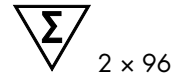


April 2022

QuantiFERON® SARS-CoV-2 ELISA Kit – Gebrauchsanweisung



Version 1



Für in-vitro-diagnostische Anwendungen.

Zur Verwendung mit QuantiFERON® SARS-CoV-2 Blood Collection
Tubes



626420



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown, MD 20874, USA
Telefon: +1-800-426-8157



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, Deutschland



1124420DE

Inhalt

Verwendungszweck	5
Vorgesehene Anwender	6
Beschreibung und Prinzip	7
Zusammenfassung und Erläuterung	7
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	9
Kit-Inhalt	9
Bestandteile des Kits	10
Plattform und Software	10
Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	11
Zusätzliche Reagenzien	11
Ausstattung/Geräte	11
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	12
Sicherheitshinweise	12
Vorsichtsmaßnahmen	14
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	16
Stabilität nach dem Öffnen	16
Rekonstituierte und nicht verbrauchte Reagenzien	16
Lagerung und Handhabung der Proben	17
Verfahren: Durchführung des ELISA	18
Protokoll: IFN- γ -ELISA	18
Ergebnisse (Berechnungen)	24
Erstellung der Standardkurve und Ermittlung der Probenwerte	24

Qualitätskontrolle des Tests.....	26
Interpretation der Ergebnisse.....	28
Grenzen des Assays	29
Assay-Leistungsmerkmale	30
Analytische Leistung.....	30
Klinische Leistungsmerkmale.....	40
Referenzen.....	48
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	53
Symbole	56
Kontakt.....	57
Anhang A: Technische Informationen	58
Unbestimmte Ergebnisse.....	58
Geronnene Plasmaproben	58
Lipämische Plasmaproben	58
Anhang B: Kurzanleitung zum ELISA-Test	59
Bestellinformationen	61
Bearbeitungshistorie des Dokuments.....	62

Verwendungszweck

Der QuantiFERON SARS-CoV-2-Assay ist ein in-vitro-diagnostischer Test für den qualitativen Nachweis auf Interferon- γ (IFN- γ), das von CD4+ und CD8+-T-Zellen als Antwort auf die Stimulation durch einen SARS-CoV-2-Peptid-Cocktail in heparinisiertem Vollblut gebildet wird. Die produzierte IFN- γ -Menge wird mithilfe eines enzymgekoppelten Immunsorptionsassays (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) gemessen.

Der QuantiFERON SARS-CoV-2-Assay ist vorgesehen als Hilfsmittel zur Beurteilung der zellvermittelten Immunreaktion (Cell-Mediated Immune Response, CMI) bei Personen ohne SARS-CoV-2-Infektion in der Anamnese, die eine COVID-19-Impfung mit Impfstoffen gegen das virale Spike-Protein (S-Protein) des SARS-CoV-2-Virus erhalten haben.

Zur Beurteilung der Immunreaktion eines Patienten auf eine COVID-19-Impfung sollte der QuantiFERON SARS-CoV-2-Assay in Verbindung mit anderen Labortests und epidemiologischen/klinischen Bewertungen verwendet werden.

Nach einer Impfung kann es mehrere Tage dauern, bis eine T-Zell-Immunreaktion erfolgt, obwohl die Zeitdauer bis zum Auftreten der T-Zell-Immunreaktionen bei Geimpften derzeit noch nicht ausreichend charakterisiert ist.

Das Ausbleiben einer Reaktion in dem Assay (nichtreaktives Ergebnis) schließt eine aktive SARS-CoV-2-Infektion nicht aus bzw. lässt keine Rückschlüsse auf die Wirksamkeit von COVID-19-Vakzinen zu. Wenn Verdacht auf eine aktive Infektion besteht, bestätigen Sie ihn anhand eines anderen molekularen oder Antigen-Tests auf SARS-CoV-2. Die Ergebnisse des Assays sollten stets in Verbindung mit einer klinischen Untersuchung, der Krankengeschichte des Patienten und anderen Befunden verwendet werden.

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen.

Vorgesehene Anwender

Dieses Kit ist zur Anwendung durch berufsmäßige Benutzer vorgesehen.

Das Produkt darf nur von Personen verwendet werden, die in die Anwendung molekularbiologischer Verfahren und des hier beschriebenen Systems speziell eingewiesen und darin geschult wurden.

Beschreibung und Prinzip

Zusammenfassung und Erläuterung

Der QuantiFERON SARS-CoV-2 SARS-Assay (QFN SARS) ist ein qualitativer Assay, für den spezielle Blutentnahmeröhrchen mit Peptidantigenen verwendet werden, die mithilfe SARS-CoV-2-spezifischer Proteine zu einer Stimulation der Immunzellen führen. Nach einer Inkubation der Blutproben in den Röhrchen für 16 bis 24 Stunden wird das Plasma entnommen und auf das Vorhandensein von in Reaktion auf die Peptidantigene produziertem IFN- γ getestet. Über spezifische T-Zell-vermittelte Reaktionen auf eine SARS-CoV-2-Infektion wurde nach der Impfung mit unterschiedlichen Vakzinen, die jeweils auf das Spike-Protein abzielen, berichtet. [1–34]

Zunächst wird Vollblut in jedes der QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes entnommen. Dabei handelt es sich um ein Nil-Röhrchen, ein Ag1- und ein Ag2-Röhrchen sowie ein Mitogen-Röhrchen. Alternativ kann auch ein einzelnes Blutentnahmeröhrchen mit Lithium- oder Natriumheparin als Antikoagulans zur Blutentnahme verwendet werden, aus dem das Blut anschließend in die QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes überführt wird.

Die QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes werden geschüttelt, um Antigene und Blut zu vermischen, und sollten so bald wie möglich, spätestens jedoch 16 Stunden nach Blutentnahme, bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 16 bis 24 Stunden werden die Röhrchen zentrifugiert, das Plasma wird abgenommen und die Menge an IFN- γ (IE/ml) mittels ELISA gemessen. Der QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA verwendet einen rekombinanten Human-IFN- γ -Standard, der gegen ein IFN- γ -Referenzpräparat geprüft wurde (NIH-Ref.: Gxg01-902-535). Die Ergebnisse der Testproben werden in internationalen Einheiten pro ml (IE/ml) ausgegeben und anhand einer Standardkurve bestimmt, die durch Tests von Verdünnungen des im Kit vorhandenen Standards erstellt wurde.

Es ist bekannt, dass im Serum oder Plasma vorliegende heterophile Antikörper (z. B. humane Anti-Maus-Antikörper) bestimmter Personen Immunassays stören. Der Effekt heterophiler Antikörper wurde im QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA dadurch minimiert, dass der grünen Verdünnungslösung Normalserum von Mäusen zugegeben wurde und als IFN- γ -Fängerantikörper monoklonale F(ab')₂-Antikörperfragmente verwendet werden, mit denen die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind.

Die Plasmaprobe aus dem Mitogen-Röhrchen dient als IFN- γ -Positivkontrolle für die zu testenden Proben. Das Nil-Röhrchen dient zur Korrektur des Hintergrunds (z. B. erhöhter Gehalt an zirkulierendem IFN- γ oder Vorhandensein heterophiler Antikörper). Der IFN- γ -Wert des Nil-Röhrchens wird von dem für die Ag1-, Ag2- und Mitogen-Röhrchen erhaltenen IFN- γ -Wert abgezogen.

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

ELISA-Komponenten	2-Platten-Kit
Katalog-Nr.	626420
Microplate Strips (Mikrotiterplattenstreifen, 12 x 8 Wells, beschichtet mit monoklonalen Mausantikörpern gegen Human-IFN- γ)	2 Sätze von Mikrotiterplattenstreifen, 12 x 8
IFN- γ Standard (IFN- γ -Standard, lyophilisiert, enthält rekombinantes Human-IFN- γ , Rinder-casein, 0,01 % m/v Thimerosal)	1 Fläschchen (8 IE/ml nach der Rekonstitution)
Green Diluent (grüne Verdünnungslösung, enthält Rinder-casein, Normalserum von Mäusen, 0,01 % m/v Thimerosal)	1 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate (100x Konjugatkonzentrat, lyophilisiert, Meerrettichperoxidase (Maus) gegen Human-IFN- γ mit 0,01 % Thimerosal)	1 x 0,3 ml (nach der Rekonstitution)
Wash Buffer 20x Concentrate (20x Waschpufferkonzentrat, pH 7,2, mit 0,05 % v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Enzymsubstratlösung, mit H ₂ O ₂ , 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzymstopplösung, mit 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
<i>QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit – Gebrauchsanweisung</i>	1

* Enthält Schwefelsäure.

Bestandteile des Kits

Kontrollen und Kalibratoren

Der QFN SARS-ELISA verwendet einen rekombinanten Human-IFN- γ -Standard, der gegen ein IFN- γ -Referenzpräparat geprüft wurde (NIH-Ref.: Gxg01-902-535).

Plattform und Software

Zur Analyse der Rohdaten und der Berechnung von Ergebnissen kann die QFN SARS Analysesoftware verwendet werden. Sie steht unter www.qiagen.com zum Download zur Verfügung.

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Zusätzliche Reagenzien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser (2 Liter)

Ausstattung/Geräte*

- Inkubator, 37 ± 1 °C (mit oder ohne CO₂-Zufuhr)
- Kalibrierte Pipetten mit variablem Volumen für die Abgabe von 10 µl bis 1000 µl mit Einwegspitzen
- Kalibrierte Mehrkanalpipette zur Abgabe von 50 µl und 100 µl mit Einwegspitzen
- Schüttler für Mikrotiterplatten mit Geschwindigkeiten von 500 bis 1000 U/min
- Mikrotiterplatten-Waschgerät (bei der Handhabung von Plasmaproben wird aus Sicherheitsgründen ein automatisches Plattenwaschgerät empfohlen)
- Mikrotiterplatten-Reader mit 450-nm-Filter und Referenzfilter bei 620 bis 650 nm
- Vortex-Mischer mit variabler Geschwindigkeit
- Zentrifuge zum Zentrifugieren der Blutentnahmeröhrchen bei mindestens 3000 RZB (g)
- Messzylinder, 1 oder 2 Liter
- Plattendeckel
- Fusselarme, saugfähige Tücher

* Stellen Sie vor dem Gebrauch sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Kunden in der Europäischen Union: Bitte beachten Sie, dass Sie verpflichtet sind, schwerwiegende Vorkommnisse, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaates, in welchem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, zu melden.


Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). Diese sind im praktischen, kompakten PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN einsehen und ausdrucken.

- Alle chemischen und biologischen Materialien sind potenziell gefährlich. Die Proben sind potenziell infektiös und müssen als biologische Gefahrenstoffe behandelt werden.
- Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.
- Die Proben sind potenziell infektiös. Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.
- Zur Beurteilung der Immunreaktion eines Patienten auf eine COVID-19-Impfung sollte der QFN SARS-Assay in Verbindung mit anderen Labortests und epidemiologischen/klinischen Bewertungen verwendet werden.

- Das Ausbleiben einer Reaktion im QFN SARS-Assay (nichtreaktives Ergebnis) schließt die Möglichkeit einer SARS-CoV-2-Infektion nicht aus bzw. lässt keine Rückschlüsse auf die Wirksamkeit von COVID-19-Vakzinen zu. Falsch nichtreaktive Ergebnisse können durch eine fehlerhafte Handhabung der Blutentnahmeröhrchen im Anschluss an die Venenpunktion, eine fehlerhafte Durchführung des Assays oder andere immunologische Variablen des jeweiligen Patienten, unter anderem im Zusammenhang mit Komorbiditäten, bedingt sein. Heterophile Antikörper oder eine unspezifische IFN- γ -Produktion infolge anderer entzündlicher Erkrankungen kann die spezifischen Reaktionen auf SARS-CoV-2-Peptide verdecken.
- Umgekehrt sollte ein reaktives Ergebnis des QFN SARS-Assays nicht als einzige oder endgültige Grundlage für Rückschlüsse auf die Wirksamkeit eines COVID-19-Vakzins dienen. Eine fehlerhafte Durchführung des Assays kann zu falsch reaktiven QFN SARS-Ergebnissen führen.
- Ein falsch reaktives QFN SARS-Ergebnis kann durch eine fehlerhafte Blutentnahme oder eine unsachgemäße Probenbehandlung und daraus resultierender Beeinträchtigung der Lymphozytenfunktion bedingt sein. Für die sachgemäße Behandlung der Blutproben siehe Abschnitt „Verfahren: Durchführung des ELISA“, Seite 18. Verzögerungen bei der Inkubation können zu falsch nichtreaktiven oder unbestimmten Ergebnissen führen, und andere technische Parameter können die Fähigkeit zum Nachweis einer bedeutenden IFN- γ -Reaktion beeinträchtigen.
- Wenn eine Blutprobe nichtreaktiv gegenüber den SARS-CoV-2-Proteinen ist, steht eine zusätzlich vorliegende schwache Reaktion auf Mitogen ($< 0,5$ IE/ml) für ein unbestimmtes Ergebnis. Ein solches Muster kann auftreten bei ungenügender Lymphozytenzahl, herabgesetzter Lymphozytenaktivität infolge unsachgemäßer Probenbehandlung, unsachgemäßem Befüllen oder Mischen des Mitogen-Röhrchens oder in Fällen, in denen die Lymphozyten des Patienten nicht in der Lage sind, IFN- γ zu bilden. Erhöhte Messwerte für IFN- γ in der Nil-Probe können in Gegenwart heterophiler Antikörper oder bei intrinsischer IFN- γ -Sekretion auftreten.

Vorsichtsmaßnahmen

<p>VORSICHT</p> 	<p>Behandeln Sie Humanblutproben stets als potenziell infektiös.</p> <p>Die einschlägigen Richtlinien zum Umgang mit Blut sind zu beachten. Proben und Materialien, die mit Blut oder Blutprodukten in Kontakt gekommen sind, müssen gemäß den auf Bundes-, Landes- und kommunaler Ebene geltenden Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.</p>
--	---

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Enthält: Schwefelsäure. Warnung! Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Warnung! Bewirkt leichte Hautreizung. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

QuantiFERON Green Diluent



Enthält: Tartrazin. Warnung! Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Schädlich für Wasserorganismen mit langfristigen Auswirkungen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

Weitere Informationen

Sicherheitsdatenblätter: www.qiagen.com/safety

- Thimerosal wird in einigen QFN SARS-Reagenzien als Konservierungsmittel eingesetzt. Bei Verschlucken, Einatmen oder Hautkontakt kann es toxisch sein.

- Abweichungen von der *QuantiFERON ELISA Kit – Gebrauchsanweisung* können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Bitte lesen Sie die Anweisungen vor Gebrauch sorgfältig durch.
- Verwenden Sie das Kit nicht, wenn Reagenzflaschen vor Gebrauch beschädigt oder undicht erscheinen.
- **Wichtig:** Fläschchen vor der Verwendung prüfen. Keine Konjugat- oder IFN- γ -Standard-Fläschchen verwenden, bei denen Zeichen einer Beschädigung sichtbar sind oder deren Gummidichtung beeinträchtigt ist. Defekte Fläschchen nicht anfassen. Fläschchen unter Beachtung geeigneter Vorsichtsmaßnahmen sicher entsorgen. Es wird empfohlen, das Konjugat- bzw. IFN- γ -Standard-Fläschchen mit einer Entbördelzange zu öffnen, um die Verletzungsgefahr durch die metallene Bördelkappe zu minimieren.
- Komponenten wie Mikrotiterplattenstreifen, IFN- γ -Standard, grüne Verdünnungslösung oder 100x Konjugatkonzentrat von unterschiedlichen QFN SARS-Kit-Chargen dürfen nicht zusammen verwendet oder vermischt werden. Andere Reagenzien (20x Waschpufferkonzentrat, Enzymsubstratlösung und Enzymstopplösung) können zwischen den Kits ausgetauscht werden, vorausgesetzt, das Verfallsdatum der Reagenzien ist noch nicht abgelaufen und die Chargendaten werden notiert.
- Nicht benötigte Reagenzien und biologische Proben müssen gemäß den auf Bundes-, Landes- und kommunaler Ebene geltenden Bestimmungen entsorgt werden.
- Nach Ablauf des Verfallsdatums darf das QFN SARS-ELISA-Kit nicht mehr verwendet werden.
- Zu jedem Zeitpunkt sind korrekte Laborverfahren anzuwenden.
- Stellen Sie sicher, dass Laborgeräte wie zum Beispiel Plattenwaschgeräte und -Reader kalibriert und für den Gebrauch validiert sind.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten aufgedruckten Verfallsdaten und Lagerungsbedingungen sind zu beachten. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Stabilität nach dem Öffnen

- Das ELISA-Kit bei 2–8 °C lagern.
- Die Enzymsubstratlösung ist stets vor direkter Sonneneinstrahlung zu schützen.

Rekonstituierte und nicht verbrauchte Reagenzien

- Für Anweisungen zur Rekonstitution der Reagenzien siehe Abschnitt „Verfahren: Durchführung des ELISA“, Seite 18.
- Der rekonstituierte Kit-Standard ist bei Lagerung bei 2–8 °C bis zu 3 Monate lang haltbar. Notieren Sie das Datum der Rekonstitution des Kit-Standards.
- Das 100x Konjugatkonzentrat muss nach der Rekonstitution bei 2–8 °C gelagert und innerhalb von 3 Monaten aufgebraucht werden. Notieren Sie das Datum der Rekonstitution des Konjugats.
- Gebrauchsfertig verdünntes Konjugat muss innerhalb von 6 Stunden nach Zubereitung verwendet werden.
- Gebrauchsfertig verdünnter Waschpuffer ist bei Raumtemperatur bis zu 2 Wochen lang haltbar.

Lagerung und Handhabung der Proben

Für Details zum Blutentnahme-Workflow für den QFN SARS-Test siehe *QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) Blood Collection Tubes – Gebrauchsanweisung (1124422)*.

Verfahren: Durchführung des ELISA

Protokoll: IFN- γ -ELISA

Wichtige Hinweise

- Informationen über Materialien, die für die Durchführung des ELISA erforderlich sind, siehe Abschnitt „Kit-Inhalt“, Seite 9, und Abschnitt „Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien“, Seite 11.

Vorbereitung (erforderliche Zeit zur Assaydurchführung)

Um mit dem QFN SARS-Assay valide Ergebnisse zu erzielen, muss der Bediener spezifische Aufgaben innerhalb bestimmter Zeiträume durchführen. Vor Verwendung des Assays wird dem Bediener daher empfohlen, jede Phase der Assaydurchführung sorgfältig zu planen, um in jeder Phase über ausreichend Zeit zu verfügen. Nachstehend finden Sie Angaben zur geschätzten Dauer sowie zur erforderlichen Zeit bei der gleichzeitigen Durchführung mehrerer Tests.

- Etwa 3 Stunden für eine ELISA-Platte
- < 1 Stunde Arbeitszeit
- Plus 10 bis 15 Minuten für jede zusätzliche Platte

Verfahren

1. Mit Ausnahme des 100x Konjugatkonzentrats müssen alle Plasmaproben und Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) gebracht werden. Planen Sie für die Temperaturäquilibrierung mindestens 60 Minuten ein.
2. Nehmen Sie nicht benötigte ELISA-Plattenstreifen aus dem Rahmen, geben Sie sie in die Folienverpackung zurück und lagern Sie diese versiegelt bis zum Gebrauch im Kühlschrank.
3. Sehen Sie mindestens 1 Streifen für die QFN SARS-Standards und eine ausreichende Anzahl von Streifen für die zu testenden Patienten vor (empfohlenes Plattenformat siehe

Abbildung 2). Bewahren Sie den Rahmen und den Deckel nach dem Gebrauch für die verbleibenden Streifen auf.

- 3a. Rekonstituieren Sie den IFN- γ -Standard mit der auf dem Etikett des Fläschchens angegebenen Menge an entionisiertem oder destilliertem Wasser. Mischen Sie vorsichtig, um die Schaumbildung zu minimieren, und vergewissern Sie sich, dass der gesamte Inhalt des Fläschchens vollständig aufgelöst wurde. Durch Rekonstitution des IFN- γ -Standards auf das angegebene Volumen erhalten Sie eine Lösung mit einer Konzentration von 8,0 IE/ml.
- 3b. Stellen Sie eine Verdünnungsreihe des rekonstituierten Standards mit 4 IFN- γ -Konzentrationen her (siehe Abbildung 1).
- 3c. Mit den folgenden IFN- γ -Konzentrationen ist eine Standardkurve zu erstellen:
- S1 (Standard 1) enthält 4,0 IE/ml
 - S2 (Standard 2) enthält 1,0 IE/ml
 - S3 (Standard 3) enthält 0,25 IE/ml
 - S4 (Standard 4) enthält 0 IE/ml (nur grüne Verdünnungslösung [Green Diluent, GD])
- 3d. Die Standards sind mindestens in Doppelbestimmungen zu testen.
- 3e. Stellen Sie die Verdünnungen des Kit-Standards für jeden ELISA-Durchgang frisch her.

Verfahren	
A	4 Röhrchen beschriften: S1, S2, S3, S4
B	150 μ l GD zu S1, S2, S3 und S4 zugeben
C	150 μ l Kit-Standard zu S1 zugeben und gründlich mischen
D	50 μ l von S1 nach S2 überführen und gründlich mischen
E	50 μ l von S2 nach S3 überführen und gründlich mischen
F	Nur GD dient als Nullstandard (S4)

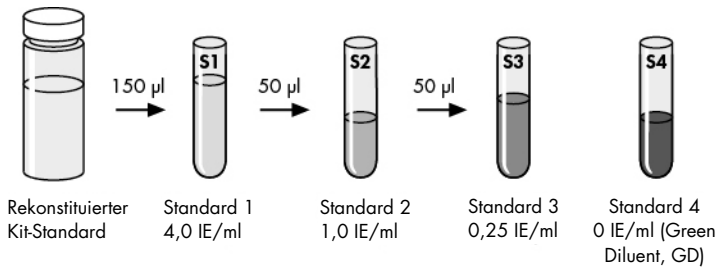


Abbildung 1. Herstellung der Verdünnungsreihen für die Standardkurve.

4. Rekonstituieren Sie das lyophilisierte 100x Konjugatkonzentrat in 0,3 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser. Mischen Sie vorsichtig, um die Schaumbildung zu minimieren, und vergewissern Sie sich, dass der gesamte Inhalt des Fläschchens vollständig aufgelöst wurde.
 - 4a. Das gebrauchsfertig verdünnte Konjugat wird hergestellt, indem Sie die erforderliche Menge des rekonstituierten 100x Konjugatkonzentrats in grüner Verdünnungslösung verdünnen (Tabelle 1).
 - 4b. Gebrauchsfertig verdünntes Konjugat sollte innerhalb von 6 Stunden nach Zubereitung verwendet werden.
 - 4c. Nicht verbrauchtes 100x Konjugatkonzentrat muss sofort nach Gebrauch wieder bei 2–8 °C gelagert werden.

Tabelle 1. Konjugatherstellung (gebrauchsfertige Verdünnung)

Anzahl Streifen	Volumen Konjugat (100x Konzentrat)	Volumen grüne Verdünnungslösung
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Plasmaproben, die aus Blutentnahmeröhrchen gewonnen und anschließend (im Kühlschrank oder gefroren) gelagert wurden, müssen vor der Zugabe zum ELISA-Well gründlich gemischt werden. Plasmaproben können in zentrifugierten QFN SARS Blood Collection Tubes bis zu 28 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden, gewonnene Plasmaproben ebenfalls. Gewonnene Plasmaproben können darüber hinaus für die zu 24 Monate bei –20 °C bis (vorzugsweise) –70 °C aufbewahrt werden.

Plasmaproben können direkt aus den zentrifugierten Blutentnahmeröhrchen in die QFN SARS-ELISA-Platte überführt bzw. verwendet werden.

Wichtig: Wenn die Plasmaproben direkt aus den zentrifugierten QFN SARS Blood Collection Tubes überführt werden, ist von einem Mischen des Plasmas abzusehen.

Achten Sie stets darauf, das Material an der Geloberfläche nicht zu verwirbeln.

6. Geben Sie je 50 µl des frisch angesetzten gebrauchsfertig verdünnten Konjugats in jedes Well der ELISA-Platte.
7. Geben Sie je 50 µl der zu testenden Plasmaprobe in die entsprechenden Wells (empfohlenes ELISA-Plattenlayout siehe Abbildung 2).
8. Geben Sie schließlich je 50 µl der Standards 1 bis 4 in die entsprechenden Plattenwells (empfohlenes ELISA-Plattenlayout siehe Abbildung 2). Die Standards sind mindestens in Doppelbestimmungen zu testen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	1 Ag1	3 Ag1	5 Ag1	7 Ag1	9 Ag1	S2	S2	13 Ag1	15 Ag1	17 Ag1	19 Ag1	21 Ag1
C	1 Ag2	3 Ag2	5 Ag2	7 Ag2	9 Ag2	S3	S3	13 Ag2	15 Ag2	17 Ag2	19 Ag2	21 Ag2
D	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
F	2 Ag1	4 Ag1	6 Ag1	8 Ag1	10 Ag1	11 Ag1	12 Ag1	14 Ag1	16 Ag1	18 Ag1	20 Ag1	22 Ag1
G	2 Ag2	4 Ag2	6 Ag2	8 Ag2	10 Ag2	11 Ag2	12 Ag2	14 Ag2	16 Ag2	18 Ag2	20 Ag2	22 Ag2
H	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

Abbildung 2. **Empfohlenes ELISA-Plattenlayout.** S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4). 1N (Probe 1; Nil-Kontrollplasma), 1 Ag1 (Probe 1; Ag1-Plasma), 1 Ag2 (Probe 1; Ag2-Plasma), 1M (Probe 1; Mitogenplasma).

9. Decken Sie die ELISA-Platte ab und mischen Sie das Konjugat und die Plasmaproben bzw. Standards 1 Minute lang gründlich mit einem Schüttler für Mikrotiterplatten bei 500 bis 1000 U/min. Ein Verspritzen muss vermieden werden.
10. Decken Sie die ELISA-Platte ab und inkubieren Sie sie 120 ± 5 Minuten lang bei Raumtemperatur ($22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$). Die ELISA-Platte darf während der Inkubation keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden. Eine Abweichung vom angegebenen Temperaturbereich kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
11. Bereiten Sie während der Inkubation der ELISA-Platte den Waschpuffer in gebrauchsfertiger Konzentration vor. Verdünnen Sie dazu einen Teil 20x Waschpufferkonzentrat mit 19 Teilen entionisiertem oder destilliertem Wasser und mischen Sie gründlich. Im Lieferumfang ist ausreichend 20x Waschpufferkonzentrat zur Herstellung von 2 Litern gebrauchsfertig verdünntem Waschpuffer vorhanden.

-
12. Waschen Sie nach Abschluss der Inkubation der ELISA-Platte die Wells mit 400 µl gebrauchsfertigem Waschpuffer. Führen Sie den Waschschrift mindestens 6-mal durch. Bei der Handhabung von Plasmaproben wird aus Sicherheitsgründen die Verwendung eines automatischen Plattenwaschgeräts empfohlen.

Sorgfältiges Waschen ist für die Leistung des Assays sehr wichtig. Achten Sie bei jedem Waschzyklus darauf, dass alle Wells vollständig bis oben mit Waschpuffer gefüllt sind. Es empfiehlt sich, den Waschpuffer bei jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken zu lassen.

In den Auffangbehälter für Abfallflüssigkeit sollte ein laborübliches Desinfektionsmittel gegeben werden. Befolgen Sie zudem die in Ihrem Labor geltenden Anweisungen zur Dekontamination potenziell infektiösen Materials.

13. Klopfen Sie die ELISA-Platte umgekehrt auf einem saugfähigen, fusselfreien Tuch aus, um noch vorhandenen Waschpuffer zu entfernen. Geben Sie 100 µl Enzymsubstratlösung in jedes Well, decken Sie die Platte ab und mischen Sie sie 1 Minute lang gründlich mit einem Schüttler für Mikrotiterplatten bei 500 bis 1000 U/min.
14. Decken Sie die ELISA-Platte ab und inkubieren Sie sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). Die ELISA-Platte darf während der Inkubation keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden.
15. Geben Sie nach der 30-minütigen Inkubation 50 µl Enzymstopplösung in jedes Well. Benutzen Sie dazu die gleiche Reihenfolge wie bei der Zugabe des Substrats. Mischen Sie die Platte anschließend gründlich mit einem Schüttler für Mikrotiterplatten bei 500 bis 1000 U/min.
16. Messen Sie innerhalb von 5 Minuten nach Stoppen der Reaktion die optische Dichte (Optical Density, OD) jedes Wells der ELISA-Platte mit einem Mikrotiterplatten-Reader unter Verwendung eines 450-nm-Filters und eines Referenzfilters bei 620 nm bis 650 nm. Die OD-Werte werden für die Berechnung der Ergebnisse verwendet.

Ergebnisse (Berechnungen)

Zur Analyse der Rohdaten und der Berechnung von Ergebnissen kann die QFN SARS Analysesoftware verwendet werden. Sie steht unter www.qiagen.com zur Verfügung. Bitte achten Sie darauf, die aktuellste Version der QFN SARS Analysesoftware zu verwenden.

Die Software führt eine Qualitätskontrolle des Assays durch, erstellt eine Standardkurve und liefert für jeden Patienten ein Testergebnis nach der in Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“, Seite 28, beschriebenen Methode. Die Software gibt alle Konzentrationen über 10 IE/ml als „> 10“ aus, da diese Werte oberhalb des validierten linearen Bereichs des ELISA liegen.

Alternativ zur Verwendung der QFN SARS Analysis Software können die Ergebnisse auch wie folgt bestimmt werden.

Erstellung der Standardkurve und Ermittlung der Probenwerte

Berechnung ohne QFN SARS Analysesoftware

Wenn zur Bestimmung der Standardkurve und der Probenwerte (IE/ml) nicht die QFN SARS Analysesoftware verwendet wird, ist ein Tabellenkalkulationsprogramm wie Microsoft® Excel® erforderlich.

Verwendung eines Tabellenkalkulationsprogramms

1. Ermitteln Sie für jede Platte die OD-Mittelwerte der Bestimmungen des Kit-Standards.
2. Erstellen Sie eine $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -Standardkurve durch Auftragen des $\log_{(e)}$ des OD-Mittelwerts (y-Achse) gegen den $\log_{(e)}$ der IFN- γ -Konzentration der Standards in IE/ml (x-Achse). Der Nullstandard wird bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Berechnen Sie dann die Regressionsgerade für die Standardkurve mittels Regressionsanalyse.

3. Ermitteln Sie anhand der Standardkurve die IFN- γ -Konzentration (IE/ml) der getesteten Plasmaproben. Legen Sie dabei den OD-Wert jeder Probe zugrunde.
4. Für diese Berechnungen können Softwarepakete für Mikrotiterplatten-Reader verwendet werden sowie gängige Tabellenkalkulations- bzw. Statistikprogramme (wie beispielsweise Microsoft Excel). Wir empfehlen die Verwendung solcher Softwarepakete zur Durchführung der Regressionsanalyse und zur Berechnung des Variationskoeffizienten (% VK) der Standards sowie des Korrelationskoeffizienten (r) der Standardkurve.

Probenberechnung

Bei Erhalt der folgenden OD-Messwerte für die Standards würden die Berechnungen mit – log(e) – denen in Tabelle 2 entsprechen.

Tabelle 2. Standardkurve

Standard	IE/ml	OD-Werte a und b	OD- Mittelwert	% VK	Log _(e) IE/ml	Log _(e) - Mittelwert (OD)
Standard 1	4	1,089; 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
Standard 2	1	0,357; 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
Standard 3	0,25	0,114; 0,136	0,125	n. z.	-1,386	-2,079
Standard 4	0	0,034; 0,037	0,036	n. z.	n. z.	n. z.

Die Gleichung der Kurve lautet $y = 0,7885(X) - 0,9837$, wobei „m“ = 0,7885 und „c“ = -0,9837. Diese Werte werden in der Gleichung $X = (Y - c)/m$ verwendet, um nach X aufzulösen. Auf Grundlage der Standardkurve ist der berechnete Korrelationskoeffizient (r) = 1,000. n. z.: nicht zutreffend.

Die Validität des Assays wird mit den in Abschnitt „Qualitätskontrolle des Tests“, Seite 26, aufgeführten Kriterien ermittelt.

Die Standardkurve (Tabelle 2) wird zur Umrechnung der ermittelten Antigen-OD in internationale Einheiten (IE/ml) verwendet.

Tabelle 3. Probenberechnung

Antigen	OD-Wert	\log_{10} -OD-Wert	X	e^x (IE/ml)	Antigen – Nil (IE/ml)
Nil	0,037	-3,297	-2,934	0,05	-
Ag1	1,161	0,149	1,437	4,21	4,15
Ag2	1,356	0,305	1,634	5,12	5,07
Mitogen	1,783	0,578	1,981	7,25	7,20

Zur Korrektur des Hintergrunds wird der Wert der jeweiligen Nil-Kontrolle (in IE/ml) von dem IFN- γ -Wert (in IE/ml) für Ag1, Ag2 und Mitogen subtrahiert. Die entsprechend korrigierten Werte werden zur Interpretation der Testergebnisse herangezogen.

Qualitätskontrolle des Tests

Die Genauigkeit der Testergebnisse hängt von der Erstellung einer korrekten Standardkurve ab. Daher müssen die Ergebnisse der Standards vor Auswertung der Testergebnisse geprüft werden.

Der ELISA liefert gültige Ergebnisse, wenn alle nachstehenden Kriterien erfüllt sind:

- Der OD-Mittelwert von Standard 1 muss $\geq 0,600$ betragen.
- Der Variationskoeffizient (% VK) für die Bestimmungen von Standard 1 und Standard 2 muss ≤ 15 % sein.
- Die OD-Werte für die Bestimmungen von Standard 3 und Standard 4 dürfen höchstens um 0,040 OD-Einheiten vom jeweiligen Mittelwert abweichen.

- Der aus den mittleren Absorptionswerten der Standards berechnete Korrelationskoeffizient (r) muss $\geq 0,98$ sein.
- Werden diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.
- Der OD-Mittelwert des Nullstandards (grüne Verdünnungslösung) muss $\leq 0,150$ sein. Ist der OD-Mittelwert $> 0,150$, muss das Verfahren zum Waschen der Platten überprüft werden.

Die Berechnung und Angabe dieser Qualitätskontrollparameter wird mit der QFN SARS Analysesoftware durchgeführt.

Die geeigneten Kontrollmaterialien und die Abstände zwischen den Tests sind von jedem Labor entsprechend den Vorgaben der zuständigen Bundes-, Landes-, kommunalen oder sonstigen Akkreditierungsstellen festzulegen. Eine externe Qualitätsprüfung sowie alternative Validierungsverfahren sind in Erwägung zu ziehen.

Hinweis: Mit rekombinantem IFN- γ versetztes Plasma zeigte bei einer Lagerung bei entweder 2–8 °C oder –20 °C Konzentrationsverluste von bis zu 50 %. Rekombinantes IFN- γ in Plasmaproben wird daher nicht zur Herstellung von Kontrollstandards empfohlen.

Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse mit dem QFN SARS-Assay werden gemäß den folgenden Kriterien interpretiert (Tabelle 4).

Wichtig: Zur Beurteilung der Immunreaktion eines Patienten auf eine COVID-19-Impfung sollte der QFN SARS-Assay in Verbindung mit anderen Labortests und epidemiologischen/klinischen Bewertungen verwendet werden.

Tabelle 4. Interpretation der Ergebnisse des QFN SARS-Assays

Nil (IE/ml)	Ag1-Antigen minus Nil (IE/ml)	Ag2-Antigen minus Nil (IE/ml)	Mitogen minus Nil (IE/ml)*	QFN SARS-Ergebnis	Bericht/Interpretation
≤ 8,0	≥ 0,15 und ≥ 25 % der Negativkontrolle	Beliebig	Beliebig	Reaktiv	SARS-CoV-2-Reaktion nachgewiesen
	Beliebig	≥ 0,15 und ≥ 25 % der Negativkontrolle			
	< 0,15 oder ≥ 0,15 und < 25 % der Negativkontrolle	< 0,15 oder ≥ 0,15 und < 25 % der Negativkontrolle	≥ 0,50	Nichtreaktiv	KEINE SARS-CoV-2-Reaktion nachgewiesen
	< 0,15 oder ≥ 0,15 und < 25 % der Negativkontrolle	< 0,15 oder ≥ 0,15 und < 25 % der Negativkontrolle	< 0,50	Unbestimmt [‡]	SARS-CoV-2-Reaktion und Mitogen nicht nachweisbar
>8,0 [§]	Beliebig				

*Die Ergebnisse der Mitogen-Positivkontrolle (und gelegentlich auch die des Ag-Antigens) können außerhalb des Messbereichs des Mikrotiterplatten-Readers liegen. Die Testergebnisse werden dadurch nicht beeinträchtigt. Werte oberhalb von 10 IE/ml werden von der QFN SARS-Software als > 10 IE/ml ausgegeben.

[‡] Mögliche Ursachen siehe Abschnitt „Hilfe zur Fehlerbehebung“, Seite 53.

[§] Klinische Studien haben ergeben, dass der IFN- γ -Spiegel der Negativkontrolle bei weniger als 0,25 % der Patienten > 8,0 IE/ml ist.

Grenzen des Assays

Die Ergebnisse des QFN SARS-Assays müssen im Zusammenhang mit der epidemiologischen Anamnese jedes einzelnen Patienten, seinem aktuellen Gesundheitszustand und sonstigen diagnostischen Untersuchungen bewertet werden.

Patienten mit Nil-Werten über 8 IE/ml werden als „unbestimmt“ eingestuft, da eine um 25 % höhere Reaktion auf die Ag-Antigene sich außerhalb des Messbereichs des Assays befinden kann.

- Ein nichtreaktives Ergebnis muss vor dem Hintergrund der medizinischen und sonstigen Anamnesedaten des Patienten, die für die Wahrscheinlichkeit einer Immunreaktion auf die Impfung von Bedeutung sind, beurteilt werden, und zwar insbesondere bei Patienten mit eingeschränkter Immunfunktion.
- Zur Beurteilung der Immunreaktion eines Patienten auf eine COVID-19-Impfung sollte der QFN SARS-Assay in Verbindung mit anderen Labortests und epidemiologischen/klinischen Bewertungen verwendet werden.

Unzuverlässige oder unbestimmte Ergebnisse können folgende Ursachen haben:

- Abweichungen von dem in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren
- Fehlerhafter Transport/fehlerhafte Behandlung der Blutproben
- Erhöhte Spiegel an zirkulierendem IFN- γ oder Vorliegen heterophiler Antikörper
- Überschreitung der validierten Zeiträume für das Blut von der Blutentnahme bis zur Inkubation. Siehe *QFN SARS Blood Collection Tubes – Gebrauchsanweisung* (1124422).

Assay-Leistungsmerkmale

Analytische Leistung

Cut-off-Wert des Assays

Der Cut-off-Wert des QFN SARS-Assays wurde anhand der Daten folgender Personen bestimmt: 20 Teilnehmern, die mit einem zugelassenen RT-PCR-Test oder einem serologischen Test auf SARS-CoV-2 nicht reagierten, sowie von zwanzig (20) Spendern, die mit einem von der FDA EUA zugelassenen Impfstoff vollständig geimpft waren (zwischen 2 bis 16 Wochen nach Erreichen des vollständigen Impfstatus). Die Analyse der Sensitivitäts- und Spezifitätsdaten zusammen mit den exakten zweiseitigen 95%-Konfidenzintervallen (KI) belegte einen optimalen Cut-off-Wert für den ELISA von 0,15 IE/ml (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5. Cut-off-Werte (IE/ml) für den QFN SARS-Assay mit der zugehörigen Sensitivität und Spezifität sowie den exakten zweiseitigen 95%-Konfidenzintervallen

Cut-off-Wert	Sensitivität			Spezifität		
	Wert	Unteres 95%-KI	Oberes 95%-KI	Wert	Unteres 95%-KI	Oberes 95%-KI
0,1	1,000	0,940	1,000	0,933	0,838	0,982
0,15	0,983	0,911	1,000	1,000	0,940	1,000
0,2	0,900	0,795	0,962	1,000	0,940	1,000
0,25	0,733	0,603	0,839	1,000	0,940	1,000
0,3	0,717	0,586	0,825	1,000	0,940	1,000
0,35	0,650	0,516	0,769	1,000	0,940	1,000
0,4	0,600	0,465	0,724	1,000	0,940	1,000
0,45	0,567	0,432	0,694	1,000	0,940	1,000
0,5	0,467	0,337	0,600	1,000	0,940	1,000
0,55	0,433	0,306	0,568	1,000	0,940	1,000
0,6	0,400	0,276	0,535	1,000	0,940	1,000
0,65	0,333	0,217	0,467	1,000	0,940	1,000
0,7	0,317	0,203	0,450	1,000	0,940	1,000
0,75	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000
0,8	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000

Linearität

Die Linearität des QFN SARS-ELISA wurde nachgewiesen. Hierzu wurden 11 Plasmapools mit bekannten IFN- γ -Konzentrationen jeweils in Fünffachbestimmungen in zufälliger Anordnung auf der ELISA-Platte untersucht. Die Regressionsgerade hat eine Steigung von $1,002 \pm 0,011$ und einen Korrelationskoeffizienten von 0,99 (Abbildung 3).

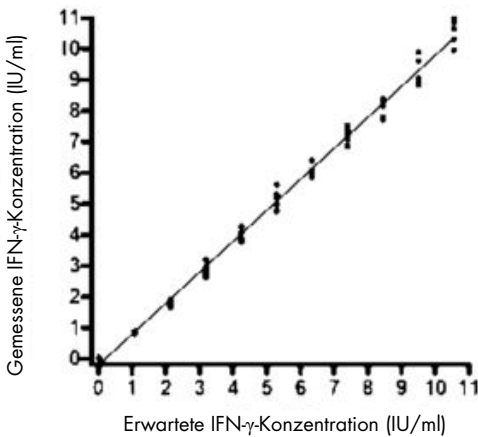


Abbildung 3. Darstellung der Ergebnisse der Regressionsanalyse der Linearitätsstudie

Reproduzierbarkeit

Zur Beurteilung der Leistung des QFN SARS-Assays über verschiedene Labors und Bediener hinweg wurde eine Reproduzierbarkeitsstudie unter Teilnahme mehrerer Labors durchgeführt. Die Studie wurde in drei Labors von QIAGEN durchgeführt. Aufgenommen in die Studie wurden insgesamt 3 Studienteilnehmer mit dem Status SARS-CoV-2-reaktiv und 3 Studienteilnehmer mit dem Status SARS-CoV-2-nichtreaktiv (jeweils ermittelt per RT-PCR-Test oder serologischen Test).

Von jedem Studienteilnehmer wurde Blut in vier (4) Lithiumheparin-Blutentnahmeröhrchen entnommen. Anschließend wurden die Lithiumheparin-Blutentnahmeröhrchen an eines der Testlabors geschickt. Dieses aliquotierte das Blut in 3 Sätze QFN SARS Blood Collection Tubes (QFN SARS Ag1, Ag2, Mitogen und Nil). Jedes der teilnehmenden Testlabors erhielt dann einen Satz dieser QFN SARS Blood Collection Tubes (BCTs) zur Untersuchung gemäß dem QFN SARS-Assayverfahren. Die Proben der einzelnen Studienteilnehmer wurden in jedem Labor in Zehnfachbestimmung untersucht (5 Bestimmungen für Ag1 und 5 Bestimmungen für Ag2). In jedem Labor führte ein Bediener den QFN SARS-Test unabhängig durch. Jeder Bediener war gegenüber den Ergebnissen der anderen Bediener verblindet, ebenso wie gegenüber den Ergebnissen der Studienteilnehmer aus den RT-PCR- oder serologischen Tests.

In jedem der drei (3) Testlabors wurden 30 Ergebnisse erzielt, was insgesamt 90 Datenpunkte ergab. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6. Zusammenfassung der Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie – N = 30 Patientenproben

Labor 1 – 1 Bediener	Labor 2 – 1 Bediener	Labor 3 – 1 Bediener
25/30 = 83 %	30/30 = 100 %	30/30 = 100 %
Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse	Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse	Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse

Die prozentuale Gesamtübereinstimmung für alle reaktiven und nichtreaktiven Proben mit den erwarteten qualitativen Ergebnissen (reaktives Ergebnis für reaktiven Teilnehmer bzw. nichtreaktives Ergebnis für nichtreaktiven Teilnehmer, gemäß Ergebnis der Referenzmethode des jeweiligen Teilnehmers) betrug für alle drei (3) Labors 94,4 % (85/90).

Inter-Chargen-Präzision

Zur Bestimmung der Inter-Chargen-Variabilität der QFN SARS Blood Collection Tubes wurde eine Studie durchgeführt, bei der die Proben von insgesamt 2 Studienteilnehmern mit Status SARS-CoV-2-reaktiv und 3 Studienteilnehmern mit Status SARS-CoV-2-nichtreaktiv (jeweils ermittelt per RT-PCR-Test oder mit einem serologischen Test) untersucht wurden. Die Studie umfasste je 3 verschiedene Chargen der Ag1- und Ag2-Röhrchen der QFN SARS Blood Collection Tubes. Pro Spender und Charge der Blutentnahmeröhrchen wurden Fünffachbestimmungen durchgeführt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Inter-Chargen-Präzision ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7. Zusammenfassung der Ergebnisse der Inter-Chargen-Präzisionsstudie – prozentuale Gesamtübereinstimmung der QFN SARS Ag1 und Ag2 Blood Collection Tubes; N = 25

QFN SARS BCT	BCT-Chargennummer	Anzahl der übereinstimmenden qualitativen Bestimmungen/ Gesamtbestimmungen	Anteil	Untere Konfidenzgrenze	Obere Konfidenzgrenze
Ag1	1	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	2	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	3	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
Ag2	1	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	2	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %
	3	25/25	100,00 %	86,28 %	100,00 %

Die prozentuale Gesamtübereinstimmung für alle reaktiven und nichtreaktiven Proben mit den erwarteten Ergebnissen (reaktives Ergebnis für reaktiven Teilnehmer bzw. nichtreaktives Ergebnis für nichtreaktiven Teilnehmer, gemäß Ergebnis der Referenzmethode des jeweiligen Teilnehmers) betrug für alle drei (3) Chargen der QFN SARS Ag1 und Ag2 Blood Collection Tubes 100 %.

Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB)

Für den QFN SARS-Assay wurde die Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB) bestimmt, Jeweils zwei (2) Bestimmungen von vierzehn (14) einzelnen normalen Humanplasmaproben (als Leerwerte) wurden mit zwei (2) Chargen des QFN SARS ELISA von drei (3) Bedienern an drei (3) Untersuchungstagen getestet, wobei ein (1) Bediener pro Untersuchungstag für insgesamt 84 Bestimmungen aus jeder ELISA-Kit-Charge zuständig war.

Die LoB-Werte (IE/ml) für die zwei (2) Chargen des ELISA-Kits wurden getrennt berechnet, wie der Tabelle 8 zu entnehmen ist.

Tabelle 8. LoB-Werte (IE/ml) für die zwei (2) Chargen des QFN SARS-ELISA-Kits

QFN SARS-ELISA-Kit	LoB, geschätzt (IE/ml)
Kit 1	0,030
Kit 2	0,040

Der höhere LoB-Wert für die beiden Chargen des QFN SARS-ELISA-Kits, 0,040 IE/ml, wurde als der endgültige LoB-Wert angegeben.

Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD)

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) für den QFN SARS-Assay wurde Ein Humanplasmapool wurde durch die Kombination von vierzehn (14) einzelnen Plasmaproben erstellt. Jeder der drei (3) Bediener bereitete einen IFN- γ Referenzstandard vor, der mit 1,0 IU/ml in Puffer verdünnt war. In Plasma wurde eine Verdünnungsreihe mit acht (8) Konzentrationen hergestellt. Die Studie wurde über drei (3) Tage und mit drei (3) unterschiedlichen Bedienern unter Verwendung von zwei (2) Chargen des QFN SARS-ELISA-Kits durchgeführt. An jedem Untersuchungstag wurden fünf (5) Bestimmungen pro Konzentration innerhalb jedes Satzes der seriellen Verdünnungsreihen durchgeführt, sodass insgesamt 45 Bestimmungen pro Verdünnung der IFN- γ -Konzentration für jede Charge des QFN SARS-ELISA-Kits durchgeführt wurden.

Der LoD-Wert für jede getestete Charge des QFN SARS-ELISA-Kits wurde getrennt berechnet, wie der Tabelle 9 zu entnehmen ist. Die Nachweisgrenze wurde mit einem Probit-Regressionsmodell geschätzt. Für die Nachweisgrenze wurde die geschätzte Konzentration (IE/ml) herangezogen, für die eine 95%ige Wahrscheinlichkeit für eine Trefferquote von mehr als 0,04 IE/ml (bestimmt durch den LoB-Wert) angenommen wurde.

Tabelle 9. Geschätzte LoD-Werte (IE/ml) für die zwei (2) Chargen des QFN SARS-ELISA-Kits

QFN SARS-ELISA-Kit	Wahrscheinlichkeit	Konzentration, geschätzt (IE/ml)	Untere 95%-Konfidenzgrenze der Schätzung	Obere 95%-Konfidenzgrenze der Schätzung
Kit 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Kit 2	0,95	0,065	0,060	0,073

Der höhere LoD-Wert für die beiden Chargen des QFN SARS-ELISA-Kits, 0,065 IE/ml, wurde als der endgültige LoD-Wert angegeben.

Störsubstanzen

Zur Ermittlung der Effekte potenzieller Störsubstanzen auf die Leistung des QFN SARS-ELISA beim Nachweis von IFN- γ . wurde eine Studie mit den folgenden Störsubstanzen durchgeführt: Triglycerid (gesamt), Hämoglobin, Protein (Gesamtserum), Bilirubin (konjugiert), Bilirubin (unkonjugiert), Abacavir (als Sulfat), Ciclosporin und Prednisolon. Insgesamt fünf (5) Plasmapools mit bekannten IFN- γ -Konzentrationen wurden mit Störsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen vorbereitet. Die IFN- γ -Konzentration des Basispools wurde zuvor mit einer bekannten Menge an IFN- γ (ca. 0,21, 0,45 und 1,4 IE/ml) vorbereitet. Dieser Pool wurde anschließend zur Vorbereitung der Pools mit den Störsubstanzen verwendet. Es wurden fünf verschiedene Konzentrationen von Störsubstanzen getestet, die auf Referenzintervallen, pathologischen Spiegeln, therapeutischen Bereichen und toxischen Bereichen bzw. auf den Empfehlungen des Anbieters oder allgemeinen klinischen Werten basieren. Für jeden Konzentrationslevel der Störsubstanz wurden sechs (6) Bestimmungen durchgeführt.

Für jede Probenkonzentration wurde ein T-Test durchgeführt, der den Unterschied des mittleren \log_{10} (IE/ml) des hohen Interferenzlevels (10) mit der Kontrolle (Level ohne Störsubstanz) verglich. Der geschätzte Unterschied bei dem Mittelwert der Reaktion sowie die entsprechenden zweiseitigen 95%-Konfidenzgrenzen und der p-Wert sind in der Tabelle angegeben.

Tabelle 10. Log10 IE/ml: Tabellarische Übersicht des t-Tests zu den Unterschieden zwischen den Mittelwerten der Kontrolle und dem hohen Interferenzlevel, für jede Störsubstanz und jeden IFN- γ -Konzentrationslevel

Störsubstanz	Interferenzlevel	Probenkonzentration (IE/ml)	Mittelwert-differenz	Unteres 95%-KI	Oberes 95%-KI	p-Wert
Triglyceride	Hoch	1,4	0,053	-0,004	0,110	0,063
		0,45	0,039	-0,021	0,058	< 0,001
		0,21	0,034	-0,002	0,071	0,061
Hämoglobin	Hoch	1,4	-0,001	-0,042	0,040	0,967
		0,45	0,016	-0,007	0,040	0,152
		0,21	0,014	-0,030	0,059	0,489
Protein	Hoch	1,4	-0,030	-0,071	0,011	0,136
		0,45	0,000	-0,046	0,046	0,992
		0,21	-0,045	-0,103	0,012	0,109
Bilirubin, konjugiert	Hoch	1,4	0,001	-0,046	0,048	0,961
		0,45	0,012	-0,043	0,067	0,639
		0,21	0,015	-0,044	0,074	0,586
Unkonjugiertes Bilirubin	Hoch	1,4	0,015	-0,011	0,042	0,231
		0,45	0,015	-0,023	0,052	0,411
		0,21	0,012	-0,033	0,057	0,566
Abacavir	Hoch	1,4	0,013	-0,015	0,040	0,322
		0,45	0,015	-0,014	0,044	0,283
		0,21	0,008	-0,034	0,050	0,677

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 10. Log₁₀ IE/ml: Tabellarische Übersicht des t-Tests zu den Unterschieden zwischen den Mittelwerten der Kontrolle und dem hohen Interferenzlevel, für jede Störsubstanz und jeden IFN- γ -Konzentrationslevel

Störsubstanz	Interferenzlevel	Probenkonzentration (IE/ml)	Mittelwertdifferenz	Unteres 95%-KI	Oberes 95%-KI	p-Wert
Ciclosporin	Hoch	1,4	0,002	-0,019	0,024	0,816
		0,45	0,007	-0,030	0,043	0,682
		0,21	0,015	-0,007	0,038	0,155
Prednisolon	Hoch	1,4	0,007	-0,016	0,030	0,518
		0,45	-0,001	-0,034	0,033	0,964
		0,21	0,021	-0,025	0,068	0,334

Die Ergebnisse zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der höchsten getesteten Störsubstanzkonzentration und der Kontrolle (Level ohne Störsubstanz), mit Ausnahme der Triglycerid-Konzentration von 0,45 IE/ml. Die mittlere Differenz für diesen Wert wurde als innerhalb von ± 2 Standardabweichungen vom Mittelwert der Kontrolle ermittelt. Dies belegt, dass die beobachtete Differenz innerhalb der erwarteten Variabilität des Assays liegt und Triglyceride bei klinisch relevanten Spiegeln voraussichtlich keinen störenden Einfluss auf den QFN SARS-ELISA haben.

Klinische Leistungsmerkmale

Die klinischen Leistungsmerkmale des QFN SARS-Assays wurden in einer prospektiven Beobachtungsstudie im Zeitraum von Juni bis Oktober 2021 untersucht. Alle Studienteilnehmer hatten eine Vorgeschichte ohne SARS-CoV-2-Infektion und zudem entweder eine COVID-19-Impfung erhalten (mit einem Vakzin gegen das virale S-Protein von SARS-CoV-2) oder keine COVID-19-Impfung erhalten.

Nach Unterzeichnung der Einwilligungserklärung wurden die Teilnehmer hinsichtlich der Ein- und Ausschlusskriterien für die Studie beurteilt. In die Studie aufgenommen wurden nur Teilnehmer, auf die alle Einschluss-, aber keine der Ausschlusskriterien zutrafen. Diesen wurde Blut für den QFN SARS-Assay entnommen.

Die Studienpopulation kann wie folgt zusammengefasst werden:

- Gruppe 1: Teilnehmer ohne eine natürliche SARS-CoV-2-Infektion in der Vorgeschichte, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme für den QFN SARS-Assay keine COVID-19-Impfung erhalten hatten, niemals positiv auf SARS-CoV-2 getestet wurde, ein nichtreaktives serologisches Testergebnis vorgelegt hatten und im Zeitraum von 4 Wochen vor Studienaufnahme keine Anzeichen oder Symptome für COVID-19 aufwiesen.
- Gruppe 2: Teilnehmer ohne eine SARS-CoV-2-Infektion in der Vorgeschichte, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme für den QFN SARS-Assay eine COVID-19-Impfung mit einem Vakzin gegen das S-Protein von SARS-CoV-2 erhalten hatten und niemals positiv auf SARS-CoV-2 getestet wurde.
- Während der Studienteilnahme erhielt keiner der Teilnehmer ein Organ- oder Zelltransplantat und/oder eine Krebstherapie.

In die Gruppe 1 wurden insgesamt 218 Teilnehmer und in die Gruppe 2 wurden 171 Teilnehmer eingeschlossen. Nach der Blutentnahme für den QFN SARS-Assay wurde die Studieneignung für 4 Teilnehmer der Gruppe 1 widerrufen, nachdem bei der Probe für den serologischen Test, die bei dem Termin zur Blutentnahme für den QFN SARS-Assay entnommen wurde, ein reaktives Ergebnis erzielt wurde. Diese Teilnehmer wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die Proben wurden entnommen, die QFN SARS-Blutentnahmeröhrchen wurden verarbeitet und das Plasma wurde bei ≤ -20 °C gelagert, bis es für den Test mit dem QFN SARS-ELISA bereit war. Alle Läufe mit den QFN SARS-ELISA-Platten waren gültig und es gab keine unbestimmten Ergebnisse. Damit lagen 214 und 171 auswertbare Proben für Gruppe 1 bzw. Gruppe 2 vor.

Demografische Daten

Die Anzahl der in den jeweiligen Ländern entnommenen Proben und der prozentuale Anteil in jeder Studiengruppe sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11. Übersicht über die Länder der Probenentnahme

Land der Probenentnahme	Gruppe 1		Gruppe 2	
	N	%	N	%
Niederlande	214	100,00 %	153	89,47 %
USA	0	0,00 %	18	10,53 %

Eine Übersicht über das Alter der Studienteilnehmer (mit Mittel-, Median-, Mindest- und Maximalwert des Alters) und der Standardabweichung (Standard Deviation, SD) für das Alter wird in Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12. Übersicht über das Alter der Studienteilnehmer (Jahre)

N	Mittelwert	Median	SD	Minimum	Maximum
385	40,47	37,00	14,168	18,00	80,00

Eine Übersicht über die Geschlechter der Studienteilnehmer ist in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13. Übersicht über die Geschlechter der Studienteilnehmer

Geschlecht	N	%
Weiblich	234	60,78 %
Männlich	151	39,22 %

Spezifität

Die klinische Übereinstimmung beim Vergleich der Ergebnisse des QFN SARS-Assays mit denen der Referenzmethoden wird in Tabelle 14 gezeigt.

Tabelle 14. Klinische Übereinstimmung: QFN SARS-Ergebnis vs. Referenzmethode

		Ergebnis der Referenzmethode		
		Gruppe 1 (ohne Impfung, ohne Infektion)	Gruppe 2 (mit Impfung, ohne Infektion)	Gesamt
QFN SARS-Ergebnis	Nichtreaktiv	199	34	233
	Reaktiv	15	137	152
Gesamt		214	171	385

Bei den ungeimpften Teilnehmern (Gruppe 1) wurden 199 von 214 mit dem QFN SARS-Assay als nichtreaktiv getestet, während die verbleibenden 15 Teilnehmer als reaktiv getestet wurden. Bei den geimpften Teilnehmern (Gruppe 2) wurden 137 von 171 mit dem QFN SARS-Assay als reaktiv getestet, während die verbleibenden 34 Teilnehmer als nichtreaktiv getestet wurden. Keine der abweichenden Proben (15 in Gruppe 1 und 34 in Gruppe 2) wurden zusätzlich mit einer weiteren Methode getestet.

Die prozentuale negative Übereinstimmung (Spezifität) für die ungeimpften Studienteilnehmer (Gruppe 1) wurde zusammen mit dem exakten zweiseitigen 95%-Konfidenzintervall (KI) berechnet und ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15. Prozentuale negative Übereinstimmung (Spezifität)

Gruppe-Nr.	Proz. neg. Übereinstimmung (Spezifität)	95%-KI
Gruppe 1 (ohne Impfung, ohne Infektion)	92,99 % (199/214)	88,70–96,02 %

Sensitivität

Die prozentuale positive Übereinstimmung (Sensitivität) für die geimpften Studienteilnehmer (Gruppe 2) wurde zusammen mit dem exakten zweiseitigen 95%-Konfidenzintervall berechnet und ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16. Prozentuale positive Übereinstimmung (Sensitivität)

Gruppe-Nr.	Proz. pos. Übereinstimmung (Sensitivität)	95%-KI
Gruppe 2 (mit Impfung, ohne Infektion)	80,12 % (137/171)	73,34–85,82 %

Prozentuale positive Übereinstimmung nach Alter

Für die geimpften Studienteilnehmer (Gruppe 2) wurde die prozentuale positive Übereinstimmung nach Alter stratifiziert (< 60 und ≥ 60 Jahre) und in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17. Prozentuale positive Übereinstimmung nach Alter (< 60 Jahre und ≥ 60 Jahre)

Altersbereich (Jahre)	Proz. pos. Übereinstimmung (Sensitivität)	95%-KI
< 60	85,33 % (128/150)	78,78–90,64 %
≥ 60	42,86 % (9/21)	21,82–65,98 %

Prozentuale positive Übereinstimmung nach COVID-19-Vakzin

Für die geimpften Studienteilnehmer (Gruppe 2) wurde die prozentuale positive Übereinstimmung nach dem erhaltenen COVID-19-Vakzin stratifiziert und in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18. Prozentuale positive Übereinstimmung nach COVID-19-Vakzin

Vakzin	Proz. pos. Übereinstimmung (Sensitivität)	95%-KI
Astra Zeneca	62,50 % (5/8)	24,49–91,48 %
Janssen (Johnson & Johnson)	86,67 % (13/15)	59,54–98,34 %
Moderna	77,27 % (17/22)	54,63–92,18 %
Pfizer/BioNTech	80,95 % (102/126)	73,00–87,40 %

Faktoren im Zusammenhang mit nichtreaktiven Ergebnissen bei geimpften Studienteilnehmern

Um mögliche Zusammenhänge zwischen steigendem Alter, Zeit seit Abschluss der COVID-19-Impfung, dem erhaltenen Vakzin bzw. dem Geschlecht und nichtreaktiven Ergebnissen bei geimpften Studienteilnehmern (Gruppe 2) festzustellen, wurde eine univariate logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen den einzelnen Faktoren und den nichtreaktiven Ergebnissen wurde als Odds-Ratio (OR) berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19. Zusammenhang zwischen Faktoren und nichtreaktiven Ergebnissen bei geimpften Studienteilnehmern

Faktor		OR (95%-KI)	p-Wert
Alter (Jahre)		1,08 (1,05–1,12)	< 0,001
Zeit von Impfung bis Blutentnahme für QFN SARS-Assay (Tage)		1,02 (1,01–1,03)	< 0,001
Vakzin	Pfizer/BioNTech	1	–
	Astra Zeneca	2,55 (0,57–11,42)	0,221
	Janssen (Johnson & Johnson)	0,65 (0,14–3,09)	0,592
	Moderna	1,25 (0,42–3,72)	0,689
Geschlecht	Weiblich	1	–
	Männlich	1,25 (0,59–2,65)	0,565

Die einzigen Faktoren, für die ein signifikanter Zusammenhang mit nichtreaktiven Ergebnissen bei geimpften Studienteilnehmern hergestellt werden konnte, waren das Alter und die Zeit seit der Impfung.

Da die Studie jedoch in Ländern durchgeführt wurde, in denen die COVID-19-Vakzine zuerst älteren Menschen bereitgestellt wurden, kann sich das Alter auf den Zusammenhang zwischen der Zeit seit der Impfung und nichtreaktiven Ergebnissen ausgewirkt haben. Tabelle 20 zeigt die Regressionsanalyse mit dem Alter als einer Kovariate.

Tabelle 20. Zusammenhang zwischen bestimmten Faktoren und nichtreaktiven Ereignissen, kontrolliert nach Alter

Faktor	OR (95%-KI)	p-Wert
Alter (Jahre)	1,07 (1,03–1,11)	< 0,001
Zeit von Impfung bis Blutentnahme für QFN SARS-Assay (Tage)	1,01 (1,00–1,02)	0,214

Bei der Kontrolle des Alters ist der Zusammenhang zwischen der Zeit seit der Impfung und nichtreaktiven Ergebnissen nicht länger signifikant. Der Zusammenhang mit dem Alter blieb jedoch weiterhin signifikant.

Referenzen

1. Goletti D., Petrone L, Manissero D, Bertoletti A, Rao S, Ndunda N, et al. The potential clinical utility of measuring SARS-CoV-2-specific T-cell responses. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 Jul [cited 2021 Jul 13];0(0). Available from: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X21003785/fulltext>
2. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Najafi Fard S, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect*. 2021
3. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Gualano G, Vittozzi P, et al. Coinfection of tuberculosis and COVID-19 limits the ability to in vitro respond to SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis*. 2021
4. Shrotri M., van Schalkwyk MCI, Post N, Eddy D, Huntley C, Leeman D, et al. T cell response to SARS-Cov-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS ONE*. 2021
5. Alessandra D’Abramo, Serena Vita, Gaetano Maffongelli, Andrea Mariano , Chiara Agrati , Concetta Castilletti ,Delia Goletti, Giuseppe Ippolito, Emanuele Nicastrì SC-19 CIT. Prolonged and severe SARS-CoV-2 infection inpatients under B-cell-depleting drug successfully treated: A tailored approach. *Int J Infect Dis*. 2021;(107):247–50
6. Soresina A, Moratto D, Chiarini M, Paolillo C, Baresi G, Focà E, et al. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020
7. Quinti I, Lougaris V, Milito C, Cinetto F, Pecoraro A, Mezzaroma I, et al. A possible role for B cells in COVID-19? Lesson from patients with agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*. 2020

8. Geers D, Shamier MC, Bogers S, den Hartog G, Gommers L, Nieuwkoop NN, et al. SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. *SciImmunol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Jun 30];6(59). Available from: <http://immunology.sciencemag.org/>
9. Alter G, Yu J, Liu J, Chandrashekar A, Borducchi EN, Tostanoski LH, McMahan K, Jacob-Dolan C, Martinez DR, Chang A, Anioke T, Lifton M, Nkolola J, Stephenson KE, Atyeo C, Shin S, Fields P, Kaplan I, Robins H, Amanat F, Krammer F, Baric RS, Le Gars M, Sado BD. Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans. *Nature*. 2021
10. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Feb 5 [cited 2021 Jun 30];371(6529). Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
11. Chavarot N, Ouedrani A, Marion O, Leruez-Ville M, Villain E, Baaziz M, et al. Poor Anti-SARS-CoV-2 Humoral and T-cell Responses After 2 Injections of mRNA Vaccine in Kidney Transplant Recipients Treated with Belatacept. *Transplantation* [Internet]. 2021 Apr 8 [cited 2021 Jul 1];2. Available from: https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/9000/Poor_Anti_SARS_CoV_2_Humoral_and_T_cell_Responses.95281.aspx
12. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020
13. Alberto M, Borobia, Antonio J Carcas, Mayte Pérez-Olmeda, Luis Castaño, María Jesús Bertran, Javier García-Pérez, Magdalena Campins, Antonio Portolés, María González-Pérez, María Teresa García Morales, Eunat Arana-Arri, Marta Aldea, Francisco Díez-Fuerte CSG. Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S

-
- primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2021
14. Mónica Martínez-Gallo, Juliana Esperalba-Esquerra, Ricardo Pujol-Borrell, Víctor Sandá, Iria Arrese-Muñoz, Candela Fernández Naval, Andrés Antón Pagarolas, Victoria Cardona, Moisés Labrador-Horrillo, Tomás Pumarola-Suñé MH-G. T-cell responses as a correlate of COVID-19 vaccination. A pilot study in Health Care Workers
15. Van Praet JT, Vandecasteele S, De Roo A, De Vriese AS, Reynders M. Humoral and cellular immunogenicity of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in nursing home residents. *Clin Infect Dis*. 2021
16. Pedersen RM, Tornby DS, Bistrup C, Johansen IS, Andersen TE JU. Negative SARS-CoV-2 antibodies, T cell response and virus neutralization following full vaccination in a renal transplant recipient: a call for vigilance. *Clin Microbiol Infect*. 2021
17. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020
18. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020
19. Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep*. 2021
20. Aiello A, Najafi Fard S, Petruccioli E, Petrone L, Vanini V, Farroni C, et al. Spike is the most recognized antigen in the whole-blood platform in both acute and convalescent COVID-19 patients. *Int J Infect Dis*. 2021

-
21. Soumya Jaganathan, Francis Stieber, Sonia N. Rao, Vladyslav Nikolayevskyy, Nadia Allen, Jeff Boyle JH. Preliminary Evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 and QIArearch Anti-SARS-CoV-2 Total Test in Recently Vaccinated Individuals. 2021
 22. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular and Molecular Immunology*. 2020
 23. Aid M, Busman-Sahay K, Vidal SJ, Maliga Z, Bondoc S, Starke C, et al. Vascular Disease and Thrombosis in SARS-CoV-2-Infected Rhesus Macaques. *Cell*. 2020
 24. Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, Rosenfeld AM, Ittner CAG, Weisman AR, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol*. 2020
 25. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020
 26. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020
 27. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol*. 2020
 28. Sattler A, Angermair S, Stockmann H, Heim KM, Khadzhynov D, Treskatsch S, et al. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J Clin Invest*. 2020
 29. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Greenplate AR, Wu JE, Alanio C, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals patient heterogeneity and distinct immunotypes with implications for therapeutic interventions. *bioRxiv Prepr Serv Biol*. 2020

-
30. Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020
31. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020
32. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 2020
33. Ryu MR, Park MS, Cho EH, Jung CW, Kim K, Kim SJ, et al. Comparative evaluation of quantiFERON-TB gold in-tube and quantiFERON-TB gold plus in diagnosis of latent tuberculosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Jul 1];56(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30135226/>
34. Petruccioli E, Vanini V, Chiacchio T, Cuzzi G, Cirillo DM, Palmieri F, et al. Analytical evaluation of QuantiFERON- Plus and QuantiFERON- Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis*. 2017

Hilfe zur Fehlerbehebung

In dem vorliegenden Abschnitt „Hilfe zur Fehlerbehebung“ finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite „Häufig gestellte Fragen“ (Frequently Asked Questions, FAQ) unseres technischen Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Darüber hinaus stehen die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beim Technischen Service von QIAGEN Ihnen stets unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zu den Informationen und/oder Protokollen in diesem Handbuch oder den für die Proben und Assays verwendeten Methoden haben sollten (Kontaktinformationen siehe unter www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Fehlerbehebung beim ELISA

Nicht-spezifische Farbentwicklung

- | | |
|--------------------------------------|---|
| a) Platte unzureichend gewaschen | Waschen Sie die Platte mindestens 6-mal mit 400 µl Waschpuffer pro Well. Je nach verwendetem Waschgerät können mehr als 6 Waschzyklen erforderlich sein. Der Waschpuffer muss in jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken können. |
| b) Kreuzkontamination der ELISA-Well | Achten Sie zur Risikominimierung darauf, die Proben vorsichtig zu pipettieren und zu mischen. |
| c) Kit/Komponenten abgelaufen | Vergewissern Sie sich, dass das Verfallsdatum des Kits nicht abgelaufen ist. Achten Sie darauf, dass Standard und 100x Konjugatkonzentrat nur innerhalb von 3 Monaten nach der Rekonstitution verwendet werden. |
| d) Enzymsubstratlösung verunreinigt | Verwerfen Sie die Substratlösung, wenn sie blau gefärbt ist. Stellen Sie sicher, dass die verwendeten Reagenzbehälter sauber sind. |

Kommentare und Vorschläge

- e) Mischen des Plasmas in den QFN SARS Blood Collection Tubes vor Entnahme
- Vermeiden Sie nach der Zentrifugation unbedingt ein Auf- und Abpipettieren oder Mischen des Plasmas vor der Entnahme. Achten Sie stets darauf, das Material an der Geloberfläche nicht zu verwirbeln.

Niedrige OD-Messwerte für die Standards

- a) Fehler beim Verdünnen der Standards
- Stellen Sie sicher, dass die Verdünnungen des Kit-Standards wie in dieser Gebrauchsanweisung angegeben hergestellt werden.
- b) Pipettierfehler
- Stellen Sie sicher, dass die Pipetten gemäß den Herstellerempfehlungen kalibriert und verwendet werden.
- c) Inkubationstemperatur zu niedrig
- Die Inkubation des ELISA muss bei Raumtemperatur ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) durchgeführt werden.
- d) Inkubationszeit zu kurz
- Die Inkubation der Platte mit Konjugat, Standards und Proben muss für 120 ± 5 Minuten erfolgen. Die Enzymsubstratlösung sollte 30 Minuten lang auf der Platte inkubiert werden.
- e) Falscher Filter im Platten-Reader verwendet
- Die Platte muss bei 450 nm gemessen werden, mit einem Referenzfilter von 620 bis 650 nm.
- f) Reagenzien zu kalt
- Alle Reagenzien, mit Ausnahme des 100x Konjugatkonzentrats, müssen vor Durchführung des Assays auf Raumtemperatur gebracht werden. Dies dauert etwa 1 Stunde.
- g) Kit/Komponenten abgelaufen
- Vergewissern Sie sich, dass das Verfallsdatum des Kits nicht abgelaufen ist. Achten Sie darauf, dass Standard und 100x Konjugatkonzentrat nur innerhalb von 3 Monaten nach der Rekonstitution verwendet werden.

Kommentare und Vorschläge

Hoher Hintergrund




- a) Platte unzureichend gewaschen
Waschen Sie die Platte mindestens 6-mal mit 400 µl Waschpuffer pro Well. Möglicherweise sind mehr als 6 Waschzyklen erforderlich. Der Waschpuffer muss in jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken können.
- b) Inkubationstemperatur zu hoch
Die Inkubation des ELISA muss bei Raumtemperatur ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) durchgeführt werden.
- c) Kit/Komponenten abgelaufen
Vergewissern Sie sich, dass das Kit vor Ablauf des Verfallsdatums verwendet wird. Achten Sie darauf, dass Standard und 100x Konjugatkonzentrat nur innerhalb von 3 Monaten nach der Rekonstitution verwendet werden.
- d) Enzymsubstratlösung verunreinigt
Verwerfen Sie die Substratlösung, wenn sie blau gefärbt ist. Stellen Sie sicher, dass die verwendeten Reagenzbehälter sauber sind.





Nicht lineare Standardkurve und Variabilität bei Doppelbestimmungen

- a) Platte unzureichend gewaschen
Waschen Sie die Platte mindestens 6-mal mit 400 µl Waschpuffer pro Well. Möglicherweise sind mehr als 6 Waschzyklen erforderlich. Der Waschpuffer muss in jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken können.
- b) Fehler beim Verdünnen der Standards
Stellen Sie sicher, dass die Verdünnungen des Standards wie in dieser Gebrauchsanweisung angegeben hergestellt werden.
- c) Unzureichendes Mischen
Mischen Sie die Reagenzien gründlich durch Überkopfdrehen oder vorsichtiges Mischen mit dem Vortex-Mischer, bevor sie zur Platte zugegeben werden.
- d) Nicht einheitliche Pipettierung oder Unterbrechung bei der Assay-Konfiguration
Die Zugabe von Proben und Standards muss in einem kontinuierlichen Prozess erfolgen. Alle Reagenzien sollten vor Beginn des Assays vorbereitet werden.

Symbole

Die folgenden Symbole können in der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Kennzeichnung verwendet werden:

Symbol	Bedeutung des Symbols
 Σ <N>	Reagenzien ausreichend für <N> Reaktionen
	Verfallsdatum
IVD	In-vitro-Diagnostikum
REF	Katalognummer
LOT	Chargennummer
MAT	Materialnummer (Kennzeichnung von Komponenten)
COMP	Komponenten
CONT	Enthält
NUM	Anzahl
GTIN	Internationale Artikelnummer
EC REP	Bevollmächtigter
R_n	R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer
	Zulässiger Temperaturbereich

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Hersteller
	Gebrauchsanweisung beachten
	Vor Sonneneinstrahlung schützen
	Warnung/Vorsicht

Kontakt

Technische Hinweise und weitere Informationen finden Sie in unserem technischen Support-Center unter **www.qiagen.com/Support**. Telefonisch erreichen Sie uns unter der Rufnummer 00800-22-44-6000, oder wenden Sie sich an eine der technischen Serviceabteilungen von QIAGEN oder an örtliche Händler (siehe hintere Umschlagseite oder www.qiagen.com).

Anhang A: Technische Informationen

Unbestimmte Ergebnisse

Unbestimmte Ergebnisse sind selten und können auf den Immunstatus des untersuchten Patienten zurückzuführen sein; sie können aber auch mit verschiedenen technischen Faktoren zusammenhängen (z. B. unsachgemäße Handhabung/Lagerung der Blutentnahmeröhrchen, unzureichendes Waschen der ELISA-Platte), wenn die oben angegebenen Gebrauchsanweisungen nicht befolgt werden.

Falls technische Probleme bei der Lagerung der Reagenzien, der Blutentnahme oder der Handhabung der Blutproben vermutet werden, muss der gesamte QFN SARS-Test mit neuen Blutproben wiederholt werden. Falls ein unzureichendes Waschen oder andere Verfahrensabweichungen bei der Durchführung des ELISA-Tests vermutet werden, kann der ELISA-Test mit den stimulierten Plasmaproben wiederholt werden. Es steht dem untersuchenden Arzt frei, eine neue Blutprobe abzunehmen oder andere als geeignet erachtete Verfahren anzuwenden.

Geronnene Plasmaproben

Wenn bei der Langzeiltlagerung von Plasmaproben Fibringerinnsel auftreten, zentrifugieren Sie die Proben, damit sich das geronnene Material absetzt und das Plasma abpipettiert werden kann.

Lipämische Plasmaproben

Gehen Sie beim Abpipettieren von lipämischen Proben mit Vorsicht vor, da Fettablagerungen die Pipettenspitzen verstopfen können.

Anhang B: Kurzanleitung zum ELISA-Test

1. Alle Komponenten des ELISA, mit Ausnahme des 100x Konjugatkonzentrats, mindestens 60 Minuten lang auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen.



2. Den Kit-Standard mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf 8,0 IE/ml rekonstituieren. Vier (4) Standardverdünnungen herstellen.



3. Das gefriergetrocknete 100x Konjugatkonzentrat mit entionisiertem oder destilliertem Wasser rekonstituieren.

4. Gebrauchsfertig verdünntes Konjugat mit Hilfe von grüner Verdünnungslösung herstellen und 50 µl in jedes Well geben.



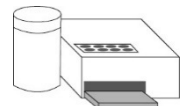
5. 50 µl der zu testenden Plasmaproben und 50 µl der Standards in die entsprechenden Wells geben. Auf dem Schüttler mischen.



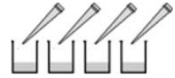
6. 120 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.



7. Die Wells mindestens 6-mal mit 400 µl Waschpuffer pro Well waschen.



8. Je 100 μ l Enzymsubstratlösung in die Wells geben. Auf dem Schüttler mischen.



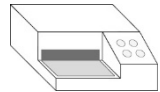
9. 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.



10. 50 μ l Enzymstopplösung in jedes Well geben. Auf dem Schüttler mischen.



11. Ergebnisse bei 450 nm mit einem Referenzfilter zwischen 620 und 650 nm ablesen.



12. Ergebnisse auswerten.



Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit	2-Platten-ELISA-Kit	626420
Zugehörige Produkte		
QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes	200 Röhrchen (je 50 Nil, Ag1, Ag2 und Mitogen)	626725

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit-Handbuch oder Benutzerhandbuch. QIAGEN Kit-Handbücher und Benutzerhandbücher sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Bearbeitungshistorie des Dokuments

Datum	Beschreibung
R1, Oktober 2021	Erstversion
R2, November 2021	Aktualisierte Abschnitte „Leistungsmerkmale“ und „Klinische Leistungsmerkmale“
R3, April 2022	Aktualisierter Abschnitt „Analytische Leistungsmerkmale“ für Störsubstanzen

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für QuantiFERON® SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit

Mit der Verwendung dieses Produkts erkennen Käufer oder Benutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Panel mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Panels gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Panels gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Benutzern für andere QIAGEN Benutzer zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückerfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Panel und/oder seinen Komponenten entstehen. Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group), ProClin®, Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

04-22 1124420 © 2022 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

