

Etablierung von immunologischen Testverfahren zum Nachweis von Orthopockenvirusinfektionen

Sascha ENGEL, Andreas KURTH, Andreas NITSCHKE
RKI, Zentrum für Biologische Sicherheit, Berlin

Poxviruses elicit infections with a lot of different disease patterns in mammals, birds and insects. Variola virus, which is the most famous representative among the *Poxviridae* and elicitor of smallpox, was declared eradicated in 1980 after a global immunization program initiated by the WHO. However, other poxviruses are still pathogenic for humans. A zoonotic infection caused by Monkeypox virus has been reported, being transmitted for the first time from the African to the American continent in 2003. Moreover, there are occasional human infections with Cowpox virus in Europe.

The Robert Koch Institute (RKI) is the central federal institution responsible for human disease control and prevention in Germany. The Centre for Biological Safety (Zentrum für Biologische Sicherheit, ZBS) is the central institution for issues of biological safety including the “Consultant Lab for Poxviruses” within the division ZBS1 (Highly Pathogenic Viruses). Routine diagnostics for poxvirus infections are one major duty for the Consultant Lab.

In this study several immunological methods for the detection of orthopoxviruses were evaluated. All these methods are based on the key mechanism of an antigen-antibody reaction and therefore implied testing of different antibodies and antigen compounds as well as optimizing test protocols.

The evaluation of three different ELISA-Systems (direct, competitive, antigen-capture) and a Western Blot assay expand the spectrum of diagnostic approaches for the detection of an orthopoxvirus infection. The possible correlation of IFA-, Western Blot- and ELISA-results support the conclusion, that these methods provide reliable data. Moreover, the Western Blot acts as a confirmation method for ELISA-positive

samples as well as a method for research on orthopoxvirus immunology. Both Western Blot- and competitive ELISA-protocols were successfully transferred to the Consultant Lab for Poxviruses.

ELISA

Das Akronym ELISA für den **Enzyme-linked Immunosorbent Assay** wurde zu einer Standardabkürzung in vielen wissenschaftlichen Journalen.

ELISAs sind Immunoassays, bei denen ein Reaktant auf einer Festphase immobilisiert wird und der Signalüberbringer ein Enzym ist.¹ Diese Definition beinhaltet u.a. den Enzymimmunoassay (EIA), der dem klassischen Radioimmunoassay (RIA) ähnlich ist, allerdings anstelle eines Radionukleotids ein Enzym zur Signalübertragung nutzt. Grundsätzlich kann man noch zwischen heterogenen EIAs und homologen EIAs unterscheiden. Heterogene EIAs besitzen eine feste und flüssige Phase, während homologe EIAs keine feste Phase besitzen. Letztere Form wird oft nicht unter den Oberbegriff ELISA gefasst. Der heterogene EIA fällt häufig in die Kategorie der Festphasen Immunoassays (SPI). Die Festphase kann hierbei von glatten Polystyren bis hin zur Nitrocellulose-Membran variieren. Der Begriff ELISA ist 1971 durch Engvall und Perlmann im Zusammenhang mit einem nichtkompetitiven ELISA entstanden, während EIAs historisch gesehen als kompetitiv beschrieben wurden.

Der ELISA hat die Durchführung von Antigenquantifizierung und Antikörpernachweisen so weit vereinfacht, dass er aktuell der am häufigsten angewandte quantitative Immunoassay ist. So weist man damit heute routinemäßig Infektionen mit HI-Viren, Hepatitis und vielen anderen humanen und tierischen Erregern nach. Vor 1970 war es üblich, dass nahezu alle immunodiagnostischen Nachweise entweder in flüssiger Phase abliefen oder auf zellulären Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper basierten. In dieser Zeit wurden für die Quantifizierung

¹ Butler J. E.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Immunochemistry* (ed. C. J. van Oss), CRC, 2004, 759–789); Thrower D. et al.: Antibodies in Cell Biology. *Methods in Cell Biology* (ed. D. J. Asai) Academic Press, London, 1993, 130–144.

von kleineren Molekülen Radioisotope als Signalüberträger eingesetzt und mühsame Methoden entwickelt, um gebundene von freien Reaktanden zu trennen. Die Erkenntnis, dass Proteine spontan an hydrophobe Oberflächen binden können, ermöglichte es, freies Antigen von gebundenem Antigen, ohne den Einsatz zeit- und kostenintensiver Trennmethode, zu trennen.² Eine Vereinfachung und Automatisierung der Immunoassays war die Folge.

Ein weiterer Meilenstein auf dem Weg zum ELISA war der Einsatz von Enzymen anstelle von Radionukleotiden. Enzyme sind hochspezifisch und ihre katalytischen Fähigkeiten können nicht-enzymatische Reaktionen um das Milliardenfache verstärken. Ein enzymatisches Signal nimmt, im Gegensatz zu dem Signal von Radionukleotiden und fluoreszierenden Stoffen, mit der Zeit durch die Umsetzung von immer mehr Substrat zu. ELISAs haben ähnliche Sensitivitäten und Spezifitäten wie RIAs. Darüber hinaus besitzen sie den Vorteil für den Experimentator, keine gefährlichen Radionukleotide handhaben und lagern zu müssen. Hinzu kommt, dass enzym-gekoppelte Reagenzien eine höhere Lebensdauer aufweisen und kostengünstiger sind.³ Der Einsatz von Enzymen anstelle von Radioisotopen machte dieses diagnostische System schließlich einer Vielzahl von Laboren zugänglich.⁴

Pocken

Die Menschen-Pocken, auch als Blattern bezeichnet, sind eine seit Jahrtausenden bekannte Krankheit, die schon auf dem mumifizierten Körper von Pharao Ramses V eindeutig zuordenbare Pockennarben hinterließ.⁵

² s.a. Butler, Anm. 1 und Thrower, Anm. 1; Catt, K. & Tregear, G. W.: Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. *Science*. 158, 1967, 1570–1572; Luttmann W., Bratke K., Küpper M., & Myrtek D.: Quantitative Immunoassays. *Der Experimentator – Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2006, 113–117.

³ Butler, Anm. 1; Thrower et al, Anm. 1

⁴ Butler, Anm. 1

⁵ Internetportal für Medizin und Gesundheit, 2007.
<http://www.onmeda.de/krankheiten/pocken.html>

Weiterhin gibt es Berichte von Pockenepidemien 1000 v. Chr. in China, auf dem indischen Subkontinent und der arabischen Halbinsel. Eine erste Beschreibung der Pocken lieferte bereits 340 n. Chr. der chinesische Arzt Ko Hung.

Im 6. Jahrhundert ist historisch die erste Pockenepidemie Europas belegt.⁶ Worauf weitere Epidemien im 13. Jahrhundert in England, sowie im 15. Jahrhundert in Deutschland folgten.

Im Krieg zwischen den amerikanischen Ureinwohnern und den europäischen Eroberern fanden die Pocken erstmals Anwendung als biologische Waffe.⁷ Dabei überreichte ein britischer Befehlshaber als Zeichen seiner Anerkennung für die Besetzung eines britischen Forts zwei Häuptlingen pockeninfizierte Decken. Dies führte zu einer verheerenden Epidemie unter den amerikanischen Ureinwohnern, während die Europäer, geschützt von vorangegangenen Pockenausbrüchen, gering gefährdet waren.

Ab dem 18. Jahrhundert lösten Pocken die Pest als schlimmste Krankheit ab.⁸ Schätzungen zufolge erlagen in dieser Zeit pro Jahr etwa 400.000 Menschen einer Pockeninfektion.

Noch in der Neuzeit gab es in Europa Pockenepidemien, so z. B. 1950 in Glasgow, 1957 in Hamburg oder 1967 in der Tschechoslowakei.⁹

1958 begann die Weltgesundheitsorganisation (WHO) ihr global geführtes Impfprogramm, welches so erfolgreich war, dass der weltweit letzte natürliche Fall einer Pockeninfektion 1977 in Somalia belegt ist.¹⁰ Seit 1980 gelten die Pocken als ausgerottet und es besteht keine gesetzliche Impfpflicht mehr.

Eines der bekanntesten Opfer der Pocken war Goethe. In seinem Buch „Dichtung und Wahrheit“ beschreibt er eindrucksvoll seine schwere Pockeninfektion: „Das Übel betraf nun auch unser Haus und überfiel mich mit ganz besonderer Heftigkeit. Der ganze Körper war mit Blattern übersät, ...“¹¹

⁶ a.a.O.

⁷ Sudhoffs Archiv. 90, 2007, 219–232.

⁸ a.a.O.

⁹ a.a.O.

¹⁰ Moore, Z. S., Seward, J. F. & Lane, J. M.: Smallpox. *Lancet*. 367, 2006, 425–435.

¹¹ Goethe, J. W.: Dichtung und Wahrheit. 12. 1831. Reclam.

Der bekannteste Vertreter der *Poxviridae* und Auslöser der schwarzen Pocken, das Variola Virus, wurde nach einem von der WHO initiierten Impfprogramm 1980 für ausgerottet erklärt. Doch auch andere Viren der Familie der *Poxviridae* können humanpathogen sein. So kam es im Jahr 2003 das erste Mal auf dem amerikanischen Kontinent zu zoonotischen Infektionen des Menschen mit Affenpockenviren. In Europa treten dagegen regelmäßig humane Infektionen mit Kuhpocken-Viren auf.

Ergebnisse

Die Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung von serologischen Methoden zum Nachweis von Orthopockeninfektionen.

Es wurden drei verschiedene ELISA-Systeme (direkt, kompetitiv, Antigen-Capture) und ein Western Blot etabliert. Eine Reproduzierbarkeitsstudie hat gezeigt, dass ein Vergleich der Ergebnisse an verschiedenen Tagen mit einer internen Kontrolle möglich ist. Der für den jeweiligen Test berechnete Cut-Off erlaubt die Einteilung der getesteten Seren in ELISA-positiv bzw. ELISA-negativ. Der kompetitive ELISA ermöglicht die Detektion von orthopockenspezifischen Antikörpern verschiedener Spezies. Der Antigen-Capture ELISA besitzt eine Nachweisgrenze, abhängig vom zu detektierenden Virus, von ca. 2×10^5 Kuhpocken-Viruspartikeln pro Milliliter. Dabei konnte ein funktionierendes ELISA-System nur mit einer Kombination aus monoklonalem Fänger- und polyklonalem Detektionsantikörper aufgebaut werden. Abschließend steht mit dem Western Blot eine Methode zur Bestätigung der ELISA-Ergebnisse und für die Aufklärung der Immunologie von Orthopockeninfektionen zur Verfügung.

Die Ergebnisse von IFA, Western Blot und ELISA konnten miteinander korreliert werden. Dies zeigt, dass die etablierten Methoden vertrauenswürdige Daten liefern. Der etablierte Western Blot sowie der kompetitive ELISA werden das Spektrum der orthopockenspezifischen diagnostischen Nachweismethoden im Konsiliarlabor für Pockenviren des Robert Koch-Instituts erweitern.