



Gebrauchsanweisung (Deutsch)

1 Zweckbestimmung

Der recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität] ist ein qualitativer Test zum Nachweis sowie zur Aviditätsbestimmung von IgG-Antikörpern gegen SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) in humanem Serum oder Plasma. Der Test dient als Hilfe bei der Beurteilung der adaptiven humoralen Immunantwort, die durch eine Infektion und/oder Impfung hervorgerufen wird. Für die Aviditätsbestimmung der IgG-Antikörper kann das Aviditätsreagenz gesondert angefordert werden. Der recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität] kann manuell oder automatisiert von geschultem Personal in einem geeigneten Labor durchgeführt werden.

2 Anwendungsbereich

SARS-CoV-2 gehört zur Familie der *Coronaviridae* und ist der ätiologische Erreger der Pandemie COVID-19. SARS-Coronaviren verbreiten sich hauptsächlich über Tröpfchen und Aerosole in der Atemluft durch Übertragung von Mensch zu Mensch. Die Symptome können von Fieber, Husten und Atembeschwerden bis hin zu Lungenentzündung und akutem Atemnotsyndrom und schließlich zum Tod bei komorbiden Personen reichen. Aktuell sind mehrere Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 zugelassen.

Der recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität] ist ein Line-Immunoassay. Das Testprinzip erlaubt durch das separate Aufklüffeln der Einzelantigene im Unterschied zu ELISAs die Identifizierung von spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen Antigene der verschiedenen Coronaviren im gleichen Test. Im Test werden für SARS-CoV-2 folgende rekombinant hergestellten Antigene verwendet: Nukleokapsid (NP), RBD (Rezeptor-Bindedomäne des Spike-Proteins) und S1 (S1-Untereinheit des Spike-Proteins). Zusätzlich werden Antikörper gegen saisonal auftretende humane Coronaviren (HCoV: 229E, NL63, OC43, HKU1) durch entsprechende Nukleokapsid-Antigene (NP) detektiert.

IgG-Antikörper gegen SARS-CoV-2 lassen sich in der Regel spätestens 3 Wochen nach Infektion nachweisen. Die entsprechende Immunantwort ist sehr individuell und Titerabfälle sind bereits nach wenigen Monaten zu beobachten. Antigen-spezifische IgG-Antikörper lassen sich ebenso nach Immunisierung detektieren, wobei die Nachweisdauer noch Thema aktueller Studien ist. Die Aviditätsreifung von IgG nach Infektion mit SARS-CoV-2 ist in der Regel unvollständig und unterscheidet sich in diesem Punkt sehr deutlich von der Aviditätsreifung nach Infektion mit anderen Viren. Hingegen kann durch mehrfache Immunisierung eine hohe Avidität des IgG gegen das Spikeprotein und dessen Rezeptor-Bindedomäne (RBD) erzielt werden.

Der Test dient als Hilfe bei der Beurteilung der adaptiven humoralen Immunantwort. Er kann zum Verständnis der Virusepidemiologie und Immunität nach Infektion und/oder Impfung beitragen und die Diagnose der COVID-19-Erkrankung unterstützen. Allerdings ist bei akuten Infektionen der Direkt-nachweis z. B. via RT-PCR maßgebend. Der recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität] kann als Bestätigungstest zur Abklärung von unklaren Screening-Ergebnissen eingesetzt werden, der Einsatz als Screening-Test ist ebenso möglich.

3 Testprinzip

Hochgereinigte rekombinante Antigene (NP, RBD und S1 für SARS-CoV-2 sowie NP für 229E, NL63, OC43, HKU1) sind auf Nitrozellulosemembran-Teststreifen fixiert.

1. Die Teststreifen werden mit der verdünnten Serum- oder Plasmaprobe inkubiert, wobei sich spezifische Antikörper an die Erreger-Antigene auf dem Teststreifen anlagern.
2. Nicht gebundene Antikörper werden anschließend gewaschen.
3. Die Streifen werden in einem zweiten Schritt mit anti-humanem Immunglobulin-Antikörpern (IgG) inkubiert, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind.
4. Nicht gebundene Konjugat-Antikörper werden anschließend gewaschen.
5. Mit einer durch die Peroxidase katalysierten Färbereaktion werden spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen. Falls eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat, erscheint an der entsprechenden Stelle eine dunkle Bande auf dem Streifen.

Am oberen Ende der Teststreifen befinden sich Kontrollbanden:

- a) Die Reaktionskontrolle unter der Streifennummer, die bei jeder Serum/Plasma-Probe eine Reaktion zeigen muss.
- b) Die Konjugatkontrolle (IgG) dient zur Kontrolle des verwendeten Konjugat- und Streifentyps (Ig-Klassen-spezifisch).
- c) "Cutoff-Kontrolle": Die Intensität dieser Bande erlaubt die Beurteilung der Reaktivität der einzelnen Antigen-Banden (siehe Kapitel 9.2 Auswertung).

4 Reagenzien

4.1 Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 20 Bestimmungen. Jeder Reagenziensatz enthält:

WASCHBUF A 10 X	100 ml Waschpuffer A (zehnfach konzentriert) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl, KCl, Detergenz, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypyron (0,2%)
SUBS TMB	40 ml Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, gebrauchsfertig)
MILKPOW	5 g Magermilchpulver
INSTRU	1 Gebrauchsanweisung
EVALFORM	1 Auswertebogen
TESTSTR	2 Röhrchen mit je 10 durchnummerierten Teststreifen
CONJ IgG	500 µl Anti-human IgG-Konjugat (hundertfach konzentriert, Grüne Verschlusskappe) Aus Kaninchen, enthält NaNa ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%) und Chlorazetamid (<0,1%)

Aviditätsbestimmung

Für die Bestimmung der Avidität von SARS-CoV-2 IgG-Antikörpern ist auf Wunsch als Zusatz das Aviditätsreagenz mit entsprechender Gebrauchsanweisung lieferbar.

AVIDI Art.-Nr. 11010	1 Aviditätsreagenz (Feststoff 25g) für 60 ml gebrauchsfertige Lösung
--------------------------------	--

4.2 Zusätzlich benötigte Reagenzien, Materialien und Geräte

- Inkubationsschalen (sind bei Bedarf von MIKROGEN zu beziehen)
- Deionisiertes Wasser (hohe Qualität)
- Plastikpinzette
- Horizontalschüttler
- Vortex-Mixer oder andere Rotatoren
- Vakuumpumpe oder entsprechendes Gerät
- Messzylinder, 50 ml und 1000 ml
- Mikropipetten mit Einwegspitzen, 20 µl und 1000 µl
- 10 ml Pipette oder Dispenser
- Timer
- Saugfähige Papiertücher
- Einweg-Schutzhandschuhe
- Abfallbehälter für Biogefahrstoffe

5 Haltbarkeitsdauer und Handhabung

- ☞ Reagenzien vor und nach Gebrauch bei +2°C bis +8°C lagern, **nicht einfrieren**.
- ☞ Vor Testbeginn alle Bestandteile für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur (+18°C bis +25°C) temperieren. Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.
- ☞ Waschpuffer, Milchpulver, Verdünnungspuffer, Konjugate und TMB können zwischen verschiedenen recomLine und/oder recomBlot Testsystemen ausgetauscht werden, wenn diese Komponenten das gleiche Symbol tragen. Dabei ist die Haltbarkeit dieser Komponenten zu beachten.
- ☞ Vor Gebrauch die konzentrierten Reagenzien und Patientenserum gut durchmischen. Schaumbildung vermeiden.
- ☞ Röhrchen mit den Teststreifen erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen, um Kondenswasserbildung zu vermeiden. Nicht benötigte Streifen verbleiben im Röhrchen und werden weiterhin bei +2°C bis +8°C gelagert (Röhrchen wieder gut verschließen, Teststreifen dürfen vor Versuchsbeginn nicht feucht werden!).
- ☞ Die Streifen sind mit der fortlaufenden Nummer sowie dem Testkürzel gekennzeichnet.
- ☞ Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.

- ☞ Kitkomponenten während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht schützen. Insbesondere die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich.
- ☞ Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.
- ☞ Bei substanzialen Änderungen am Produkt bzw. der Anwendungsvorschrift durch den Anwender kann die Anwendung außerhalb der von MIKROGEN vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.
- ☞ Kreuzkontamination der Patientenproben oder Konjugate kann zu falschen Testergebnissen führen. Fügen Sie Patientenproben, Teststreifen und Konjugatlösung sorgfältig zu. Achten Sie darauf, dass Inkubationslösungen nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden. Flüssigkeiten vorsichtig entfernen.
- ☞ Die Streifen müssen während der gesamten Prozedur vollständig benetzt und untergetaucht sein.
- ☞ Automatisierung ist möglich, nähere Informationen erhalten Sie von MIKROGEN.

6 Warnungen und Sicherheitsvorkehrungen

- ☞ Nur für die In-vitro-Diagnostik verwenden.
- ☞ Sämtliche Blutprodukte müssen als potenziell infektiös behandelt werden.
- ☞ Die Teststreifen wurden mit inaktivierten Ganzzelllysaten und/oder rekombinant hergestellten bakteriellen, viralen oder parasitären Antigenen angefertigt.
- ☞ Nach der Zugabe von Patienten- oder Kontrollmaterial muss der Streifen als potenziell infektiös betrachtet und entsprechend als solcher behandelt werden.
- ☞ Während des gesamten Testverfahrens müssen geeignete Einweg-Handschuhe getragen werden.
- ☞ Die Reagenzien enthalten die antimikrobiellen Mittel und Konservierungstoffe Natriumazid (NaN₃), MIT (Methylisothiazolon), Oxypyron und Chlorazetamid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden. Natriumazid (NaN₃) kann bei Kontakt mit Schwermetallen wie Kupfer und Blei explosive Azide formen.
- ☞ Alle abgesaugten Flüssigkeiten müssen gesammelt werden. Alle Sammelbehälter müssen geeignete Desinfektionsmittel zur Inaktivierung humanpathogener Erreger enthalten oder autoklaviert werden. Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potenziell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder entsprechend den Hygienevorschriften entsorgt werden. Die Konzentrationsangaben und Inkubationszeiten der Hersteller müssen beachtet werden.
- ☞ Inkubationsschalen nur einmal verwenden.
- ☞ Streifen vorsichtig mit einer Plastikpinzette handhaben.
- ☞ Ersetzen oder mischen Sie die Reagenzien nicht mit Reagenzien anderer Hersteller.
- ☞ Vor Durchführung des Tests die gesamte Gebrauchsanweisung durchlesen und sorgfältig befolgen. Abweichungen vom in der Gebrauchsanweisung aufgeführten Testprotokoll können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

7 Probenentnahme und Vorbereitung

7.1 Probenmaterial

Das Probenmaterial kann Serum oder Plasma (EDTA, Citrat, Heparin, CPD) sein, das nach Entnahme möglichst rasch vom Blutkuchen getrennt werden muss, um eine Hämolyse zu vermeiden. Eine mikrobielle Kontamination der Probe ist unbedingt zu vermeiden. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation aus der Probe zu entfernen. Die Verwendung von ikterischen, hämolytischen, lipämischen oder trüben Proben wird nicht empfohlen.

Achtung!

Sollen die Bestimmungen nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu 2 Wochen bei +2 °C bis +8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20 °C oder tiefer möglich. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben wird wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate nicht empfohlen. Mehr als 3 Tiefgefrier- und Auftau-Zyklen sollten vermieden werden.

7.2 Herstellung der Lösungen

7.2.1 Herstellung des gebrauchsfertigen Waschpuffers A

Dieser Puffer wird für die Serum- und Konjugatverdünnung sowie die Waschschriffe benötigt.

Vor dem Verdünnen ist das Volumen des Waschpuffers A für die entsprechende Anzahl der durchzuführenden Tests zu bestimmen.

Das Magermilchpulver wird zuerst in Waschpuffer A-Konzentrat vorgelöst und diese Mischung dann mit deionisiertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt (Verdünnung 1 + 9). Die benötigten Mengen für eine definierte Anzahl von Teststreifen sind entsprechend folgender Formeln rechnerisch zu ermitteln (gerätespezifisches Totvolumen ist nicht berücksichtigt):

Reagenz	Formel	Beispiel: 5 Streifen
Magermilchpulver [g]	= Streifen-Anzahl x 0,1	0,5 g
Waschpuffer A-Konzentrat [ml]	= Streifen-Anzahl x 2	10 ml
Deionisiertes Wasser [ml]	= Streifen-Anzahl x 18	90 ml
Gebrauchsfertiger Waschpuffer A [ml]	= Streifen-Anzahl x 20	100 ml

Gebrauchsfertiger Waschpuffer A kann bei +2 °C bis +8 °C vier Wochen gelagert werden. Der gebrauchsfertige Waschpuffer A ist geruchlos und leicht getrübt.

7.2.2 Herstellung der Konjugatlösungen

Die Konjugatlösung ist kurz vor Gebrauch herzustellen, eine Lagerung der gebrauchsfertigen Konjugatlösung ist nicht möglich. Ein Teil des Konjugat-Konzentrats wird mit 100 Teilen gebrauchsfertigem Waschpuffer A verdünnt (1 + 100). Die benötigten Mengen für eine definierte Anzahl von Teststreifen sind entsprechend folgender Formeln rechnerisch zu ermitteln:

Reagenz	Formel	Beispiel: 5 Streifen
Konjugat-Konzentrat [µl]	= Streifen-Anzahl x 20	100 µl
Gebrauchsfertiger Waschpuffer A [ml]	= Streifen-Anzahl x 2	10 ml

Die Konjugatmengen sind ohne Totvolumen berechnet. Je nach Abarbeitung (manuell bzw. an einem Gerät) bitte zusätzliche Konjugatlösung für 1 bis 3 Streifen ansetzen.

8 Testverfahren

Nr.	Durchführung	Anmerkung
1	Alle Reagenzien vor Testbeginn für mindestens 30 Minuten auf 18 °C bis 25 °C (Raumtemperatur) temperieren.	Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.
2	<u>Teststreifen vorbereiten</u> Streifen in 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A (siehe 7.2.1) einlegen.	Die Streifen nicht mit bloßen Händen anfassen – Pinzette verwenden. Die Streifennummer zeigt nach oben. Für jeden Streifen wird eine Vertiefung in einer Inkubationsschale (siehe 4.2) benötigt. Die Streifen müssen komplett untergetaucht sein.
3	<u>Probeninkubation</u> a) 20 µl einer unverdünnten Probe (Humanserum oder Plasma) werden je Inkubationsansatz zum Teststreifen pipettiert (Verdünnung 1 + 100). b) 1 Stunde unter leichtem Schütteln inkubieren.	Probe an einem Ende des untergetauchten Streifens in den Waschpuffer A pipettieren und schnellstmöglich durch vorsichtiges Schütteln der Inkubationsschale mischen. Inkubationsschale mit Kunststoffdeckel abdecken und auf den Schüttler stellen.
4	<u>Waschen</u> a) Kunststoffdeckel vorsichtig von den Inkubationsschalen abnehmen. b) Serumverdünnung vorsichtig aus den einzelnen Vertiefungen absaugen. c) 2 ml gebrauchsfertigen Waschpuffer A (siehe 7.2.1) in jede Vertiefung pipettieren, für 5 Minuten unter leichtem Schütteln waschen und anschließend den Waschpuffer A absaugen.	Waschschriffe 8.4a–8.4c insgesamt dreimal durchführen. Kreuzkontamination vermeiden. Bei maschineller Abarbeitung sind diesbezüglich die Hinweise des Geräteherstellers zu beachten.
5	<u>Inkubation mit Konjugat</u> 2 ml gebrauchsfertige Konjugatlösung (siehe 7.2.2) zugeben und 45 Minuten unter leichtem Schütteln inkubieren.	Inkubationsschale mit dem Kunststoffdeckel abdecken und auf den Schüttler stellen.
6	<u>Waschen</u> siehe unter 8.4	Waschschriffe insgesamt dreimal durchführen (siehe 8.4a–8.4c).

7	<u>Substratreaktion</u> 1,5 ml der Substratlösung zugeben und 8 Minuten unter leichtem Schütteln inkubieren.	
8	<u>Abstoppen der Reaktion</u> Substratlösung entfernen. Mindestens dreimal kurz mit deionisiertem Wasser waschen.	
9	<u>Trocknen der Streifen</u> Streifen vor der Auswertung 2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers trocknen.	Streifen vorsichtig mit einer Plastikpinzette aus dem Wasser nehmen. Streifen vor Licht geschützt aufbewahren.
Achtung! Inkubationslösungen dürfen nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden. Insbesondere beim Öffnen und Schließen des Deckels sind Spritzer zu vermeiden.		

9 Ergebnisse

Achtung:

Verwenden Sie nicht die automatisierte Interpretation, ohne die unten beschriebenen Hinweise zur Interpretation zu beachten.

9.1 Validierung – Qualitätskontrolle

Eine Auswertung des Tests kann erfolgen, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

1. Reaktionskontroll-Bande (oberste Linie) deutlich gefärbt, dunkle Bande erkennbar.
2. Antikörperklasse (zweite Bande): die IgG-Konjugatkontroll-Bande muss eine deutliche Färbung zeigen.
3. Cutoff-Kontrolle (dritte Bande): schwache, aber sichtbare Färbung.

9.2 Auswertung

Die Auswertung der Teststreifen kann visuell oder computergestützt – mit der Teststreifen-Auswertesoftware *recomScan* – erfolgen. Die *recomScan* Software ist zur Unterstützung der Teststreifen-Interpretation bestimmt. Weitere Informationen und entsprechende Anleitungen zur computergestützten Auswertung erhalten Sie auf Anfrage bei MIKROGEN. Die nachfolgende Anleitung bezieht sich auf die visuelle Auswertung.

9.2.1 Bewertung der Bandenintensität

1. Notieren Sie im beigegefügtten Auswertebogen Datum, Chargen- und Röhrchen-Nummer sowie die detektierte Antikörperklasse.
2. Tragen Sie die Proben-Identifizierungs-Nummern in den Auswertebogen ein.
3. Kleben Sie nun mit einem Klebestift die dazugehörigen Teststreifen in die entsprechenden Felder des Auswertebogens. Richten Sie dazu die Teststreifen mit der Reaktionskontroll-Bande an der eingezeichneten Markierungslinie aus. Kleben Sie dann mit einem durchsichtigen Klebeband die Teststreifen links von der Markierungslinie an (Reaktionskontroll-Bande nicht überkleben!). Flächiges Ankleben der ganzen Teststreifen mit Klebestift oder Klebeband kann zu Veränderungen der Färbung führen.
4. Identifizieren Sie nun die Banden der entwickelten Teststreifen anhand des aufgedruckten Kontrollstreifens des Auswertebogens und tragen diese in den Auswertebogen ein. Nehmen Sie dazu anhand der Tabelle 1 die Bewertung der Intensität der auftretenden Banden gesondert für die entsprechenden Immunglobulin-Klassen vor.

Tabelle 1: Bewertung der Bandenintensität im Bezug zur Cutoff-Bande

Farbintensität der Banden	Bewertung
Keine Reaktion	-
Sehr schwache Intensität (geringer als Cutoff-Bande)	+/-
Schwache Intensität (entspricht Cutoff-Bande)	+
Starke Intensität (stärker als Cutoff-Bande)	++
Sehr starke Intensität	+++

Bewertung der Avidität: siehe Kapitel 9.4.

9.3 Interpretationsschema

Tabelle 2: Testinterpretation von *recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität]*

Testinterpretation	Antigenreaktivität
SARS-CoV-2 IgG positiv	Eine oder mehrere SARS-CoV-2-spezifische Antigenbanden (NP, RBD und/oder S1) sind positiv, reagieren also mit derselben (+) oder einer stärkeren Intensität als die Cutoff-Bande (unabhängig von der Reaktivität der HCoV-Antigene).
SARS-CoV-2 IgG negativ	Alle SARS-CoV-2-spezifischen Antigenbanden (NP, RBD und S1) sind negativ, zeigen also keine Banden (-) oder Banden mit schwächerer (+/-) Intensität als die Cutoff-Bande (unabhängig von der Reaktivität der HCoV-Antigene).

Der Nachweis von Antikörpern kann auf eine kürzliche bzw. zurückliegende SARS-CoV-2-Infektion hindeuten. Für den Nachweis einer akuten Infektion gilt der direkte Erregernachweis, z. B. mittels RT-PCR, als Goldstandard. Nach Infektion lassen sich in der Regel IgG-Antikörper gegen alle drei verwendeten Antigene (NP, RBD und S1) nachweisen.

Nach einer Impfung können ebenfalls IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Abhängig vom verwendeten Impfstoff ist teilweise eine Differenzierung zu Infektion möglich. Da sich die meisten zugelassenen Impfstoffe (z. B. Comirnaty von BioNTech/Pfizer) gegen das Spikeprotein richten, werden hier bei naiven Personen nur Antikörper gegen RBD und S1 induziert.

Neben SARS-CoV-2 werden Reaktivitäten gegen die saisonal auftretenden humanen Coronaviren (HCoV: 229E, NL63, OC43, HKU1) erfasst. Hier ist eine Gesamtseroprävalenz von 70–90% zu erwarten (siehe auch Tabelle 6). Die erfassten Reaktivitäten der HCoVs lassen keine Differenzierung bzw. keine Rückschlüsse auf den Immunstatus bezüglich der entsprechenden Coronaviren oder auf eine Kreuzreaktivität mit SARS-CoV-2 zu.

9.4 Aviditätsbestimmung

Durch parallele Abarbeitung von zwei IgG-Ansätzen, von denen einer mit dem Aviditätsreagenz behandelt wird, kann erkannt werden, ob es sich um IgG-Antikörper von niedriger, intermediärer oder von hoher Avidität handelt. Niedrig-avide Antikörper lassen sich durch ein Aviditätsreagenz von der Bindungsstelle auf dem Streifen abwaschen, während hoch-avide Antikörper davon nicht abgelöst werden können.

9.4.1 Auswertung der Avidität im *recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität]*

- Aviditätsbestimmung nur bei positivem IgG-Gesamtbefund durchführen.
- Banden auf dem IgG-Streifen, die in ihrer Reaktivität geringer als der Cutoff sind, werden bei der Aviditätsbestimmung nicht berücksichtigt.
- Vergleichen Sie die Intensitäten der entsprechenden Banden auf den beiden Teststreifen (IgG-Streifen und Aviditätsstreifen), die mit der gleichen Patientenprobe inkubiert wurden. Achten Sie darauf, ob sich die Intensitäten verändert haben.
- Eine Abnahme der Intensität der SARS-CoV-2-Banden (NP, RBD und S1) um mehr als 60% (Aviditätsindex $\leq 0,4$) ist als niedrige Avidität definiert, eine Abnahme zwischen 40 und 60% als intermediär (Aviditätsindex $> 0,4$ bis $< 0,6$).
- Bei hoher Avidität nimmt die Bandenintensität des Aviditätsstreifens weniger als 40% (Aviditätsindex $\geq 0,6$) ab, die IgG-Antikörper werden als hoch-avide definiert.
- Generell gilt, dass die Aviditätsreifung nach SARS-CoV-2-Infektionen sehr variabel und häufig unvollständig ist. Dem steht die Möglichkeit einer vollständigen Aviditätsreifung nach optimaler Impfung gegenüber.

9.4.2 Aussagekraft der Aviditätsbestimmung

Folgende Erkenntnisse zur Avidität von SARS-CoV-2 IgG-Antikörpern wurden erarbeitet und können zur besseren Beurteilung der Immunantwort beitragen:

Avidität nach Infektion (siehe u. a. Tabelle 7 und 8)

- Bei Patienten mit symptomatischer SARS-CoV-2-Infektion, die keiner Hospitalisierung bedürfen, entwickelt sich in den nachfolgenden 2 Monaten regelmäßig nur IgG (NP, RBD, S1) von niedriger oder intermediärer Avidität. Bei hospitalisierten Patienten zeigt sich ein Auftreten von hoch-avidem IgG bei ca. 12% der Patienten innerhalb dieses Zeitraums.
- Im Gegensatz zu vielen anderen Virusinfektionen kann aus einer einmaligen Aviditätsbestimmung kein sicherer Hinweis auf den

wahrscheinlichen Zeitpunkt der Infektion abgeleitet werden. Durch eine weitere Bestimmung zu einem zweiten Zeitpunkt kann ermittelt werden, ob es zu einem weiteren Anstieg der Avidität gekommen ist. Daher ist die Aviditätsmessung zur Bestimmung des Infektionszeitpunkts nicht geeignet.

Avidität nach Impfung (siehe u. a. Tabelle 9)

- Nach der ersten Impfung (Vektorimpfstoffe oder mRNA-Impfstoffe) wird in der Regel fast ausschließlich niedrig-avides IgG gegen RBD und S1 induziert. Nach der zweiten Impfung wird in 55–75% der Geimpften IgG hoher Avidität erzielt.
- Nach der dritten Impfung kommt es regelmäßig zu einem weiteren Anstieg der Avidität. Dies ist besonders für die Personen wichtig, bei denen nach zweifacher Immunisierung noch keine hohe Avidität erzielt wurde.
- Zum Erreichen einer hohen Avidität können nach gegenwärtiger Erkenntnis Vektorimpfstoffe oder mRNA-Impfstoffe nicht nur homolog, sondern auch heterolog, also in Kombination, eingesetzt werden.
- Eine vorausgegangene SARS-CoV-2-Infektion führt zunächst nur zu niedriger oder intermediärer Avidität. Durch eine einmalige darauffolgende Impfung kann jedoch sehr wirkungsvoll und schnell hohe Avidität des IgG gegen RBD und S1 erzielt werden, während die Avidität des IgG gegen NP dabei keine Veränderung erfährt.

10 Grenzen der Methode, Einschränkungen

- Der recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität] erlaubt mit der Erfassung und Aviditätsbestimmung von SARS-CoV-2-spezifischen IgG-Antikörpern eine bessere Beurteilung der humoralen Immunantwort nach Infektion und/oder Impfung. Allerdings gibt es aktuell noch keine offiziellen international anerkannten Richtwerte, die es zulassen, Vorhandensein oder Dauer eines Immunschutzes zu definieren.
- Serologische Testergebnisse des recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität] erlauben keine unmittelbare Aussage/Vorhersage auf den Schweregrad einer eventuellen Erkrankung. Eine lange ausbleibende Aviditätsreife nach Infektion oder nach Impfungen kann ein Anzeichen sein, dass eine protektive Immunität mangelhaft sein könnte.
- Serologische Testergebnisse sind immer in Zusammenhang mit dem klinischen Bild zu sehen. Therapeutische Konsequenzen der serologischen Befundung sind im Zusammenhang mit den klinischen Daten zu ziehen.
- Bei unklaren serologischen Ergebnissen wird eine erneute Testung im zeitlichen Verlauf der Infektion empfohlen.
- Für den Nachweis einer akuten Infektion gilt der direkte Erregernachweis mittels RT-PCR als Goldstandard. Der Nachweis von Antikörpern kann die Aussage aus dem RT-PCR-Test bestätigen, aber auch bei negativem RT-PCR-Testergebnis auf eine länger oder kürzer zurückliegende Infektion hinweisen.
- Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer SARS-CoV-2-Infektion nicht aus, da insbesondere in einer frühen Infektionsphase Antikörper noch nicht oder in nicht nachweisbaren Konzentrationen vorhanden sein können. Bei klinischem Verdacht auf eine Infektion mit SARS-CoV-2 und negativem serologischem Befund sollte eine RT-PCR (z. B. mit Testen der ampliCube-Produktlinie von MIKROGEN) gemacht werden und/oder nach 2 Wochen eine weitere Probenentnahme und Testung erfolgen.
- Es ist derzeit nicht auszuschließen, dass eine Infektion mit Immun-Escape-Varianten des SARS-CoV-2 zu einer verminderten Empfindlichkeit des Antikörpernachweises führt.
- Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades der SARS-Coronaviren (SARS-CoV und SARS-CoV-2) ist eine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen SARS-CoV möglich. Kreuzreaktionen mit anderen humanpathogenen Coronaviren (HCoV) sind nicht vollständig ausgeschlossen, konnten aber in der Evaluierung des recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität] nicht festgestellt werden.
- Einzelne Kreuzreaktionen mit Proben von Schwangeren, akut EBV-Infizierten, Rheumafaktor-positiven und lipämischen Proben können in seltenen Fällen vorkommen. Siehe auch Tabelle 5.
- Dunkle Teststreifen:** Manche Patientenproben können auf dem gesamten Nitrozellulose-Streifen eine dunkle, durchgängige oder gemusterte Färbung erzeugen (z. B. bei Seren von Patienten mit Milcheiweiß-Allergien). Hierfür sind unterschiedliche Faktoren aus dem jeweiligen Patientenserum verantwortlich. Die Auswertung dieser Streifen ist in der Regel nur mit Einschränkungen möglich. So sind z. B. "inverse" Banden (weiße Banden auf dunklem Hintergrund) als negativ zu werten. Das entsprechende Serum

sollte in jedem Fall mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

11 Leistungsmerkmale

11.1 Diagnostische Sensitivität

Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität wurden 54 Proben von RT-PCR-bestätigten SARS-CoV-2-infizierten Personen untersucht.

Tabelle 3: Diagnostische Sensitivität für recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität]

recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität]	Tage nach Symptombeginn		
	Früh < 12 Tage	Mittel 12–23 Tage	Spät > 23 Tage
Positiv	6	20	26
Negativ	1	1	0
Diagnostische Sensitivität	85,7%	95,2%	100%
	96,3%		

11.2 Diagnostische Spezifität

Zur Bestimmung der diagnostischen Spezifität wurden Proben von deutschen Blutspendern (n = 300) untersucht, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor dem Beginn der SARS-CoV-2-Pandemie entnommen wurden, sowie potenziell kreuzreaktive (n = 191) bzw. interferierende Proben (n = 80).

Tabelle 4: Diagnostische Spezifität für recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität]

recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität]	Blutspender (n = 300)	Potenziell kreuzreaktive Proben* (n = 191)	Potenziell interferierende Proben** (n = 80)
Positiv	1	4	2
Negativ	299	187	78
Diagnostische Spezifität	99,7%	97,9%	97,5%
	98,8%		

* Proben positiv für saisonale Coronaviren, Influenza-A/B-Virus, RSV, Adenoviren, *Mycoplasma pn.*, *Chlamydia pn.*, EBV, CMV, Autoantikörper sowie von Schwangeren

** Lipämische, hämolytische und ikterische Proben, RF-positive Proben

11.3 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität wird definiert als die Eignung des Tests, den Analyten genau zu bestimmen bei Vorhandensein von potenziellen Interferenzfaktoren in der Probenmatrix oder Kreuzreaktionen mit potenziell interferierenden Antikörpern.

a) Interferenzen: Kontrollstudien über potenziell interferierende Faktoren haben gezeigt, dass die Leistung des Tests nicht durch Antikoagulanzen (Natriumzitrat, EDTA, Heparin, CPD), Hämolyse, Lipämie oder Bilirubinämie der Probe beeinflusst wird.

b) Kreuzreaktionen: In Kontrollstudien wurden die potenziellen Interferenzen von Antikörpern gegen andere Organismen, die ähnliche klinische Symptome wie bei einer SARS-CoV-2-Infektion hervorrufen können (z. B. saisonale Coronaviren, Influenza-A/B-Virus, RSV, Adenoviren, *Mycoplasma pn.*, *Chlamydia pn.*), untersucht. Zusätzlich wurden Konditionen getestet, die eine atypische Aktivität des Immunsystems entwickeln (z. B. EBV, CMV, antinukleäre Autoantikörper, Schwangerschaft, Rheumafaktor). Die Ergebnisse zu den Testungen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Testung auf Kreuzreakтивitäten bei recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität]

Kollektiv (n = 271)	recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität] positiv
Saisonale Coronaviren (HCoV) (n = 9)	0
Influenza-A-Virus (n = 9)	0
Influenza-B-Virus (n = 5)	0
Respiratorisches Syncytial-Virus (RSV) (n = 10)	0
Adenoviren (n = 6)	0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (n = 10)	0
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (n = 25)	0
Epstein-Barr-Virus (EBV) (n = 31)	2
Cytomegalievirus (CMV) (n = 11)	0
ANA Autoantikörper-positiv (n = 15)	0
Schwangere (n = 60)	2
Rheumafaktor-positiv (n = 50)	1
Hämolytische Proben (n = 10)	0
Lipämische Proben (n = 10)	1
Ikterische Proben (n = 10)	0

11.4 Durchseuchung

Zur Bestimmung der Durchseuchung von HCoV wurden 300 Proben von deutschen Blutspendern untersucht, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor dem Beginn der SARS-CoV-2-Pandemie entnommen wurden.

Tabelle 6: Durchseuchung in Deutschland vor SARS-CoV-2-Pandemie mit recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität]

Blutspender (n = 300)	recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität]
Durchseuchung	HCoV (229E, NL63, OC43, HKU1)
	81,9%

11.5 Avidität

Zur Bestimmung der Avidität von SARS-CoV-2 IgG-Antikörpern wurden Proben von RT-PCR-bestätigten SARS-CoV-2-infizierten Personen als auch Proben von geimpften Personen untersucht.

Tabelle 7: Avidität bei SARS-CoV-2-infizierten Personen nach Symptombeginn

SARS-CoV-2 Infizierte*	Tage nach Symptombeginn					
	0–50 Tage (n = 52)			51–100 Tage (n = 32)		
Avidität**	n	i	h	n	i	h
NP [%]	98,1	-	1,9	87,4	6,3	6,3
RBD [%]	96,4	3,6	-	71,9	21,9	6,2
S1 [%]	96,4	3,6	-	78,1	12,5	9,4

* Seren von SARS-CoV-2 RT-PCR-positiven Personen

** Avidität: n = niedrig, i = intermediär, h = hoch

Tabelle 8: Avidität bei SARS-CoV-2-infizierten Personen nach Schweregrad der Erkrankung

SARS-CoV-2 Infizierte*	Schweregrad der Erkrankung								
	Verlauf ohne Krankenhaus-aufenthalt (n = 14)			Verlauf mit Krankenhaus-aufenthalt auf Normalstation (n = 24)			Verlauf mit Krankenhaus-aufenthalt auf Intensivstation (n = 11)		
Avidität**	n	i	h	n	i	h	n	i	h
NP [%]	100	-	-	91,6	4,2	4,2	90,9	9,1	-
RBD [%]	92,9	7,1	-	70,8	16,7	12,5	81,8	-	18,2
S1 [%]	100	-	-	83,3	12,5	4,2	72,7	9,1	18,2

* Seren von SARS-CoV-2 RT-PCR-positiven Personen

** Avidität: n = niedrig, i = intermediär, h = hoch

Tabelle 9: Avidität bei SARS-CoV-2-geimpften Personen

SARS-CoV-2 Geimpfte*	Zeitpunkt nach Impfung								
	1. Dosis (n = 28)			2. Dosis (n = 40)			3. Dosis (n = 20)		
Avidität**	n	i	h	n	i	h	n	i	h
NP [%]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RBD [%]	96,4	3,6	-	4,2	12,5	83,3	-	-	100
S1 [%]	96,4	3,6	-	4,2	12,5	83,3	-	-	100

* Seren von Personen nach SARS-CoV-2-Impfung, welche 10 bis 50 Tage nach Impfdosis 1, 2 oder 3 entnommen wurden. Das Kollektiv beinhaltete Impfungen ohne bekannte vorangegangene SARS-CoV-2-Infektion und folgender Impfstoff kam zum Einsatz: BioNTech/Pfizer Comirnaty®

** Avidität: n = niedrig, i = intermediär, h = hoch

12 Literatur







- Bauer G. High avidity of vaccine-induced immunoglobulin G (IgG) against SARS-CoV-2: potential relevance for protective humoral immunity. *Exploration of Immunology*, 2022, in press.
- Bauer G, Struck F, Schreiner P, Staschik E, Soutschek E, Motz M. The challenge of avidity determination in SARS-CoV-2 serology. *J Med Virol*. 2021;93:3092–104.
- Struck F, Schreiner P, Staschik E, Wochinz-Richter K, Schulz S, Soutschek E, et al. Vaccination versus infection with SARS-CoV-2: establishment of a high avidity IgG response versus incomplete avidity maturation. *J Med Virol*. 2021;93:6765–77.
- Struck F, Schreiner P, Staschik E, Wochinz-Richter K, Schulz S, Soutschek E, et al. Incomplete IgG avidity maturation after seasonal coronavirus infections. *J Med Virol*. 2021;94:186–96.
- Strömer A, Rose R, Grobe O, Neumann F, Fickenscher H, Lorentz T, et al. Kinetics of nucle- and spike protein-specific immunoglobulin G and of virus-neutralizing antibodies after SARS-CoV-2 infection. *Microorganisms*. 2020;8:1572.
- Neumann F, Rose R, Römpke J, Grobe O, Lorentz T, Fickenscher H, et al. Development of SARS-CoV-2 specific IgG and virus-neutralizing antibodies after infection with variants of concern or vaccination. *Vaccines (Basel)*. 2021;9:700.
- Moura AD, da Costa HHM, Correa VA, Lima AK, Lindoso JA, De Gaspari E, et al. Serological assessment of COVID-19 patients in Brazil: levels, avidity,

and subclasses of IgG against RBD. *Research Square:rs.3.rs-131195/v1* [Preprint]. 2021 [posted 2021 Jan 08] [23 p.]. Available from: <https://www.researchsquare.com/article/rs-131195/v1>



- Pratesi F, Caruso T, Testa D, Tarpanelli T, Gentili A, Gioè D, et al. BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 vaccine elicits high avidity and neutralizing antibodies in healthcare workers. *Vaccines (Basel)*. 2021;9:672.
- Rose R, Neumann F, Grobe O, Lorentz T, Fickenscher H, Krumbholz A. Humoral immune response after different SARS-CoV-2 vaccination regimens. *BMC Medicine* 2022; 20:31. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02231-x>
- Lustig Y, Gonen T, Melzer L, Gilboa M, Indenbaum V, Cohen C, Amit S, Jaber H, Doolman R, Asraf K, Rubin C, Fluss R, Mendelson E, Freedman L, Regev-Yochay G, Kreiss Y. Superior immunogenicity and effectiveness of the 3rd BNT162b2 vaccine dose. *medRxiv*: 2021.12.19.21268037 [Preprint] 2021 [posted 2021 Dec 21]: [29 p.]. Available from: <https://doi.org/10.1101/2021.12.19.21268037>
- Kaneko N, Kuo HH, Boucau J, Farmer JR, Allard-Chamard H, Mahajan VS, et al. Loss of Bcl-6-expressing T follicular helper cells and germinal centers in COVID-19. *Cell*. 2020;183:143–57.
- Tang J, Ravichandran S, Lee Y, Grubbs G, Coyle EM, Klenow L, et al. Antibody affinity maturation and plasma IgA associate with clinical outcome in hospitalized COVID-19 patients. *Nat. Commun*. 2021;12:1221.
- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579:270–3.
- Khatri I, Staal FJT, van Dongen JJM. Blocking of the high-affinity interaction-synapse between SARS-CoV-2 spike and human ACE2 proteins likely requires multiple high-affinity antibodies: an immune perspective. *Front Immunol*. 2020;11:570018.
- Delgado JM, Duro N, Rogers DM, Tkatchenko A, Pandit SA, Varma S. Molecular basis for higher affinity of SARS-CoV-2 spike RBD for human ACE2 receptor. *Proteins*. 2021;89:1134–44.
- Barton MI, MacGowan SA, Kutuzov MA, Dushek O, Barton GJ, van der Merwe PA. Effects of common mutations in the SARS-CoV-2 spike RBD and its ligand, the human ACE2 receptor on binding affinity and kinetics. *Elife*. 2021;10:e70658.
- Muecksch F, Weisblum Y, Barnes CO, Schmidt F, Schaefer-Babajew D, Wang Z, et al. Affinity maturation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies confers potency, breadth, and resilience to viral escape mutations. *Immunity*. 2021;54:1853–68.e7.
- van Binnendijk RS, den Hartog G, Reimerink J, Schepp R, Feenstra S, Reukers D, Reusken C, Eggink D, Sanders EAM, Kortbeek T, Vennema H. Serological Evidence for Reinfection with SARS-CoV-2; An Observational Cohort Study. [Preprint] 2021 [Posted 2021 March 08]:[17 p.]. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3800076> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3800076>
- Kuhlmann C, Mayer CK, Claassen M, Maponga T G, Sutherland A D, Suliman T, Shaw M, Preiser W. Breakthrough Infections with SARS-CoV-2 Omicron Variant Despite Booster Dose of mRNA Vaccine [Preprint] 2021 [Posted 2021 December 09]:[8 p.]. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3981711> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3981711>
- Marshall J.C.A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *Lancet Infect Dis* 2020, June 12, 2020. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30483-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30483-7)

Auf Anforderung senden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zu.

13 Erläuterung der Symbole

	Inhalt ist ausreichend für <n> Ansätze Anzahl der Ansätze
WASHBUF A 10 X	Waschpuffer A (zehnfach konzentriert)
SUBS TMB	Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin
MILKPOW	Magermilchpulver
TESTSTR	Teststreifen
C ONJ IgG	Anti-human IgG-Konjugat
AVIDI	Aviditätsreagenz
EVALFORM	Auswertebogen
INSTRU	Gebrauchsanweisung
	Gebrauchsanweisung beachten
CONT	Inhalt, enthält
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LOT	Chargen-/Versionsnummer
	Nicht einfrieren
REF	Bestell-Nummer
	Verwendbar bis Verfallsdatum
	Lagerung bei x°C bis y°C
	Hersteller

14 Hersteller- und Versionsdaten

recomLine SARS-CoV-2 IgG [Avidität]	Artikel-Nr. 7374
Gebrauchsanweisung gültig ab	GARLCS004D 2023-03
 MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Germany Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-Mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	
	



GARLCS004