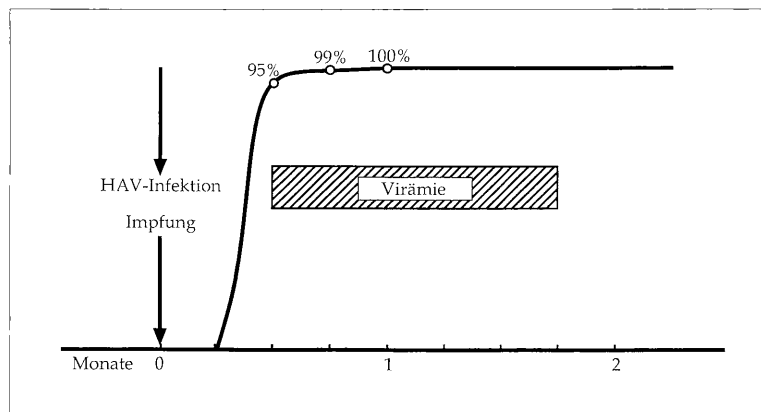


Abbildung 2:

Zeitlicher Verlauf der Serokonversion (NT) nach Impfung mit EPAXAL® im Vergleich zur Virämie nach HAV-Infektion.

Zusammenfassung

Die Impfung mit dem inaktivierten Hepatitis A-Impfstoff ist heute eine wichtige prophylaktische Maßnahme vor Reisen in Gebiete mit hohem Risiko einer Hepatitis A-Infektion. Aufgrund der Entwicklung von verbesserten Impfstoffen sowohl auf Aluminium-Hydroxid- als auch auf Liposomenbasis, konnte das ursprüngliche Impfschema, das eine dreimalige Impfung in den Monaten 0, 1 und 12 vorsah, auf ein Zweidosischema mit einer Primingdosis und einer Boosterdosis nach 6 - 12 Monaten reduziert werden. Derzeit gibt es jedoch noch keine genauen Daten über den tatsächlichen Beginn des Schutzes nach der ersten Impfdosis.

Um diese wichtige Frage zu beantworten, haben wir eine klinische Studie mit dem Hepatitis A-Liposomen-Impfstoff EPAXAL® des Schweizer Serum- & Impfinstituts Berna durchgeführt, mit der die frühe Immunantwort nach einer Impfdosis untersucht werden sollte. Zu diesem Zweck wurden in den ersten beiden Wochen nach der Impfung Blutproben in zweitägigen Abständen abgenommen und mit Hilfe des ELISA- und des Neutralisations-Tests untersucht.

Es zeigte sich, daß die Produktion spezifischer Antikörper bereits eine Woche nach der Impfung beginnt. Nach zwei Wochen waren alle untersuchten Personen geschützt. Mit Hilfe dieser Ergebnisse läßt sich das für einen ausreichenden Schutz erforderliche Mindestintervall zwischen der Applikation des Impfstoffes und der Exposition mit dem Hepatitis A-Virus genauer festlegen.

Schlüsselwörter

Hepatitis A, aktive Immunisierung, Schutzeintritt, Antikörperkinetik, Neutralisationstest.

Summary *Early immune response after single dose immunization with liposomal hepatitis A-vaccine (EPAXAL®)*

Active immunization with inactivated hepatitis A vaccine has become an important measure particularly in travellers going from low endemic to high endemic areas. Due to the development of improved vaccines, either aluminium adjuvanted or liposome based, the vaccination regimen could be reduced to only one primary vaccination and one booster. However, as yet there are no precise data on the actual onset of protection after the first dose.

In order to answer this question we conducted a prospective clinical study to assess the early immune response after a single dose of a new liposomal hepatitis A vaccine. Thirty volunteers were immunized with EPAXAL®, produced by the Swiss Serum and Vaccine Institute. Blood samples were drawn on days 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 21 and 28.

HAV antibodies were determined by ELISA and by virus neutralization test. Geometric mean antibody titers and seroconversion rates were calculated for each point of time.

The results of the study show that production of specific and protective antibodies is starting one week after injection of a single dose of EPAXAL®. After two weeks all investigated volunteers were protected.

This finding might be useful to better define the minimum time interval between injection of a single dose of hepatitis A vaccine and HAV exposure guaranteeing full protection.

Key words Hepatitis A, Immunization, Onset of protection, Antibody kinetics, Neutralization test.

Literatur

1. AMBROSCH, F., JONAS, S., KUNZ, Ch., ANDRÉ, F. & WIEDERMANN, G. (1994): Active immunization against hepatitis A. Vaccination strategies and future perspectives. *Trop. Med. Parasitol.* 45, 145.
2. AMBROSCH, F., JONAS, Susanna, KUNZ, Ch., ANDRÉ, F., WIEDERMANN, G. (1994): Aktive Immunisierung gegen Hepatitis A-Impfstrategien und zukünftige Perspektiven. *Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* 16, 115-122.
3. AMBROSCH, F., ALTHAUS, B., GLÜCK, R., HERZOG, Ch., JONAS, Susanna, WIEDERMANN, G. (1995): Immunogenität und Protektivität eines inaktivierten Hepatitis A-Impfstoffes auf Liposomenbasis. *Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* 17, 201-208
4. AMBROSCH, F., WIEDERMANN, G., JONAS, S., ALTHAUS, B., FINKEL, B., GLÜCK, R., HERZOG, C. (1997): Immunogenicity and protectivity of a new liposomal hepatitis A vaccine.
5. ANDRÉ, F. E. (1991): Development of a vaccine against hepatitis A. In: *Viral Hepatitis and Liver Diseases*, Eds.: Hollinger, B., Lemon, S. M. and Margolis, H.S., Williams and Wilkins, Baltimore, p. 85-88.
6. BRIEM, H. & SAFARY, A. (1994): Immunogenicity and safety in adults of hepatitis A virus vaccine administered as a single dose with a booster 6 months later. *J. Med. Virol.* 44, 443-445.
7. COX, J. C. & COULTER, A. R. (1997): Adjuvants – a classification and review of their modes in action. *Vaccine* 15, 248-256.
8. FRÖSNER, G. (1991): Hepatitis A Virus. In: *Textbook of Human Virology*, Ed.: R.B. Belshe. Mosby Year Book Inc., St. Louis, 498-516.
9. GLÜCK, R., ALTHAUS, B., BERGER, R., JUST, M. & CRYZ, S. J. (1992): Development, safety and immunogenicity of new inactivated hepatitis A vaccines: effects of adjuvants. In: *Travel Medicine*, Eds.: Lobel, H. O., Steffen R. and Kozarksy, P. E. International Society of Travel Medicine, Atlanta, 135-136.
10. GLÜCK, R. (1992): Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIVs) and other adjuvants for improved presentation of small antigens. *Vaccine* 10, 915-919.
11. GLÜCK, R., MISCHLER, R., BRANTSCHEN, S., JUST, M., ALTHAUS, B. & CRYZ, S. J. (1992): Immunopotentiating reconstituted influenza virus virosome vaccine delivery system for immunization against hepatitis. *A. J. Clin. Invest.* 90, 2491-2495.
12. GLÜCK, R. (1995): Liposomal presentation of antigens for human vaccines. In: *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Eds.: Powell, M.F. and Newman, M.J.). Plenum Press, New York, 325-345.
13. GLÜCK, R. & WEGMANN, A. (1997): Virosomes, a new liposome-like vaccine delivery system. In: *Antigen Delivery Systems. Immunological and Technological Issues*. Eds.: B. Gander, H.P. Merkle and G. Corradin, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 101-122.

14. JUST, M., BERGER, R., DRECHSLER, H., BRANTSCHEN, S. & GLÜCK, R. (1992):
A single vaccination with an inactivated hepatitis A liposome vaccine induces protective antibodies after only two weeks.
Vaccine 10, 737-739.
15. LOUTAN, L., BOVIER, P., ALTHAUS, B. & GLÜCK, R. (1994):
Inactivated virosome hepatitis A vaccine.
Lancet 343, 322-324.
16. STEFFEN, R. (1992):
Risk of hepatitis A in travellers.
Vaccine 10, 69-72.
17. VAN DAMME, P., MATHEI, C., THOELLEN, S., MEHEUS, A., SAFARY, A. & ANDRÈ, F. E. (1994):
Single dose inactivated hepatitis A vaccine: rationale and clinical assessment of the safety and immunogenicity.
J. Med. Virol. 44, 435-441.
18. VIDOR, E., XUEREF, C., BAJARD, A. & FANGET, B. (1994):
Analysis of the immune response of volunteers after vaccination with Pasteur Mérieux inactivated hepatitis A vaccine.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 51, 142.
19. WEGMANN, A., ZELLMAYER, N., GLÜCK, R. et al. (1994):
Immunogenität und Stabilität eines aluminiumfreien liposomalen Hepatitis-A-Impfstoffes (Epaxal Berna®).
Schweiz. med. Wschr. 124, 2053-2056.
20. WERZBERGER, A., MENSCH, B. KUTER, B. et al. (1992):
A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children.
N. Engl. J. Med. 327, 453-457.

Univ. Prof. Dr. Franz J. Ambrosch
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin
Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1998

Band/Volume: [20](#)

Autor(en)/Author(s): Ambrosch Franz, Finkel B., Glück R., Herzog Ch., Koren Andrea, Wiedermann Gerhard

Artikel/Article: [Untersuchung der frühen Immunantwort nach einer Dosis des liposomalen Hepatitis A-Impfstoffes Epaxal®. 61-66](#)