

Quantitative Bestimmung von Antikörpern gegen das Coronavirus (SARS-CoV-2)

IPA entwickelt immunologische Testsysteme

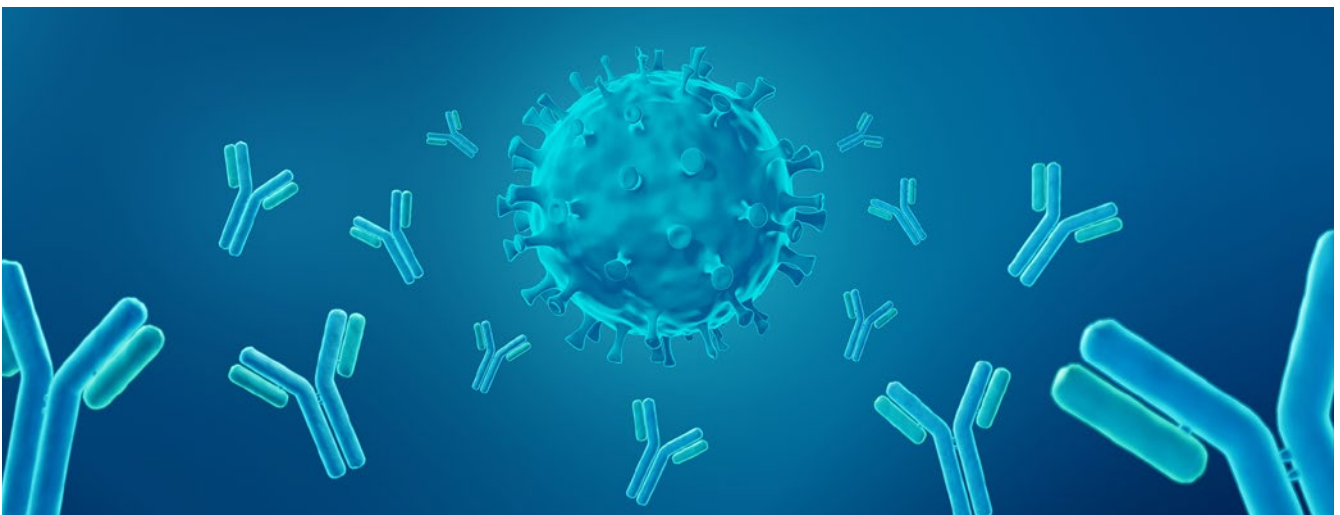


Ingrid Sander, Thomas Brüning,
Monika Raulf

Im IPA wurden immunologische Testsysteme entwickelt, die eine quantitative Bestimmung der Antikörper gegen das Coronavirus ermöglichen. Die Testergebnisse sind durch Berücksichtigung internationaler Standards mit Werten aus anderen Laboren vergleichbar. Die Tests erlauben eine Differenzierung zwischen einer Infektion und einer Impfreaktion. Die Testsysteme werden bereits in zwei Studien in Zusammenarbeit mit Unfallversicherungsträgern eingesetzt.

Beruflicher Kontakt mit Infizierten führt insbesondere im Gesundheits- und Pflegebereich zu einem deutlich erhöhten Risiko an COVID-19 zu erkranken. Bis Ende Juni 2022 gab es bereits über 350.000 Verdachtsanzeigen auf eine Berufserkrankung im Zusammenhang mit COVID-19 und über 58.000 gemeldete Arbeitsunfälle (DGUV). Forschungsarbeiten zur Prävention dieser Erkrankung haben daher eine hohe Priorität für die Unfallversicherungsträger.

Sowohl nach Infektion mit dem SARS-CoV-2-Virus als auch nach erfolgreichen Impfungen werden Antikörper gebildet, welche die Vermehrung des Virus im Körper erschweren. Die in Deutschland eingesetzten Impfstoffe enthalten die genetische Information oder eine Untereinheit des als „Spike-Protein“ bezeichneten Oberflächenproteins des Virus. Dieses Protein ermöglicht den Eintritt in menschliche Zellen, so dass eine gegen das Spike-Protein gerichtete Immunantwort die Ausbreitung des Virus besonders effektiv



Kurz gefasst

Im IPA wurden Antikörpertests für eine quantitative Bestimmung der SARS-CoV-2-Antikörperkonzentrationen entwickelt.

Die Bestimmung von Antikörpern gegen zwei unterschiedliche Proteine des SARS-CoV-2-Virus kann zwischen Impfung und Infektion unterscheiden.

Die ELISA sind validiert und ihre Ergebnisse aufgrund des Bezugs zu WHO-Standards international vergleichbar.

verringert. Andere Virusproteine, wie zum Beispiel das Nucleocapsid-Protein, können im Falle einer Infektion nach Probenahme im Nasen-Rachen-Raum mit Antigen-Schnelltests nachgewiesen werden. Entsprechend werden Antikörper auch gegen dieses Protein nach einer Virusinfektion, nicht aber nach der Impfung, gebildet.

Frühe Entwicklung von Testverfahren am IPA

Bereits zu Beginn der Pandemie, im Frühjahr 2020 begann das IPA mit der Entwicklung immunologischer Testverfahren zur Quantifizierung menschlicher Antikörper gegen das SARS-CoV-2 Virus, die als „ELISA“ (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) in praktisch jedem immunologischen Labor durchgeführt werden können. Im ELISA werden bestimmte Moleküle über Antikörper und eine Enzym-gekoppelte Farbreaktion nachgewiesen.

Zu diesem Zeitpunkt gab es noch keine kommerziellen quantitativen Nachweisverfahren für Humanantikörper gegen SARS-CoV-2 Antigene. Ziel war es, anhand der Antikörperkonzentrationen im Blut Hinweise für die Dauer der Immunität und den Schutz vor erneuter Erkrankung nach Genesung zu erhalten. Nach der Zulassung verschiedener Impfstoffe konnten die Tests zum Nachweis einer Impfreaktion und zur Bestimmung der Antikörperkonzentrationen im zeitlichen Verlauf nach wiederholten Impfungen angewendet werden.

Test unterscheidet zwischen Impfung und Infektion

Bei SARS-CoV-2-Infektionen werden innerhalb der ersten Wochen nach der Infektion fast gleichzeitig verschiedene Klassen von Immunglobulinen, den Antikörpern, produziert. Da Immunglobuline der Klasse G, abgekürzt als IgG, für die andauernde Immunität am wichtigsten sind,

wurden für die Testentwicklung gut charakterisierte kommerzielle Komponenten zum Nachweis dieser Antikörperklasse eingesetzt. Als SARS-CoV-2 spezifische Komponenten dienten sowohl eine Untereinheit (S1) des Spike Proteins, als auch das Nucleocapsid Protein, beide mit der Sequenz des ursprünglichen SARS-CoV-2-Virus. Mit der Entwicklung von ELISA-Systemen gegen zwei verschiedene Virusproteine kann so zwischen der Immunantwort nach einer Infektion oder einer Impfung unterschieden werden. Während nach einer Infektion prinzipiell gegen beide Proteine Antikörper gebildet werden, sind es nach einer Impfung nur Antikörper gegen das Spike Protein.

Quantifizierung und analytische Genauigkeit

Als Referenz für die Umrechnung von den im Photometer gemessenen optischen Dichten der Farbreaktion in IgG-Werte wird neben den Proben eine Serummischung mit bekannter IgG-Konzentration in einer Verdünnungsreihe auf jeder ELISA Platte eingesetzt (Abb. 1).

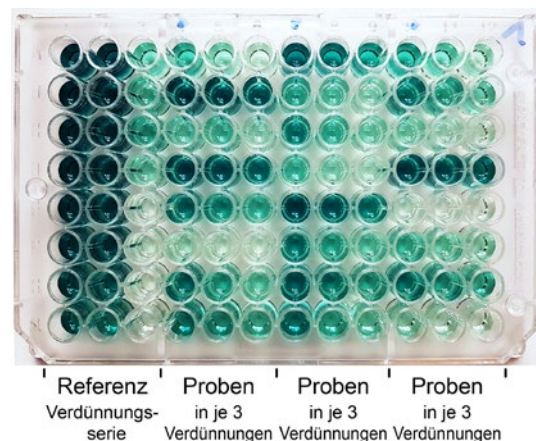


Abb. 1 ELISA Testplatte mit Serumproben in je drei Verdünnungen und Referenz zur Umrechnung in IgG-Konzentrationen.

Entscheidend für die Quantifizierung ist ein paralleler Verlauf der Referenzkurve und der Probenverdünnungen. Die ausgezeichnete Parallelität zeigte sich an der relativen Standardabweichung der Ergebnisse auf einer Platte von im Mittel nur 7,1% beim Spike S1-ELISA und 7,2% beim Nucleocapsid-ELISA. Die Ergebnisse konnten an verschiedenen Messtagen reproduziert werden und wichen mit mittleren Standardabweichungen von nur 11,9% beim Spike S1 und 6,6% beim Nucleocapsid ELISA voneinander ab.

Laborergebnisse international vergleichbar

Um Laborergebnisse international vergleichen zu können, müssen Antikörpermessungen standardisiert werden. Hierfür gibt es von der World Health Organisation (WHO) zugelassene Serummischungen mit definierter Antikörperbindung. Der WHO 67/086 Standard dient zur Quantifizierung von Antikörpern verschiedener Subklassen und standardisiert anhand von „Internationalen Units (IU)“, während der WHO 20/136 Standard an SARS-CoV-2 bindende Antikörper anhand von „Binding Activity Units (BAU)“ standardisiert. Letzterer ist seit Anfang 2021 verfügbar und enthält per Definition eine Konzentration von 1000 BAU/mL. Auch die WHO-Standards wurden im IPA parallel zu der IgG Referenz in den ELISAs eingesetzt (Abb. 2). Die in der Abbildung eingezeichneten Faktoren ermöglichen die Umrechnung der IgG-Konzentrationen in die verschiedenen Einheiten.

Info

Die Sensitivität und die Spezifität sind Indikatoren für die Zuverlässigkeit von medizinischen Diagnoseverfahren.

Dabei gibt die **Sensitivität** eines Tests an, wie viele erkrankte Personen von diesem Test richtig als erkrankt erkannt werden.

Die **Spezifität** beschreibt, wie viele gesunde Personen von einem Testsystem als gesund erkannt werden.

Validierung der ELISA

Zur Validierung der ELISAs und Festlegung der Beurteilungsgrenze („Cutoff“) wurden sowohl Proben von Erkrankten (Positive) als auch Proben von Gesunden (Negative) benötigt. Die 135 negativen Kontrollproben stammten aus der Biobank des IPA aus Projekten, bei denen die Proben sicher vor Ausbruch der Pandemie gewonnen wurden. Die 144 positiven Proben stammten von Personen mit positivem PCR-Test auf SARS-CoV-2, die im Zeitraum von 14 bis 100 Tagen nach dem positiven Ergebnis Blut gespendet und anonymisiert zur Verfügung gestellt hatten. Zuvor wurde ein Datenschutzkonzept erstellt und das Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum eingeholt (Registriernummer 20-7007).

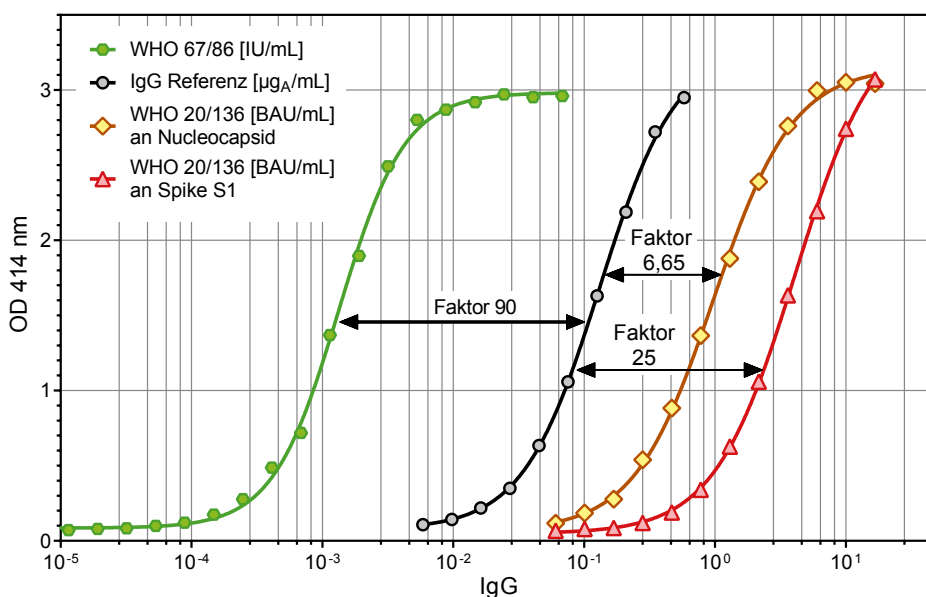


Abb. 2
Paralleler Verlauf der IgG Referenzkurve zu den WHO Standards mit Umrechnungsfaktoren zwischen den Einheiten.

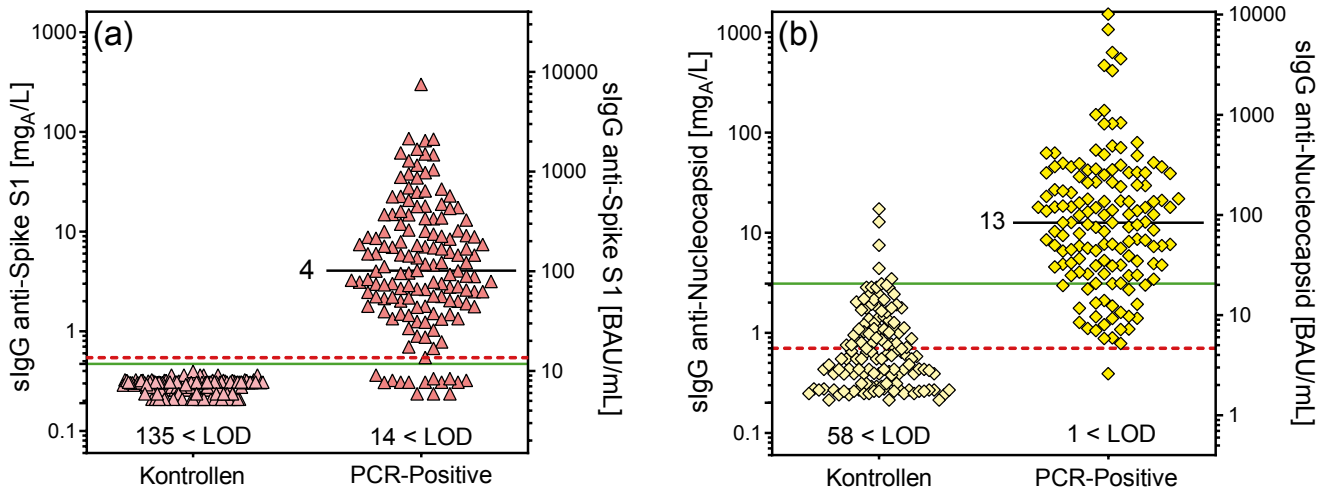


Abb. 3a/b IgG-Ergebnisse bei PCR-Positiven und Kontrollen im Spike-S1 ELISA (a) und Nucleocapsid-ELISA (b). Gestrichelte rote Linie: Nachweisgrenze (LOD) Durchgezogene grüne Linie: Cutoff

Keine der Kontrollen hatte IgG-Antikörper gegen das Spike Protein über der Nachweisgrenze (LOD), während die PCR-Positiven im Median IgG-Werte von 4 $\text{mg}_A\text{/L}$ und umgerechnet 102 BAU/mL aufwiesen (Abb. 3a). Im Nucleocapsid-ELISA lagen 58 Kontrollen und eine PCR-Positive Person unter der Nachweisgrenze. Der Median-Wert bei den PCR-Positiven lag bei 13 $\text{mg}_A\text{/L}$ und umgerechnet 84 BAU/mL (Abbildung 3b). Anhand der Kontrollen wird die Spezifität beurteilt, anhand der PCR-Positiven die Sensitivität. Der „Cutoff“ zur optimalen diagnostischen Beurteilung findet sich beim Maximum der Summe aus Sensitivität und Spezifität.

Insbesondere die Spezifität der ELISA beim optimalen „Cutoff“ ist mit 100 % beim Spike S1 ELISA und 96,3 % beim Nucleocapsid ELISA ausgezeichnet.

ELISA Ergebnisse vor und nach Impfungen

Die neu entwickelten ELISA-Systeme wurden bei 48 gesunden Freiwilligen vor und nach Impfungen mit dem Impfstoff von BioNTech-Pfizer eingesetzt (Impfgruppe, Abb. 4). Zusätzlich wurden auch zehn Personen, die zuvor einen positiven PCR-Test hatten, nach ihrer Impfung getestet.

Nach der Erstimpfung hatten 92% der gesunden Freiwilligen IgG-Antikörper gegen das Spike-S1-Protein von im Median 100 BAU/mL; nach der 2. Impfung wiesen 98 % IgG-Antikörper von im Median 1457 BAU/mL auf (Abb. 4a). Noch höher lagen die IgG-Antikörper gegen das Spike-S1-Protein bei den zuvor PCR-Positiven nach Erstimpfung. Die Antikörper gegen das Nucleocapsid-Protein blieben dagegen wie erwartet von der Impfung unbeeinträchtigt (Abb. 4b).

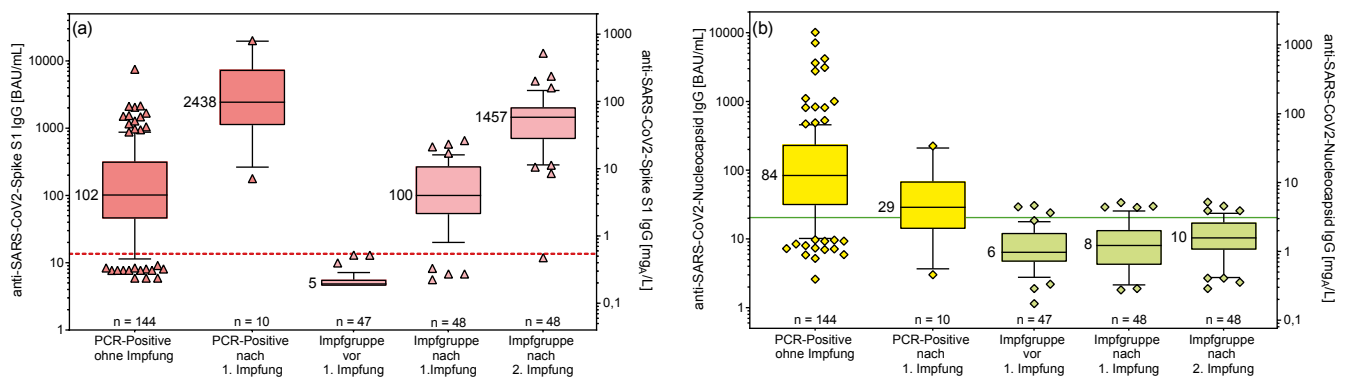


Abb. 4a/b Antikörperkonzentrationen gegen das Spike S1 Protein (a) und das Nucleocapsid (b).

Ausblick

Die neuentwickelten Antikörpertests werden derzeit in zwei laufenden Studien eingesetzt. In einer Kohortenstudie „VAC-Studie“ werden die Antikörperkonzentrationen im Verlauf vor und nach wiederholten Impfungen und ihre Schutzwirkung vor Infektion über einen Zeitraum von zwei Jahren verfolgt. In der „PostCovid und Immunstatus-Studie“, die von der Berufsgenossenschaft für Gesundheitsdienst und Wohlfahrtspflege initiiert wurde, dienen die Antikörpertests neben weiteren Methoden zur Bestimmung des Immunstatus nach einer SARS-CoV-2-Infektion bei Versicherten aus dem Gesundheitswesen.

Ein großer Vorteil der im IPA entwickelten ELISA-Systeme ist die Entwicklung aus kommerziell erhältlichen Komponenten. Die Durchführung der Tests ist mit üblicher Laborausstattung ohne zusätzliche Messgeräte und teure Testmaterialien möglich. Außerdem können IgG-Antikörper gegen weitere Antigene, wie zum Beispiel die Omikron-Variante des Spike-Proteins, nach gleichem Schema und mit den gleichen Referenzen quantifiziert und verglichen werden. Auch diese ELISA-Variante wurde mittlerweile erfolgreich im IPA etabliert und wird bereits in der VAC-Studie eingesetzt. Vor dem Hintergrund einer hohen Anzahl Infizierter auch nach Impfungen bleibt es eine offene Forschungsfrage, welche Antikörperkonzentrationen einen Schutz vor schweren Verläufen von COVID-19 Erkrankungen vorhersagen können.

Danksagung

Der Dank gilt unseren Bochumer Projektpartnern Dr. Philipp Göcke aus der Praxis für Labormedizin und Mikrobiologie und Prof. Herrmann aus der Praxis für Endokrinologie und Laborforschung für die Probensammlung von PCR-positiv Getesteten.

Die hier zusammengefassten Ergebnisse wurden bereits publiziert (Sander et al. 2022). Zwischenergebnisse der VAC-Studie wurden bei der DGAUM Jahrestagung 2022 vorgestellt und werden derzeit für eine Originalpublikation zusammengefasst.

Die Autoren:

Prof. Dr. Thomas Brüning

Prof. Dr. Monika Raulf

Dr. Ingrid Sander

IPA

Literatur

DGUV. Berufskrankheiten und Arbeitsunfälle im Zusammenhang mit COVID-19: https://www.dguv.de/medien/inhalt/mediencenter/hintergrund/covid/dguv_zahlen_covid.pdf (abgerufen am 19.07.2022)

Sander I, Kespohl S, Zahradnik E, Göcke P, Hosbach I, Herrmann BL, Brüning T, Raulf M. Quantitative measurement of IgG to SARS-CoV-2 antigens using monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin. Transl. Immunol.* 2022; 11:e1369. Doi: 10.1002/cti2.1369