

5.6 Erfahrungen bei der Evaluierung von ABICAP[®] – Hand-Held-Testkits zum Nachweis von *Francisella tularensis* und Ebolavirus

Roland Grunow · Andreas Lucht · Mustafa Porsch-Özcürümez

Zusammenfassung

In unseren Untersuchungen haben wir das säulenchromatographische Verfahren ABICAP[®] (Antibody Immuno Column for Analytical Processes) der Firma Senova, Jena, hinsichtlich seiner Eignung als Ultraschnelltest für den Nachweis von *Francisella tularensis* und Ebolavirus geprüft. In beiden Assays konnte eine vergleichbare Spezifität und Sensitivität wie mit den Referenzmethoden auf Grundlage der entsprechenden Capture-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) erzielt werden. Der Einfluss von Störgrößen in Probenmatrizen beim Nachweis der Antigene war unterschiedlich hoch, führte jedoch in den meisten Fällen kaum zu einer Veränderung des Ergebnisses. Insgesamt wurde geschlossen, dass sich der ABICAP[®] für die untersuchten Antigene als präsumtiver Schnelltest eignet und weitere Validierungsarbeiten in der Praxis durchgeführt werden sollten.

Für die Detektion und die Identifizierung von Krankheitserregern mit bioterroristischem Hintergrund sind in den letzten Jahren verstärkt Labortechniken entwickelt bzw. adaptiert worden. Dazu gehören neben der Anzucht des Erregers mikroskopische und elektronenmikroskopische, immunologische und molekularbiologische Verfahren. Aufgrund der benötigten Zeitdauer kann man die Tests in ultraschnelle (Minuten bis zu einer halben Stunde), schnelle (ein bis ca. sechs Stunden) und langsame, zeitaufwändige Tests (ein bis acht Tage) einteilen. Eine möglichst frühe Erkennung von biologischen Agenzien ist für den Bevölkerungsschutz dringend notwendig, um rechtzeitig eine gezielte Behandlung der betroffenen Personen einleiten zu können. Darüber hinaus müssen im Fall einer Epidemie möglichst rasch Infektionsquellen und Infektionsketten erkannt werden, um eine weitere Ausbreitung des Erregers zu unterbinden. Gerade bei den Ultraschnelltests besteht häufig ein reziprokes Verhältnis zwischen Geschwindigkeit und Sensitivität der Methodik. Deshalb sind Schnelligkeit, Sensitivität, Spezifität, Reproduzierbarkeit und Handhabbarkeit Qualitätsmerkmale, hinsichtlich derer auch Ultraschnelltests optimiert

werden müssen. In unseren Untersuchungen haben wir das säulenchromatographische Verfahren ABICAP[®] (Antibody Immuno Column for Analytical Processes) der Firma Senova, Jena, hinsichtlich seiner Eignung als Ultraschnelltest für den Nachweis von *Francisella tularensis* und Ebolavirus geprüft.

Das Verfahren beruht auf einer 3D-Immunofiltration, wobei der Analyt im Durchfluss an eine Trägermatrix, die mit spezifischen Antikörpern beladen ist und sich in einer Minisäule befindet, gebunden wird (Abb. 62). Die Säulen haben eine Größe von ca. 5 cm x 0,5 cm. Das Standardprobenvolumen beträgt 750 µl, kann aber zwischen 50 µl und mehreren Millilitern bei Verwendung eines Trichteraufsatzes variiert werden. Das poröse Trägermaterial in der Säule hat eine Oberfläche von bis zu 10 cm², wodurch die relativ große Menge von ca. 1 µg Fängerantikörper in der Säule gebunden werden kann. Die Affinität und Quantität der gebundenen Fängerantikörper sind wesentliche Parameter, die zur Sensitivität des Tests beitragen. Die Säulen mit den Fängerantikörpern werden in getrocknetem Zustand vorrätig gehalten und haben, wie die restlichen Ready-to-use-Reagenzien, eine Mindesthaltbarkeit von zwölf Monaten. Nachdem die Probe die Säule passiert hat, wird ein Detektorantikörper-Poly-Horseradish-Peroxidase (HRP)-Konjugat durch die Säule gegeben und anschließend die Bindung der konjugierten Antikörper über die Substratreaktion mit präzipitierendem Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. Mittels eines batteriebetriebenen Photometers kann die optische Dichte der Säule nach der Substratreaktion gemessen werden, wobei ein dynamischer Messbereich von drei bis vier Logstufen möglich ist. Die generellen Vorteile dieses Systems sind in Abbildung 63 hervorgehoben. Das System besticht im Vergleich mit anderen Ultraschnelltests durch eine hohe Sensitivität bei relativ niedriger Assayzeit und die Möglichkeit, aus größeren Probenvolumina eine Anreicherung des Zielantigens zu erreichen. Die Ergebnisse werden mit Hilfe des Photometers in Taschenformat objektiviert und können entsprechend archiviert und ausgewertet werden.

Ausgangspunkt der Entwicklung eines ABICAP[®]-Hand-Held-Testkits ist in der Regel ein qualitätsgeprüfter ELISA. In unseren Untersuchungen haben wir entsprechende ELISA zum Nachweis von *Francisella tularensis* (Grunow et al., 2000) und Ebolavirus (Lucht et al., 2007) an den Test adaptiert.

F. tularensis ist der Erreger der Tularämie, einer meldepflichtigen Zoonose, die in Deutschland selten vorkommt. Derzeit gehören dem Genus *Francisella*

die zwei Spezies *tularensis* und *philomiragia* an, wobei letztere von untergeordneter klinischer Bedeutung ist. Innerhalb von *F. tularensis* werden vier Subspezies unterschieden. Davon rufen insbesondere die Subspezies *tularensis* (Jellison Typ A), die vorwiegend in Nordamerika vorkommt, und die Subspezies *holarctica* (Jellison Typ B), die auf der gesamten nördlichen Hemisphäre verbreitet ist, Krankheiten beim Menschen hervor. In Abhängigkeit von der Eintrittspforte kann sich die Erkrankung als ulzeroglandulär, glandulär, okulär, oropharyngeal, pulmonal oder typhös manifestieren. Bereits ca. zehn Erreger können einen Menschen infizieren, wobei die Erkrankung in Abhängigkeit von Erregersubspezies (*F. tularensis* ssp. *holarctica*, *F. tularensis* ssp. *tularensis*) mit unterschiedlichen Schweregraden verlaufen kann.

Für die Entwicklung der Nachweissysteme für *F. tularensis* wurde ein anti-LPS-monoklonaler Antikörper, der sowohl als Fänger- als auch als Detektorantikörper eingesetzt wurde, verwendet (Greiser-Wilke et al., 1989). Die Konzentrationen des Antikörpers wurden in vorhergehenden Validierungsexperimenten optimiert und festgelegt. In Abbildung 64 sind vergleichend die erzielten Standardkurven im Ft-ABICAP[®] und Capture-ELISA dargestellt. Anhand der jeweils zehn Eichkurven zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit beider Tests und eine vergleichbar hohe Sensitivität ca. 10^3 Bakterien/ml. Mit der Erhöhung des Probenvolumens bei gleich bleibender Antigenmenge kann die Nachweisgrenze weiter gesenkt werden. Dabei konnten wir noch Bakterien in einer Konzentration von 3×10^2 Bakterien/ml im Ft-ABICAP[®] detektieren (Abb. 65). Im Zusammenhang mit einem Tularämieausbruch im Kosovo haben wir Kotproben von verdächtigen Nagern gesammelt, die als Überträger der Tularämie gedient haben könnten (Reintjes et al., 2002). Diese Proben haben wir mit Kotproben vergleichbarer Nager aus deutscher Stallhaltung untersucht (Abb. 66). Dabei zeigte sich, dass die als Negativkontrolle eingesetzten Mausekotproben aus Deutschland im Vergleich mit denen vom Kaninchen einen wesentlich höheren Background ergaben, was im ELISA nicht zu beobachten war. Die Gründe dafür sind bisher nicht geklärt und an einer entsprechenden Optimierung wird gearbeitet. Trotzdem konnte in einigen Maus- und Hasenproben aus dem Kosovo sowohl im Ft-ABICAP[®] als auch im Capture-ELISA eindeutig *Francisella*-Antigen nachgewiesen werden. In weitergehenden Versuchen konnten wir belegen, dass eine Kreuzreaktivität mit anderen relevanten bakteriellen Erregern unwahrscheinlich ist (Ergebnisse nicht dargestellt). Darüber hinaus haben wir Proben aus Wasserreservoirs, die in Endemiegebieten der Tularämie durch schwedische Kollegen (M. Forsman, FOI,

Umeå, Schweden) gesammelt wurden, untersucht. Bei sieben von 165 Proben konnte wiederum übereinstimmend im Ft-ABICAP[®] und im Capture-ELISA ein positives Resultat erzielt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Ebolaviren gehören zu den Filoviren und es werden vier Spezies unterschieden, die jeweils nach den Orten ihres ersten Auftretens benannt wurden: *Zaire-Ebolavirus* (sechs Subtypen), *Sudan-Ebolavirus* (drei Subtypen), *Côte d'Ivoire-Ebolavirus* (ein Subtyp) und das *Reston-Ebolavirus* (vier Subtypen). Mit Ausnahme des *Reston-Ebolavirus* verursachen die anderen drei genannten Spezies beim Menschen ein hämorrhagisches Fieber, das mit einer Letalitätsrate von etwa 50 bis 90 Prozent einhergeht. Wie aus den Namen abzuleiten ist, kommen diese Viren vorwiegend in afrikanischen Regionen vor, wobei das eigentliche Reservoir nicht eindeutig bekannt ist. Neben dem bioterroristischen Aspekt besteht für die höher entwickelten Länder insbesondere die Gefahr der Einschleppung der Krankheit. In jedem Fall ist eine schnelle Diagnostik des Erregers von Bedeutung, um eine frühzeitige symptomatische Therapie einleiten und präventive Maßnahmen zur Verhinderung bzw. Eindämmung einer Epidemie ergreifen zu können.

Auch hier haben wir ausgehend von einem Capture-ELISA unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern einen ABICAP[®]-Ultraschnelltest entwickelt (Lucht, 2004). Die monoklonalen Antikörper sind dabei vor allen Dingen mit Natriumdodecylsulfat (SDS)-inaktivierten Ebolaviren reaktiv, was nach entsprechender Behandlung der Untersuchungsprobe eine Ansteckungsgefahr für den Durchführenden des Tests drastisch vermindert. Neben dem Nachweis von Ebolaviren im Blut haben wir den Test vor allen Dingen auch für Urin als Untersuchungsprobe evaluiert, da für letzteres Probenmaterial bei der afrikanischen Bevölkerung eine wesentlich höhere Akzeptanz besteht. Für die Untersuchungen haben wir SDS-inaktivierte Ebolaviren (EBOV) eingesetzt, die uns freundlicherweise von PD Dr. S. Becker, Virologie, Universität Marburg, zur Verfügung gestellt wurden. Aus der Abbildung 67 geht hervor, dass mit dem EBOV-ABICAP[®] eine hohe Sensitivität erreicht wird und eine Inaktivierung von Serum oder Urin mit SDS kaum einen Einfluss auf das Testergebnis hat. Mit entsprechenden Negativproben, die nicht das Antigen enthielten, war keine Reaktion im Test festzustellen. Wie schon im Ft-ABICAP[®] konnte auch hier die Sensitivität des Tests mit höheren Probenvolumina gesteigert werden. Da allerdings häufig, gerade im Fall von Blutuntersuchungen, geringere Probenvolumina zur Verfügung stehen, haben wir auch Probenmengen zwischen 50

und 200 µl untersucht. Hierbei ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zu größeren Probenvolumina mit gleichem absoluten Antigengehalt (Ergebnisse nicht dargestellt).

Für die Evaluierung des Tests wurden einhundert Normalseren aus Deutschland (BRK, München) und siebzig Seren aus Afrika (freundlicherweise von Frau Emmerich, BNI, Hamburg zur Verfügung gestellt) herangezogen. Die Seren wurden nativ eingesetzt bzw. mit EBOV-Kontrollantigen in einer optimierten Konzentration versetzt und dann untersucht (Abb. 68, 69). Die Ergebnisse wurden als Verhältnis zwischen optischer Dichte (OD) der Untersuchungsprobe zur OD der Negativkontrolle ausgedrückt. Bei den deutschen Seren konnten wir eine Spezifität von 97 Prozent errechnen, wenn auch die im Graubereich liegenden Werte hinzugezogen wurden, bzw. von 99 Prozent, wenn die sicher positiven Werte zur Grundlage gelegt wurden. Die Sensitivität, d. h. die Wiederfindung des Spikematerials, lag bei 100 Prozent. Für die afrikanischen Seren ist anzumerken, dass sich diese in sehr unterschiedlichen Zustand bezüglich Gerinnung und Hämolyse befanden, was durchaus die Probleme einer Serumgewinnung unter ungünstigen äußeren Bedingungen widerspiegelt. Trotzdem entsprachen Spezifität und Sensitivität des Assays annähernd den Werten, die mit qualitativ hochwertigen Seren aus Deutschland erreicht wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der ABICAP[®] anhand der zwei geprüften Modellantigene trotz seiner Schnelligkeit bezüglich der Spezifität und Sensitivität dem konventionellen ELISA nicht nachsteht. Er stellt somit eine ausbaufähige Plattform zum Schnellnachweis von Agenzien mit bioterroristischem Hintergrund dar. Bei der Testentwicklung ist es wichtig, die relevanten Probenmatrizen hinsichtlich der geforderten Leistungsparameter zu prüfen und gegebenenfalls zu optimieren. Das setzt die Verfügbarkeit entsprechender Referenzmaterialien voraus, was für seltene Krankheitserreger häufig nur in Speziallaboratorien gegeben ist. Trotz der Einfachheit in der Durchführung des ABICAP[®] ist die Interpretation der Ergebnisse durch eine Fachkraft notwendig, um die richtigen adäquaten Schlussfolgerungen ableiten zu können. Die Ergebnisse eines Ultraschnelltests sind als vorläufig anzusehen und müssen im Zusammenhang mit einer Bedrohungssituation, klinischen Manifestationen und weiteren Laboruntersuchungen gesehen und bestätigt werden.

Antibody Immuno Column Analytical Process

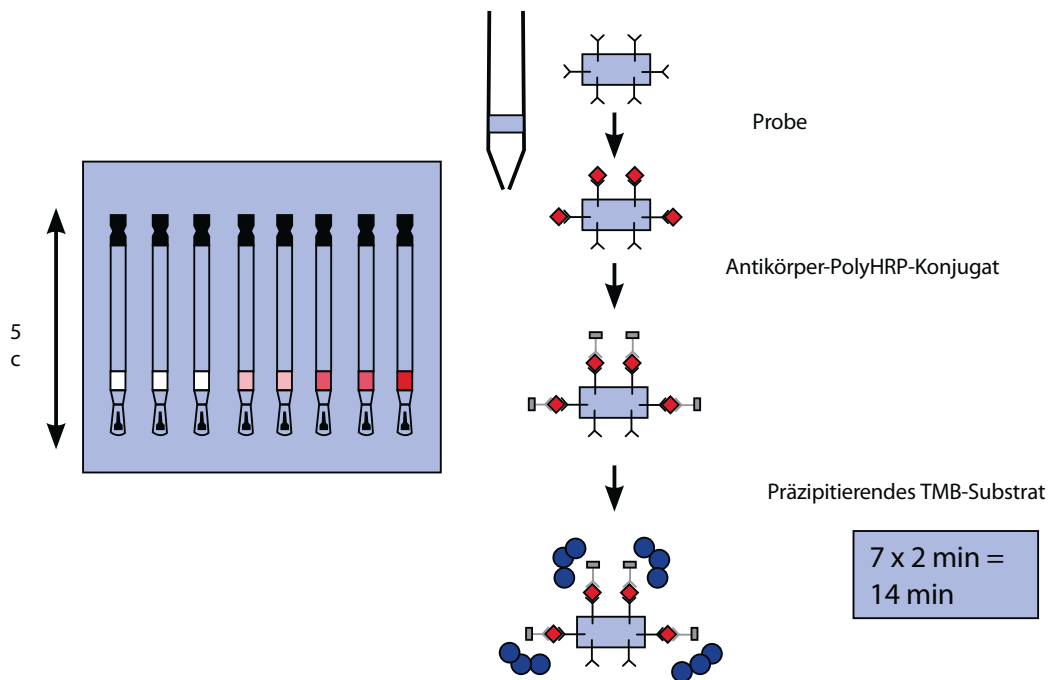


Abb. 62: ABICAP[®] (Antibody Immuno Column for Analytical Processes)

ABICAP[®] -Technologie

(Antibody Immuno Column for Analytical Processes)

Vorteile

- Kurze Assayzeit von 20 – 30 min (10 – 15 min)
- Hohe Sensitivität
- Antigenanreicherung durch Immunfiltration
- Einfache Durchführbarkeit
- Batteriebetriebener Reader in Taschenformat
- Objektive Ergebnisse
- Evaluert für inaktivierte Proben
- Möglichkeit für Automatisierung

Abb. 63: Vorteile der ABICAP[®]-Technologie

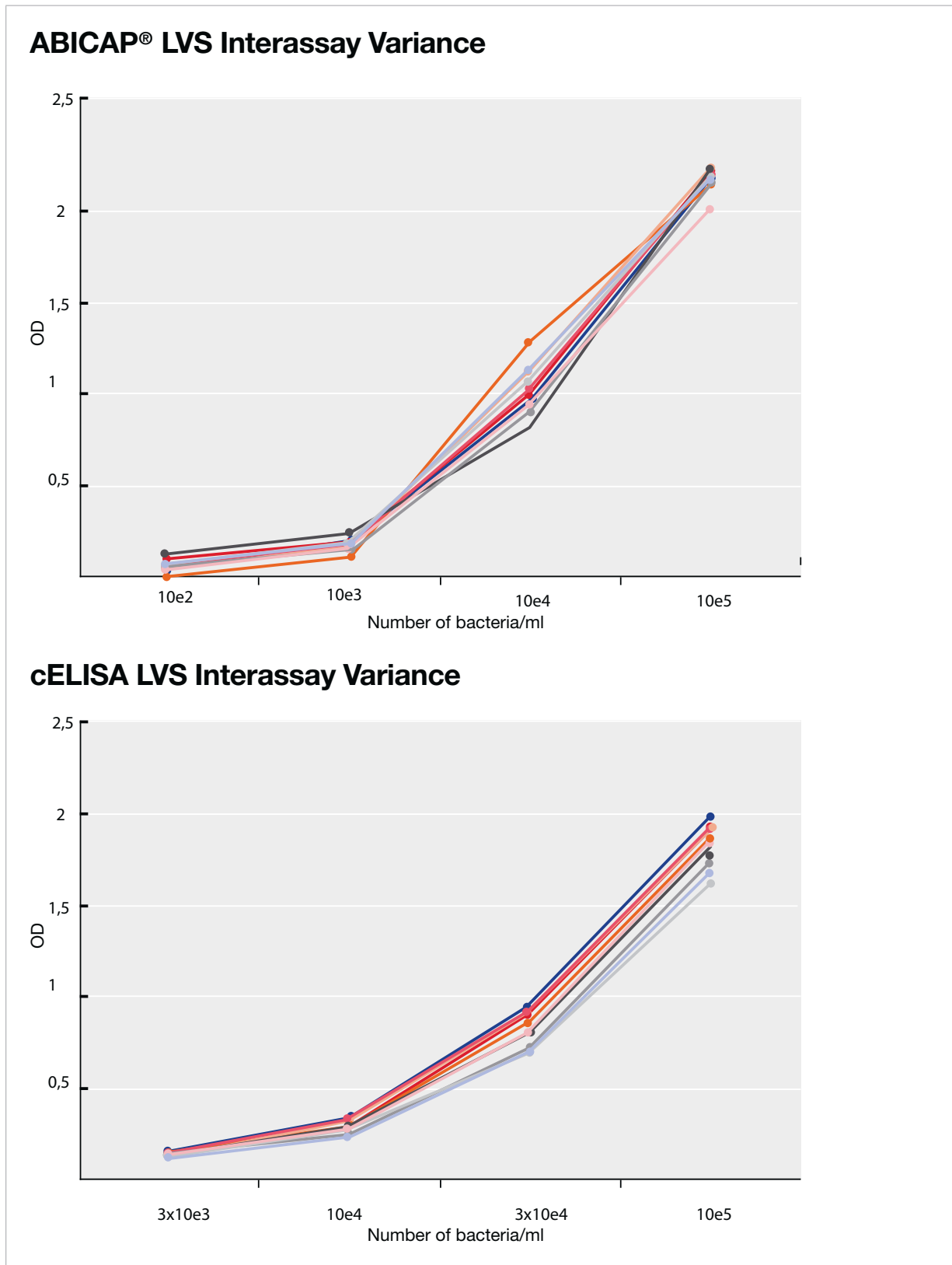


Abb. 64: *F. tularensis* ABICAP®-/ cELISA -Standardkurven

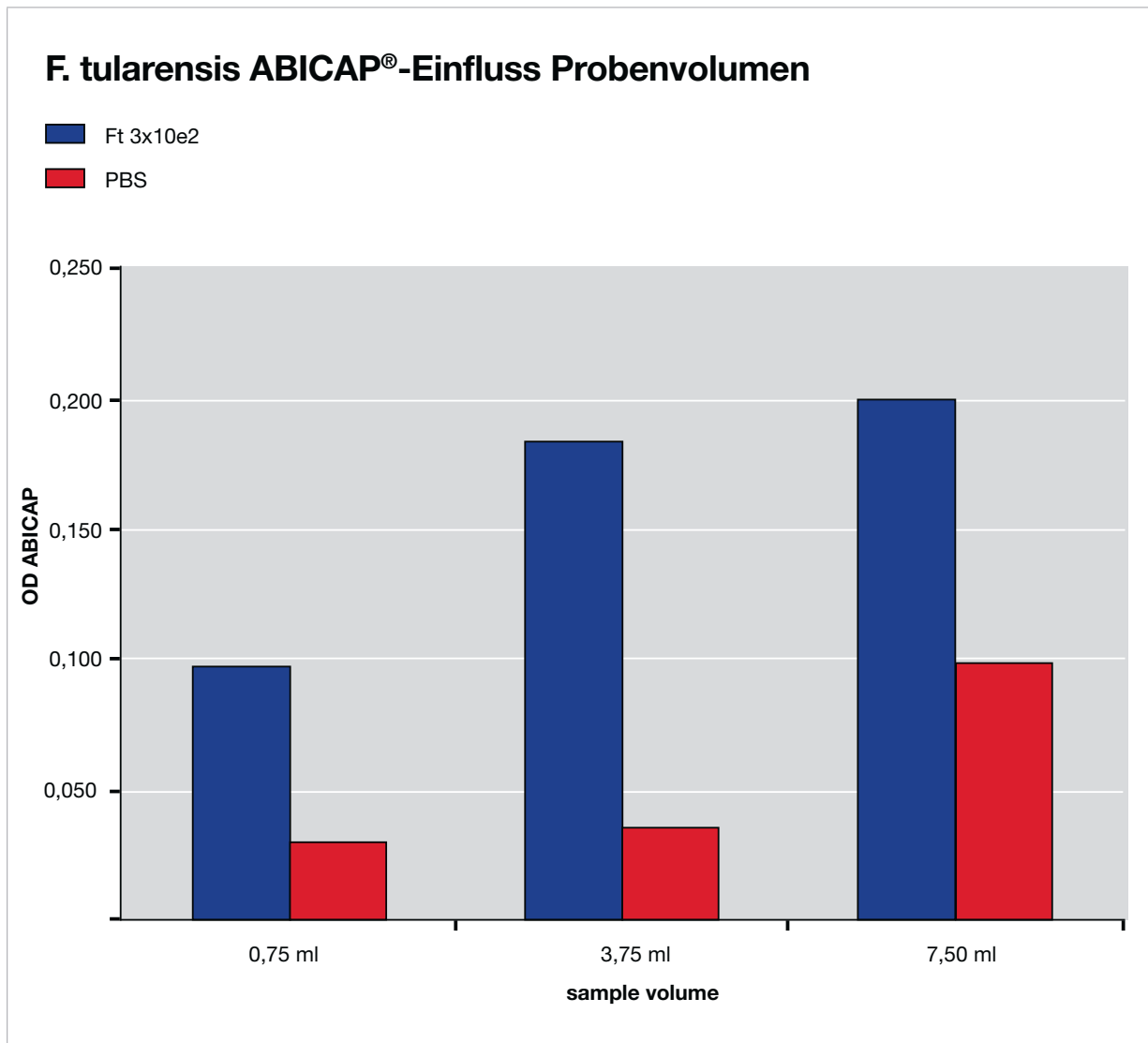


Abb. 65: *F. tularensis* ABICAP® – Einfluss des Probenvolumens

Hasen- und Mauskot aus Deutschland und Kosovo

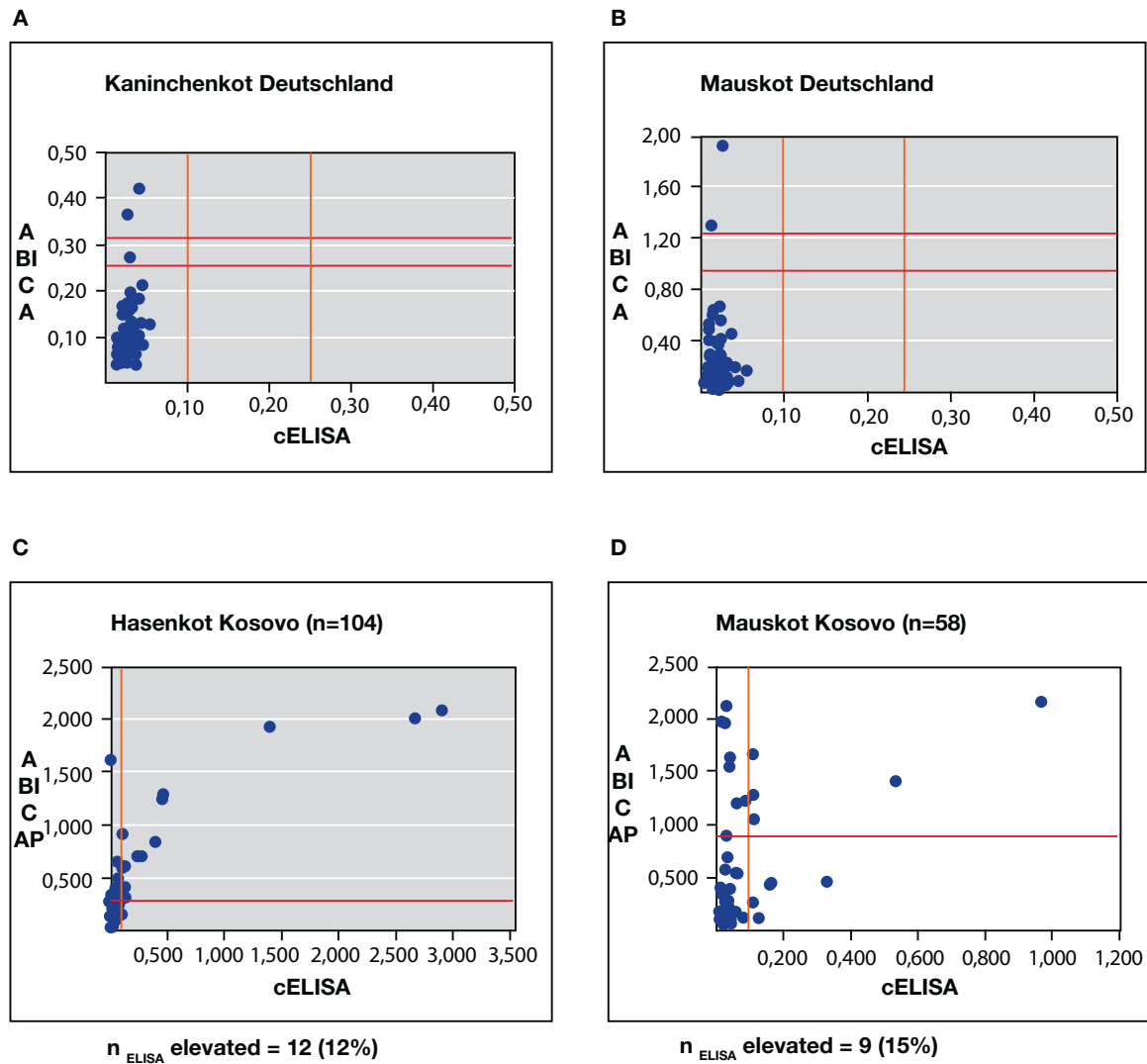


Abb. 66: *F. tularensis* ABICAP[®]-/ cELISA-Kotproben aus Deutschland (A; B) und einem Tularämie-Ausbruchs im Kosovo (C; D)

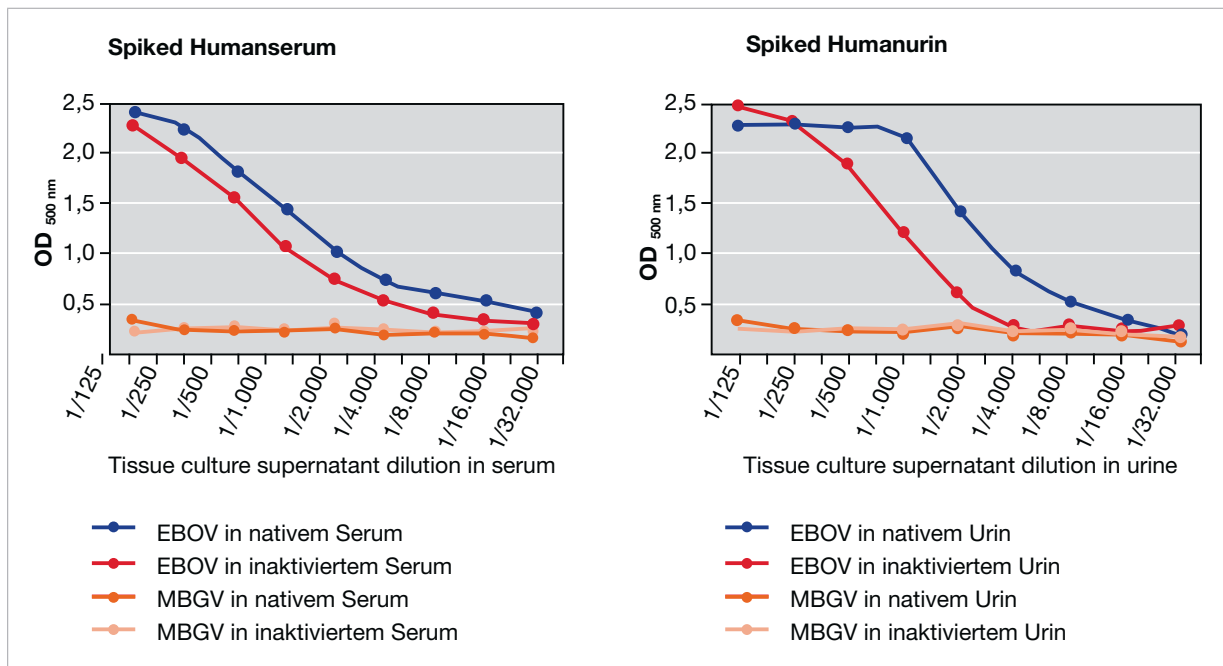


Abb. 67: Antigen-Verdünnungskurven des EBOV ABICAP®

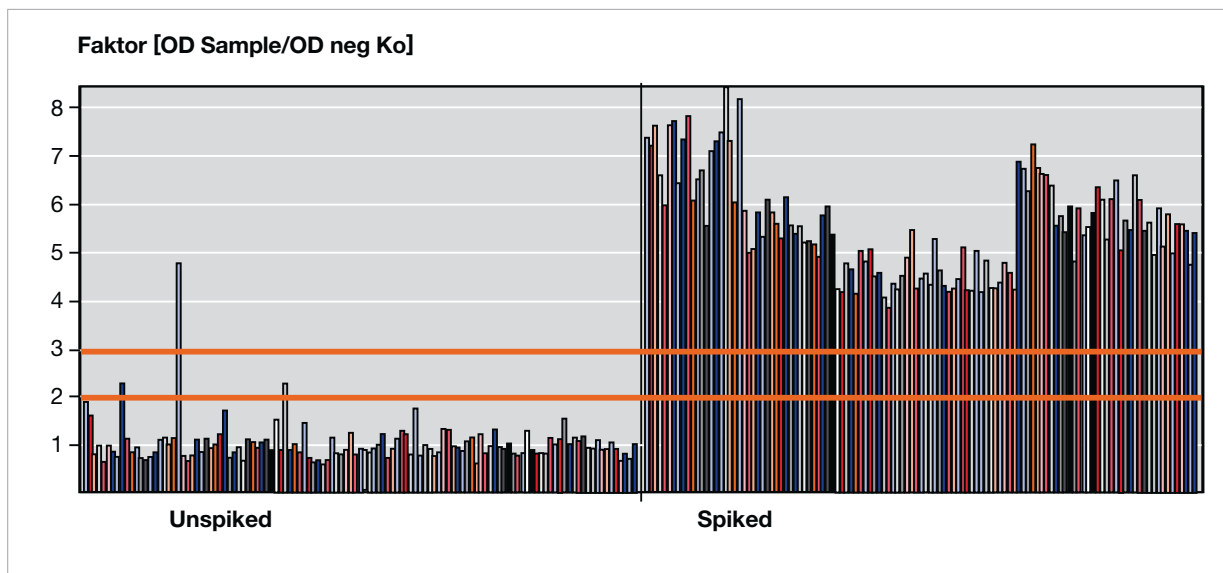


Abb. 68: Validierung des EBOV ABICAP® mit Serumproben aus Deutschland

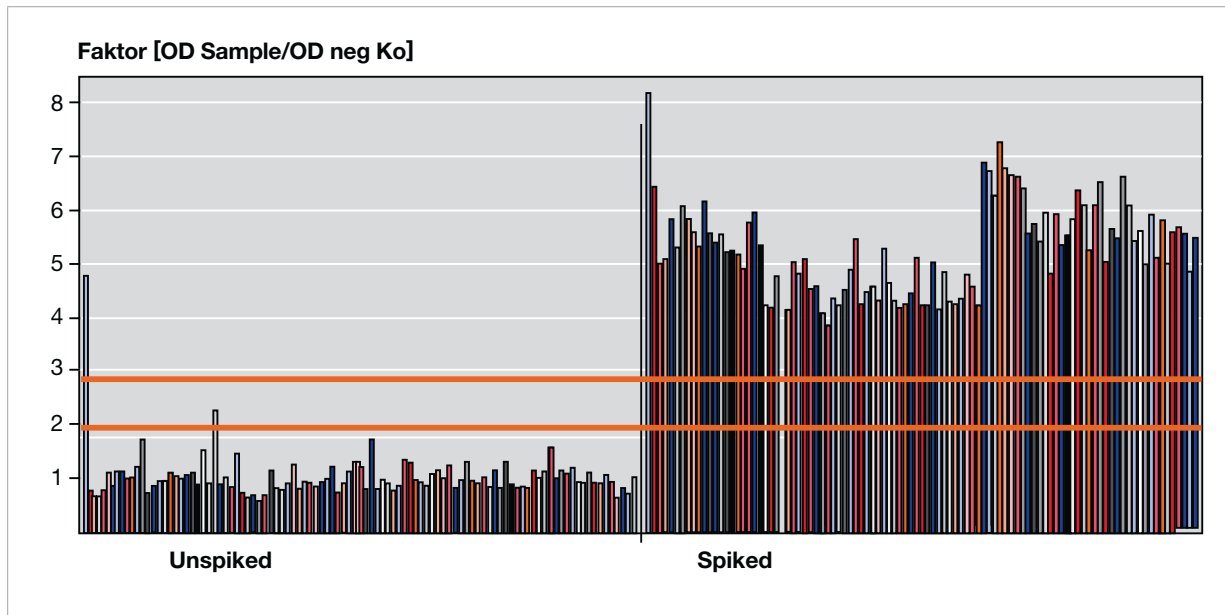


Abb. 69: Validierung des EBOV ABICAP[®] mit Serumproben aus Afrika

Literaturhinweise

GRUNOW, R., SPLETTSTOESSER, W., McDONALD, S., OTTERBEIN, C., O'BRIEN, T., MORGAN, C., et al. (2000). Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, 7(1), 86-90.

REINTJES, R., DEDUSHAJ, I., GJINI, A., JORGENSEN, T. R., COTTER, B., LIEFTUCHT, A., et al. (2002). Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. *Emerg.Infect.Dis.*, 8(1), 69-73.

LUCHT, A. , FORMENTY, P. , FELDMANN, H. , GOTZ, M. , LEROY, E. , BATABOUKILA, P. , GROLLA, A., FELDMANN, F., WITTMANN, T., CAMBELL, P., ATSANGANDOKO, C., BOUMANDOKI, P., FINKE, E.J., MIETHE, P., BECKER, S., GRUNOW, R. (2007). Development of an immunofiltration-based antigen-detection assay for rapid diagnosis of Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 196 Suppl. 2; 184 – 192

GREISER-WILKE, I., SOINÉ, C., MOENING, v. (1989), Monoclonal antibodies reacting specifically with *Francisella* sp. *Zentralbl. Veterinarmed B.* 36 (8): 593 – 600.