

SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Test Kit

Gebrauchsanweisung



Microarray auf Basis eines Enzym-Immunoassays zum qualitativen Nachweis von **IgG** Antikörpern gegen spezifische Antigene des **SARS-CoV-2** (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, „Schweres akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2“, COVID-19) in humanem Serum.

Auf dem **SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Test Kit** werden die aufgereinigten spezifischen Oberflächenantigene S1, RBD und S2 und das Nukleokapsidantigen N des SARS-CoV-2, die RBD der Delta-Variante von SARS-CoV-2 (B.1.617.2) sowie die Nukleokapsidantigene der humanen Coronaviren HCoV-229E, -NL63, -OC43 und -HKU1 an definierten Positionen auf Nitrozellulose gebunden.

Die Reaktivitäten der Antigene S1, RBD, S2 und N wurden am *First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)* (3) eingestellt und ermöglichen somit eine Korrelation mit Messwerten in Binding Antibody Units pro Milliliter (**BAU/ml**). Die Quantifizierung von SARS-CoV-2 spezifischen anti-S1, anti-RBD, anti-S2 und anti-N IgG Antikörpern in **BAU/ml** erfolgt über die ViraChip® Software.

Der SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Test Kit ist nach der Richtlinie **98/79/EG** hergestellt.

Testprinzip

Am Boden jeder Kavität der 96 well Standard-Mikrotiterplatte (MTP) des ViraChip® Test Kits befindet sich eine Nitrozellulose-Membran auf der die Antigene des jeweiligen Erregers als Analytspots fixiert sind (Microarray).

Zum Antikörpernachweis wird zunächst jeweils eine verdünnte Serumprobe in je eine ViraChip® Kavität gegeben und inkubiert. Wenn entsprechende erregerspezifische Antikörper in der Serumprobe vorhanden sind, binden diese unter Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen an die fixierten Analytspots.

Nach mehrmaligem Waschen erfolgt die Zugabe von mit Alkalischer Phosphatase gekoppeltem anti-Human-IgG-Konjugat und eine anschließende Inkubation. Während dieser Inkubation bindet das Konjugat an vorhandene Antigen-Antikörper-Komplexe.

Nach erneutem Waschen und Zugabe der Chromogen / Substratlösung setzt die in den Antigen-Antikörper-Konjugat-Komplexen befindliche Alkalische Phosphatase das Chromogen / Substrat um und färbt damit die Analytspots auf dem Microarray lila bis schwarz an. Nach weiteren Wasch- und Trocknungsschritten werden die Analytspot-Intensitäten gemessen und mittels ViraChip® Software ausgewertet.

Die Analytspots dienen dem Nachweis von Antikörpern gegen die SARS-CoV-2 spezifischen Antigene **S1, RBD, Delta-RBD, S2** und **N**. Zusätzlich werden Antikörper gegen die **HCoV-229E, -NL63, -OC43** und **-HKU1** Nukleokapsidantigene nachgewiesen.

Jeder Microarray beinhaltet neben den Analytspots Kontrollspots für **Serumkontrollen, Konjugatkontrollen, Kalibratorkontrollen** und eine **Negativkontrolle**.

Zur Kennzeichnung sind die Kavitäten der Mikrotiterplatte farblich kodiert:

Dazu ist der SARS-CoV-2 ViraChip® IgG durch einen **braunen Vollkreis** auf dem Kavitätenrand markiert.

Best.-Nr.:	V-COCGOK	Best.-Nr.:	V-COCGDK (Deca Kit)
Packungsgröße:	1 MTP à 96 einzelbrechbaren Kavitäten	Packungsgröße:	10 MTP à 96 einzelbrechbaren Kavitäten
Probenmaterial:	10 µl Serum	Probenmaterial:	10 µl Serum
Testdauer:	ca. 130 Minuten	Testdauer:	ca. 130 Minuten

Kitinhalt

1 bzw. 10 MTP à 96 Kavitäten	SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Antigen Coated Wells Einzelbrechbare Kavitäten mit ViraChip® Microarrays, gebrauchsfertig	(Prod.-Nr.: V-COCGAC)
1x bzw. 10x 12 ml	ViraChip® AP-Anti-Human IgG Conjugate Anti-human IgG Konjugatlösung für ViraChip® Teste, aus Ziege, mit boviner alkalischer Phosphatase, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVCGKI)
1x bzw. 10x 100 ml	ViraChip® / ViraStripe® / ViraBlot® Diluent / Wash Buffer Waschpuffer-Konzentrat für ViraChip® Teste, mit Detergenzien und Salzen zum Verhindern unspezifischer Bindungen, 10-fach	(Best.-Nr.: V-UVNUWP)
1x bzw. 10x 12 ml	ViraChip® Chromogen / Substrate Solution Chromogen/Substratlösung für ViraChip® Teste, mit BCIP / NBT, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVUCUS)

Zusätzlich erforderlicher Puffer für die Probenverdünnung, wird separat mitgeliefert

50 ml	ViraChip® Sample Buffer Probenpuffer für ViraChip® Teste, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-UVUCUPP)
-------	---	------------------------

Optional erhältlich

1 MTP-Riegel à 8 Kavitäten	SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Antigen Coated Wells (8) Einzelbrechbare Kavitäten mit ViraChip® Microarrays, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-COCGRT)
330 µl	SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Positive Control IgG positives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-COCGPK)
330 µl	SARS-CoV-2 ViraChip® IgG,A,M Negative Control IgG, IgA, IgM negatives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	(Best.-Nr.: V-COCPNK)

Zusätzlich geforderte Ausrüstung und benötigtes Material

1. ViraChip Software®	zum Vorbereiten, Durchführen und Auswerten des Testlaufes, ab v1.3.0-1960	(Best.-Nr.: V-VCNUPR)
2. 2D-Barcode Scanner	zum Lesen der DataMatrix-Codes	
3. Mikrotiterplatte mit 96 Leerkavitäten	zum Auffüllen angefangener Riegel der Mikrotiterplatte im Halterahmen	(Best.-Nr.: V-UVNMTP)
4. Orbitalschüttler (750 rpm) oder Linearschüttler (20 Hz)	zur Durchmischung von Proben und Reagenzien während der Prozessierung	
5. ViraChip® Scanner oder ViraChip® Reader	zur Digitalisierung / Messung entwickelter ViraChip® Teste, ab ViraChip® Scanner v1.0 bzw. ViraChip® Reader Rev.01	(Best.-Nr.: V-UVCCSCA) (Best.-Nr.: V-UVCCAM)
6. Optional: Ventilator/ Lüfter	zur schnelleren Trocknung der entwickelten Mikrotiterplatten	

Vorbereiten der Reagenzien und der Patientenproben

	Alle Reagenzien und die verpackte Mikrotiterplatte vor Gebrauch auf Raumtemperatur (RT: 20-23°C) bringen. Alle Reagenzien vor Gebrauch gut durchmischen.
Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung:	Waschpuffer-Konzentrat 1:10 in destilliertem oder deionisiertem Wasser (H ₂ O) verdünnen: 100 ml Waschpuffer-Konzentrat + 900 ml H ₂ O
Probenpuffer:	Gebrauchsfertig
Konjugatlösung:	Gebrauchsfertig
Chromogen / Substratlösung:	Gebrauchsfertig
MTP-Kavitäten:	Die Mikrotiterplatte (MTP) vorsichtig aus der Verpackung entnehmen und die benötigte Anzahl an Kavitäten in einen leeren Mikrotiterplattenrahmen stecken (Vorbereiten und Durchführen des Testlaufes, Punkt 3). Nach Entnahme aus der Verpackung Kavitäten sofort verwenden. Nicht benötigte Kavitäten sofort wieder in die Originalverpackung zurückgeben, dicht verschließen und bei 2-8°C lagern.
Patientenproben:	Die Patientenproben werden in einer 1:76 Verdünnung eingesetzt, z.B. 10 µl Patientenprobe + 750 µl Probenpuffer . Von der verdünnten Probe werden für die Prozessierung 100 µl pro Kavität benötigt.
Kontrollen:	Bei Bedarf wird das positive und das negative Kontrollserum in einer 1:16 Verdünnung eingesetzt, z.B.: 10 µl Kontrollserum + 150 µl Probenpuffer . Von der verdünnten Kontrolle werden für die Prozessierung 100 µl pro Kavität eingesetzt.

Aufbau des SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Microarrays

Antigene:

Jedes der SARS-CoV-2 spezifischen Antigene **S1**, **RBD**, **Delta-RBD**, **S2** und **N** sowie die **HCoV-229E**, **-NL63**, **-OC43** und **-HKU1** Nukleokapsidantigene sind jeweils drei Mal in identischer Konzentration als Spottriplett aufgetragen. Jedes Spottriplett entspricht einer Bande im Western Blot / Immunoblot.

Kontrollen:

Jede ViraChip® Kavität enthält folgende integrierten Kontrollen:

Zwei Serumkontrollen (sc), eine Negativkontrolle (nc), zwei IgG Konjugatkontrollen (ccG), zwei IgA Konjugatkontrollen (ccA), zwei IgM Konjugatkontrollen (ccM) und sechs Kalibratorkontrollen (cal).

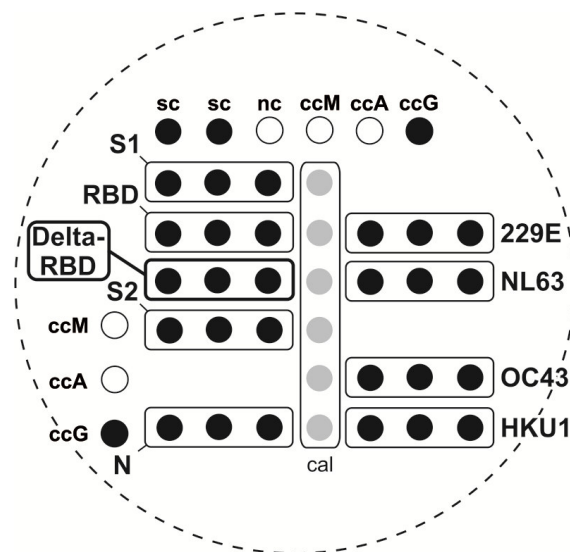


Abbildung 1: Abbildung einer Kavität aus der Mikrotiterplatte mit dem SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Microarray (vergrößert). Anordnung der Spottriplets für Antigene und der Spots für integrierte Kontrollen.

Nomenklatur und Beschreibung der SARS-CoV-2 Antigene aus der Literatur

Nomenklatur:	Antigen:	Bemerkung:
S1	Spike-Glykoprotein Untereinheit S1 von SARS-CoV-2	Die S1-Untereinheit des SARS-CoV-2 Spike-Proteins ist essentiell für die Bindung des Virus an den ACE2-Rezeptor an der Oberfläche der Wirtszelle (6). Antikörper werden sowohl gegen die Rezeptorbindedomäne als auch die N-terminale Domäne von S1 gebildet (5,21). Antikörper gegen S1 gelten als spezifisch und sensitiv für SARS-CoV-2 (17).
RBD	Rezeptorbindedomäne von SARS-CoV-2	Die Rezeptorbindedomäne (RBD) von SARS-CoV-2, welche in der S1-Untereinheit enthalten ist, spielt bei der Bindung des Virus an den ACE2-Rezeptor an der Oberfläche der Wirtszelle eine entscheidende Rolle (8,6). Neutralisierende Antikörper werden v.a. gegen die RBD gebildet (20,10). Antikörper gegen RBD gelten als spezifisch und sensitiv für SARS-CoV-2 (17).
Delta-RBD	Rezeptorbindedomäne der Delta-Variante von SARS-CoV-2 (B.1.617.2)	Die Rezeptorbindedomäne der Delta-Variante von SARS-CoV-2 (B.1.617.2) zeichnet sich durch die Mutationen L452R und T478K aus (1,2). Es gibt Hinweise darauf, dass diese zwei Mutationen einen Einfluss auf die Bindung von Antikörpern an die RBD von SARS-CoV-2 haben können (2).
S2	Spike-Glykoprotein Untereinheit S2 von SARS-CoV-2	Die S2-Untereinheit des SARS-CoV-2 Spike-Proteins fusioniert die Wirts- und die Virusmembran nach der Bindung des Virus an die Wirtszelle und ermöglicht damit dem Virusgenom in die Wirtszelle einzudringen (6). Die serologische Bedeutung von Antikörpern gegen S2 ist derzeit noch wenig untersucht.
N	Nukleokapsid-Protein von SARS-CoV-2	Das Nukleokapsid-Protein / Nukleoprotein von SARS-CoV-2 ist für die virale Replikation notwendig (9). Durch Wechselwirkungen sowohl mit dem viralen Genom als auch mit anderen viralen Proteinen ist es von grundlegender Bedeutung bei der Assemblierung des Virions (22,19). Antikörper gegen das Nukleokapsid-Protein sind als spezifisch und sensitiv für SARS-CoV-2 beschrieben (17).

Nomenklatur und Beschreibung der HCoV Antigene aus der Literatur

Nomenklatur:	Antigen:	Bemerkung:
229E	Nukleokapsid-Protein von HCoV-229E	Das Nukleokapsid-Protein / Nukleoprotein des Alpha-Coronavirus HCoV-229E ist für die virale Replikation notwendig (14,7) und weist eine Aminosäuresequenzübereinstimmung mit dem SARS-CoV-2 Nukleokapsid-Protein von 24% auf.
NL63	Nukleokapsid-Protein von HCoV-NL63	Das Nukleokapsid-Protein / Nukleoprotein des Alpha-Coronavirus HCoV-NL63 ist für die virale Replikation notwendig (23,7) und weist eine Aminosäuresequenzübereinstimmung mit dem SARS-CoV-2 Nukleokapsid-Protein von 26% auf.
OC43	Nukleokapsid-Protein von HCoV-OC43	Das Nukleokapsid-Protein / Nukleoprotein des Beta-Coronavirus HCoV-OC43 ist für die virale Replikation notwendig (4,7) und weist eine Aminosäuresequenzübereinstimmung mit dem SARS-CoV-2 Nukleokapsid-Protein von 34% auf.
HKU1	Nukleokapsid-Protein von HCoV HKU1-	Das Nukleokapsid-Protein / Nukleoprotein des Beta-Coronavirus HCoV-HKU1 ist für die virale Replikation notwendig (7) und weist eine Aminosäuresequenzübereinstimmung mit dem SARS-CoV-2 Nukleokapsid-Protein von 31% auf.

Vorbereiten und Durchführen des Testlaufes

Bei automatisierter Prozessierung können sich Inkubationszeiten, Volumina und die Reihenfolge der einzelnen Arbeitsschritte von der im Folgenden aufgeführten Arbeitsvorschrift unterscheiden. Eine detaillierte Schritt-für-Schritt-Anleitung für die verwendete Automationslösung sowie eine Anleitung für die Benutzung der ViraChip®-Software wird bei der Einrichtung der Geräte und Schulung durch die Viramed Biotech AG zur Verfügung gestellt. Einzelheiten sind im Abschnitt „Hinweise zu Geräten und Software“ beschrieben.

1. Belegen

Testauswahl und Eintrag der Probanden in den Belegungsplan der ViraChip®-Software.

2. Bestücken

Scannen der 2D-Barcodes auf den Etiketten des Test Kits und der Mikrotiterplatte, zur Übertragung der Chargennummern und der chargen-spezifischen Faktoren (lot specific factors).

3. Prozessieren

Alle Schritte der Prozessierung bei RT durchführen.

3.1 Vorbereitung

- Die gemäß der Belegung definierte Anzahl an Kavitäten in den Halterahmen setzen.
- Leere Positionen eines Riegels der Mikrotiterplatte im Halterahmen mit Leerkavitäten auffüllen. Die Riegel sind auf der Mikrotiterplatte mit 1-12 gekennzeichnet.

Darauf achten, dass beim Brechen der Riegel keine Kunststoffpartikel in die Kavitäten fallen.

3.2 Vorinkubation

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

3.3 Seruminkubation

- Gemäß dem Belegungsplan 100 µl verdünnte Patientenprobe bzw. 100 µl verdünntes Kontrollserum der entsprechenden Kavität zugeben.
- 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

3.4 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Absaugnadeln so einstellen bzw. Pipetten so verwenden, dass die Kavitätenböden nicht beschädigt werden.

3.5 Konjugatinkubation

- Je Kavität 100 µl Konjugatlösung zugeben.
- 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Die Kavitätenböden müssen während der Inkubationsschritte vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein.

3.6 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben.
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

Während der Inkubations- und Waschschriffe einen Orbitalschüttler, einstellbar auf eine Frequenz von ca. 750 rpm, oder einen Linearschüttler, einstellbar auf eine Frequenz von ca. 20 Hz, verwenden.

3.7 1 x waschen

- Je Kavität 300 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben.
- 1 Minute bei RT inkubieren.
- Flüssigkeit absaugen.

3.8 Substratinkubation

- Je Kavität 100 µl Chromogen/Substratlösung zugeben.
- 15 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
- Stoppen: Flüssigkeit absaugen.

3.9 3 x waschen

- Je Kavität 300 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben.
- Keine Zwischeninkubation.
- Flüssigkeit absaugen.

3.10 Kavitäten trocknen

20 Minuten bei maximal 60% Luftfeuchtigkeit unter kontinuierlichem Luftstrom trocknen lassen.

Bei höherer Luftfeuchtigkeit kann sich die Trockenzeit verlängern. Alternativ 12 Stunden lichtgeschützt bei RT trocknen lassen.

4. Scannen

ViraChip® Microarrays mit dem ViraChip® Scanner oder dem ViraChip® Reader messen.

Messungen der ViraChip® Microarrays sind innerhalb von 24 Stunden nach Prozessierung durchzuführen (Mikrotiterplatte lichtgeschützt aufbewahren). Die genaue Durchführung bitte dem Geräte-Handbuch entnehmen.

5. Analysieren

5.1 Zuordnung der Antigen-Spottriplets und der Kontrollspots überprüfen (Technisch validieren)

Jeder Spot wird aufgrund seiner Position von der ViraChip® Software automatisch dem entsprechenden Antigen-Spottriolett bzw. dem entsprechendem Kontrollspot zugeordnet.

Die automatische Zuordnung muss visuell mit dem Muster entsprechend Abb. 1 überprüft werden. Zuordnungen, die nicht dem dargestellten Muster entsprechen im Feld „QC“ auf „nicht gültig“ setzen. Die entsprechende Probe muss wiederholt werden.

5.2 Gültigkeitsprüfung

Die Gültigkeitsprüfung wird von der ViraChip® Software automatisch durchgeführt.

Ein ViraChip® Microarray ist gültig, wenn folgende Kontrollspots die in der ViraChip® Software hinterlegten Kriterien erfüllen:

- **Serumkontrollen** (sc) über Grenzwert
- **Konjugatkontrollen IgG** (ccG) über Grenzwert
Die Konjugatkontrollen IgG müssen stärker reagieren als die Kontrollen der anderen Konjugatklassen.
- **Kalibratorkontrollen** (cal) über Grenzwert
- **Negativkontrolle** (nc) unter Grenzwert

Falls eines der genannten Kriterien nicht erfüllt ist, wird der ViraChip® Microarray als „nicht gültig“ klassifiziert.

Nicht gültige ViraChip® Microarrays dürfen nicht ausgewertet werden und müssen wiederholt werden.

5.3 Auswertung der ViraChip® Microarrays

Die Bewertung der Patientenproben wird von der ViraChip® Software automatisch nach den im Folgenden definierten Auswertekriterien durchgeführt:

Die ViraChip® Einheiten jedes Spottrioletts werden unter Berücksichtigung der chargen-spezifischen Faktoren relativ zu den Kalibratorkontrollen durch die ViraChip® Software berechnet.

Auswertekriterien für die Intensitäten der SARS-CoV-2 Spottripletts

ViraChip®-Einheiten der Spottripletts	Ergebnis	Beurteilung
Mindestens ein Spottriplett ≥ 100 ViraChip®-Einheiten aus: S1, RBD / Delta-RBD, S2, N <u>oder</u> S1 und RBD / Delta-RBD Spottripletts ≥ 50 ViraChip®-Einheiten	Positiv	Spezifische IgG Antikörper gegen SARS-CoV-2 nachweisbar.
Keines der oberen Kriterien, aber mindestens ein Spottriplett ≥ 65 ViraChip®-Einheiten <u>und</u> mindestens zwei zusätzliche Spottripletts ≥ 20 ViraChip®-Einheiten aus: S1, RBD / Delta-RBD, S2, N	Grenzwertig	Anwesenheit spezifischer IgG Antikörper gegen SARS-CoV-2 ist fraglich. Für grenzwertige Ergebnisse wird nach MiQ35a eine Verlaufskontrolle empfohlen (15).
Alle anderen Konstellationen	Negativ	Spezifische IgG Antikörper gegen SARS-CoV-2 sind nicht nachweisbar.

Die SARS-CoV-2 Antigen-Reaktivitäten sind unabhängig von den Reaktivitäten der Antigene der humanen Coronaviren HCoV-229E, -NL63, -OC43 und -HKU1 zu bewerten.

Quantifizierung

Der SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Test Kit ist am *First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)* (3) kalibriert und ermöglicht über die ViraChip® Software die **Quantifizierung** von anti-S1, anti-RBD / -Delta-RBD, anti-S2 und anti-N Antikörperkonzentrationen in **BAU/ml**.

Bei einer Quantifizierung mit dem SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Test Kit sind folgende Schwellenwerte zu beachten:

- Eine anti-S1 IgG Antikörperkonzentration von **≥ 25 BAU/ml** gibt einen Hinweis auf SARS-CoV-2 spezifische anti-S1 IgG Antikörper.
- Eine anti-RBD / -Delta-RBD IgG Antikörperkonzentration von **≥ 15 BAU/ml** gibt einen Hinweis auf SARS-CoV-2 spezifische anti-RBD / -Delta-RBD IgG Antikörper.
- Eine anti-S2 IgG Antikörperkonzentration von **≥ 72 BAU/ml** gibt einen Hinweis auf SARS-CoV-2 spezifische anti-S2 IgG Antikörper.
- Eine anti-N IgG Antikörperkonzentration von **≥ 16 BAU/ml** gibt einen Hinweis auf SARS-CoV-2 spezifische anti-N IgG Antikörper.

Auswertekriterien für die Intensitäten der HCoV-229E, -NL63, -OC43 und -HKU1 Spottripletts

Die Reaktivitäten der Nukleokapsidantigene von HCoV-229E, -NL63, -OC43 und -HKU1 sind rein informativ und ermöglichen keine Rückschlüsse auf eine Kreuzreaktivität mit den SARS-CoV-2 Antigenen bzw. auf eine Infektion oder den Immunstatus bezüglich der humanen Coronaviren HCoV-229E, -NL63, -OC43 und -HKU1.

Für die humanen Coronaviren HCoV-229E, -NL63, -OC43 und -HKU1 ist insgesamt eine Seroprävalenz von ungefähr 90% bei Erwachsenen zu erwarten (13,12,16,18). Diese kann saisonal und regional schwanken (18,12).

ViraChip®-Einheiten der Spottripletts	Ergebnis	Beurteilung
229E Spottriplett ≥ 100 ViraChip®-Einheiten	Positiv für HCoV-229E	IgG Antikörper gegen das Nukleokapsidprotein von HCoV-229E nachweisbar.
NL63 Spottriplett ≥ 100 ViraChip®-Einheiten	Positiv für HCoV-NL63	IgG Antikörper gegen das Nukleokapsidprotein von HCoV-NL63 nachweisbar.
OC43 Spottriplett ≥ 100 ViraChip®-Einheiten	Positiv für HCoV-OC43	IgG Antikörper gegen das Nukleokapsidprotein von HCoV-OC43 nachweisbar.
HKU1 Spottriplett ≥ 100 ViraChip®-Einheiten	Positiv für HCoV-HKU1	IgG Antikörper gegen das Nukleokapsidprotein von HCoV-HKU1 nachweisbar.
229E, NL63, OC43 bzw. HKU1 Spottriplett jeweils < 100 ViraChip®-Einheiten	Negativ	Keine IgG Antikörper gegen das jeweilige Nukleokapsidprotein von HCoV-229E, -NL63, -OC43 bzw. -HKU1 nachweisbar.

SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Test Kit

- 7 -

Leistungsdaten
Sensitivität

Kollektiv 1, hospitalisierte Covid-19 Patienten:

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden 22 Seren von hospitalisierten Patienten mit Covid-19 Klinik, positivem SARS-CoV-2-PCR Ergebnis sowie positiver Serologie (11) mit dem SARS-CoV-2 ViraChip® IgG untersucht. Die Blutentnahme erfolgte 7-17 Tage nach Symptombeginn.

Gesamt	SARS-CoV-2 ViraChip® IgG		
	Negativ n	Positiv / Grenzwertig n	Sensitivität (%)
n = 22	1	21	95%
Bei hospitalisierten Covid-19 Patienten beträgt die Sensitivität zwischen 7 und 17 Tagen nach Symptombeginn 95%			

Tabelle 1a. © Copyright VIRAMED Biotech AG Oktober 2021

Kollektiv 2, nicht-hospitalisierte Covid-19 Patienten:

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden 36 Seren von 15 nicht-hospitalisierten Patienten (mit mildem Verlauf) mit bekannter Covid-19 Klinik und positivem SARS-CoV-2-PCR Ergebnis mit dem SARS-CoV-2 ViraChip® IgG untersucht. Die Blutentnahme erfolgte 12 bis 184 Tage nach Symptombeginn.

Blutentnahme - Tage nach Symptombeginn	Gesamt n = 36	SARS-CoV-2 ViraChip® IgG		
		Negativ n	Positiv / Grenzwertig n	Sensitivität (%)
12-17	7	1	6	86%
18-59	15	0	15	100%
> 59	14	0	14	100%
Bei nicht-hospitalisierten Covid-19 Patienten beträgt die Sensitivität ab 18 Tagen nach Symptombeginn 100%				

Tabelle 1b. © Copyright VIRAMED Biotech AG Oktober 2021

Spezifität

Zur Bestimmung der Spezifität wurden Seren von gesunden Blutspendern aus Deutschland mit dem SARS-CoV-2 ViraChip® IgG untersucht. Die Blutentnahme erfolgte in den Jahren 1995/96, vor den SARS-CoV- und MERS-CoV-Ausbrüchen.

Kollektiv 3: Blutspender vor Beginn der Covid-19 Pandemie	SARS-CoV-2 ViraChip® IgG		
	Negativ n	Positiv / Grenzwertig n	Spezifität (%)
Seren von deutschen Blutspendern 1995/96, n = 142	139	3	98%

Tabelle 2. © Copyright VIRAMED Biotech AG Oktober 2021

Kreuzreaktivität

Es wurden insgesamt 105 Proben mit dem SARS-CoV-2 ViraChip® IgG untersucht, die zum einen Antikörper gegen andere Organismen enthalten, die Covid-19-ähnliche Symptome auslösen können, und zum anderen eine atypische Immunaktivität repräsentieren können.

Kollektive		SARS-CoV-2 ViraChip® IgG		
		Negativ n	Positiv / Grenzwertig n	Spezifität (%)
HCoV	n=24	22	2	92%
EBV	n=8	8	0	100%
CMV	n=7	5	2	71%
Influenza A Virus	n=8	8	0	100%
Influenza B Virus	n=6	6	0	100%
H. influenzae	n=6	6	0	100%
RSV	n=6	5	1	83%
B. pertussis	n=6	5	1	83%
C. pneumoniae	n=8	8	0	100%
MERS-CoV	n=7	7	0	100%
SARS-CoV-1	n=10	10	0	100%
ANA Autoantikörper	n=8	8	0	100%

Tabelle 3. © Copyright VIRAMED Biotech AG Oktober 2021

Zur Bestimmung der Leistungsdaten wurde die ViraChip® Software 1.4.0 und der ViraChip® Reader Rev.03 verwendet.

Anforderungen an den Anwender

1. Dieser Test ist nur in einem Fachlabor durchzuführen, das die entsprechende Laborausstattung (z.B. nach GLP) und die ggf. erforderlichen behördlichen Genehmigungen zum Umgang mit den zu testenden Proben besitzt.

2. Dieser Test ist nur von Fachpersonal durchzuführen, das bezüglich des Testverfahrens geschult wurde.

3. Um ein exaktes Testergebnis zu erhalten, müssen die Gebrauchsanweisung und „Good Laboratory Practice (GLP)“ eingehalten werden.

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

1. **ViraChip® Microarrays:** Verschlossen in der Originalverpackung bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

2. **Waschpuffer-Konzentrat, 10-fach:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

3. **Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung:** Bei 2-8°C ca. 2 Wochen haltbar. Bei längerer Aufbewahrung kann die Gebrauchsverdünnung aliquotiert bei -20°C eingefroren werden.

4. **Probenpuffer:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

5. **Konjugatlösung:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

6. **Chromogen/Substratlösung:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum. Vor Lichteinfall schützen!

7. Nach erstmaligem Öffnen der Reagenzien und Kitkomponenten wird bei sachgerechter Anwendung („Good Laboratory Practice“) und Einhaltung der auf dem Etikett angegebenen Lagerungsbedingungen in der Originalverpackung die Haltbarkeit in der Regel bis zum angegebenen Verfallsdatum beibehalten.

Vorsichtsmaßnahmen / Sicherheitsvorkehrungen

1. Alle humanen Serumkomponenten wurden auf HCV-, HIV1,2-Antikörper und HBs-Antigen untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kitkomponenten, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös betrachtet und mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden. Bei Arbeiten mit potentiell gefährlichen oder infektiösen Materialien sind die entsprechenden nationalen / internationalen Gesetze, Verordnungen und Vorschriften zu beachten. Dies gilt ebenfalls für die Lagerung und Entsorgung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

2. Die Schutzmaßnahmen für das Arbeiten mit Gefahr- und Biostoffen sind gemäß den aktuell gültigen länderspezifischen Richtlinien für Laboratorien zu beachten. Maßnahmen sind unter anderem:

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Einweg-Handschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Am Arbeitsplatz nicht essen, trinken oder rauchen.

3. Die Berührung von Haut und Schleimhäuten mit Chromogen / Substratlösung vermeiden. Bei Berührung mit Haut und Augen sofort mit viel Wasser nachwaschen.

4. Proben und alle möglicherweise kontaminierten Materialien sowie flüssige infektiöse Abfälle sind gemäß allgemein anerkannter Laborrichtlinien zu dekontaminieren, z.B. durch ein mindestens 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C. Zur Entsorgung flüssiger Abfälle können diese z.B. mit Natriumhypochlorit in einem Volumenverhältnis gemischt werden, so dass das Endgemisch 1% Natriumhypochlorit enthält. Zur vollständigen Desinfektion 30 Minuten einwirken lassen.

5. Angaben über mögliche Gefahren, Erste-Hilfe-Maßnahmen, Maßnahmen bei unbeabsichtigter Freisetzung von größeren Mengen, Handhabung und Lagerung, persönliche Schutzausrüstung, Hinweise zur Entsorgung sowie Angaben zur Toxikologie sind in den Sicherheitsdatenblättern dokumentiert.

6. Der Eintritt von Staub und anderen Verschmutzungen in die Kavitäten der MTP ist zu vermeiden, da daraus ungültige Ergebnisse resultieren können.

Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Patientenprobe

1. Der **SARS-CoV-2 ViraChip® IgG Test Kit** ist mit humanem Serum als Probenmaterial durchzuführen.

2. Die Probengewinnung sollte durch medizinisches Fachpersonal nach den geltenden Standards aus Vollblut erfolgen (25).

3. Proben, die mit Hitze vorbehandelt wurden, hämolytisch, ikterisch oder lipämisch sind, können zu ungültigen Ergebnissen führen.

4. Proben dürfen nicht mikrobiell kontaminiert sein.

5. In der Regel können unverdünnte Proben bis zu 5 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden. Für eine Lagerung bis zu 24 Monaten sind die Proben in Aliquots bei mindestens -20°C einzufrieren.

6. Vor Beginn der Testdurchführung sollten die Proben auf Raumtemperatur gebracht werden. Proben nach dem Auftauen vorsichtig mischen und bei Bedarf sichtbare Partikel durch Zentrifugation entfernen.

7. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

Einschränkungen des Untersuchungsverfahrens

1. Ein positives Testergebnis der jeweiligen Patientenprobe ist als Symptom zu werten. Interpretation und Beurteilung von Testergebnissen dürfen nur durch medizinisches Fachpersonal unter Wertung aller relevanten Daten erfolgen (24).

2. Ein negatives Testergebnis schließt einen Erregerkontakt bzw. eine Infektion nicht aus.

3. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern kann bei Untersuchungen mit verschiedenen Testen bzw. mit verschiedenen Herstellern aufgrund von unterschiedlichen Sensitivitäten, Spezifitäten und Testmethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

4. Bei Immunsuppression gilt eine eingeschränkte Beurteilbarkeit (24).

5. Medikamente und Immunglobulingaben können unspezifische Antikörperreaktionen hervorrufen (24).

6. *In vitro*-Diagnostika dürfen nicht über das angegebene Verfallsdatum hinaus verwendet werden, da zuverlässige Ergebnisse dann nicht mehr gewährleistet sind.

7. Präzises Befolgen der Arbeitsvorschrift ist essentiell für exakte Testergebnisse. Abweichendes Prozessieren wie z.B. ungenügendes Durchführen der Waschschritte kann falsche Ergebnisse verursachen.

8. Der Ansatz von „Poolproben“, bei denen mehrere Seren gemeinsam untersucht werden, ist unzulässig, da bei derartigen Ansätzen die Testsensitivität und -spezifität nicht gewährleistet sind.

Hinweise zu Geräten und Software

1. Bei automatisierter Durchführung müssen für den jeweiligen Prozessortyp von Viramed Biotech AG validierte Arbeitsschritte programmiert und verwendet werden.

2. Bei Verwendung von Prozessorspezifischen Verbrauchsmaterialien sind die entsprechenden Konfigurationen nach Herstellerangaben von Viramed Biotech AG freizugeben.

3. Die von Viramed Biotech AG bereitgestellte Geräte- und Softwarekonfiguration darf nicht verändert werden. Jegliche Änderung kann falsche Ergebnisse verursachen.

4. Es ist ausschließlich gerätespezifische Software zu verwenden. Änderungen an Konfigurationsdateien dürfen nur von Viramed Biotech AG durchgeführt werden.











5. Als Messgeräte sind nur von Viramed Biotech AG zugelassene Systeme zu verwenden.

6. Die Auswertung der ViraChip® Microarrays erfolgt ausschließlich über die ViraChip® Software. Eine manuelle/visuelle Auswertung ist nicht möglich.

Literatur

1. RKI Robert Koch Insitut: Bericht zu Virusvarianten von SARS-CoV-2 in Deutschland - Stand 07.07.2021, 2021
2. PLANAS, D et al.: Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization., Nature, 2021
3. NIBSC: First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136 Instructions for use (Version 2.0, Dated 17/12/2020), 2020
4. CHEN, IJ et al.: Crystal structure-based exploration of the important role of Arg106 in the RNA-binding domain of human coronavirus OC43 nucleocapsid protein., Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2013
5. CHI et al.: A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2, Science, 2020
6. FANG, L: Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins, Annu Rev Virol, 2016
7. FEHR, A et al.: Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis., Coronaviruses, 2015
8. HUANG et al.: Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19, Acta Pharmacologica Sinica, 2020
9. KANG, S et al.: Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites., Acta Pharmaceutica Sinica B, 2020
10. KREER et al.: Longitudinal Isolation of Potent Near-Germline SARS-CoV-2-Neutralizing Antibodies from COVID-19 Patients, Cell, 2020
11. KRÜTTGEN, A et al.: Comparison of four new commercial serologic assays for determination of SARS-CoV-2 IgG, Journal of Clinical Virology, 2020
12. LEHMANN, C et al.: A line immunoassay utilizing recombinant nucleocapsid proteins for detection of antibodies to human coronaviruses., Diagnostic microbiology and infectious disease, 2008
13. LEHMANN, C: Humane Coronaviren: Entwicklung und Anwendung eines Immunoassays und Untersuchungen zur zellvermittelten Immunität, Dissertation Universität Regensburg, 2009
14. MA-LAUER, Y et al.: Ma-Lauer, Yue, et al. "Influences of cyclosporin A and non-immunosuppressive derivatives on cellular cyclophilins and viral nucleocapsid protein during human coronavirus 229E replication., Antiviral research, 2020
15. PODBIELSKI, A et al.: MIQ Heft: 35a Infektionsimmunologische Methoden Teil 1, Elsevier Urban & Fischer, 2016
16. MODROW, S et al.: Humanpathogene Coronaviren., Molekulare Virologie, 2010
17. OKBA, NMA et al.: SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients, medRxiv, 2020
18. SEVERANCE, E et al.: Development of a nucleocapsid-based human coronavirus immunoassay and estimates of individuals exposed to coronavirus in a US metropolitan population., Clinical and Vaccine Immunology, 2008
19. TOK, TT & TATAR, G: Structures and Functions of Coronavirus Proteins: Molecular Modeling of Viral Nucleoprotein, Int J Virol Infect Dis, 2017
20. WALLS et al.: Elicitation of Potent Neutralizing Antibody Responses by Designed Protein Nanoparticle Vaccines for SARS-CoV-2, Cell, 2020
21. XIAOJIE et al.: Stem Cell Research 50 (2021) 102125 Available online 15 December 2020 1873-5061/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). Neutralizing antibodies targeting SARS-CoV-2 spike protein, Stem Cell Research, 2021
22. YU, IM et al.: Crystal Structure of the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein Dimerization Domain Reveals Evolutionary Linkage Between Corona- And Arteriviridae, J Biol Chem, 2006
23. ZUWALA, K et al.: Zuwała, Kaja, et al. "The nucleocapsid protein of human coronavirus NL63., PloS one, 2015
24. THOMAS, L: Labor und Diagnose, Med Verlagsgesellschaft Marburg, 2012
25. TUCK, MK et al.: Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collection, J Proteome Res, 2009

Symbolerklärungen

	Hersteller		Bestell-Nummer
	Gebrauchsanweisung beachten		Verwendbar bis / Mindesthaltbarkeitsdatum
	In-Vitro Diagnostikum		Temperaturbegrenzung (Lagerung)
	Chargen-Nummer		Positives Kontrollserum
	Ausreichend für 96 Ansätze		Negatives Kontrollserum