

Der SARS-CoV2 Interferon-gamma Release Assay (IGRA)

T-Zell-Stimulation im Lithium-Heparin Vollblut auf Basis des hochimmunogenen Spike-Proteins und anschließender Nachweis des freigesetzten IFN-mittels ELISA (Kosten ca. 20€ pro Probe)

INHALT (STRG+Mausklick um Link zu folgen)

1. [Immunantwort auf Sars-CoV2](#)
2. [Immunologische Bedeutung von Interferon-gamma](#)
3. [Testprinzip des Sars-CoV2 IGRA](#)
4. [WICHTIGE Präanalytik des Sars-CoV2 IGRA](#)
5. [Indikation zur Durchführung Sars-CoV2 IGRA](#)
6. [Grenzen des Verfahrens](#)

1. Immunantwort auf Sars-CoV2

Beide Säulen des Immunsystems – sowohl die Antikörper- als auch die T-Zell-Antworten – sind für die Entwicklung einer Immunität gegen SARS-CoV-2 von Bedeutung. Derzeit geht man davon aus, dass insbesondere IgG-Antikörper gegen die S1-Untereinheit des SARS-CoV-2-Spike-Proteins und spezifische, potenziell langlebige, reaktivierbare T- u. B-Zellen (“memory cells”) die entscheidende Rolle bei der Neutralisierung des Virus und dem Erhalt des Immunschutzes spielen. Während Antikörper-Spiegel nach einer natürlichen Infektion wie auch nach einer Impfung abfallen und vermutlich nach einiger Zeit nicht mehr im Serum nachweisbar sein können, bleibt das Immungedächtnis allerdings sehr wahrscheinlich lebenslang reaktivierbar. Hierbei korreliert die Höhe der gebildeten Antikörper mit dem Ausmaß der Gedächtniszell-Stimulierung (s. Abb. 1). Somit werden Genesene und Geimpfte vor schweren Krankheitsverläufen durch ihr Immungedächtnis dauerhaft geschützt sein, während für den Schutz vor leichten bis mittelschweren Infektionen eine erneute Impfung („Booster-Impfung“) nach einem noch zu bestimmenden Zeitraum erforderlich sein wird. Nach COVID19 Infektion konnte bisher ein immunologisches Gedächtnis für 8 Monate nachgewiesen werden. Nach vollständiger Sars-CoV2 Impfung wurde in Studien 6-8 Monate Immunschutz bei mehr als 90% der Geimpften gezeigt. Hierbei ist das Muster der Immunantworten und der aktivierten Zellen sehr individuell (s. Abb. 2).

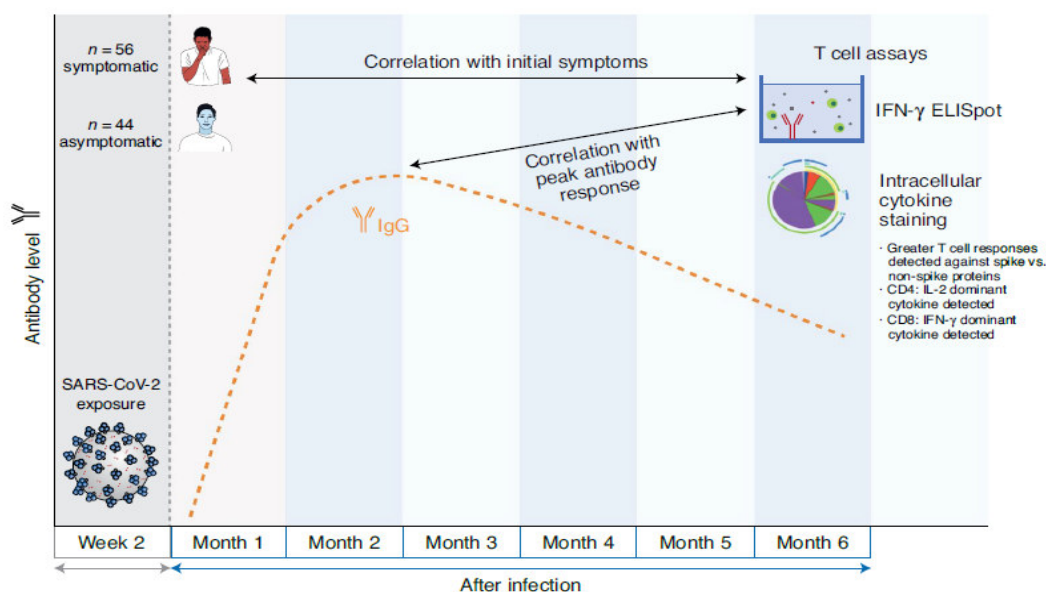


Abb. 1: Immunschutz nach Sars-CoV2 Infektion (Quelle: Jagannathan & Wang, Nature Immunology, April 2021)

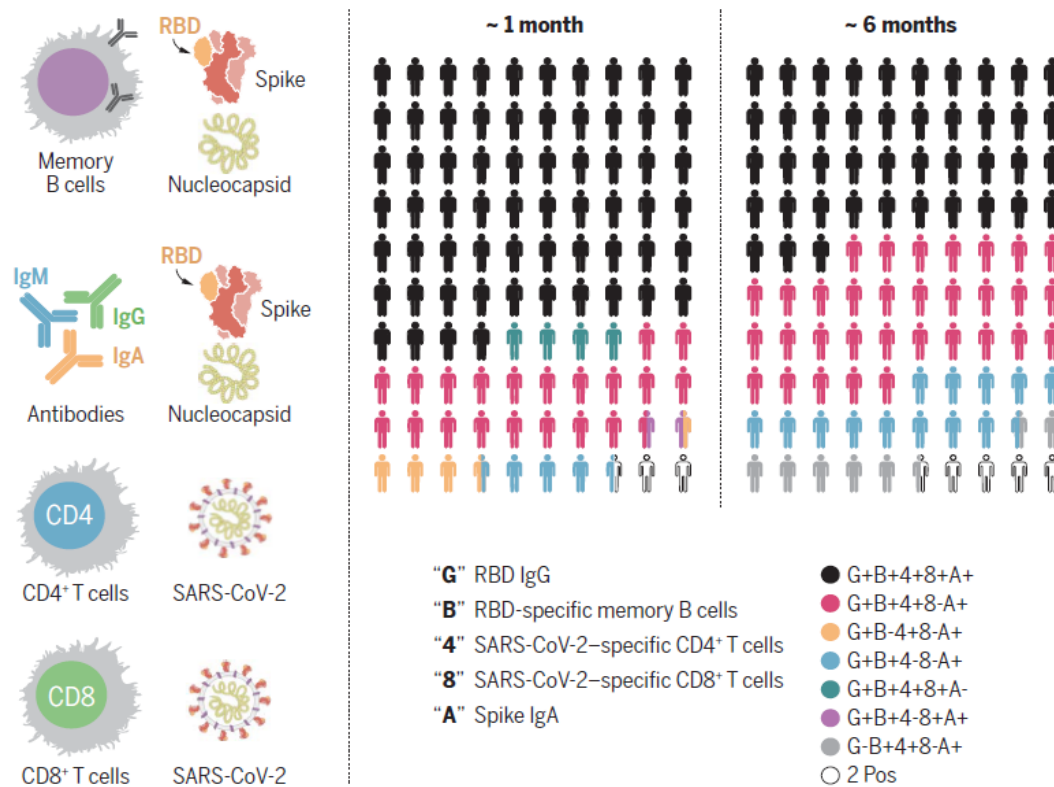


Abb. 2: Immungedächtnis und Varianz in der Verteilung der Immunantwort bei 19 Individuen 1 Monat und 6 Monate nach COVID 19 Infektion (Quelle: Dan et al., Science 371, 587 (2021))

2. Immunologische Bedeutung von Interferon-gamma (Quelle u.a. DocCheck Flexikon)

Interferon-gamma (Glykoprotein) ist ein wichtiges Signalmolekül des Immunsystems, welches von einigen Zellen des Immunsystems freigesetzt wird. CD4-positive TH1-Zellen bilden Interferon-gamma nach Kontakt mit einem Makrophagen oder einer anderen antigenpräsentierenden Zelle, welche Antigene phagozytiert hat. Interferon-gamma ist das Marker-Zytokin der TH1-Zellen. Weitere, zur Interferon- γ -Produktion fähige Zellen sind CD8-positive T-Zellen, dendritische Zellen sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die Hauptaufgabe des Interferon-gamma ist die Aktivierung von Makrophagen und damit die Stimulation und Unterstützung der zellulären Abwehr. Auf der Oberfläche normaler Zellen führt Interferon-gamma zu einer Erhöhung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, um hier ebenfalls die Antigenpräsentation zu optimieren. In Bezug auf die B-Zell-Aktivität führt Interferon-gamma zu einem Klassenwechsel der Antikörper von IgM zu IgG.

3. Testprinzip des Sars-Cov2 IGRA (s. auch Abb. 3)

Der Interferon-gamma Release Assay („IGRA“) ist im Testformat ein klassischer Sandwich-ELISA (Mikrotitergefäße beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen humanes Interferon-gamma; Zugabe von Biotin-markierten Anti-Interferon-gamma- Antikörpern; enzymatischer Nachweis über Streptavidin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase; Farbintensität proportional zur Interferon-gamma-Antigen Konzentration) und ermöglicht die Bestimmung der T-Zell-Aktivität gegen SARS-CoV-2 in Vollblutproben. Der Nachweis basiert auf einer in der Mikrobiologie etablierten ELISA-Methode und kann automatisiert durchgeführt werden. Der Test ist zurzeit ein RUO-Test („Research use only“) und befindet sich noch in der wissenschaftlichen Evaluation. Für die Durchführung ist eine Vollblutprobe im Lithium / Heparin-Röhrchen (grüne Kappe!) einzuschicken. Der vorliegende Test ist in der Mikrobiologie nur in Verbindung mit einem entsprechenden Stimulationsröhrchen-Set von

EUROIMMUN, dem SARS-CoV-2-IGRA Stimulationsröhrchen-Set, durchzuführen. Dieses Set wird in der Mikrobiologie beimpft und inkubiert. Das Stimulationsröhrchen-Set besteht aus drei Stimulationsröhrchen (CoV-2 IGRA BLANK, CoV-2 IGRA TUBE, CoV-2 IGRA STIM). Die Innenwände der Stimulationsröhrchen sind entweder ohne (BLANK) oder mit Immunsystem-aktivierenden Substanzen beschichtet (CoV-2 IGRA TUBE, Mitogen; CoV-2 IGRA STIM, Bestandteile der S1-Domäne des Spike-Proteins). Das beimpfte Set wird für 20-24 Std. bei 37°C in der Mikrobiologie inkubiert, anschließend wird das Plasma bis zur Messung im Kühlschrank gelagert und die Messung zweimal in der Woche durchgeführt. Das Plasma kann für mehrere Monate eingefroren und analysiert werden. Sind in der Probe prinzipiell stimulierbare T-Zellen vorhanden, kann Interferon-gamma im CoV-2 IGRA STIM-Röhrchen gemessen werden. Hatten die T-Zellen auch Kontakt zu SARS-CoV-2-Antigenen, ist Interferon Gamma im CoV-2 IGRA Tube nachweisbar. Die Interferon-gamma-Konzentration im Plasma des BLANK stellt den individuellen Interferon-gamma-Hintergrund dar und muss deshalb von der Interferon-gamma-Konzentration der aus den Konditionen STIM und TUBE gewonnenen Plasmen subtrahiert werden. Nach BLANK-Abzug muss die Interferon-gamma-Konzentration in der STIM-Kondition noch in ausreichendem Maße höher als der BLANK-Wert selbst sein, damit eine ausreichende Anzahl und Stimulierbarkeit der Immunzellen in der Vollblutprobe als gegeben betrachtet werden kann. Für jeden Testansatz wird mittels Kalibratoren (n=6) eine Standardkurve erstellt. Die Linearität des Interferon-gamma-ELISA wurde nach den Anforderungen der Richtlinie EP06-A des CLSI bestimmt. Der Interferon-gamma-ELISA ist mindestens im untersuchten Konzentrationsbereich (1,24 mIE/ml bis 1340,37 mIE/ml) linear.

Grenzwerte zur Beurteilung der Testergebnisse werden derzeit noch etabliert. Vorbehaltlich wird momentan bei einem Cut-off von 0,6 O.D. ($\approx 100-200$ mIU/ml grenzwertig; >200 mIU/ml wahrscheinlicher Kontakt zu SarsCoV2) das Ergebnis als positiv bewertet.

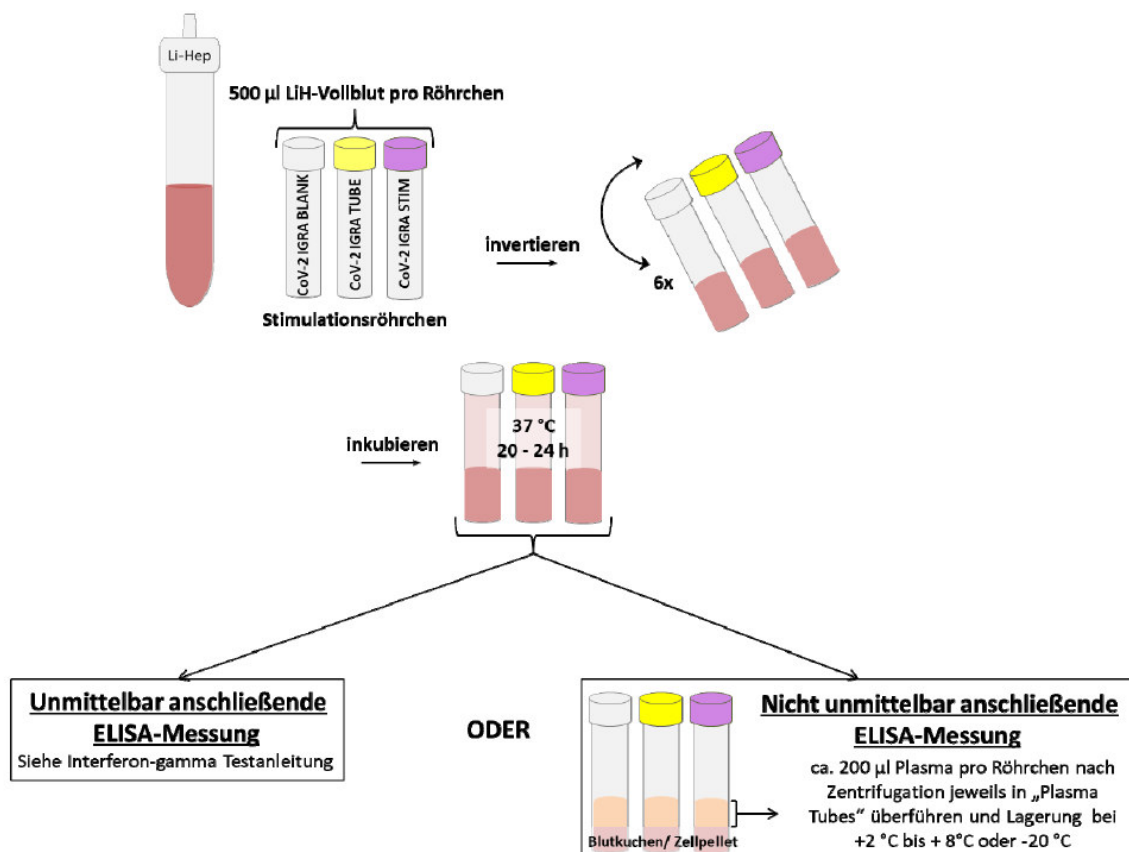


Abb. 3: Schematische Darstellung des Sars CoV2 IGRA Testablaufs

4. WICHTIGE Präanalytik des Sars-Cov2 IGRA

Für die Durchführung ist eine Vollblutprobe im Lithium/Heparin-Röhrchen (grüne Kappe!) einzuschicken. Die Vollblutprobe ist am Morgen zu gewinnen und **unverzüglich** in das Labor zu senden/bringen. Proben die am Nachmittag abgenommen werden, KÖNNEN NICHT MEHR berücksichtigt werden. Das Stimulationsröhrchen-Set von EUROIMMUN wird in der Mikrobiologie montags bis freitags in der Zeit zwischen 08:00 und 14:00 beimpft. Proben außerhalb dieses Zeitfensters müssen abgelehnt werden, da die Verweilzeit im Lithium/Heparin Vollblutröhrchen keine 16Std. überschreiten darf.

5. Indikation zur Durchführung des Sars-CoV2 IGRA

Das Testsystem kann unabhängig von Antikörperantworten zur Beurteilung der zellulären Immunantwort auf Sars-CoV2 sowohl nach Erkrankung als auch Impfung hilfreich sein.

Indikationen wären, z.B.:

- Bei immunsupprimierten Patienten (Hämato-Onkologie, Dialysepatienten) nach Impfung ohne Antikörpernachweis kann die zelluläre Immunantwort geprüft werden, die - wenn vorhanden - zumindest vor schweren Krankheitsverläufen schützen sollte.
- Bei Immungesunden kann eine Antikörperantwort nach Impfung ausbleiben und zur Prüfung, ob es sich tatsächlich um einen „kompletten Impfversager“ handelt, sollte hier unbedingt die zelluläre Immunantwort getestet werden.
- Im weiteren Verlauf nach stattgehabter kompletter Impfung fallen die Antikörper möglicherweise unter die Nachweisgrenze und es könnte geprüft werden, ob die zelluläre Immunantwort noch vorhanden ist. Möglicherweise ist eine Booster-Impfung noch nicht verfügbar oder aus sonstigen Gründen möglich und der Proband kann beruhigt werden, da er mit hoher Wahrscheinlichkeit bei nachweisbarer zellulärer Immunantwort noch vor schweren CVOVID19 Infektion geschützt ist.
- Falls der Verdacht auf eine durchgestandene asymptomatische Erkrankung besteht, die ohnehin mit nur geringer Bildung von Antikörpern einhergeht, könnte geprüft werden, ob diese Infektion tatsächlich stattgefunden hat. Die spezifische Aktivierung der zellulären Antwort mit S1-Antigen bleibt ohne vorherigen Antigenkontakt sicher aus.

6. Grenzen des Verfahrens

Der vorliegende Test befindet sich in wissenschaftlicher Evaluation und wird in Kürze als CE-Test verfügbar sein. Die angegebenen Pipettierolumina, Inkubationszeiten, Temperaturen und Vorbereitungsschritte gemäß Testanleitung sind strikt einzuhalten. Die korrekte Probengewinnung und -aufbewahrung sind entscheidend für die Qualität und Verwertbarkeit der Testergebnisse. Die korrekte Bestimmung der Interferon-gamma-Konzentration kann nur erfolgen, wenn alle Plasmaproben eines Stimulationsröhrchen-Sets gemeinsam auf einer Mikrotiter-Platte gemessen wurden. Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml Hämoglobin, 20 mg/ml Triglyceriden und 0,4 mg/ml Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Das diagnostische Verfahren braucht seine Zeit! Um zügig Ergebnisse zu erhalten, berücksichtigen sie bitte unbedingt die oben gemachten Angaben.
