

IGG-TESTS FÜR COVID-19

Viele Immundiagnostika zur Messung von IgG-Antikörpern gegen SARS-CoV-2 sind erhältlich – aktuell weit mehr als 100 Kits. Fraglich ist, ob die Diagnostika-Industrie hier schon zielgerichtet den tatsächlichen Bedarf bedient.

von Sebastian M. Richter und Tobias Polifke, CANDOR Bioscience

Im Rahmen der COVID-19-Pandemie gibt es für jede Einzelperson zwei wesentliche Fragen: Erstens, bin ich infiziert, und – mit ähnlicher persönlicher Tragweite – zweitens, bin ich immun?

Die erste Frage beantwortet momentan teure PCR-Diagnostik. Deren Zuverlässigkeit ist auch aufgrund der schwierigen Probenahme noch verbesserungswürdig, nur ein einzelner Test von R-Biopharm kann sich positiv von der Masse abheben [1]. Aus Kostengründen werden bald Lateral-Flow-Assays und ELISA-Tests beim direkten Erregernachweis eine zentrale Rolle spielen.

Doch wie wird die Frage nach der persönlichen Immunität beantwortet? Für die Messung der Durchseuchungsraten sind

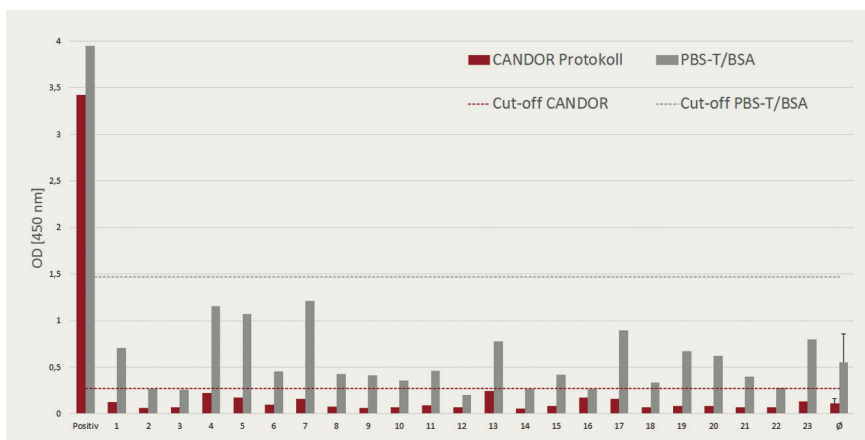
günstige Forschungskits ausreichend. Die Immunitätsfrage hingegen ist hochbrisant: Die Person sucht eine klare Aussage, ob sie immun gegen SARS-CoV-2 ist oder nicht. Bei dieser Patienten-individuellen Diagnostik ist es essenziell, dass kein einziges falsch-positives Ergebnis auftritt. Denn – unabhängig von allen Warnungen des Laborarztes – wird die Person auf Basis der IgG-Bestimmung ihr Verhalten anpassen. Bei einem falsch-positiven Ergebnis könnte sie unvorsichtig werden und in der irrigen Annahme, immun zu sein, sich und andere gefährden. Die Brisanz falsch-positiver Testergebnisse muss die primäre Entscheidungsgrundlage sein, um Tests für die wichtige Frage der Immunität zu

entwickeln. Die erste Generation der Antikörpernachweise war für Seroprävalenz-Studien brauchbar, brachte aber keine Aussage zur Immunitätsfrage [2]. Aufgrund anfänglicher Unkenntnis mussten teils unsichere Erkenntnisse über COVID-19 schnell in laufende Entwicklungen einfließen.

Deshalb setzten viele Firmen zunächst auf suboptimale Antigene und unzureichende Assay-Protokolle. Mittlerweile liegen ausreichend gesicherte Erkenntnisse vor, um die bisherigen infektionsserologischen SARS-CoV-2-Tests, die für die Individualdiagnostik im genannten Sinne unbrauchbar sind, rasch durch eine zweite Generation ergänzen zu können.

DESIGN VON IGG-TESTS

Wie also sollte ein IgG-Assay für SARS-CoV-2 aussehen? Die rezeptorbindende Domäne (RBD) des viralen Spikeproteins ist nach aktuellem Kenntnisstand das einzig relevante Antigen für den Nachweis neutralisierender Antikörper. Antikörper gegen die RBD korrelieren stark mit der neutralisierenden Wirkung des Serums und blockieren bereits bei Konzentrationen von weniger als 10 ng/ml den viralen Zelleintritt [3,4]. Niedrige Spezifität geht meist mit niedriger Affinität von Antikörpern einher. Im Falle von COVID-19 bilden Patienten hochaffine neutralisierende IgG gegen die RBD. Nur diese Antikörper sollten gemessen werden, um sichere Aussagen



Serologischer Assay für Antikörper gegen die RBD von SARS-CoV-2, durchgeführt mit CANDOR-Puffern[®] (Plate Block, Liquid Plate Sealer, LowCross-Buffer und HRP-Protector) bzw. mit PBS/BSA/Tween als Proben- und Antikörperverdünnungspuffer. Negative Proben (Nr. 1–23, Ø Mittelwert mit Standardabweichung) bereitgestellt durch in.vent Diagnostica, Henningsdorf. Cut-off bezeichnet die Nachweisgrenze (3-fache Standardabweichung der Negativproben).

treffen zu können. Dies hilft auch bei der Erfolgskontrolle nach Impfungen.

Im normalen Verlauf der humoralen Antwort fällt das spezifische IgG auf eine geringere Konzentration, kann aber auf Basis der Forschung mit Neutralisationstests dennoch Schutz bieten. Serum-basierte Antikörperimmunität ist also durch Anti-RBD-IgG mit hoher Affinität, aber nicht immer hoher Konzentration gekennzeichnet. Diese IgG sollen sicher bestimmt werden.

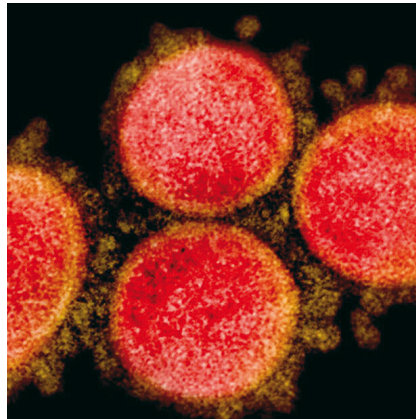
Also hängt die Genauigkeit der benötigten Immunitätstests für Serum von RBD als Antigen von der optimalen Blockierung der Oberflächen (Folge suboptimaler Blockierung sind unter anderem schlechte Nachweisgrenzen [5]) und vor allem von modernen, Affinitäts-selektiven Assay-Verdünnungspuffern ab. Denn nur diese ermöglichen die Anzeige eines positiven Ergebnisses, wenn hochaffine und damit spezifisch neutralisierende – also tatsächlich Immunitäts-vermittelnde – Antikörper gebildet wurden. Hierfür stehen Lösungen wie der LowCross-Buffer® von Candor Bioscience oder auch der Hi-Spec-Diluent von Biorad zur Verfügung. Sie wurden jedoch – laut Validierungsdaten der Hersteller – bei fast allen Kits der ersten Generation nicht eingesetzt. Falsch-positive Ergebnisse sind die Folge. Hierbei kann nicht genug betont werden, dass eine Spezifität von 98% oder 99% bei der Massentestung im Rahmen einer Pandemie deutlich zu niedrig ist, auch wenn 98% bei anderen Diagnostika mit Anamnese-Untermauerung vielleicht nicht so schlecht erscheinen [6].

WIE SPEZIFISCH?

Einer Pandemie mit einem Virus, dessen Wirkung von asymptomatisch über traumatisierend mit schweren Spätfolgen bis hin zu letal reicht, ist nicht mit einem Antikörpernachweis mit nur 98% Spezifität zu begegnen!

Jeder hat das Recht auf die bestmögliche Diagnostik und dies ist zum Beispiel mit PBS/BSA/Tween zur Probenverdünnung technisch nicht machbar.

Die Abbildung zeigt deutlich die Unterschiede von Assays, wie sie für einige kommerzielle IgG-Nachweise der



ersten Generation aufgebaut wurden, im Vergleich zu einem Assay, der auf Affinitäts-selektierendem Verdünnungspuffer, optimalem Serologieblockierer und Coating-Stabilizer für die instabile RBD basiert [7]. Diagnostika mit diesem Aufbau befinden sich aktuell in der Validierung und zeigen deutlich bessere Spezifitäten als die erste Generation. Der niedrige Cut-off-Wert ist essenziell, um geringe, aber relevante IgG-Konzentrationen nachzuweisen.

Erste Firmen, die konsequent auf Verdünnungspuffer zur Affinitätsselektion setzen, werden bald zuverlässige Immunitätsdiagnostika für Serumantikörper gegen SARS-CoV-2 anbieten. Bleibt zu hoffen, dass viele Anbieter der ersten Generation der IgG-Nachweise (oder gar der Double-Antigen-Sandwich-Nachweise mit suboptimalem Antigen), rasch nachbessern. Affinitäts-selektierende Verdünnungspuffer wie der LowCross-Buffer® sind zudem Plattform-unabhängig einsetzbar, haben also ihre Anwendbarkeit in allen Formaten bereits bei anderen Biomarkern gezeigt – vom Lateral-Flow-Test über den klassischen ELISA bis hin zu Proteinarray-Plattformen oder den für Hochdurchsatz optimierten Bead-basierten Klinik-Plattformen.

Bleibt zu erwähnen, dass Immunität nicht nur über IgG im Serum vermittelt wird. Es wurden hochaffine IgA und IgG gegen RBD im Speichel von Patienten nachgewiesen [8]. Hierfür wird es bald spezielle Speicheltests geben, deren Sinnhaftigkeit für eine respiratorisch übertragene Virose außer Frage steht.

Die Matrix des Speichels verhält sich vor allem aufgrund von Mucinen anders als Serum und bedarf daher angepasster, Affinitäts-selektiver Verdünnungspuffer und einer veränderten Probenvorbereitung für zuverlässige Assays.

Immer deutlicher wird auch die Rolle der T-Zell-vermittelten Immunität [9]. Möglicherweise sollte auch die T-Zell-Aktivierbarkeit durch SARS-CoV-2-Antigene diagnostisch ermittelt werden.

FAZIT

Die erste Generation der IgG-Tests ist nicht geeignet zur Immunitätsdiagnostik und erhielt zunächst auch keine Kostenerstattung. In Kürze wird die zweite Generation von Antikörpertests erwartet, die sowohl eine zuverlässige Aussage für den Einzelnen als auch die Erfolgskontrolle von Impfungen gestattet. COVID-19 zeigt auch, dass Infektiologie-Diagnostik in einer Pandemie besonders zuverlässige, zielgerichtete und aussagekräftige Tests im Interesse der einzelnen Patienten erfordert. Dies ist allerdings auch für andere Infektionskrankheiten wünschenswert.

LITERATUR

- [1] van Kasteren et al. (2020) Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY*
- [2] EUneHTA RCRC01 Authoring Team. (2020) The current role of antibody tests for novel coronavirus SARS-CoV-2 in the management of the pandemic. *www.eunetha.eu*
- [3] Suthar et al. (2020) Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. *CELL REPORTS MEDICINE*
- [4] Robbiani et al. (2020) Convergent Antibody Responses to SARS-CoV-2 Infection in Convalescent Individuals. *NATURE*
- [5] Hecht et al. (2020) Surface Blockers in serology: Some background about background. *www.biocompare.com/Future-Lab/Diagnostics*
- [6] Polifke & Rauch (2020) The COVID-19 antibody test challenge. *www.bionity.com*
- [7] Richter et al. (2020) The challenges of serology – towards reliable SARS-CoV-2 antibody assays. *www.biocompare.com/Future-Lab/Diagnostics*
- [8] Isho et al. (2020) Evidence for sustained mucosal & systemic antibody responses to SARS-CoV-2 antigens in COVID-19 patients. *MEDRXIV*
- [9] Braun et al. (2020) SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *NATURE*