

PRNT von SARS-CoV-2

Isolation von SARS-CoV-2 aus lokalem Patientenmaterial, Evolutionsexperiment und Aufbau eines Neutralisationstests

Programm / Ausschreibung	Emergency-Call, Emergency-Call Coronavirus 2020, Emergency-Call Coronavirus 2020	Status	abgeschlossen
Projektstart	25.05.2020	Projektende	21.05.2021
Zeitraum	2020 - 2021	Projektlaufzeit	13 Monate
Keywords			

Projektbeschreibung

Serielle Passagen, Genomanalysen und Aufbau eines Plaque-Reduktionsneutralisationstests nach Isolation von SARS-CoV-2 aus Patientenmaterial in Osttirol

Sonnleitner (Lamprecht) ST1, Dorigi J1, Jansen B1, Gietl S1, Schönberger C1, Koblmüller S2, Sturmbauer C2, Walder G1.

1 Dr. Gernot Walder GmbH, Medizinisches Labor, Abteilung für Virologie, 9931 Außervillgraten 30, Austria.
 sissy.lamprecht@infektiologie.tirol

2 Department of Zoology, Karl-Franzens-University Graz, Universitätsplatz 2, 8010 Graz, Austria.

Ziel der Studie ist der Aufbau eines Plaque-Reduktionsneutralisationstests (PRNT), der in der Diagnostik den Goldstandard zur Ermittlung neutralisierender Antikörper im Serum darstellt. Die dazu erforderlichen Isolate von SARS-CoV-2 werden nach den Vorschriften des Biosafety Level-3 aus ausgewählten RT-PCR- positiven Rachen- oder Stuhlproben auf Zellkulturen inokuliert. Isolate der Passage 0 werden auf zwei unterschiedlichen Zell-Linien inokuliert und serielle Passagen mehrerer Wildvirus-Linien vorgenommen. Eine potentielle Entstehung von Quasispezies in vitro wird durch Sequenzieren hochvariabler Regionen (N, ORF8) und punktuell Whole Genome Sequencing bei Passage 1, 5 und 10 dokumentiert und die mögliche Bedeutung der Mutationen im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Definierte Positivseren werden im Zuge der medizinischen Versorgung der lokalen Bevölkerung erhalten und mittels in house – Immunfluoreszenztest (IFT) auf Vorhandensein und Titerhöhe von IgG – Antikörpern untersucht. Im IFT positive Seren werden im Plaque-Reduktionsneutralisationstest (PRNT) auf deren Neutralisationsfähigkeit getestet. Weiters soll eine Untersuchung der Neutralisationsfähigkeit der anti-SARS-CoV-2-Antikörper gegen weitere Vertreter der Beta- bzw. Alpha Coronaviridae erfolgen (E229 und OC43). Die Ermittlung des Cut-off-Titers durch definiert negative Seren, Markierung der Zellen mit konjugierten Markern und das Auslesen am Mikrotiter-Leser soll es

ermöglichen, den PRNT in der Mikrotiterplatte zum routinediagnostischen Tool mit hoher Durchsatzrate umzuwandeln, immer unter Berücksichtigung der Notwendigkeit der Sicherheitsvorschriften des BSL-3 Bereiches.

Folgende Fragen sollen im Zuge dieser Studie geklärt werden: Wie groß ist die Evolutionsrate von SARS-CoV-2 in Kultur? Gibt es genomische Anpassungen durch Serielles Passagieren? Gibt es Hinweise darauf, dass sich die genomischen Anpassungen auf unterschiedlichen Zell-Linien unterscheiden? Werden bei allen COVID-19 Patienten neutralisierende Antikörper entwickelt oder muss eine gewisse Schwere der Erkrankung erfolgt sein? Hierfür wurde ein Severity Index entwickelt. Gibt es Kreuzreaktivität zwischen IgG Antikörpern von COVID-19 Patienten gegen andere Vertreter der Beta - oder Alpha -Coronaviridae? Wie lange bleiben die neutralisierenden Antikörper im Patienten aufrecht? Schützt eine vorangegangene Infektion mit einem nonSARS-CoV-2 Corona-Virus vor einem schweren Krankheitsverlauf oder wird er dadurch sogar geschürt? Wirkt eventuelle Kreuzreaktivität möglicherweise als Enhancer für Infektionen (= antibody-dependent enhancement)?

Abstract

Serial passaging, genome analyses and design of a plaque – reduction neutralization test after isolation of SARS-CoV-2 from patients´ swabs in East Tyrol.

Sonnleitner (Lamprecht) ST1, Dorigi J1, Jansen B1, Gietl S1, Schönberger C1, Koblmüller S2, Sturmbauer C2, Walder G1.

1 Dr. Gernot Walder GmbH, Medizinisches Labor, Abteilung für Virologie, 9931 Außervillgraten 30, Austria.
sissy.lamprecht@infektiologie.tirol

2 Department of Zoology, Karl-Franzens-University Graz, Universitätsplatz 2, 8010 Graz, Austria.

The aim of our study is the development of a plaque-reduction neutralization test (PRNT), which represents the gold standard in identifying neutralizing antibodies in sera. The necessary strains of SARS-CoV-2 will be isolated from RT-PCR-positive sputum and stool samples on VeroB4-cultures paying full attention on the standards of BSL-3. Several wild virus-strains of SARS-CoV-2 from passage 0 will be inoculated onto two different cell cultures and passaged serially. The emergence of quasi-species in vitro will be determined using sequencing of highly variable regions (N, ORF) and punctual whole genome sequencing at passage 1, 5 and 10 and its possible meanings in comparison to the wild virus – type will be investigated.

In the course of the medical treatment of the local population, defined positive sera are collected and screened for the presence of specific IgG antibodies and titer levels using an in house – immunofluorescence assay (IFA). Sera positive in IFA will be retested and investigated for neutralizing abilities using the PRNT. Furthermore, positive sera will be investigated for neutralizing antibodies against OC43 und E229. The assessment of the cut off titer using defined negative sera, flagging of cells with conjugated markers and admitting of a microplate reader into the working process shall adjust the PRNT into a routine-diagnostic tool with higher throughput, though keeping in mind the circumstance of bearing up the BLS-3 conditions.

The following questions are to be investigate: Can we determine evolutionary rates of SARS-CoV-2 in

vitro? Does serial passaging lead to genomic variabilities or adaptations? Are there hints of different variations or adaptations depending on the cell lines? Does a significant number of COVID-19 patients develop neutralizing antibodies or does the development depend on the severity of the disease? Therefore, we calculated a severity index. Can we state cross reactivity between antibodies of COVID19 patients and other members of the Beta- or Alphacoronavirus family? Are there hints for long lasting neutralization and immunity following former infections with SARS-CoV-2? Does a former infection with a nonSARS-CoV-2 Coronavirus protect against a severe course of disease or does it rather enhance the etiopathology (antibody-dependent enhancement)?

Projektpartner

- Dr. Gernot Walder GmbH, Hygiene und medizinische Mikrobiologie