



Falsch-Positive in SARS-CoV-2 Antikörpertests einfach vermeiden

Dr. Tobias Polifke & Dr. Peter Rauch

In der aktuellen Situation der Covid-19-Pandemie werden zuverlässige IgG-Antikörper-Tests gegen SARS-CoV-2 weltweit dringend benötigt. Virologen warnen vor Kreuzreaktivitäten, die zu Falsch-Positiven führen können [1, 2]. Am Beispiel von ELISAs diskutieren wir hier die technischen Voraussetzungen für die Entwicklung wirklich zuverlässiger immunologischer Testverfahren, denn die von vielen Virologen derzeit diskutierten Kreuzreaktivitäten sind nur ein kleiner Teil der faktischen Herausforderungen.

Virologen warnen bei Corona-Antikörper-Nachweisen zu Recht vor Kreuzreaktivitäten bei diesem Assay-Typ wegen der Besonderheiten der Corona-Virus-Familie. Die IgG-Assays sollen eine bereits erfolgte Immunisierung anzeigen und in breiter Masse eingesetzt werden. Besonders dringender Bedarf besteht vor allem im Bereich der Gesundheits-, Pflege- und Sicherheitsberufsgruppen, da bereits immunisierte Personen ihre Arbeit weiterführen könnten, ohne sich oder andere zu gefährden. Sukzessive müssen aber viele weitere Berufs- und Personengruppen systematisch getestet werden – ggf. auch mehrfach. Immunität kann hierbei durch eine durchlebte Infektion, später hoffentlich auch aufgrund von Impfung, entstehen. Im Ergebnis ist die Immunität in beiden Fällen durch hochspezifische und hochaffine IgG-Antikörper gegen SARS-CoV-2 gekennzeichnet. Genau diese Antikörper lassen sich durch Immunoassays einfach, kostengünstig und massentauglich messen – jedoch kann es hier zu falsch-positiven Signalen kommen, wenn die Assays nicht optimal entwickelt, produziert und durchgeführt werden. Aus rein Assay-technischer Perspektive beschreiben wir hier etablierte und moderne Lösungen, die bei der Vermeidung falscher diagnostischer Resultate helfen. Die aufgezeigten Lösungen werden am Beispiel eines Anti-IgG-ELISA gegen SARS-CoV-2 beschrieben, eignen sich aber auch allgemein für die Optimierung von infektionserologischen Testsystemen sowohl für die Routine-Diagnostik als auch für die Begleitung der Impfstoffentwicklung. Ein generelles Problem dieser Testsysteme ist es, dass viele Kostenträger der Gesundheitssysteme die Diagnostik der Infektionserologie auf Basis von Immunoassays besonders niedrig vergüten und die IVD-Hersteller sich damit einem enormen Kostendruck ausgesetzt sehen. Dies führt vielfach zu technischen Kompromissen ohne Rücksicht auf die Patientensicherheit. Viele technisch valide Lösungen werden daher noch kaum in der Routine-Diagnostik eingesetzt, obwohl sie nachweislich bessere Zuverlässigkeit ermöglichen. Denn sie führen zu einigen Cent Mehrkosten je Probe.

Im Rahmen der Corona-Pandemie sollte aber allen Beteiligten, angefangen bei den Kostenträgern, über die Laborärzte, Virologen und Epidemiologen und selbstredend den IVD-Herstellern, klar sein, dass Kosteneinsparungen von wenigen Cent je Probe keine noch so seltene potentielle Unzuverlässigkeit dieser Immunstatus-Diagnostik gegen Covid-19 rechtfertigen. Falsch-Positive bei diesen Tests können dazu führen, dass nach einem falsch-positiven Resultat in kritischen Bereichen durch spätere Infektion schwer erkennbare Super-Spreader entstehen, weil man diese fälschlicherweise als Covid-19-Immune und damit prinzipiell ungefährliche Personen eingestuft hat.

Dieser Artikel soll helfen, dieses Szenario möglichst umfassend zu verhindern und beschreibt mehrere parallele technische Strategien, von denen unserer Meinung nach keine einzige außer Acht gelassen werden sollte, um das gewünschte Ziel sicher zu erreichen. Nur wenn man alle diese technischen Ansätze gemeinsam einsetzt, werden wirklich zuverlässige IgG-Antikörpertests gegen SARS-CoV-2 kommerziell und in der Forschung verfügbar sein.

Bekannte Ursachen für „Kreuzreaktivitäten“ bzw. Falsch-Positive

Man kennt vier verschiedene Ursachen für Falsch-Positive in der Serologie:

1. ungünstig gewählte Fängerproteine
2. Kreuzreaktivitäten und biochemische Interferenzen
3. unzureichende Oberflächen-Blockierung für die Serologie und
4. Stabilität der Reagenzien.

Ein guter Assays ist nur unter Beachtung aller vier Aspekte entwickelbar. Daher gehen wir auf alle vier Aspekte getrennt ein.

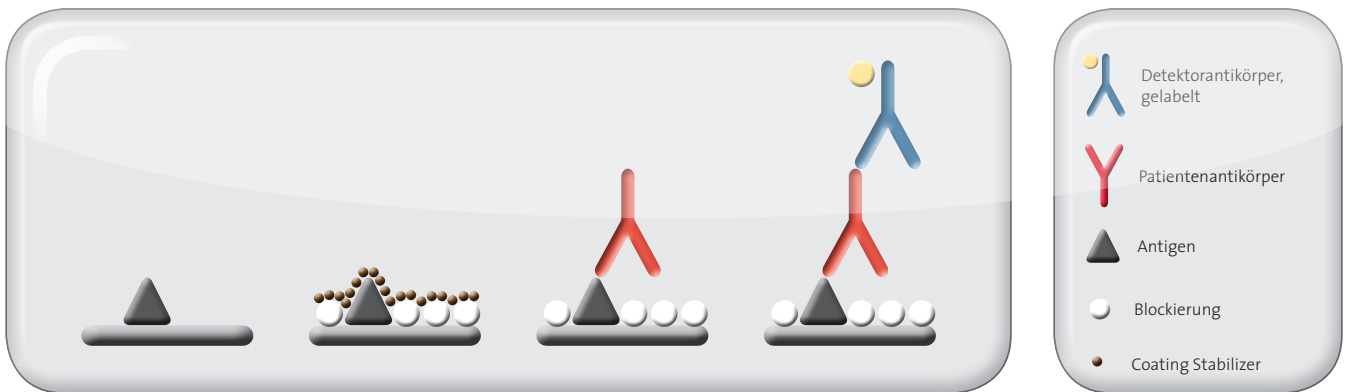


Abbildung 1 zeigt exemplarisch den Assay-Aufbau eines Antigen-Down-Assays wie er für die IgG-Nachweise gegen SARS-CoV-2 als ELISA eingesetzt wird.

1. Ungünstig gewähltes Fängerprotein

Das für viele Virologen offensichtlichste Problem ist das verwendete Fänger-Protein. Dieser Aspekt wird unter dem Stichwort der Kreuzreaktivität unter Virologen aktuell breit diskutiert und untersucht, weswegen wir ihn hier nicht im letzten Detail beleuchten [1]. Im Falle eines ELISA ist ein Fänger-Protein auf der Platte zu coaten, an das das spezifische IgG aus der Patienten-Probe binden soll. Es ist bekannt, dass eine vorangegangene Infektion mit anderen Coronaviren nicht sicher vor Covid-19 schützt, also keine echte Immunität vermittelt. Eine Immunität gegen einen anderen Coronavirus darf daher von einem SARS-CoV-2 IgG-Assay nicht detektiert werden. Da in diesem Falle gar nicht der SARS-CoV-2 mit seinen spezifischen Epitopen, sondern nur ein ähnliches Protein-Epitop erkannt wird, spricht man hier von einer Kreuzreaktivität. Kreuzreaktivität ist ganz allgemein die Bindung eines Antikörpers gegen ein strukturell ähnliches, jedoch nicht identisches Molekül. Im Fall der verschiedenen Coronaviren ist die Quelle der Strukturähnlichkeit die biologische Verwandtschaftsbeziehung [1]. Es kommen aber auch rein zufällige bzw. unerklärliche Kreuzreaktivitäten aufgrund ähnlicher 3D-Struktur (Strukturepitope) vor, obwohl der Rest der betreffenden Moleküle keinerlei Ähnlichkeiten zeigt. Detaillierter wird das Thema Kreuzreaktivitäten z.B. im Buch „Immunoassays“ Hrsg. von A.M. Raem und P. Rauch (Verlag Elsevier 1. Aufl. 2006; 2. Aufl. in Vorbereitung) beschrieben. Man muss deshalb Vorsorge treffen, dass ein SARS-CoV-2 IgG-Assay nicht solche Patienten-Antikörper positiv anzeigt, die bei anderen Coronavirus-Infektionen entstanden sind. Das wären sonst falsch-positive Ergebnisse. Wichtig in diesem Kontext ist es zu wissen, dass in der Regel nicht die Proteinsequenz, sondern die 3D-Struktur inkl. aller posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierungen, Phosphorylierungen etc. von den Antikörpern erkannt wird [3]. Man muss ein Fänger-Protein für einen zuverlässigen Antikörpertest daher in einer Zelllinie exprimieren, die identische oder nahezu identische Modifikationen erzeugt, wie die Zellen, die faktisch in einem erkrankten Patienten für die stärkste Virus-Expression verantwortlich sind [2]. Weder ein ungünstig gewähltes Fängerprotein noch ein suboptimal modifiziertes Protein oder Proteinfragment oder eines, das durch das Coaten seine native Faltung verloren hat, haben große Chancen, die Basis für einen zuverlässigen ELISA zu werden. Zudem ist die 3D-Struktur des gecoateten Fängers und dessen Modifikation auch während der Lagerung dauerhaft aufrecht zu erhalten. Denn anders als bei Forschungsassays, die direkt nach Produktion vermessen werden, muss ein Diagnostikum nicht nur massenproduktionstauglich, sondern auch konfektionierbar, versandfähig und dauerhaft lagerbar sein. Zudem sollte ein In-Vitro-Diagnostikum immer noch funktionieren, wenn es im Labor nicht unmittelbar nach Entnahme aus der Kühlung vermessen wird. Der letzte Aspekt wird beispielsweise bei ELISA-Prozessoren und Hochdurchsatz-Immunoassay-Systemen auch als on-board shelf life bezeichnet und kann ein mitunter nicht ausreichend validierter Punkt sein. Das alles muss möglich sein, ohne dass die Zuverlässigkeit des Assays durch schleichende Degradation des Fängermoleküls in Mitleidenschaft gezogen wird. Das sind ganz andere Anforderungen als sie an einen Assay im universitär-medizinischen Forschungsbereich zu stellen sind. Das Fängerprotein ist also eine zentrale Herausforderung dieser Art von Diagnostik und hier wird – je nach Auswahl – eventuell auch das Upscaling für einen Produktionsmaßstab für eine weltweite Versorgung eine nicht zu unterschätzende technische Aufgabe im Rahmen der Pandemie. Tatsächlich handelt es sich im Falle der hier befürchteten Bindung von spezifischen IgG's gegen andere Coronaviren also eigentlich gar nicht um eine unerwartete Kreuzreaktivität im ELISA, sondern darum, dass das präsentierte Epitop vorab ungünstig gewählt wurde. Mit der Auswahl des richtigen Epitops beschäftigen wir uns in diesem Artikel nicht, aber mit der unbedingt notwendigen optimalen Stabilisierung, die später noch genannt wird.

Gleichwohl hat man neben der Möglichkeit der genauen Auswahl, schonenden Aufreinigung, korrekten Behandlung und perfekten Stabilisierung der Fängerproteine noch einen zweiten, ganz anderen Ansatz gegen die gefürchteten Kreuzreaktivitäten, der vollkommen unabhängig vom Target und in nahezu jedem Immunoassay einsetzbar ist.

2. Kreuzreaktivitäten und biochemische Interferenzen

Selbst wenn die Auswahl des Fängermoleküles korrekt ist und dieses optimal gehandhabt wird, ist davon auszugehen, dass es Kreuzreaktivitäten geben wird – wenn auch nur bei einem Teil der Patienten. Es werden also Patientenantikörper, die eigentlich andere Coronavirus-Proteine aufgrund vorheriger Infektionen mit Coronaviren hochspezifisch und hochaffin binden können, zusätzlich auch die strukturell verwandten SARS-CoV-2 Proteine binden können, wenn auch mit niedrigerer Affinität. Dies kann ein positives Testergebnis erzeugen und damit eine Immunität vortäuschen. Was genau ist nun das Problem, wenn diese Patientenantikörper doch SARS-CoV-2 erkennen können?

Vereinfacht ausgedrückt können nur hochspezifisch und hochaffin bindende Antikörper eine gute Immunreaktion im Körper erzeugen. Wenn ein AK „nur“ niedrigaffin bindet, wird er ein Target im Körper nicht „ausreichend lang“ (sehr vereinfachte Formulierung, die hier der Vereinfachung und Verkürzung wegen genutzt wird) binden, um so die volle Aktivierung des Immunsystems zu erzeugen und genügend Viren zu inaktivieren. Wenn aber im Körper das Immunsystem durch die mittel- oder niedrigaffin bindenden Antikörper gar nicht aktiviert wird, dann besteht auch kein Immunschutz bzw. keine Immunität. Dennoch würde im Assay eine Bindung stattfinden, die auch als positives Ergebnis detektiert wird. Zudem gibt es bekanntermaßen viele andere Moleküle, die nur in vereinzelt Patientenproben in ausreichender Konzentration vorkommen, aber dann zu Interferenzen mit dem Ergebnis falsch-positiver und auch falsch-negativer Resultate führen können [4, 5]. Dies sind Moleküle und Antikörper, die von der Entstehung her überhaupt nichts mit einer Coronavirus-Infektion zu tun hatten, aber dennoch kreuzreaktiv sind. Spätestens seit der umfassenderen Forschung im Bereich der Autoimmunität ist klar, dass diese unbekannt und aus unserem Verständnis heraus nicht logisch erscheinenden Antikörper und Bindungsereignisse in Patientenproben immer wieder auftreten. Das eigentliche natürliche Target der kreuzreagierenden Antikörper ist hier häufig gar nicht bekannt oder wird nicht als immunogenes Target in einzelnen Patienten vermutet. Es handelt sich also um unerwartete, aber in der Routine immer wieder vorkommende Kreuzreaktivitäten und Interferenzen. Ein aus Platzgründen hier nicht näher zu beleuchtendes Feld sind dabei auch die Störungen, die sich bei der Immundiagnostik besonders bei rheumatisch Erkrankten, bei Personen mit Autoimmunitäten oder an Krebs erkrankten Patienten ergeben. Hierbei sind vielfach Interferenz-Phänomene beschrieben, die in ihrer genauen Ursache gar nicht bei jedem Einzelpatient nachvollzogen werden können. Schlimmer noch: Solche Interferenzen treten bei einzelnen Patientengruppen gehäuft auf, aber sie kommen auch bei klinisch unauffälligen Personen vor, wenn auch deutlich seltener. Das mag in der klinischen Diagnostik kein großes Problem darstellen, da nur „Patienten“ vermessen werden. Bei „Patienten“ hat man im Regelfall neben der Labordiagnostik eine vernünftige Anamnese, damit auch meist eine „Erwartungshaltung“ und bei unklaren bzw. unerwarteten Ergebnissen kann man erneut mit anderen Kits oder Methoden testen.

Der gute Laborarzt und behandelnde Arzt kann also falsch messende Labordiagnostik mitunter durch Erfahrung kompensieren. Im Fall von Covid-19 muss aber gescreent, also eine große Menge klinisch unauffälliger Personen getestet werden. Selbst eine nur im Promillebereich vorkommende unbekannt und unerwartete Störung hat hier große Auswirkungen und ist zu vermeiden, würde aber bei einer Validierung ggf. nicht auffallen. Wenn z.B. ein Kit mit einer Spezifität von 99 % aufwarten kann, klingt das zunächst sehr gut, ist aber bei einer Pandemie mit derzeit geringer Prävalenz unzumutbar. Unter der optimistischen Annahme, dass 5 % der Bevölkerung bereits immun gegen SARS-CoV-2 sind, hat bei einem positiven Ergebnis die getestete Person nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 84 % tatsächlich spezifische Antikörper gebildet [6]. Das würde bedeuten, dass man 16 von hundert als „immunisiert“ Getestete nach späterer Infektion als potenzielle Super-Spreader zu befürchten hat. In relevanten Bereichen, die mit hohem Personenkontakt einhergehen, kann man damit auf keinen Fall zufrieden sein.

Die hier diskutierten biochemischen Störungen bzw. Interferenzeffekte beruhen in aller Regel auf niedrig- bis mittelaaffinen Bindungen, ähnlich wie die klassischen Kreuzreaktivitäten, und solche Bindungen führen zu einem Signal im ELISA (oder je nach Assay-Format und Art der Bindung zur Auslöschung eines Signales). Zu unterscheiden ist davon die hochaffine Bindung, die im Assay tatsächlich detektiert werden soll. Dies ist in unserem Falle die hochaffine Bindung von spezifisch an SARS-CoV-2-Antigene bindenden Patientenantikörpern und die hochaffine Bindung des Detektorantikörpers an eben diese Patientenantikörper. Vor mehr als anderthalb Jahrzehnten wurde bereits die sogenannte LowCross-Technologie in den Markt eingeführt und wird seither in vielen immundiagnostischen Assays weltweit eingesetzt. Es wird ganz einfach der Probenverdünnungspuffer durch den LowCross-Buffer® ersetzt. Der Name LowCross® ist abgeleitet von „lower cross-reactivities“, weil dieses Diluent ganz allgemein Kreuzreaktivitäten, aber auch viele andere Formen von Interferenzen vermeiden hilft. Durch Einsatz von LowCross-Buffer® werden sehr zuverlässige und robuste Immunoassays ermöglicht. Wenn die Bindung der Antikörper an ihr Target in LowCross-Buffer® erfolgt, dann werden sehr zuverlässig und vollkommen unabhängig von ihrer molekularen Ursache alle niedrig- bis mittelaaffinen Bindungen signifikant reduziert, während hoch

affine Bindungen – also die eigentlichen „wahren“ Signale des Assays – nicht beeinflusst werden. Signale sind mit oder ohne Verwendung von LowCross-Buffer® also identisch, wenn sie von hochaffinen Antikörpern (im Falle von SARS-CoV-2 hochaffine Antikörper, die in Folge einer Infektion oder durch Impfung entstanden sind) erzeugt werden. Wenn jedoch nur eine Kreuzreaktivität durch Antikörper, die eigentlich gegen andere Corona-Viren oder ganz andere Targets gebildet wurden, vorliegt, also das SARS-CoV-2 Fängerprotein nur mit niedrigerer Affinität gebunden wird und somit im Falle einer neuen Infektion auch keine schützende Immunreaktion ausgelöst würde, dann werden diese Patientenantikörper im Assay-Diluent LowCross-Buffer® nicht binden und kein Signal erzeugen.

LowCross-Buffer® hilft somit die gefürchteten falsch-positiven Signale zu vermeiden. Sollte also in LowCross-Buffer® ein positives Signal angezeigt werden, dann ist davon auszugehen, dass die Patientenprobe Antikörper enthält, die das Fängerprotein – und damit SARS-CoV-2 – hochaffin binden. Sind diese spezifischen Antikörper des Patienten in ausreichender Konzentration vorhanden, so ist nach allgemeiner Lehrmeinung davon auszugehen, dass neu in den Körper eingebrachte Viren unschädlich gemacht werden. Der Patient ist immun. LowCross-Buffer® ermöglicht es also – auch wenn es nicht spezifisch für die Corona-Virus-Diagnostik entwickelt wurde – auch in diesem Falle, dass Interferenzen, die bei nahezu allen Analyten in der Immundiagnostik auftreten können, vermieden werden können und somit die gewünschte Zuverlässigkeit eines Immunoassays signifikant erhöht werden kann. LowCross-Buffer® ist ready-to-use, wird also einfach unverdünnt anstelle anderer Diluents eingesetzt, um die gewünschte Wirkung zu erzielen. Die generelle Erhöhung der Zuverlässigkeit von Immunoassays durch die LowCross®-Technologie, die durch den einfachen Austausch des Assay-Diluents für nahezu jeden ELISA und auch für andere Formate wie Lateral-Flow-Assays (Einsatz als Chase- bzw. Flow-Buffer), Luminex-Assays, Protein-Arrays, automatisierte Hochdurchsatz-Immunoassay-Systeme und andere Formate einsetzbar ist, wurde im vergangenen Jahrzehnt vielfach beschrieben und ist ein bewährtes Mittel für hochwertige Immundiagnostika. Warum wird LowCross-Buffer® dann nicht in jedem Immundiagnostikum eingesetzt? Die Hauptgründe für den geringen Einsatz speziell im Bereich der Infektionsserologie liegen im bereits erwähnten Kostendruck aufgrund der geringen Wertigkeit von Diagnostika im Gesundheitssystem. Zudem wird vielfach auf ein „one-buffer-fits-all“ Konzept gesetzt, sodass der Austausch des alten Diluent gegen ein Besseres häufig technisch möglich ist, aber die gleichzeitige Revalidierung ganzer Assaypanels, die auf automatisierten Systemen oder teilautomatisierten ELISA-Prozessoren angewendet werden, zur Folge hätte. Diesen Aufwand scheuen manche Hersteller.

Falsch-Positive im Rahmen einer Covid-19 Pandemie sollten aber sicherlich nicht so hingenommen werden, wie dies mit vielen Falsch-Positiven in der etablierten Infektionsserologie geschieht. Laborärzte und Virologen, die im Rahmen der Covid-19 Pandemie mit der jeweiligen regionalen und nationalen Bekämpfung befasst sind, sollten selbst prüfen, ob sie hier Kompromisse in Bezug auf die Ergebniszuverlässigkeit eingehen wollen oder ob man sich von den jeweiligen Herstellern der Immundiagnostika den Einsatz etwa der LowCross®-Technologie oder einer vergleichbaren alternativen Strategie – so sie denn existieren sollte – vorsichtshalber bestätigen lässt, bevor man sich für den breiten Einsatz von IgG-Assays bei Covid-19 entscheidet. Sollten andere gleichwertige oder bessere Technologien bekannt sein oder bekannt werden, stünde dem Einsatz anderer Technologien natürlich auch nichts entgegen.

Wichtig ist es zu verstehen, dass Assay-Diluents, wie sie etwa auf Basis von PBS, BSA, Tween bzw. ähnlichen Formulierungen oder im schlechtesten Falle auf Basis von Milchpulver oder mit Zusatz von FCS (fötales Kälberserum) in der Literatur vielfach beschrieben sind, keine Möglichkeit bieten, die Affinität als Kriterium für die Güte einer Antikörperbindung aktiv in einen Assay einzubinden. Sie bieten also keine ergänzende Sicherheit gegen Kreuzreaktivitäten. Es können so sogar noch undefinierte Substanzen in den Assay eingeführt werden, die zu weiteren Kreuzreaktivitäten führen können [1].

Die LowCross®-Technologie und deren Einsatz in der Diagnostik wurde bereits im Jahr 2005 mit einem Artikel in der IVD-Technology diskutiert und wird seither vor allem in hochwertigen Diagnostika für die Onkologie, für moderne Biomarkerbasierte Diagnostik und zum Teil in der Infektiologie weltweit eingesetzt [7].

3. Oberflächenblockierung für die Serologie – eine unterschätzte Herausforderung

Eine besondere Herausforderung für alle infektionsserologischen ELISA stellt die Blockierung der ELISA-Platte dar. Eine gute Blockierung stellt sicher, dass es nicht – unabhängig vom Vorhandensein eines Analyten – zu unspezifischer Bindung von Assaykomponenten an die Oberfläche kommt. Bei den hier diskutierten Antigen-Down-Assays darf die Blockierung zudem die Epitope des Fängers nicht zu stark überdecken und es müssen Kreuzreaktivitäten des Detektors mit der Blockierung (ggf. unter Vermittlung von Bestandteilen der Patientenproben), wie sie auch schon bei kommerziellen Antikörpertests für SARS-CoV-2 beobachtet wurden [1, 8], sicher vermieden werden.

Es ist allgemein bekannt, dass Proteine sehr gut zur Blockierung von ELISA-Platten geeignet sind. Aber es geht nicht nur um primäre Blockierung, also den einmaligen Aufbau einer möglichst lückenlosen Schicht auf der Oberfläche, sondern auch um Vermeidung des Ablösens einzelner Moleküle aus der Blockierungsschicht im Verlauf des Assays. Speziell im Falle der Serologie fällt es auf, dass die Serum- und Plasmaproben einzelner Patienten dazu neigen, einzelne Moleküle einer vorher dichten Blockierungsschicht abzulösen und im Rahmen einer Austauschreaktion die Einlagerung anderer Moleküle auf der Oberfläche in die Blockierungsschicht ermöglichen. Hierbei handelt es sich meist um Antikörper der Patienten, die sich in die Blockierungsschicht durch Austausch einlagern können (der genaue Mechanismus und vor allem die Gründe, warum dieses Phänomen bei manchen Seren verstärkt auftritt, sind weitgehend unklar). Als Folge ergeben sich hohe Hintergrundwerte, falls die Serumproben der Patienten nicht ausreichend hoch verdünnt werden. Hohe Probenverdünnungen von 1:100 oder mehr haben aber den Nachteil, dass spezifische Antikörper, die in geringer Konzentration vorliegen, eventuell nicht mehr nachweisbar sind, obwohl sie klinisch gesehen sehr relevant sein können. Das Blockierungsproblem der Austauschreaktionen betrifft generell Assays im Antigen-Down-Format bei dem mit Anti-Antikörpern detektiert wird, also beispielsweise die infektionsserologischen Assays. Zudem kann es bei verschiedenen Blockierungsreagenzien auch zu durch Serumproteine vermittelte Quervernetzungen zwischen Blockierung und Detektorantikörper kommen. Ein solches Phänomen ist auch bei einem aktuellen ELISA zum Nachweis spezifischer Patientenantikörper gegen SARS-CoV-2 beschrieben worden [1]. Solche Effekte sind patienten- und assayspezifisch. Der Blockierung von ELISA-Platten für die Serologie ist also ein hohes Maß an Aufmerksamkeit zu widmen, wenn man Falsch-Positive sicher vermeiden möchte.

Unabhängig vom SARS-CoV-2 IgG-ELISA möchten wir zufügen, dass die einmalige Testung des möglichst niedrigen „Hintergrundes“ ohne Zufügen eines Analyten (Vermessung eines „Leerwertes“) nicht etwa ein hinreichender Schritt einer Assay-Validierung in Bezug auf die Wahl des Blockierers ist, sondern allenfalls ein erster Vorversuch einer professionellen Assay-Entwicklung sein kann. Vergleiche von Variationskoeffizienten von verschiedenen Blockierungen mit statistisch relevanten Wiederholungen zeigen sehr viel deutlicher die Unterschiede in der Blockierungseffizienz als ein einzelner Hintergrundwert dies jemals könnte. Ein einfaches Beispiel, wie schlecht zum Beispiel eine BSA-Blockierung gegenüber einer Blockierung mit The Blocking Solution von CANDOR abschneidet, obwohl der Absolut-Wert des Hintergrundes (gemessen als „Leerwert“) in diesem Assay nicht unterscheidbar war, zeigt ein sehr einfacher Vergleichstest hier anhand eines kompetitiven ELISAs.

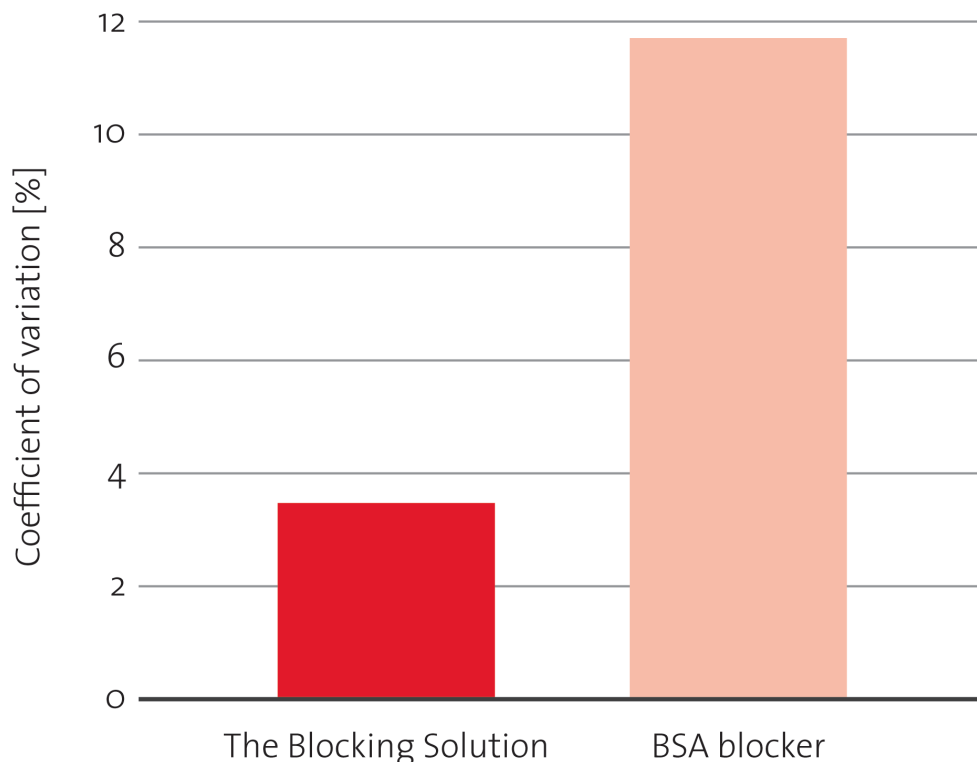


Abbildung 2: Verringerung des Variationskoeffizient (VK) mit n = 96, gemessen am Maximalwert Bo. Die verbesserte Blockierung durch The Blocking Solution lässt sich im Rahmen einer Assay-Validierung eindeutig quantifizieren.

Gänzlich abgelehnt werden muss im Kontext medizinisch relevanter Forschung der Einsatz von undefinierten Lebensmitteln wie etwa Milchpulver zur Blockierung. Die „Reinheit“, von der man hier eigentlich gar nicht sprechen sollte, schwankt in einem Maße, dass man über andere Parameter der Chargenkonsistenz gar nicht mehr diskutieren muss. Ungeprüfte und schlecht konditionierbare Lebensmittel in der medizinischen Forschung sollten keinerlei Zustimmung in einer verantwortungsbewussten Forschungsgemeinde finden, zumal viele kommerzielle und gut Chargen-konsistente Lösungen von spezialisierten und genau dafür zertifizierten Herstellern auf dem Markt verfügbar sind. Gleichwohl wird immer noch auf Basis von Milchpulver-Blockierung im universitären Umfeld gearbeitet, wie man aus vielen – ansonsten hochwertigen – Artikeln entnehmen kann. Dem sollte insbesondere dann ein Riegel vorgeschoben werden, wenn die Zuverlässigkeit eines Assays von entscheidender Bedeutung ist. Niemand würde auf die Idee kommen, auf einem Bauernhof gefangene Mäuse für klinische Studien einzusetzen. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit nutzt man ausschließlich definiert gehaltene und eindeutig charakterisierte Labortiere. Die gleiche Sorgfalt sollte man als Wissenschaftler bei der Auswahl guter Lösungen für den Aufbau eines Immunoassays verwenden und nicht adäquat gereinigte Lebensmittel, wie etwa Milchpulver, sind generell aus jedem Labor zu verbannen. Zumal Milchpulver ohnehin nur ein ganz passabler, aber keineswegs ein guter Blockierer ist, wie der unten gezeigte Vergleich belegt.

Speziell aufgrund der Serologie-Problematik mit ihren Austauschreaktionen und den daraus entstehenden Tendenzen zu Hintergrund und Ausreißern bei einzelnen, seltenen Patientenproben werden seit Jahren immer weiter optimierte Blockierer entwickelt. Im Falle von CANDOR zunächst die universell einsetzbare The Blocking Solution und später der auf Basis dieser Erfahrungen für besonders kleine Fängermoleküle empfohlene SmartBlock™. In infektionsserologischen Assays konnte im Rahmen von Entwicklungsprojekten mit etablierten Diagnostika-Produzenten in exemplarischen Produktgruppen gezeigt werden, dass beim kombinierten Einsatz von LowCross-Buffer® als Assay-Diluent und SmartBlock™ als Blockierer auf Standard-ELISA-Platten im Rahmen der durchgeführten Validierungen gar keine Patientenproben mehr gefunden wurden, die falsch-positive Ergebnisse zeigten. Dennoch erfordert die Frage der Blockierung eine Assay-spezifische Lösung. Der PlateBlock™ ist ein neuentwickelter, proteinfreier Blockierer, der daraufhin optimiert wurde, die genannten Austauschreaktionen besonders umfassend zu verhindern. Bisherige Testungen deuten auf eine sehr gute Anwendbarkeit in der Infektionsserologie hin (siehe auch Abb. 4). CANDOR erarbeitet mit Partnern gerade einen umfassenden Vergleich verschiedener Blockierer zur Verwendung in der Covid-19 IgG-Diagnostik. Wir sind zuversichtlich bald, neben den verschiedenen hier aufgezeigten Optionen, eine konkrete Empfehlung für SARS-CoV-2 Anti-IgG ELISA geben zu können, damit möglichst viele Diagnostika ohne großen Aufwand auf beste Zuverlässigkeit hin optimiert werden können. Die Produkte der CANDOR sind sowohl in Kleinvolumina für die Forschung als auch für die Produktion kommerzieller Hochvolumen-Diagnostika erhältlich.

4. 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 Haltbarkeit der kommerziellen Kits von entscheidender Bedeutung. Im Falle eines IgG-ELISAs für Covid-19 sind hier vor allem die gecoateten Fängermoleküle relevant, aber auch der gelabelte Detektor. Für den gelabelten Detektor steht neben dem vielfach bewährten HRP-Protector™ auch ein Stabilizer auf Basis von LowCross® (LowCross® HRP-Stab) zur Verfügung. Sofern sich Patienten-vermittelte Kreuzreaktionen zwischen Detektor und Blockierer fänden, wäre der Einsatz von LowCross® HRP-Stab angezeigt. Zudem könnte dieser genutzt werden, wenn das Detektorkonjugat direkt als Proben-Diluent eingesetzt werden soll, wodurch sich die Komplexität des Protokolls reduziert. Man kann so sehr schnelle Einschnitt-Inkubations-ELISA aufbauen, die durch den LowCross®-Effekt ähnlich zuverlässig sein können, wie sequenzielle ELISA mit mehreren Waschschritten. Aktuell gehen wir jedoch eher davon aus, dass ein sequenzielles Format mit Waschschritten aufgrund der enormen Wichtigkeit der Vermeidung aller falschen Resultate speziell bei SARS-CoV-2 vorteilhaft sein könnte. HRP-Protector™ ist in diesem Falle eventuell eine ausreichende Lösung, um Sicherheit beim Detektorkonjugat für mehrere Jahre bzw. auch beim internationalen Versand mit möglicherweise unsicheren Kühlketten zu garantieren und eine rasche Detektionsreaktion zu ermöglichen, da die Assayperformance des HRP-Protector™ im Vergleich zu vielen anderen kommerziellen HRP-Stabilizern ausgezeichnet ist. Die enorme Wichtigkeit der Vermeidung von Falsch-Positiven in der aktuellen Pandemie im Speziellen und bei auftretenden Zoonosen mit hoher Infektiosität im Allgemeinen spricht jedoch deutlich für den Einsatz der LowCross®-Technologie auch bei diesem Schritt des ELISA. Vergleicht man die Entstörung eines ELISA mit einem kompletten Airbag-System, handelt es sich beim Einsatz von LowCross® HRP-Stab als Diluent für den Detektor-Antikörper sicherlich nur noch um einen Seiten-Airbag, der aber im selteneren Falle eines Seitenaufpralles doch die entscheidende zusätzliche Sicherheit bieten kann. Wichtigster Airbag bleibt der unverdünnt eingesetzte LowCross-Buffer® als Proben-Diluent.

Für die Stabilisierung des gecoateten Fänger-Moleküls ist es allgemein notwendig, sowohl eine gute Stabilität durch eine geschlossene und gleichmäßige Schichtbildung auf den Fänger-Molekülen als auch eine gute Ablösung der Komponenten von den Epitopen bei Durchführung des Assay zu erhalten.

Coating-Stabilizer sind von diversen Anbietern erhältlich. Die Produktgruppe der Liquid Plate Sealer® wurde von CANDOR Bioscience vor etwa einem Jahrzehnt vorgestellt und mittlerweile bei Millionen von Proben eingesetzt. Neben der herausragenden Stabilisierung im Vergleich zu alternativen Lösungen ist eine Besonderheit beim Liquid Plate Sealer® die Möglichkeit, diesen für die Blockierung und Stabilisierung in einem produktionstechnisch sehr angenehmen Schnellverfahren für klassische Sandwich-ELISA mit Fänger-Antikörpern einzusetzen. Man coatet den Fänger in ca. 50 µl Coating Buffer, lässt in einem Inkubationsschritt den Fänger an die Platte binden und pipettiert dann ohne weitere Waschschriffe direkt 100-150 µl des Liquid Plate Sealer® hinzu (Abb. 3). Nach kurzer Inkubation kann die Lösung abgesaugt und die Platte getrocknet und eingeschweißt werden. Dieser Prozess wird auch in den Produktinformationen entsprechend beschrieben.

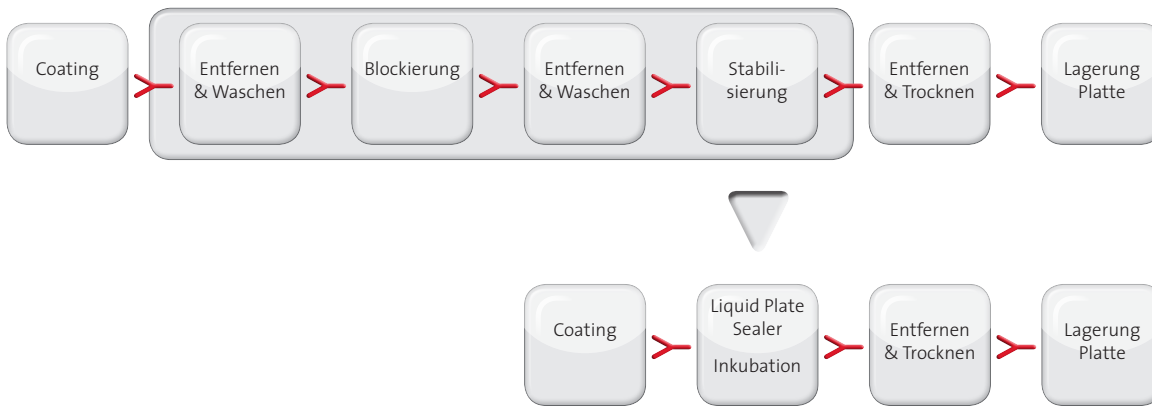


Abbildung 3: ELISA-Platten-Produktion im Schnellverfahren mit Liquid Plate Sealer® als Blockierer und Coating Stabilizer in einem einzigen Verfahrensschritt ist geeignet für Sandwich-ELISA und kompetitive Tests, bei denen kein Anti-Antikörper-Detektor eingesetzt wird.

Auch die Weiterentwicklungen, nämlich der speziell für die Veterinärdiagnostik formulierte Liquid Plate Sealer® animal free und der auch bei herausfordernden Struktur-Epitopen eingesetzte Liquid Plate Sealer® Plus ermöglichen diese rasche Produktionsweise ohne getrennte Blockierung.

Die Blockierung im Falle der Serologie muss, wie zuvor beschrieben, speziellen und anderen Anforderungen gerecht werden als bei den meisten anderen Immundiagnostika, bei denen die hier erläuterte schnellere Produktionsweise angebracht und ausreichend ist. Wir halten das Schnellverfahren ohne getrennte Blockierung, unabhängig vom eingesetzten Coating-Stabilizer, für Covid-19 IgG-Diagnostika und allgemein für Tests, die mit Anti-Antikörpern als Detektor-Molekülen arbeiten, ausdrücklich nicht für empfehlenswert! In einem einfachen Blockierer-Testaufbau wird hier die Resilienz gegen Austauschreaktionen dadurch getestet, dass die Platte blockiert wird, auf der Platte humanes Poolserum in Assay Diluent inkubiert wird und dieses dann nach dem Waschen der Platte mit einem Sekundär-Antikörper detektiert wird. Sofern die Blockierung sicher verhindert hat, dass IgG's sich an die Platte anlagern oder in die Blockierungsschicht einlagern, ist kein Signal zu sehen. Es zeigen sich sehr deutliche Unterschiede in der Eignung der verschiedenen Blockierer für Antigen-Down-Assays (Abb. 4). Vollständig ungeeignet als Blockierer für dieses Assay-Format in der Serologie erweisen sich sowohl Milchpulver als auch Coating Stabilizer, die nur im Einschritt-Verfahren zur Blockierung eingesetzt werden (hier gezeigt am Beispiel des Liquid Plate Sealer®, der in diesem Test im Einschritt-Verfahren ohne zusätzliche Blockierung eingesetzt wurde). Das trifft auch für Einschritt-Coating Stabilizer anderer Anbieter zu (Daten nicht gezeigt). Beim Test schneidet PlateBlock™ deutlich als bester Kandidat ab.

Sofern man auf Stabilisierung verzichtet, ist davon auszugehen, dass es – wie mit sehr vielen gecoateten Proteinen – sukzessive zu einer Degradation der nativen Faltung der Moleküle im Verlauf der Lagerung oder des ggf. nicht optimal gekühlten Transportes kommt. Bei Einsatz eines optimalen Coating Stabilizers lässt sich dies so gut verhindern, dass man, aufgrund der hohen Stabilität der ELISA-Platten, sogar auf Kühlketten während des Transportes verzichten könnte. Die Stabilizer der Liquid Plate Sealer® Produktgruppe eignen sich hervorragend in Kombination mit vorheriger Blockierung durch PlateBlock™ oder andere Blockierer, bieten also ausgezeichneten Schutz für serologische Assays.

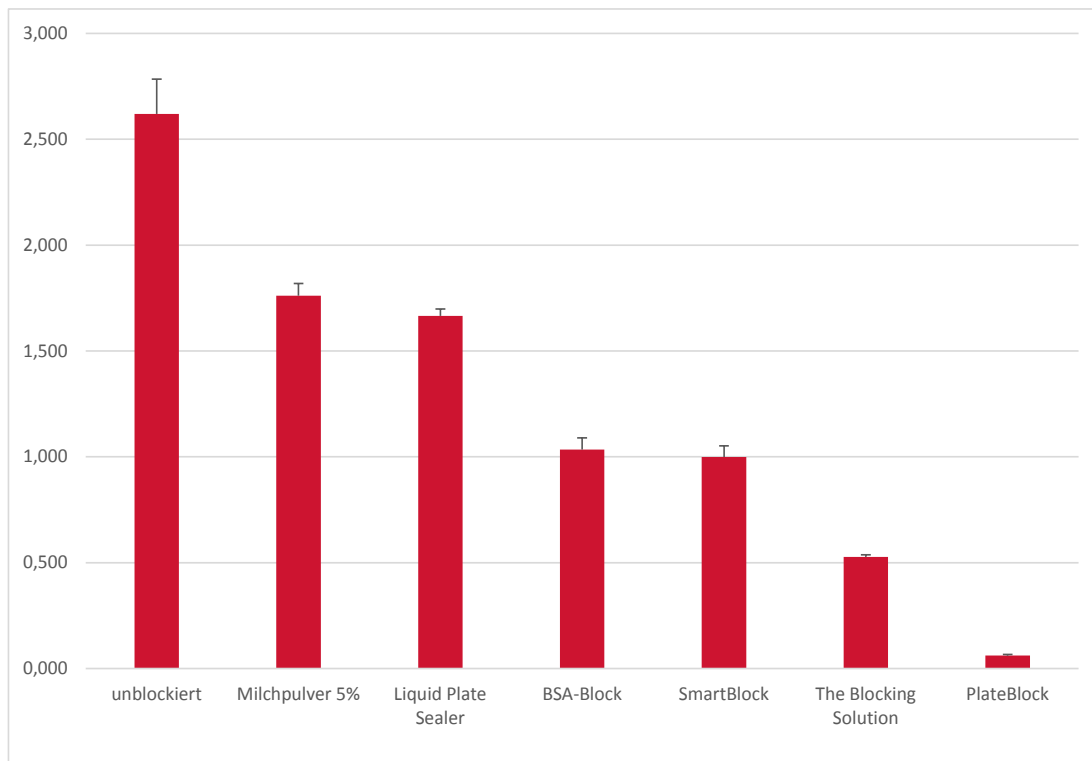


Abbildung 4: Blockierervergleich für die Serologie: Eine Nunc MaxiSorp-Platte wurde mit verschiedenen Blockierern abgesättigt und danach mit einem humanen Pool-Serum in Verdünnung 1:10 im Assay Diluent Sample Buffer von CANDOR auf der Platte inkubiert (jeweils $n = 4$; Fehlerbalken entsprechen einer Standardabweichung). Nach dem Waschen wird die Anlagerung von Antikörpern aus dem Serum mit einem Peroxidase-gelabelten Anti-Human-AK detektiert.

Idealer ELISA-Aufbau in Kurzfassung

1. Coating des korrekt gewählten und produzierten Fängerproteins.
2. Absaugen oder Ausklopfen der Platte (nicht waschen)
3. Blockierung mit PlateBlock™ bei anschließender Stabilisierung mit Liquid Plate Sealer® (je nach ausgewähltem Fänger-Epitop vermutlich eher mit Liquid Plate Sealer® Plus).
4. Absaugen oder Ausklopfen der Platte (nicht waschen), Trocknen und Lagern
5. Verdünnung der Patientenprobe (1:10 bis 1:50) in LowCross-Buffer® und Inkubation auf der Platte.
6. Nach dem Waschen Inkubation mit in LowCross® HRP-Stab (oder HRP-Protector™) gelagertem Detektor-Konjugat.
7. Detektion mit Substrat nach erneutem Waschen.

Hinweise:

Es sollte nicht auf Waschschritte im Assay-Protokoll zugunsten schnellerer ELISA-Durchführung verzichtet werden.

Die Serumprobe sollte nicht zu stark verdünnt werden.

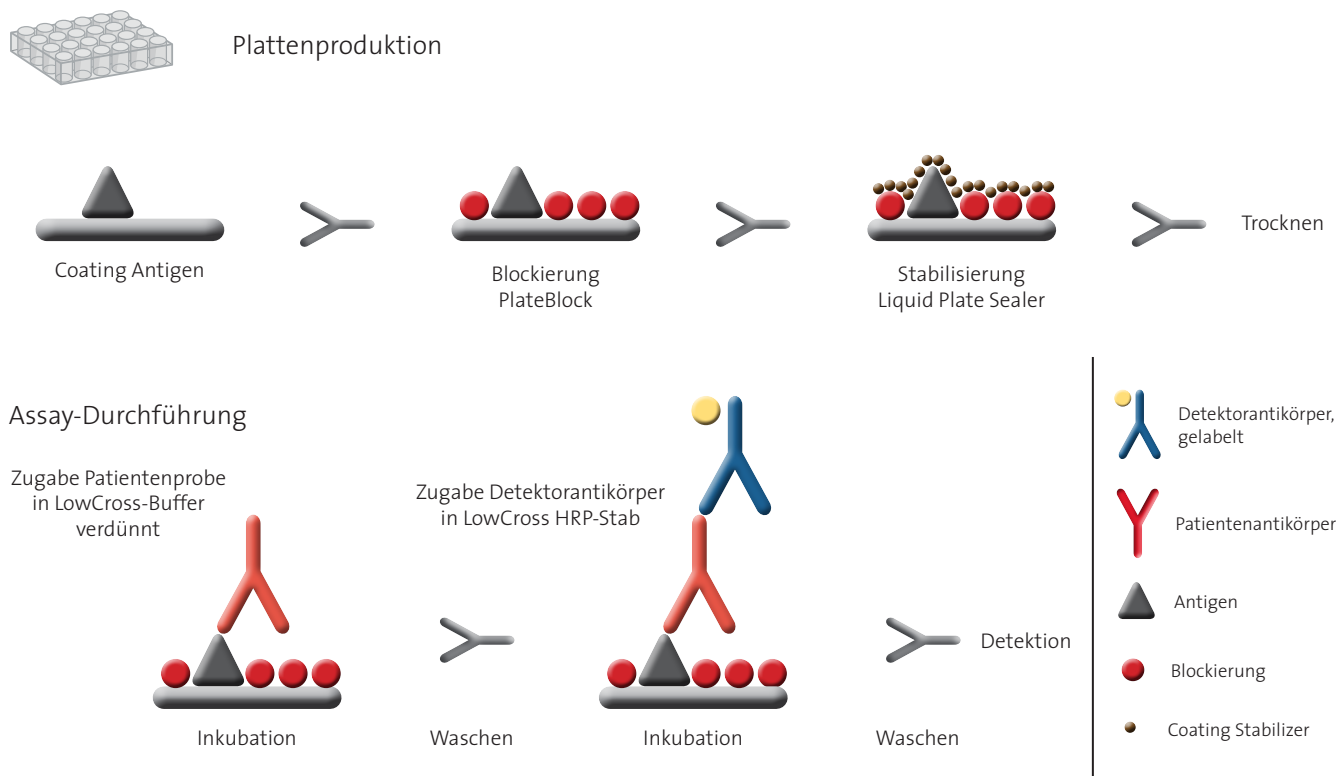


Abbildung 5: idealer ELISA-Aufbau für die Serologie als Schema.

Fazit

Die Entwicklung zuverlässiger Immundiagnostika für Covid-19 ist eine komplexe Herausforderung, die nicht nur von der Expertise von Virologen, sondern auch von erfahrenen Praktikern aus dem Bereich der Immundiagnostik profitieren kann. Zuverlässigkeit ist nur erreichbar, wenn die besten Werkzeuge gegen alle potenziellen Ursachen für Fehlbestimmungen kombiniert werden.

Wir gehen davon aus, dass auch für Covid-19 bald sehr zuverlässige Antikörper-Tests verfügbar sein werden, die mit modernsten Tools der Immundiagnostik ausgerüstet sind. Aktuell sehen wir noch keine voll nutzbaren Antikörper-Tests auf dem Markt, die unseren Qualitätsansprüchen genügen und auf die man sich wirklich verlassen kann. Da mehrere suboptimale Assays bereits publiziert wurden und angewendet werden und erste kommerzielle Diagnostika auch nicht signifikant besser optimiert erscheinen, haben wir uns entschlossen, diesen Artikel zu publizieren, um das technische Wissen zur Optimierung von Immunoassays auch im virologischen Umfeld zu erweitern.

CANDOR Bioscience steht prinzipiell allen Interessierten bei der Optimierung von Immunoassays auch persönlich beratend zur Seite und verfolgt seit mehr als 15 Jahren erfolgreich das Ziel, die Immundiagnostik sowie Immunoassays für die Forschung sukzessive zuverlässiger zu machen. Einige einfache Schritte – auch zur nachträglichen deutlichen Verbesserung der ersten kommerziellen Tests durch deren Anbieter nutzbar – haben wir hier jedem Interessierten zugänglich gemacht. Wir hoffen so, unseren Beitrag zur Eindämmung der durch Covid-19 ausgelösten Krise leisten zu können.

Literatur

- [1] Okba NMA, et al. „SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients.“ medRxiv (2020).
- [2] Amanat F, et al. „A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans.“ medRxiv (2020).
- [3] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, & Velesler D (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. Cell.
- [4] Rauch P, et al.; Assayoptimierung: Störeffekte in Immunoassays erkennen und vermeiden; LABORWELT; 4-2005
- [5] Park YP, Kricka LJ (2013) Interference in Immunoassays, Chapter 5.3 in Wild DG (ed.) The Immunoassay Handbook (fourth Edition), ELSEVIER
- [6] Richter SM; Spezifität, positiver Vorhersagewert und Validierungsstatistik im Kontext von CoViD-19; free for download on www.candor-bioscience.de; 4-2020
- [7] Polifke T & Rauch P; Affinity discrimination to avoid interference in assays; IVD Technology; 3-2009
- [8] Lassaunière R, Frische A, Harboe ZB, Nielsen AC, Fomsgaard A, Kroghfelt KA, & Jørgensen CS (2020). Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays. medRxiv.

CANDOR Bioscience GmbH
Simoniusstrasse 39
88239 Wangen
www.candor-bioscience.de
support@candor-bioscience.de