

ANTIKÖRPER-TESTS: COVID-19

In der CoVID-19-Pandemie werden zuverlässige Antikörpernachweise weltweit dringend benötigt. Da viele der verfügbaren Assays ungenügende Leistungen erbringen¹, werden hier die technischen Voraussetzungen für die Entwicklung wirklich verlässlicher Antikörpernachweise erläutert.

von Sebastian Richter, Manuel Hecht & Peter Rauch, CANDOR Bioscience

Immunogenität gegen SARS-CoV-2-Proteine ist durch die Bildung hochspezifischer und hochaffiner IgG-Antikörper gekennzeichnet². Assays zum Nachweis dieser Antikörper sollen eine Immunisierung anzeigen und in breiter Masse eingesetzt werden. Für eine Massentestung ist allerdings eine extrem hohe Spezifität, also eine niedrige Rate falsch-positiver Ergebnisse essentiell. Selbst bei einer scheinbar guten Spezifität von 99% und einer optimistisch geschätzten Antikörper-Prävalenz von 5% hat bei einem positiven Ergebnis die getestete Person nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 84% tatsächlich spezifische Antikörper gegen SARS-CoV-2 gebildet³. Eine solch geringe Sicherheit ist für den Einsatz getesteter Personen in kritischen Bereichen schlicht

inakzeptabel. Am Beispiel eines ELISAs werden hier Ursachen beschrieben für die geringe Zuverlässigkeit vieler verfügbarer infektiologischer Assays und die technischen Voraussetzungen für die Entwicklung und Massenfertigung wirklich zuverlässiger Testverfahren mittels etablierter und moderner Lösungen. Denn Kostendruck sollte kein Grund für Kompromisse zu Lasten der Sicherheit sein.

Es sind vier verschiedene Ursachen für falsch-positive Ergebnisse in der Serologie bekannt: 1. ungünstig gewählte Fänger-moleküle, 2. Kreuzreaktivitäten und biochemische Interferenzen, 3. unzureichende Oberflächenblockierung und 4. Stabilität der Reagenzien. Zu 1. sei hier nur erwähnt, dass sich die

RBD von SARS-CoV-2 als das vielversprechendste Antigen herauskristallisiert⁴.

KREUZREAKTIVITÄTEN

Selbst bei optimalen Fänger-molekülen muss immer mit Kreuzreaktivitäten und Interferenzen gerechnet werden. Beispielsweise können Antikörper gegen andere Coronaviren auch die verwandten Epitope von SARS-CoV-2 binden und zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Diese Kreuzreaktivitäten basieren auf niedrig- bis mittelaffinen Antikörper-Interaktionen und sind nicht ausreichend für Immunität gegen CoViD-19. Viele potentiell fatale falsch-positive Ergebnisse können durch den Einsatz der LowCross-Technologie verhindert werden⁵. LowCross-Buffer® ersetzt den Probenverdünnungspuffer und reduziert sehr zuverlässig und unabhängig von ihren molekularen Ursachen alle niedrig- bis mittelaffinen Bindungen signifikant, während hochaffine Bindungen – also die „wahren“ Signale des Assays – nicht beeinflusst werden. Die LowCross-Technologie reduziert neben Kreuzreaktivitäten auch viele andere Formen von Interferenzen und hat seit ihrer Markteinführung weltweit bei der Optimierung vieler diagnostischer Assays geholfen. LowCross-Buffer® ist ready-to-use und ersetzt Assay-Verdüner nicht nur in ELISAs, sondern auch in Lateral-Flow-Assays (Einsatz als Chase- bzw. Flow-Buffer), Luminex-Assays, Protein-Arrays,

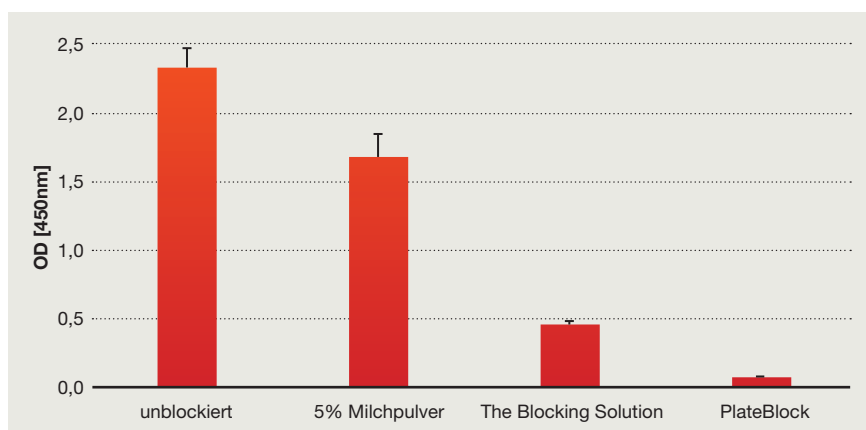


Abb.: 1 Vergleich der Blockierung gegen 1:10 verdünnte Serumproben. Detektion unspezifisch gebundener Antikörper mit Anti-Human-Antikörper. PlateBlock verhindert sehr effektiv den unerwünschten Hintergrund.

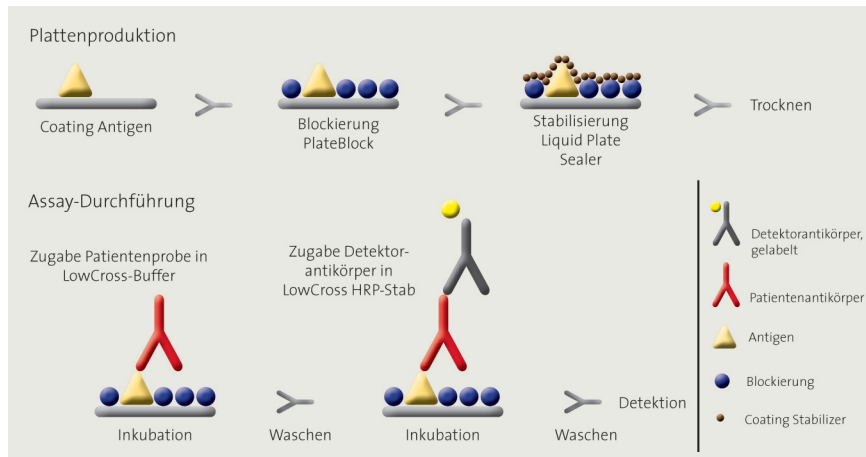


Abb. 2 Idealer ELISA-Aufbau für die Serologie.

automatisierten Hochdurchsatz-Immunoassay-Systemen und ist in vielen anderen Formaten einsetzbar. In einer Pandemie sollten falsch-positive Ergebnisse nicht so einfach hingegenommen werden wie in der Routine-Serologie und LowCross-Buffer® kann einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung zuverlässiger Diagnostika für SARS-CoV-2-Antikörper leisten.

BLOCKER FÜR DIE SEROLOGIE

Die Blockierung der Oberflächen stellt eine besondere Herausforderung für alle serologischen Assays dar. Sie soll sicherstellen, dass es nicht – unabhängig vom Vorhandensein eines Analyten – durch unspezifische Bindung von Molekülen an die Oberfläche zu falsch-positiven Ergebnissen kommt. Speziell in der Serologie tritt das Problem auf, dass manche Serum- und Plasmaproben einzelne Moleküle einer vorher dichten Blockierungsschicht ablösen können und im Rahmen einer Austauschreaktion die Anlagerung unspezifischer Antikörper an die Oberfläche ermöglichen. Als Folge ergeben sich hohe Hintergrundwerte, falls die Proben nicht ausreichend verdünnt werden. Hohe Probenverdünnungen von 1:100 oder mehr haben aber den Nachteil, dass klinisch relevante, spezifische Antikörper, die in geringer Konzentration vorliegen, eventuell nicht mehr nachweisbar sind. Die Verwendung undefinierter Blockierer wie Milchpulver oder FCS geht immer auf Kosten der Assay-Performance (Abb. 1). Auch Lösungen für die Plattenproduktion

von Sandwich-ELISAs, mit denen Blockierung und Coating-Stabilisierung in einem Schritt durchgeführt werden können, wie Liquid Plate Sealer®, reichen in serologischen Assays⁶ nicht aus, wenn sie nicht mit einem Serologie-Blockierer ergänzt werden. Für diese kritischen Assays hat CANDOR den PlateBlock™ entwickelt. Der proteinfreie PlateBlock™ wurde daraufhin optimiert, die genannten Austauschreaktionen besonders umfassend zu verhindern. Testungen zeigen sehr gute Anwendbarkeit in der Serologie (Abb. 1). In Kombination mit LowCross-Buffer® als Probenverdünner zeigt PlateBlock™ sehr gute Performance in ELISA-Nachweisen für neutralisierende SARS-CoV-2 Antikörper.

STABILITÄT DER REAGENZIEN

Für einen kommerziellen und in einer Pandemie mit hohen Stückzahlen weltweit einsetzbaren Test ist die Stabilität der Reagenzien und die damit verbundene Kit-Haltbarkeit entscheidend. Für den gelabelten Detektor steht neben dem bewährten HRP-Protector™ auch ein Stabilizer auf Basis von LowCross® (LowCross® HRP-Stab) zur Verfügung. Beide Lösungen ermöglichen Haltbarkeiten von mehreren Jahren, verringern die Abhängigkeit von Kühlketten und zeigen bessere Assay-Performance im Vergleich zu anderen kommerziellen HRP-Stabilizern.

Ebenso essentiell sind Coating-Stabilizer für das Fänger-molekül, um den

Verlust der nativen Proteinfaltung während Lagerung und Transport und somit Fehlbestimmungen zu verhindern. Die Produktgruppe der Liquid Plate Sealer® von CANDOR bietet herausragende Stabilisierung im Vergleich zu alternativen Lösungen und wurde bereits bei Millionen Proben eingesetzt. In Kombination mit PlateBlock™ ermöglicht Liquid Plate Sealer® hervorragend blockierte und stabilisierte serologische Assays.

IDEALER SEROLOGISCHER ELISA

1) Coating des Fängerproteins. 2) Absaugen der Platte (nicht waschen). 3) Blockierung mit PlateBlock™. 4) Stabilisierung mit Liquid Plate Sealer®. 5) Absaugen der Platte (nicht waschen), Trocknen und Lagern. 6) Verdünnung der Patientenprobe (1:10 bis 1:50) in LowCross-Buffer® und Inkubation. 7) Nach dem Waschen Inkubation mit in LowCross® HRP-Stab (oder HRP-Protector™) gelagertem Detektor-Konjugat. 8) Detektion nach Waschen. Die Entwicklung zuverlässiger Diagnostika für CoViD-19 ist eine komplexe Herausforderung. CANDOR Bioscience berät gerne alle Interessierten, denn die gegenwärtige Krise kann nur gemeinsam gemeistert werden.

LITERATUR

1. Lassaunière, R et al. (2020). Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays. *Preprint at medRxiv*
2. Long, Q et al. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*
3. Richter SM (2020) Spezifität, positiver Vorhersagewert und Validierungsstatistik im Kontext von COVID-19. *www.candor-bioscience.de*
4. Chee, WT et al. (2020). A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike (RBD) protein-protein interaction. *Preprint at Research Square*
5. Polifke T & Rauch P (2009). Affinity discrimination to avoid interference in assays. *IVD Technology*.
6. Polifke T & Rauch P (2020). Falsch-Positive in SARS-CoV-2 Antikörpertests einfach vermeiden. *www.bionity.com..*