

# Prospektive COVID-19 Kohorte München (KoCo19): Zusammenfassung der Labormethodik zu den Erstuntersuchungen

**KoCo19 Studienteam unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Hölscher, Prof. Dr. Katja Radon, Prof. Dr. Christiane Fuchs, Prof. Dr. Jan Hasenauer und PD Dr. Andreas Wieser**

Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin, Center for International Health, Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Klinikum der LMU München; Helmholtz Zentrum München-Deutsches Zentrum für Gesundheit und Umwelt; Technische Universität München, Universität Bielefeld, Universität Bonn

*Dies ist eine Beschreibung der verwendeten Labor-Messtechniken der Prospektiven COVID-19 Kohorte München (KoCo19). Diese soll für jeden verständlich die wichtigsten Grundzüge der Probestellung beschreiben, und Grundlegendes zu den Vorgängen im menschlichen Körper erklären. **Dabei wird bisweilen vereinfacht und unnötig komplizierte Details weggelassen, um Zusammenhänge besser verständlich zu machen.** Für darüberhinausgehende Details verweisen wir auf die parallel erstellten wissenschaftlichen Publikationen (auf Englisch), welche demnächst erscheinen werden.*

## **Hintergrund:**

### Die Prospektive COVID-19 Kohorte München (KoCo19)

In der KoCo19-Studie wird untersucht, wie viele Menschen in München bereits Kontakt mit dem neuartigen SARS-CoV-2 Erreger hatten. Das Virus und seine Herkunft sind seit Ende letzten Jahres bekannt. In München ist es erstmals im Januar 2020 nachgewiesen worden, die Verbreitung ist allerdings noch unklar.

Um neue Krankheitserreger und ihre Ausbreitung besser zu verstehen, müssen maßgeschneiderte experimentelle Verfahren entwickelt werden. Für bekannte Krankheitserreger sind diese Verfahren sehr zuverlässig, und es kommt nur äußerst selten zu Fehlern oder größeren Abweichungen. Dies liegt daran, dass diese Verfahren schrittweise verbessert wurden und so Fehlerquellen eliminiert werden konnten. Für neue Erreger dauert die Entwicklung verlässlicher Testverfahren zumeist mehrere Jahre.

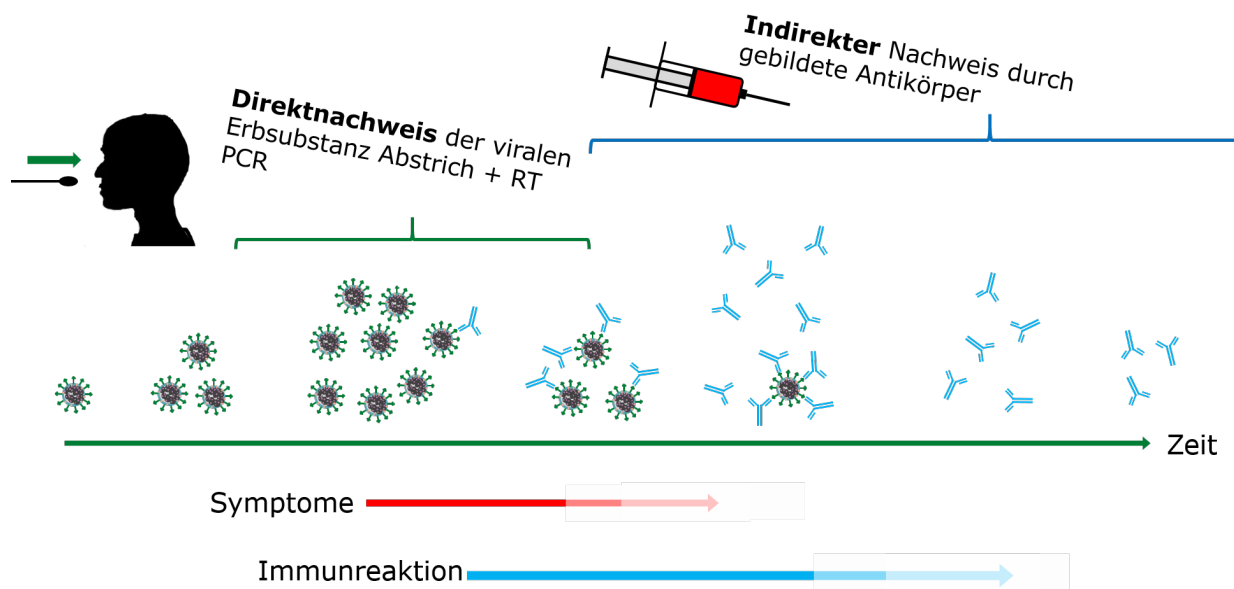
Im Rahmen der SARS-CoV-2-Pandemie war Zeit ein entscheidender Faktor, da sich dieses Virus sehr schnell verbreitete und rasch Testverfahren entwickelt werden mussten. Viele Universitäten und Firmen haben Tests etabliert, welche auf unterschiedlichen Nachweisprinzipien beruhen und daher auch unterschiedliche Informationen liefern. Nun müssen wir verstehen, was genau das biologische Korrelat ist, welches die jeweiligen Tests nachweisen, was also deren Aussagekraft ist. Hierzu müssen wir als wissenschaftliche Gemeinschaft viele Daten mit mehrfachen Wiederholungen und Kontrollen erheben, um herauszufinden, welche Tests wie gut funktionieren und ob es gute Test-Kombinationen gibt. Dies ist ein übliches wissenschaftliches Vorgehen, und in KoCo19 haben wir dazu beigetragen, die Datenbasis deutlich zu erweitern.

### Die Diagnose von SARS-CoV-2:

Die Erkrankung COVID-19 wird ausgelöst durch das Virus SARS-CoV-2. Das Virus wird, wie die nahe verwandten Schnupfenviren aus der "Corona Gruppe", über die Schleimhäute der oberen Atemwege übertragen. Dies geschieht vor Allem durch Husten, Tröpfchen- und Aerosol-Übertragung. Nach dem Kontakt mit der Schleimhaut dringt das Virus in Körperzellen ein und beginnt sich dort zu vermehren. Dies dauert eine ganze Weile und währenddessen hat der Infizierte oft gar keine oder wenige Symptome. Nach Tagen treten die Viren in den Sekreten (Speichel, Nasenschleim) des infizierten Menschen auf. Bei vielen Infizierten sind zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei Symptome aufgetreten, es ist aber dann möglich, das Virus z.B. mittels Nasen- oder

Rachenabstrich zu gewinnen und nachzuweisen. Dies geschieht meist durch die Vervielfältigung der viralen Erbsubstanz im Labor (RT-PCR Reaktion; siehe Abbildung 1). Einige Tage später kommt es bei vielen Patienten zu grippalen Symptomen wie Husten, Halsschmerzen, Fieber, oft auch Geruchs-/Geschmacksverlust. Manche spüren aber auch weiterhin nichts, oder nur eine leichte Abgeschlagenheit.

Was man nicht merkt, ist, dass innerhalb weniger Tage das Immunsystem das Virus entdeckt hat (siehe Abbildung 1) und beginnt, es zu bekämpfen. Immunzellen bilden Antikörper mit dem Ziel, das Virus zu inaktivieren. Antikörper sind kleine lösliche Proteine, welche im Blut und den Sekreten des Körpers gelöst sind und eine Bindestelle besitzen, die ganz speziell wie bei einem Schlüssel-Schloss Prinzip an Teile des Virus binden können. Diese Reaktionen und andere Abwehrmechanismen führen nun dazu, dass das Virus erfolgreich bekämpft wird und meist schon nach wenigen Tagen bei einem Nasen-/Rachenabstrich nicht mehr nachgewiesen werden kann. Der Infizierte erholt sich und kann niemanden mehr anstecken. Oftmals sind es nur wenige Tage, die das SARS-CoV-2 Virus auf den Schleimhäuten nachgewiesen werden kann. Die oben beschriebenen Antikörper jedoch verbleiben auch als "Gedächtnis des Immunsystems" im Blut für längere Zeit nachweisbar.



**Abbildung 1: Ablauf der Infektion.** Nach der Infektion dringt das Virus in Körperzellen ein und beginnt, sich zu vermehren. Die Anzahl der Viren nimmt langsam zu, bis sie in den Sekreten nachweisbar werden (Nachweis über Abstrich aus Nase/Rachen). Etwa um diese Zeit spüren viele Infizierte die ersten Symptome der Erkrankung, manche spüren jedoch keinerlei Anzeichen. Mit dem Einsetzen einer Immunreaktion werden die Viren meist erfolgreich bekämpft. Parallel zum Verschwinden der Viren entstehen Antikörper und spezifisch reaktive T-Zellen im Körper (Nachweis im Blut möglich).

### Methodik - Analysen für KoCo19:

Wenn untersucht werden soll, wie viele Münchner z.B. nach der ersten Welle bereits Kontakt mit SARS-CoV-2 hatten, ist die RT-PCR nicht hilfreich, da das Virus nur wenige Tage lang nachgewiesen werden kann. Hierfür kann man einen Nachweis von Antikörpern verwenden, die ca. 2-6 Wochen nach der Infektion gebildet werden und auch noch längere Zeit nach der Erkrankung nachweisbar bleiben.

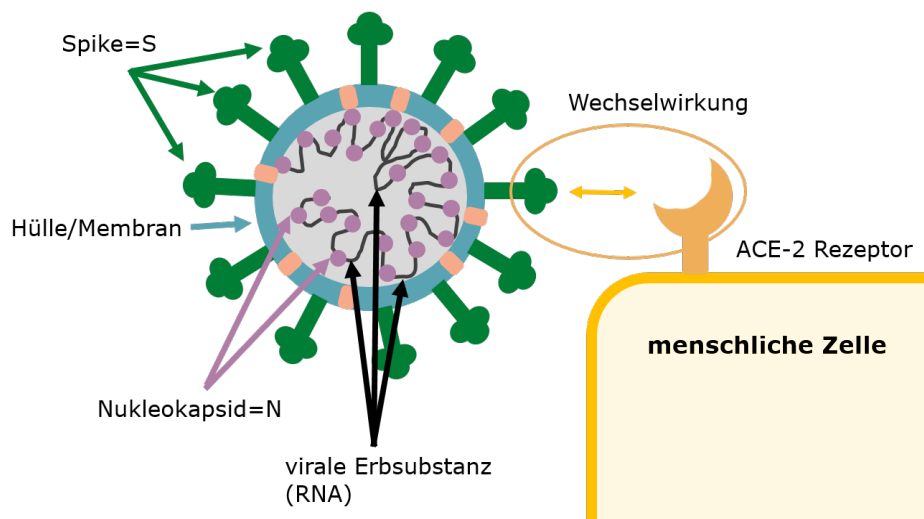
Zur Untersuchung der Tausenden von Blutproben im Rahmen der KoCo19-Studie wurde ein System benötigt, welches in der Lage ist, viele Blutproben in relativ kurzer Zeit zu verarbeiten. Im Frühjahr 2020, zu Beginn der KoCo19-Studie, gab es nur wenige kommerzielle Testsysteme. Von diesen war noch keines **unabhängig** für solche Studien evaluiert worden. Wir haben im Rahmen der Studie letztlich die folgenden sieben Tests gründlich untersucht:

1. Roche anti-N pan-Ig (Elecsys Anti-SARS-CoV-2)
2. Euroimmun anti-S1 IgA (Euroimmun Anti-SARS-CoV-2-ELISA)
3. Euroimmun anti-S1 IgG (Euroimmun Anti-SARS-CoV-2-ELISA)
4. Direkte Virenneutralisation (Zellkultur)
5. GenScript® cPass
6. VIRAMED SARS-CoV-2 ViraChip® microarray (VC-N-IgA/M/G; S1-IgA/M/G; S2-IgA/M/G)
7. Mikrogen, recomLine SARS-CoV-2 IgG line immunoassay (Lineblot)

Hierbei haben wir Tests 1-3 als sogenannte "primary tests", also Screeningtests, genutzt, um das Vorkommen der Antikörper festzustellen. Tests 4-7 hingegen wurden als "confirmatory tests", sprich Bestätigungstests, genutzt, um die detektierten Antikörper genauer einordnen zu können, und falsch positive Ergebnisse auszusortieren.

Um die Tests so gut wie möglich evaluieren zu können, wurden die Proben von verschiedenen Probandengruppen verwendet:

- 991 Proben von Blutspendern aus dem Herbst 2019 und dem Frühjahr 2020 (vor der Verbreitung von COVID-19 in München); wir wollten dabei absichtlich Proben von vor der Schnupfen-/Grippewelle im Winter und auch danach messen
- 193 Proben von Menschen mit nachgewiesener SARS-CoV-2-Infektion (positive RT-PCR)
- 5.709 Proben aus der KoCo19-Kohorte



**Abbildung 2: Aufbau des SARS-CoV-2 Virus.** Schematisches Bild eines SARS-CoV-2 Viruspartikels. Innen befindet sich die Erbsubstanz des Virus (RNA). Sie wird stabilisiert durch das Nukleokapsid-Protein (abgekürzt „N“-Protein). Darum herum befindet sich eine Hülle, wie die Membran einer menschlichen Zelle. Darin eingebettet sind vor allem die sogenannten Spike-Proteine („S“, bestehend aus S1 und S2). Diese sind sehr wichtig für das Virus, da es hierüber die menschliche Zelle infiziert. Hierfür tritt es auf der Oberfläche von menschlichen Zellen mit einem speziellen Binde-Partner (genannt ACE 2-Rezeptor) in Wechselwirkung und tritt dann in die Zelle ein (=Infektion).

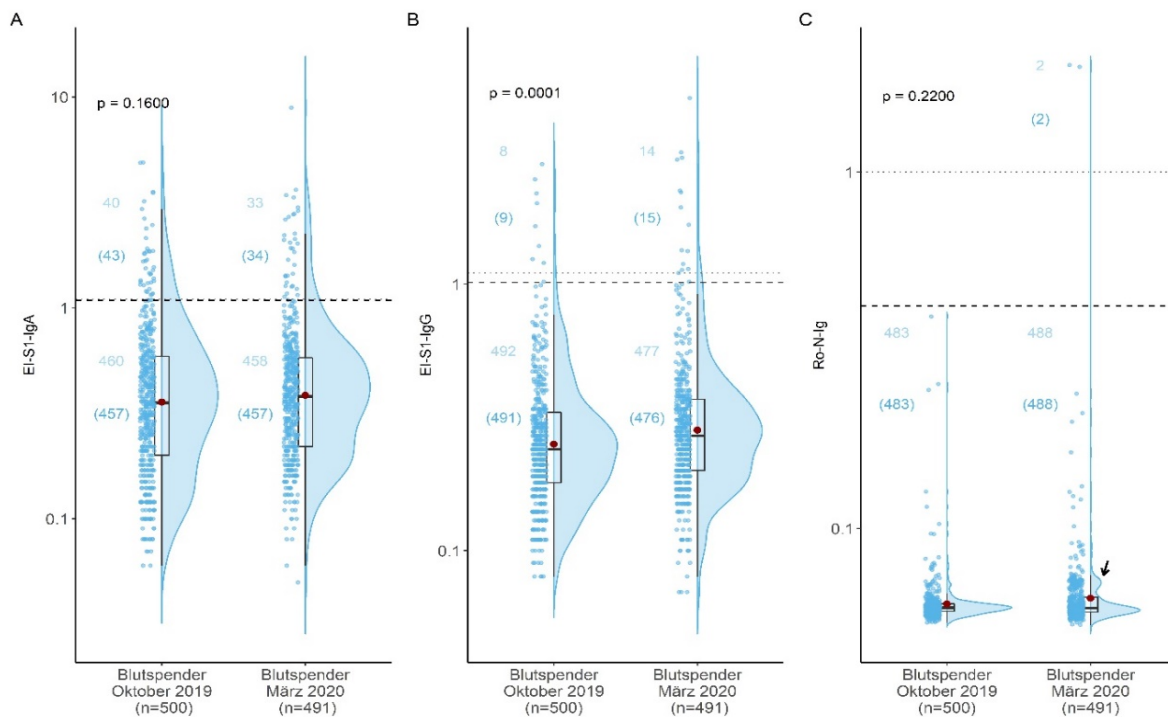
## Ergebnisse:

### Evaluierung der Screening Tests (Euroimmun Anti-SARS-CoV-2-ELISA IgA/IgG und Roche anti-N pan-Ig)

Um die sogenannte Sensitivität (Nachweisempfindlichkeit) und Spezifität (Genauigkeit) zu bestimmen, haben wir zunächst Proben von nicht-Erkrankten (=Blutspendern) und sicher Infizierten (SARS-CoV-2 Infektion mit positiver RT-PCR) gemessen.

Wir wollten wissen, welche Messwerte wir bei Blutproben von Menschen aus München erwarten können, die keine COVID-19 Erkrankung hatten. Dies ist wichtig, um zu verstehen, ob der Test auch fälschlicherweise positive Werte (falsch-positive/unspezifisch Reaktive) ausgibt, obwohl gar keine Infektion mit SARS-CoV-2

bestand. Dazu haben wir die oben beschriebenen 991 Proben von Blutspendern gemessen (siehe Abbildung 3).

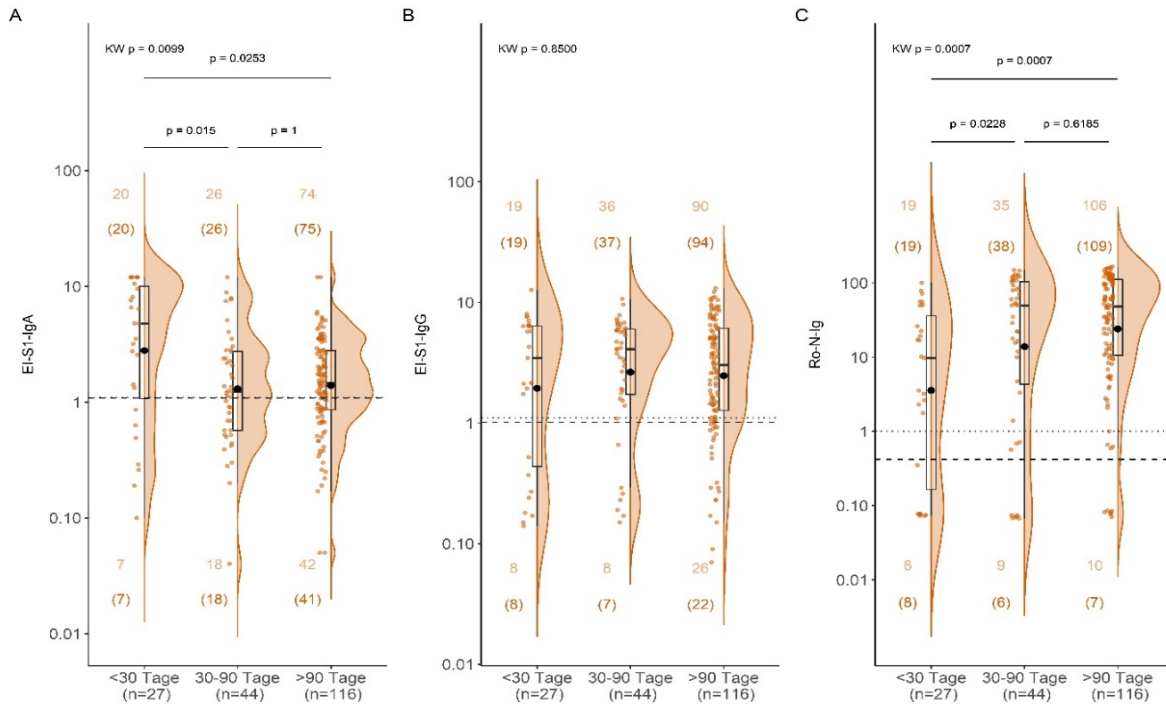


**Abbildung 3: Kontrollmesswerte.** Verteilung der Messwerte von nicht SARS-CoV-2 erkrankten Personen vor- und nach der Grippe-/Schnupfen-Zeit. Leichter Anstieg der Werte vermutlich durch Kreuzreaktionen mit den saisonalen Viren. Auch im März konnte keiner der initial Antikörper-positiv getesteten Proben als SARS-CoV-2 positiv bestätigt werden, es sind also wenige unspezifische (falsch-) positive Reaktionen festzustellen.

Dabei konnten wir feststellen, dass bei den beiden Tests von Euroimmun gegen das Spike-Protein des Virus nach dem Winter (Abbildung 3A rechts versus links und 3B rechts versus links) jeweils höhere Werte aufgetreten sind als vor dem Winter. Dieses Phänomen trat wesentlich weniger ausgeprägt bei dem Test von Roche auf, der Antikörper gegen eine andere Zielstruktur des Virus (Nukleokapsid) testet (siehe Abbildung 2). Wir konnten sehen, dass von den 991 Proben von Blutspendern - also Menschen, die eigentlich keinen Kontakt zu SARS-CoV-2 gehabt hatten - bei beiden Tests trotzdem wenige positiv getestet wurden. Bei dem Euroimmun-Test waren es etwa 20, bei dem Roche-Test 2. Dies kann zwei mögliche Ursachen haben: 1) Es gab schon früher an COVID-19 Erkrankte in München als angenommen, was allerdings sehr unwahrscheinlich ist, da keine der Proben in den nachgeschalteten Bestätigungs-Tests reagierte; oder 2) die jeweiligen Tests machen Fehler und messen fälschlicherweise positiv, was die wahrscheinlichere Ursache ist.

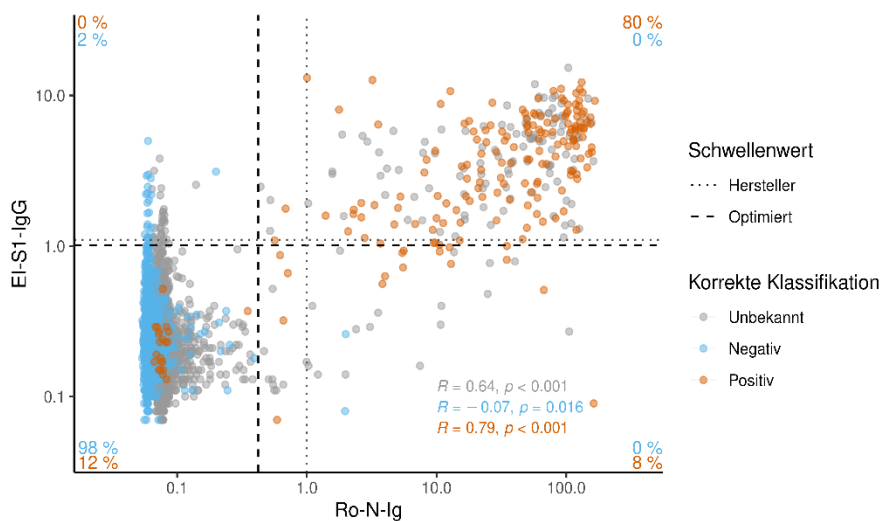
Um festzustellen, wie empfindlich die Tests beim Nachweis von dem neuen Coronavirus sind, wurden Proben von Menschen benutzt, welche eine durch RT-PCR nachgewiesene SARS-CoV-2 Infektion hatten. Ziel hierbei war es festzustellen, wie viele Erkrankungen von den Tests nicht erkannt werden, also falsch-negativ sind. Hier zeigt sich, dass der Nachweis von Antikörpern gegen das Oberflächenprotein Spike in 80% der Fälle gelang, und gegen das strukturelle Protein N in 89% der Fälle.

Eine weitere wichtige Fragestellung ist, wie lange die Antikörper im Blut verweilen (siehe Abbildung 4). Hierfür betrachteten wir bei Personen mit nachgewiesener SARS-CoV-2 Infektion die Zeit zwischen Blutabnahme und Erregernachweis im Abstrich. In unseren Messungen sehen wir, dass für IgG Antikörper auch nach etlichen Monaten weder die Nachweisrate noch die Höhe der Messwerte sinkt. Dies bedeutet, dass auch Monate nach einer SARS-CoV-2 Infektion diese mittels Antikörper nachgewiesen werden kann. Ob dies allerdings auch bedeutet, dass diese Antikörper vor einer weiteren Infektion schützen, muss noch erforscht werden.



**Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf.** Darstellung der Rohwerte von Patienten, die einen positiven RT-PCR Befund auf SARS-CoV-2 hatten. Die Zeit zwischen positivem Abstrich und Blutentnahme wurde in drei Klassen unterteilt: <30 Tage, zwischen 30-90 Tage und > 90 Tage. Der Beobachtungszeitraum liegt bei über 3 Monaten. Man sieht, dass der Antikörperanstieg beim Test von Roche länger dauert als bei dem Euroimmun IgG Test, beide aber dann unverändert hoch bleiben. Ein kleiner Anteil der Patienten entwickelte keine messbare Reaktion in den Tests. Dies kann auch dadurch zustande gekommen sein, dass der RT-PCR Befund falsch positiv war; dies ist zwar selten, kann aber vorkommen. Antikörper der Subklasse IgA treten eher im akuten Stadium auf und fallen danach ab (A), dies wird aber durch die länger bestehende IgG Reaktion ausgeglichen (B, C)

Insgesamt zeigte sich, dass die Übereinstimmung der Screeningtests gut war (91% der positiven und 98% der negativen Proben; Abbildung 5). Außerdem konnten wir mit Hilfe unserer vielen Proben aus Gruppen mit bekannter Erkrankung bzw. negativer Kontrollen die Schwellenwerte der Tests verbessern. Wir zeigen, dass bei Untersuchungen der Bevölkerung in München andere Schwellenwerte bessere Ergebnisse zeigen als die vom Hersteller empfohlenen. Vor allem wird die sogenannte Sensitivität verbessert, wodurch das Entdecken von Menschen mit nur niedrigen Antikörper-Spiegeln im Blut erleichtert wird.

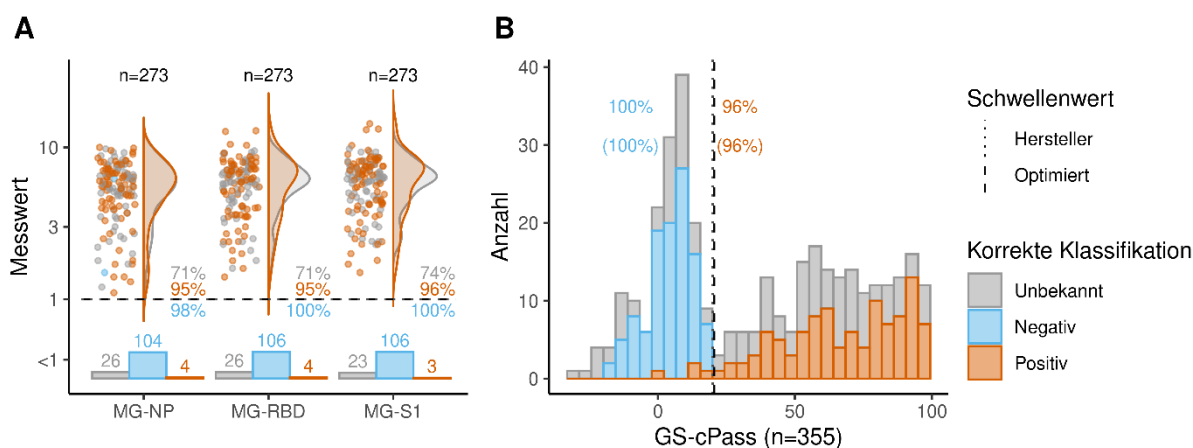


**Abbildung 5: Korrelation der zwei Tests Euroimmun S1 IgG und Roche anti-N:** Jeder Punkt ist eine Blutprobe, insgesamt sind > 6000 Punkte auf der Abbildung zu sehen. Blaue Punkte stehen für negative RT-PCR-Proben, orange Punkte zeigen Blutproben von Menschen mit positiver SARS-CoV-2 RT-PCR. Graue Punkte stellen Proben von Patienten mit unklarem Status dar (=KoCo19). Man sieht, dass 98% aller RT-PCR-negativen Proben von beiden Tests negativ gemessen werden, und 80% aller Proben von Personen mit positiver RT-PCR von beiden Tests als positiv gemessen werden.

## Evaluierung der Bestätigungstests (direkte Virenneutralisation, GenScript® cPass, VIRAMED SARS-CoV-2 ViraChip® microarray, Mikrogen Lineblot)

Von Proben, die mindestens in einem der Screeningtests positiv waren, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Dabei kamen auch sehr aufwändige Verfahren zum Einsatz, z.B. die direkte Konfrontation von echten SARS-CoV-2-Viren mit den Blutproben ("direkter Virusneutralisationstest"). Ziel hierbei ist es zu überprüfen, ob das Blut (mit den Antikörpern) in der Lage ist, das Eindringen des Virus in menschliche Zellen zu unterbinden (sogenannte Virusneutralisation). Außerdem haben wir einen Test angewandt, welcher aufgereinigte Viren-Spike Proteine (die Bindestellen des Virus – siehe Abbildung 2) mit aufgereinigten menschlichen Rezeptoren (ACE 2) im Reagenzglas interagieren lässt und die Wechselbindung somit stört (GenScript® cPass). Daneben haben wir noch weitere Tests angewandt, welche auf dem Blot-Prinzip und einem Micro-Array basieren (VIRAMED SARS-CoV-2 ViraChip® microarray und Mikrogen Lineblot).

Bei diesen Tests konnten wir zeigen, dass diese mit sehr großer Genauigkeit (fast 100% Spezifität) in der Lage waren, falsch-positive Proben als solche zu erkennen. Besonders gut waren dabei die Tests cPass (von GenScript®) und Lineblot (von Mikrogen; Abbildung 6). Diese weiteren Tests erlauben es also, bei unklaren Befunden eine bessere Aussage für den einzelnen Fall zu treffen.



**Abbildung 6: Bestätigungstests.** Links Daten der Lineblots (Mikrogen) und rechts von cPass (GenScript®). Man erkennt bei beiden Bestätigungstests in den Gruppen der positiven Patienten eine Sensitivität von 95-96% und eine Spezifität für die negativen Gruppen von 98-100%.

### Einfluss von Schnupfenviren auf die Screeningtests

Zudem sollten die Auswirkungen möglicher Infektionen mit den harmlosen Schnupfen-Coronaviren verstanden werden. Hierbei waren sogenannte Kreuzreaktionen mit SARS-CoV-2 der Fokus. Daher haben wir die positiven Proben und eine Stichprobe an negativen Blutproben noch gegen die vier in Deutschland häufig verbreiteten Schnupfen-Coronaviren getestet. Hierbei zeigte sich, dass es bei zwei der vier Schnupfenviren zu einer geringen Kreuzreaktivität kommt, welche sich jedoch nicht in falsch-positiven oder falsch-negativen Screeningtests widerspiegelt.

### **Schlussfolgerung:**

Zusammenfassend haben wir verschiedene Testsysteme direkt miteinander an denselben Proben verglichen. Insgesamt können wir zeigen, dass die Übereinstimmung der Screeningtests gut war, mit wenigen Ausnahmen. Die Ergebnisse der Blutspender deuten darauf hin, dass auch immer wieder positive Ergebnisse in den Screeningtests entstehen, obwohl keine SARS-CoV-2 Infektion vorlag. Das kann unter Umständen dazu führen, dass einzelne Menschen ein falsches Ergebnis bekommen, oder die Daten bei Studien verfälschen. Dies ist vor allem dann relevant, wenn nur sehr wenige Menschen wirklich erkrankt waren. Nehmen wir bspw. an, es waren etwa 2% der Bevölkerung erkrankt und der Test detektiert durch unspezifische Reaktionen ebenfalls

2% der Menschen positiv. Dann würde man bei einer Messung vieler Proben ca. 4% Positivität erhalten. Dies wäre dann nicht nur falsch, sondern würde auch bedeuten, dass die Hälfte aller positiven Befunde nicht richtig wäre.

Wir können durch unsere Bestätigungstests und die Auswahl der richtigen Testsysteme diesen Effekt minimieren um Werte für die richtige Rate an wirklich SARS-CoV-2 exponierten Personen zu errechnen (siehe auch separaten Artikel). Durch die Anpassung der Schwellenwerte konnten wir außerdem erreichen, dass die Leistung der Tests verbessert werden konnte, insbesondere die Sensitivität. Hierdurch wird das Entdecken von Menschen mit nur niedrigen Antikörper-Spiegeln im Blut erleichtert.

Wir haben Bestätigungstests untersucht und zeigen, dass auch andere Tests wie der Lineblot (Mikrogen) oder der cPass (GenScript®) in gleicher Weise wie die direkte Virenneutralisation als Bestätigung verwendet werden können.

Auch sehen wir, dass in der Population in München die Schnupfen/Grippe-Zeit keinen großen Einfluss auf die verwendeten Tests hat, und die meisten Menschen mit einer SARS-CoV-2 Infektion tatsächlich messbare Antikörper entwickeln, wir also mit den serologischen Verfahren nicht viele Fälle übersehen werden.

**Finanzielle Unterstützung:** Bayerische Staatsregierung, LMU Klinikum, Helmholtz Zentrum München