

Aus dem Institut für Experimentelle Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Serologische Längsschnittstudie von SARS-CoV-2 positiven Personen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Paul Joris Lange

aus Berlin

Magdeburg, Januar 2022

Bibliographische Beschreibung:

Lange, Paul Joris:

Serologische Längsschnittstudie von SARS-CoV-2 positiven Personen. - 2021. - 43 Bl., 20 Abb., 1 Anl.

Kurzreferat

In der Arbeit wurde die humorale Immunantwort des Menschen auf SARS-CoV-2 untersucht. Die Serumproben, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden klinisch und infektionsserologisch charakterisiert. Vier kommerzielle Assays wurden für die Bestimmung von Antikörpern gegen SARS-CoV-2 und weitere Coronaviren verwendet. Die Untersuchung der Antikörper Titer von SARS-CoV-2 positiven Personen zeigte signifikante Unterschiede je nach Schweregrad der Coronavirus-Erkrankung (COVID-19). In der Gruppe moderat bis schwer erkrankter Patienten fanden sich mehr neutralisierende Antikörper als in der asymptomatisch und leicht erkrankten Gruppe. Die Untersuchung der Patientenproben mit einem Peptid Microarray führte zur Identifizierung von immundominanten Epitopen. Die identifizierten Peptidsequenzen wurden mit den homologen Peptidsequenzen weiterer auf dem Peptid Microarray erfassten Coronaviren verglichen und auf kreuzreaktive Antikörper untersucht. Auf dem S und N Protein wurden Epitope identifiziert, die ausdrücklich Antikörperreaktivität für SARS-CoV-2 zeigten. Diese können für die Entwicklung eines Peptid-ELISA verwendet werden.

Schlüsselwörter

COVID-19, SARS-CoV-2, Antikörper, Peptid Microarray, Diagnostik

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	3
EINFÜHRUNG	4
1.1 Corona Pandemie	4
1.2 Humanpathogene Coronaviren	4
1.3 Aufbau und Invasionsverhalten von SARS-CoV-2.....	5
1.4 Spezifische Immunantwort auf die Virusinfektion	6
1.5 Erkrankungsverlauf von COVID-19.....	7
1.6 Nachweismethoden einer Infektion mit SARS-CoV-2.....	8
1.7 Epitopkartierung von SARS-CoV-2.....	9
1.8 Zielsetzung der Dissertation	10
MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Rekrutierung der Probanden	10
2.2 Auswahlkriterien für die Epitopkartierung.....	11
2.3 Probenlogistik und Sammlung.....	11
2.4 Probandenbefragung	12
2.5 Schweregrad Einteilung innerhalb der Studie.....	12
2.6 Verwendete ELISA	14
2.7 SARS-CoV-2-NeutraLISA	15
2.8 Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac-ELISA (IgG)	15
2.9 Elecsys Anti-SARS-CoV-2	16
2.10 Peptide Microarray	17

2.11 EUROLINE Anti-SARS-CoV-2-Profil (IgG) Immunblot.....	17
2.12 Zusammenfassung der verwendeten kommerziellen Assays	19
2.13 Polymerase Kettenreaktion	19
2.14 Statistische Analyse.....	20
2.15 Ethikvotum	20
ERGEBNISSE	20
3.1 Infektionsserologische Charakterisierung von SARS-CoV-2 Antikörpern in unterschiedlichen ELISA Systemen	20
3.2 Epitopkartierung mit dem Peptid Microarray	26
3.3 Prüfung der immundominanten Epitopsequenzen auf Kreuzreaktivität	28
DISKUSSION.....	33
4.1 Der Schweregrad der Erkrankung nach Infektion mit SARS-CoV-2 beeinflusst die Anzahl und Qualität der nachweisbaren Antikörper gegen SARS-CoV-2.....	33
4.2 Genesene mit asymptomatischen und leichten COVID-19 Verläufen sind nicht ausreichend gegen eine erneute Erkrankung geschützt.....	34
4.3 Das Immunsystem von Erkrankten reagiert bezüglich der humoralen Immunantwort individuell auf SARS-CoV-2	35
ZUSAMMENFASSUNG.....	37
LITERATURVERZEICHNIS	38
ANHANG	43
Danksagung	43
Veröffentlichung und Vorträge.....	43
Förderung.....	43
Ehrenerklärung	44
Darstellung des Bildungsweges	46

Abkürzungsverzeichnis

ACE2. Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
ARDS. Akutes Respiratorisches Distress Syndrom
Assay_NAK. SARS-CoV-2-NeutralISA
CDC. Centers for Disease Control
CorSurV. Coronavirus-Surveillanceverordnung
COVID-19. Coronavirus-Krankheit-2019
Ct-Wert. Cycle threshold-Wert
ELISA. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISA_E. Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac-ELISA (IgG)
ELISA_R. Elecsys Anti-SARS-CoV-2
E-protein. Envelope-protein
HCoV-229E. Humanes Coronavirus 229E
HCoV-HKU1. Humanes Coronavirus HKU1
HCoV-NL63. Humanes Coronavirus NL63
HCoV-OC43. Humanes Coronavirus OC43
HEK293. Humane embryonale Nieren 293-Zellen
IgA. Immunglobulin A
IgG. Immunglobulin G
IgM. Immunglobulin M
IH. Inhibition
MERS-CoV. Middle East respiratory syndrome-related coronavirus
M-Protein. Membrane-protein
N-Protein. Nucleocapsid-protein
nsp. Nichtstrukturprotein
RT-PCR. Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SARS. Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom
SARS-CoV-1. Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 1
SARS-CoV-2. Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2
S-Protein. Spike-Protein
STIKO. Ständige Impfkommission
TMPRSS2. Transmembrane serine protease 2
TNR. True Negative Rate
TPR. True Positive Rate

Einführung

1.1 Corona Pandemie

Im Dezember 2019 sind in der Stadt Wuhan in China Lungenentzündungen ohne erkennbare Ursache aufgetreten. Der Augenarzt Dr. Li Wenliang informierte Ende Dezember 2019 seine Kollegen über Patienten, im Zentral-Krankenhaus in Wuhan, die Symptome ähnlich einer Erkrankung mit dem SARS-Virus aufwiesen. Drei Wochen später starb Dr. Li Wenliang an den Folgen von COVID-19 (Green, 2020). Bereits am 27.01.2020 erkrankte die erste Person in Deutschland an COVID-19. Kurze Zeit später, am 10.03.2020 sind die ersten Patienten in Deutschland durch COVID-19 gestorben (Rothe et al., 2020). Am 11.03.2020 ruft die Weltgesundheitsorganisation die Pandemie aus (WHO, 2020). Zum Zeitpunkt der Finalisierung dieser Arbeit sind laut dem interaktiven Dashboard von Dong et al. (2020) am 12.12.2021, 6.53 Millionen Infektionen in Deutschland gemeldet und 106.000 Menschen an den Folgen der Erkrankung mit COVID-19 gestorben. Im Vergleich dazu sind weltweit über 206 Millionen SARS-CoV-2 Infektionen gemeldet und 4,34 Millionen Menschen an der Erkrankung gestorben.

1.2 Humanpathogene Coronaviren

Vermutet wird, dass SARS-CoV-2 von Coronaviren mit Erregerreservoir in Fledermäusen abstammt. Infolge des Antigendrift entwickelte das Virus die notwendigen Strukturen für Infektionen menschlicher Zellen (Andersen et al., 2020). Vermutet wird eine klassische Zoonose. Diese Annahme begründet sich aus der strukturellen Ähnlichkeit von Coronaviren, die aus Fledermäusen der Gattung Hufeisennase isoliert wurden, aber noch deutliche Unterschiede des Spike-Protein (S-Protein) für die Bindung an den Angiotensin-konvertierendes Enzym 2-Rezeptor (ACE2-Rezeptor) menschlicher Zellen aufweisen (Zhou et al., 2020). Das Spike Gen aus Proben einer Virusvariante von Pangolinen ist nahezu identisch zum Spike Gen von SARS-CoV-2 und zeigt, dass Coronaviren, die in Tieren vorkommen, die notwendige genetische Variabilität für die Infektion menschlicher Zellen besitzen (Touati et al., 2020). Dieses „Überspringen“ der Barriere eines zoonotischen Regelkreislaufs stellt die Menschheit bei steigender Weltbevölkerung vor große Herausforderungen. Coronaviren, die beim Menschen Erkrankungen hervorrufen, gibt es schon vor SARS-CoV-2. 2002 führt SARS-CoV-1 in Südostasien zum Ausbruch der SARS Krankheit (Peiris et al., 2003). 2012 führt MERS-CoV, eine Virusvariante, die auf der arabischen Halbinsel aufgetreten ist, zu neuen SARS Fällen (Kim et al., 2017). Ein MERS-CoV Ausbruch im Jahr 2012 führte zu einer Sterblichkeitsrate von bis zu 38,7%, wobei der

erneute Ausbruch 2015 in Südkorea lediglich in 19,9% der Fälle zum Tod führte (Kim et al., 2017). Eine Infektion durch ein Coronavirus verläuft nicht immer schwerwiegend. Die Rhinitis acuta, auch umgangssprachlich „Schnupfen“, wird auch durch Coronaviren (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, und HCoV-HKU1) ausgelöst. Die meisten Menschen machen eine solche Infektion im Laufe ihres Lebens durch. Insgesamt kennen wir bis jetzt 7 humanpathogene Coronaviren (Paules et al., 2020).

1.3 Aufbau und Invasionsverhalten von SARS-CoV-2

Fehr und Perlman (2015) beschreiben in wissenschaftlichen Untersuchungen die Struktur von SARS-CoV-1 und MERS-CoV, analog dazu beschreibt Li et al. (2020) den Aufbau von SARS-CoV-2 wie folgt: Das behüllte SARS-CoV-2 gehört zu der Gattung der Beta Coronaviren. Die genetische Information dieser Viren ist als einzelsträngige und positiv orientierte RNA gespeichert. 10 offene Leserahmen (ORF) liefern den Bauplan für die typischen Proteine des Virus. 16 Proteine bilden den Replikase-Transkriptase-Komplex. In der Literatur sind diese Proteine als *non-structural proteins* bekannt und abgekürzt (nsp1-nsp16). Das Virus setzt sich aus 4 Struktur Proteinen zusammen (Abbildung 1). Das S-Protein, für die Namensgebung des Virus verantwortlich, dient als Bindungsstelle für das ACE2 Membranprotein auf der Zelloberfläche menschlicher Zellen. Die Interaktion des S-Proteins mit dem ACE2-Rezeptor wurde bereits bei SARS-CoV-1 beschrieben (Li et al., 2003). In Folge einer Proteolyse durch die *Transmembrane Serin Protease 2* (TMPRSS2) wird das S-Protein so verändert, dass das Virus die Zellmembran penetrieren kann (Bestle et al., 2020). TMPRSS2 und ACE2 sind Membranproteine, die in Zellen verschiedener Organe des Menschen zu finden sind. Die Schädigung dieser Organe korreliert mit den durch SARS-CoV-2 verursachten Symptomen. Die Membranproteine sind in Lunge, Herz, Darm, Niere, Leber, Ösophagus, Gehirn, Gallenblase, Hoden, Nase, Brust, Pankreas und Schilddrüse exprimiert (Hamming et al., 2004). Die drei weiteren Strukturproteine sind das *envelope-protein* (E-protein), das *nucleocapsid-protein* (N-Protein) und das *membrane-protein* (M-Protein) (Yao et al., 2020).

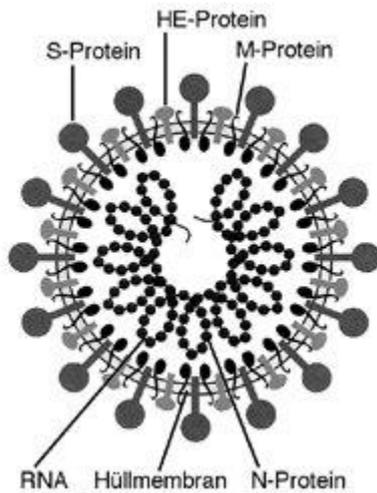


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Coronavirus (Lexikon der Biologie: Coronaviren, 1999).

1.4 Spezifische Immunantwort auf die Virusinfektion

Im Blut eines Patienten lassen sich Antikörper, die von B-Lymphozyten gebildet werden, nachweisen. Antikörper sind Proteine, die von Plasmazellen produziert werden und im Rahmen der Immunabwehr spezifische Antigene binden. Die Interaktion von antigenspezifischen T-Zellen und B-Zellen über den MHC-2-Rezeptor und Kostimulation über CD40 bildet die Grundlage für die Differenzierung einer Plasmazelle. Die Auswirkung dieser Beziehung ist bei der Immunreaktion gegen SARS-CoV-2 anhand der Korrelation von S-Protein spezifischen CD4+ T-Zellen mit Serum IgG und IgA Titern gegen das S-Protein zu erkennen (Grifoni et al., 2020). Damit T-Helfer Zellen und B-Zellen miteinander interagieren können, müssen sie zuvor aktiviert werden. T-Zellen können durch den MHC-Rezeptor auf körpereigenen Zellen aktiviert werden, deshalb wird eine naive T-Zelle durch die Antigenpräsentation einer Antigen-präsentierenden Zelle aktiviert. Die dendritischen Zellen scheinen bei der Immunreaktion gegen SARS-CoV-2 beeinträchtigt zu sein, was einen negativen Effekt auf die T-Zell Immunreaktion hat (Zhou et al., 2020). B-Zellen können entweder selber Antigene erkennen oder durch Antigen präsentierende Zellen aktiviert werden. Die B-Zellen und die T-Zellen, die für dasselbe Antigen spezifisch sind, bilden ein Keimzentrum. Nach der Reifung im Keimzentrum entstehen aus B-Lymphozyten Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Die Antikörper sind sowohl gegen lineare Epitope als auch Konformationsepitope gerichtet (Gressner & Arndt, 2019). Zunächst wird IgM produziert und kann somit als Hinweis auf eine frische Infektion genutzt werden (Gressner & Arndt, 2019). Nach dem Klassenswitch (IgM zu IgG) lässt sich der Zeitpunkt der Infektion nicht mehr genau nachvollziehen (Gressner & Arndt, 2019). Grundlegend kann man zur Diagnostik von COVID-19 Antikörper der IgA, IgM und IgG Typen nachweisen (Abbildung

2). Neben der humoralen Immunantwort reagiert das Immunsystem auf SARS-CoV-2 mit einer zellulären Immunantwort. SARS-CoV-2 spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen können bei COVID-19 Patienten nachgewiesen werden. Die CD4+ T-Zell Antwort ist überwiegend gegen das S-Protein, N-Protein und M-Protein gerichtet, CD8+ T-Zellen reagieren primär auf das S-Protein und M-Protein (Grifoni et al., 2020).

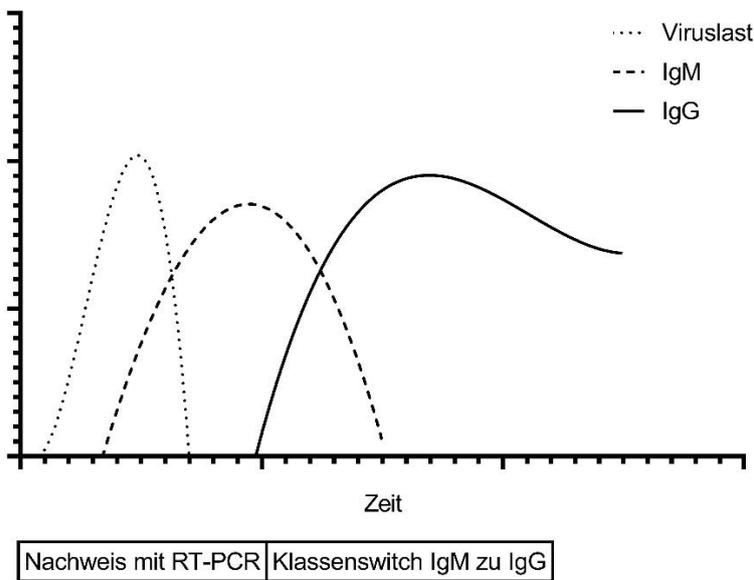


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Nachweiswahrscheinlichkeit der Immunglobulinklassen über die Zeit (skizziert mit GraphPad Prism 9). Die in dieser Abbildung gezeigten Kurven sind aus dem Grundwissen über die Immunreaktion abstrahiert, unter der Annahme, dass ein direkter Erregernachweis in der frühen Infektionsphase gelingt. Die Dynamik der tatsächlich nachweisbaren Antikörper und Viruslast unterscheidet sich zwischen Individuen und Art der Infektion.

1.5 Erkrankungsverlauf von COVID-19

In der Anfangsphase von COVID-19 vermehrt sich das Virus in den Zellen der Atemwege und schädigt dabei die infizierten Zellen (Xu et al., 2020). Das Immunsystem reagiert auf die Infektion und dieser Prozess löst eine Entzündungsreaktion aus. Husten und Halsschmerzen sind häufige Symptome dieser oftmals begrenzten Entzündungsreaktion. Wenn die Entzündungsreaktion jedoch überschießt kann die Erkrankung schwer verlaufen. Dyspnoe und Fieber sind Symptome, die aufgrund der ausgedehnten Schädigung des Lungenepithels und der systemischen Entzündungsreaktion entstehen und auf einen schweren Verlauf hinweisen können (Ruan et al., 2020). Die klinische Klassifikation der Schweregrade von COVID-19 wird mit zunehmendem Wissen über die Erkrankung regelmäßig überarbeitet. In der letzten Fassung der Richtlinien bezüglich der klinischen Klassifikation von COVID-19, verfasst von der Weltgesundheitsorganisation, ist die Erkrankung in die Stadien mild, moderat, schwer und kritisch eingeteilt (WHO, 2021). Bei

einer milden Infektion zeigen sich die typischen Symptome von COVID-19: Fieber, Husten, Abgeschlagenheit, Muskelschmerzen, Halsschmerzen, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Anosmie und Ageusie. Eine moderate Erkrankung ist durch klinische Symptome einer Pneumonie definiert. Dazu gehören Dyspnoe, erhöhte Atemfrequenz, Fieber und eine reduzierte Sauerstoffsättigung. Fällt die Sauerstoffsättigung unter 90% und liegen Symptome einer COVID-19 Pneumonie vor, wird die Erkrankung als schwer definiert. Ein kritischer Erkrankungsgrad ist erreicht, wenn der Patient ein Akutes Respiratorisches Distress Syndrom (ARDS) entwickelt.

1.6 Nachweismethoden einer Infektion mit SARS-CoV-2

Liegt der vermutete Infektionszeitpunkt mit SARS-CoV-2 nur wenige Tage zurück, ist der direkte Virusnachweis mit der Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) der Goldstandard (Lauer et al., 2020). Seit Beginn der Pandemie sind in Deutschland über 80 Millionen PCR Untersuchungen durchgeführt worden (Robert Koch-Institut, 2021a). Im Rahmen der humoralen Immunantwort bildet der Körper Antikörper gegen Antigene des Virus. Diese Antikörper sind mit einem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in Serumproben der Patienten nachweisbar (Abbildung 3). In der Akutdiagnostik spielt der Nachweis von Antikörpern gegen SARS-CoV-2 keine Rolle. Im Rahmen der Impfkampagne ist der Antikörperstatus hinsichtlich der Qualität der gebildeten Antikörper zur Ermittlung des Impfstatus von großer Bedeutung. Zahlreiche Hersteller haben daher sowohl qualitative als auch quantitative Nachweisverfahren etabliert, um die Entwicklung der humoralen Immunantwort vom Beginn der Infektion verfolgen zu können (Shuren & Stenzel, 2021). Derzeit ist es noch weitgehend unklar, warum Infektionen ohne Erkrankungszeichen ablaufen und warum Patienten milde, moderate, schwere und kritische Verläufe der Erkrankung aufweisen. Ein potenziell den Schweregrad bestimmender Faktor, ist die aufgenommene Virusmenge (van Damme et al., 2021). Möglicherweise spielt der stattgefundene Kontakt mit anderen Coronaviren ebenfalls eine Rolle (Ladner et al., 2021).

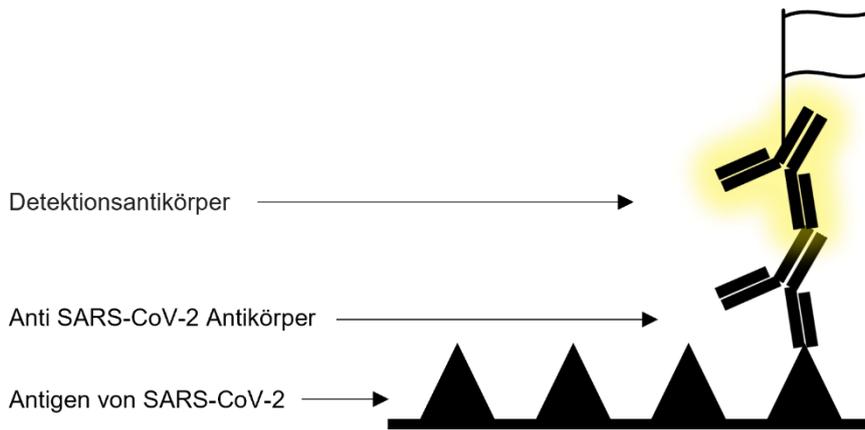


Abbildung 3: Typischer Aufbau eines ELISA-Verfahrens

1.7 Epitopkartierung von SARS-CoV-2

Die Literatur zeigt, dass viele Arbeiten die humorale Immunantwort auf SARS-CoV-2 untersuchen (Siracusano et al., 2020). Anfangs wurden für die meisten dieser Untersuchungen rekombinante Proteine von SARS-CoV-2 als Antigen für den Nachweis von Antikörpern gegen SARS-CoV-2 verwendet. Verschiedenen Epitope können mit einem Peptid Microarray identifiziert werden (Abbildung 4). Jedoch waren in der Anfangsphase der Pandemie Untersuchungen bezüglich der genauen Antikörperbindungsstellen selten. Nachdem die Ergebnisse der Epitopkartierung aus dieser Arbeit veröffentlicht wurden, sind zwei Publikationen zu dem Thema erschienen (Amrun et al., 2020, Poh et al., 2020). Weitere Arbeiten wurden zum Zeitpunkt der Finalisierung der Dissertation ebenfalls publiziert (Wang et al., 2020, Farrera-Soler et al., 2020, Heidepriem et al., 2021). Der Nachweis von Antikörpern gegen spezifische Epitope besitzt somit Potenzial, das Verständnis der humoralen Immunantwort verschiedener Erkrankungen zu verbessern (Andresen & Grotzinger, 2009).

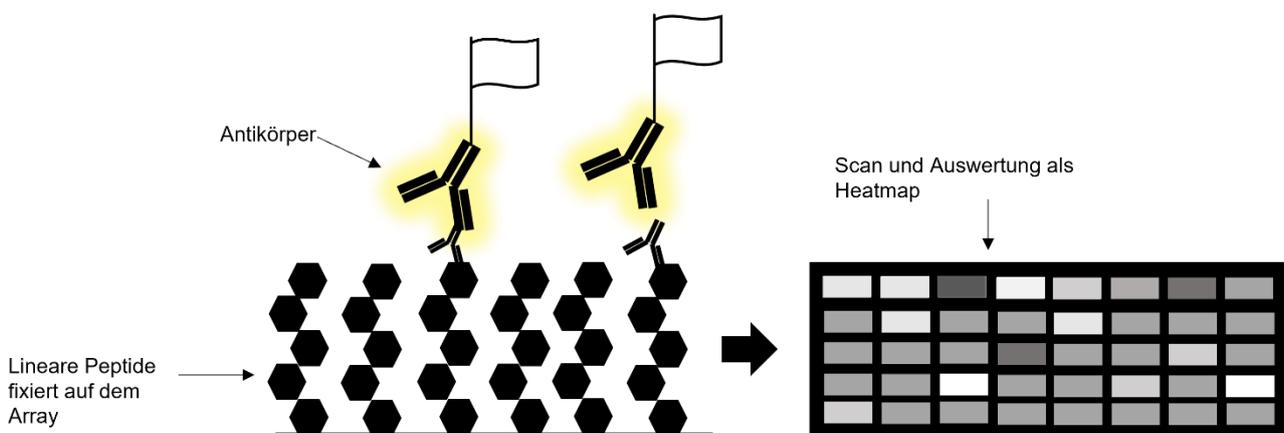


Abbildung 4: Prinzipien eines Peptid Microarray

1.8 Zielsetzung der Dissertation

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Immunantwort des Menschen gegen Coronaviren, insbesondere SARS-CoV-2 im Verlauf einer Infektion im Detail mit unterschiedlichen serologischen Methoden zu analysieren und mit der Ausprägung der Erkrankungen zu korrelieren. Die Studie wurde so angelegt, dass für weitere Versuchsansätze ein Untersuchungskollektiv klinisch und infektionsserologisch charakterisierter Proben zur Verfügung steht. Für unsere Forschergruppe aber auch für *in vitro* Diagnostika Hersteller sollte die Basis geschaffen werden, neue Testsysteme zu entwickeln und unter standardisierten Rahmenbedingungen zu validieren. Aus der Problemstellung wurden die folgenden Hypothesen abgeleitet.

1. Der Schweregrad der Erkrankung nach Infektion mit SARS-CoV-2 beeinflusst die Anzahl und Qualität der nachweisbaren Antikörper gegen SARS-CoV-2
2. Genesene mit asymptomatischen und leichten COVID-19 Verläufen sind nicht ausreichend gegen eine erneute Erkrankung geschützt
3. Das Immunsystem von Erkrankten reagiert bezüglich der humoralen Immunantwort individuell auf SARS-CoV-2
4. Die Nachweismethode mittels Peptid Microarray ist gegenüber herkömmlicher serologischer Verfahren geeignet, die Individualität der Immunantwort auf SARS-CoV-2 darzustellen

Material und Methoden

2.1 Rekrutierung der Probanden

Es wurden 165 Probanden in die Studie eingeschlossen (Abbildung 5). Voraussetzung für die Teilnahme war neben der unterschriebenen Einwilligungserklärung, der klinische Verdacht auf eine Infektion mit SARS-CoV-2. Patienten mit schwerer Form von COVID-19 wurden auf der Intensivstation im AMEOS Klinikum Bernburg identifiziert und in die Studie aufgenommen. Probanden mit leichter und milder Symptomatik konnten in den Fieber- und Testzentren, die in Kooperation mit den Gesundheitsämtern des Landkreis Börde, Landkreis Salzland, Landkreis Harz und der KH-Labor geführt, rekrutiert und untersucht werden. Ausschlusskriterien waren: Primäre Immundefekte, schwere Leber- oder Nierenerkrankungen, Probanden, die immunmodulierende Medikamente einnehmen, Schwangere und Personen, die an einer onkologischen Erkrankung leiden. Um

sicherzustellen, dass die Probanden an COVID-19 erkrankt waren, wurden die Resultate der RT-PCR, die klinische Diagnose und die Informationen des standardisierten Anamnesebogens berücksichtigt.

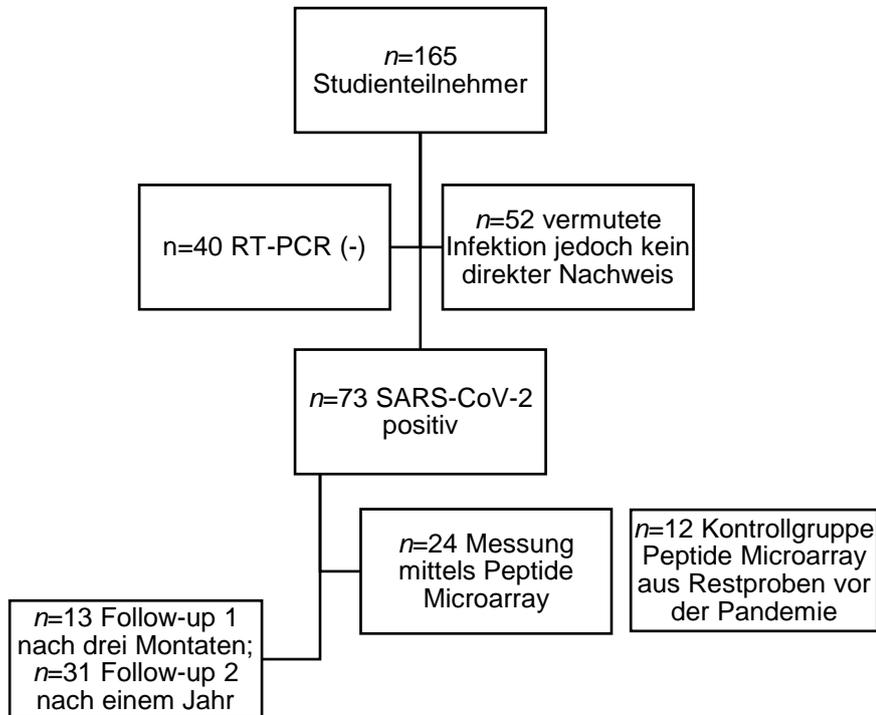


Abbildung 5: Selektionsprozess der Studienteilnehmer

2.2 Auswahlkriterien für die Epitopkartierung

Für die umfangreiche Epitopkartierung von 5512 Peptiden des gesamten Proteoms von SARS-CoV-2 und des S, N, E, und M Proteins der Coronaviren: SARS-CoV-1, MERS-CoV, HCoV-229, HCoV-OC43 standen nur begrenzt finanzielle Mittel im Rahmen des Projektes zu Verfügung. Daher mussten aus der Gesamtheit der 73 SARS-CoV-2 positiven Proben, 24 Patientenproben ausgewählt werden. Die 24 ($n = 13$ weiblich, $n = 11$ männlich) Patienten wurden ausgewählt, um das Spektrum der Schweregrade repräsentativ abzudecken. Die serologischen und klinischen Parameter wurden tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 2). Eine Kontrollgruppe ($n = 12$) wurde mitgeführt. Die Untersuchungsmaterialien entstammten der Biobank des Zentrallabors, die vor der Pandemie gesammelt wurden.

2.3 Probenlogistik und Sammlung

Nach dem Einschluss der Patienten in die Studie wurde das Blut durch eine venöse Blutabnahme oder aus einem peripheren venösen Katheter entnommen. Das Blut wurde in 6 S-Monovetten, Serum-Gel mit 4,9 ml Volumen abgenommen. Das gewonnene Blut war ungekühlt bis zu 48 Stunden stabil. Das Material wurde mindestens für eine Viertel Stunde

koaguliert und dann durch einen Zentrifugationsschritt getrennt. Um mit dem Material mehrere Messreihen durchzuführen, stellte das Labor mehrere Aliquots her. Diese Aliquots wurden bei -80 °C aufbewahrt. Das Untersuchungsmaterial für den direkten Erregernachweis wurde entsprechend der Vorschrift des Centers for Disease Control (CDC) gesammelt. Proben wurden aus den oberen Atemwegen entnommen. Die Abstrichentnahme erfolgte als tiefer Nasen- und Rachenabstrich mit dem Abstrich- und Transportsystem, Universal Transport Medium (UTM®) der Firma Copan. Das gewonnene Material wurde gekühlt gelagert und binnen 48 Stunden getestet (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b).

2.4 Probandenbefragung

Die Befragung erfolgte strukturiert anhand eines Fragebogens. Der Fragebogen beinhaltete die folgenden Abschnitte: Infektionszeitpunkt, Symptome, Hospitalisierung, Vorerkrankungen, Medikamente/Noxen, Patientenumfeld und körperliche Untersuchung. Für die Ermittlung des Infektionszeitpunkts wurden die Patienten nach Ort und Zeit der vermuteten Infektion befragt. Außerdem wurde der Zeitpunkt des Symptombeginns und die Dauer der bestehenden Symptome erfragt. Folgende Symptome wurden ermittelt: Fieber, Husten, Schnupfen, Abgeschlagenheit, Gliederschmerzen, Durchfall, Erbrechen, Kopfschmerzen, Halsschmerzen, Luftnot und Ausfall von Geruch oder Geschmack. Im Anamnesegespräch wurde expliziert nach folgenden Vorerkrankungen gefragt: Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit, Herzleiden, Lungenerkrankungen, Lebererkrankungen, Rheuma, Krebs, Diabetes, Nierenleiden, Infektanfälligkeit (häufige Infektionen), Asthma und Allergien. In der Untersuchung wurde bei Patienten mit Verdacht auf einen moderaten und schweren Verlauf die Sauerstoffsättigung mit einem Pulsoximeter gemessen. Durchschnittlich dauerte die Anamneseerhebung 20 Minuten. Wenn ein Patient aufgrund der Infektion stationär aufgenommen wurde, wurde zusätzlich der Arztbrief für die Auswertung hinzugezogen. Zum Zeitpunkt der zweiten Blutabnahme wurde eine zweite Befragung durchgeführt.

2.5 Schweregrad Einteilung innerhalb der Studie

Der Schweregrad der Infektion wurde in asymptomatisch, leicht (Schnupfen), moderat (Dyspnoe, Symptome wie bei einer Grippe) und schwer (Sauerstofftherapie, Akutes Respiratorisches Distress Syndrom, ARDS) eingeteilt (Tabelle 1). Die Einteilung weicht von der heutigen Definition der WHO Richtlinie ab. Asymptomatische Patienten zeigten keine Symptome wurden jedoch mit der RT-PCR positiv auf SARS-CoV-2 getestet. Patienten mit

leichten Symptomen zeigten Symptome von COVID-19, aber keine Anzeichen auf Luftnot oder einer Infektion der tiefen Atemwege. Patienten die Luftnot angegeben und Fieber hatten, wurden der Gruppe moderat zugeteilt. Alle Patienten die aufgrund von COVID-19 stationär aufgenommen wurden, wurden der Gruppe schwer zugeteilt. Als Kontrollgruppe dienten Restproben aus dem Labor, diese Proben wurden vor der Pandemie gesammelt.

Tabelle 1: Übersicht und Angaben zur Patientenkohorte

Abnahmephase	Zeitpunkt 0	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2
Patientenanzahl, davon RT-PCR (+) (%)	165, 44,24 %	13, 100 %	31, 100 %
Probenentnahme nach Infektion, Tage	$M=34,76$, $SD=16,20$	$M=94,17$, $SD=28,79$	$M=335,71$, $SD=20,49$
Geschlecht, w/m	89 w, 76 m	8 w, 5 m	17 w, 14 m
Alter, Jahren	$M=50,21$, $SD=14,64$	$M=52,16$, $SD=12,78$	$M=49,08$, $SD=14,55$
Verlauf, asymptomatisch	12	1	5
Verlauf, leicht	35	5	17
Verlauf, mild	12	2	3
Verlauf, schwer	14	5	6

M: Mittelwert, SD: Standardabweichung

Tabelle 2: Übersicht und Angaben der ausgewählten Proben für die Epitopkartierung

Geschlecht w/m	13 w, 11 m
Alter, Jahren	$M=55$, $SD=11$
Probenentnahme nach Infektion, Tage	$M=27$, $SD=12$
Verlauf, asymptomatisch	2
Verlauf, leicht	12
Verlauf, mild	2
Verlauf, schwer	8

M: Mittelwert, SD: Standardabweichung

2.6 Verwendete ELISA

Zu Beginn der Pandemie erfolgte die Messung der Antikörper gegen das S-Protein mittels qualitativem Euroimmun anti-SARS-CoV-2-S1-IgG ELISA. Das Antigen für diesen ELISA war ein rekombinantes Spike (S1) Protein von SARS-CoV-2, welches auf HEK293 Zellen exprimiert wird. Als Bindungsnachweis diente ein Enzym-markierter IgG Antikörper. Dies war zu diesem Zeitpunkt der einzige kommerziell verfügbare Assay. Mit dem Erscheinen quantitativer ELISA-Methoden (SARS-CoV-2-NeutralISA, Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac-ELISA (IgG) und Elecsys® Anti-SARS-CoV-2) wurden diese ELISA für die Analyse der Proben verwendet. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Die verwendeten ELISA sind in Tabelle 3 zusammengefasst, die Informationen bezüglich der Hersteller der Testsysteme sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten ELISA

Test-Eigenschaften		
ELISA	Antigen	Leistungsmerkmale
Euroimmun anti-SARS-CoV-2-S1-IgG ELISA EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck	Rekombinante S1-Domäne des Spike Proteins	Nachweis spezifischer Antikörper [> 10 Tage nach Symptombeginn oder PCR (+)]: Sensitivität = 94,4%; Spezifität = 99,6%
SARS-CoV-2-NeutralISA EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck	S1-/RBD-Domäne des Spike-Proteins; humane ACE2 liegt als Konzentrat in Lösung vor	Nachweis neutralisierender Antikörper [> 14 Tage nach Symptombeginn oder PCR (+)]: Sensitivität = 95,9% und Spezifität = 99,7%
Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac-ELISA (IgG) EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck	Rekombinante S1-Domäne des Spike Proteins	Nachweis spezifischer Antikörper [> 21 Tage nach Symptombeginn oder PCR (+)]: Sensitivität = 93,2%; Spezifität = 99,8%
Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim	RBD-Antigen	Sensitivität = 99,96%, Spezifität = 98,80%

S1: S-Protein Untereinheit 1, S2: S-Protein Untereinheit 2, RBD: Receptor Binding Domain, NP: Nucleocapsid-protein.

2.7 SARS-CoV-2-NeutralISA

Mit diesem ELISA wurden semiquantitativ neutralisierende Antikörper gegen die RBD-Domäne des Spike-Proteins von SARS-CoV-2 bestimmt. Neutralisierende Antikörper sind hierbei definiert als Antikörper, die an die Rezeptorbindungsdomäne von SARS-CoV-2 S1 binden und somit SARS-CoV-2 daran hindern über den ACE-2 Rezeptor in die Wirtszelle einzudringen. Wenn in der Patientenprobe neutralisierende Antikörper vorhanden waren, konkurrierten diese mit dem hinzugegebenen ACE-2 um die Bindungsstellen in den mit S1-/RBD-Domäne beschichteten Reagenzgefäßen. Die Detektion des gebundenen ACE-2 erfolgte durch Peroxidase-markiertes Streptavidin, welches eine Farbreaktion katalysierte. In Vorbereitung auf einen Testdurchlauf wurde das Patientenserum in einem Verhältnis 1:5 mit dem Probenpuffer verdünnt und mit einem Vortex Mixer durchmischt. Das ACE-2-Konzentrat wurde in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt und der Waschpuffer wurde in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Ein Testdurchlauf bestand aus acht Schritten (Proben Inkubation, Waschen, Konjugat Inkubation, Waschen, Substrat Inkubation, Stoppen und Messen). Entsprechend dem vorgegebenen Pipettierschema wurden 100 µl Probenpuffer, verdünnte Kontrollen und Proben mit einer Mikroliterpipette des Herstellers Eppendorf in die Reagenzgefäße überführt. Die Proben wurden 60 Minuten lang in den Reagenzgefäßen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Reagenzgefäße entleert und dreimal mit 300 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Im dritten Schritt wurde 100 µl Enzymkonjugat hinzugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Waschvorgang wiederholt. Zum Schluss wurden 100 µl Substratlösung in die Reagenzgefäße pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Stopplösung beendet und die fotometrische Auswertung erfolgte innerhalb von 30 Minuten nach dem Stoppen mit Hilfe des Fotometers Infinite 200 PRO der Firma Tecan. Die Auswertung bezieht sich auf den Vergleich zwischen der Extinktion der Blank-Messung (Probenpuffer) und der Extinktion der Patientenproben: $100\% - \text{Extinktion der Patientenprobe} \times 100\% / \text{Extinktion des Blanks} = \% \text{ IH}$. Die Befundinterpretation erfolgte anhand des Schemas: $\% \text{ IH} < 20 = \text{negativ}$; $\% \text{ IH} 20 - 35 = \text{grenzwertig}$; $\% \text{ IH} > 35 = \text{positiv}$.

2.8 Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac-ELISA (IgG)

Für die quantitative Bestimmung der Antikörper im Patientenserum wurde der Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac-ELISA verwendet. Mit diesem Test wurde die Anzahl humaner Antikörper der Immunglobulinklasse IgG bestimmt. Als Antigen dient bei diesem ELISA die rekombinant hergestellte S1-Domäne des Spike-Proteins von SARS-CoV-2. Die beschichteten Reagenzgefäße wurden mit verdünnter Patientenprobe inkubiert, bei

positiven Proben banden spezifische Antikörper an die Antigene. Um diese Reaktion darzustellen, wurde in einem zweiten Schritt ein Enzym markierter Anti-human-IgG hinzugegeben, der als Nachweis eine Farbreaktion katalysierte. Die Proben wurden zunächst im Verhältnis von 1:100 mit dem Probenpuffer verdünnt (10 µl Probe in 1 ml Probenpuffer) und mit einem Vortex Mixer durchmischt. Im ersten Schritt wurden je 100 µl Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrolle und verdünnte Patientenproben nach dem Pipettierschema in die Reagenzgefäße pipettiert. Die Proben wurden 60 Minuten lang in den Reagenzgefäßen bei 37°C inkubiert. Daraufhin folgte das Waschen. Die Reagenzgefäße wurden dreimal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde jeweils 100 µl Enzymkonjugat in die Reagenzgefäße pipettiert. Dieses Gemisch inkubierte für 30 Minuten bei 37°C. Nach dem erneuten Waschen wurde im dritten Schritt 100 µl Substratlösung in die Reagenzgefäße pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurde 100 µl Stopplösung in die Reagenzgefäße pipettiert und innerhalb von 30 Minuten die photometrische Auswertung durchgeführt. Um den Test auszuwerten, wurden zunächst die Extinktionen der 6 Kalibratoren gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen und eine Standardkurve erstellt. Anhand dieser Standardkurve wurden die Konzentrationen in den unbekanntenen Proben ermittelt. Proben unter 25,6 IE/ml wurden als negativ gewertet. Proben zwischen 25,6 und 35,2 IE/ml wurden als grenzwertig bewertet. Proben größer 35,2 IE/ml wurden als positiv bewertet.

2.9 Elecsys Anti-SARS-CoV-2

Der Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Assay funktioniert nach dem Doppel Sandwich Prinzip (Abbildung 6). Im ersten Schritt wurde die Patientenprobe mit ruthenylierten (lumineszierendes Metallchelate) und biotinylierten rekombinanten *Receptor Binding Domain* (RBD)-Antigenen inkubiert. Wenn Antikörper gegen die Antigene vorhanden, bildeten diese

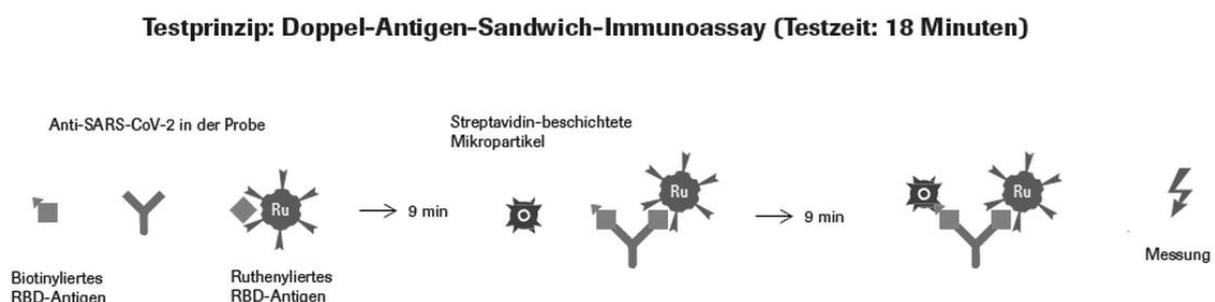


Abbildung 6: Testprinzip des Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (Roche Deutschland Holding GmbH, 2021)

einen Komplex. Im zweiten Schritt wurde der Komplex mit Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln inkubiert. Biotin bindet mit einer hohen Affinität an Streptavidin. Das

Reaktionsgemisch wurde in die Messzelle überführt und magnetisch fixiert. Im dritten Schritt wurden ungebundene Substanzen entfernt und die Messung durch das Anlegen einer Spannung, welche die Chemilumineszenzreaktion erzeugte, durchgeführt. Die Lichtemission wurde gemessen. Interpretiert wurden die Befunde wie folgt: <0.8 U/mL = nicht-reaktiv, ≥ 0.8 U/mL = reaktiv. Die Untersuchung erfolgte auf dem vollautomatisierten System Roche e411 (Firma).

2.10 Peptide Microarray

Die Peptide waren 15 Aminosäuren lang und wurden so angeordnet, dass jeweils 11 Aminosäuren der nächsten Sequenz überlappten. Jedes Peptid wurde dreifach hinterlegt. Aus den Signalintensitäten der dreifach hinterlegten Peptide wurde der Mittelwert ausgewählt, um die Signalintensität der Aminosäuresequenz zu repräsentieren. Der Peptid Microarray wurde mit 1:200 verdünntem Serum mithilfe der HS4800 Microarray Station (Tecan) für 2 Stunden bei 30 °C inkubiert. Diesem Schritt folgte die Inkubation mit 0,1 µg/ml fluoreszenz-markiertem-antihumanem IgG Antikörper. Gescannt wurde das Microarray durch das Auswertungssystem GENE PIX 4300 SL50 der Firma Molecular Devices, San Jose, Kalifornien. Die Signalintensität wurde mit der dazugehörigen Analysesoftware GenePix Pro 7.0 (Molecular Devices, San Jose, Kalifornien) evaluiert. Grafisch und statistisch wurden die Intensitäten mit der Software R (Version 4.0.2. www.r-project.org) ausgewertet. Die Untersuchungen wurden als Auftragsarbeit im Labor der JPT Peptide Technologies (Berlin) durchgeführt.

2.11 EUROLINE Anti-SARS-CoV-2-Profil (IgG) Immunblot

Die Proben aus dem Follow-up 2 wurden mit dem EUROLINE Anti-SARS-CoV-2-Profil (IgG) gemessen, um Antikörper gegen andere humanpathogene Coronaviren, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV-NL63 und HCoV-229E in den Seren nachzuweisen. Der EUROLINE Anti-SARS-CoV-2-Profil (IgG) ist ein Immunblot zur qualitativen Bestimmung von Antikörpern der Immunglobulinklasse IgG gegen Antigene verschiedener Coronaviren. Mit dem Test wurden Antikörper gegen Antigene von SARS-CoV-2 und Antikörper gegen Antigene der humanen Coronaviren HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV-NL63 und HCoV-229E nachgewiesen. Die Antigene sind auf den Teststreifen vorbeschichtet und wurden mit verdünntem Patientenserum bei Raumtemperatur nach der Herstellerrichtlinie inkubiert. Wenn Antikörper gegen die Antigene im Patientenserum vorhanden waren, banden diese IgG Antikörper an die Antigene auf den Teststreifen. Dargestellt wurden die Immunkomplexe mittels enzymmarkiertem Anti-human-IgG durch eine Farbreaktion. Obwohl die Auswertung

auch analog gelingt, wurde hierbei auf die Empfehlung des Herstellers geachtet und das EUROIMMUN-Kamerasystem mit der EUROLIneScan-Software genutzt. In dem Test wurde mit 1:51 (entsprechend 30 µl Probe in 1,5 ml Puffer) verdünnten Patientenproben gearbeitet. Außerdem wurde die Kontrolle, das Enzymkonzentrat und der Universalpuffer vor dem Testbeginn verdünnt. Die anderen Materialien wurden gebrauchsfertig eingesetzt. Durchgeführt wurden acht Arbeitsschritte (Vorbehandeln, Proben Inkubation, Waschen, Konjugat Inkubation, Waschen, Substrat Inkubation, Stoppen und Auswerten). Als Vorbereitung wurden die Teststreifen in mit jeweils 1,5 ml Probenpuffer befüllten Inkubationsrinnen gelegt und dort 15 Minuten auf einem Vertikalschüttler inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den verdünnten Proben, die 30 Minuten auf einem Vertikalschüttler inkubiert wurden. Beim Waschen wurde darauf geachtet, den Vorgang 3 mal 5 Minuten mit dem Universalpuffer zu wiederholen. Das Konjugat wurde danach 30 Minuten auf einem Vertikalschüttler inkubiert. Der nächste Waschschrift erfolgte analog zum Ersten. Zum Schluss erfolgte die Substrat-Inkubation für 10 Minuten auf einem Vertikalschüttler. Gestoppt wurde die Reaktion durch das Spülen mit destilliertem Wasser. Bevor das Kamerasystem die Analyse starten konnte, wurden die Teststreifen auf das Auswertungsprotokoll gelegt und mit Filterpapier getrocknet. Die Auswertung erfolgte anhand von Signalintensitäten, die durch die Software bestimmt wurden. Eine Signalintensität von 0-11 wurde als negativ bewertet. Eine Signalintensität von 12-18 als grenzwertig interpretiert und eine Intensität von > 18 wurde positiv bewertet.

2.12 Zusammenfassung der verwendeten kommerziellen Assays

Tabelle 4: Überblick der verwendeten Assays

Assay	Firma	Abkürzung innerhalb der Arbeit	Verwendungszweck
Euroimmun anti-SARS-CoV-2-S1-IgG ELISA	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG • 23560 Lübeck (Germany) Seekamp 31	-	Erster verfügbarer Test, die ersten Messungen wurden deshalb mit diesem Test durchgeführt.
SARS-CoV-2-NeutralISA	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG •	Assay_NAK	Test für den Nachweis der neutralisierenden Antikörper
Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac-ELISA (IgG)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG •	ELISA_E	Quantitativer Nachweis der Antikörper (IgG)
Elecsys Anti-SARS-CoV-2	Roche Diagnostics Deutschland GmbH Sandhofer Straße 116 68305 Mannheim	ELISA_R	Quantitativer Nachweis der Antikörper (IgG)
EUROLINE Anti-SARS-CoV-2-Profil (IgG) Immunblot	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG •	-	Immunblot zur Bestimmung der Antikörper der Immunglobulinklasse IgG gegen Antigene verschiedener Coronaviren

2.13 Polymerase Kettenreaktion

Da es sich bei SARS-CoV-2 um ein RNA-Virus handelt, wurden zum Nachweis zwei Verfahren kombiniert. Da es sich bei SARS-CoV-2 um ein RNA-Virus handelt, wurden zum Nachweis zwei Verfahren kombiniert. Daraufhin wurde ein Abschnitt der DNA zyklisch vervielfältigt. Da es sich bei SARS-CoV-2 um ein RNA-Virus handelt, wurden zum Nachweis zwei Verfahren kombiniert. Gekennzeichnet wird dies in der Befundung durch den Cycle threshold-Wert (Ct-Wert). Ein hoher Ct-Wert entspricht einer geringen Virusmenge, ein niedriger Ct-Wert einer hohen Virusmenge in der Probe (Singanayagam et al., 2020). Beim Nachweis von SARS-Cov-2 war der Nachweis bis zu einem Ct-Wert von 40 möglich. In jeder Probe wurde bakterielle 16S RNA als Kontrolle amplifiziert. Zum Nachweis von SARS-CoV-2 wurden die spezifischen Genabschnitte 2019-nCoV N1 und N2 amplifiziert. Wenn nach 40 Amplifikationszyklen die spezifischen N1 und N2 Gene nicht parallel amplifiziert werden konnten, wurde das Ergebnis als negativ bewertet. Konnte die 16S-RNA nach 40

Amplifikationszyklen nicht amplifiziert werden, handelte es sich um ein ungünstiges Ergebnis. Wenn nur eines der beiden N-Gene amplifiziert wurde, musste die Probe erneut prozessiert werden. Der Nachweis wurde im Zentrallabor der KH Labor GmbH (Bernburg) mithilfe etablierter Standardmethoden routinemäßig geführt.

2.14 Statistische Analyse

Die Datenanalyse und Auswertung des Peptid Microarray wurde mit der Statistik-Software R (Version 4.0.2. www.r-project.org) durchgeführt. Die ermittelten Signalintensitäten der Gruppen SARS-CoV-2 positiv und SARS-CoV-2 negativ (Kontrolle) wurden mithilfe des Wilcoxon-Rangsummentest verglichen. Für die Berechnung der diagnostischen Genauigkeit wurden zuvor die Schwellenwerte durch eine ROC-Analyse bestimmt, dabei wurde auf eine Balance von Sensitivität (TPR) und Spezifität (TNR) geachtet ($((\text{Sensitivität} + \text{Spezifität})/2)$).

Die Datenanalyse und Auswertung der ELISA wurde mit der Analyse-Software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc.) durchgeführt. Für den Vergleich der unterschiedlichen Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für den Vergleich der gepaarten Stichproben wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet.

2.15 Ethikvotum

Die Arbeit wurde nach der Deklaration von Helsinki - Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen durchgeführt. Der Ethikantrag wurde durch die Ärztekammer Sachsen-Anhalt (Aktenzeichen 64/20) geprüft und bewilligt.

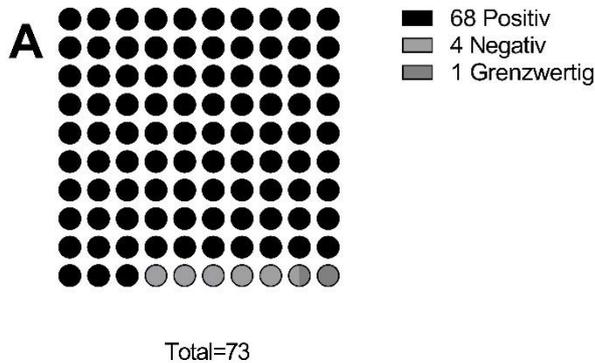
Ergebnisse

3.1 Infektionsserologische Charakterisierung von SARS-CoV-2 Antikörpern in unterschiedlichen ELISA Systemen

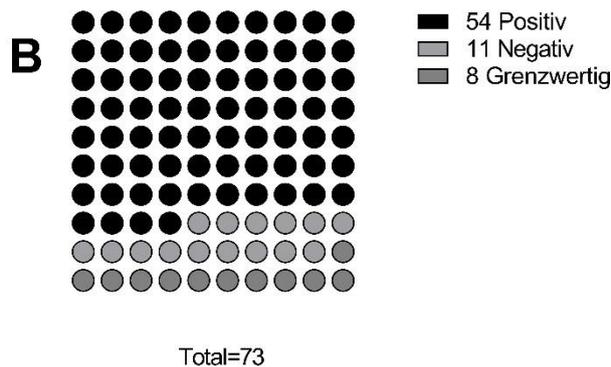
Die Gegenüberstellung der qualitativen Auswertung der ELISA Daten mittels Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (ELISA_R), Anti-SARS-CoV-2-Quantivac-ELISA (IgG) (ELISA_E) und SARS-CoV-2-NeutralISA (Assay_NAK) der 73 RT-PCR positiven Patienten zeigte, dass der Nachweis von Antikörper gegen das S-Protein vom Nachweis neutralisierender Antikörper abwich. Mit dem ELISA_E wurden in 68 von 73 Seren Antikörper gegen die rekombinante S1-Domäne des S-Proteins identifiziert. Mit dem ELISA_R wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt und in 69 von 73 Seren Antikörper gegen das RBD-Antigen identifiziert.

Mit dem Assay_NAK wurden in 54 von 73 Seren neutralisierende Antikörper identifiziert (Abbildung 7).

Qualitative Auswertung des ELISA_E



Qualitative Auswertung des Assay_NAK



Qualitative Auswertung des ELISA_R

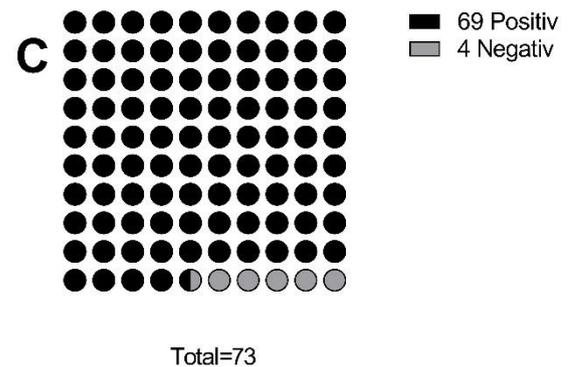


Abbildung 7: Vergleich der Befundinterpretation und qualitative Ergebnisse von (A) ELISA_E, (B) Assay_NAK und (C) ELISA_R.

Die Auswertung der quantitativen Ergebnisse von den 73 Seren, gemessen mit dem ELISA_E, im Mittel 37 Tage (SD=17) nach angenommenem Infektionszeitpunkt, ergab eine weite Streuung der gemessenen Titer. Im Mittelwert lag der Titer der Proben bei 683,92 IE/ml mit einer Standardabweichung von 982,51 IE/ml. Der höchste gemessene Titer einer Serumprobe lag bei 5133 IE/ml. Es zeigten sich zwei Gruppen, die sich in der durchschnittlichen Titer Höhe deutlich unterschieden. In der einen Gruppe fanden sich die Patienten mit klinischem Schweregrad asymptomatisch und leicht, in der anderen Gruppe die moderat und schwer betroffenen Patienten wieder. Seren von Patienten mit asymptomatischem oder leichtem Verlauf wurden der Gruppe 0+1 zugeteilt. Seren von Patienten mit moderatem oder schwerem Verlauf wurden der Gruppe 2+3 zugeteilt. Mit Hilfe

des Mann Whitney Tests wurden die beiden Gruppen verglichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Menge von IgG Antikörper gegen die rekombinante S1-Domäne des S-Proteins wurde nachgewiesen (Abbildung 8). Patienten, die einen asymptomatischen oder leichten Verlauf der Erkrankung zeigten, hatten im Median 680,3 IE/ml weniger Antikörper, als Patienten die einen moderaten oder schweren Verlauf aufwiesen, $U = 246.5$, $p < .001$.

Vergleich der Titer der Gruppen 0+1
vs. 2+3 der 1. Messung

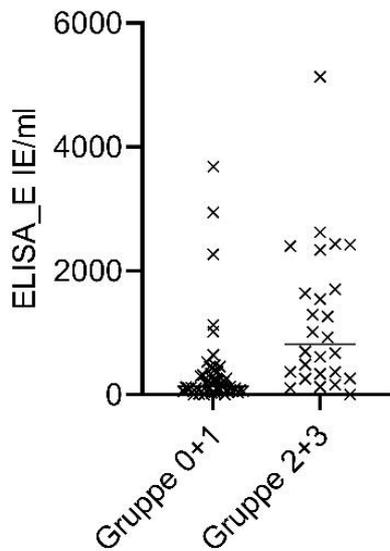


Abbildung 8: Vergleich der Titer der Gruppen 0+1 vs. 2+3 gemessen mit dem ELISA_E. Gruppe 0+1: Asymptomatisch oder leichter Verlauf, Gruppe 2+3: Moderater oder schwerer Verlauf

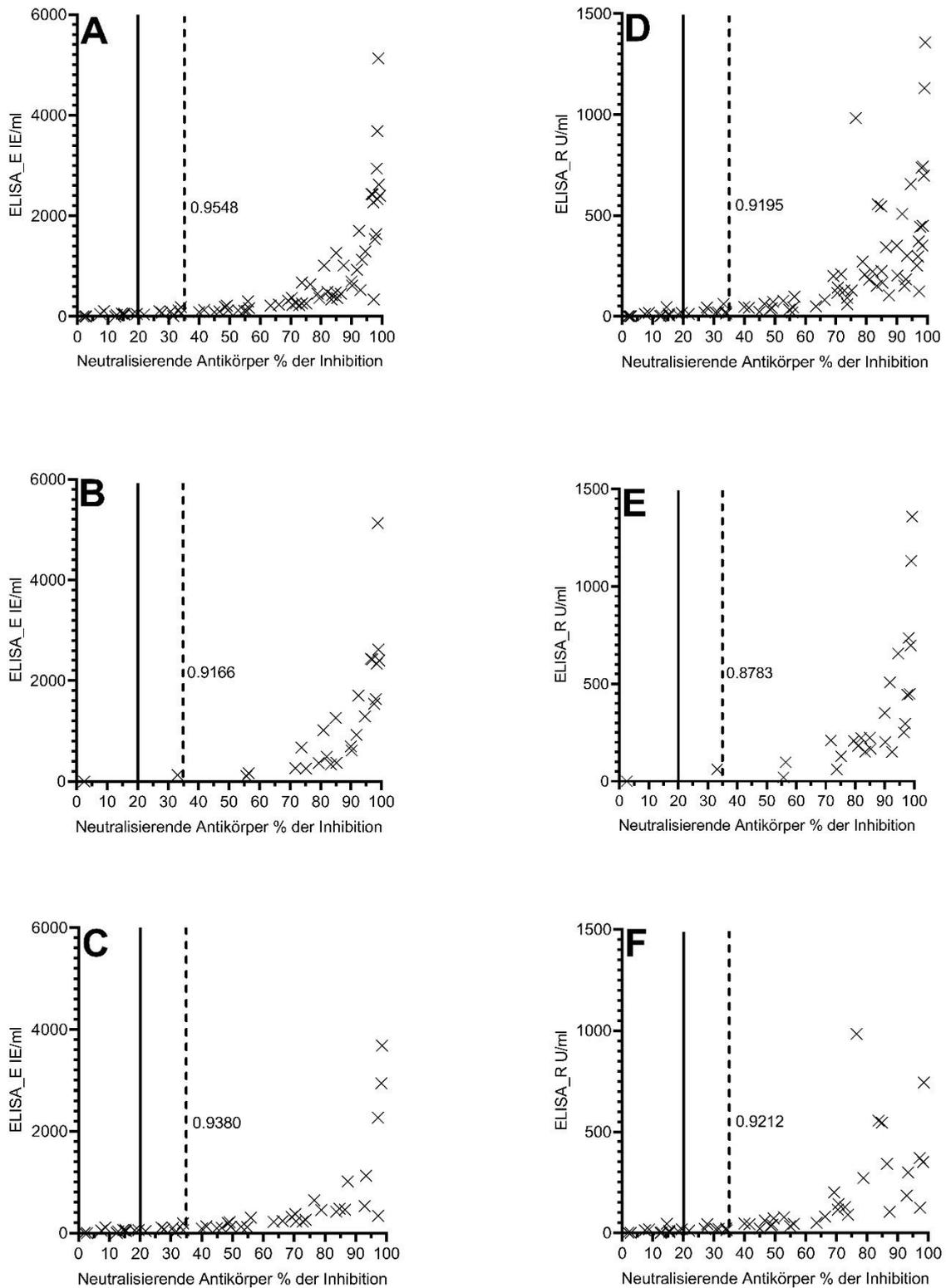


Abbildung 9 Korrelation der Ergebnisse des Assay_NAK mit dem ELISA_E (A, B, C) und ELISA_R (D, E, F). A, D: Messwerte unabhängig vom klinischen Ausprägungsgrad. B, E: Messwerte der asymptomatischen und leichten Fälle. C, F: Messwerte der moderaten und schweren Fälle. Die Linien kennzeichnen den Grenzwert des Referenzbereichs des Assay_NAK.

Darüber hinaus erlaubte die Messung neutralisierender Antikörper eine weitere Separation im Reaktionsmuster des untersuchten Patientenkollektivs. In der Gruppe moderat bis

schwer erkrankter Patienten fanden sich mehr neutralisierende Antikörper als in der asymptomatisch und leicht erkrankten Gruppe.

Abbildung 9 vergleicht die Messwerte des Assay_NAK mit dem ELISA_E und ELISA R. Beide Tests zeigen eine klare positive Korrelation mit den Ergebnissen des Tests für neutralisierende Antikörper. Wir sahen eine Übereinstimmung der Messwerte unabhängig vom klinischen Ausprägungsgrad, die statistisch signifikant war, $r = 0.9548$, $p < .001$, 0.9159 , $p < .001$. Asymptomatisch und leichte Fälle konnten von moderaten und schweren Fällen unterschieden werden. Patienten der Gruppe 2 + 3 besaßen mit Ausnahme von zwei Patienten (n=1 negative und n=1 grenzwertig) neutralisierende Antikörper (92,3 %). Im Vergleich dazu konnte festgestellt werden, dass in 17 von 47 Patienten keine neutralisierenden Antikörper (36,2 %) nachweisbar waren.

Die initial eingeschlossenen Patienten wurden gebeten, sich im Verlauf nach 6 (Zeitpunkt 1) und 12 Monaten (Zeitpunkt 2) erneut vorzustellen. Sie wurden hinsichtlich des Krankheitsverlaufs und des serologischen Status untersucht. In unserer Ambulanz stellten sich 44 Patienten vor. 13 zum Zeitpunkt 1 und 31 zum Zeitpunkt 2. Die Fallzahl zum Zeitpunkt 1 reichte nicht zur statistischen Auswertung aus. Deshalb wurden nur die zum Zeitpunkt 2 erhobenen Daten in die Arbeit einbezogen. Klinischer Status sowie der Titerverlauf wurden erhoben. Der Zeitpunkt 2 lag im Mittel bei 336 Tagen (SD=20). Es zeigte sich eine deutliche Abnahme des Antikörpertiters (Abbildung 10). Der Unterschied war

statistisch signifikant, $p < .0013$, $p < .0195$. Die Anzahl neutralisierender Antikörper sowie die Titer Höhe nahm im Beobachtungszeitraum ab (Abbildung 11).

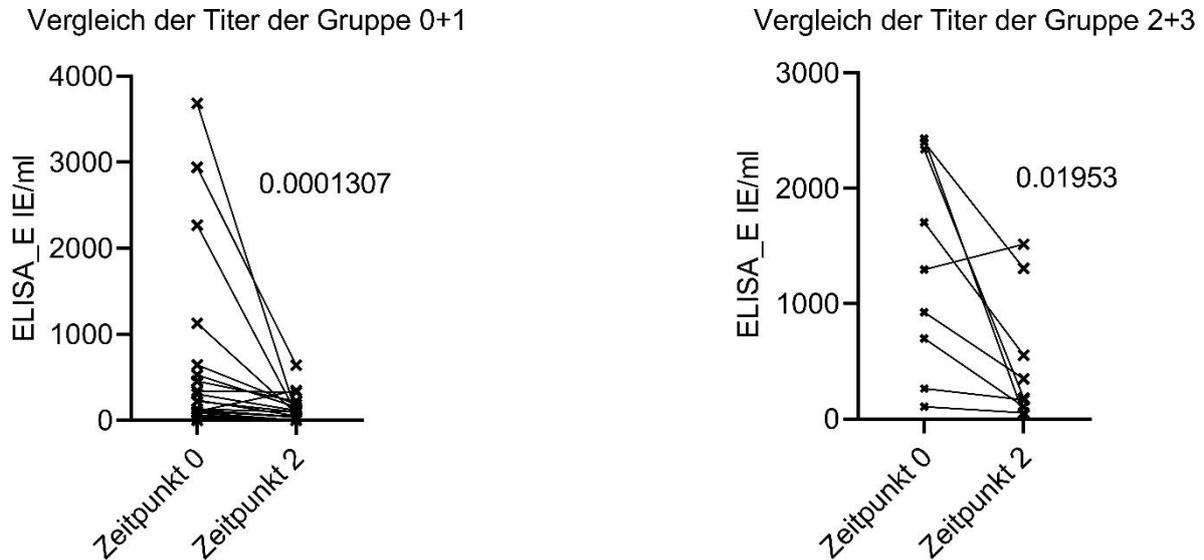


Abbildung 10: Vergleich der Titer 37 (SD=17) Tage nach der Infektion und 336 (SD=20) Tage nach der Infektion gemessen mit dem ELISA_E (Anti-SARS-CoV-2-QuantiVac-ELISA (IgG)).

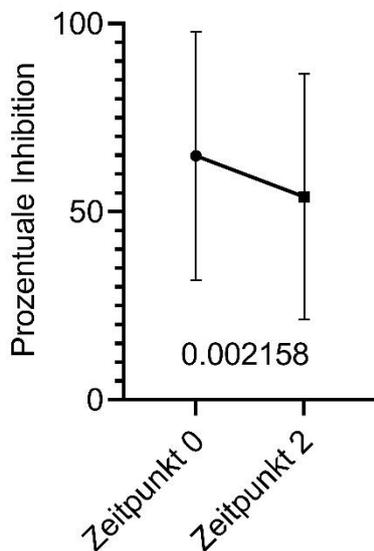


Abbildung 11: Vergleich der Ergebnisse des Assay_NAK im Beobachtungszeitraum. Darstellung der Zentralwerte mit Standardabweichung.

Die zum Zeitpunkt 2 untersuchten Seren wurden ergänzend mithilfe des EUROLINE Anti-SARS-CoV-2-Profil (IgG) Immunblots zum Nachweis anderer Antikörper untersucht. Ein großer Anteil (81%) der Patienten wies Antikörper gegen ein oder mehrere humanpathogene Coronaviren auf (Tabelle 5).

Tabelle 5: Auswertung der Antikörperanalyse mit dem EUROLINE Anti-SARS-CoV-2-Profil (IgG) Immunblot von n=31 Proben

Virus	Anteil der positiven Proben
HCoV-229E	17 von 31
HCoV-NL53	17 von 31
HCoV-OC43	14 von 31
HCoV-HKU1	12 von 31
Mindestens 1 Virus nachweisbar	26 von 31

Alle Untersuchungsmaterialien, die klinisch und infektionsserologisch vollständig charakterisiert wurden, stehen weiteren Untersuchungen zur Verfügung.

3.2 Epitopkartierung mit dem Peptid Microarray

Wie in den Auswahlkriterien für die Epitopkartierung (2.2) ausgeführt, wurden für die Epitopkartierung 24 Seren (Zeitpunkt 0) ausgewählt (Tabelle 2).

Serum-Proben der COVID-19 Patienten, die im Microarray untersucht wurden (n=24), zeigten starke Immunogenität im Gegenteil zu den Patienten in der Kontrollgruppe (n=12). Die immundominanten Regionen wurden primär auf dem S und N Protein von SARS-CoV-2 lokalisiert. Außerdem zeigten lineare Epitope auf dem M, AP2A und R1AB Proteinen IgG Reaktivität. Epitope anderer Proteine von SARS-CoV-2 zeigten keine oder nur geringe Immunogenität. Insgesamt wurden 81 immunogene Peptide im Peptid-Array gefunden. Mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde die Signalintensität der einzelnen Peptide zwischen der SARS-CoV-2 positiven Gruppe und der Kontrollgruppe verglichen. Zusätzlich wurden für die jeweiligen Peptide um die Gruppen zu unterscheiden, die diagnostische Genauigkeit ((richtig positive + richtig negative) / Gesamtzahl der Ereignisse) errechnet. 33 Peptide mit der höchsten diagnostischen Genauigkeit wurden ausgewählt und die Peptidsequenzen der immunogenen Peptide miteinander verglichen. Daraus wurde auf die immundominanten Epitopsequenzen geschlossen (Tabelle 6). Auf dem S-Protein konnten die immundominanten Epitope: 0557-KKFLPFQQFGR-0567 (#1), 0661-ECDIPGAGIC-0671 (#2), 0789-YKTPPIKDFGG-0799 (#3), 0813-SKRSFIEDLLF-0823 (#4), 1145-LDSFKEELDKYFKNH-1159 (#5), 1259-DDSEPVLKGVKLH-1271 (#6) identifiziert werden. Auf dem N-Protein konnten die immundominanten Epitope: 0013-PRITFGGPSDS-0023 (#7), 0037-SKQRRPQGLPN-0047 (#8), 0161-LPQGTTLPKGF-0171 (#9), 0221-LLLLDRLNQL-0231 (#10), 0357-IDAYKTFPTEPKKD-0371 (#11), 0377-DETQALPQRQK-0387 (#12), 0393-TLLPAADLDDFSKQL-0407 (#13) identifiziert werden.

Tabelle 6: Nachweis von immundominanten Peptiden im Peptid-Array

Peptide	Sequenz	Epitope	#
SPIKE_0553-0567	TESNKKFLPFQQFGR	0557-KKFLPFQQFGR-0567	1
SPIKE_0557-0571	KKFLPFQQFGRDIAD		
SPIKE_0657-0671	NNSYECDIPIGAGIC	0661-ECDIPIGAGIC-0671	2
SPIKE_0661-0675	ECDIPIGAGICASYQ		
SPIKE_0785-0799	VKQIYKTPPIKDFGG	0789-YKTPPIKDFGG-0799	3
SPIKE_0789-0803	YKTPPIKDFGGFNFS		
SPIKE_0809-0823	PSKPSKRSFIEDLLF	0813-SKRSFIEDLLF-0823	4
SPIKE_0813-0827	SKRSFIEDLLFNKVT		
SPIKE_1145-1159	LDSFKEELDKYFKNH	1145-LDSFKEELDKYFKNH-1159	5
SPIKE_1253-1267	CCKFDEDDSEPVLKG	1259-DDSEPVLKGVKLH-1271	6
SPIKE_1257-1271	DEDDSEPVLKGVKLH		
SPIKE_1259-1273	DDSEPVLKGVKLHYT		
NCAP_0009-0023	QRNAPRITFGGSPDS	0013-PRITFGGSPDS-0023	7
NCAP_0013-0027	PRITFGGSPDSTGSN		
NCAP_0033-0047	SGARSKQRRPQGLPN	0037-SKQRRPQGLPN-0047	8
NCAP_0037-0051	SKQRRPQGLPNNTAS		
NCAP_0157-0171	IVLQLPQGTTLPKGF	0161-LPQGTTLPKGF-0171	9
NCAP_0161-0175	LPQGTTLPKGFYAEG		
NCAP_0217-0231	AALALLLLDRLNQLE	0221-LLLLDRLNQLE-0231	10
NCAP_0221-0235	LLLLDRLNQLESKMS		
NCAP_0357-0371	IDAYKTFPTEPKKD	0357-IDAYKTFPTEPKKD-0371	11
NCAP_0373-0387	KKKADETQALPQRQK	0377-DETQALPQRQK-0387	12
NCAP_0377-0391	DETQALPQRQKKQQT		
NCAP_0385-0399	RQKKQQTVTLLPAAD	0393-TLLPAADLDDFSKQL-0407	13
NCAP_0389-0403	QQTVTLLPAADLDDF		
NCAP_0393-0407	TLLPAADLDDFSKQL		
NCAP_0397-0411	AADLDDFSKQLQQSM		
AP3A_0253-0267	SGVVNPVMEPIYDEP	0261-EPIYDEP-0267	14
AP3A_0257-0271	NPVMEPIYDEPTTTT		
AP3A_0261-0275	EPIYDEPTTTT SVPL		
R1AB_1657-1671	KYPQVNGLTSIKWAD	1657-KYPQVNGLTSIKWAD-1671	15
R1AB_2153-2167	TTNIVTRCLNRVCTN	0005-TTNIVTRCLNRVCTN-0019	16
VME1_0005-0019	NGTITVEELKKLLEQ	0005-NGTITVEELKKLLEQ-0019	17

SPIKE: S-Protein; NCAP: N-Protein; AP3A: Protein 3a; VME1: M-Protein; Die Zahlen bei den Peptidsequenzen bezeichnen Beginn und Endposition des Peptids innerhalb der Proteinsequenz. #: Bezeichnet die Nummerierung der Epitopsequenz, auf die innerhalb der Arbeit verwiesen wird. Die P-Werte und die diagnostische Genauigkeit wurden übersichtshalber nicht in dieser Tabelle dargestellt. Die komplette Liste der Peptidsequenzen mit den statistischen Angaben sind in Anlage I.

Um das diagnostische Potenzial der identifizierten immunogenen Peptide zu beurteilen, wurde das Ergebnis des Microarray mit dem kommerziellen Euroimmun anti-SARS-CoV-2-

S1-IgG ELISA verglichen. Mithilfe des Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman wurden die aus dem kommerziellen ELISA ermittelten Extinktionsquotienten (Tabelle 7) der SARS-CoV-2 Gruppe mit der Summe der Peptid Microarray Signale des S und N Proteins verglichen. Die Ergebnisse der Tests korrelierten miteinander $R = 0,88$; $p = 2,5 \times 10^{-6}$.

Tabelle 7: Extinktionsquotienten der Serumproben des Anti-SARS-CoV-2-ELISA (IgG)

Serum	SAR_1	SAR_2	SAR_3	SAR_4	SAR_5	SAR_6	SAR_7	SAR_8	SAR_9
Ratio	6,07	8,41	8,46	12,19	12,81	8,71	0,61	0,15	6,4
Serum	SAR_10	SAR_11	SAR_12	SAR_13	SAR_14	SAR_15	SAR_16	SAR_17	SAR_18
Ratio	5,37	7,26	0,39	7,61	1,12	9,02	2,95	0,96	1,24
Serum	SAR_19	SAR_20	SAR_21	SAR_22	SAR_23	SAR_24	KTR_1	KTR_2	KTR_3
Ratio	10,01	10,8	4,29	3,88	5,88	5,98	0,38	0,24	0,21
Serum	KTR_4	KTR_5	KTR_6	KTR_7	KTR_8	KTR_9	KTR_10	KTR_11	KTR_12
Ratio	0,4	0,27	0,25	0,4	0,37	0,31	0,32	0,2	-

SAR_X: Bezeichnung der Serumprobe aus der SARS-CoV-2 positiven Gruppe. KTR_X: Bezeichnung der Serumprobe aus der Kontrollgruppe. Ratio: Berechnung der Ratio aus der Extinktion der Probe und der Extinktion des Kalibrators. Ratio < 0,8: negativ, Ratio $\geq 0,8$ - < 1,1: grenzwertig, Ratio $\geq 1,1$: positiv.

3.3 Prüfung der immundominanten Epitopsequenzen auf Kreuzreaktivität

Die Proben der Kontrollgruppe und der mit SARS-CoV-2 infizierten Personen wurden auf Reaktionen gegenüber vier weiteren Coronaviren geprüft. Speziell wurde nach Reaktionen auf Epitope im S, N, E und M Protein von SARS-CoV, MERS, HCoV_OC43 und HCoV-229E gesucht. Kreuzreaktive Epitope wurden auf dem N und M Protein der Viren SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 identifiziert. Für die anderen Viren konnte für diese Proteine keine Kreuzreaktivität gefunden werden. Besonders klar waren die Signale auf dem S Protein für alle getesteten Viren. Zwei Regionen im S Protein zeigten sich besonders immunogen. R0815S-IED-LF0823 zeigte Reaktivität für alle getesteten Viren und F1148--ELD--FKN1158 zeigte Reaktivität für SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV und HCoV-OC43, aber nicht für HCoV-229E.

Die Aminosäuresequenzen der immundominanten Epitope #1 - #13 wurden mit den gleichlaufenden Aminosäuresequenzen von HCoV-229E, HCoV-OC43, MERS-CoV und SARS-CoV-1 verglichen (Tabelle 8). Für die Aminosäuren, die in den Epitopsequenzen aller untersuchten Viren vorkommen, wurde die ermittelte Signalintensität gegeneinander aufgetragen und mithilfe eines graduierten Farbcodes visualisiert (Abbildung 12). Die immundominanten Regionen #12 und #13 auf dem N Protein und #1 und #3 auf dem S Protein zeigten hauptsächlich Reaktivität für SARS-CoV-2. Die Signalintensitäten der Epitope #1 und #13 zeigten die deutlichsten Unterschiede zwischen SARS-CoV-1 und

SARS-CoV-2 und können damit als charakteristisch für das Virus angesehen werden. Epitop #7 und #9 auf dem N Protein und #2 und #6 auf den S Protein wiesen analoge Signalmuster für SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 auf. Hier kam es zu Kreuz-Reaktivität. Epitope, die Reaktivität für alle Viren zeigten, sind Epitop #4 und #5 auf dem S-Protein.

Tabelle 8: Prozentuale Übereinstimmung zwischen den gefundenen Epitopsequenzen von SARS-CoV-2 mit anderen Coronaviren.

Epitopsequenz	% Homologie der Epitopsequenz					#
	HCoV-229E	HCoV-OC43	MERS-CoV	SARS-CoV-1		
0557-KKFLPFQQFGR-0567	0	9	20	82	1	
0661-ECDIPIGAGIC-0671	33	36	46	100	2	
0789-YKTPPIKDFGG-0799	9	18	46	73	3	
0813-SKRSFIEDLLF-0823	64	82	82	91	4	
1145-LDSFKEELDKYFKNH-1159	15	69	46	100	5	
1259-DDSEPVLKGVKLH-1271	17	23	8	100	6	
0013-PRITFGGPPSDS-0023	10	18	36	91	7	
0037-SKQRRPQGLPN-0047	0	8	56	91	8	
0161-LPQGTTLPKGF-0171	36	55	55	100	9	
0221-LLLLDRLNQL-0231	0	9	64	100	10	
0357-IDAYKTFPTEPKKD-0371	0	13	91	100	11	
0377-DETQALPQRQK-0387	0	9	9	91	12	
0393-TLLPAADLDDFSKQL-0407	0	13	7	87	13	

Die prozentuale Homologie der Sequenzen wurde anhand der Proteinsequenzen mittels Uniprot Align (Align (uniprot.org)) ermittelt.

Epitop #1											
HCoV-229E	T	F	L	N	-	-	G	I	T	Y	T
HCoV-OC43	T	Y	Y	N	S	W	Q	N	L	L	Y
MERS-CoV	V	G	V	R	-	Q	Q	R	F	V	Y
SARS-CoV-1	K	R	F	Q	P	F	Q	Q	F	G	R
SARS-CoV-2	K	K	F	L	P	F	Q	Q	F	G	R

Epitop #2											
HCoV-229E	-	-	-	-	-	S	S	F	G	V	C
HCoV-OC43	T	C	D	L	T	V	G	S	G	Y	C
MERS-CoV	D	C	K	L	P	L	G	Q	S	L	C
SARS-CoV-1	E	C	D	I	P	I	G	A	G	I	C
SARS-CoV-2	E	C	D	I	P	I	G	A	G	I	C

Epitop #3											
HCoV-229E	F	T	L	A	N	V	S	S	F	G	D
HCoV-OC43	V	T	L	S	T	K	L	K	D	G	V
MERS-CoV	Q	S	S	P	I	I	P	G	F	G	G
SARS-CoV-1	Y	K	T	P	T	L	K	Y	F	G	G
SARS-CoV-2	Y	K	T	P	P	I	K	D	F	G	G

Epitop #4											
HCoV-229E	A	G	R	S	A	I	E	D	I	L	F
HCoV-OC43	S	S	R	S	A	I	E	D	L	L	F
MERS-CoV	S	A	R	S	A	I	E	D	L	L	F
SARS-CoV-1	T	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F
SARS-CoV-2	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F

Epitop #5																		
HCoV-229E	Y	I	D	V	N	K	T	L	Q	E	L	S	Y	K	L	P	N	Y
HCoV-OC43	L	P	-	-	-	D	F	K	E	E	L	D	Q	W	F	K	N	Q
MERS-CoV	S	T	G	I	-	D	F	Q	D	E	L	D	E	F	F	K	N	V
SARS-CoV-1	L	D	-	-	-	S	F	K	E	E	L	D	K	Y	F	K	N	H
SARS-CoV-2	L	D	-	-	-	S	F	K	E	E	L	D	K	Y	F	K	N	H

Epitop #6													
HCoV-229E	L	P	Y	Y	D	V	E	K	I	H	I	Q	-
HCoV-OC43	G	Y	Q	E	L	V	I	K	T	S	H	D	D
MERS-CoV	E	Y	D	L	E	P	H	K	V	H	V	H	-
SARS-CoV-1	D	D	S	E	P	V	L	K	G	V	K	L	H
SARS-CoV-2	D	D	S	E	P	V	L	K	G	V	K	L	H

Epitop #7												
HCoV-229E	M	A	T	V	K	W	A	D	A	S	E	-
HCoV-OC43	N	G	I	L	K	W	A	D	Q	S	D	Q
MERS-CoV	P	R	A	V	S	F	A	D	N	N	D	I
SARS-CoV-1	P	R	-	I	T	F	G	G	P	T	D	S
SARS-CoV-2	P	R	-	I	T	F	G	G	P	S	D	S

Epitop #9												
HCoV-229E	L	P	N	G	V	T	V	V	E	E	P	D
HCoV-OC43	F	P	P	G	T	V	L	P	Q	G	-	Y
MERS-CoV	F	A	P	G	T	K	L	P	K	N	-	F
SARS-CoV-1	L	P	Q	G	T	T	L	P	K	G	-	F
SARS-CoV-2	L	P	Q	G	T	T	L	P	K	G	-	F

Epitop #12											
HCoV-229E	S	A	L	E	F	N	P	S	Q	T	S
HCoV-OC43	Q	G	E	N	D	N	I	S	V	A	V
MERS-CoV	P	K	E	E	S	T	D	Q	M	S	E
SARS-CoV-1	D	E	A	Q	P	L	P	Q	R	Q	K
SARS-CoV-2	D	E	T	Q	A	L	P	Q	R	Q	K

Epitop #13															
HCoV-229E	P	V	R	D	E	V	S	I	E	T	D	I	I	D	E
HCoV-OC43	Q	Q	N	K	S	R	E	L	T	A	E	D	I	S	L
MERS-CoV	R	V	Q	G	T	Q	R	T	R	T	R	P	S	V	Q
SARS-CoV-1	T	L	L	P	A	A	D	M	D	D	F	S	R	Q	L
SARS-CoV-2	T	L	L	P	A	A	D	L	D	D	F	S	K	Q	L

Abbildung 12: Farbgraduierte Visualisierung der gleichlaufenden Epitopsequenzen (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #9, #12, #13 von HCoV-229E, HCoV-OC43, MERS-CoV, SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2. Die Aminosäuresequenz ist im FASTA-Format dargestellt (Pearson & Lipman, 1988). Die Farbgraduierung der Aminosäuren entspricht dem Medianwert aller Peptidsignale der SARS-CoV-2 positiven Gruppe. Die Farbskala reicht von Weiß (kein Signal = 0 Lichteinheiten) über Gelb (mittlere Signalstärke) bis zu Rot (maximale Signalstärke = 65535 Lichteinheiten). Eine rote Farbcodierung steht für eine starke Antikörperreaktion gegen die Aminosäure, analog dazu steht eine gelbe und weiße Farbcodierung für eine mittelstarke und schwache Antikörperreaktion auf die Aminosäure.

Diskussion

4.1 Der Schweregrad der Erkrankung nach Infektion mit SARS-CoV-2 beeinflusst die Anzahl und Qualität der nachweisbaren Antikörper gegen SARS-CoV-2

Betrachten wir die Ergebnisse aus den ELISA-Daten, ist ein deutlicher Unterschied bezüglich der Quantität der gebildeten Antikörper zu erkennen (Abbildung 9 A,D). Patienten deren Erkrankung asymptomatisch oder leicht verlaufen ist, bilden weniger Antikörper als Patienten, deren Erkrankung moderat oder schwer verlaufen ist. Dieses Ergebnis entspricht der allgemeinen Erwartungshaltung und bestätigen sich in den Arbeiten von Yan et al. (2021) sowie Moradi et al. (2021). In den Forschungsergebnissen von Pujadas et al. (2020) ist beschrieben, dass die Virusdosis als unabhängiger Risikofaktor anzusehen ist und eine hohe Dosis mit einer erhöhten Mortalität einhergeht. Die Menge an IgG Antikörpern korreliert außerdem mit den neutralisierenden Antikörpern. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich dieser Befund ebenfalls. Patienten mit moderatem und schwerem Verlauf besitzen im Trend häufiger neutralisierende Antikörper (Abbildung 9). In den Forschungsergebnissen von Legros et al. (2021) ist die positive Korrelation des Schweregrads von COVID-19 und der Quantität gebildeter neutralisierender Antikörper beschrieben. Ein neutralisierender Antikörper verhindert den Eintritt in die Wirtszelle, in dem er Zielstrukturen des Virus besetzt, die für das Eindringen in die menschliche Zelle notwendig sind. Im Falle von SARS-CoV-2 bindet das Virus mit dem S-Protein an den menschlichen ACE2 Rezeptor (Frankowska et

al., 2021). Die Erforschung der Qualität dieser Antikörper ist derzeit ein wichtiges Ziel, da im Rahmen der Vakzinierung der Bevölkerung ein Test, der es erlaubt, eine Abschätzung zum Beispiel einer 3. Impfung zu treffen, die verfolgte Impfstrategie optimieren könnte. Derzeit empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) die Erhebung eines Antikörper Status als Indikator für Impfungen noch nicht (Vygen-Bonnet et al., 2021).

Momentan ist es schwer zu beurteilen, ob und welche Personen tatsächlich bei erneutem Kontakt mit dem Virus vor einer Erkrankung geschützt sind. Möglicherweise hängt das auch von den in der Bevölkerung kursierenden Virusvarianten ab. Derzeit ist die Delta-Variante, die für eine höhere Ansteckungsrate verantwortlich gemacht wird im Umlauf (Lopez Bernal et al., 2021). Die hohe Mutationsrate von SARS-CoV-2 führt hier zu einer Verschärfung des Infektionsgeschehens. Die Delta-Variante scheint bereits jetzt zu Impfdurchbrüchen zu führen (Farinholt et al., 2021). Analog zur Erfahrung mit der Influenza Schutzimpfung mit jährlicher Anpassung an die im Umlauf befindlichen Viren ist die Beobachtung der Modifikationen der SARS-CoV-2 Viren notwendig und es gibt bereits Handlungsanweisungen in der Coronavirus-Surveillanceverordnung (CorSurV) die Ausbreitung zu überwachen (Robert Koch-Institut, 2021b). Die Messung von neutralisierenden Antikörpern und deren Qualität hinsichtlich der neutralisierenden Wirkung von Virusvarianten in der Bevölkerung könnte wichtige Hinweise für gesundheitliche Risiken liefern.

4.2 Genesene mit asymptomatischen und leichten COVID-19 Verläufen sind nicht ausreichend gegen eine erneute Erkrankung geschützt

Die vorliegenden Daten zeigen, dass Patienten, die einen milden Verlauf der Erkrankung ausgeprägt haben, im Verlauf der Nachbeobachtung einen deutlichen Verlust der Höhe des Antikörper Titers erfahren haben (Abbildung 10). In der nationalen Strategie wird deshalb die Impfung von Genesenen 6 Monate nach der Erkrankung empfohlen. Die derzeit propagierte 2 respektive 3G Regel trägt diesem Umstand nur teilweise Rechnung. Genesene sollten auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse nur so lange den Status "Genesen" erhalten wie ausreichend neutralisierende Antikörper im Blut nachweisbar sind. Inwieweit neben der humoralen Immunantwort eine T-Zell Immunantwort im Sinne eines immunologischen Gedächtnisses die Genesenen trotzdem schützt, war nicht Bestandteil dieser Arbeit. In der Literatur findet sich hierzu folgendes Bild. Das T-Zell Gedächtnis scheint bei Coronaviren langanhaltend zu sein (Ng et al., 2016). In der Arbeit von Ni et al. (2020) ist eine Korrelation der neutralisierenden Antikörper mit den der Anzahl von N Protein spezifischen T-Zellen beschrieben. In einer weiteren Arbeit von Bonifacius et al. (2021)

konnte diese Korrelation nicht gestützt werden, jedoch haben die Ergebnisse eine Korrelation der Anzahl von S Protein spezifischer T-Zellen und der Menge an Antikörpern gegen das S-Protein gezeigt. Aus dem Grundwissen der Immunologie wissen wir, dass T-Zellen und B-Zellen miteinander interagieren müssen, damit die spezifische Immunantwort effektiv ablaufen kann. Das Screening für T-Zellen ist bis heute jedoch noch nicht flächendeckend möglich. Wenn wir jedoch eine direkte Korrelation der gut messbaren humoralen Immunantwort mit der zellulären Immunantwort belegen, könnten wir den Immunstatus besser einschätzen und auf eine T-Zellmessung verzichten. Screening auf T-Zell Immunität kann womöglich auch abgelaufene Infektionen von asymptomatischen und leichten COVID-19 Verläufen detektieren, deren humorale Immunantwort nicht nachweisbar ist (Kruse et al., 2021). Leider ist noch nicht bekannt, ob Patienten mit einem positiven Test auf spezifische T-Zellen effektiv gegen eine erneute Infektion mit SARS-CoV-2 geschützt sind. Zielführend ist es auf beiden Seiten der spezifischen Immunantwort weitere Forschungsarbeit zu leisten und die Ergebnisse in der Gesamtheit bezüglich des Nutzens zur Bekämpfung von SARS-COV-2 einzusetzen. Möchte man Personen identifizieren, die nach einer Infektion oder einer Impfung unzureichend auf einen erneuten Kontakt mit SARS-CoV-2 vorbereitet sind, gilt es prognostische Marker zu finden. Das sollte ebenfalls auf Seiten der zellulären oder humoralen Immunantwort oder in Kombination geschehen.

4.3 Das Immunsystem von Erkrankten reagiert bezüglich der humoralen Immunantwort individuell auf SARS-CoV-2

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Peptid Microarray Technologie die Qualität der aufgetretenen Antikörper hinsichtlich der Antikörperbindungsstellen auf Peptid-Ebene im Detail untersucht. Die Methode des "Peptid Scans" um Antikörperbindungsstellen zu charakterisieren wird mittlerweile seit 30 Jahren in der medizinischen Forschung erfolgreich angewendet (Schneider et al., 1990). Schneider und Kollegen identifizierten zum Beispiel immundominante Epitope des HIV-1 spezifischen vpu Proteins und setzten diese in Korrelation mit klinischen Stadien von AIDS. Mit Hilfe von Mikroarray-Technologie ist man heute in der Lage, im Hochdurchsatz Patientenkollektive hinsichtlich auftretender Antikörpermotive zu screenen. Die Nachweismethode mittels Peptid Microarray ist gegenüber herkömmlichem serologischem Verfahren geeignet, das individuelle Antikörperspektrum von Patienten gegen SARS-CoV-2 zu bestimmen. Die Firma JPT Peptide Technologies hatte im Frühjahr 2020 entsprechende Arrays entwickelt, um vor allem für die Suche von Medikamenten für die Behandlung von SARS-CoV-2 Erkrankten geeignete Werkzeuge zur Verfügung zu stellen. Diese kommerzielle Plattform wurde in der

vorliegenden Arbeit zur Suche nach Antikörperbindungsstellen genutzt. Sofern sich unterschiedliche Antikörpermotive im Verlauf der Infektion und Erkrankung feststellen lassen, war das Ziel diese Strukturen für spezifische Testsysteme einzusetzen, die kostengünstig zum „Screenen“ von Kollektiven nutzen zu können. Wesentliche Voraussetzung für diese Untersuchung war die Qualität der eingesetzten Untersuchungsmaterialien.

Die eingesetzten Serumproben, die für diese Untersuchung genutzt wurden, wurden hinsichtlich klinischer Status und mit herkömmlichen serologischen Verfahren charakterisiert. Die Reaktivität der eingesetzten Seren wurde über das gesamte Proteom von SARS-CoV-2 und weiterer humanpathogener Coronaviren untersucht. Das Auftreten von kreuzreagierenden Antikörpern konnte so in einem Arbeitsgang analysiert werden. Antikörper gegen die Epitope auf dem S Protein (1148-FKEELDKYFKN-1158 und 0815-RSFIEDLLF-0823) zeigten Kreuzreaktivität mit den Viren HCoV-OC43 und HCoV-229E. Diese Epitope wurden auch in der Arbeit von Ladner et al. (2021) identifiziert. In dem untersuchten Kollektiv konnten immundominante Epitope in hoher Auflösung entdeckt werden. Primär richtet sich die humorale Immunantwort der IgG Antikörper gegen Epitope auf dem S- und N-Protein. Diese Proteine zeigen literaturübergreifend Immundominanz (Farrera-Soler et al., 2020; Lu et al., 2021; Premkumar et al., 2020). Die humorale Immunantwort richtet sich jedoch nicht ausschließlich gegen diese Proteine, sondern auch gegen Epitope des M, AP2A und R1ab Protein. Die Mechanismen, eine Erkrankung zu verhindern, sind komplex und es bedarf der Zusammenarbeit verschiedener Spezialisten. Wie bereits weiter oben ausgeführt, müssen Aspekte der zellulären Immunantwort im Kontext weiterer Untersuchungen einbezogen werden. Möglicherweise können die spezifischen Peptide auch für einen Lymphozytentransformationstest verwendet werden. Bei einem Lymphozytentransformationstest, der heutzutage bei latenten, reaktivierenden Virusinfektionen wie zum Beispiel Herpesvirus Infektionen verwendet wird, werden antigenspezifische T-Lymphozyten im Blut nachgewiesen (Møller-Larsen et al., 1975). Dieser ist geeignet, eine abgelaufene Infektion ohne die ausreichende Bildung von Antikörpern nur auf Basis der T-Zellimmunität zu bestimmen. Betrachtet man die identifizierten immundominanten Epitope und vergleicht diese mit den Epitopen aus anderen Arbeiten zeigt sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse. Die Epitope aus den Arbeiten von Amrun et al. (2020) und Poh et al. (2020) ähneln den Epitopen #3 auf dem N Protein und #1, #4 auf dem S Protein dieser Arbeit (Abbildung 12). Die hier beschriebenen

Epitope ergänzen nicht nur die Liste der bereits identifizierten Epitope, sondern erweitern die Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Nachweisverfahren auf Peptidebene.

Für die Entwicklung eines diagnostischen Tests müssen Peptide ausgewählt werden, die eine hohe Sensitivität und Spezifität hinsichtlich der Erkennung von SARS-CoV-2 Patienten besitzen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass solche Peptide existieren. Die gefundenen Peptide sind geeignet, klar zwischen infizierten und gesunden Personen zu unterscheiden. Im Vergleich zu einem kommerziellen ELISA zeigt sich eine klare positive Korrelation der Ergebnisse.

Die vorliegenden Ergebnisse werden derzeit genutzt, Peptid-ELISA Systeme zum Nachweis spezifischer Antikörper aufzubauen, die eine differenzierte Beobachtung der Antikörperbildung im Rahmen der Entwicklung der Immunantwort gegen SARS-CoV-2 zulassen. Eine Kombination unterschiedlicher Peptide für den diagnostischen Einsatz ist zum Patent angemeldet.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist es gelungen, die individuelle humorale Reaktion von Corona Patienten exemplarisch mit Hilfe unterschiedlicher serologischer Verfahren über einen Verlauf von einem Jahr zu beschreiben und immundominante Epitope aus dem Proteom von SARS-CoV-2 zu identifizieren.

Die Ergebnisse der ELISA zeigen einen deutlichen Unterschied bezüglich der Quantität der gebildeten Antikörper bei den infizierten Personen. Patienten mit schweren und mittleren Krankheitsverläufen zeigten statistisch signifikant mehr Antikörper als Patienten die einen asymptomatischen oder leichten Verlauf aufwiesen $U = 246.5$, $p < .001$.

In Bezug auf die neutralisierenden Antikörper zeigte die Gruppe moderat bis schwer erkrankter Patienten mehr neutralisierende Antikörper als in der asymptomatisch und leicht erkrankten Gruppe. Patienten mit moderatem und schwerem Verlauf besaßen mit Ausnahme von zwei Patienten neutralisierende Antikörper (92,3 %). Im Vergleich dazu wurde festgestellt, dass in 17 von 47 Patienten mit asymptomatischem und leichtem Verlauf keine neutralisierenden Antikörper (36,2 %) nachweisbar waren. Die Anzahl neutralisierender Antikörper sowie die Höhe der Titer nahm im Beobachtungszeitraum von einem Jahr ab (Abbildung 10, 11).

Ein großer Anteil (81%) der Patienten wies Antikörper gegen ein oder mehrere humanpathogene Coronaviren auf (Tabelle 5)

Im Peptid Microarray zeigten sich 81 immunogene Peptide. 33 Peptide mit der höchsten diagnostischen Genauigkeit wurden ausgewählt und die Peptidsequenzen der immunogenen Peptide miteinander verglichen. Die immundominanten Regionen wurden primär auf dem S und N Protein von SARS-CoV-2 lokalisiert. Außerdem zeigten lineare Epitope auf dem M, AP2A und R1AB Proteinen IgG Reaktivität. Die Auswertung des Peptid Microarrays zeigte kreuzreaktive Antikörper, die Epitope verschiedener Coronaviren erkennen. Das bedeutet, dass vermutlich jede Art von Corona-Infektion auch gegen eine SARS-COV-2 Infektion schützen kann. Jedoch gibt es auch Hinweise darauf, dass bereits bestehende Antikörper einen negativen Effekt auf die Produktion neuer Antikörper hat (Baraniak et al., 2019). Die immundominanten Regionen #12 und #13 (Abbildung 12) auf dem N Protein und #1 und #3 (Abbildung 12) auf dem S Protein zeigten hauptsächlich Reaktivität für SARS-CoV-2.

Die Signalintensitäten der Epitope #1 und #13 (Abbildung 12) zeigten die deutlichsten Unterschiede zwischen SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 und können damit als charakteristisch für das Virus angesehen werden. Epitope, die Reaktivität für alle Viren zeigten, sind Epitop #4 und #5 auf dem S-Protein.

Auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit sind weitere wissenschaftliche Projekte angeschlossen. Hierfür steht auch die im Rahmen der Arbeit etablierte Serumbank zur Verfügung. Um eine größere Aussagekraft zu erzielen, müssen weitere Untersuchungen mit größeren Kohorten durchgeführt werden, um die humorale Reaktion bei Patienten mit verschiedenen Schweregraden der COVID-19 Erkrankung zu charakterisieren, sowie Indikatoren zum Beispiel für Long COVID Erkrankungen zu finden.

Literaturverzeichnis

1. Amrun SN, Lee CY-P, Lee B, Fong S-W, Young BE, Chee RS-L: Linear B-cell epitopes in the spike and nucleocapsid proteins as markers of SARS-CoV-2 exposure and disease severity. *EBioMed*. 2020;58:102911.
2. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF: The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2020;26:450–2.
3. Andresen H, Grotzinger C: Deciphering the antibodyome: Peptide arrays for serum antibody biomarker diagnostics. *Curr proteomics* 2009;6:1-12.
4. Bestle D, Heindl MR, Limburg H, Van Lam van T, Pilgram O, Moulton H: TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci Alliance*. 2020;3:e202000786.

5. Bonifacius A, Tischer-Zimmermann S, Dragon AC, Gussarow D, Vogel A, Krettek U: COVID-19 immune signatures reveal stable antiviral T cell function despite declining humoral responses. *Immunity*. 2021;54:340-354.e6.
6. Baraniak I, Kern F, Holenya P, Griffiths P, Reeves M: Original Antigenic Sin Shapes the Immunological Repertoire Evoked by Human Cytomegalovirus Glycoprotein B/MF59 Vaccine in Seropositive Recipients. *J Infect Dis*. 2019;220(2):228–32.
7. Centers for Disease Control and Prevention: CDC 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel 2021 (CDC-006-00019, Revision: 07) <https://www.fda.gov/media/134922/download>.
8. Dong E, Du H, Gardner L: An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis* 2020;20:533–4.
9. Farrera-Soler L, Daguer J-P, Barluenga S, Vadas O, Cohen P, Pagano S: Identification of immunodominant linear epitopes from SARS-CoV-2 patient plasma. *PLoS One*. 2020;15:e0238089.
10. Farinholt T, Doddapaneni H, Qin X, Menon V, Meng Q, Metcalf G, u. a. Transmission event of SARS-CoV-2 delta variant reveals multiple vaccine breakthrough infections. *BMC Med*. 2021;19:255.
11. Fehr AR, Perlman S: Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: Maier H., Bickerton E., Britton P. (eds) *Coronaviruses. Methods in Molecular Biology*, vol 1282. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
12. Frankowska S, Zając K, Zargaryan K, Zawilska J: Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) - the major receptor for SARS-CoV-2 virus. *Farm Pol*. 2021;77:150- 154.
13. Green A: Li Wenliang. *Lancet*. 2020;395:682.
14. Gressner AM, Arndt T: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Band 3: P-Z / Axel M Gressner, Torsten Arndt Hrsg. 3. Auflage. Berlin [Heidelberg]: Springer; 2019. S. 423-476, 700-706.*
15. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR: Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*. 2020;181:1489-1501.e15.
16. Hamming I, Timens W, Bulthuis M, Lely A, Navis G, van Goor H: Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004;203:631–7.
17. Heidepriem J, Dahlke C, Kobbe R, Santer R, Koch T, Fathi A: Longitudinal development of antibody responses in COVID-19 patients of different severity with ELISA, peptide, and glycan arrays: An immunological case series. *Pathogens*. 2021;10:438.
18. Kim KH, Tandi TE, Choi JW, Moon JM, Kim MS: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) outbreak in South Korea, 2015: epidemiology, characteristics and public health implications. *J Hosp Infect*. 2017;95:207–13.
19. Kruse M, Dark C, Aspden M, Cochrane D, Competiello R, Peltz M: Performance of the T-SPOT.COVID test for detecting SARS-CoV-2-responsive T cells. *Internatl J Infect Dis*. 2021;113:155–61.

20. Ladner JT, Henson SN, Boyle AS, Engelbrektson AL, Fink ZW, Rahee F: Epitope-resolved profiling of the SARS-CoV-2 antibody response identifies cross-reactivity with endemic human coronaviruses. *Cell Rep Med*. 2021;2:100189.
21. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR: The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: Estimation and application. *Ann Intern Med*. 2020;172:577–82.
22. Legros V, Denolly S, Vogrig M, Boson B, Siret E, Rigaille J: A longitudinal study of SARS-CoV-2-infected patients reveals a high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(2):318–27.
23. Lexicon der Biologie: Coronaviren. (1999). [Illustration]. LEXIKON DER BIOLOGIE : Coronaviren. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/coronaviren/15358>
24. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA: Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003;426(6965):450–4
25. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, Pan P, Wang W, Hu D, Liu X, Zhang Q, Wu J: Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*. 2020;92(4):424-432.
26. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, Gallagher E, Simmons R, Thelwall S: Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N Engl J Med*. 2021;385(7):585–94.
27. Lu S, Xie X, Zhao L, Wang B, Zhu J, Yang T: The immunodominant and neutralization linear epitopes for SARS-CoV-2. *Cell Rep*. 2021;34(4):108666.
28. Møller-Larsen A, Andersen HK, Heron I, Sarov I: In vitro Stimulation of Human Lymphocytes by Purified Cytomegalovirus. *Intervirology*. 1975;6(4–5):249–57.
29. Moradi G, Mohamadi Bolbanabad A, Ahmadi S, Aghaei A, Bahrami F, Veysi A: Persistence assessment of SARS-CoV-2-specific IgG antibody in recovered COVID-19 individuals and its association with clinical symptoms and disease severity: A prospective longitudinal cohort study. *Int Immunopharmacol*. 2021;98:107893.
30. Ng O-W, Chia A, Tan AT, Jadi RS, Leong HN, Bertoletti A: Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine*. 2016;34(17):2008–14.
31. Ni L, Ye F, Cheng M-L, Feng Y, Deng Y-Q, Zhao H: Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. *Immunity*. 2020;52(6):971-977.e3.
32. Paules CI, Marston HD, Fauci AS: Coronavirus Infections—More Than Just the Common Cold. *JAMA*. 2020;323(8):707.
33. Pearson WR, Lipman DJ: Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(8):2444–8.
34. Peiris J, Lai S, Poon L, Guan Y, Yam L, Lim W: Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2003;361(9366):1319–25.
35. Poh CM, Carissimo G, Wang B, Amrun SN, Lee CY-P, Chee RS-L: Two linear epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein that elicit neutralising antibodies in COVID-19 patients. *Nat Commun*. 2020;11(1):2806.

36. Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, Martinez DR, Raut R, Markmann AJ: The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol*. 2020;5(48):eabc8413.
37. Pujadas E, Chaudhry F, McBride R, Richter F, Zhao S, Wajnberg A: SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir Med*. 2020;8(9):e70.
38. Robert Koch-Institute: RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - Erfassung der SARS-CoV-2-Testzahlen in Deutschland. Abgerufen am 13. August 2021, von https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Testzahl.html
39. Robert Koch-Institute: RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - Handlungsanleitung für primärdiagnostizierende Labore zur Auswahl von SARS-CoV-2-positiven Proben für die Sequenzierung im Rahmen der Coronavirus-Surveillanceverordnung (CorSurV). https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/DESH/Handlungsanleitung_Labore.html
40. Roche Deutschland Holding GmbH: Testprinzip: Doppel-Antigen-Sandwich-Immunoassay [Illustration]. <https://www.roche.de/diagnostik-produkte/produktkatalog/tests-parameter/electsys-anti-sars-cov-2-s/>
41. Rothe C, Schunk M, Sothmann P, Bretzel G, Froeschl G, Wallrauch C: Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *N Engl J Med*. 2020;382(10):970–1.
42. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J: Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med*. 2020;46(5):846–8.
43. Schneider T, Hildebrandt P, Ronspeck W, Weigelt W, Pauli G: The Antibody Response to the HIV-1 Specific „Out“ (vpu) Protein: Identification of an Immunodominant Epitope and Correlation of Antibody Detectability to Clinical Stages. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1990;6(7):943–50.
44. Shuren J, Stenzel T: The FDA’s Experience with Covid-19 Antibody Tests. *N Engl J Med*. 2021;384(7):592–4.
45. Singanayagam A, Patel M, Charlett A, Lopez Bernal J, Saliba V, Ellis J: Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(32).
46. Siracusano G, Pastori C, Lopalco L: Humoral Immune Responses in COVID-19 Patients: A Window on the State of the Art. *Front Immunol*. 2020;11:1049.
47. Touati R, Haddad-Boubaker S, Ferchichi I, Messaoudi I, Ouesleti AE, Triki H: Comparative genomic signature representations of the emerging COVID-19 coronavirus and other coronaviruses: High identity and possible recombination between Bat and Pangolin coronaviruses. *Genomics*. 2020;112(6):4189–202.
48. Van Damme W, Dahake R, van de Pas R, Vanham G, Assefa Y: COVID-19: Does the infectious inoculum dose-response relationship contribute to understanding heterogeneity in disease severity and transmission dynamics? *Med Hypotheses*. 2021;146:110431.
49. Vygen-Bonnet S, Koch J, Bogdan C, Heininger U, Littmann M, Meerpohl J: Beschluss der STIKO zur 8. Aktualisierung der COVID-19-Impfempfehlung und die dazugehörige wissenschaftliche Begründung. 8. Juli 2021. Abgerufen am 16. November 2021 von <https://edoc.rki.de/handle/176904/8505>

50. Wang H, Wu X, Zhang X, Hou X, Liang T, Wang D: SARS-CoV-2 Proteome Microarray for Mapping COVID-19 Antibody Interactions at Amino Acid Resolution. *ACS Cent Sci.* 2020;6(12):2238–49.
51. WHO: WHO erklärt COVID-19-Ausbruch zur Pandemie. Weltgesundheitsorganisation Regionalbüro für Europa. Abgerufen am 13. Januar 2021, von <https://www.euro.who.int/de/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/news/news/2020/3/who-announces-covid-19-outbreak-a-pandemic>
52. WHO: COVID-19 Clinical management: living guidance (WHO/2019-nCoV/clinical/2021.1). WHO reference number: WHO/2019-nCoV/clinical/web_annex/2021.1. Abgerufen am 10. Oktober 2021 von <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-1>
53. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C: Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* 2020;8(4):420–2.
54. Yan X, Chen G, Jin Z, Zhang Z, Zhang B, He J: Anti-SARS-CoV-2 IgG levels in relation to disease severity of COVID-19. *J Med Virol.* 2022;94(1):380–3.
55. Yao H, Song Y, Chen Y, Wu N, Xu J, Sun C: Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell.* 2020;183(3):730-738.e13.
56. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270–3.

Anhang

Danksagung:

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Veröffentlichung und Vorträge

Holenya, P., Lange, P. J., Reimer, U., Woltersdorf, W., Panterodt, T., Glas, M., Wasner, M., Eckey, M., Drosch, M., Hollidt, J., Naumann, M., Kern, F., Wenschuh, H., Lange, R., Schnatbaum, K. & Bier, F. F. (2021). Peptide microarray-based analysis of antibody responses to SARS-CoV-2 identifies unique epitopes with potential for diagnostic test development. *European Journal of Immunology*, 51(7), 1839–1849. <https://doi.org/10.1002/eji.202049101>

Statusseminar zur COVID-19 Forschung im Rahmen der BMBF Ref522-Förderung, 08.10.2021 Universität Potsdam, Griebnitzsee

Förderung

Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung im Förderbereich: Corona 2020, Grant Nummer: 03COV24A gefördert.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Serologische Längsschnittstudie von SARS-CoV-2 positiven Personen

im Institut für Experimentelle Innere Medizin mit Unterstützung durch

das Bundesministerium für Bildung und Forschung Grant Nummer: 03COV24A

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Paul Joris Lange

Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die
Wissenschaftsbezug hat.

Magdeburg, den

Paul Joris Lange

Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.