

Aus der Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin
Geschäftsführender Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

**DRIED BLOOD SPOTS (DBS)
IM KONTEXT DER ÜBERSICHTS-
UND IMPFEFFEKTIVITÄTSANALYTIK
BEZÜGLICH ANTI-SARS-COV-2-ANTIKÖRPERN**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Anna Carthaus
aus Neuss

promoviert am 11. Juli 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Professorin Dr. rer. nat. K. Brixius
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. G. Fätkenheuer

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgender Person erhalten:

Herr Professor Dr. Mario Thevis.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. Mario Thevis und Herrn Dr. André Knoop von mir selbst ausgeführt worden. Die Testung ausgewählter Daten mittels generalisiertem linearem Modell in R erfolgte mit Unterstützung von Herrn Dr. Thomas Piper. Die restlichen Daten wurden von mir selbst mit GraphPad Prism und Microsoft Excel ausgewertet.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 25. August 2021

Unterschrift:

Danksagung

Zunächst gilt meiner Doktormutter, Frau Professor Dr. Klara Brixius, großer Dank für die Überlassung des faszinierenden und hochaktuellen Themas, ihrer fachlichen und organisatorischen Unterstützung und ihrem wertschätzenden Vertrauen.

Herrn Professor Dr. Mario Thevis möchte ich für die konstante wissenschaftliche Begleitung und Bereitstellung der für die Durchführung der Arbeit notwendigen Hilfsmittel danken. Mich auf seine fundierte und konstruktive Kritik verlassen zu können, war für mich ein extrem wichtiger Rückhalt und roter Faden.

Herrn Dr. André Knoop danke ich für die geduldige Einführung in die experimentelle Arbeit, seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und den klaren Blick in der mitunter herausfordernder Probenkoordination.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans Geyer, ohne den ich niemals die Gelegenheit gehabt hätte, einen Fuß in das Institut für Biochemie zu setzen. Sein steter inhaltlicher und moralischer Beistand war für mich von unschätzbarem Wert.

Ich danke allen Probanden, die mir geduldig und gewissenhaft Blutproben gespendet haben. Ohne sie wäre diese Arbeit mit Sicherheit nicht zustande gekommen.

Der Mitarbeiterschaft des Instituts für Biochemie möchte ich dafür danken, dass sie mich als ärztlichen Exoten so herzlich in ihre Gemeinschaft aufgenommen hat. Die warme Atmosphäre hat dazu geführt, dass ich mich ab dem ersten Tag wohl gefühlt habe.

Und natürlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mir in den leichten und schweren Momenten dieser Arbeit mit offenem Ohr und Zuspruch zur Seite standen. Ohne sie könnte ich diese Zeilen heute nicht schreiben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	10
2.1 SARS-CoV-2	11
2.1.1. Erreger und Krankheitsbeschreibung	11
2.1.2. Antikörperantwort nach Infektion mit SARS-CoV-2	13
2.1.3. Impfung gegen SARS-CoV-2	19
2.1.4. Diagnostische Verfahren	22
2.2 Dried Blood Spots (DBS)	26
2.2.1. Allgemein	26
2.2.2. Anwendung für SARS-CoV-2	28
2.2.3. Volumetrische Probenentnahme	29
2.3 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	30
3. Material und Methoden	31
3.1 Material	31
3.1.1. Chemikalien und Materialien	31
3.1.2. ECLIA-Tests	31
3.1.3. Blutproben	32
3.2 Methoden	34
3.2.1. Probengewinnung und -aufbereitung	34
3.2.2. Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern mittels ECLIA	35
3.2.3. Gewinnung von rDBS aus Plasma	36
3.2.4. Überprüfung des experimentellen Vorgehens und S-Assays	36
3.2.5. Präzisionsüberprüfung der Mitra®-Spitzen	37
3.2.6. Statistische Analyse	37
4. Ergebnisse	38
4.1 Kreuzvalidierung des quantitativen Assays	38
4.1.1. Anti-SARS-CoV-2-Antikörperwerte in DBS und Plasma nach Infektion	38
4.1.2. Anti-SARS-CoV-2-Antikörperwerte in DBS und Vollblut nach Impfung	40

4.1.3.	Charakterisierung des experimentellen Vorgehens und des S-Assays	45
4.1.4.	Präzisionsüberprüfung der Mitra®-Spitzen	46
4.2	Überwachung der quantitativen Antikörperantwort nach Impfung	48
4.3	Machbarkeitsstudie und Untersuchung des Semestereinflusses an der DSHS	52
5.	Diskussion	56
5.1	Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern in DBS	56
5.1.1.	Quantitativer Antikörpernachweis in DBS im Vergleich zu Plasma und Serum	56
5.1.2.	Herausforderungen bei der Probenentnahme	58
5.1.3.	Herausforderungen bei Probenhandhabung und -aufbereitung	60
5.1.4.	Vor- und Nachteile der verwendeten Assays	63
5.2	Überwachung der Antikörperantwort nach Impfung mittels DBS	65
5.2.1.	Verlauf der quantitativen Antikörperantwort in DBS und Zulassungsstudien	66
5.2.2.	Anwendungsmöglichkeiten von DBS im Impfkontext	68
5.2.3.	Antikörper als Schutzkorrelat	69
5.3	Seroprävalenzstudien mittels DBS	72
5.3.1.	Das Potential seroepidemiologischer Daten angesichts statistischer Unsicherheit	72
5.3.2.	Untersuchung des Infektionsgeschehens an der DSHS	74
5.3.3.	Limitationen der Aussagekraft serologischer Assays	76
5.4	Fazit	77
6.	Literaturverzeichnis	78
7.	Anhang	102
7.1	Abbildungsverzeichnis	102
7.2	Tabellenverzeichnis	102
7.3	Zusatztabellen	103

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (<i>angiotensin-converting enzyme 2</i>)
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
ADP	Antikörper-abhängige Phagozytose (<i>antibody-dependent phagocytosis</i>)
ARDS	Akutes Lungenversagen (<i>acute respiratory distress syndrome</i>)
CDC	Zentren für Krankheitskontrolle und -prävention (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
COI	Cutoff-Index
COVID-19	Coronavirus-Erkrankung 2019 (<i>coronavirus disease 2019</i>)
csSerum	Mit Aktivkohle gereinigtes Serum (<i>charcoal stripped serum</i>)
Ct	Zyklusschwellenwert (<i>cycle threshold</i>)
DBS	Getrocknete Blutstropfen (<i>dried blood spots</i>)
E	Hülle (<i>envelope</i>)
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	Enzymimmunoassay (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FDA	US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (<i>Food and Drug Administration</i>)
hCoVs	Menschliche Coronaviren (<i>human coronaviruses</i>)
IgA/ IgG/ IgM	Immunglobulin A/ Immunglobulin G/ Immunglobulin M
IFR	Infektions-Verstorbenen-Anteil (<i>infection fatality rate</i>)
K2E	Ethylendiamintetraessigsäure Dikaliumsalz Dihydrat
LFIA	Lateral Flow Immunoassay
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
M	Membran
mRNA	Boten-RNA (<i>messengerRNA</i>)
N	Nukleokapsid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
RBD	Rezeptorbindungsdomäne (<i>receptor-binding domain</i>)
rDBS	Rekonstituierte DBS
RKI	Robert Koch-Institut
rMitra®	Rekonstituierte Mitra®-Proben
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

RSD	Relative Standardabweichung (<i>relative standard deviation</i>)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
rRT-PCR	Echtzeit reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (<i>real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
S	Spike
SARS-CoV	Schweres akutes respiratorisches Syndrom-Coronavirus (<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>)
SARS-CoV-2	Schweres akutes respiratorisches Syndrom-Coronavirus-2 (<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
VITT	Impfstoffinduzierte immunthrombotische Thrombozytopenie (<i>vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia</i>)
VOC	Besorgniserregende Virusvariante (<i>variant of concern</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)

1. Zusammenfassung

Trotz Aufwendung massiver finanzieller und personeller Ressourcen sowie Einschränkungen des öffentlichen und privaten Lebens ist eine effektive Eindämmung von SARS-CoV-2 bislang nicht gelungen. Der Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern mit Hilfe serologischer Tests stellt in der Pandemiebekämpfung ein wertvolles Hilfsmittel dar, um unerkannt infizierte Personen zu detektieren, die Ausbreitung des Infektionsgeschehens nachzuvollziehen, die Effektivität politischer Maßnahmen zu evaluieren, die entscheidenden Kriterien von Antikörpern als Schutzkorrelat zu untersuchen, die Antikörperentwicklung nach Impfung zu verfolgen oder potentielle Plasmaspender zu identifizieren. Serologische Tests sind jedoch auf die Entnahme einer venösen Blutprobe angewiesen, was ihre Anwendung stark einschränkt. Demgegenüber hat der Einsatz getrockneter Blutstropfen erhebliche Vorteile, da diese eine dezentrale, minimal-invasive und selbständige Probenentnahme ermöglichen. Auch wenn Anti-SARS-CoV-2-Antikörper in DBS in ersten Studien qualitativ nachgewiesen werden konnten, ist der quantitative Nachweis bislang unzureichend untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser erbracht werden. Darüber hinaus sollten die Vorteile von DBS auf Individual- und Kohortenebene genutzt werden, um die longitudinale Antikörperentwicklung nach Impfung sowie die Seroprävalenz unter Beschäftigten der Deutschen Sporthochschule zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Kreuzvalidierung der Antikörperantwort in gepaarten DBS- und Vollblutproben 27 ehemals infizierter und 96 geimpfter Probanden durchgeführt. Anschließend wurde die durch Impfung induzierte Antikörperentwicklung von 27 Probanden mit Hilfe regelmäßiger, selbständig entnommener DBS-Proben parallel zur Impfserie longitudinal überwacht. Berücksichtigt wurden die Impfstoffe BNT162b2, mRNA-1273 und ChAdOx1 nCoV-19 sowie ChAdOx1 nCoV-19 in Kombination mit einem mRNA-Impfstoff. Schließlich wurde durch qualitative Analyse von 557 DBS-Proben DSHS-Beschäftigter vor und nach dem Wintersemester 2020/21 ein großvolumiger Einsatz der Methode sowie der Einfluss des Semesterbetriebs auf das Infektionsgeschehen untersucht. Die Proben wurden mit Hilfe eines quantitativen Immunoassays zur Detektion von Anti-RBD-Antikörpern und eines qualitativen Immunoassays zur Detektion von Anti-N-Antikörpern analysiert.

Zwischen DBS- und Vollblutproben konnte eine lineare Korrelation der Antikörperkonzentration nachgewiesen werden ($R^2 = 0,89$). Zur Ermittlung der Antikörperkonzentration in Serum oder Plasma auf Basis von DBS unter Anwendung des vorgestellten Verfahrens kann ein Umrechnungsfaktor von mindestens zehn angenommen werden. Die selbständige und nicht supervidierte DBS-Entnahme mittels volumetrischer Glaskapillare zeigte keinen Nachteil gegenüber der supervidierten oder durch eine medizinische Fachkraft durchgeführten Entnahme. Der alternative Einsatz einer volumetrischen Microsampling-Technologie erleichterte jedoch die Probenentnahme und -aufbereitung. Hinsichtlich der Antikörperentwicklung nach Impfung zeigten die Teilnehmenden unterschiedliche Verläufe und Antikörperkonzentrationen. Der wesentliche Anstieg der Antikörperkonzentration war erst nach Erhalt der zweiten Impfdosis zu beobachten. Die Kombination von ChAdOx1 nCoV-19 mit einem mRNA-Impfstoff führte zu einer deutlich höheren Antikörperantwort als die homologe ChAdOx1 nCoV-19-

Impfung. Auf Kohortenebene erlaubte der Einsatz von DBS einen hohen und schnellen Probenumsatz mit geringen personellen und finanziellen Mitteln. Der DSHS-Semesterbetrieb mit reduziertem Studierendenkontakt zeigte im Vergleich zum Infektionsgeschehen in der Stadt Köln keine überproportionale Zunahme von SARS-CoV-2-Infektionen unter den Beschäftigten.

Angesichts der fortschreitenden Pandemie wird es in Zukunft von entscheidender Bedeutung bleiben, die Ausbreitung von SARS-CoV-2 zu verfolgen, den Immunstatus auf Individual- und Bevölkerungsebene zu quantifizieren, eine protektive Antikörperschwelle zu definieren und vulnerable Gruppen zu identifizieren. Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DBS für den quantitativen und qualitativen Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern eine zuverlässige Alternative zur Standardmatrix Vollblut darstellen und die Untersuchung sowohl individueller Antikörperreaktionen als auch großer Kohorten in kurzer Zeit mit geringem personellem und finanziellem Aufwand erlauben.

2. Einleitung

Der Ausbruch des neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) hat innerhalb kurzer Zeit zu einer Gesundheitskrise von internationaler Tragweite geführt^{1,2}. Nachdem im Dezember 2019 erste Cluster einer neuen Atemwegserkrankung in der zentralchinesischen Stadt Wuhan registriert wurden^{3,4}, konnte bereits im Januar 2020 das umhüllte, einzelsträngige RNA-Betacoronavirus SARS-CoV-2 als Auslöser von COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) identifiziert und genetisch charakterisiert werden⁵⁻⁸. Am 11. März 2020 erklärte die WHO COVID-19 zur Pandemie⁹.

Seitdem haben die weltweit registrierten SARS-CoV-2-Infektionen 211 Millionen Fälle und 4,4 Millionen Todesfälle überschritten (Stand 25. August 2021)¹⁰. Viele Gesundheitssysteme wurden an den Rand ihrer Belastbarkeit getrieben, manche darüber hinaus. Ein von der WHO eingesetztes Gremium, das *Independent Panel for Pandemic Preparedness and Response*, kritisierte im Mai 2021, dass die Pandemie hätte verhindert werden können – einschließlich ihrer verheerenden Konsequenzen für die globale Gerechtigkeit¹¹.

Obwohl wissenschaftliche Erkenntnisse in beispielloser Geschwindigkeit und Kooperation zusammengetragen und zwischenmenschliche Begegnungen stark eingeschränkt wurden, konnte die Ausbreitung von SARS-CoV-2 nicht eingedämmt werden. Zahlreiche Mechanismen der Infektion sind weiterhin unverstanden. Gleichzeitig müssen konkrete politische Handlungsanweisungen auf Grundlage mitunter lückenhafter Informationen getroffen werden¹².

Die derzeit drängendsten Fragen betreffen die Schutzwirkung vor einer (Re-)Infektion mit SARS-CoV-2 nach Infektion oder Impfung. Auch wenn neutralisierenden Antikörpern diesbezüglich eine zentrale Rolle zugeschrieben wird¹³, sind Dauer und möglicherweise quantifizierbare Schwelle der durch sie vermittelten Schutzwirkung nicht bekannt. Für ein Verständnis von Immunität und Virusausbreitung sind die Überwachung der Immunantwort sowie eine Kenntnis der *tatsächlich* stattgefundenen und stattfindenden Infektionen essentiell, was den Nutzen serologischer Tests unterstreicht¹⁴.

Um das Infektionsgeschehen in der Bevölkerung zu überwachen, wurden verschiedene Testverfahren entwickelt: Während akute Infektionen mittels Nukleinsäureamplifikationstechnik wie der reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bestätigt werden, dienen serologische Tests dem Nachweis von Antikörpern nach Infektion oder Impfung^{15,16}. Antikörper-Tests können Informationen über die Verbreitung von SARS-CoV-2 liefern und zur Identifizierung von Personen beitragen, die immunologisch naiv und somit weiterhin anfällig für das Virus sind. Gleichsam können sie als Ergänzung möglicherweise falsch negativer PCR-Proben, zur Aufdeckung unerkannter Infektionen oder der Einschätzung der Antikörperantwort nach Impfung dienen^{15,17,18}. Die für serologische Tests notwendige Blutentnahme geht jedoch mit einem Infektionsrisiko für testende und zu testende Person einher und erfordert medizinisch geschultes Personal. Insbesondere bei Untersuchungen großer Kohorten und wiederholten Messungen zur Überwachung des Antikörperstatus ist damit ein hoher Kosten- und Zeit-

faktor verbunden – limitierte Ressourcen in einer politisch und ökonomisch angespannten Situation. Zwar stehen Lateral Flow Immunoassays (LFIAs) als Alternative zur Selbstanwendung zur Verfügung, weisen jedoch oft eine geringe Sensitivität auf^{19–21}.

Die Bestimmung von Antikörpern aus getrockneten Blutstropfen (*dried blood spots*, DBS) könnte die beschriebenen Probleme umgehen. DBS können kontaktlos, minimal-invasiv, selbständig und selbst an entlegenen Orten gewonnen werden. Darüber hinaus erfordern sie die Entnahme eines lediglich kleinen Blutvolumens. Dass mittels DBS auch Anti-SARS-CoV-2-Antikörper qualitativ nachgewiesen werden können, konnte inzwischen für den Zustand nach Infektion gezeigt werden^{22–25}. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einsatz von DBS mit einem Fokus auf der quantitativen Nachweisbarkeit von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern experimentell evaluiert und im Kontext der Übersichts- und Impffektivitätsanalytik vertieft werden.

2.1 SARS-CoV-2

2.1.1. Erreger und Krankheitsbeschreibung

Bis zum Ausbruch von SARS-CoV im Jahr 2002 galten humane Coronaviren bei Immunkompetenten als Auslöser lediglich milder Erkrankungen der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts^{26–28}. Die Betacoronaviren SARS-CoV, MERS-CoV und SARS-CoV-2 können jedoch zu schweren Infektionen mit letalem Ausgang führen^{4,29,30}. Die abnehmende Trennung tierischer und menschlicher Lebensräume erleichterte ihnen ab Beginn des 21. Jahrhunderts den Übergang aus tierischen Reservoirs auf den Menschen²⁷.

Coronaviren sind umhüllte, einzelsträngige RNA-Viren. Ihr Genom kodiert für nichtstrukturelle Proteine, die für die Replikation benötigt werden, sowie die vier Hauptstrukturproteine Spike (S), Hülle (E), Membran (M) und Nukleokapsid (N)^{26,31}. Das Spike-Protein von SARS-CoV-2 ist auf der Virusoberfläche exprimiert und verleiht diesem die namensgebende „Krone“. Es induziert die Bildung neutralisierender Antikörper und dient als Zielstruktur zahlreicher Impfstoffe^{32,33}. Das Spike-Protein besteht aus einer N-terminalen S1- und einer transmembranären S2-Einheit, die zu Trimeren zusammengelagert sind. Die S1-Einheit beinhaltet die Rezeptorbindungsdomäne (*receptor-binding domain*, RBD), mit der das Virus am Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2) der Wirtszelle andockt und die Aufnahme in die Zelle induziert. Die anschließende Fusion von Virushülle und Zellmembran wird von der S2-Einheit vermittelt^{5,34,35}. Wrapp et al. beschreiben bei SARS-CoV-2 eine mehr als zehnfach stärkere Affinität des Spike-Proteins an den zellulären Rezeptor als bei SARS-CoV³⁶. Eine hohe Dichte von ACE2-Rezeptoren liegt unter anderem auf Nasenepithelzellen, Typ-II-Pneumozyten, Zellen von Niere, Darm und Herzmuskel vor^{37,38}. In sekretorischen Zellen der Atemwege und Typ-II-Pneumozyten korreliert sie mit steigendem Alter und männlichem Geschlecht³⁹.

Die mediane Inkubationszeit von SARS-CoV-2 beträgt fünf bis sechs Tage^{40,41}. Infizierte Personen leiden meist unter Atemwegsbeschwerden, Fieber, Schnupfen und Störungen des Geruchs- und/ oder

Geschmackssinns⁴². Der Schweregrad der Erkrankung reicht von asymptomatischen Infektionen bis zu schweren Pneumonien mit Lungenversagen und Tod. Bei schweren Verläufen kann es zu akutem Lungenversagen (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) mit sekundären Bakterien- oder Pilzinfektionen kommen. Auch wenn Infektionen sich meist pulmonal manifestieren, können auch andere Organsysteme in vielfältiger Weise betroffen sein^{4,43}. So wurden hämatologische und kardiovaskuläre Komplikationen (thrombotische Ereignisse, Arrhythmien, Myokardschäden, akutes Koronarsyndrom), renale, gastrointestinale und hepatische Schäden, Störungen der Elektrolyt- und Glukoseregulation, neurologische und neuropsychiatrische Erkrankungen, okuläre sowie dermatologische Komplikationen beschrieben⁴³. Die Beeinträchtigungen können über mehrere Wochen oder Monate nach Infektion fortbestehen oder dann erst eintreten, was in der öffentlichen Debatte als „Long Covid“ bezeichnet wird. Hiervon Betroffene leiden häufig unter persistierenden Atembeschwerden, Erschöpfung und kognitiven Einschränkungen^{44,45}.

Pathophysiologisch kann es bei COVID-19 zu direkten Schäden der Wirtszelle durch das Virus, einer Dysregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems durch Herabregulierung von ACE2-Rezeptoren und Schäden oder Entzündungen von Endothelzellen kommen. Gefäßwandverletzungen und Entzündungsgeschehen befördern die Aktivierung des Gerinnungssystems, die Ausbildung von Mikrothromben und eine mikrovaskuläre Dysfunktion. In schweren Fällen kann außerdem eine Dysregulation der Immunantwort (zum Beispiel in Form eines Zytokinsturms) auftreten^{43,46}.

Hinsichtlich einer möglichen Geschlechtsabhängigkeit wurden ähnliche Infektionszahlen bei Frauen und Männern beobachtet, jedoch verlaufen Infektionen bei Männern gravierender und führen häufiger zum Tod⁴⁷. Schwere Verläufe wurden meist im fortgeschrittenen Alter und bei zugrunde liegenden Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-erkrankungen, Diabetes mellitus, Lungenerkrankungen, Krebs, chronischen Nierenerkrankungen, Übergewicht und Rauchen beobachtet^{48,49}. Der Infektions-Verstorbenen-Anteil (*infection fatality rate*, IFR) steigt mit dem Alter exponentiell an⁵⁰. Jedoch können auch Kinder betroffen sein und in seltenen Fällen schwere Verläufe aufweisen^{51,52}.

Die Übertragung von SARS-CoV-2 erfolgt primär über Aerosole und Tröpfchen, die, wie die Gesellschaft für Aerosolforschung aufführt, beispielsweise beim Atmen, Sprechen oder Niesen entstehen⁵³. Das Tragen eines Mund-Nasen-Schutzes sowie das Einhalten eines Sicherheitsabstands zwischen Personen reduziert das Risiko einer Übertragung⁵⁴. Während die Übertragungswahrscheinlichkeit bei längerem Aufenthalt in kleinen, schlecht oder nicht belüfteten Räumen erhöht ist, haben Übertragungen im Außenbereich nur einen geringen Anteil am Infektionsgeschehen⁵³. Eine Übertragung von SARS-CoV-2 über kontaminierte Oberflächen wird diskutiert^{55,56}.

Eine Ansteckung kann sowohl durch symptomatische, als auch präsymptomatische oder gar asymptomatische Personen erfolgen. In einer Übersichtsarbeit von Oran und Topol wird der Anteil asymptomatischer Infektionen an der Gesamtheit der SARS-CoV-2-Infektionen auf mindestens ein Drittel geschätzt⁵⁷. Zwar scheint die Übertragbarkeit des Virus bei asymptomatischen Trägern geringer zu sein als bei symptomatischen, gleichzeitig führt das Fehlen von Symptomen seltener zu protektiven

Verhaltensänderungen, was diesen Effekt unterminiert. In einer CDC-Studie wurde geschätzt, dass 59 Prozent aller Infektionen durch Weitergabe von asymptomatischen Trägern zustande kommen⁵⁸. Allgemein scheint ein geringer Teil der Infizierten für den Großteil der Sekundärinfektionen verantwortlich zu sein⁵² – gemäß einer Studie aus dem chinesischen Hunan können 80 Prozent der Sekundärinfektionen auf lediglich 15 Prozent der primär Infizierten zurückgeführt werden⁵⁹. Zu einer unverhältnismäßig hohen Weitergabe des Virus kommt es bei sogenannten „superspreading events“, bei denen eine infektiöse Person das Virus auf überdurchschnittlich viele Menschen überträgt^{60,61}.

Die Therapie einer SARS-CoV-2-Infektion erfolgt meist supportiv, beinhaltet Sauerstoffversorgung, eine restriktive Flüssigkeitstherapie, die Einleitung von Thromboseprophylaxe oder Antikoagulation, die Prävention oder Behandlung von Ko- und Sekundärinfektionen sowie vorbestehender Erkrankungen. Als antivirales Arzneimittel kann bei Patienten mit Sauerstoffbedarf im frühen Stadium Remdesivir eingesetzt werden; als immunmodulatorisch wirksames Medikament bei Patienten mit Sauerstoffbedarf Dexamethason; im Rahmen klinischer Studien kommen unter anderem monoklonale Antikörper und Rekonvaleszenten-Plasma, antiinflammatorische Medikamente wie die Interleukin-6-Rezeptor-Inhibitoren Tocilizumab und Sarilumab, der Interleukin-1-Rezeptor-Inhibitor Anakinra oder der Januskinase-Inhibitor Baricitinib sowie das Anti-Parasitikum Ivermectin zur Anwendung^{62,63}.

Wie andere Viren auch entwickelt sich SARS-CoV-2 mit der Zeit weiter. Während die meisten Veränderungen keinen Einfluss auf die Viruseigenschaften haben⁶⁴, verschaffen manche Veränderungen einen Fitness-Vorteil, indem sie beispielsweise eine höhere Übertragbarkeit oder Rezeptoraffinität bedingen. So führte der Aminosäureaustausch D614G während der ersten Pandemiewelle im Frühjahr 2020 zu einer Konformationsänderung des Spike-Proteins und bewirkte damit eine fast vollständige Verdrängung des Ursprungstyps⁶⁵. Seit Dezember 2020 wird über die zunehmende Verbreitung von Virusvarianten berichtet, die eine höhere Übertragbarkeit, höhere Virulenz oder reduzierte Kontrollierbarkeit aufweisen und von der WHO als besorgniserregend (*variants of concern*, VOC) eingestuft werden⁶⁶.

Neben der unmittelbaren Konsequenzen, die eine SARS-CoV-2-Infektion für Gesundheit und Leben einer infizierten Person hat, bedingt die Pandemie jedoch auch indirekt eine Übersterblichkeit, da sie eine Überlastung der Gesundheitssysteme und verzögerte Versorgung anderer Erkrankungen bewirkt⁶⁷. Die psychologischen und ökonomischen Auswirkungen der Pandemie werden sich, wenn überhaupt, erst in der Rückschau quantifizieren lassen.

2.1.2. Antikörperantwort nach Infektion mit SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 scheint ungewöhnlich erfolgreich darin zu sein, die frühe angeborene Immunantwort außer Kraft zu setzen, was Sette und Crotty als den möglicherweise großen Trick (*one big trick*) des Virus bezeichnen⁶⁸. Aufgrund der zentralen Rolle, die dementsprechend dem adaptiven Immunsystem in der Infektionsbekämpfung und dem Erfolg von Impfstoffen zukommt⁶⁸, der Möglichkeit sterilisie-

render Immunität durch hohe Titer neutralisierender Antikörper^{69,70} sowie der in dieser Arbeit untersuchten Nachweismethode soll im Folgenden ein Fokus auf die Antikörperantwort nach Infektion mit SARS-CoV-2 gelegt werden. Ihr Verständnis ist grundlegend für die Interpretation und klinische Anwendung serologischer Testergebnisse⁷¹.

Das adaptive Immunsystem reagiert auf eine SARS-CoV-2-Infektion mit der Ausbildung spezifischer Antikörper, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, wobei CD4⁺ T-Zellen die Antikörperantwort aktivieren⁷². Die Antikörperreaktionen sind heterogen, korrelieren aber mit dem Schweregrad der Infektion und der Viruslast⁷³⁻⁸³. Circa fünf bis sieben Tage nach Symptombeginn werden Antikörper vom Typ IgM und IgA sezerniert, sieben bis zehn Tage nach Symptombeginn Antikörper vom Typ IgG⁸⁴. Guo et al. beschreiben das Vorliegen aller drei Antikörperklassen bereits ab dem ersten Tag nach Symptombeginn⁸⁵. Die üblicherweise chronologische Reihenfolge von IgM und IgG scheint bei SARS-CoV-2 variabel zu sein, was ihren diagnostischen Nutzen mindert⁷³. Allerdings könnte dies auch in einer Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen saisonale humane Coronaviren (hCoVs) begründet sein⁸⁶. Es ist unklar, ob Anti-hCoVs-Antikörper Schutz vor einer Infektion oder Hospitalisierung mit SARS-CoV-2 bieten^{86,87}. Bei der überwiegenden Mehrheit der Infizierten ist fünf bis 15 Tage nach Symptombeginn eine Serokonversion in Serum^{68,73,77,79} und Speichel⁸⁸ nachweisbar. Gleichsam berichten zahlreiche Studien vom Ausbleiben einer Serokonversion nach Infektion^{73,75,76,89,90}. Hierbei ist anzumerken, dass je nach verwendetem Assay und Ziel-Antigen eine große Variabilität der serologischen Ergebnisse besteht^{71,91}.

Während alle Antikörper die Eigenschaft haben, an ein Antigen zu binden, verfügen neutralisierende Antikörper darüber hinaus über die Fähigkeit, die Interaktion des Virus mit der Wirtszelle zu verhindern⁹². Ihnen wird zum jetzigen Kenntnisstand das maßgebliche Potential zugeschrieben, sterilisierende Immunität zu vermitteln, also den Schutz davor, sich infizieren und das Virus weitergeben zu können^{69,70}. Demgegenüber beschreibt funktionale Immunität die Fähigkeit, vor einer Erkrankung zu schützen.

Zielstruktur der induzierten Antikörper sind hauptsächlich Spike- und Nukleokapsid-Protein, wobei das Spike-Protein über besonders starke immunogene Eigenschaften verfügt⁹³. Neutralisierende Antikörper richten sich – wie bei anderen Coronaviren auch – primär und wahrscheinlich ausschließlich gegen diese Struktur⁹⁴. 90 Prozent der neutralisierenden Antikörper zielen auf die Rezeptorbindungsdomäne der S1-Einheit⁹⁵, ein geringer Anteil auf deren N-terminale Domäne⁹². Antikörpern gegen die RBD wurde eine zehn- bis 100-fach höhere Neutralisierungskapazität zugeschrieben als Antikörpern gegen die N-terminale Domäne⁹⁶. Antikörper gegen das Nukleokapsid-Protein verfügen aufgrund einer Abschirmung durch virale oder zelluläre Membranen wahrscheinlich nicht über neutralisierende Eigenschaften^{17,94}. Im Zeitverlauf wurden sie etwas früher beobachtet als Antikörper gegen das Spike-Protein⁹⁷.

Für den Krankheitsverlauf ist die Zielstruktur der Antikörper möglicherweise ausschlaggebend: Während Rekonvaleszenz überwiegend Antikörper gegen das Spike-Protein aufwiesen, zielten Antikörper

schwer Erkrankter oder Verstorbener häufiger auf die Nukleokapsid-Struktur^{79,98}. Bei schweren Verläufen ging die Höhe der gegen das Spike-Protein gerichteten IgG mit der Hospitalisierungsdauer und negativen Krankheitsparametern einher, schien aber keinen Prognoseparameter für die Letalität darzustellen. Viel entscheidender hierfür ist wohl die Antikörperkinetik: Je später die Antikörper anstiegen, desto schlechter war die virale Kontrolle und damit das klinische Ergebnis der Infizierten^{75,80,99}.

Die zentrale Schutzwirkung, sei es die Abschwächung einer aktuellen oder zukünftigen Erkrankung oder die vollständige Abwehr einer erstmaligen oder erneuten Infektion, wird neutralisierenden Antikörpern zugeschrieben. Rekonvaleszenten-Seren zeigten fast immer neutralisierende Aktivität – unabhängig von der Symptomatik (auch bei asymptomatischen Probanden) und vom Alter (auch bei Kindern)^{74,76,94,100}. Bei Rhesusaffen und Hamstern reichten schon geringe Titer neutralisierender Antikörper aus, um die Tiere vor einer Reinfektion zu schützen^{101–103}. Bei einem lokal begrenzten SARS-CoV-2-Ausbruch auf einem Fischereiboot waren diejenigen Fischer, die aufgrund einer vorangegangenen Infektion neutralisierende Antikörper aufwiesen, vor einer erneuten Infektion geschützt¹⁰⁴. Die durch neutralisierende Antikörper vermittelte Schutzwirkung wurde ebenfalls beobachtet, wenn die Antikörper durch Impfung induziert wurden^{105,106}. Darüber hinaus wurde eine Korrelation zwischen neutralisierenden Antikörpern und der Eindämmung der *Virusausscheidung* beobachtet, was hinsichtlich einer sterilisierenden Immunität relevant ist¹⁰⁷. Auch eine passive Immunisierung mit neutralisierenden Antikörpern verringerte in Tierstudien und erkrankten Patienten die Viruslast in den Atemwegen^{108,109}. Einen Einfluss auf die Ausbildung neutralisierender Antikörper hat die Intensität der Erkrankung: Bal et al. konnten zeigen, dass die Titer neutralisierender Antikörper bei milden Verläufen nur ein Sechstel der Titer schwerer Verläufe betragen¹¹⁰.

Es ist jedoch verfrüht, neutralisierende Antikörper als alleinigen Biomarker für den Schutz vor einer Reinfektion zu verwenden, zumal eine mögliche Schwelle für diese Schutzwirkung nicht bekannt ist. Ebenso entscheidend oder gar wichtiger könnte die T-Zell-Antwort sein, deren Ausbildung mit einem mildereren Krankheitsverlauf korreliert ist und auch bei seronegativen Infizierten beobachtet werden konnte^{111,112}. Die höhere Anfälligkeit älterer Menschen gegenüber SARS-CoV-2 könnte nicht zuletzt in ihrem kleineren Pool naiver T-Zellen begründet sein^{68,111}.

Da die Durchführung von Neutralisationstests sehr aufwändig ist, wurde die Neutralisationskapazität von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern in vielen Studien nicht getestet. Aber auch ohne diese Kenntnis konnte eine Korrelation zwischen der Antikörperantwort und protektiven Effekten beobachtet werden: Beim Ausbruch von SARS-CoV-2 auf einem Schulausflug blieben alle Schüler mit bereits vorliegenden und nicht spezifizierten Antikörpern vor einer Reinfektion verschont¹¹³. Die Nachverfolgung englischer Gesundheitsarbeiter über sechs Monate zeigte ein deutlich reduziertes Risiko einer Reinfektion bei Vorliegen von Anti-Spike oder Anti-Nukleokapsid-Antikörpern¹¹⁴. In einer amerikanischen Kohortenstudie mit drei Millionen Teilnehmenden war das Risiko für einen positiven PCR-Test ab 90 Tagen nach Antikörpernachweis um den Faktor zehn gemindert¹¹⁵. Eine Beobachtungsstudie aus Dänemark zeigte beim Vergleich von erster und zweiter Infektionswelle (März bis Mai versus September

bis Dezember 2020) eine 80-prozentige Schutzwirkung (Anmerkung: zu dieser Zeit waren in Dänemark keine Virusvarianten dominant)¹¹⁶. Eine prospektive Multicenter-Studie in England zeigte eine 84-prozentige Risikoreduktion für eine Reinfektion bei vorangegangener Infektion. Bei vorangegangener symptomatischer Infektion betrug die Risikoreduktion 93 Prozent (Anmerkung: während des letzten Teils des Beobachtungszeitraums zirkulierte die besorgniserregende Variante B.1.1.7 und verursachte etwa 50 Prozent aller Infektionen, schien aber keinen Einfluss auf die Reinfektionsrate zu haben)¹¹⁷. Auch die Verabreichung von IgG-Rekonvaleszenzplasma im frühen Stadium von COVID-19 schien dem Fortschreiten der Erkrankung entgegenzuwirken¹¹⁸. Laut Siggins et al. ist davon auszugehen, dass die Messung von Antikörpern gegen die RBD oder S1-Einheit durch robuste serologische Assays mit dem Schutz vor den meisten natürlichen Expositionen gegenüber SARS-CoV-2 korreliert⁶⁹. Nicht alle Autoren teilen jedoch diese Auffassung und äußern sich eher zurückhaltend⁷¹.

Hinsichtlich der Möglichkeit einer Reinfektion werden aufgrund der kurzen Beobachtungsperiode Parallelen zu saisonalen Coronaviren gezogen. Bei diesen ist eine Reinfektion nicht untypisch und tritt häufig zwölf Monate nach Infektion auf¹¹⁹. Da bei SARS-CoV-2 wiederholte Infektionen mit phylogenetisch unterschiedlichen Linien beobachtet wurden, scheinen Reinfektionen auch bei diesem Virus möglich zu sein¹²⁰. In einer Preprint-Studie aus den Niederlanden, die die Antikörperantwort von 17 vermutlich Reinfizierten untersucht hat, wurde bei den Reinfizierten eine schnellere und stärkere Antikörperantwort gegen die RBD und S1-Einheit gefunden als bei erstmalig Infizierten¹²¹. Die Antikörper der Reinfizierten wiesen darüber hinaus eine höhere Avidität auf und die Betroffenen zeigten weniger oder mildere Symptome.

Fraglich ist weiterhin, wie lange Anti-SARS-CoV-2-Antikörper nach Infektion fortbestehen. Dabei ist insbesondere die Verfolgung milder und asymptomatischer Verläufe von Interesse, da diese die Mehrzahl der Infektionen darstellen^{73,122}. Einzelne Kohortenstudien weisen darauf hin, dass die Antikörperantwort über mehrere Monate andauert: So ließen sich in Studien aus Belgien¹²³, Island⁷⁸ und den USA⁹⁴ beim Großteil der Teilnehmenden auch bei leichter oder mittelschwerer Erkrankung mindestens vier Monate nach Infektion Antikörper nachweisen. Eine Studie aus Großbritannien fand selbst beim Großteil asymptomatischer Betroffener vier Monate nach Infektion neutralisierende Antikörper¹²⁴. In einer amerikanischen Langzeitbeobachtung von SARS-CoV-2-Infizierten mit einer repräsentativen Verteilung der Krankheitsintensität über sechs bis acht Monate zeigte sich zwar eine stetige Abnahme der IgG-Antikörper gegen Nukleokapsid, Spike und RBD, jedoch waren am Ende des Beobachtungszeitraums noch bei 90 Prozent der Teilnehmenden Anti-Spike und Anti-RBD IgG sowie neutralisierende Antikörper nachweisbar⁷⁰. Eine zehnmonatige Beobachtungsstudie aus Österreich zeigte bei fast 80 Prozent der ehemals Infizierten mit meist mildem oder moderatem Verlauf ein Fortbestehen neutralisierender Antikörper ohne relevanten Rückgang⁸¹. Demgegenüber dokumentieren jedoch zahlreiche Studien eine Abnahme der Antikörperkonzentration bei bis zu achtmonatiger Verfolgung^{83,125-130}. Bei initial hohen Antikörper-Titern scheint es zu einer kontinuierlichen Abnahme zu kommen, während bei initial niedrigen Titern zunächst ein verspäteter Anstieg und erst im Anschluss

stattfindender Rückgang beobachtet wurde⁹⁴. Zudem scheinen die gegen die Nukleokapsid-Struktur gerichteten Antikörper schneller abzunehmen als diejenigen gegen das Spike-Protein: Während neutralisierende und Spike-spezifische Antikörper mindestens fünf bis sieben Monate nachweisbar bleiben, waren Nukleokapsid-Antikörper nach diesem Zeitraum häufig nicht mehr vorhanden^{77,130}. Gleichzeitig zeigte eine Verfolgung des Niveaus neutralisierender Antikörper über drei Monate ebenfalls ein schnelles Abfallen auf teilweise nicht mehr detektierbare Werte¹³¹.

Hinsichtlich der erreichten Anti-SARS-CoV-2-Antikörperkonzentration beobachteten Yamayoshi et al., dass die höchsten Antikörpertiter schwer Betroffener zwar initial höher sind als diejenigen mild oder moderat Betroffener, der Antikörperrückgang schwer Betroffener jedoch massiver ausfällt, sodass nach 60 Tagen bei allen Patienten ähnliche Antikörpertiter vorliegen¹³². Wajnberg et al. beobachteten, dass sehr niedrige Anfangstitel im Laufe der Zeit auf nicht nachweisbare Werte fallen⁹⁴. Dan et al. beschreiben eine heterogene Antikörperkinetik auch in der Langzeitbeobachtung von sechs bis acht Monaten⁷⁰. Angesichts der unterschiedlichen Antikörperreaktionen und -dynamiken kommt eine prospektive Kohortenstudie aus Singapur zu dem Schluss, dass die Langlebigkeit der Immunantwort nach Infektion mit SARS-CoV-2 nur auf individueller Ebene bestimmt werden kann¹³³. Dies unterstreicht den Mehrwert individueller serologischer Testreihen für die Überwachung der Immunantwort jedes Einzelnen.

Bei Differenzierung der Antikörpertypen wurde eine schnelle Abnahme von IgM und IgA beobachtet, während IgG länger persistieren^{78,88,134}. In einer Verfolgung mild oder moderat Betroffener über 31 Wochen nahmen neben den IgM- und IgA-Antikörpern auch die neutralisierenden Antikörper ab, während die IgG-Antikörper bei allen Teilnehmenden nachweisbar blieben¹²⁹. Bei einer Untersuchung von 3600 Haushalten im chinesischen Wuhan zeigte sich: Neun Monate nach Ausbruch von SARS-CoV-2 lagen bei 91 Prozent derjenigen, die ursprünglich IgG-Antikörper vorwiesen, weiterhin IgG vor; von IgA-Antikörpern hingegen waren nur noch 22 Prozent vorhanden (bei 3,5 Prozent der Teilnehmer nach ursprünglichen 15,8 Prozent)¹³⁴.

Da eine längere Beobachtung der Antikörperantwort bei SARS-CoV-2 aufgrund der Neuartigkeit des Virus nicht möglich ist, können Beobachtungen nach Infektion mit SARS-CoV zur Einschätzung der Antikörperpersistenz nützlich sein⁹¹. Bei Verfolgung ursprünglich hospitalisierter SARS-CoV-Patienten über drei Jahre wurde eine Abnahme von IgG und neutralisierenden Antikörpern beobachtet^{135,136}. Jedoch ließen sich noch zwölf Jahre nach Infektion Antikörper vom Typ IgG nachweisen¹³⁷. Anderson et al. konnten bei vereinzelt Patienten noch 17 Jahre nach Infektion das Vorliegen neutralisierender Antikörper beobachten¹³⁸. Die Dauer der Nachweisbarkeit korrelierte mit der Schwere des Verlaufs¹³⁹.

Neben neutralisierenden Eigenschaften der Antikörper wird auch ihrer Fähigkeit zur Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität und Phagozytose (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC, und *antibody-dependent phagocytosis*, ADP) eine wichtige antivirale Funktion zugesprochen, die mit reduzierter Krankheitsschwere und Mortalität einhergeht^{99,140,141}. Während in einer Studie vier

Monate nach Symptombeginn nur noch bei 70 Prozent der Infizierten neutralisierende Aktivität nachgewiesen werden konnte, blieb die Fähigkeit zu ADCC/ ADP in 94 Prozent bestehen¹⁴⁰. Die neutralisierende Aktivität von Antikörpern korrelierte unabhängig vom Schweregrad der Erkrankung mit ihrer Fähigkeit, ADCC zu vermitteln¹⁴². Zusätzlich wurde eine Korrelation zwischen ADCC und dem Level von Anti-Spike IgG gefunden¹²⁹. Gleichsam berichten Liu et al. von Antikörpern, die die Infektiosität des Virus nicht eindämmen, sondern vielmehr erhöhen¹⁴³. Diese sind gegen die N-terminale Domäne gerichtet, unterstützen die Bindungsfähigkeit des Virus an den ACE-2-Rezeptor und wurden vornehmlich bei schwer Erkrankten gefunden.

Es ist unwahrscheinlich, dass die Persistenz von Serum-Antikörpern die einzige Determinante einer lang anhaltenden Immunität ist. Vielmehr scheint SARS-CoV-2 ein nachhaltiges zelluläres Immungedächtnis zu induzieren: Bereits bei milden und moderaten Verläufen von COVID-19 ließ sich vier Monate nach Infektion ein konstanter Anstieg S-spezifischer IgG+ Gedächtnis-B-Zellen auf ein medianes Niveau von 0,8 Prozent aller IgG+ Gedächtnis-B-Zellen beobachten¹³⁰. Auch acht Monate nach Infektion zeigte sich die Anzahl RBD-spezifischer IgG+ Gedächtnis-B-Zellen konstant¹²⁹. Wie Stephens und McElrath schreiben, sollte ein früher Rückgang neutralisierender Antikörper daher nicht beunruhigen⁸⁴. Vielmehr sei entscheidend, auf welchem Niveau sich die Antikörper *langfristig* einfinden. Während die anfänglichen Antikörper wahrscheinlich von Plasmablasten produziert werden und zwei bis drei Wochen nach Symptombeginn ihre Maximalkonzentration erreichen, werden die anhaltenden Antikörpertiter wahrscheinlich von langlebigen Plasmazellen im Knochenmark produziert⁹⁴. Turner et al. konnten sieben bis acht Monate nach Infektion langlebige Plasmazellen im Knochenmark moderat betroffener Patienten nachweisen¹⁴⁴. Die von Gedächtnis-B-Zellen exprimierte Antikörper weisen eine größere somatische Hypermutation, Resistenz gegen RBD-Mutationen und erhöhte Potenz auf, was auf eine fortgesetzte Evolution der humoralen Antwort hindeutet¹²⁸. Darüber hinaus wurde bei einigen Patienten vier Monate nach Infektion eine Antigenpersistenz im Dünndarm beobachtet, die zu einer konstanten Weiterentwicklung der Antikörper beitragen könnte¹²⁸.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Dauer, Robustheit und Schutzvermögen der Antikörperantwort nach Infektion mit SARS-CoV-2 noch immer nicht abschließend geklärt sind. Dies gilt insbesondere für den Zusammenhang zwischen Antikörperspiegel und dem Schutz vor Reinfektion. Auch wird sich zeigen, wie stabil die Antikörperkonzentrationen im Zeitverlauf sind und welche Konsequenz ihre potentielle Abnahme für die Schutzwirkung hat. Weiterhin ist fraglich, welchen Einfluss neu auftretende Virusvarianten haben werden, zumal für diese eine Resistenz gegenüber der Neutralisierung durch Plasma Rekonvaleszenten oder Geimpfter berichtet wurde¹⁴⁵.

Bei allen zitierten Studien muss berücksichtigt werden, dass die Beobachtungen auch durch Faktoren wie Verhaltensänderungen nach Infektion oder weniger ansteckende Virusvarianten beeinflusst worden sein können. Extreme Dauer und Höhe viraler Exposition könnten eine Immunität gegen SARS-CoV-2 jedoch unterminieren⁶⁹.

2.1.3. Impfung gegen SARS-CoV-2

Impfstoffe werden derzeit als das wichtigste Instrument im Kampf gegen die SARS-CoV-2-Pandemie angesehen. Dank Vorkenntnissen und erster Impfstoffstudien im Rahmen von SARS und MERS, der Bestätigung der zentralen Rolle des Spike-Proteins auch beim neuartigen Coronavirus, einer international kooperierenden Wissenschaftsgemeinschaft sowie massiver finanzieller Unterstützung, konnte die Impfstoffentwicklung zur Eindämmung von SARS-CoV-2 in beispielloser Geschwindigkeit vorangetrieben werden. Aktuell (Stand 25. August 2021) befinden sich 296 Impfstoffkandidaten in der Entwicklung¹⁴⁶. Zwischen Dezember 2020 und März 2021 hat die Europäische Arzneimittelagentur auf Grundlage randomisierter, verblindeter und kontrollierter Studien vier Impfstoffe zugelassen, die auch in Deutschland eingesetzt werden¹⁴⁷: Zwei in Lipid-Nanopartikel eingekapselte Impfstoffe auf mRNA-Basis (BNT162b2 von BioNTech/Pfizer und mRNA-1273 von Moderna) sowie zwei rekombinante Schimpansen-Adenovirus-Vektoren (ChAdOx1 nCoV-19 von AstraZeneca und Ad26.COV2.S von Johnson & Johnson/ Janssen). Sie alle kodieren für das Spike-Protein.

Impfstoffe lösen in kontrollierter Form eine Immunantwort aus, die vor späterer Infektion oder Erkrankung mit einem spezifischen Pathogen schützt¹⁴⁸. Ähnlich dem Zustand nach Infektion reagiert das adaptive Immunsystem auf eine Impfung mit einer humoralen und zellulären Immunantwort, wobei Antikörpern eine maßgebliche Schutzwirkung zugeschrieben wird¹⁴⁸. Im Rahmen der Zulassungsstudien wurden die Impfstoffe auf Sicherheit und funktionale Immunität überprüft, nicht jedoch auf ihre Fähigkeit, sterilisierende Immunität herbeizuführen.

BNT162b2 zeigte ab einer Woche nach Zweitimpfung eine Effektivität von 95 Prozent, eine symptomatische SARS-CoV-2-Infektion zu verhindern¹⁴⁹, mRNA-1273 ab zwei Wochen nach Zweitimpfung eine Effektivität von 94,1 Prozent¹⁵⁰. Bei ChAdOx1 nCoV-19 wurde ab zwei Wochen nach Zweitimpfung eine durchschnittliche Effektivität von 66,7 Prozent berichtet¹⁵¹. (Dabei hatte jedoch der Abstand zwischen erster und zweiter Impfung einen Einfluss auf das Ergebnis: Betrug dieser mehr als zwölf Wochen, wurde eine Effektivität von 81,3 Prozent beobachtet; ein Impfabstand von weniger als sechs Wochen ging mit einer Effektivität von 55,1 Prozent einher.) Für Ad26.COV2.S wurde ab zwei Wochen nach Applikation eine Effektivität von 66,9 Prozent berichtet¹⁵².

Zur Einschätzung des Transmissionsrisikos unter Realbedingungen wurden und werden Populationsstudien durchgeführt, die teilweise noch nicht peer-reviewed sind. Thompson et al. konnten mittels wöchentlicher Selbsttestung von fast 4000 Teilnehmenden eine 90-prozentige Schutzwirkung der mRNA-Impfstoffe BNT162b2 und mRNA-1273 nachweisen, eine PCR-positive Infektion zu verhindern (USA)¹⁵³. Hall et al. fanden eine 85-prozentige Effektivität von BNT162b2 (Großbritannien)¹⁵⁴, Dagan et al. bei Testung von über einer Million mit BNT162b2 Geimpften eine 92-prozentige Effektivität (Israel)¹⁵⁵. Pritchard et al. konnten bei Verfolgung von über 370.000 Probanden eine Effektivität von 70 Prozent durch Impfung mit BNT162b2 oder ChAdOx1 nCoV-19 nachweisen, ohne Unterschiede zwischen den Impfstoffen zu beobachten (Großbritannien)¹⁵⁶. Wurde trotz Impfung eine Infektion nachgewiesen, so war deren Ct-Mittelwert (*cycle threshold*) höher als bei naiven Infizierten, was

auf eine niedrigere durchschnittliche Viruslast hindeutet^{15,156,157}. Eine Impfung mit BNT162b2 oder ChAdOx1 nCoV-19 führte weiterhin zu einer 40- bis 50-prozentigen Risikoreduktion, das Virus bei dennoch erfolgter Infektion auf Haushaltsmitglieder zu übertragen¹⁵⁸. Wie Burioni und Topol schlussfolgern, scheinen Impfstoffe die Replikation und Weitergabe von SARS-CoV-2 erfolgreich zu unterbinden¹⁵⁹.

Angesichts der beobachteten Abnahme neutralisierender Antikörper nach Infektion mit SARS-CoV-2 folgern einige Autorinnen und Autoren, dass Impfungen zur Etablierung einer dauerhaften Schutzwirkung eine deutlich stärkere Antikörperantwort auslösen müssten als Infektionen¹³⁰. Die bislang zugelassenen Impfstoffe scheinen diese Prämisse teilweise zu erfüllen: In Phase 1 und 2 Studien von BNT162b2 lagen die Titer neutralisierender Antikörper eine Woche nach Zweitimpfung 3,8- (18- bis 55-Jährige) beziehungsweise 1,6-fach (65- bis 85-Jährige) über dem Niveau Rekonvaleszenter¹⁶⁰. Eine Verfolgung der jüngeren Gruppe über zwei Monate zeigte im Verlauf eine Abnahme der Antikörpertiter, jedoch lagen diese weiterhin über dem Niveau Rekonvaleszenter¹⁶¹. mRNA-1273 zeigte neutralisierende Antikörpertiter oberhalb des Medians rekonvaleszenter Proben¹⁶², außerdem eine Persistenz über sechs Monate nach Zweitimpfung¹⁶³. ChAdOx1 nCoV-19 zeigte neutralisierende Titer im ähnlichen Bereich wie rekonvaleszente Plasmaproben nach mildem Verlauf^{164,165}. Auch Ad26.COVS zeigte im Vergleich mit rekonvaleszentem Serum ähnliche Neutralisationstiter¹⁶⁶. Problematisch ist, dass diese Studien unterschiedliche Immunoassays und Standards für „Rekonvaleszenz“ verwenden¹³. Khoury et al. haben die in Phase 1 und 2 Studien beobachteten, neutralisierenden Titer zum jeweils verwendeten rekonvaleszenten Titer normalisiert und mit Effektivitätsbeobachtungen der Phase 3 Studien in Beziehung gesetzt. Dabei fanden sie eine hohe, nicht-lineare Korrelation zwischen durchschnittlichem Neutralisationslevel und Schutzwirkung¹³.

Bei Menschen mit durchlebter SARS-CoV-2-Infektion scheint die Verabreichung einer einzigen Impfstoff-Dosis die Immunität zu erhöhen und auch gegen neue Virusvarianten zu schützen¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. Dabei zeigten Rekonvaleszente nach Einfachimpfung mit einem mRNA-Impfstoff sogar höhere Titer als immunologisch Naive nach Zweifachimpfung¹⁶⁸. Andreano und Rappuoli vermuten, dass eine Booster-Impfung zweifach Geimpfter mit Impfstoffen der ersten Generation ebenfalls ausreichenden Schutz vor besorgniserregenden Varianten bieten könnte⁹⁶. Zugleich führte die Zweitimpfung Rekonvaleszenter zu keiner weiteren Erhöhung des Antikörpertiters¹⁶⁸. Unklar ist, wie lang die beobachtete Antikörperantwort anhält.

Auch wenn Impfungen hohe Antikörperlevel induzieren können, könnten sie Infektionen insofern unterlegen sein, als sie bei intramuskulärer Applikation wahrscheinlich keine mukosale Immunität hervorrufen^{171,172}. Dies könnte bedeuten, dass Impfstoffe zwar eine funktionale, jedoch keine sterilisierende Immunität bewirken¹⁷³. Ein weiterer Nachteil könnte sein, dass impfstoffinduzierte Antikörper sich in ihrer Zielstruktur auf eine ausgewählte Struktur des Virus beschränken – während durch Infektion hervorgerufene Antikörper sich auch gegen andere Strukturen von SARS-CoV-2 richten können¹⁷¹.

Um überhaupt wirken zu können, sind Impfstoffe auf ein funktionierendes Immunsystem angewiesen. Dies ist nicht immer der Fall. So wurde beispielsweise bei Empfängern von Organtransplantaten, Dialysepatienten oder Patienten mit malignem Lymphom eine reduzierte oder gar vollständig ausbleibende Antikörperbildung beobachtet¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Eine Anti-CD 20-Therapie scheint die Serokonversion ebenfalls zu verhindern¹⁷⁷. Weiterhin scheint eine bloße Einfachimpfung bei älteren Menschen eine geringere Neutralisierungskapazität (auch gegenüber VOC) herbeizuführen, was durch Zweifachimpfung jedoch ausgeglichen werden kann¹⁷⁸.

Das Impfstoff-vermittelte Schutzpotential hängt nicht nur von neutralisierenden Antikörpern, sondern auch von einer effektiven T-Zell-Antwort ab¹⁹. Für die in dieser Arbeit diskutierten Impfstoffe konnte diese beobachtet werden^{160,164,179,180}. Tarke et al. konnten zudem zeigen, dass T-Zellen ehemals Infizierter oder Geimpfter (mRNA-1273 oder BNT162b2) auch Varianten von SARS-CoV erkennen¹⁸¹.

Weiterhin beruht der Erfolg eines Impfstoffs auf einem funktionierenden Immungedächtnis⁷⁰. Dieses besteht aus Gedächtnis-B-Zellen, Antikörpern und Gedächtnis-CD4⁺ oder Gedächtnis-CD8⁺ T-Zellen. Turner et al. konnten durch Punktion axillärer Lymphknoten zeigen, dass BNT162b2 zwölf Wochen nach vollständiger Impfung ein annähernd konstantes Niveau spezifischer B-Zellen und Plasmablasten in Keimzentren induziert, was auf eine langlebige B-Zell-Antwort durch Impfung hindeutet¹⁸².

Nichtsdestotrotz vermitteln Impfstoffe keinen 100-prozentigen Schutz vor einer Infektion oder Erkrankung. Das amerikanische CDC definiert als *vaccine breakthrough cases* Personen, bei denen SARS-CoV-2-RNA oder -antigen in einer Atemwegprobe nachgewiesen wurde, welche mindestens 14 Tage nach Abschluss der primären Serie eines von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen COVID-19-Impfstoffs entnommen wurde¹⁸³. Diese Fälle sind jedoch in der Regel mit weniger schweren Verläufen der Erkrankung verbunden^{184,185}.

Unsicher ist weiterhin, wie groß die Schutzwirkung der bislang verwendeten Impfstoffe gegenüber neu auftretenden Virusvarianten ist und ob, beziehungsweise wie schnell, die Impfstoffe angepasst werden können⁹⁶. Einige Impfstoffe zeigten gegenüber Virusvarianten eine reduzierte Effektivität und zum Teil niedrigere Titer neutralisierender Antikörper^{96,186-188}. Nichtsdestotrotz scheint eine vollständige Impfung auch in diesen Fällen Schutz vor schweren Verläufen zu bieten¹⁸⁹.

Ab Ende Februar 2021 wurden nach Impfung mit ChAdOx1 nCoV-19 oder Ad26.COV2.S vereinzelte Fälle ungewöhnlicher thrombotischer Ereignisse in Kombination mit einem Abfall der Thrombozytenzahl beobachtet. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde als impfstoffinduzierte immunthrombotische Thrombozytopenie (*vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia*, VITT) beschrieben^{190,191}. Das erhöhte Risiko für diese Ereignisse bei gleichzeitig niedrigem Risiko für schwere COVID-19-Verläufe veranlasste die Ständige Impfkommission zu der Empfehlung, dass Personen unter 60 Jahren eine Zweitimpfung mit einem mRNA-Impfstoff erhalten sollen¹⁹². Aufgrund der überlegenen Immunantwort dieses Impfschemas im Vergleich zur homologen Impfung mit ChAdOx1 nCoV-19¹⁹³ wurde die Empfehlung im Verlauf altersunabhängig ausgesprochen¹⁹⁴.

Auch wenn im Rahmen der SARS-CoV-2-Pandemie wissenschaftliche Erkenntnisse in ungekannter Geschwindigkeit zusammengetragen wurden, bleiben zahlreiche Fragen offen: Wie lang persistiert die Antikörperantwort nach Impfung? Welchen Verlauf zeigt sie im Vergleich zur Antikörperantwort nach natürlicher Infektion? Welchen Effekt haben Booster-Impfungen? Wann sind sie sinnvoll, wann notwendig? Welchen langfristigen Effekt zeigen heterologe Impfschemata? Reduzieren Impfungen nur das Auftreten symptomatischer Erkrankungen oder können sie auch sterilisierende Immunität vermitteln? Angesichts knapper Ressourcen: Sollten primär diejenigen geimpft werden, die eine starke Antikörperantwort ausbilden und zum nachhaltigen Erreichen einer Herdenimmunität beitragen könnten oder stattdessen vulnerable Gruppen Vorrang haben?

2.1.4. Diagnostische Verfahren

Die Nachweismethoden für SARS-CoV-2 sind vielfältig und dienen der Beantwortung von Fragen auf Individualebene (Ist eine Person akut infiziert? Kann sie das Virus weitergeben? Liegt eine Virusvariante vor? War eine Person bereits in der Vergangenheit infiziert? Welche Immunantwort bildet sie nach Infektion oder Impfung? Wie lang hält diese an? Ist eine Booster-Impfung notwendig?) sowie auf Kohortenebene (Welcher Anteil einer Gruppe war bereits infiziert? Wie viele Infizierte wurden nicht erfasst? Wie entwickelt sich das Infektionsgeschehen im Zeitverlauf? Welche Berufsgruppen/ Altersklassen/ Wohnorte sind häufiger betroffen als andere?).

Die frühzeitige Identifizierung einer infizierten Person ist essentiell, um effektive Maßnahmen gegen die unkontrollierte Verbreitung des Virus einleiten zu können. Dies erfordert schnelle und akkurate Testverfahren. Dank der frühzeitigen Sequenzierung und Freigabe des viralen Genoms auf einer offenen Plattform konnten nukleinsäurebasierte Tests entwickelt werden, allen voran die Echtzeit reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time reverse transcription polymerase chain reaction*, rRT-PCR)¹⁹⁵, die seither millionenfach zur Diagnose von SARS-CoV-2-Infektionen eingesetzt wurde. Mittels Amplifikation der viralen RNA aus Nasen- oder Rachenabstrich wird der Erreger in der rRT-PCR direkt nachgewiesen, wobei die Detektionsrate in Nasopharynx-Proben derjenigen in Oropharynx-Proben überlegen ist^{196,197}. Auch bronchoalveoläre Lavage, Sputum oder Trachealsekret, Vollblut, Serum oder Stuhl eignen sich für den RNA-Nachweis¹⁶. Im Sinne einer besseren Tolerierbarkeit wurden alternative Matrices (zum Beispiel Speichel, Rachenspülwasser, Ausatemluft) mit variabler Ergebnisqualität^{15,198} und die angeleitete Selbstbeprobung mit vergleichbaren Ergebnissen zur Probenentnahme durch geschultes Personal getestet¹⁹⁹. Für Gebiete mit eingeschränkten Ressourcen wurden isotherme genombasierte Tests entwickelt²⁰⁰. Zur Detektion besorgniserregender Virusvarianten kommen PCR-basierte Genotypisierungsassays und Gesamtgenomsequenzierungen zum Einsatz.

Neben ihrer standardmäßigen Verwendung für den Nachweis einer akuten Infektion könnten PCR-Tests auch eine epidemiologische Funktion erfüllen: Hay et al. konnten zeigen, dass sich aus einmali-

gen quantitativen PCR-Tests unter Verwendung des Ct-Werts Rückschlüsse auf die Infektionsdynamik auf Populationsebene ziehen lassen, da Ct-Werte sich im Verlauf der Infektion verändern. Die Autorinnen und Autoren schlussfolgern, dass sich dadurch Schätzungen der Bevölkerungsinzidenz verbessern ließen – „ein Maß, das ohne serologische Studien oft schwer zu erfassen ist“²⁰¹.

Auch wenn die rRT-PCR in der SARS-CoV-2-Diagnostik den Ruf des Goldstandards genießt, ist dieser nicht unumstritten²⁰²: So wurden – selbst bei Vorliegen positiver radiologischer Befunde – zahlreiche falsch negative Testergebnisse berichtet^{196,203,204}. Ein systematischer Review dokumentierte bis zu 33 Prozent falsch negativer Befunde²⁰⁵. Gründe können fehlerhafte Probenentnahmen, zu geringe Probenmengen, ein ungünstiger Entnahmezeitpunkt, Transport- oder Laborfehler sein. Neue PCR-Assays werden häufig an schwer kranken Patienten getestet – unter idealisierten Bedingungen, die den Umständen in der realen Welt oft nicht entsprechen²⁰⁶. Aufgrund der begrenzten Aussagekraft negativer Testergebnisse rät das Robert Koch-Institut daher von der massenhaften Testung asymptomatischer Personen mittels rRT-PCR im Sinne eines Screenings ab¹⁵. Auf der anderen Seite können Virusfragmente auch bei asymptomatischen Patienten noch Wochen nach Infektion persistieren^{107,207,208}. Kommerziell erhältliche PCR-Tests sind nicht in der Lage, zwischen vermehrungsfähigem Virus und toten Fragmenten zu unterscheiden und somit eine Aussage über die akute Infektiosität zu treffen¹⁷. Diese kann lediglich mittels Virusanzucht nachgewiesen werden, was jedoch sehr aufwändig und wenig praktikabel für ein großes Probenaufkommen wie bei SARS-CoV-2 ist¹⁹⁶. Weitere Nachteile von PCR-Tests sind ihre lange Durchlaufzeit, die Notwendigkeit von geschultem Personal und sicherer Laborausstattung sowie eine leichte Kontaminierbarkeit²⁰⁹.

Als Ergänzung (oder perspektivischer Ersatz) von PCR-Tests können Antigentests dienen, deren Funktionsprinzip auf der Detektion viraler Proteine basiert. Sie können laborbasiert (fluoreszenz- oder chemilumineszenzbasiert) oder in Form von Lateral Flow Assays als Point-of-Care-Tests eingesetzt werden. Antigentests sind preiswert, können selbständig durchgeführt werden und zeigen vornehmlich bei hoher Viruslast eine hohe Sensitivität²¹⁰. Aufgrund ihrer schnellen Durchführbarkeit eignen sie sich insbesondere dann, wenn ein Ergebnis kurzfristig erforderlich ist. Die Detektionsrate von Antigentests ist abhängig von der Virusmenge in der entnommenen Probe. Die Tests zeigen insgesamt eine variable sowie im Vergleich zur rRT-PCR geringere Sensitivität²¹⁰.

Auch serologische Tests haben das Potential, die Standardmethode PCR zur Diagnose von COVID-19 zu ergänzen, um falsch negative Ergebnisse angesichts einer abnehmenden Virusausscheidung in den oberen Atemwegen zu korrigieren¹⁷. Ihr Funktionsprinzip basiert auf der Detektion von Antikörpern (IgM, IgG, IgA oder eine Kombination der Genannten) gegen spezifische Strukturen von SARS-CoV-2 (meist Spike, RBD oder Nukleokapsid). Die Bandbreite serologischer Tests erstreckt sich von schnell durchführbaren Lateral Flow Immunoassays (LFIAs) über zeitaufwändigere Enzymimmunoassays (ELISAs) oder Neutralisationstests, Microarrays und Zytometrie-Methoden bis hin zu automatisch betreibbaren Chemilumineszenz-Immunoassays (CLIAs)⁷¹. Aufgrund der verzögerten Antikörperantwort nach Infektion sind serologische Tests nicht für die Detektion einer akuten

Infektion geeignet²¹¹. Sie sind jedoch für die Messung der Seroprävalenz in einer Population, Verfolgung der Antikörperdynamik nach Infektion, Untersuchung möglicher Schutzkorrelate vor Reinfektion, Identifizierung geeigneter Plasmaspender, Überwachung der Antikörperreaktion nach verschiedenen Impfstoffen und Impfschemata sowie zur Beantwortung epidemiologischer Fragestellungen und Beurteilung politischer Maßnahmen von hohem Wert. Aufgrund ihres Designs und ihrer Eigenschaften (schneller Umsatz, großes Probenvolumen, einfache Handhabbarkeit) erlauben ELISAs und CLIAs das Screening großer Populationen in kurzer Zeit²⁰⁰.

Während PCR-Tests schnell auf SARS-CoV-2 angepasst wurden, dauerte die Entwicklung serologischer Assays länger. Dies ist unter anderem auf Engpässe positiver Kontrollseren und die Notwendigkeit umfangreicher Spezifitäts- und Sensitivitätstests angesichts bereits bestehender Immunität gegen saisonale Coronaviren zurückzuführen²¹². Die Bereitstellung von Protokollen zur Herstellung rekombinanter Antigene hat die Entwicklung serologischer Assays unterstützt und von der Notwendigkeit befreit, Labore der Schutzstufe 3 vorzuhalten²¹³. Auch wenn serologische Tests vielleicht sogar sensibler sein könnten als die rRT-PCR, müssen sie sich jedoch an diesem Goldstandard messen lassen, solange kein anderer Referenztest etabliert ist²⁰².

Unter den serologischen Testverfahren gelten Neutralisationstests als Goldstandard²⁰⁰. Mit ihnen kann die neutralisierende Eigenschaft einer Probe beurteilt werden. Da neutralisierenden Antikörpern eine maßgebliche Schutzfunktion vor Reinfektion zugesprochen wird, kommerzielle Assays häufig jedoch keinen Anspruch auf die Detektion neutralisierender Antikörper erheben, sind reaktive Proben nicht mit einem Schutz vor Reinfektion gleichzusetzen²¹⁴. Im Sinne einer besseren Handhabbarkeit wurden inzwischen Surrogat-Neutralisationstests entwickelt, die ohne Zellkultur und Laborbedingungen der Schutzstufe 3 durchgeführt werden können. Auch wurde gezeigt, dass Antikörper gegen die RBD mit neutralisierender Aktivität korrelieren²¹⁴. Die Firma Roche beschreibt für den in dieser Arbeit verwendeten Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Assay ein gute, für den Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S Assay sogar signifikante Korrelation mit Neutralisationstests²¹⁵. Tang et al. konnten bei Untersuchung von drei kommerziellen Assays (darunter der Roche Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Assay) jedoch eine lediglich schwache Korrelation zu neutralisierenden Tests feststellen²¹⁶.

Gerade angesichts einer niedrigen Prävalenz erfordern serologische Tests eine hohe Sensitivität und Spezifität, um eine korrekte Aussage über das Vorliegen von Antikörpern treffen zu können. Die WHO fordert von neu entwickelten Testverfahren eine Spezifität und Sensitivität von mindestens 97 respektive 95 Prozent²¹⁷. Bei einer Abwägung zwischen den Parametern für das Screening einer Population wird zur zuverlässigen Einschätzung der stattgehabten Exposition eine hohe Sensitivität bevorzugt²¹⁸. Wenn ein positives Ergebnis jedoch mit unverhältnismäßigen nachteiligen Konsequenzen verknüpft ist, ist eine hohe Spezifität essentiell²¹². Da IgM eine geringere Affinität zu Antigenen aufweisen, muss für Tests, die ausschließlich diese Antikörperklasse detektieren, eine höhere Spezifitätsschwelle definiert werden⁷¹. Wie Li et al. bei der Entwicklung eines LFIA zeigen konnten, ist die Sensitivität größer, wenn serologische Assays nicht gegen distinkte Antikörperklassen, sondern mehrere

Typen gleichzeitig testen²¹⁹. Da neutralisierende Antikörper maßgeblich gegen das Spike-Protein gerichtet sind, unterliegt dieses einem hohen Selektionsdruck. Dies könnte dazu führen, dass serologische Tests in Zukunft an Sensitivität einbüßen und (ebenso wie Impfstoffe) angepasst werden müssen⁷¹.

Ein weiteres wesentliches Merkmal serologischer Assays ist ihre Robustheit gegenüber einer Kreuzreaktivität mit anderen Pathogenen, insbesondere anderen zirkulierenden Coronaviren. Zwar ist die genetische Übereinstimmung der immunogenen Strukturen zwischen SARS-CoV-2 und endemischen Coronaviren, deren Seroprävalenz häufig über 90 Prozent liegt²²⁰, gering, jedoch besteht eine große Homologie zu SARS-CoV²²¹. Auch geographische Faktoren müssen berücksichtigt werden, wurde beispielsweise eine Kreuzreaktivität zwischen SARS-CoV-2 und dem Denguevirus beschrieben²²².

Inzwischen wurden zahlreiche serologische Tests entwickelt und eingeführt, die sich in Treffsicherheit, Kosten und Benutzerfreundlichkeit unterscheiden. Dabei können bei einem großen Probenaufkommen bereits kleine Unterschiede in Sensitivität und Spezifität zu gravierenden Unterschieden in der Anzahl falscher Diagnosen führen²²³. Vereinzelt Studien haben einzelne Assays miteinander verglichen, konnten jedoch stets nur eine begrenzte Anzahl an Tests sowie eine begrenzte Vielfalt an Probanden einschließen^{89,223–226}. Es ist daher schwierig, die Testergebnisse verschiedener Assays miteinander zu vergleichen. Zur Umgehung dieses Problems hat die WHO vorgeschlagen, serologische Assays gegen einen Standard auf Basis rekonvaleszenter Seren zu normalisieren und einen entsprechenden Standard entwickelt^{227,228}. Schallier et al. rufen bei der Interpretation serologischer Ergebnisse zu Vorsicht auf: Im Zeitverlauf zeigten verschiedene Assays divergierende Antikörperkinetiken an, auch wenn sie gegen die gleiche Zielstruktur gerichtet waren und die gleiche Antikörperklasse detektierten²²⁹.

Der Einsatz kommerzieller Hochdurchsatz-Assays hat neben der Analyse eines großen Probenvolumens gegenüber hauseigen entwickelten Assays den Vorteil, dass ihre großflächige Implementierung mit einer Vergleichbarkeit der Messwerte zwischen verschiedenen Laboren einhergeht²³⁰. Im Vergleich von laborbasierten und Lateral Flow Assays liefern LFIAAs zwar ein schnelleres Ergebnis, weisen jedoch häufig eine deutlich geringere Sensitivität auf und können keine quantitative Aussage treffen¹⁹. Damit sind LFIAAs für die experimentelle Arbeit wenig attraktiv.

Aufgrund positiver Erfahrungswerte sowie der lokalen Verfügbarkeit eines Cobas e411 Analyzers für Immunoassay-Tests (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurden in dieser Arbeit zwei Assays der Firma Roche verwendet: Der qualitative Assay (Elecsys Anti-SARS-CoV-2) ist gegen das Nukleokapsid-Antigen gerichtet und detektiert Antikörper nach Infektion; der quantitative Assay (Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S) ist gegen die Rezeptorbindungsdomäne gerichtet und detektiert Antikörper nach Infektion oder Impfung. In kombinierter Anwendung erlauben sie die Differenzierung zwischen der Immunantwort nach Impfung oder Infektion (sofern ein Spike-basierter Impfstoff verwendet wurde). Beide Assays zeigen keine Kreuzreaktivität mit zirkulierenden endemischen humanen

Coronaviren^{231,232}. Im Vergleich mit anderen serologischen Assays weisen sie eine hohe Sensitivität und Spezifität auf^{89,223,233}.

In dieser Arbeit sollen serologische Tests unter anderem zur Einschätzung des stattgefundenen (und möglicherweise unentdeckten) Infektionsgeschehens in einer definierten Kohorte eingesetzt werden. Das in Deutschland für die Erfassung von SARS-CoV-2-Infektionen zuständige Robert Koch-Institut veröffentlicht gemäß seiner Falldefinition nur laborbestätigte Fälle unabhängig vom Vorliegen klinischer Symptome⁴². Faktoren wie die Unterlassung einer Testung bei nicht oder nur milde ausgeprägten Symptomen, eine unzureichende medizinische Versorgung, fehlende Testkapazitäten, falsch-negative Tests oder ein unvollständiger Ergebnisbericht können die Vollständigkeit der Erfassung beeinflussen. Die berichteten Fallzahlen stellen meist nur die „Spitze des Eisbergs“ dar²³⁴. Antikörperstudien können helfen, die tatsächliche Anzahl von Personen mit durchlebter SARS-CoV-2-Infektion einzuschätzen. Damit sind sie ein wertvolles Werkzeug, den Infektions-Verstorbenen-Anteil zu berechnen, die Wirksamkeit ergriffener Maßnahmen zu bewerten oder den Anteil der möglicherweise immunen Bevölkerung abzuschätzen. Eine internationale Übersichtsarbeit hat ermittelt, dass das Verhältnis von serologisch aufgedeckten zu bereits bekannten Infektionen durchschnittlich 11,1 betrug, wobei die Spannweite von 2 (Färöer Inseln, Dänemark) bis 103 (Indien) reichte²³⁵. In Deutschland ermittelte das RKI im Rahmen der Studie „Corona-Monitoring lokal“ an vier Hotspots eine Untererfassung im Verhältnis 1,6 (Straubing), 2,2 (Berlin-Mitte), 4,5 (Bad Feilnbach) und 6 (Kupferzell)²³⁶. Die Studie wurde für 8000 Teilnehmende konzipiert. Bemerkenswerterweise konnten (je nach Hotspot) bei 53, 37, 24 und 11 Prozent der Teilnehmenden, die einen positiven PCR-Test angaben, keine Antikörper nachgewiesen werden.

Serologische Tests können helfen, zentrale Fragen in der Erforschung und Eindämmung von SARS-CoV-2 zu beantworten. Ihr großer Nachteil besteht jedoch darin, dass sie auf die Entnahme von Vollblutproben angewiesen sind – ein Problem, das durch den Einsatz getrockneter Blutstropfen umgangen werden kann.

2.2 Dried Blood Spots (DBS)

2.2.1. Allgemein

Auch wenn venöse Vollblutproben oft die Standardmatrix für medizinische Blutanalysen darstellen, ist ihre Entnahme nicht immer möglich, da sie spezielles Material, Personal, Fachkenntnisse oder Transportmöglichkeiten erfordern. In diesen Situationen können getrocknete Blutstropfen (*dried blood spots*, DBS) als Alternative zu den Referenzproben Plasma und Serum dienen²³⁷.

Die Idee, getrocknete Blutstropfen zu diagnostischen Zwecken zu nutzen, wird dem Begründer der modernen klinischen Mikrochemie Ivar Christian Bang zugeschrieben, der 1913 Glukose aus Eluatzen getrockneter Blutstropfen bestimmte^{238,239}. Guthrie und Susie entwickelten die Methode weiter und

wendeten sie 1963 für die Untersuchung Neugeborener auf Phenylketonurie an²⁴⁰. Damit sicherten sie sich bis zum heutigen Tag einen Platz in der Routineuntersuchung Neugeborener.

Getrocknete Blutstropfen werden gewonnen, indem die Haut von Fingerbeere oder Ferse desinfiziert und mit Hilfe einer Einmallanzette minimal inzidiert wird. Nach Entfernung des ersten Blutstropfens zur Minimierung des Anteils an Gewebeflüssigkeit können wenige Tropfen Blut derart auf ein Filterpapier aufgetragen werden, dass dieses bis auf die Rückseite durchtränkt ist. Die Probe wird etwa drei Stunden an der Luft getrocknet, bevor sie gemeinsam mit einem Trockenmittel-Päckchen und Feuchtigkeitsanzeiger in verschließbaren Kunststoffbeuteln verpackt wird. In Abhängigkeit von Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Spot-Größe oder Papierbeschaffenheit kann ein längeres Trocknen erforderlich sein²⁴¹. Eine hermetische Verpackung sollte vermieden werden, da diese zu erhöhter Temperatur und Feuchtigkeit führen kann, was die Analytenstabilität negativ beeinflussen kann^{242,243}. Die Versickung an ein Labor erfolgt per einfacher Post unter Berücksichtigung lokaler Transportvorschriften^{244,245}. Häufig eingesetzt werden unbehandelte Karten auf reiner Zellulosebasis (zum Beispiel FTA® DMPK-C, Whatman® 903 oder Ahlstrom 226); die Karten können jedoch auch chemisch vorbehandelt sein, sodass nach dem Auftragen Enzyme und andere Proteine denaturieren, Zellen abgebaut oder Krankheitserreger inaktiviert werden (zum Beispiel Whatman® FTA®, FTA® Elute, FTA® DMPK-A oder FTA® DMPK-B)²⁴⁶. Im Labor können die getrockneten Blutstropfen manuell oder automatisiert ausgestanzt und weiteren Analyseschritten zugeführt werden. Eine automatisierte Extraktion wurde für verschiedene Anwendungen beschrieben, darunter auch für Anti-SARS-CoV-2-Antikörper^{241,247,248}.

Durch die einfache Handhabbarkeit ist die Entnahme der Blutstropfen schnell erlern- und anwendbar, was auch medizinischen Laien eine eigenständige Durchführung erlaubt. Dies ermöglicht das Sammeln eines großen Probenvolumens in kurzer Zeit. DBS erfordern nur ein kleines Blutvolumen, was sie insbesondere für die Kinderheilkunde und regelmäßige Messungen attraktiv macht. Sie sind kostengünstig und bergen wenig Risiko für bakterielle Infektionen der Testperson, da die sonst notwendige Phlebotomie entfällt. Da die Probenentnahme selbständig durchgeführt werden kann, entfällt auch das Infektionsrisiko für die Person, die unter normalen Umständen die Probe entnehmen würde. Die getrockneten Proben scheinen weniger infektiös zu sein als Vollblutproben^{55,249} und können zwischen -20 und + 4°C über mehrere Monate gelagert werden²⁴². Direkte Sonneneinstrahlung, hohe Luftfeuchtigkeit und Temperatur können die Analytenstabilität negativ beeinflussen^{243,246}.

Die Nachteile von DBS: Gerade weil sie nur ein kleines Volumen haben, erfordern sie eine sensitive Analysetechnik; im Vergleich zu herkömmlichen Methoden haben sie häufig eine niedrigere Sensitivität; trotz Anleitung ist die selbständige Probenentnahme nicht immer erfolgreich; kapilläre Konzentrationen können von venösen Konzentrationen abweichen, da DBS neben Blutzellen und Plasma auch interstitielle Flüssigkeit enthalten; Hämatokrit, Spotgröße- und homogenität sowie Papiereigenschaften können variieren und das Ergebnis beeinflussen^{239,250–252}.

In den vergangenen Jahren wurden DBS für vielfältige Zwecke eingesetzt, die von präklinischen und klinischen Pharmakokinetikstudien²⁵³, der therapeutischen Medikamentenüberwachung (Antiepileptika, Immunsuppressiva, Antibiotika, antiretrovirale, kardiovaskuläre oder psychoaktive Medikamente)^{250,254}, über Toxikokinetikstudien²⁵⁵, Doping- oder Umweltkontaminationskontrollen²⁵⁶ bis hin zur mikrobiologischen oder epidemiologischen Krankheitsüberwachung reichen^{257,258}. Neben Praktikabilitäts- und ökonomischen Vorteilen haben auch ethische Überlegungen hinsichtlich tierexperimenteller Studien die Anwendung von DBS untermauert²⁴⁶. Um der Tatsache Rechenschaft zu tragen, dass das Verfahren auch für andere Matrices als Blut implementiert wurde, sprechen einige Autorinnen und Autoren von Dried Matrix Spots (DMS)²⁵².

Auch im Virenscreening sind DBS etablierte Hilfsmittel und wurden von der WHO für die Diagnose von HIV, Hepatitis B und C im Feldeinsatz empfohlen^{237,259}. Weitere Feldanwendungen wurden beispielsweise für Masern²⁶⁰, CMV²⁶¹ oder Malaria²⁶² erprobt. Wie Amini et al. in einer systematischen Übersichtsarbeit zusammenfassen, konnte die Detektion von Antikörpern in DBS für zahlreiche Entitäten (darunter Hepatitis A, B, C, E, HIV, HPV, EBV, CMV, Polyomaviren, Mumps, Masern, Röteln, Pertussis, Syphilis, Helicobacter Pylori, Cholera, Tuberkulose, Malaria oder Toxoplasmose) gezeigt werden²⁶³. Die Autorinnen und Autoren konnten insbesondere für SARS-CoV-2 eine hohe Korrelation zwischen DBS- und Serumproben feststellen, was ihren Nutzen für epidemiologische und Impfstoffstudien unterstreicht.

2.2.2. Anwendung für SARS-CoV-2

DBS bieten zahlreiche Vorteile für ein schnelles, ökonomisches und dezentrales Screening großer Kohorten – attraktiv für die Überwachung eines Infektionsgeschehens, das sich innerhalb kurzer Zeit weltweit ausgebreitet hat und weiterhin ein „globales Desaster bleibt“¹¹. Dank der eigenständigen Probenentnahme und geringen Material- und Transportkosten können auch Menschen eingeschlossen werden, die aufgrund geringer oder fehlender Symptome keine medizinische Einrichtung aufgesucht hätten oder aufgrund limitierter Ressourcen keinen Zugang zu einer solchen haben.

Die eigenständige DBS-Entnahme zu Hause mit anschließender Verschickung wurde für SARS-Cov-2 mit zufriedenstellenden Ergebnissen erprobt und von den Teilnehmenden gut toleriert^{264,265}. In kleineren Machbarkeitsstudien wurde die Detektion mittels ELISA oder ECLIA in Risikokohorten evaluiert^{22,24,218}. Dabei konnte beispielsweise die davor unbekannte und überraschend hohe Serokonversionsrate von 80 Prozent unter Haushaltsangehörigen einer zuvor mit SARS-CoV-2 infizierten Person identifiziert werden²⁵. Initiativen in den USA und Schweden haben größere Studien mit 10.000 beziehungsweise 1.000 Teilnehmenden durchgeführt, um unentdeckte Coronavirus-Infektionen aufzudecken^{266,267}. Die US-Studie schloss ausschließlich Teilnehmende ohne vorherige COVID-19-Diagnose ein und ermittelte unter diesen eine Seropositivitätsrate von 4,6 Prozent. Dies entspricht fast fünf zuvor unbekanntem Fällen pro diagnostizierter Infektion. Die Autorinnen und Autoren konnten darüber hinaus interessante Aspekte hinsichtlich geographischer Region (höchste Prävalenz an der

Ost-Küste), Ethnie (höchste Prävalenz unter Afroamerikanern), Arbeitsort (geringere Prävalenz beim Arbeiten zu Hause), Alter (höchste Prävalenz in der Gruppe der 18- bis 44-Jährigen), Geschlecht (höhere Prävalenz bei Frauen), Vorerkrankungen (geringere Prävalenz bei Vorliegen von Risikofaktoren) herausarbeiten. Aufgrund des schonenden Verfahrens ist eine Anwendung von DBS auch bei Neugeborenen möglich. Interessanterweise scheinen DBS-Serologien Neugeborener bei SARS-CoV-2 mütterliche und bevölkerungsweite Infektionsraten widerzuspiegeln²⁶⁸.

Beim Altern von Matrices können sich Faktoren wie die Analytenstabilität oder der Extraktionsgewinn verändern²⁶⁹. Getrocknete Matrices zeigen gegenüber flüssigen Matrices jedoch aufgrund reduzierter enzymatischer Aktivität häufig eine höhere Stabilität²⁵². Da Anti-SARS-CoV-2-Antikörper sich in DBS bei luftdichter Lagerung bei +4°C auch über mehr als sechs Monate stabil zeigten²⁴⁸ und ihre Lagerung im Vergleich zu Serum- oder Plasma-Proben zahlreiche Vorteile hat, ist ihr Einsatz auch im Rahmen langfristiger epidemiologischer Studien denkbar. Neben der Antikörperdiagnostik könnten DBS im Kontext von SARS-CoV-2 auch für Zytokin-Assays oder zur therapeutischen Medikamentenüberwachung eingesetzt werden^{252,270}.

Inzwischen haben vereinzelte Studien die Anwendung von DBS zur Detektion von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern mit positiven Resultaten hinsichtlich Sensitivität und Spezifität erprobt^{23,271–275}. Dabei wurden auch die in dieser Arbeit verwendeten Assays von Roche eingesetzt^{230,276}. Bislang beschränken sich die Studien jedoch meist auf rein qualitative Analysen.

2.2.3. Volumetrische Probenentnahme

Ein Nachteil von DBS ist die Variabilität der Messergebnisse angesichts unterschiedlicher Volumina aufgetragenen Blutes. Wenn Probanden einen frei fallenden Tropfen auf DBS-Karten auftragen, hat dieser in der Regel ein Volumen zwischen 20 und 70 µL; wird ein am Finger hängender Tropfen auf die Karte appliziert, beträgt dessen Volumen durchschnittlich 15 bis 50 µL²⁴¹. Um eine volumetrische Messung zu erreichen, können verschiedene Methoden angewendet werden. Eine Möglichkeit ist das Ausstanzen der getrockneten Blutstropfen in vordefinierter Größe. Dies kann jedoch durch eine variable, Hämatokrit-abhängige Viskosität²⁷⁷ oder zu geringe Befüllung des vordefinierten Spots korrumpiert werden. Außerdem kann der Analyt inhomogen verteilt und am Rand in deutlich geringerer Konzentration vorliegen, was als „Vulkaneffekt“ bezeichnet wird²⁷⁸. Es ist daher vorteilhaft, bereits die Blutentnahme volumetrisch durchzuführen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene technische Hilfsmittel entwickelt, darunter kapilläres Microsampling (zum Beispiel hemaPEN®)²⁷⁹, mikrofluidisches Spotten (zum Beispiel HemaXis™ und Capitainer-B)^{280,281} oder volumetrisches absorptives Microsampling (VAMS, zum Beispiel Mitra®)²⁸². Um sich im Sinne der DBS-Logik zu eignen, müssen die Hilfsmittel auch für medizinische Laien möglichst intuitiv anwendbar und fehlerrobust sein.

Beim kapillären Microsampling werden volumengenaue Glaskapillaren zur Sammlung und Handhabung kleiner Mikrolitervolumina verwendet²⁴⁶. Die Kapillaren können mit einem Antikoagulans be-

schichtet sein und werden über Kapillarkraft gefüllt. Ihr Inhalt kann auf eine Karte platziert werden oder in der Kapillare belassen werden, die hierfür mit Wachs versiegelt wird²⁴⁶. Der hemaPEN® vereint in einem Gerät vier Mikrokapillaren à 2,74 µL, deren Inhalt sich auf vier vorgefertigte Papierscheiben entleert, sowie ein Trocknungsmittel²⁸³. Beim mikrofluidischen Spotten werden Mikrokanäle mit einem definierten Volumen verwendet, die Blut ebenfalls über Kapillarwirkung aufziehen und auf eine DBS-Karte platzieren. HemaXis™-Geräte werden derzeit mit dem Ziel weiterentwickelt, bereits im Gerät eine Trennung von Plasma oder Serum zu erreichen^{252,284}. Beim volumetrischen absorptiven Microsampling (VAMS) kommt eine saugfähige, hydrophile Polymerspitze zum Einsatz, die einem Plastikstiel aufsitzt und ein definiertes Volumen aufnimmt²⁸⁵. In dieser Arbeit wurden zur Entnahme volumetrischer DBS kapilläres Microsampling und VAMS eingesetzt.

2.3 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Analytische diagnostische Verfahren stellen eine zentrale Säule im Verständnis und in der Eindämmung von SARS-CoV-2 dar. Unter diesen können serologische Tests Informationen über das Infektionsgeschehen und den Erfolg von Impfkampagnen liefern und damit einen wesentlichen Beitrag zur Pandemiekontrolle leisten. Ihr Einsatz ist jedoch durch den Mangel finanzieller, personeller oder logistischer Ressourcen limitiert, da sie in der Regel eine venöse Blutentnahme erfordern. Dies schränkt ihre flächendeckende Anwendung ein und führt zu einer Selektion des untersuchten Patientenguts. Zur Umgehung dieser Hindernisse wurde der Einsatz getrockneter Blutstropfen in der Anti-SARS-CoV-2-Antikörper-Diagnostik bereits in vereinzelt Studien überprüft. Meist beschränken sich diese jedoch auf eine qualitative Analyse, sodass wesentliche Informationen über die Antikörperreaktion verloren gehen.

In der vorgelegten Arbeit sollte daher der quantitative Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern in DBS untersucht und in der konkreten Anwendung überprüft werden. Hierfür wurde zunächst evaluiert, ob und mit welchen Limitationen ein solcher Nachweis gelingen kann. Zu diesem Zweck wurde die Antikörperantwort nach Infektion und Impfung in Vollblut- und DBS-Proben mit Hilfe zweier serologischer Assays untersucht und eine Kreuzvalidierung zwischen den Matrices durchgeführt. In einer Proof-of-Concept-Studie wurde der Einsatz von DBS zur Quantifizierung der Antikörperantwort nach Impfung im Zeitverlauf untersucht. Dabei wurden die Impfstoffe BNT162b2, mRNA-1273 und ChAdOx1 nCoV-19 berücksichtigt. Da ein wesentlicher Vorteil von DBS die Untersuchung großer Kohorten darstellt, wurde die Eignung des experimentellen Vorgehens schließlich für eine großvolumige Überwachung mittels einer Seroprävalenzstudie an der Deutschen Sporthochschule untersucht. Als untergeordnete Fragestellung sollte durch Testung der Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern vor und nach dem Wintersemester 2020/21 ein möglicher Einfluss des Hochschulbetriebs auf das Infektionsgeschehen überprüft werden.

3. Material und Methoden

Aufgrund früherer Arbeiten zur Detektion von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern in getrockneten Blutstropfen in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Thevis gibt es hinsichtlich des verwendeten Materials und der angewendeten Methoden Überschneidungen zu Knoop et al.²⁴⁸.

3.1 Material

3.1.1. Chemikalien und Materialien

Zur Extraktion der getrockneten Blutproben wurde eine 1,8 mg/mL-EDTA-Lösung hergestellt. Hierfür wurde Ethylendiamintetraessigsäure Dikaliumsalz Dihydrat (K2E) von Sigma-Aldrich/ Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben und mit deionisiertem Reinstwasser aus einem Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™-Gerät (Bremen, Deutschland) versetzt. Als Verdünnungsmedien wurden Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), künstliches Serum und mit Aktivkohle gereinigtes Serum verwendet. Für die Herstellung der PBS-Lösung wurden PBS-Tabletten von Sigma-Aldrich/ Merck mit deionisiertem Reinstwasser versetzt. Für die Herstellung künstlichen Serums wurde rekombinantes Humanalbumin von Sigma-Aldrich/ Merck erworben und mit PBS-Lösung versetzt. Gepooltes, mit Aktivkohle gereinigtes Humanserum der Firma Innovative Research™ wurde von Dunn Labortechnik (Asbach, Deutschland) bezogen. Solofix® Safety Neonat Lanzetten (0,8 x 2 mm) wurden von B. Braun Petzold (Melsungen, Deutschland) erworben. Für die volumetrische Entnahme von Kapillarblut wurden 20 µL Volumen aufnehmende und mit K2E beschichtete End-to-End-Kapillaren von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) eingesetzt. DBS-Karten auf Zellulosebasis (QIAcard® FTA® DMPK-C) wurden von VWR International (Bruchsal, Deutschland) erworben. Als Microsampling-Gerät wurden 20 µL aufnehmende Mitra®-Spitzen aus einem porösen, hydrophilen Material von Neoteryx (Torrance, CA, USA) verwendet. MiniPax®-Absorptionsmittel-Pakete wurden von Sigma-Aldrich/ Merck bezogen. Für die venösen Blutentnahmen (Plasma- beziehungsweise Serumproben) wurden BD Vacutainer® Safety-Lok™-Blutentnahmesets sowie K2E (5,4 mg, 3 mL) und SST™ II Advance (5 mL) Plus Blutentnahmeröhrchen von BD verwendet. Zur Aufbereitung der Proben wurden 1,5 und 2 mL messende Safe-Lock Tubes® von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) sowie 1,5 mL messende Polypropylen-Mikroröhrchen von Sarstedt erworben.

3.1.2. ECLIA-Tests

Es wurden zwei ECLIA (Elektrochemilumineszenz-Immunoassays) Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Tests der Firma Roche eingesetzt: Während der N-Assay (REF 09203095190) gegen die Nukleokapsid-Struktur des Coronavirus gerichtet ist, zielt der S-Assay (REF 09289267190) auf die Rezeptorbindungsdomäne des Spike-Proteins. Für den N-Assay gilt: Proben oberhalb eines numerischen Cutoff-Index von 1,0 gelten als reaktiv. Für den S-Assay gilt: Die untere Nachweisgrenze liegt

bei 0,4 U/mL, Proben oberhalb von 0,8 U/mL gelten als reaktiv, der Messbereich liegt zwischen 0,4 und 250 U/mL. Gemäß Produktbeschreibung des Herstellers wurde der S-Assay gegen den internen Roche-Standard standardisiert, der aus einem äquimolaren Gemisch zweier monoklonaler Antikörper besteht, die gegen zwei verschiedene Epitope der RBD gerichtet sind. 1 nM dieser Antikörper entspricht 20 U/mL des Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S Tests²³². Roche gibt weiterhin an, dass 1 U/mL (Elecsys) 1 AU/mL (WHO-Standard) entspricht²⁸⁶. Für beide Assays besteht laut Herstellerangaben eine Korrelation mit Surrogat-Neutralisationstests²¹⁵. Die klinische Sensitivität des N-Assays wird von Roche 14 Tage nach PCR-bestätigter Infektion mit 99,5 Prozent beziffert, die klinische Spezifität mit 99,8 Prozent²⁸⁷. Die klinische Sensitivität des S-Assays liegt laut Roche bei 98,8 Prozent, die klinische Spezifität bei 99,96 Prozent²⁸⁸. Vereinzelt beschreiben Studien jedoch eine geringere Sensitivität der Tests²⁸⁹⁻²⁹¹. Es wurde keine Kreuzreaktivität mit endemischen humanen Coronavirus-Rekonvaleszenzseren gefunden^{231,232}. Gemäß Herstellerangaben sind die Assays für den Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern in Humanserum und -plasma vorgesehen. Die Verwendung zur Analyse von DBS-Eluat erfolgte dementsprechend off-label.

3.1.3. Blutproben

Alle Forschungsproben (venöses Vollblut, Plasma-, DBS- und Mitra®-Proben) wurden mit Genehmigung der lokalen Ethikkommission (Nr. 054/2020, Deutsche Sporthochschule Köln) und schriftlicher Einverständniserklärung der Teilnehmerinnen und Teilnehmer gesammelt.

Die Proben lassen sich in vier Blöcken gruppieren:

- 1) Kreuzvalidierung nach Infektion: 27 Plasmaproben stammten von Probanden nach durchlebter SARS-CoV-2-Infektion (sechs Frauen, 21 Männer, Altersspanne 20-50 Jahre) und wurden im Rahmen sportlicher Routinemessungen gesammelt.
- 2) Kreuzvalidierung nach Impfung: 96 zum gleichen Zeitpunkt entnommene getrocknete Blutproben (DBS und/ oder Mitra®) und Vollblut-Proben (Plasma und/ oder Serum) stammten von geimpften Probanden (68 Frauen, 28 Männer, Altersspanne 19-69 Jahre). Eingeschlossen wurden Probanden nach Impfung mit Präparaten der Firmen AstraZeneca und BioNTech/Pfizer. 67 Probanden hatten zum Zeitpunkt der Entnahme eine Impfdosis erhalten, 29 Probanden waren zweifach geimpft. Die Probenentnahmen erfolgten in unterschiedlichem zeitlichem Abstand zur Impfung (sieben bis 92 Tage nach Erstimpfung).
- 3) Longitudinale Überwachung der Antikörperantwort nach Impfung: Von 27 Probanden (23 Frauen, vier Männer, 27-69 Jahre) wurden parallel zur Impfserie regelmäßig DBS-Proben gesammelt. Sechs Probanden (alle weiblich, 41-59 Jahre) wurden zweifach mit BNT162b2 von BioNTech/Pfizer geimpft, sechs Probanden (alle weiblich, 25-33 Jahre) zweifach mit mRNA-1273 von Moderna. 15 Probanden erhielten eine Erstimpfung mit ChAdOx1 nCoV-19 von AstraZeneca. Da sich im Verlauf der Überwachung die Empfehlungen bezüglich dieses Impf-

stoffs änderten, erhielten fünf Probanden (drei Frauen, zwei Männer, 60-65 Jahre) auch die Zweitimpfung mit ChAdOx1 nCoV-19, neun Probanden eine Zweitimpfung mit BNT162b2 (sechs Probanden, fünf Frauen, ein Mann, 27-49 Jahre) oder mRNA-1273 (drei Probanden, zwei Frauen, ein Mann, 59-69 Jahre). Die Überwachung begann vor der ersten Impfung und umschloss bis auf eine Ausnahme beide Impftermine. In den ersten sechs Wochen nach Erstimpfung wurde alle sieben Tage eine DBS-Probe entnommen, anschließend wurde die Überwachung je nach erhaltenem Impfstoff und Schema in reduzierter Frequenz fortgesetzt. Insgesamt wurde ein Zeitraum von bis zu 16 Wochen nach Erstimpfung überwacht. Den Probanden wurden DBS-Pakete (Abbildung 1) sowie eine Anleitung zur eigenständigen Entnahme der Blutstropfen ausgehändigt. Sie sammelten die Proben selbständig und schickten sie per Post an das Institut für Biochemie. Den fünf Probanden mit homologer ChAdOx1 nCoV-19-Impfung wurden parallel zur DBS-Probenentnahme nach zwei, drei, vier, acht und 16 Wochen zusätzlich Vollblutproben entnommen.



Abbildung 1: Inhalt der DBS-Pakete. Die an die Teilnehmenden ausgehändigten DBS-Pakete zur Selbstentnahme wurden mit Verschlussbeutel (A), Trockenmittel-Päckchen (B), 20 µL-Glaskapillaren (C), Alkoholtupfer (D), DBS-Karte (E) und Einweg-Stecher (F) ausgestattet.

- 4) Serosurvey in definierter Kohorte: Zur Einschätzung der Seroprävalenz sowie Durchführbarkeit der Testung einer größeren Kohorte wurden 557 DBS-Proben von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Deutschen Sporthochschule gesammelt. Die Studie wurde zu zwei Zeitpunkten – vor und nach dem Wintersemester 2020/21 – durchgeführt. Bei der ersten Durchführung

nahmen 327 Personen (173 Frauen und 154 Männer) teil, bei der zweiten 230 Personen (138 Frauen und 92 Männer). 132 Personen nahmen zu beiden Zeitpunkten teil. Nach elektronischer Registrierung wurden durchnummerierte DBS-Pakete sowie eine Anleitung zur Entnahme der Blutstropfen an die Teilnehmenden ausgehändigt. Da es sich um eine qualitative Studie handelte, war keine volumetrische Entnahme der Proben notwendig und ein reines Befüllen der gekennzeichneten Spots ausreichend. Die DBS-Karten wurden an das Institut für Biochemie zurückgesendet und dort pseudonymisiert analysiert. In einem separat eingereichten Fragebogen gaben die Teilnehmenden an, ob sie in der Vergangenheit einen positiven PCR-Test oder eine Impfung erhalten hatten, machten Angaben zu ihrem Arbeitsumfeld (in oder außerhalb von Räumlichkeiten) sowie Frequenz ihres Studierendenkontakts (<1, 1-3 oder >3 Mal pro Woche).

3.2 Methoden

3.2.1. Probengewinnung und -aufbereitung

Serum und Plasma wurden durch Zentrifugation (Serumproben 1400 x g, zwölf Minuten, Plasmaproben 1800 x g, fünf Minuten) aus venösen Blutentnahmeröhrchen gewonnen. Im Anschluss waren sie sofort für die ECLIA-Analyse einsetzbar. DBS wurden gesammelt, indem nach minimal-invasiver Inzision der Fingerbeere Kapillarblut mit Hilfe einer 20 µL messenden Kapillare entnommen und bis zu vier Spots à 20 µL auf DBS-Karten aufgetragen wurden. Für die Inzision wurden die vom Nervus ulnaris innervierten Finger (Hälfte des Mittelfingers und Ring- oder kleinen Fingers) bevorzugt, da diese weniger empfindlich sind als die vom Nervus medianus innervierten Regionen. Der erste Blutstropfen wurde aufgrund eines hohen Anteils von Gewebeflüssigkeit mit einem Tupfer entfernt. Massage und Erwärmen des zu punktierenden Fingers erleichterten die Probenentnahme. Die Mitra®-Spitzen wurden an die auf der Fingerbeere entstandenen Blutstropfen gehalten und nahmen aufgrund ihrer hydrophilen Materialeigenschaften Blut gemäß vordefinierter Kapazität (20 µL) auf. DBS-Karten und Mitra®-Spitzen wurden nach der Probenentnahme bis zur Analyse mit einem Trockenmittelpaket in Plastikbeuteln bei Raumtemperatur gelagert. Zur Analyse wurden die DBS-Spots ausgeschnitten und geviertelt. Die vier Teile wurden in 1,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen platziert. Die Mitra®-Spitzen wurden mit einer Pinzette von ihrer Halterung abgenommen und in 2 mL-Mikrozentrifugenröhrchen platziert. Nach Zugabe von 100 µL EDTA-Lösung wurden die Proben zehn Minuten lang im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurde der erhaltene Blutextrakt von Zellulosematerial oder Mitra®-Spitze getrennt und für die ECLIA-Messung in frische Polypropylen-Mikroröhrchen überführt.

3.2.2. Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern mittels ECLIA

Für den Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern wurde ein Cobas e411 Analyzer für Immunoassay-Tests (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), ein Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Test sowie ein Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S Test eingesetzt. Das Detektionsprinzip des Elektrochemilumineszenz-Immunoassays wurde von Roche beschrieben²⁹². Es basiert auf einer elektrisch induzierten Chemilumineszenz-Emission nach Bildung eines Sandwich-Komplexes (siehe Abbildung 2): Hierfür wurden 20 µL Probe mit biotinyliertem SARS-CoV-2-spezifischem rekombinanten Antigen und ruthenyliertem SARS-CoV-2-spezifischem rekombinanten Antigen versetzt und bildeten einen Komplex. Nach Inkubation mit Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln und Bindung an die Festphase wurde das Gemisch auf der Oberfläche einer Elektrode fixiert. Durch Anlegen einer Spannung wurde eine konzentrationsabhängige Chemilumineszenz-Emission induziert und mit einem Photomultiplier gemessen. Die Analyse erfolgte für alle Proben automatisch in Chargen von 30 Proben mit einer Gesamtlauzeit von etwa 45 Minuten.

Als Positiv- und Negativkontrollen wurde DBS-Eluat PCR-positiver und negativer Blutspender verwendet, für die Qualitätskontrolle Präzisionskontrollen von Roche (PreciControl Anti-SARS-CoV-2).

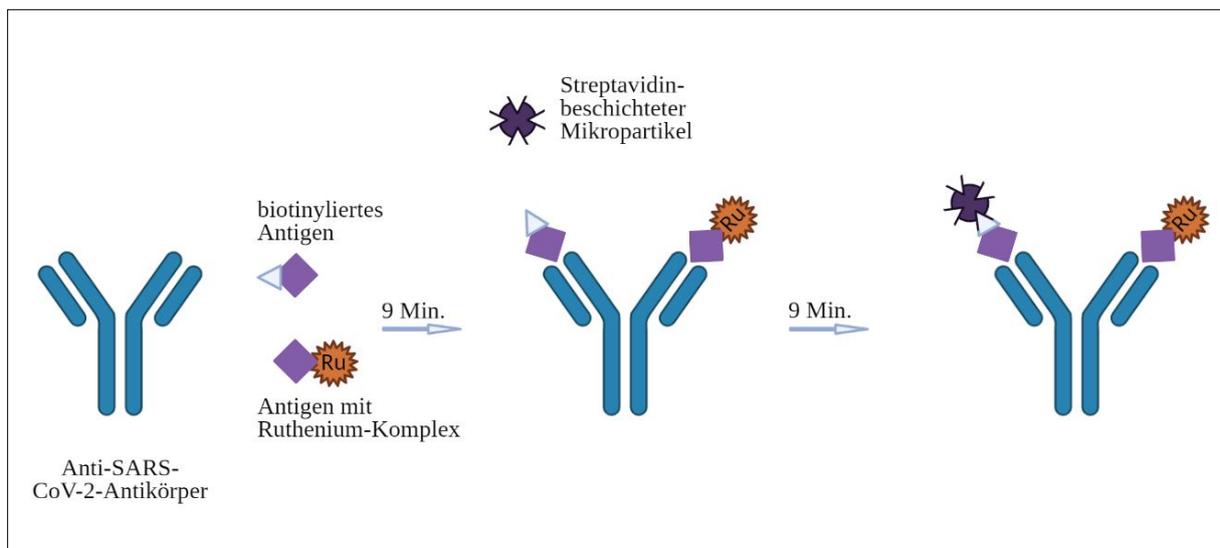


Abbildung 2: Funktionsprinzip des Elektrochemilumineszenz-Immunoassays (ECLIA). Schematische Illustration. 20 µL der zu untersuchenden Probe wurden neun Minuten lang mit einem Gemisch aus biotinylierten und ruthenylierten Antigenen inkubiert. Lagen Anti-SARS-CoV-2-Antikörper vor, bildete sich ein Sandwich-Komplex. Diesem wurden Streptavidin-beschichtete Mikropartikel hinzugefügt. Über Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin wurden die Immunkomplexe an die Festphase gebunden. Nach neun Minuten wurde das Gemisch in die Messzelle überführt, wo die Mikropartikel magnetisch auf der Elektrodenoberfläche fixiert wurden. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wurde eine Chemilumineszenz-Reaktion erzeugt, die mit Hilfe eines Photomultipliers gemessen wurde (erstellt mit BioRender.com, in Anlehnung an die Produktbeschreibung von Roche²⁹²).

Mit dem N-Assay gemessene Proben gelten oberhalb eines numerischen Cutoff-Index von 1,0 als reaktiv. Angesichts einer geringeren Antikörpermenge in Vollblut (im Vergleich zu Plasma oder Serum) und möglicher Verluste sowie Verdünnung während des Extraktionsvorgangs wurde der Cutoff-Index konservativ auf 0,5 angepasst. Für den S-Assay wurde keine Anpassung vorgenommen, da bei diesem das Verhältnis zwischen DBS-/ Mitra®- und Serum-/ Plasmawerten ermittelt werden sollte.

3.2.3. Gewinnung von rDBS aus Plasma

Aus den Anti-SARS-CoV-2-Antikörper-reaktiven Plasmaproben wurde unter Zusatz von Blutzellen Vollblut rekonstituiert. Hierfür wurden die Plasmaproben mit Blutzellen eines Anti-SARS-CoV-2-Antikörper-negativen Blutspenders gemischt. Durch Zusatz von 65,5 μL Blutzellen zu 80 μL Plasma wurde ein Hämatokrit von 45 Prozent eingestellt. Je 20 μL der rekonstituierten Blutproben wurden auf DBS-Karten und Mitra®-Spitzen aufgetragen. Die derart gewonnen DBS- und Mitra®-Proben wurden anschließend als rekonstituierte DBS oder Mitra® (rDBS oder rMitra®) bezeichnet und analog zu den kapillären Blutproben extrahiert und gemessen.

3.2.4. Überprüfung des experimentellen Vorgehens und S-Assays

Das experimentelle Vorgehen und der S-Assay wurden mit Hilfe verschiedener Tests charakterisiert.

- 1) Präzision der kapillären Blutentnahme: 20 μL Vollblut wurden mit einer Pipette auf DBS-Karten und Mitra®-Spitzen aufgetragen, analog zu den kapillären DBS-Proben extrahiert und mit dem S-Assay gemessen. Weiterhin wurden 28 Probanden mündlich ($n = 17$) oder schriftlich ($n = 11$) zur eigenständigen kapillären Blutentnahme angeleitet und die Messwerte mit oder ohne Supervision verglichen.
- 2) Extraktionsausbeute: Analog zum Extraktionsvorgang der getrockneten Blutproben (20 μL Kapillarblut extrahiert in 100 μL EDTA) wurden 20 μL Vollblut mit 100 μL EDTA versetzt, mit dem S-Assay gemessen und mit den Messwerten der entsprechenden DBS-Proben verglichen.
- 3) Verdünnungsverhalten: Da die Serum-/ Plasma-Werte der zweifach geimpften Probanden meist oberhalb des Messbereichs des S-Assays lagen, wurden die entsprechenden Proben mit EDTA im Verhältnis 1:10 und/ oder 1:20 verdünnt. Um einen möglichen Einfluss des Verdünnungsmediums zu überprüfen, wurde eine Serumprobe mit EDTA, PBS, mit Aktivkohle gereinigten Serum (*charcoal stripped Serum*, csSerum) und künstlichem Serum im Verhältnis 1:10 und 1:20 verdünnt. Zur Untersuchung des Verdünnungsverhaltens wurden mit drei Serumproben (hohe, mittlere und niedrige Antikörperkonzentration) Verdünnungsreihen mit EDTA und csSerum im Verhältnis 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 durchgeführt. Um einen möglichen Einfluss der zugesetzten Substanzen zu untersuchen, wurden diese als Blanks gemessen. Alle Proben wurden mit dem S-Assay analysiert.
- 4) Laborpräzision: Eine Vollblutprobe wurde zehn Mal mit dem S-Assay gemessen. Hierfür wurden analog zum Vorgehen bei Messung der Extraktionsausbeute 100 μL Vollblut mit 500 μL EDTA versetzt, sodass eine Verdünnung im Verhältnis 1:6 erreicht wurde. Dieser Test wurde nach drei und sieben Wochen wiederholt, die Probe in der Zwischenzeit bei +4°C gelagert.

- 5) Wiederholpräzision: Drei Vollblutproben unterschiedlicher Antikörperkonzentration wurden analog zum Vorgehen bei Messung der Extraktionsausbeute im Verhältnis 1:6 verdünnt und am Tag der Entnahme, drei und sieben Wochen nach Entnahme gemessen. In der Zwischenzeit wurden die Proben bei +4°C gelagert.

3.2.5. Präzisionsüberprüfung der Mitra®-Spitzen

Zehn Mitra®-Spitzen mit einem Fassungsvermögen von 20 µL wurden derart an die Oberfläche einer Anti-SARS-CoV-2-Antikörper-reaktiven Vollblutprobe gehalten, dass sie das Blut gemäß ihrer hydrophilen Eigenschaften absorbierten. Zehn weitere Spitzen wurden mit 20 µL der identischen Probe befüllt, indem dieses Volumen mit einer Pipette auf die Spitzen appliziert wurde. Die Mitra®-Spitzen wurden vor und nach dem Befüllen mit einer Präzisionswaage gewogen. Anschließend wurden die Proben extrahiert und mit dem quantitativen Assay gemessen.

Um den Einfluss der Absorptionsdauer zu überprüfen, wurden Mitra®-Spitzen für kurze oder lange Zeit an die Oberfläche elf Anti-SARS-CoV-2-Antikörper-reaktiver Vollblutproben unterschiedlicher Antikörperkonzentration gehalten. Bei kurzer Absorptionszeit wurde das Befüllen beendet, wenn das Blut die Unterseite der nach unten gerichteten Spitzen erreicht hatte. Bei langer Absorptionszeit wurden die Spitzen weitere zwei Sekunden an der Oberfläche der Blutproben belassen. Je 20 µL der verwendeten Proben wurden auf elf weitere Mitra®-Spitzen pipettiert. Alle Proben wurden extrahiert und mit dem S-Assay gemessen.

3.2.6. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Microsoft Excel 2007, R 3.4.3 und GraphPad Prism 5.01 durchgeführt. Berücksichtigt wurden ausschließlich Messwerte innerhalb des Messbereichs. Abgebildet sind die absoluten Messwerte oder Mittelwerte mit Standardabweichung (dargestellt als Fehlerbalken). Umrechnungsfaktoren, Abweichungen und relative Standardabweichungen wurden mit Microsoft Excel berechnet. Die Überprüfung der Daten mit generalisiertem linearem Modell wurde mit R durchgeführt. Lineare Regressionen, Bestimmtheitsmaße und Korrelationskoeffizienten wurden mit Hilfe von GraphPad Prism berechnet. Geradensteigungen und Achsenschnittpunkte wurden mit Hilfe von GraphPad Prism berechnet und auf Signifikanz getestet. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Als nicht-parametrischer Test wurde die Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Zum Ausschluss eines Outliers wurde der Grubb's-Tests angewendet. Die Signifikanz der Mitra®-Präzisionsüberprüfung wurde mittels zweiseitigem ungepaarten t-Test berechnet. Es wurde keine statistische Methode verwendet, um die Stichprobengröße im Voraus zu bestimmen. Der Stichprobenumfang wurde auf Grundlage vorhandener Literatur und vorhergehender Erfahrung festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Kreuzvalidierung des quantitativen Assays

Dass ein Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern in DBS nach Infektion prinzipiell möglich ist, konnte die Arbeitsgruppe von Herrn Professor Thevis in der Vergangenheit zeigen^{24,248}. Unter Verwendung des gegen die RBD gerichteten Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S Tests sollte nun untersucht werden, in welcher Form und mit welchen Limitationen auch ein quantitativer Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern in DBS gelingen und inwiefern dieser die Antikörperwerte im Vollblut repräsentieren kann. Zu diesem Zweck wurde unter Verwendung des S-Assays eine Kreuzvalidierung zwischen getrockneten und venösen Blutproben durchgeführt. Dabei wurde zwischen der Antikörperantwort nach Infektion und Impfung unterschieden.

4.1.1. Anti-SARS-CoV-2-Antikörperwerte in DBS und Plasma nach Infektion

Um die nach Infektion vorliegenden Antikörperwerte in DBS mit denjenigen im Plasma zu vergleichen, wurden aus Plasmaproben ehemals Infizierter getrocknete Blutstropfen hergestellt. Hierzu wurden 27 Plasmaproben von Probanden mit durchlebter SARS-Cov-2-Infektion mit Blutzellen einer SARS-CoV-2-negativen Person versetzt und ein Hämatokrit von 45 Prozent eingestellt. Je 20 µL der rekonstituierten Blutproben wurden auf DBS-Karten und Mitra®-Spitzen aufgetragen und in Abgrenzung zu aus kapillärem Blut gewonnenen Proben als rekonstituierte DBS beziehungsweise Mitra® (rDBS/ rMitra®) bezeichnet. Für den Vergleich der quantitativen Messwerte wurden alle Proben mit dem S-Assay analysiert. Da Antikörper nach Infektion mit SARS-CoV-2 sowohl gegen das Nukleokapsid- als auch das Spike-Protein gebildet werden, wurde die Korrelation zwischen N- und S-Assay untersucht, indem die Plasmaproben mit beiden Assays analysiert wurden.

Bei allen Probanden konnten Anti-SARS-CoV-2-Antikörper nachgewiesen werden. Die mit dem S-Assay ermittelten Antikörperwerte in den Plasmaproben erstreckten sich gleichmäßig über den vom ECLIA abgedeckten Messbereich (0,4-250 U/mL). Die Messwerte lagen zwischen 1,61 und 249,2 U/mL. Eine rDBS- beziehungsweise rMitra®-Probe zeigte einen Messwert unterhalb der Nachweisgrenze, obwohl in der korrespondierenden Plasmaprobe eine Antikörperkonzentration im geringen Messbereich nachgewiesen werden konnte. Zwei Plasmaproben zeigten Messwerte oberhalb der oberen Messbereichsgrenze. Zwei Probanden wiesen Konzentrationen nahe oberer und unterer Grenze des Messbereichs auf. Ihre Messwerte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Antikörperwerte nach Infektion nahe der Grenzen des Messbereichs (0,4 und 250 U/mL). Aufgeführt sind die Werte korrespondierender Proben an unterer (Limitation durch rDBS- oder rMitra®-Wert) und oberer Grenze (Limitation durch Plasmawert). Die niedrigste Plasmakonzentration, die mittels getrockneter Blutstropfen detektiert werden konnte, betrug 4,73 U/mL. Für unverdünnte Plasmaproben ließ sich bis zu einem Maximalwert von 14,49 (bei Verwendung von rDBS) beziehungsweise 22,49 U/mL (bei Verwendung von rMitra®) eine Korrelation feststellen.

Messbereich	Plasmawert [U/mL]	rDBS [U/mL]	rMitra® [U/mL]
Minimalwert	4,73	0,414	0,444
Maximalwert	249,2	14,49	22,49

Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen getrockneten Blut- und Plasmaproben: Das Bestimmtheitsmaß zwischen rDBS- und Plasmawerten betrug 0,897, zwischen rMitra®- und Plasmawerten 0,9684.

Um das Verhältnis zwischen Plasma- und rDBS/ rMitra®-Werten zu ermitteln, wurde für jedes Probenpaar der Umrechnungsfaktor von getrocknetem Blut zu Plasma ermittelt. Für das maximale Wertepaar in Tabelle 1 gilt beispielsweise: Zur Berechnung des Plasmawerts (249,2 U/mL) aus den Messwerten der getrockneten Blutproben muss der rDBS-Wert (14,49 U/mL) mit dem Faktor 17,2 multipliziert werden, der rMitra®-Wert (22,49 U/mL) mit dem Faktor 11,1. Bei Betrachtung aller Proben betrug der Umrechnungsfaktor für rDBS mindestens 10,4, für rMitra® mindestens 9,5. Die Daten wurden mit einem generalisierten linearen Modell getestet und zeigten keine Konzentrationsabhängigkeit, sodass der Umrechnungsfaktor für den gesamten Messbereich angewendet werden kann. Bei rDBS wurde eine größere Streuung des Umrechnungsfaktors beobachtet als bei rMitra® (relative Standardabweichung 18,6 versus 13,9 Prozent).

Bei Analyse mit dem N-Assay zeigten sich alle Plasmaproben reaktiv, der niedrigste Wert betrug 4,28, der höchste 168,4. Zwischen den mit S- und N-Assay gemessenen Werten zeigte sich bei Testung mit generalisiertem linearem Modell ein schwach linearer Zusammenhang ($R^2 = 0,485$), der in der Korrelationsanalyse nach Spearman jedoch hochsignifikant war ($p < 0,0001$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

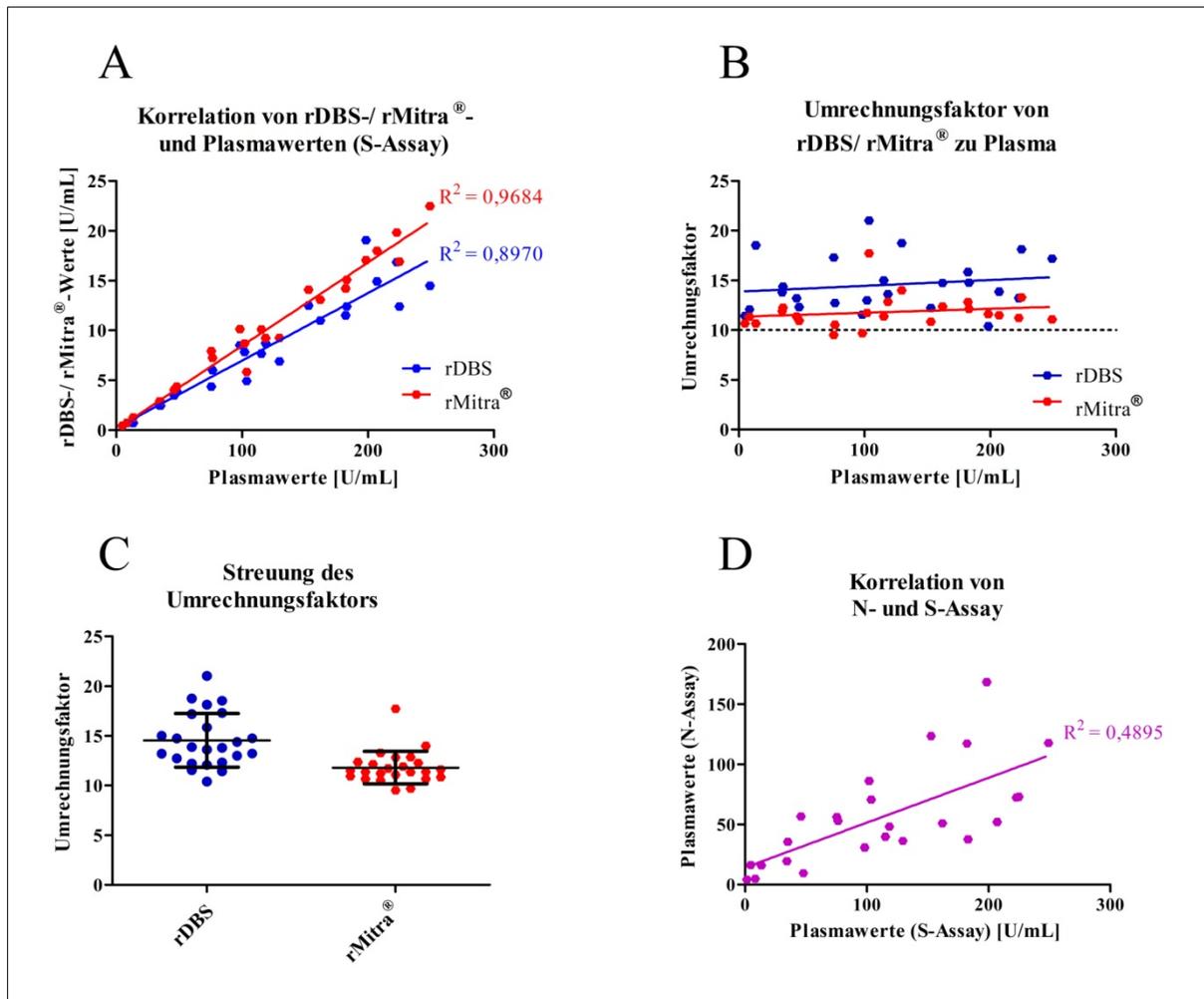


Abbildung 3: Korrelation von rDBS/ rMitra®- und Plasmawerten nach Infektion. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen getrockneten Blut- und Plasmaproben (A). Zur Berechnung von Plasmawerten aus rDBS- oder rMitra®-Werten wurde ein minimaler Umrechnungsfaktor von 10,4 beziehungsweise 9,5 ermittelt, ohne dass eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet wurde (B). Der Umrechnungsfaktor (Mittelwert \pm SD) zeigte bei rDBS eine größere Streuung als bei rMitra (C). Zwischen N- und S-Assay zeigte sich ein schwach linearer, jedoch hochsignifikanter Zusammenhang (D). Es wurden ausschließlich Messwerte innerhalb des Messbereichs berücksichtigt.

4.1.2. Anti-SARS-CoV-2-Antikörperwerte in DBS und Vollblut nach Impfung

Um zu untersuchen, wie sich die Antikörperwerte in DBS und Vollblut nach Impfung zueinander verhalten, wurden von 96 geimpften Probanden zum gleichen Zeitpunkt DBS- und Vollblutproben entnommen. Allen Probanden wurden Plasmaproben entnommen, 54 Probanden zusätzlich Serumproben. 14 Probanden wurden Mitra®-Proben von der Fingerbeere entnommen.

Die Plasma- und Serumwerte erstreckten sich über den gesamten Messbereich. Sieben einfach geimpfte Probanden zeigten Plasmawerte unterhalb der Nachweisgrenze. Eine einfach geimpfte Probandin mit durchlebter SARS-CoV-2-Infektion wies einen Plasmawert oberhalb von 250 U/mL auf. Die restlichen Proben einfach geimpfter Probanden zeigten Werte innerhalb des Messbereichs. Probanden mit zweifacher Impfung zeigten bis auf eine Ausnahme Werte oberhalb von 250 U/mL.

In den DBS-Proben zeigten 21 Probanden mit einfacher Impfung Werte unterhalb der Nachweisgrenze, 45 Probanden Werte innerhalb des Messbereichs. Die ehemals infizierte Probandin zeigte einen DBS-Wert oberhalb von 250 U/mL. Nach zweifacher Impfung zeigten 21 Probanden DBS-Werte innerhalb des Messbereichs, acht oberhalb der Messbereichsgrenze.

Diskordante Ergebnisse zwischen DBS- und Serum- oder Plasmaproben hinsichtlich der Reaktivität waren bis zu fünf Wochen nach Impfung zu beobachten. Die minimal und maximal messbaren Wertepaare innerhalb des Messbereichs sind in Tabelle 2 dargestellt. Bei Messung der Proben mit dem N-Assay zeigte sich lediglich die Probe der Probandin mit bekannter SARS-CoV-2-Infektion reaktiv.

Tabelle 2: Antikörperwerte nach Impfung nahe der Grenzen des Messbereichs (0,4 und 250 U/mL). Aufgeführt sind die korrespondierenden Proben an unterer Grenze (DBS-Wert) und oberer Grenze (Plasma-/ Serum-Wert). Der mittels DBS minimal detektierte Plasmawert betrug 4,48 U/mL (Serum 4,54 U/mL). Für unverdünnte Proben ließ sich bis zu einem Maximalwert von 215,9 U/mL eine Korrelation feststellen.

Messbereich	Plasmawert [U/mL]	Serumwert [U/mL]	DBS [U/mL]
Minimalwert	4,48	4,54	0,482
Maximalwert	215,9	237,3	11,29

Zur Überprüfung, ob Plasma- und Serumproben gleichwertig verwendet werden können, wurde zunächst die Korrelation zwischen den beiden Matrices analysiert. Da die Vollblutproben zweifach geimpfter Probanden meist oberhalb des Messbereichs des S-Assays lagen, wurden die entsprechenden Plasma- und Serumproben im Verhältnis 1:10 und 1:20 mit EDTA verdünnt. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang und Bestimmtheitsmaße von 0,9971 (unverdünnte Proben), 0,9273 (Verdünnung 1:10) beziehungsweise 0,9759 (Verdünnung 1:20). Werte außerhalb des Messbereichs wurden nicht eingeschlossen.

Da die Überwachung der Impfantwort ausschließlich mit DBS erfolgte, werden DBS- und Mitra®-Proben im Folgenden separat behandelt. Nach Ausschluss eines Outliers unter Anwendung des Grubb's-Tests zeigte sich zwischen DBS- und Plasmawerten eine lineare Korrelation ($R^2 = 0,8938$). Um zu überprüfen, ob diese Linearität auch für Messwerte oberhalb des Messbereichs besteht, wurden die entsprechenden Plasmaproben im Verhältnis 1:10 und 1:20 mit EDTA verdünnt und gegen die DBS-Werte aufgetragen. Auch hier zeigten sich lineare Korrelationen ($R^2 = 0,9143$ und $0,9049$).

Analog zum Vorgehen nach Infektion wurde der Umrechnungsfaktor von DBS- zu Plasmawerten in Abhängigkeit von der Plasmakonzentration untersucht. Hierfür wurden lediglich die unverdünnten Proben eingeschlossen. Der Umrechnungsfaktor betrug mindestens 9,3, schwankte aber bis zu einem Maximalwert von 31,8. Bei Überprüfung mit generalisiertem linearem Modells ließ sich keine Abhängigkeit von der Plasmakonzentration feststellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

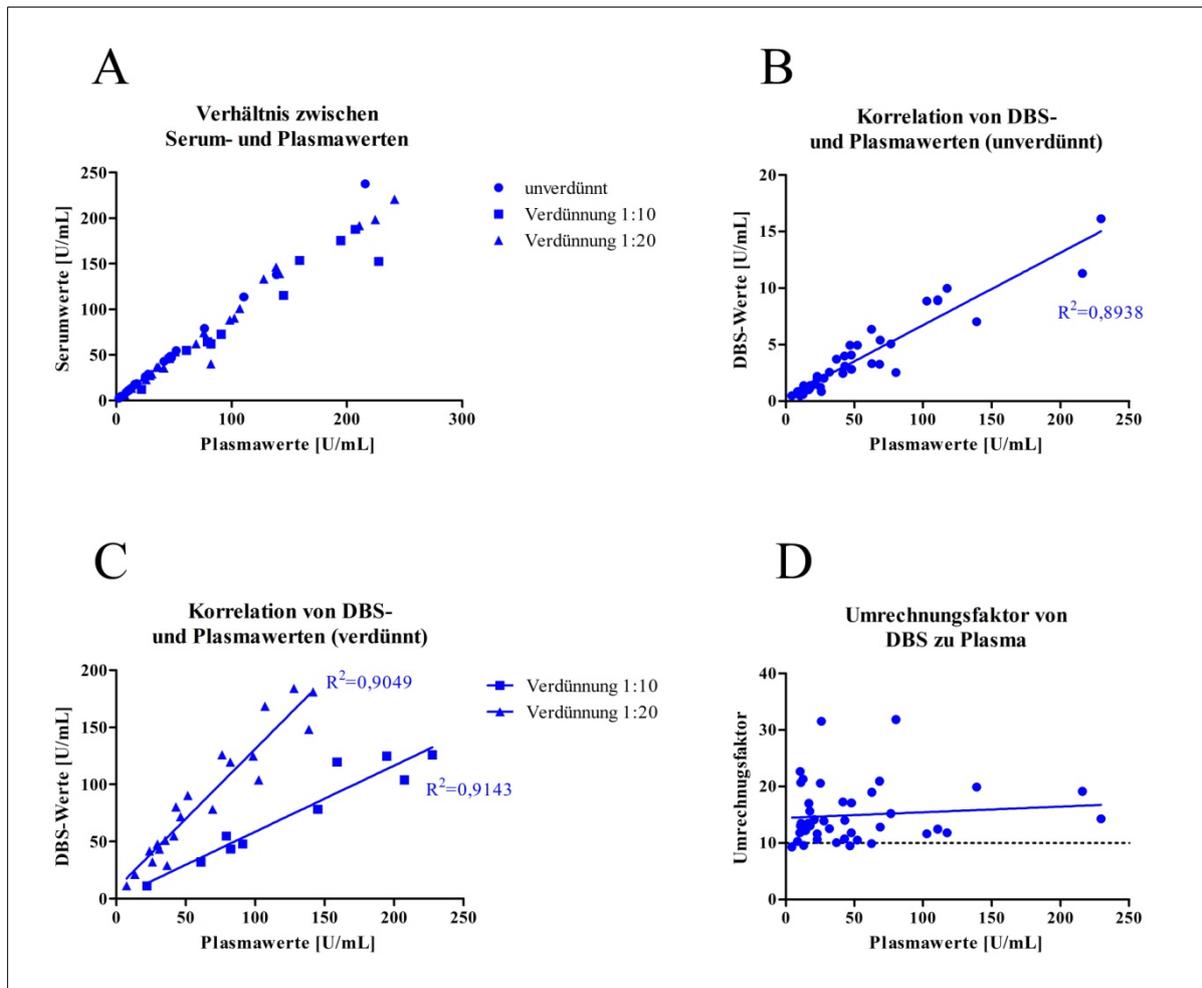


Abbildung 4: Korrelation von DBS- und Plasma-/Serumwerten nach Impfung. Serum- und Plasmawerte zeigten einen linearen Zusammenhang. Da zahlreiche Proben oberhalb der Grenze des Messbereichs (250 U/mL) lagen, wurden diese mit EDTA verdünnt. Der lineare Zusammenhang bestand auch für diese Proben (A). Zwischen DBS- und Plasmawerten zeigte sich ein linearer Zusammenhang sowohl für unverdünnte (B) als auch verdünnte (C) Proben. Der Umrechnungsfaktor von DBS- zu Plasmawerten betrug mindestens 9,3 und zeigte sich unabhängig von der Antikörperkonzentration im Plasma (D). Alle Proben wurden mit dem S-Assay gemessen. Werte außerhalb des Messbereichs wurden ausgeschlossen.

Um die Präzision der kapillären Blutentnahme zu untersuchen, wurden von 65 Proben 20 μ L Vollblut auf DBS-Karten pipettiert und mit den entsprechenden kapillären DBS verglichen. Es zeigte sich eine lineare Korrelation ($R^2 = 0,9523$). Während die Probenentnahmen zum Großteil durch die Versuchsleitung durchgeführt wurden, entnahmen zwei Probandengruppen ihre DBS-Proben selbständig. Dabei wurde eine Gruppe ($n = 17$) durch die Versuchsleitung angeleitet und supervidiert, die andere Gruppe ($n = 11$) erhielt schriftliche Instruktionen und führte die Entnahme ohne Supervision durch. Zwischen den Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied beobachten. Werte außerhalb des Messbereichs wurden ausgeschlossen.

Um den Einfluss der volumetrischen Entnahme zu testen, wurden von acht Probanden explorativ nicht-volumetrische DBS-Proben und korrespondierende Serumproben gesammelt. Sechs der Probenpaare zeigten Messwerte innerhalb des Messbereichs. Diese waren linear korreliert ($R^2 = 0,8533$).

Zur Untersuchung der Extraktionsausbeute wurden – analog zum Vorgehen bei Extraktion – 20 µL der Vollblutproben in 100 µL EDTA überführt und mit den entsprechenden kapillären DBS verglichen. Zur Angleichung des Volumens wurden die Messwerte der direkt in EDTA überführten Proben mit dem Faktor 1,2 angepasst. Messwerte außerhalb des Messbereichs wurden ausgeschlossen. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang und eine Steigung von $0,82 \pm 0,02$. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

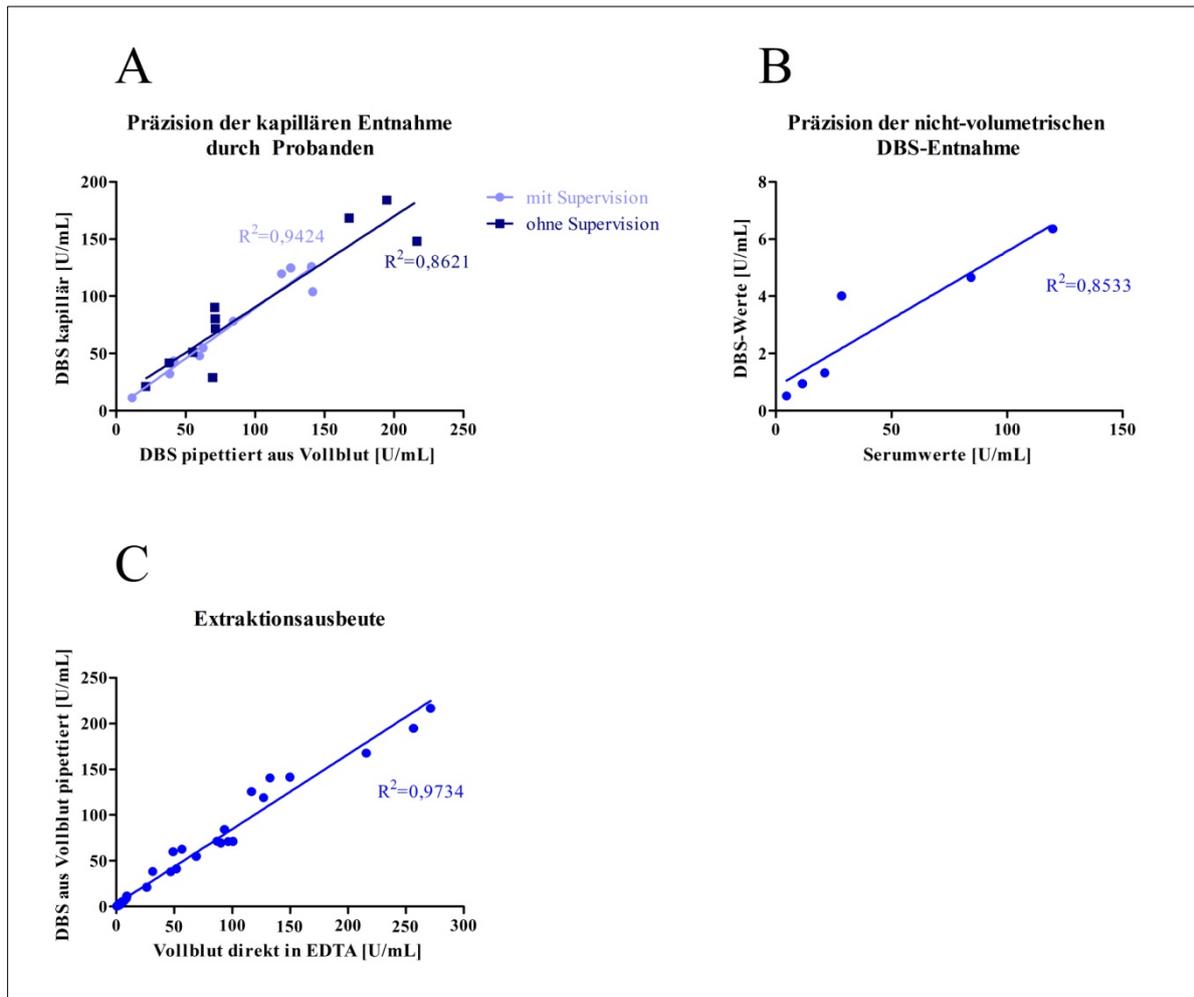


Abbildung 5: Repräsentation venöser Antikörperkonzentrationen durch DBS. Vollblut-DBS (20 µL Vollblut auf DBS-Karten pipettiert) zeigten eine lineare Korrelation zu kapillären DBS (20 µL Blut mittels Kapillare von der Fingerbeere entnommen und auf DBS-Karten platziert). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der supervidierten Selbstentnahme und schriftlichen Instruktion mit Selbstentnahme (A). Für die Exploration nicht-volumetrischer DBS wurden kapilläre Blutstropfen direkt auf die Zellulosekarte platziert. Sie zeigten eine lineare Korrelation zu den korrespondierenden Serumproben (B). Zur Untersuchung der Extraktionsausbeute wurden 20 µL Vollblut entweder auf eine DBS-Karte pipettiert und mit 100 µL EDTA extrahiert oder direkt in 100 µL EDTA überführt. Die Extraktionsausbeute lag über 80 Prozent (Steigung $0,82 \pm 0,02$) (C).

Um den Einsatz von Mitra®-Spitzen als Microsampling-Gerät zu untersuchen, wurden analog zum Vorgehen nach Infektion Mitra®-Spitzen mit 20 µL Vollblut beladen. Zur Überprüfung des eigenständigen Füllungsverhaltens wurden die Spitzen zudem an die Oberfläche der Vollblutproben gehalten, sodass sie das Blut gemäß ihrer hydrophilen Eigenschaften absorbierten. Die Messwerte wurden mit pipettierten DBS- und Plasmaproben (Verdünnung 1:20) verglichen. Da lediglich verdünnte Plasmaproben verwendet werden konnten und die realen Plasmawerte nicht bekannt waren, war die Berechnung eines Umrechnungsfaktors nicht möglich. Zwischen pipettierten DBS- und Mitra®-Proben zeigte sich eine lineare Korrelation ($R^2 = 0,987$), die Wiederfindung der Antikörper lag in den Mitra®-Proben circa acht Prozent über derjenigen in den DBS-Proben (Steigung $1,08 \pm 0,03$). Die mittels Absorption präparierten Mitra®-Proben zeigten eine größere Streuung ($R^2 = 0,7811$) als die pipettierten Mitra®-Proben und geringere Übereinstimmung mit den pipettierten DBS-Proben. Zwischen Mitra®- und verdünnten Plasmawerten zeigte sich eine lineare Korrelation. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Zum Vergleich sind die korrespondierenden pipettierten DBS-Proben ebenfalls aufgeführt. Es wurden lediglich Messwerte innerhalb des Messbereichs inkludiert.

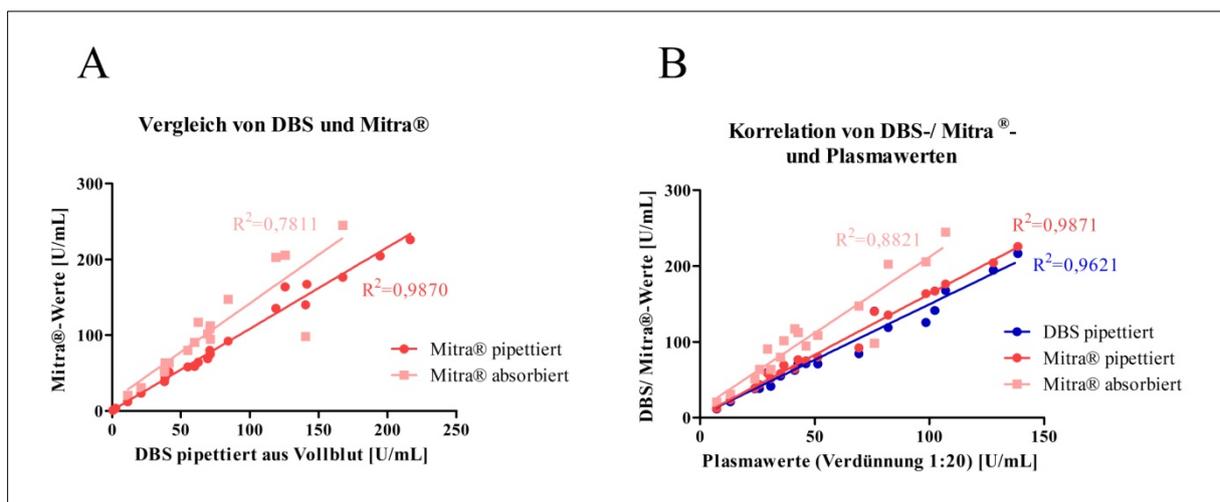


Abbildung 6: Korrelation zwischen Mitra®-Proben mit DBS- und Plasmaproben. Mitra®-Proben zeigten eine lineare Korrelation zu DBS- (A) und Plasmaproben (B), wobei die mittels Absorption präparierten Mitra®-Proben eine größere Streuung aufwiesen und weniger mit den pipettierten DBS-Proben übereinstimmten als die pipettierten Mitra®-Proben. Die Wiederfindung von Antikörpern lag in den Mitra®-Proben circa acht Prozent über derjenigen in DBS (A). Der Anschaulichkeit halber und in Analogie zu Abbildung 3 sind in (B) die pipettierten DBS-Werte ebenfalls aufgeführt. Da die realen Plasmawerte nicht bekannt waren, konnte kein Umrechnungsfaktor zwischen den Matrices bestimmt werden.

Explorativ wurden drei Sputum-Proben zweifach geimpfter Probanden mit Hilfe des S-Assays analysiert. Ihre Messwerte betragen 1,17 U/mL, 1,87 U/mL und 3,69 U/mL. Die entsprechenden Plasmaproben zeigten selbst bei Verdünnung im Verhältnis 1:20 Messwerte oberhalb von 250 U/mL und keine Reaktivität im N-Assay.

4.1.3. Charakterisierung des experimentellen Vorgehens und des S-Assays

Um einen möglichen Einfluss von Zellulosekarte, Mitra®-Spitze oder EDTA auf die Messergebnisse zu untersuchen, wurden die Substanzen als Blanks im S-Assay gemessen. Sie zeigten keine Reaktivität.

Da Proben mit Messwerten oberhalb von 250 U/mL verdünnt wurden, um die Messwerte zu quantifizieren, wurden das Verdünnungsverhalten sowie der potentielle Einfluss des Verdünnungsmediums untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Serumprobe mit EDTA, PBS, künstlichem Serum und mit Aktivkohle gereinigtem Serum (csSerum) im Verhältnis 1:10 und 1:20 verdünnt. Die Messwerte sind in Tabelle 3 dargestellt. Unabhängig vom verwendeten Medium zeigte sich, dass die nach Verdünnung erhaltenen Messwerte durchschnittlich 30 Prozent (Verdünnung 1:10) beziehungsweise 38 Prozent (Verdünnung 1:20) unter den erwarteten Werten lagen. Die relative Standardabweichung der Ergebnisse unter Verwendung der verschiedenen Verdünnungsmedien betrug 5,2 Prozent (Verdünnung 1:10) beziehungsweise 4,7 Prozent (Verdünnung 1:20). Die als Blanks gemessenen Verdünnungsmedien zeigten keine Reaktivität.

Tabelle 3: Verdünnungsverhalten einer Serumprobe bei Verdünnung mit vier verschiedenen Medien. Die nach Verdünnung erhaltenen Messwerte lagen durchschnittlich über 30 Prozent unter den erwarteten Messwerten. Dies war unabhängig vom Verdünnungsmedium zu beobachten. Dargestellt sind die ermittelten Messwerte in U/mL.

Verdünnungsmittel	Serum unverdünnt	Verdünnung 1:10	Verdünnung 1:20
EDTA	222,9	16,71	6,47
PBS	222,9	14,87	6,67
künstliches Serum	222,9	15,36	7,06
csSerum	222,9	15,24	7,15

Um das Verdünnungsverhalten näher zu charakterisieren, wurden mit drei Serumproben unterschiedlicher Konzentration (49,56 U/mL, 149,4 U/mL und 243,6 U/mL) Verdünnungsreihen mit EDTA und csSerum durchgeführt. Die Verdünnung erfolgte im Verhältnis 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 und 1:20.

Die ermittelten Messwerte ließen sich mit einer quadratischen Ausgleichsgerade besser annähern als mit einer linearen Regression. Mit steigender Verdünnung beziehungsweise im niedrigen Messbereich nahm die Abweichung vom Verdünnungsfaktor bei allen Proben zu. Für Proben mit hoher Ausgangskonzentration war dieser Effekt stärker ausgeprägt als für Proben mit niedriger Ausgangskonzentration. Das Verhalten zeigte sich unabhängig vom eingesetzten Verdünnungsmedium. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

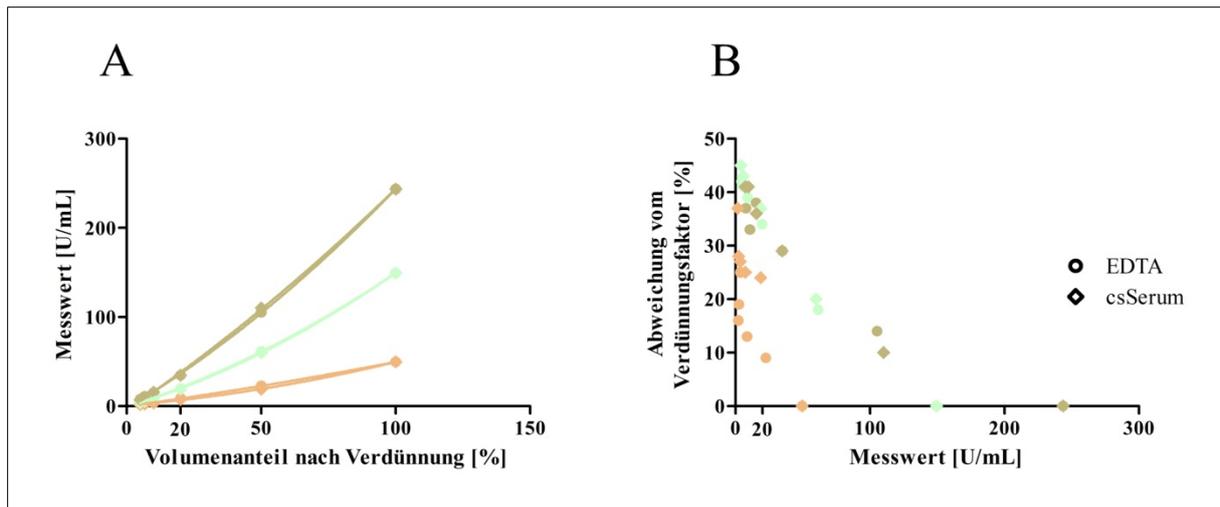


Abbildung 7: Abweichung von linearem Verdünnungsverhalten insbesondere im niedrigen Messbereich. Drei Proben unterschiedlicher Ausgangskonzentration im niedrigen, mittleren und hohen Messbereich zeigten bei Verdünnung mit EDTA und csSerum ein Verdünnungsverhalten, das mit einer quadratischen Ausgleichsgerade angenähert werden konnte. Ein Einfluss des Verdünnungsmediums war nicht erkennbar (A). Mit zunehmender Verdünnung beziehungsweise abnehmender Antikörperkonzentration nahm die Abweichung vom Verdünnungsfaktor zu (B).

Um die Reproduzierbarkeit der Messwerte innerhalb eines Tages (*intraday*) sowie im Verlauf mehrerer Tage zu untersuchen (*interday*), wurde eine Probe (Konzentration 90 U/mL) im Verhältnis 1:6 mit EDTA verdünnt und unmittelbar hintereinander zehn Mal gemessen. Dieser Vorgang wurde nach 22 und 35 Tagen wiederholt. Die relative Standardabweichung innerhalb eines Tages schwankte zwischen 1,1 und 1,4 Prozent. Die relative Standardabweichung zwischen den drei Zeitpunkten betrug 2,7 Prozent. Um die Reproduzierbarkeit der Messwerte auch für Proben im niedrigen Messbereich zu überprüfen, wurden drei Proben unterschiedlicher Messwerte (< 10 U/mL) im Verhältnis 1:6 verdünnt und ebenfalls nach 22 und 35 Tagen wiederholt gemessen. Die relative Standardabweichung schwankte hier zwischen 4,3 und 9 Prozent.

4.1.4. Präzisionsüberprüfung der Mitra®-Spitzen

Bei visueller Kontrolle fiel auf, dass die Mitra®-Spitzen weniger gefüllt waren, wenn sie mit 20 μ L Blut beladen wurden, als wenn sie mit der Oberfläche einer Blutprobe in Kontakt kamen und sich gemäß hydrophiler Eigenschaften und vordefinierter Füllmenge von 20 μ L selbständig füllten: Bei Beladung mittels Pipette blieb die Unterseite der Mitra®-Spitzen in der Regel weiß, während die Absorption zur Füllung derselben führte.

Um die Herstellerangaben (Volumen 20 μ L, RSD < 4%) zu überprüfen, wurden zehn Mitra®-Spitzen gewogen, jeweils mit 20 μ L der gleichen Vollblutprobe beladen und über Nacht getrocknet. Zehn weitere Mitra®-Spitzen wurden gewogen, zur eigenständigen Füllung an die Oberfläche der identischen Vollblutprobe gehalten und ebenfalls über Nacht getrocknet. Es wurde darauf geachtet, dass die Spitzen nicht vollständig in die Blutprobe getaucht wurden, sondern lediglich deren Oberfläche berührten. Die Absorption wurde beendet, sobald das Blut die Unterseite der Mitra®-Spitze erreicht hatte. Nach

Trocknung über Nacht wurden die Mitra®-Spitzen erneut gewogen. Alle Proben wurden extrahiert und mit dem S-Assay gemessen. Die relative Standardabweichung von Gewichts­differenz und Antikörperkonzentration in Abhängigkeit vom Applikationsmodus sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Abhängigkeit der Gewichts­differenz und Antikörperkonzentration vom Applikationsmodus (relative Standardabweichung in Prozent). Zehn Mitra®-Proben wurden entweder mittels Pipette oder hydrophiler Absorption gefüllt. Es wurde stets die gleiche Blutprobe verwendet. Das Auftragen mit Pipette führte zu einer größeren relativen Standardabweichung als die Absorption. Die relative Standardabweichung der Gewichts­differenz betrug bei Absorption weniger als vier Prozent, was mit den Herstellerangaben übereinstimmt. Die relative Standardabweichung der Antikörperkonzentration lag deutlich höher.

	Gewichts­differenz (RSD [%])	Antikörperkonzentration (RSD [%])
pipettiert	5,80	19,21
absorbiert	3,73	12,33

Der Einfluss des Applikationsmodus wurde mittels zweiseitigem gepaarten t-Test überprüft. Es zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied der Gewichts­differenz sowie ein signifikanter Unterschied der ermittelten Antikörperkonzentration. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

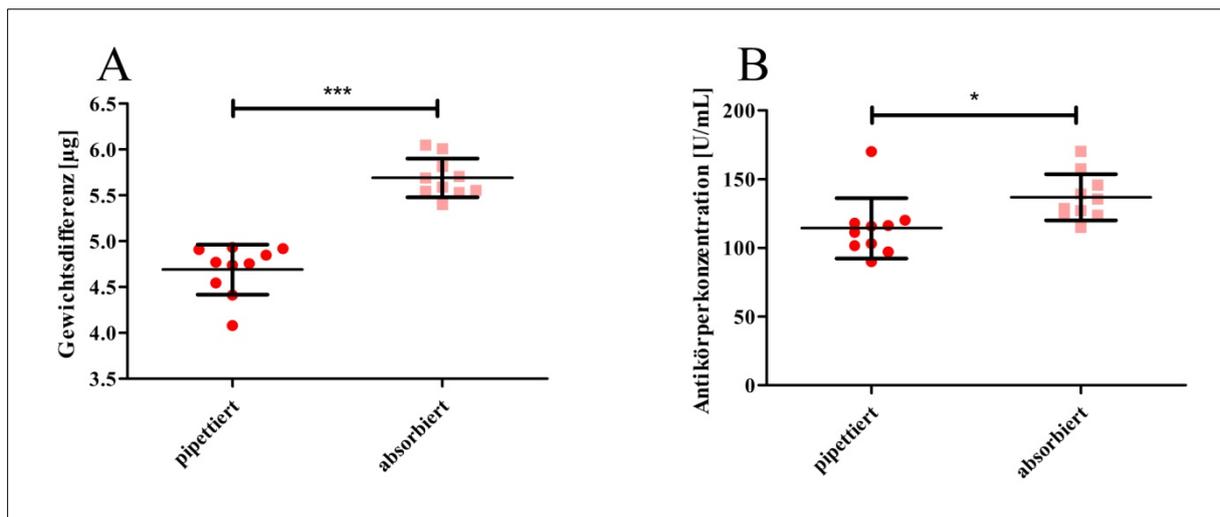


Abbildung 8: Füllungsverhalten der Mitra®-Spitzen in Abhängigkeit vom Applikationsmodus. Zehn Mitra®-Spitzen wurden entweder mittels Applikation von 20 µL oder hydrophiler Absorption befüllt. Bei Überprüfung mit zweiseitigem gepaarten t-Test zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied der Gewichts­differenz ($p < 0,0001$) sowie ein signifikanter Unterschied der ermittelten Antikörperkonzentration ($p = 0,0192$).

Um zu überprüfen, ob auch die Dauer der Absorption das Messergebnis beeinflusst, wurden elf Mitra®-Spitzen bis zur vollständigen Füllung an die Oberfläche elf verschiedener Blutproben gehalten (kurze Absorption). Dieses Vorgehen wurde mit elf weiteren Spitzen wiederholt mit dem Unterschied, dass diese nach erreichter Füllung weitere zwei Sekunden an der Oberfläche der Blutprobe belassen wurden (lange Absorption). Mittels Pipette wurden die gleichen Blutproben auf elf weitere Spitzen appliziert. Alle Proben wurden mit dem S-Assay gemessen. Nur sieben Proben zeigten in allen drei Applikationsmodi Werte innerhalb des Messbereichs und konnten in der statistischen Analyse berücksichtig-

sichtigt werden. Sie sind in Abbildung 9 dargestellt. Bei kurzer Absorptionsdauer lagen die Messwerte 26 bis 47 Prozent über den Messwerten der pipettierten Proben, bei langer Absorptionsdauer 41 bis 59 Prozent. Bei Durchführung eines gepaarten t-Tests zeigte sich eine signifikante Abweichung zwischen kurzer und langer Absorptionszeit.

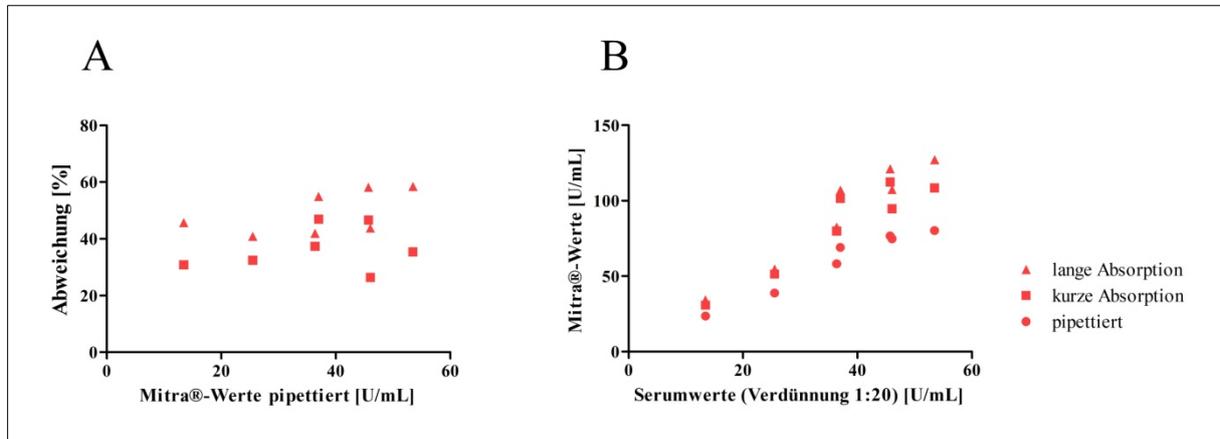


Abbildung 9: Einfluss der Absorptionsdauer auf die ermittelte Antikörperkonzentration. Die mittels kurzer Absorption präparierten Mitra®-Spitzen führten im Vergleich zu den pipettierten Proben zu einer Abweichung des Antikörperwerts um 26 bis 47 Prozent. Bei langer Absorption lag die Abweichung zwischen 41 und 59 Prozent (A). Das Verhältnis zu den entsprechenden Serumwerten ist in (B) dargestellt.

In der praktischen Anwendung war die Probenentnahme unter Verwendung von Mitra®-Spitzen deutlich einfacher und schneller als unter Verwendung einer Glaskapillare. Auch der Extraktionsvorgang gestaltete sich weniger arbeitsaufwändig und schneller, da das manuelle Ausschneiden der getrockneten Blutstropfen entfiel und die Mitra®-Spitzen direkt in EDTA-Lösung überführt werden konnten.

4.2 Überwachung der quantitativen Antikörperantwort nach Impfung

Mittels regelmäßiger DBS-Messungen sollte überprüft werden, wie sich die Antikörperantwort verschiedener Probanden bei Anwendung unterschiedlicher Impfstoffe im Zeitverlauf verhält, wenn diese mit Hilfe selbständig entnommener Proben überwacht wird. Berücksichtigt wurden die Impfstoffe BNT162b2 (n = 6) und mRNA-1273 (n = 6) in homologer Applikation sowie ChAdOx1 nCoV-19 (n = 15), das in homologer Form (n = 5) oder in Kombination mit BNT162b2 (n = 6) oder mRNA-1273 (n = 3) eingesetzt wurde. Die Überwachung wurde über einen Zeitraum von sechs Wochen nach Erstimpfung mit allen Probanden wöchentlich durchgeführt, anschließend bei Probanden mit größerem Abstand zur Zweitimpfung in reduzierter Frequenz. Nach der Zweitimpfung erfolgte die DBS-Überwachung mindestens drei Wochen lang erneut wöchentlich. Eine Probandin mit ChAdOx1 nCoV-19-Erstimpfung konnte lediglich sechs Wochen und somit nicht über den Zeitpunkt der zweiten Impfung verfolgt werden. Vor Beginn der Überwachung wurden alle Teilnehmenden unter Verwendung von N- und S-Assay auf Vorliegen von Antikörpern getestet und zeigten keine Reaktivität.

Der Abstand zwischen den Impfungen war individuell verschieden: Bei BNT162b2 betrug er für alle Probanden 21 Tage, bei mRNA-1273 lag er zwischen 28 und 36 Tagen, bei ChAdOx1 nCoV-19 zwischen 62 und 93 Tagen. Da bei allen Teilnehmenden und unabhängig vom Impfstoff eine starke Antikörperzunahme nach Erhalt der zweiten Impfdosis zu beobachten war, wurde dieser Zeitpunkt in der graphischen Darstellung aufgrund der ungleichen Impfabstände als Nullpunkt ($x = 0$) gewählt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Verläufe ist für alle Impfstoffe der Zeitraum zwischen 90 Tagen vor und 60 Tagen nach Zweitimpfung dargestellt, auch wenn die Überwachung der homologen mRNA-Impfung deutlich kürzer ausfiel. Aufgrund der geringen Probandenanzahl werden die Ergebnisse rein deskriptiv berichtet. Die absoluten Messwerte sind in Zusatztabelle 1-5 im Anhang aufgeführt.

Bei BNT162b2 wurde bei zwei der sechs Teilnehmenden nach 16 Tagen erstmals Reaktivität im DBS-Eluat nachgewiesen. Diese lag im sehr niedrigen Messbereich des S-Assays (0,537 und 1,55 U/mL). Die restlichen Teilnehmenden zeigten erst nach Erhalt der zweiten Impfdosis reaktive Proben. In der Messung neun Tage nach Zweitimpfung erreichten alle Probanden ihren jeweiligen Maximalwert. In fünf Proben lag dieser zwischen 45 und 146 U/mL, in einer Probe oberhalb der Messbereichsgrenze (BT-4). In den Folgemessungen zwei und drei Wochen nach Zweitimpfung wurde bei allen Probanden eine Abnahme der Antikörperkonzentration auf ungefähr die Hälfte der Maximalkonzentration beobachtet. In der Nachbeobachtung nach zehn und elf Wochen zeigten zwei Probanden konstante Werte (BT-2 und BT-6), bei den restlichen Probanden kam es zu einer weiteren Abnahme der Antikörperkonzentration. Die Verläufe sind in Abbildung 10 dargestellt.

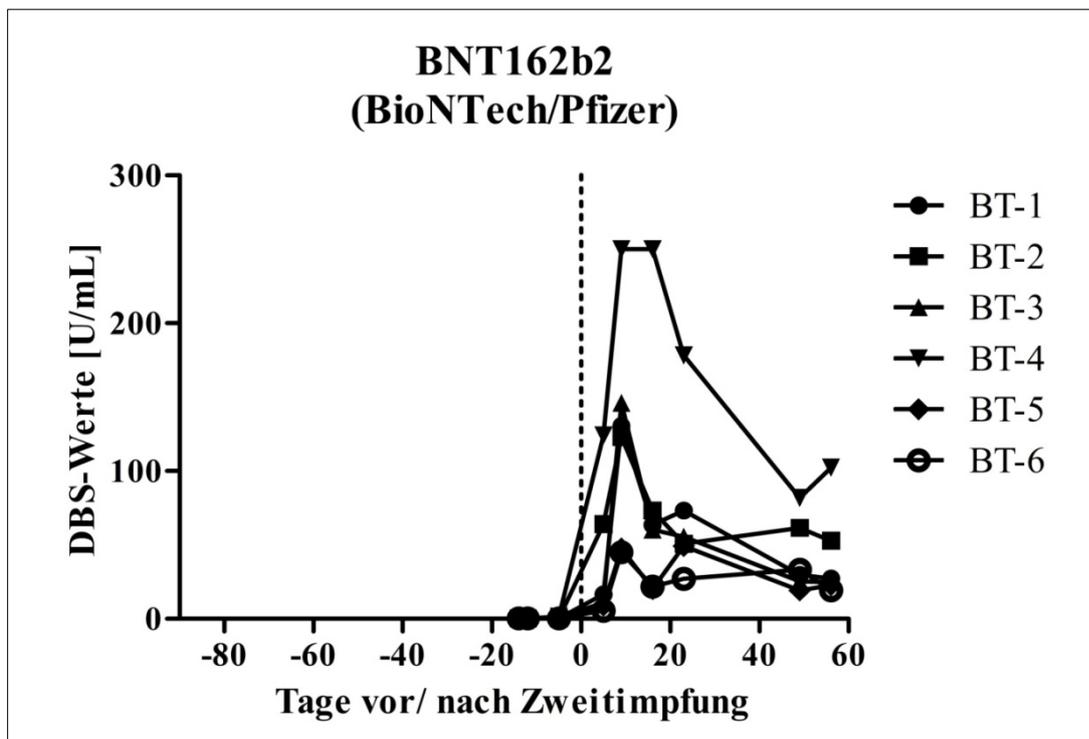


Abbildung 10: Longitudinale Überwachung der Antikörperantwort in DBS von sechs Probanden mit zweifacher BNT162b2-Impfung.

Bei mRNA-1273 wurde bereits acht Tage nach Erstimpfung ein Vorliegen von Antikörpern beobachtet (Mod-4), nach spätestens 17 Tagen (und somit vor Erhalt der zweiten Impfdosis) war dieses bei allen Probanden nachweisbar (Messwerte zwischen 1,47 und 50,92 U/mL). Eine Woche nach Zweitimpfung zeigten fünf der sechs Probanden Werte oberhalb der Messbereichsgrenze. Da sich dies bis zum Ende der Beobachtungsperiode nicht änderte, können die Verläufe nicht näher beschrieben werden. Eine Probandin (Mod-6) erreichte erst sieben Wochen nach Zweitimpfung eine Antikörperkonzentration oberhalb der Messbereichsgrenze. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

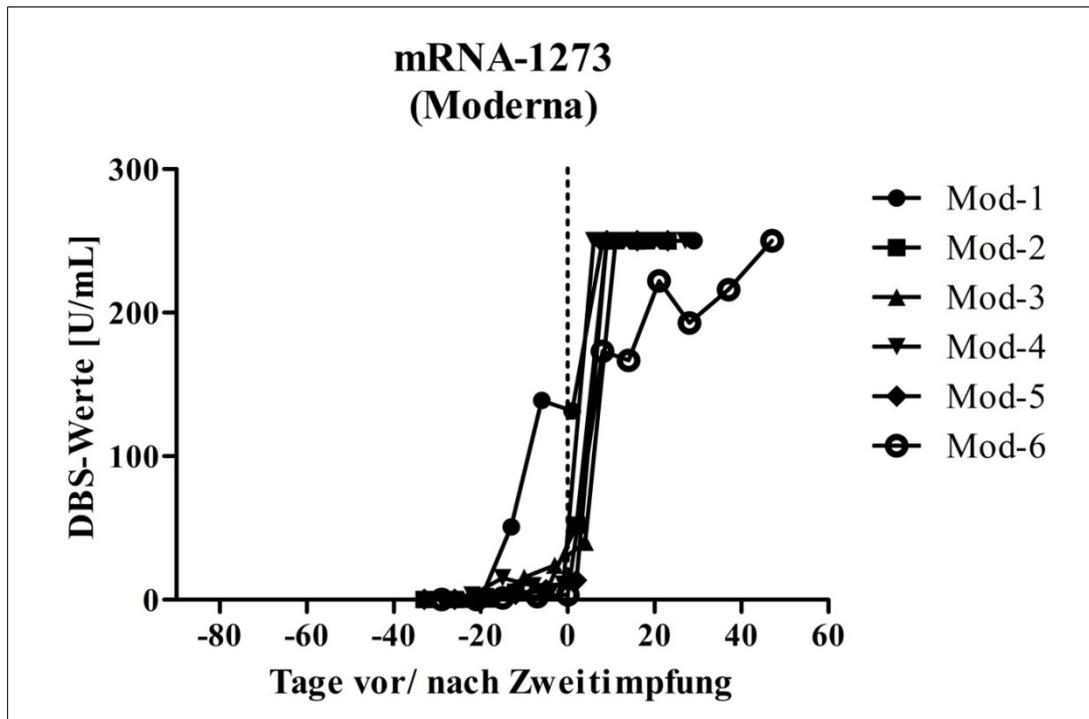


Abbildung 11: Longitudinale Überwachung der Antikörperantwort in DBS von sechs Probanden mit zweifacher mRNA-1273-Impfung.

Bei ChAdOx1 nCoV-19 wurde frühestens ab zwei, in der Regel ab vier Wochen nach Erstimpfung Reaktivität im niedrigen Messbereich beobachtet (0,478 bis 7,59 U/mL). Nach Erhalt einer zweiten ChAdOx1 nCoV-19-Dosis war bei allen Probanden eine Zunahme der Antikörperkonzentration nachweisbar, zeigte sich jedoch heterogen: Während eine Probandin (AZ-1) bereits eine Woche nach Zweitimpfung einen Messwert oberhalb der Messbereichsgrenze aufwies, zeigte ein Proband (AZ-5) bis zum Ende der Beobachtungsperiode Messwerte unterhalb von 15 U/mL. Während bei AZ-1 im weiteren Verlauf eine Abnahme der Antikörperkonzentration zu beobachten war, zeigten AZ-3 und AZ-4 eine stetige Zunahme und erreichten 27 beziehungsweise 49 Tage nach Zweitimpfung Werte oberhalb der Messbereichsgrenze. Die Verläufe sind in Abbildung 12 dargestellt. Zusätzlich wurden dieser Kohorte nach zwei, drei, vier, acht und 16 Wochen Plasmaproben entnommen. Im Plasma war eine Antikörperdetektion ab zwei Wochen nach Erstimpfung möglich. Aufgrund der im Vergleich zu DBS höheren Messwerte treten die interindividuellen Unterschiede in der graphischen Darstellung bei

gleicher Skalierung deutlicher hervor. Über die Antikörperkonzentration nach Zweitimpfung ist bei reiner Plasmamessung keine Aussage möglich, da vier der fünf Probanden nach Zweitimpfung Werte oberhalb der Messbereichsgrenze aufwiesen.

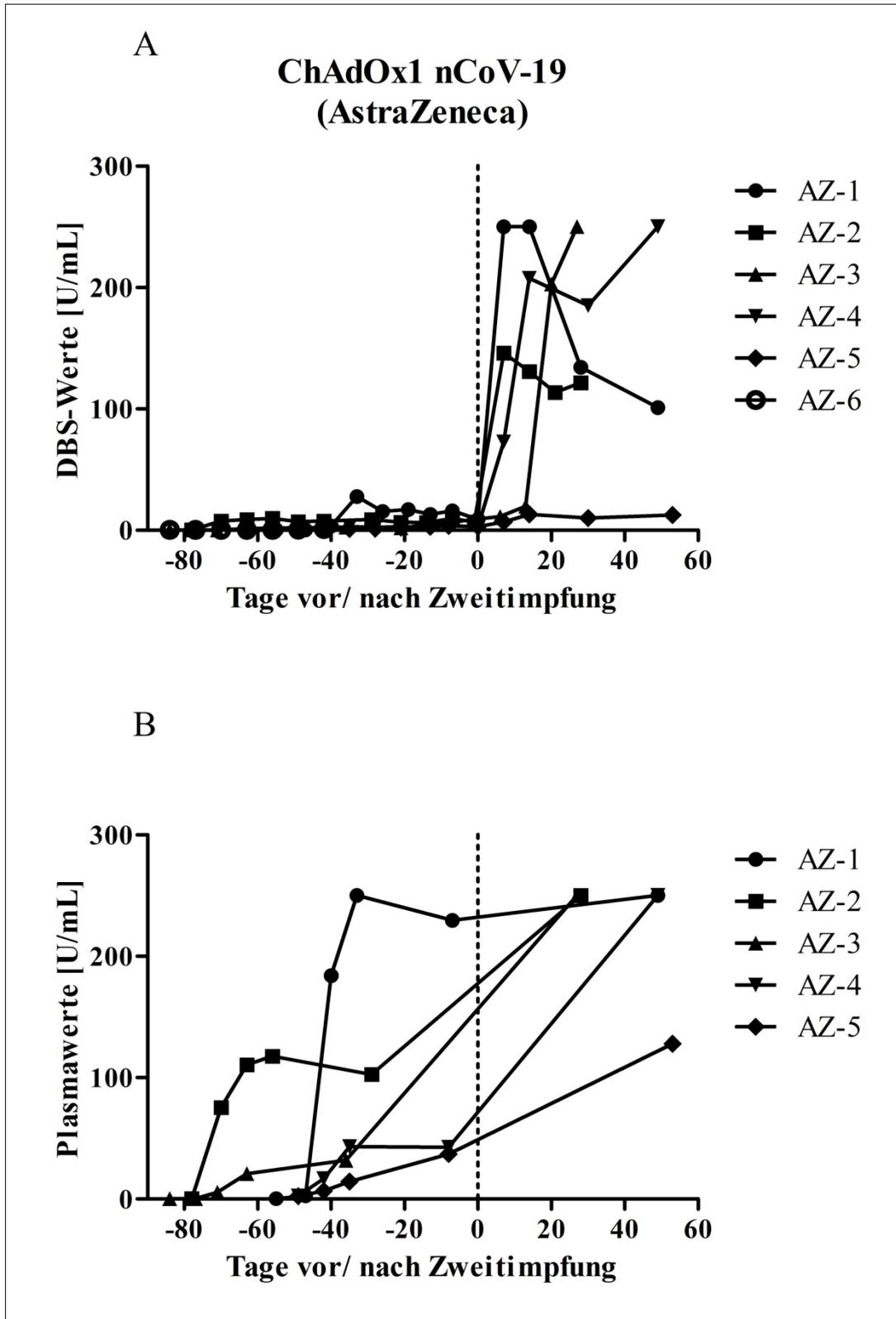


Abbildung 12: Longitudinale Überwachung der Antikörperantwort von Probanden mit zweifacher ChAdOx1 nCoV-19-Impfung in DBS (A) und Plasma (B).

Bei Kombination von ChAdOx1 nCoV-19 mit einem mRNA-Impfstoff zeigten alle Probanden sieben bis elf Tage nach Zweitimpfung Messwerte oberhalb von 250 U/mL. Bei sieben der neun Probanden zeigten sich diese im Verlauf der Beobachtungsperiode konstant. Ein Proband (AZ-BT5) zeigte 17 Tage nach Zweitimpfung einen Messwert von 232 U/mL. Eine Probandin (AZ-BT3) zeigte sieben Wochen nach Zweitimpfung einen Rückgang auf 125 U/mL. Da diese Probe abweichend vom Protokoll deutlich verspätet entnommen wurde, sind die Werte der anderen Teilnehmenden zum gleichen Zeitpunkt nicht bekannt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

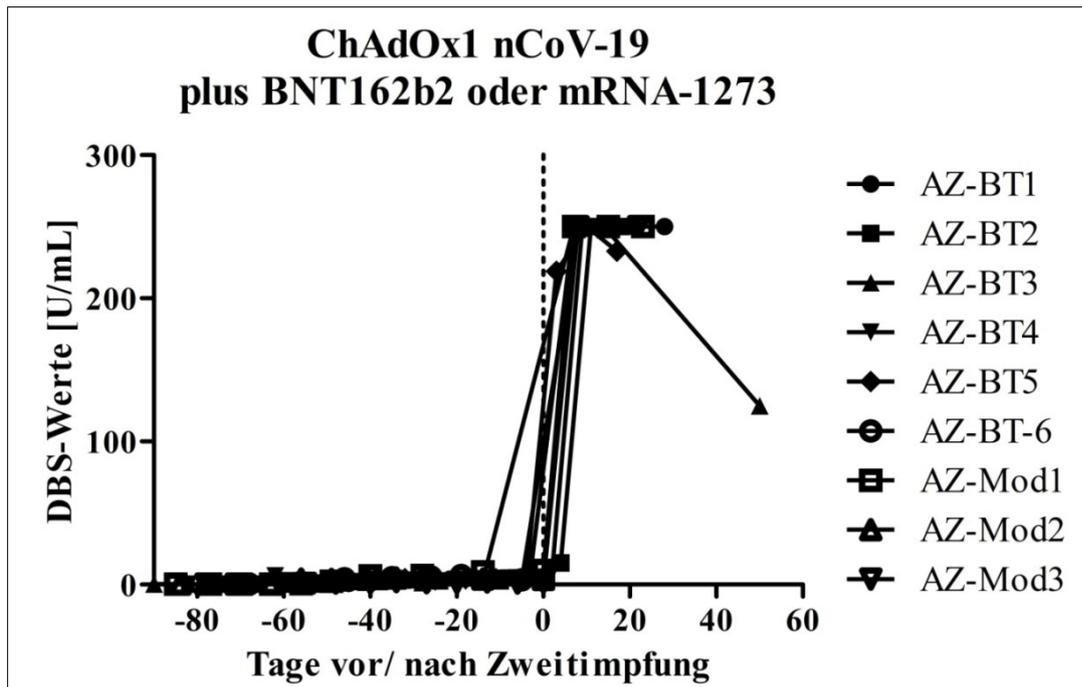


Abbildung 13: Longitudinale Überwachung der Antikörperantwort in DBS von neun Probanden mit Erstimpfung ChAdOx1 nCoV-19 und Zweitimpfung BNT162b2 (AZ-BT) oder mRNA-1273 (AZ-Mod).

4.3 Machbarkeitsstudie und Untersuchung des Semestereinflusses an der DSHS

Um zu untersuchen, ob die Detektion von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern in DBS auch in größerem Maßstab einsetzbar ist, bei einem gesteigerten Probenaufkommen eine zeitnahe Analyse zulässt und Antikörper nach Infektion oder Impfung zuverlässig anzeigt, wurde eine Studie mit 557 Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Deutschen Sporthochschule durchgeführt. Die Studie fand zu zwei Zeitpunkten, im Oktober 2020 und März 2021, statt (im Folgenden als DSHS I und II bezeichnet). Durch Testung vor und nach dem Wintersemester sollte neben der Durchführbarkeit auch der Einfluss des Hochschulbetriebs auf das Infektionsgeschehen unter den Beschäftigten untersucht werden.

327 Probanden (173 Frauen, 154 Männer) nahmen an DSHS I teil, 230 Probanden (128 Frauen, 92 Männer) an DSHS II. 132 Probanden nahmen zu beiden Zeitpunkten teil.

Während zum Zeitpunkt der Durchführung von DSHS I noch keine Impfstoffe in Deutschland zugelassen waren, hatten zu Beginn von DSHS II fast zehn Prozent der deutschen Bevölkerung eine Impfung erhalten²⁹³. Um auf Vorliegen von Antikörpern nach Infektion zu testen, wurden alle Proben pseudonymisiert unter Verwendung des N-Assays analysiert. Nach Entblindung wurden die Proben der Geimpften zusätzlich mit dem S-Assay analysiert. Die Analyse fand bis auf wenige Ausnahmen am Tag des Probeneingangs statt.

Gemäß Herstellerangaben werden Testergebnisse oberhalb eines numerischen Cutoff-Index von 1,0 als reaktiv interpretiert. Da die Angaben sich auf Serum- oder Plasmaproben beziehen, wurde für die DBS-Proben (Verwendung von Vollblut statt Serum/ Plasma, geringeres Volumen auf DBS-Karte, potentielle Verluste oder Verdünnung während der Extraktion) eine konservative Anpassung vorgenommen und Proben oberhalb eines COI von 0,5 als reaktiv bewertet. In der getesteten Kohorte reichten die beobachteten Werte der reaktiven DBS-Proben von 0,698 bis 28,2, während die Werte für nicht-reaktive Proben zwischen 0,04 und 0,12 lagen (Abbildung 14). Testergebnisse nahe, aber unterhalb des COI (0,2 bis 0,5) wurden als uneindeutig eingestuft und mittels Analyse eines weiteren DBS-Spots oder einer venösen Blutprobe erneut bestimmt.

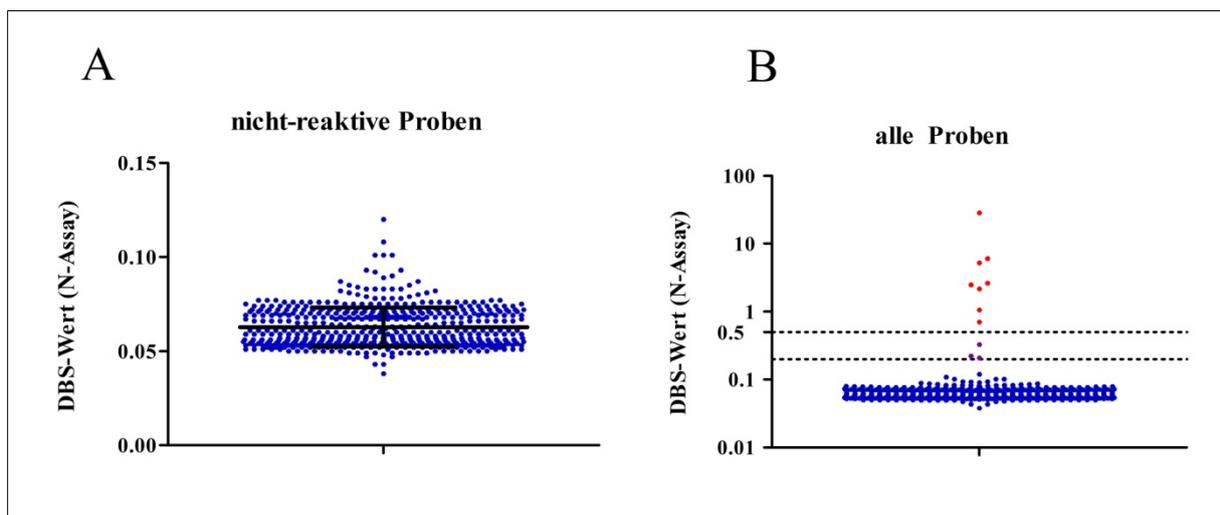


Abbildung 14: Werte der DBS-Proben von DSHS I und II, gemessen mit dem N-Assay. Während die Werte der nicht-reaktiven Proben (dargestellt in blau) zwischen 0,04 und 0,12 lagen (A), galten Proben oberhalb eines COI von 0,5 als reaktiv (dargestellt in rot) und waren von den nicht-reaktiven Proben eindeutig abgrenzbar (B, Verwendung einer logarithmischen Skala). Auch die uneindeutigen Proben (dargestellt in violett) waren deutlich von den nicht-reaktiven Proben unterscheidbar.

DSHS I zeigte bei drei der 327 Probanden reaktive DBS-Proben (Tabelle 5). Keiner dieser Probanden hatte einen zuvor positiven PCR-Test berichtet. Alle drei Proben wurden durch Analyse eines weiteren DBS-Spots und/ oder einer Plasmaprobe als reaktiv bestätigt. Zwei der 327 Proben zeigten uneindeutige Werte und wurden durch Analyse einer Plasmaprobe als reaktiv identifiziert. Die restlichen Proben waren nicht-reaktiv. Die als nicht-reaktiv identifizierte Probe mit dem höchsten Wert (0,12) war auch in wiederholten Messungen nicht-reaktiv (0,158 und 0,072). Eine einzige Probandin hatte einen in der Vergangenheit positiven PCR-Test angegeben. Ihre DBS-Probe war jedoch nicht-

reaktiv und konnte auch bei wiederholter Messung (DBS sowie Plasma) als nicht-reaktiv bestätigt werden.

Tabelle 5: Übersicht über DSHS I-Proben mit Spezialbefund. Alle reaktiven oder uneindeutigen DBS-Proben ließen sich durch Wiederholungsmessungen (DBS oder Plasma) als reaktiv identifizieren. Die Proben der einzigen Probandin mit in der Vergangenheit positivem PCR-Test waren weder in wiederholter DBS- noch Plasmamessung reaktiv.

	DBS 1	DBS 2	Plasma	Testanamnese	Interpretation
DBS reaktiv	5,24	3,15	50,49	negativ	reaktiv
	2,17	2,38	/	negativ	reaktiv
	0,698	1,74	/	negativ	reaktiv
DBS uneindeutig, Messung von Plasma	0,327	0,353	4,82	negativ	reaktiv
	0,221	0,203	1,37	negativ	reaktiv
DBS nicht-reaktiv trotz positiver PCR	0,067	0,063	0,084	positiver PCR-Test (13.09.20)	nicht-reaktiv

DSHS II zeigte bei Messung mit dem N-Assay bei fünf der 230 Probanden reaktive Proben (Tabelle 6). Drei dieser Probanden hatten einen in der Vergangenheit positiven PCR-Test angegeben, ein Proband einen positiven Antikörper-Test, bei einer Probandin lag zuvor kein positiver Befund vor. Alle Proben wurden durch Messung eines weiteren DBS-Spots als reaktiv bestätigt. Eine der 230 Proben zeigte ein uneindeutiges Ergebnis und wurde durch Plasmamessung als reaktiv identifiziert. Bei der getesteten Probandin hatte bereits in DSHS I ein uneindeutiges DBS-Ergebnis vorgelegen, das in der Plasmamessung als reaktiv identifiziert worden war (Plasmawert DSHS I: 4,82, Plasmawert DSHS II: 1,73). Bei drei Probanden, die einen zuvor positiven PCR-Test angegeben hatten, waren die DBS-Proben nicht-reaktiv. Zwei dieser Probanden zeigten auch in der konsekutiven Plasmamessung keine Reaktivität. Bei einer Probandin war aufgrund von Schwangerschaft keine Blutentnahme und Wiederholungsmessung einer Plasmaprobe möglich.

Tabelle 6: Übersicht über DSHS II-Proben mit Spezialbefund. Alle reaktiven oder uneindeutigen DBS-Proben ließen sich durch Wiederholungsmessungen (DBS oder Plasma) als reaktiv identifizieren. Bei fünf von sechs dieser Probanden lagen in der Vergangenheit positive PCR- oder Antikörper-Tests vor. Drei Teilnehmende mit positiver Testanamnese konnten auch bei wiederholter Messung nicht als reaktiv identifiziert werden.

	DBS 1	DBS 2	Plasma	Testanamnese	Interpretation
DBS reaktiv	28,2	30,42	/	positiver AK-Test (25.11.20)	reaktiv
	6,04	5,8	/	positiver PCR-Test (15.02.21)	reaktiv
	2,63	2,95	/	negativ	reaktiv
	2,46	1,37	/	positiver PCR-Test (05.02.21)	reaktiv
	1,05	1,38	/	positiver PCR-Test (05.12.20)	reaktiv
DBS uneindeutig, Messung von Plasma	0,207	0,244	1,73	positiver AK-Test (19.11.20)	reaktiv
DBS nicht-reaktiv trotz positiver PCR	0,108	0,080	/	positiver PCR-Test (15.12.20)	nicht-reaktiv
	0,07	0,061	0,336	positiver PCR-Test (12.12.20)	nicht-reaktiv
	0,043	0,053	0,072	positiver PCR-Test (26.02.21)	nicht-reaktiv

Die zwei Probandinnen mit in DSHS I uneindeutigen DBS-Proben waren die einzigen Studienteilnehmenden mit auffälligem Befund, die auch an DSHS II teilnahmen. Während die DSHS II-Testung bei einer Probandin analog zu DSHS I verlief (DBS uneindeutig, Plasma reaktiv), war bei der anderen Probandin bereits die DBS-Probe nicht-reaktiv.

14 Probanden hatten zum Zeitpunkt von DSHS II eine Impfdosis mit Impfstoff der Firma AstraZeneca erhalten, ein Proband zwei Impfdosen von BioNTech/Pfizer. Diese DBS-Proben wurden zusätzlich unter Verwendung des S-Assays gemessen. Analog zu den vorherigen Beobachtungen waren die Proben bis auf eine Ausnahme ab drei Wochen nach Impfung reaktiv. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen Antikörperlevel und zeitlichen Abstand zur Impfung erkennen. Die Ergebnisse sind in Zusatztable 6 im Anhang dargestellt.

Zur Untersuchung der Rolle des Semesters hinsichtlich des Infektionsgeschehens wurden von den teilnehmenden Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern Angaben Häufigkeit und Form ihres arbeitsbezogenen Studierendenkontakts erhoben. Es zeigte sich eine Reduktion der Studierendenkontakte bei nahezu unveränderter räumlicher Verteilung ihres Auftretens. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Angaben zu wöchentlicher Anzahl und Ort der Studierendenkontakte (in absoluten Zahlen und anteilig zur jeweiligen Kohortengröße). Beim Begegnungsort wurde zwischen in Räumlichkeiten, zum Beispiel Büro, Seminarraum, Hörsaal, Halle, und außerhalb von Räumlichkeiten, zum Beispiel Freiplätze, differenziert. Während die Studierendenkontakte in DSHS I und II räumlich ähnlich verteilt waren, ließ sich bei DSHS II eine Reduktion ihrer Häufigkeit beobachten.

		DSHS I	%	DSHS II	%
Häufigkeit	<1/ Woche	163	49,8	145	63,0
	1-3/ Woche	87	26,6	49	21,3
	>3/ Woche	77	23,5	36	15,7
Begegnungsort	in Räumlichkeiten	283	86,5	195	84,8
	außerhalb von Räumlichkeiten	44	13,5	35	15,2

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und mit welchen Limitationen getrocknete Blutstropfen zum quantitativen Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern geeignet sind, wie sich die Antikörperentwicklung nach Impfung in der longitudinalen DBS-Überwachung verhält und ob sich unter Einsatz von DBS ein Einfluss des Semesterbetriebs auf die Seroprävalenz unter den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Deutschen Sporthochschule ermitteln lässt.

Die quantitativen DBS-Ergebnisse zeigten sowohl nach Infektion als auch nach Impfung eine lineare Korrelation zu den entsprechenden Plasma- und Serumproben. Um Antikörperwerte in Plasma oder Serum auf Basis getrockneter Blutproben zu bestimmen, kann konzentrationsunabhängig ein Umrechnungsfaktor von mindestens zehn angenommen werden. Die Messung von DBS-Eluat mit zwei kommerziellen Assays von Roche erlaubte einen hohen Probendurchsatz und die Differenzierung zwischen durch Infektion oder Impfung induzierten Antikörpern. Die selbständige volumetrische Probenentnahme mittels Glaskapillare erwies sich als durchführbar und präzise, in der Handhabbarkeit jedoch für einige Probanden mühsam. Zur erleichterten Probenentnahme ist der Einsatz einer Microsampling-Technologie sinnvoll.

Mit Hilfe selbständig entnommener DBS-Proben ließ sich der Antikörperverlauf nach homologer Impfung mit den Impfstoffen BNT162b2, mRNA-1273 und ChAdOx1 nCoV-19 sowie nach heterologer Impfung mit ChAdOx1 nCoV-19 und einem mRNA-Impfstoff in einer kleinen Kohorte longitudinal überwachen. Es zeigten sich interindividuell unterschiedliche Verläufe der ermittelten Antikörperkonzentrationen, jedoch bei allen Teilnehmenden eine starke Zunahme der Antikörperkonzentration nach Erhalt der zweiten Impfdosis.

Die qualitative Anwendung von DBS für über 500 Teilnehmende erwies sich als praktikabel. Eine größere Skalierung ist mit den vorhandenen technischen und personellen Mitteln am Institut für Biochemie der DSHS vorstellbar. In der im Vergleich zu Seroprävalenzstudien auf Populationsebene kleinen Stichprobe konnte bei reduziertem Studierendenkontakt kein überproportionaler, infektionsfördernder Einfluss des Semesterbetriebs an der DSHS nachgewiesen werden.

5.1 Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern in DBS

5.1.1. Quantitativer Antikörpernachweis in DBS im Vergleich zu Plasma und Serum

Da zahlreiche Substanzen sich in venösem und kapillärem Blut unterschiedlich präsentieren²⁹⁴, muss ihre Beziehung für jeden kapillär zu testenden Analyten und das verwendete Nachweisverfahren neu überprüft werden²⁷². Der eingesetzte Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S Assay von Roche ist für den quantitativen Nachweis von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern in Plasma und Serum zugelassen, nicht jedoch in DBS-Eluat²³². Einige Studien haben diesen oder den Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Assay zur Analyse von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern in DBS untersucht, beschränken sich jedoch meist auf einen rein qualitativen Nachweis^{230,276,295-297}.

Der hier untersuchte quantitative Nachweis erwies sich als möglich, zeigte jedoch Limitationen, die in der praktischen Anwendung berücksichtigt werden müssen. Zwischen DBS- und Plasma- oder Serumproben konnte ein über den gesamten Messbereich linearer Zusammenhang nachgewiesen werden. Dies wurde sowohl für die aus Plasma rekonstituierten Proben nach Infektion als auch für die kapillären Proben nach Impfung beobachtet, was als interne Bestätigung angesehen werden kann. Die Validität rekonstituierter DBS-Proben wurde in mehreren Arbeiten hinreichend belegt^{25,230,248}. Um Plasma- oder Serumwerte auf Basis von DBS-Werten zu bestimmen, kann konzentrationsunabhängig ein Umrechnungsfaktor von mindestens zehn angenommen werden. Maßgeblich lag er zwischen zehn und 20, schwankte jedoch bis zu einem Maximalwert von 32. Diese Streuung ist angesichts von Ungenauigkeiten in der volumetrischen Blutentnahme, Verlusten bei Transport und Lagerung oder einer unvollständigen Desorption vom Zellulosematerial plausibel. Auch die höhere Variabilität des Verhältnisses zwischen Plasma und zellulären Bestandteilen in kapillären Proben im Vergleich zu venösem Blut kann einen Einfluss gehabt haben und durch zusätzliches „Melken“ des Fingers verstärkt worden sein²⁹⁸. Für diese Tatsache spricht, dass der Umrechnungsfaktor der rekonstituierten DBS eine geringere Streuung aufweist als der Umrechnungsfaktor der kapillären DBS. Zur Reduktion der „drop-to-drop“ Variabilität könnte es vorteilhaft sein, bereits bei der Entnahme größere Volumina kapillären Bluts zu sammeln oder bei der Analyse mehrere Blutspots gepoolt zu messen²⁹⁸. Für Plasma- oder Serumproben mit Messwerten oberhalb der Messbereichsgrenze von 250 U/mL ließ sich kein Umrechnungsfaktor ermitteln, bei Verdünnung zeigte sich jedoch auch für diese Proben eine lineare Korrelation zu DBS.

Die Detektionsschwelle lag für DBS-Proben um einen Faktor zehn unter derjenigen für Plasma- oder Serumproben. Angesichts eines niedrigeren Blutvolumens, der Verwendung von Vollblut statt Plasma oder Serum sowie potentieller Verluste und Verdünnung während der Extraktion war dies nicht überraschend. Im Vergleich zu Mulchandani et al., die unter Verwendung des Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Assays eine um den Faktor 30 geringere Detektionsschwelle beobachteten²⁷⁶, führte das in dieser Arbeit angewendete Entnahme- und Extraktionsverfahren zu einer deutlich effizienteren Antikörper-Ausbeute. Dies korrespondiert mit den Beobachtungen von Brinc et al., die unter Verwendung des Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S Assays eine Sensitivität von 98 Prozent erreichen konnten²³⁰. Einen maßgeblichen Einfluss auf die Extraktionsausbeute haben leicht adaptierbare Faktoren wie das eingesetzte Blutvolumen, die Entfernung überschüssigen Kartenmaterials oder das Volumen des Extraktionsmediums²⁴.

Während die untere Nachweisgrenze des Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S Assays für Plasma- oder Serumproben gemäß Herstellerangaben bei 0,4 U/mL liegt und Proben erst oberhalb einer Konzentration von 0,8 U/mL als reaktiv gewertet werden, ist es sinnvoll, die Schwelle für DBS aufgrund der geringeren Sensitivität abzusenken und Proben bereits oberhalb von 0,4 U/mL als reaktiv zu werten. Zwar lassen sich Plasma- oder Serumwerte unterhalb von 4 U/mL unter alleiniger Verwendung von DBS weiterhin nicht detektieren, es ist jedoch fraglich, ob dies in der Praxis relevant ist, da bislang keine

Immunitätsschwelle für SARS-CoV-2 definiert werden konnte und die beobachteten Antikörperwerte nach abgeschlossener Impfung in einem deutlich höheren Bereich liegen, meist oberhalb der Messbereichsgrenze des S-Assays. Für den Zustand nach Infektion zeigte sich eins der 27 Probenpaare ausschließlich in der Plasmaprobe reaktiv (Messwert 1,61 U/mL im S-Assay beziehungsweise 4,28 im N-Assay). Antikörperkonzentrationen im niedrigen Messbereich können also bei alleiniger DBS-Messung fälschlicherweise nicht detektiert werden. Nach Impfung kam es zwischen Plasma- oder Serumproben und DBS-Proben bis zu fünf Wochen nach Erstimpfung zu diskordanten Ergebnissen hinsichtlich der Reaktivität. Diese glichen sich jedoch im Verlauf an, da die Antikörperkonzentrationen zunahmten und schließlich auch in den DBS-Proben nachweisbar waren.

Die erhobenen Daten zeigen, dass für Anti-SARS-CoV-2-Antikörper eine lineare Korrelation zwischen DBS und Plasma- oder Serumproben besteht, was die Methode als einfach anzuwendende Alternative zur quantitativen Antikörperbestimmung aus Vollblut interessant macht.

5.1.2. Herausforderungen bei der Probenentnahme

Ein großer Vorteil von DBS liegt in der selbständigen Probenentnahme, was den Einschluss großer Kohorten, abgelegenen wohnender oder immobiler Probanden erlaubt. Gleichzeitig stellt diese Entnahmeform eine potentielle Fehlerquelle für die quantitative Antikörperbestimmung dar, da diese auf einer volumetrischen Probenentnahme beruht.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde mit volumetrisch (Kreuzvalidierung, Impfüberwachung) und nicht volumetrisch entnommenen Proben (Hochschulstudie) gearbeitet. Die 557 nicht volumetrisch entnommenen Proben zeigten eine variable Spotgröße und –qualität, ließen jedoch in der Regel eine qualitative Antikörperbestimmung zu. Teilweise mussten hierfür mehrere Spots gepoolt werden, sodass in der praktischen Anwendung das Befüllen von mindestens zwei Spots beibehalten werden sollte. Die eigenständige Probenentnahme wurde von den Teilnehmenden akzeptiert, alle ausgehändigten Karten wurden instruktionsgemäß behandelt und zurückgeschickt. Dies entspricht den Beobachtungen von Guest et al. und Valentine-Graves et al., die die Selbstentnahme im Rahmen der iCollect-Studie digital überwachten^{264,265}. Dabei bewerteten 90 Prozent der Probanden die Selbstentnahme als akzeptabel oder sehr akzeptabel²⁶⁴, 93 Prozent der Proben hatten eine für die Laboruntersuchung ausreichende Qualität²⁶⁵. In beiden Arbeiten waren jedoch vornehmlich junge Probanden eingeschlossen. Aufgrund der in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Probandenrekrutierung am Arbeitsplatz ergibt sich auch für diese ein Selektionsbias zugunsten im Berufsleben stehender und somit tendenziell aktiver Probanden. Da insbesondere ältere oder körperlich eingeschränkte Personen von schweren SARS-CoV-2-Verläufen betroffen sein können^{48,49} und die Prävalenz unter Kindern von hoher politischer Brisanz ist, könnte die Handhabbarkeit für diese Zielgruppen in Folgestudien untersucht werden. Dies gilt umso mehr für die anspruchsvollere volumetrische Probenentnahme.

Diese wurde mit Hilfe einer 20 µL messenden und mit EDTA beschichteten Glaskapillare durchgeführt. Zwischen den mittels Kapillare von der Fingerbeere entnommenen und den aus venösem Vollblut pipettierten Proben zeigte sich eine lineare Korrelation. Dies weist einerseits auf eine hohe Präzision der kapillären Entnahme sowie andererseits Repräsentanz kapillärer DBS für venöse Blutproben hin. Wie Weisser et al. betonen, muss das Verhältnis mit Hilfe verschiedener Probenmaterialien ermittelter Ergebnisse für jeden diagnostischen Test neu etabliert werden²⁷². Zwischen der supervidierten und nicht supervidierten Selbstentnahme zeigte sich kein signifikanter Unterschied, sodass in der praktischen Anwendung auf die Supervision verzichtet und der Vorteil von DBS als personelle Ressourcen einsparendes Hilfsmittel genutzt werden kann.

Von einigen Teilnehmenden wurden Schwierigkeiten beim Befüllen und Entleeren der Kapillare berichtet oder durch die Versuchsleitung beobachtet. Ursachen waren insbesondere ein zu geringer Blutfluss bei Wahl einer ungünstigen Punktionsstelle oder per se unzureichenden Durchblutung, auch wenn die Teilnehmenden zu einer standardisierten Vorbereitung der Punktionsstelle durch Erwärmen mit warmem Wasser und Befolgung einer vorgegebenen Einstichposition angehalten waren. Mitunter kam es zum kapillären Einschluss einer Luftblase oder eines Blutgerinnsels, was zur unvollständigen Füllung der Kapillare führte. Bei Sistieren des Blutflusses versuchten die Teilnehmenden häufig, diesen durch Massage des punktierten Fingers anzuregen. Es ist davon auszugehen, dass die dadurch hervorgerufene Produktion extravasärer Gewebeflüssigkeit zu einer Verdünnung der Blutprobe und möglicherweise Beeinträchtigung der Probenqualität führte²⁹⁸. Zur Erleichterung der Punktion könnte der Einsatz verschiedener Lanzettentypen mit variabler Stechtiefe evaluiert werden.

Fraglich ist, welchen Einfluss eine derartige Verdünnung oder lediglich 80- oder 90-prozentige Füllung der Kapillare auf die ermittelte Antikörperkonzentration hat oder ob diese aufgrund von Ungenauigkeiten im anschließenden Extraktions- und Messverfahren möglicherweise zu vernachlässigen ist. Bei Überprüfung von sechs nicht-volumetrisch aufgetragenen DBS zeigte sich ebenfalls eine lineare Korrelation zwischen DBS- und Serumproben. Möglicherweise spielt die volumetrische Entnahme also eine untergeordnete Rolle. Angesichts der kleinen Probenanzahl ist diese Beobachtung jedoch mit großer Zurückhaltung zu interpretieren und sollte mit einer größeren Fallzahl näher beleuchtet werden.

Um die Compliance der Teilnehmenden zu fördern und die präzise kapilläre Entnahme zu erleichtern, wurde der Einsatz eines volumetrischen Microsampling-Geräts untersucht: Mitra®-Spitzen basieren auf dem VAMS-Prinzip (*volumetric absorptive microsampling*) und absorbieren Blut vordefinierten Volumens gemäß ihrer hydrophilen Materialeigenschaften. Unerwarteterweise – da vom Hersteller eine relative Standardabweichung von maximal vier Prozent angegeben wurde²⁸⁵ – zeigte sich, dass mittels Absorption gefüllte Mitra®-Proben schlechter mit den korrespondierenden Plasmaproben korreliert waren als pipettierte Mitra®- oder DBS-Proben. Auch wenn die relative Standardabweichung der Gewichts Differenz der mittels Absorption gefüllten Mitra®-Spitzen die Herstellerangabe nicht überschritt, zeigten sich systematisch höhere Antikörperkonzentrationen als in den pipettierten Proben.

Verstärkt wurde dieser Effekt durch eine längere Absorptionsdauer: Durchschnittlich lagen die so ermittelte Werte 50 Prozent über den in pipettierten Proben ermittelten Konzentrationen.

Es ist möglich, dass die pipettierten Proben die wahre Antikörperkonzentration unterrepräsentieren, da es beim Pipettiervorgang zu Verlusten von Plasma oder Serum kommen kann. Da jedoch in der vorliegenden Arbeit für innerhalb des Messbereichs liegende Plasmakonzentrationen ein minimaler Umrechnungsfaktor von zehn auf Grundlage pipettierter Mitra®-Werte etabliert wurde und ein Überschätzen der Messwerte nachteiligere Konsequenzen hätte als ein Unterschätzen, sollte in der praktischen Anwendung die kurze Absorptionsdauer eingehalten werden. Für den Zustand nach zweifacher Impfung ist die beobachtete Ungenauigkeit angesichts hoher Antikörperkonzentrationen wahrscheinlich von geringer Relevanz. Im niedrigen Messbereich, wie er für den Zustand nach Infektion beobachtet wurde, kann sie jedoch durchaus ins Gewicht fallen. Da Mitra®-Spitzen nicht nur in der Probenentnahme, sondern auch in der Extraktion Vorteile aufweisen, sind weitere Untersuchungen angezeigt, um das Phänomen abschließend zu klären.

Alternativ könnte der Einsatz von Microsampling-Geräten wie HemaXis™ oder Capitainer-B evaluiert werden, wie Marchand et al. dies für den qualitativen Assay getan haben²⁹⁵. HemaXis™-Geräte werden derzeit weiterentwickelt, um bereits bei der Probenentnahme eine Trennung der zellulären Bestandteile von Plasma oder Serum vorzunehmen^{252,284}. Dies könnte die derzeit im Labor stattfindenden Extraktionsschritte erübrigen. Gleichzeitig ist der Einsatz dieser Technologien mit zusätzlichen Kosten verbunden, was das ökonomische Argument zugunsten der Anwendung von DBS anstelle von Plasma- oder Serumproben untergraben würde.

5.1.3. Herausforderungen bei Probenhandhabung und -aufbereitung

Als Trägermaterial der Blutstropfen wurden FTA® DMPK-C Karten verwendet. Diese enthalten laut Herstellerangaben und in Abgrenzung zu anderen Karten keine imprägnierten Chemikalien, die zur Denaturierung proteinbasierter Biomoleküle beitragen oder mit der Analyse interferieren. Alternativ könnte der Einsatz von Whatman 903 Karten, EUROIMMUN Blood Collection Cards, PerkinElmer 226 oder TFN Karten, die von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Analyse von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern eingesetzt wurden^{230,247,272,276,296}, mit der hier angewendeten Extraktionsmethode evaluiert werden, um beispielsweise die Möglichkeit einer höheren Extraktionsausbeute zu untersuchen.

Bei Lagerung bei +4°C und Messung mit dem Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Assay zeigten sich die Antikörper auf FTA® DMPK-C Karten hinsichtlich des qualitativen Ergebnisses über mindestens sechs Monate stabil²⁴⁸. Wie sich Lagerung und Extraktionszeitpunkt auf den quantitativen Messwert auswirken, könnte nun nach erfolgter Kreuzvalidierung unter Verwendung des Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S Assays untersucht werden. Für eine langfristige und ressourcenunabhängige Lagerung wäre ferner eine Stabilitätsüberprüfung der quantitativen Messwerte bei Raumtemperatur interessant. Wie Fontaine et al. berichten, hatte eine 30-tägige Lagerung auf Whatman 903 Karten zwischen 20 und 30°C

keinen Einfluss auf das qualitative Ergebnis, auch wenn die Autorinnen und Autoren im Verlauf einen langsamen Abbau von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern beobachteten²⁹⁶. Da der Einsatz von DBS in Regionen mit begrenzten diagnostischen Kapazitäten oder geographisch entlegenen Gebieten Vorteile aufweist, ist ein Transport über größere Distanzen und unter extremen klimatischen Bedingungen vorstellbar. Die Überprüfung der Antikörper-Stabilität unter erschwerten Versandbedingungen (hohe Luftfeuchtigkeit und Temperatur, große Distanz und mechanische Belastung) ist dementsprechend von Interesse. Moat et al. konnten für PerkinElmer 226 Karten bei gleichzeitigem Vorliegen hoher Temperatur und Feuchtigkeit nach 28 Tagen einen negativen Effekt auf die Analytenstabilität feststellen, auch wenn die Parameter separat nur einen geringen Effekt zu haben schienen²². In der hier vorgestellten Arbeit wurden Proben bis zu 600 Kilometer innerhalb Deutschlands per Post transportiert, ohne dass eine Auswirkung auf ihre Qualität zu beobachten war. Karp et al. konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen Proben feststellen, die weniger als 100 oder mehr als 1500 Meilen verschickt wurden. Auch unter Simulation eines sommerlichen oder winterlichen Klimas zeigten sich die Proben stabil²⁷¹.

Vor der Extraktion wurden die getrockneten Blutstropfen ausgeschnitten und geviertelt. Das manuelle Vorgehen war angesichts einer – auch bei volumetrischer Entnahme vorliegenden – Spotheterogenität notwendig. Gleichzeitig ist diese Präparation aufwändig und stellt eine potentielle Fehlerquelle dar. Im Sinne eines größeren Probendurchsatzes ist die Implementierung einer Stanzapparatur sinnvoll. McDade et al. geben an, dass ein fünf Millimeter großes Segment ungefähr fünf Mikroliter Serum entspricht²⁵. Zur Implementierung einer Stanzapparatur könnte ein Verhältnis zwischen Durchmesser und Volumen mit dem hier verwendeten Kartenmaterial etabliert werden. Da zudem die Stanzposition einen Einfluss auf die ermittelte Antikörperkonzentration haben kann^{22,278}, sollte diese vereinheitlicht werden. Angesichts einer geringen Größe vereinzelter Spots könnte es vorteilhaft sein, das Zentrum mehrerer Spots auszustanzen und die erhaltenen Teile gepoolt zu extrahieren. So ließe sich möglicherweise auch eine potentielle Variabilität zwischen verschiedenen Blutstropfen ausgleichen²⁹⁸, eine höhere Analytendichte erreichen und die Sensitivität der Gesamtmethode erhöhen. Gleichzeitig setzt dieses Vorgehen in Abgrenzung zum manuellen Ausschneiden des Gesamtsports eine gleichmäßige Durchtränkung des Filterpapiers voraus, was leider nicht immer der Fall war. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die Größe der ausgestanzten Partikel die mit dem Extraktionsmittel in Kontakt kommende Oberfläche beeinflusst: Dabei könnte eine größere Oberfläche zwar die Extraktionsausbeute erhöhen; zu kleine Partikel können jedoch bei Extraktion im Ultraschallbad verklumpen und zum vollständigen Verlust der Probe führen. Da ferner der Hämatokrit-Wert einen Effekt auf die rheologischen Eigenschaften der Blutstropfen sowie den enthaltenen Plasma- oder Serumanteil hat, kann er die ermittelte Antikörperkonzentration je nach Größe und Lokalisierung des ausgestanzten Spots beeinflussen. Für die in dieser Arbeit analysierten Proben ist dieser Effekt wahrscheinlich zu vernachlässigen, da ein homogenes Probandengut eingeschlossen wurde²⁷⁵. Da dies bei einer großvolumigen Anwendung von DBS nicht vorausgesetzt werden kann, könnte der Einfluss des Hämatokrit-

Werts in Folgestudien untersucht werden. Möglicherweise ließe sich so im Sinne einer Homogenisierung der Proben eine Anpassung der auszustanzenden Spotgröße an den Hämatokrit-Wert vornehmen. Bei der Extraktion wurde zur Etablierung des gleichen Milieus wie in den Plasmaröhrchen und um die Anzahl der eingesetzten Chemikalien und potentiellen Einflussfaktoren gering zu halten, eine 1,8 mg/mL-haltige EDTA-Lösung eingesetzt. Damit konnte eine Extraktionsausbeute von über 80 Prozent erreicht werden. Ob Elutionspuffer wie PBS/ Tween™, LowCross Buffer® oder künstliches Serum zu einer höheren Extraktionsbeute oder Reduzierung möglicherweise vorhandener Matrixeffekte führen, könnte in Folgestudien untersucht werden. Ferner könnte als Referenzwert eine Extraktion mit Eigen-serum als Medium minimaler Interferenz untersucht werden, wohlwissend dass diese für die klinische Anwendung nicht praktikabel ist. Bei Verdünnung der Proben mit PBS, künstlichem Serum und mit Aktivkohle gereinigtem Serum wurde kein Unterschied zur Verdünnung mit EDTA beobachtet, sodass eine Interaktion von EDTA mit dem Nachweisverfahren unwahrscheinlich ist. Hinsichtlich des Volumens des eingesetzten Verdünnungsmediums wurde das von Thevis et al. optimierte Verfahren implementiert²⁴.

Während Knoop et al. unter Verwendung des Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Assays erhöhte Messwerte (0,1-0,2) blanker extrahierter Spots beobachteten²⁴⁸, zeigten die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Materialien bei Verwendung des Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S Assays keine Reaktivität. Zwar ist es möglich, dass sie eine Reaktivität unterhalb der Nachweisgrenze von 0,4 U/mL besitzen, dies ist in der klinischen Anwendung angesichts höherer zu erwartender Messwerte jedoch vernachlässigbar.

Dank der Extraktion im Ultraschallbad genügte eine Extraktionszeit von zehn Minuten, um eine 80-prozentige Ausbeute zu erreichen. Eine längere Extraktionszeit zeigte keinen Vorteil²⁴. Dies ist hinsichtlich der Bearbeitung eines großen Probenvolumens vorteilhaft und hebt sich positiv von zahlreichen anderen Studien ab, die mehrstündige Extraktionen oder gar Extraktionen über Nacht beschreiben^{23,263,276}. Um den Probendurchsatz zu erhöhen, die Routineanalytik zu vereinfachen und die Analysekosten zu reduzieren ist eine Automatisierung der vollständigen DBS-Analyse, wie beispielsweise von Gaugler et al. oder Knoop et al. evaluiert^{247,248}, sinnvoll.

Für Mitra®-Proben zeigte sich: Neben der erleichterten Probenentnahme wies der Extraktionsprozess weniger Fehlerquellen und einen höheren Probendurchsatz auf, da das mühsame, manuelle Ausschneiden der getrockneten Blutspots entfiel. Die Messwerte lagen bis auf wenige Ausnahmen über denjenigen der DBS-Proben (durchschnittlich acht Prozent), was zusätzlich auf eine bessere Desorption der Antikörper vom Polymer- im Vergleich zum Zellulosematerial hinweist. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Marchand et al.^{295,299}. Darüber hinaus wiesen die Messwerte der pipettierten Mitra®-Spitzen eine geringere relative Standardabweichung auf als die pipettierten DBS-Proben, was auf eine geringere Variabilität der Extraktion schließen lässt. Mitra®-Proben sind zudem robuster gegenüber variablen Hämatokrit-Werten als DBS²⁸². Allgemein kann ihr Einsatz als vorteilhaft bewertet werden, wenn das Einhalten einer korrekten Absorptionszeit berücksichtigt wird.

Auch wenn LFIA hinsichtlich der Selbstanwendung ähnliche Vorteile bieten wie DBS, haben sie eine geringere Sensitivität als laborbasierte serologische Tests und erlauben keine quantitative Aussage¹⁹⁻²¹. Zusätzliche reduziert die Trennung von Probenentnahme und -analyse bei DBS Fehler in der Präanalytik und entkoppelt die Interpretation von der Integrität der Probanden.

5.1.4. Vor- und Nachteile der verwendeten Assays

Zahlreiche Labore haben hauseigene Assays entwickelt, um den Einsatz von DBS zur Anti-SARS-CoV-2-Diagnostik zu untersuchen^{22,23,271,274}. Dies erschwert die Vergleichbarkeit der Messergebnisse, auch wenn von der WHO inzwischen einen Standard zur Vereinheitlichung serologischer Assays vorgeschlagen wurde^{227,228}. Labore ohne Kapazität einer eigenen Assayentwicklung waren von der Durchführung serologischer Testungen zunächst ausgeschlossen. Angesichts eines dynamischen Infektionsgeschehens waren die schnelle Einführung und klinische Überprüfung kommerzieller Assays daher extrem wertvoll²³⁰.

In Studien detektierte der quantitative Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S Assay Antikörper gegen die RBD ab zwei Wochen nach Infektion mit einer Sensitivität von 84 Prozent und einer Spezifität von 100 Prozent²⁹¹. Der qualitative Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Assay detektierte Antikörper gegen das Nukleokapsid ab zwei Wochen nach Infektion mit einer Sensitivität von 89 Prozent und einer Spezifität von 99 Prozent²⁹⁰. Dank dieser Parameter kann der Antikörper-Nachweis auch im geringen DBS-Volumen gelingen. Wie Klumpp-Thomas et al. jedoch unter Verwendung eines differenzierten ELISA beobachteten, wiesen einige Probanden mittlerer Antikörperkonzentration höhere Absorptionwerte gegen das Spike-Antigen als die RBD auf, sodass eine alleinige Messung von Anti-RBD-Antikörpern die möglicherweise polyklonale Antikörperbildung nicht berücksichtigt²¹⁸.

Die Analyse im Cobas e411 Analyzer erfordert ein Probenvolumen von lediglich 20 µL und erfolgt vollautomatisch innerhalb von 45 Minuten. Dies macht sie für einen hohen Probendurchsatz infizierter oder geimpfter Menschen attraktiv. Der S-Assay zeigte in dieser Arbeit eine hohe Reproduzierbarkeit innerhalb eines Tages sowie im Vergleich mehrerer Tage. Für den N-Assay wurden diese Parameter von Knoop et al. positiv bewertet²⁴⁸.

In Kombination erlauben die Assays eine Differenzierung zwischen dem Zustand nach Infektion und Impfung, da bei einer SARS-CoV-2-Impfung mit den derzeit in Deutschland zugelassenen Impfstoffen Antikörper gegen das Spike-Protein gebildet werden, bei einer Infektion hingegen Anti-Spike- und Anti-Nukleokapsid-Antikörper. So ließe sich mit Hilfe des N-Assays die tatsächliche Impfstoffeffektivität asymptomatischer Individuen überprüfen²⁹⁶. Bei Geimpften, die eine starke Impfreaktion aufweisen, könnte nachträglich festgestellt werden, ob in der Vergangenheit bereits eine SARS-CoV-2-Infektion vorgelegen hat. Da bereits Infizierte in Deutschland nur eine Impfdosis erhalten (Stand 25. August 2021)^{300,301}, könnte dies die Zweitimpfung obsolet machen und zu einer ressourcenschonenden Impfstoffverteilung beitragen. Umgekehrt könnte bei Menschen, für die aufgrund einer stattgehabten

Infektion nur eine Impfdosis vorgesehen ist, die Ausbildung von Anti-Spike-Antikörpern überprüft werden. Da diese Antikörper mit einem besserem Outcome assoziiert sind als Antikörper gegen die Nukleokapsid-Einheit⁹⁸, könnten bereits Infizierte mit geringer Antikörperentwicklung gezielt zweigepflicht werden.

Da Mueller et al. und Higgins et al. bei einigen Probanden diskordante Ergebnisse zwischen den beiden Assays festgestellt haben^{291,302}, könnte ein kombinierter Einsatz zur Überprüfung der Immunantwort nach Infektion erwogen werden. In der vorgelegten Arbeit wurde keine Diskordanz der Assays bei bekanntermaßen Infizierten beobachtet. Vielmehr zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang, auch wenn der N-Assay nicht über eine quantitative Skalierung verfügt und die Methoden daher nur eingeschränkt miteinander vergleichbar sind. Während die in lediglich einem Assay mögliche Nachweisbarkeit bei Mueller et al. gleichmäßig auf S- und N-Assay verteilt war, berichteten Higgins et al. ausschließlich von Proben, die im S-Assay reaktiv waren, im N-Assay jedoch nicht^{291,302}. Da eine quantitative Aussage derzeit lediglich mit Hilfe des S-Assays möglich ist, spricht dies bei Verwendung lediglich eines Assays für den Einsatz des S-Assays. Inwiefern die quantitative Aussage nach Infektion und Impfung miteinander vergleichbar ist, muss untersucht werden, da ein qualitativer Unterschied durch Impfung oder Infektion hervorgerufener Antikörper beschrieben wurde³⁰³.

N- und S-Assay detektieren mehrere Antikörperklassen gleichzeitig, was ihre Sensitivität erhöht²¹⁹, jedoch keine Differenzierung der Antikörperklassen erlaubt. Aufgrund der zentralen Rolle von IgA für die mukosale Immunabwehr und ihre Fähigkeit, sterilisierende Immunität zu vermitteln⁷¹, wäre eine spezifische Untersuchung von IgA im Respirationstrakt interessant. Hierfür müsste jedoch ein IgA-spezifischer Assay verwendet werden. Auch wenn die Assays von Roche nicht für Saliva oder Sputum zugelassen sind, konnte bei explorativer Analyse von drei Sputum-Proben zweifach Geimpfter eine Reaktivität im niedrigen Messbereich des S-Assays nachgewiesen werden. Da die Proben im N-Assay nicht reaktiv waren, ist dies ein Hinweis auf einen Impfstoff-vermittelten mukosalen Immunschutz – jedoch ohne Spezifizierung der detektierten Antikörperklasse.

Eine wesentliche Schutzfunktion vor Infektion oder Reinfektion wird neutralisierenden Antikörpern zugesprochen. Diese wurden in der vorgestellten Arbeit nicht direkt ermittelt, jedoch beschreibt Roche für beide Assays eine Korrelation mit Neutralisationstests²¹⁵. Ferner weisen hohe Titer RBD-spezifischer Antikörper, die das Zielantigen des S-Assays sind, auf eine Präsenz neutralisierender Antikörper hin^{216,304}. Tang et al. konnten bei Untersuchung des N-Assays nur eine schwache Korrelation zu Neutralisationstests feststellen²¹⁶. Wie Iankov et al. berichten, ist die Verwendung von DBS auch für Neutralisationstests möglich³⁰⁵, könnte also in Folgestudien evaluiert werden.

Da der S-Assay in einem sehr niedrigen Bereich kalibriert wurde, wiesen zahlreiche Plasma- und Serumproben sowie einige DBS-Proben Werte oberhalb des Messbereichs auf. Bei Verdünnung zeigte sich, dass die beobachteten Messwerte unabhängig vom Verdünnungsmedium mehr als 30 Prozent unter den erwarteten Werten lagen. Je höher verdünnt wurde, desto größer war die Abweichung vom Verdünnungsfaktor. Higgins et al. beschreiben in ihrer Evaluierung des S-Assays ein lineares Verdün-

nungsverhalten, betonen jedoch, dass dieses unterhalb von 20 U/mL nicht mehr gegeben war²⁹¹. Auch Roche weist darauf hin, dass beim Verdünnen eine Konzentration von 20 U/mL nicht unterschritten werden darf, da die Heterogenität von Anti-SARS-CoV-2-Antikörpern bei einzelnen Proben zu nicht-linearem Verdünnungsverhalten führen kann²³². Angesichts dieser von Roche vorgenommenen Einschränkung ist positiv zu bewerten, dass zwischen DBS- und Plasmawerte eine derart robuste lineare Korrelation nachgewiesen werden konnte, da die aus DBS extrahierten Proben im Laufe der Extraktion zwangsläufig verdünnt wurden und meist Werte im niedrigen Messbereich aufwiesen.

Auf der anderen Seite erlaubte die Kalibrierung im niedrigen Bereich die Bestimmung von DBS-Werten geringer Konzentration wie beispielsweise im frühen Stadium nach Impfung. Nichtsdestotrotz war eine weitere Herabsetzung der Nachweisgrenze notwendig. Vorherige Studien haben gezeigt, dass eine Schwellenwert-Anpassung des N-Assays auf 0,165 die Sensitivität erhöht, ohne die Spezifität zu beeinträchtigen³⁰⁶. Mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgenommenen konservativen Anpassung konnten alle Fälle mit in der Vergangenheit positivem PCR-Test und weiterhin reaktiver Plasmaprobe mittels DBS und Messung im N-Assay identifiziert werden. Alle als uneindeutig eingestuft Proben zeigten sich bei wiederholter Messung oder Messung einer Plasmaprobe reaktiv. Eine weitere Herabsetzung des COI könnte die Sensitivität erhöhen, sollte jedoch mit einem größeren Probenvolumen evaluiert werden, da falsch positive Ergebnisse aufgrund der nachteiligen Auswirkungen eines falschen Sicherheitsgefühls zu vermeiden sind. Bei geimpften Probanden wurden bis zu fünf Wochen nach Erstimpfung reaktive Plasmaproben gemessen, deren korrespondierende DBS-Proben Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze aufwiesen. Zur Vermeidung einer Fehlklassifizierung sollten DBS-Werte in diesem Zeitraum zurückhaltend interpretiert werden.

Fraglich ist, welchen Einfluss zirkulierende Virusvarianten und neu auftretende SARS-CoV-2-Stämme auf die Sensitivität der Assays haben und haben werden. Ein Sensitivitätsverlust ist denkbar und könnte Anpassungen der Tests erfordern. Testergebnisse sollten daher immer in Kombination mit der individuellen Krankengeschichte interpretiert, strittige Proben im Zweifelsfall mit Hilfe eines alternativen serologischen Assays mit abweichendem Zielantigen überprüft werden.

Da für die Analyse mittels ECLIA nur ein kleines Volumen notwendig ist und DBS über einen langen Zeitraum gelagert werden können, sind Wiederholungsmessungen oder Mehrfachanalysen mit verschiedenen Assays gut durchführbar. Die Systeme von Roche sind weltweit in vielen Laboren verfügbar, sodass Analysen auch in Regionen mit niedrigem und mittlerem Einkommen möglich sein sollten. Ebenfalls vorteilhaft ist, dass für die Analyse getrockneter Blutstropfen keine Anpassung der Geräteparameter oder Reagenzien erforderlich ist²⁹⁶

5.2 Überwachung der Antikörperantwort nach Impfung mittels DBS

Neben nicht-pharmakologischen Interventionen stellen Impfstoffe derzeit das wichtigste Element in der Pandemiebekämpfung dar. Einige Vakzine wurden in beispielloser Geschwindigkeit und unter

erstmaliger Anwendung der mRNA-Technologie entwickelt und zugelassen, zahlreiche weitere befinden sich in der Entwicklung³⁰⁷. Langzeitdaten über Schutzwirkung und unerwünschte Effekte stehen aus und werden parallel zur Anwendung generiert. Da Antikörpern eine wesentliche Rolle in der Schutzfunktion zugeschrieben wird, wird ihre Überwachung auch in Zukunft von hohem Interesse sein. Die Entwicklung von Hilfsmitteln zu ihrer erleichterten Durchführung wird dementsprechend an Bedeutung gewinnen. Zur Überprüfung der Antikörperantwort wurden zahlreiche Assays entwickelt und teilweise für die Analyse getrockneter Blutstropfen untersucht^{22-25,230}. Nach unserem Kenntnisstand stellt die vorliegende Arbeit die erste quantitative Antikörper-Untersuchung geimpfter Probanden mittels DBS dar.

Die longitudinale Überwachung mittels selbständiger DBS-Entnahme zeigte sich praktikabel. Vereinzelt kam es zu Abweichungen vom vorgegebenen Protokoll, sodass die Probenentnahme nicht immer am vorgesehenen Tag stattfand. Bei einer Probandin kam es zum Verlust von drei auf dem Postweg verschickter Proben. Dieser Nachteil von DBS muss insbesondere beim Versand über größere Distanzen berücksichtigt werden.

5.2.1. Verlauf der quantitativen Antikörperantwort in DBS und Zulassungsstudien

Unabhängig von Impfstoff, Impfstoffkombination, Impfintervall und Proband wurde die wesentliche Zunahme der Antikörperkonzentration nach Erhalt der zweiten Impfdosis beobachtet. Da ausschließlich Probanden ohne vorherige SARS-CoV-2-Infektion eingeschlossen wurden, deckt sich dies mit den Beobachtungen der Zulassungsstudien^{160,162,164}. Auch wenn alle Probanden eine Antikörperreaktion zeigten, gab es interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der erreichten Konzentration. Wie die Autorinnen und Autoren verschiedener Impfstoffstudien betonen, lagen die Antikörperkonzentrationen Geimpfter in der Regel über denjenigen Rekonvaleszenten^{161,179}. Dieses Phänomen konnte auch im DBS-Eluat beobachtet werden, wobei die Gruppe der Rekonvaleszenten lediglich 27 Probanden umfasste. Auch wenn die Anzahl eingeschlossener Rekonvaleszenten in den Zulassungsstudien nur unwesentlich größer war^{161,162}, wäre eine quantitative Analyse von Rekonvaleszenten-DBS unter Anwendung des beschriebenen Protokolls und Assays mit einer größeren Probenanzahl sinnvoll.

Während lediglich zwei Probanden nach Erstimpfung mit BNT162b2 im DBS-Eluat Antikörperkonzentrationen im sehr niedrigen Messbereich des S-Assays zeigten, konnten bei allen Probanden mit mRNA-1273- und ChAdOx1 nCoV-19-Erstimpfung Antikörperkonzentrationen im niedrigen Messbereich nachgewiesen werden. Bei mRNA-1273 war dies in der Regel zwei Wochen nach Erstimpfung der Fall, bei ChAdOx1 nCoV-19 drei bis vier Wochen nach Erstimpfung. Da bei allen Probanden spätestens nach der Zweitimpfung Reaktivität nachgewiesen werden konnte, ist eine nicht detektierbare Antikörperreaktion nach Erstimpfung nicht als ausbleibende Immunantwort zu interpretieren. Tatsächlich betonen Earle et al., dass Studien der drei in dieser Arbeit zur Anwendung kommenden Impfstoffe

bereits nach Applikation der ersten Dosis eine hohe Wirksamkeit zeigten, obwohl die Titer neutralisierender Antikörper gering oder gar nicht nachweisbar waren³⁰⁸.

Da ein Vergleich der quantitativen Ergebnisse mit den Zulassungsstudien aufgrund einer fehlenden Kalibrierung der serologischen Assays auf einen gemeinsamen Standard nicht möglich ist³⁰⁸, soll im Folgenden ein Fokus auf die Entwicklung der Antikörperkonzentration im Zeitverlauf gelegt werden. Nach Impfung mit BNT162b2 stimmte der im DBS-Eluat beobachtete Antikörperverlauf mit den Beobachtungen von Sahin et al. und Walsh et al. überein^{160,161}. Auch dort lagen die Messwerte vor Zweitimpfung in der Regel unterhalb der Nachweisgrenze, wurde die maximale Konzentration von gegen die RBD gerichteten IgG-Antikörpern eine Woche nach Zweitimpfung registriert, kam es anschließend zu einem kontinuierlichen Rückgang der Antikörper und betrug die Antikörperkonzentration neun Wochen nach Zweitimpfung etwa ein Drittel der Maximalkonzentration. Während im DBS-Eluat meist erst nach Erhalt der zweiten Impfdosis Reaktivität nachgewiesen werden konnte, lag diese in den Zulassungsstudien bei gleichem Impfabstand bereits am Tag der Zweitimpfung vor. Bei mRNA-1273 beobachteten Jackson et al. 15 Tage nach Erstimpfung eine Serokonversion¹⁶². Im DBS-Eluat war dies bis auf eine Ausnahme nach 17 Tagen ebenso der Fall. Die Detektion mittels der hier vorgestellten Methode kann dementsprechend als ähnlich sensitiv bewertet werden. Ab dem Zeitpunkt der Serokonversion wurde sowohl in der Zulassungsstudie als auch in der DBS-Überwachung eine Zunahme der Antikörperwerte beobachtet. Im Verlauf von sechs Monaten beobachteten Doria-Rose et al. einen Rückgang der Antikörper bei weiterhin erhöhten Konzentrationen¹⁶³. Eine derart lange Verfolgung wurde an dieser Stelle nicht erbracht, stellt aber eine potentielle Anwendungsmöglichkeit von DBS dar. Bei ChAdOx1 nCoV-19 beobachteten Folegatti et al. zwei Wochen nach Erstimpfung eine erste Antikörperantwort, welche durch eine zweite Impfdosis deutlich gesteigert werden konnte¹⁶⁴. In der DBS-Überwachung war die erstmalige Detektion von Antikörpern in der Regel erst nach zwei bis vier Wochen möglich. Die starke Antikörperzunahme nach Zweitimpfung wurde ebenfalls beobachtet. Da es nach Impfung mit ChAdOx1 nCoV-19 zu einem vermehrten Auftreten von Sinusvenenthrombosen und Thrombopenien bei jüngeren Menschen kam, wurde – zunächst für Menschen unter 60 Jahren, im Verlauf altersunabhängig – die Empfehlung ausgesprochen, eine mit ChAdOx1 nCoV-19 begonnene Impfserie mit einem mRNA-Impfstoff zu vervollständigen^{192,194}. Die in dieser Arbeit eingeschlossenen Probanden mit homologer ChAdOx1 nCoV-19-Impfung waren dementsprechend meist älter als die Teilnehmenden der restlichen Gruppen (60 bis 65 Jahre). Da mit zunehmendem Alter eine Abnahme der Immunogenität beschrieben wird¹⁶⁰, kann dies einen Einfluss auf die Antikörperentwicklung gehabt haben. Gleichzeitig beobachteten Ramasamy et al. bei Applikation lediglich einer ChAdOx1 nCoV-19-Dosis zwar eine geringere Antikörperkonzentration älterer Probanden, bei Zweifachimpfung jedoch keinen Einfluss des Alters auf die erreichte Antikörperkonzentration³⁰⁹. Bei den drei ebenfalls älteren Probanden (59 bis 69 Jahre), die nach Erstimpfung mit ChAdOx1 nCoV-19 den Impfstoff mRNA-1273 erhielten, war eine starke Zunahme der Antikörperkonzentration nach Zweitimpfung zu beobachten. Im Vergleich von homologem und heterologem Impfschema zeigten alle Pro-

banden mit einer Kombination von Vektor- und mRNA-Impfstoff in der DBS-Überwachung eine deutlich stärkere und schnellere Antikörperzunahme nach Zweitimpfung. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Schmidt et al. überein³¹⁰. Die Autorinnen und Autoren beschreiben die Reaktion nach heterologer Applikation darüber hinaus als ähnlich im Vergleich zur homologen mRNA-Impfung. Da die entsprechenden Messwerte in der vorliegenden Studie oberhalb der Messbereichsgrenze lagen, lässt sich für die DBS-Messungen keine vergleichbare Aussage treffen, könnte jedoch in Folgestudien mittels Verdünnung evaluiert werden.

Allgemein wird an dieser Stelle Zurückhaltung hinsichtlich der Vergleichbarkeit der DBS-Werte geübt. Da die volumetrischen DBS-Entnahmen selbständig von den Probanden durchgeführt wurden, kann die ungleiche Alters-, Geschlechts- oder Berufsverteilung zu einer ungleichen Probenqualität beigetragen haben. Da die Teilnehmenden meist weiblich und jung waren, einen ähnlichen ethnischen Hintergrund und keine bekannten Vorerkrankungen aufwiesen, stellen sie keine repräsentativen Kohorten dar. Zudem sind diese mit in der Regel sechs Teilnehmern klein, dienen jedoch als *proof of concept*. Die Variabilität individueller Antikörperverläufe unterstreicht den Mehrwert von Mehrfachmessungen im Zeitverlauf zur Einschätzung der Immunantwort.

5.2.2. Anwendungsmöglichkeiten von DBS im Impfkontext

Bereits während der Durchführung dieser Arbeit zeigte sich, dass Impfstrategien und –schemata für SARS-CoV-2 aufgrund ihrer Neuartigkeit aufmerksam überwacht und im Zweifelsfall angepasst werden müssen¹⁹²⁻¹⁹⁴. Aufgrund der einfachen Handhabbarkeit, Einschlussmöglichkeit zahlreicher, diverser und unter normalen Umständen nicht berücksichtigter Personen sowie eines großen Probendurchsatzes können DBS die Antikörperüberwachung im Impfkontext in zahlreichen Anwendungen erleichtern, verbessern oder überhaupt erst ermöglichen. Wie in dieser Arbeit exemplarisch an einer kleinen Stichprobe gezeigt, können DBS eingesetzt werden, um die Antikörperkonzentration nach Impfung longitudinal zu überwachen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass auch bei Abnahme der Antikörperkonzentration die SARS-CoV-2-spezifische zelluläre Immunität bestehen bleibt^{70,129}, eine alleinige Antikörperüberwachung also möglicherweise keine fundierte Aussage über den Immunschutz zulässt. Unter Einsatz von DBS und Analyse von Anti-Spike- (Impfung) und Anti-Nukleokapsid-Antikörpern (Infektion) könnte eine longitudinale Reinfektionsstudie Geimpfter durchgeführt und so die effektive Schutzwirkung verschiedener Impfstoffe überprüft werden. Bei infizierten Personen wurde beobachtet, dass die Sterblichkeit nicht mit dem Antikörperspiegel, sondern einer langsameren Serokonversion korreliert ist⁸⁰. Ob die Antikörperkinetik auch nach Impfung einen Einfluss auf die Schutzwirkung hat, ließe sich mit der hier vorgestellten Methode testen. DBS könnten außerdem eingesetzt werden, um die durch verschiedene Impfstoffe induzierte Antikörperreaktion zu analysieren. Dabei könnte, sofern zwei Impfdosen eingesetzt wurden, die homologe mit der heterologen Applikation verglichen, verschiedene Impfstoffkombinationen und Impfabstände berücksichtigt werden. Angesichts möglicherweise notwendiger Booster-Impfungen könnte untersucht werden, welche Kombination bei dritter

(vierter, fünfter, ...) Applikation den günstigsten Effekt erzielt. Auch könnten beeinflussende Faktoren wie Alter, Ethnizität oder Lebensstil näher beleuchtet und die Anwendung verschiedener Medikamente parallel zur Impfung untersucht werden. Menschen mit besonders effektiver Antikörperbildung könnten mittels DBS als Plasmaspender identifiziert werden.

Collier et al. konnten bei Menschen über 80 Jahren eine reduzierte Bildung neutralisierender Antikörper nachweisen¹⁷⁸. Bei Influenza wurde beobachtet, dass ältere Menschen höhere Konzentrationen neutralisierender Antikörper benötigen als jüngere, um vor einer Infektion geschützt zu sein³¹¹. Yang et al. beobachteten, dass Patienten zwischen 19 und 30 Jahren nach Infektion mit SARS-CoV-2 niedrigere IgG-Werte aufwiesen als jüngere oder ältere Menschen³¹². Mit Hilfe quantitativer DBS-Messungen könnte die altersstratifizierte Antikörperkonzentration nach Impfung und das entsprechende Auftreten von Infektionen mit einem großen Probenvolumen untersucht werden, um serologische Messwerte entsprechend interpretieren zu können.

Größere Populationen oder spezifische Gruppen wie beispielsweise in Gesundheitsberufen exponierte Menschen könnten durch ein DBS-Scanning nach Impfung auf erfolgreiche Antikörperbildung untersucht werden. In Impfstoffmangelsituationen könnte auf Grundlage des Antikörpertiters entschieden werden, welche Personen präferiert ihre zweite Impfdosis erhalten sollen, sofern Antikörper als Schutzkorrelat ausreichend etabliert sind. Dieses Vorgehen müsste natürlich ethisch diskutiert werden, auch wenn im Rahmen der Vivaldi-Studie gezeigt werden konnte, dass bereits eine Einmalimpfung älterer Menschen mit den Impfstoffen BNT162b2 und ChAdOx1 nCoV-19 substantiellen Schutz vor einer Infektion liefert³¹³. Im Sinne einer ressourcenschonenden Verteilung und Reduktion von Impfenbenwirkungen könnte vor Durchführung einer Impfung überprüft werden, ob in der Vergangenheit bereits eine SARS-CoV-2-Infektion vorlag, die weiterhin den Nachweis von Antikörpern erlaubt³¹⁴. Bei zuvor Infizierten könnte die Antikörperbildung in Abhängigkeit vom vor der Impfung vorliegenden Titer untersucht werden. Dies wäre auch nach bereits erfolgter Impfung durch Analyse von Antinukleokapsid-Antikörpern möglich, da diese ausschließlich durch Infektion induziert werden. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass Antikörper gegen das Nukleokapsid-Protein eine andere Kinetik aufweisen als Antikörper gegen das Spike-Protein^{77,78,130,223}.

5.2.3. Antikörper als Schutzkorrelat

Die Anwendung von Antikörpern als Entscheidungsgrundlage steht unter einem großen Vorbehalt: Noch immer ist unklar, welche Schutzwirkung sie gegenüber einer zukünftigen Infektion vermitteln, eine protektive Schwelle konnte nicht etabliert werden. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Antikörperkonzentrationen können zum jetzigen Zeitpunkt also lediglich beschrieben werden, eine Aussage über den Immunschutz erlauben sie nicht. Die US-Arzneimittelbehörde FDA ruft hinsichtlich der Durchführung serologischer Tests nach Impfung zu Zurückhaltung auf: Bei falscher Interpretation bestehe das Risiko, dass Menschen sich unvorsichtiger verhalten und eine Infektion oder Weitergabe

von SARS-CoV-2 riskieren³¹⁵. Die schnelle Entwicklung diverser serologischer Tests bei fehlendem internationalen Standard erschwert zudem die Vergleichbarkeit von Messergebnissen³¹⁶.

Gleichzeitig besteht ein hohes Interesse an einem Biomarker und seiner Messbarkeit^{171,308,317}. Für andere virale Entitäten konnte ein solcher in der Vergangenheit etabliert werden²¹². Bei der Entwicklung neuer Impfstoffe wird es angesichts bereits zugelassener wirksamer Vakzine ethisch nicht vertretbar sein, eine ungeimpfte Kontrollgruppe einzuschließen³¹⁸. Vor dem Hintergrund sinkender Fallzahlen riskieren klinische Phase 3 Studien dringend benötigter Impfstoffe, an praktischen Gesichtspunkten zu scheitern³¹⁷. Um Menschen beispielsweise die Rückkehr an den Arbeitsplatz zu ermöglichen, wurde die Idee eines Immunitätsausweises diskutiert^{212,319}.

Der Nachweis von Antikörpern ist prinzipiell vielversprechend, um den Immunschutz einzuschätzen: Schon für SARS-CoV konnte gezeigt werden, dass Quantität und Qualität der Antikörper das funktionelle Resultat bestimmen³²⁰. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass auch bei SARS-CoV-2 das Vorliegen von Antikörpern nach Infektion mit einem Schutz vor Reinfektion korreliert ist und bei passivem Transfer die Viruslast verringert^{104,109,113–115}. In einer Expositionsstudie an nicht-menschlichen Primaten schien schon eine geringe, durch adoptiven Transfer erreichte Antikörperkonzentration eine gewisse Schutzwirkung vermitteln¹⁰¹. Impfstoffstudien zeigen, dass Präsenz und Höhe neutralisierender Antikörper einen hohen Vorhersagewert für die Schutzwirkung haben^{13,150,160,308,321,322}. Darüber hinaus wurde eine Korrelation zwischen neutralisierenden Antikörpern und der Eindämmung der Virusausscheidung beobachtet, was hinsichtlich einer möglicherweise sterilisierenden Immunität von Relevanz ist¹⁰⁷. Der als Goldstandard geltende Nachweis neutralisierender Antikörper ist jedoch aufwändig und außerhalb des Forschungskontexts kaum durchführbar. Kommerzielle Tests können ihn meist nicht leisten¹¹⁰. Antikörper gegen die Rezeptorbindungsdomäne, welche mit Hilfe des Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S Assays von Roche detektiert werden, weisen jedoch auf die Präsenz neutralisierender Antikörper hin^{216,304}. Roche beschreibt außerdem eine hohe Korrelation mit einem Surrogatneutralisationstest²¹⁵. Für den N-Assay wurde eine geringe Übereinstimmung mit der Neutralisationskapazität beobachtet^{110,216}.

Earle et al. konnten beim Vergleich verschiedener Impfstoffstudien (darunter alle in dieser Arbeit untersuchten) nachweisen, dass die Impfstoff-vermittelte Schutzwirkung nicht nur für neutralisierende, sondern auch für bindende Antikörper gilt³⁰⁸. Diese docken an das Virus an, ohne seinen Zelleintritt zu verhindern. Durch Kalibrierung auf die in der jeweiligen Studie berichteten Titer menschlicher Rekonvaleszenzseren konnten die Autorinnen und Autoren zeigen, dass dies unabhängig von geographischen Faktoren (und möglicherweise dort zirkulierenden Virusvarianten), Assays oder Herstellungsplattformen gilt³⁰⁸. Sie schlussfolgern, dass Antikörpertiter nach Impfung eine valide Grundlage für ein Schutzkorrelat von COVID-19-Impfstoffen darstellen. Großflächige Screenings, wie in dieser Arbeit vorgeschlagen, könnten helfen, die Persistenz von Antikörpern im Zeitverlauf und den Einfluss ihrer Abnahme auf die Schutzwirkung zu überwachen.

Nichtsdestotrotz bestehen Zweifel an der Eignung von Antikörpern als Schutzkorrelat⁷⁰. Ebenso entscheidend – oder gar wichtiger – könnte die zelluläre Immunität sein³²³, zumal die T-Zell-Antwort mit einem milderem Krankheitsverlauf korreliert ist und die Antikörperbildung von ihr abhängt^{111,112}. Im Rahmen der Zulassungsstudien von BNT162b2 und mRNA-1273 wurde bereits nach der ersten Impfdosis eine substantielle Schutzwirkung beobachtet, obwohl neutralisierende Antikörper zu diesem Zeitpunkt kaum nachweisbar waren³¹⁸. Während Antikörper im Zeitverlauf abnehmen, scheinen zelluläre Gedächtniszellen zu persistieren³²⁴. Dies stellt die Aussagekraft der ermittelten Antikörperkonzentrationen in Frage. Da zahlreiche Studien vom Ausbleiben einer Serokonversion nach Infektion berichten^{73,75,76,89,90}, muss überlegt werden, ob die Überprüfung von Antikörpern überhaupt sinnvoll ist und nicht vielmehr oder zumindest ergänzend die zelluläre Immunität getestet werden sollte¹⁹. Außerdem ist fraglich, ob die fortgesetzte Evolution der Antikörper, wie von Gaebler et al. beschrieben, mit Hilfe kommerzieller Assays erfasst werden kann¹²⁸. Auch scheint die Art der Antikörper-Induktion (Infektion oder Impfung) einen qualitativen Unterschied zu machen, wie Greaney et al. berichten³⁰³. So zielen durch Impfung mit mRNA-1273 induzierte Antikörper im Vergleich zu durch Infektion induzierten Antikörpern primär auf eine Region, nämlich die RBD, fokussieren sich dabei aber auf eine größere Anzahl an Epitopen. Die Autorinnen und Autoren bewerteten dies als vorteilhaft. Es ist fraglich, ob diese Beobachtung einerseits mit einer klinischen Konsequenz verbunden ist und Impfstoff-induzierte Antikörper beispielsweise robuster gegenüber Mutationen in der RBD sind, andererseits von kommerziellen Assays wie denjenigen von Roche differenziert werden kann. Krammer et al. hingegen beobachten einen möglicherweise effektiveren Immunschutz nach Infektion, auch wenn, wie die Autorinnen und Autoren beschreiben, dieser Zustand mit einer größeren Variabilität und geringerem Level von Antikörperkonzentrationen einhergeht als der Zustand nach Impfung¹⁷¹. Lucas et al. konnten bei Geimpften eine höhere Neutralisationskapazität gegenüber Virusvarianten beobachten, wenn diese zuvor eine SARS-CoV-2-Infektion durchlebt hatten³²⁵. Der Schlüssel könnte in der Induktion einer mukosalen Immunität sowie Immunantwort gegen andere Strukturen des Virus liegen, die durch Impfung nicht erreicht werden¹⁷¹ – und durch die in dieser Arbeit verwendeten Assays nicht differenziert werden können. Erneut wäre eine alleinige Interpretation der Antikörperkonzentration unzureichend, um eine Aussage über den Immunschutz zu treffen.

Auch die Differenzierung zwischen verschiedenen Antikörperklassen könnte relevant sein: So zeigten Menschen mit überstandener SARS-CoV-2-Infektion überwiegend Antikörper gegen das Spike-Protein, während bei schwer Erkrankten oder Verstorbenen häufiger Antikörper gegen die Nukleokapsid-Struktur nachweisbar waren^{79,98}. Antikörper gegen die RBD werden als zehn- bis 100-fach potenter beschrieben als Antikörper gegen die N-terminale Domäne⁹⁶.

Zusammenfassend lässt sich derzeit sagen: Auch wenn Antikörper nicht das einzige Schutzkorrelat gegenüber einer (Re-)Infektion mit SARS-CoV-2 darstellen, sind sie deutlich einfacher zu messen als eine zelluläre Reaktion und daher in der klinischen Anwendung praktikabler³¹⁷. Da IgG-

Konzentrationen mit SARS-CoV-2 spezifischen T-Zellen korrelieren⁷², liefern Antikörper zudem einen Hinweis auf die zelluläre Immunantwort.

5.3 Seroprävalenzstudien mittels DBS

5.3.1. Das Potential seroepidemiologischer Daten angesichts statistischer Unsicherheit

Das wahre Ausmaß der Pandemie ist unbekannt und wird sich womöglich erst in der Rückschau offenbaren. Naturgemäß werden in den Fallzahlen nur diejenigen Menschen abgebildet, die sich einer Testung unterzogen haben – diese jedoch sind oft limitiert, verzögert implementiert, unzureichend koordiniert, zugunsten symptomatischer und schwer verlaufender Fälle verzerrt oder werden unvollständig berichtet. Bewegungseinschränkungen zur Eindämmung der Virusausbreitung erschweren zudem die Durchführung von Feldstudien³²⁶. Schätzungen der Dunkelziffer in unterschiedlichen Regionen oder Populationen weisen eine hohe Streuung auf²³⁵. Unstrittig ist, dass die dokumentierten Infektionszahlen das Ausmaß der Verbreitung von SARS-CoV-2 stark unterrepräsentieren – und damit epidemiologische Größen wie die Infektions-Sterbe-Rate überschätzen^{218,235,327}. Gleichsam ist anzumerken, dass Verzerrungen der eingeschlossenen Personen die ermittelte Seroprävalenz stark beeinflussen und Studien mit einem geringeren Verzerrungsrisiko eine höhere Infektions-Sterbe-Rate zu zeigen scheinen als solche mit einem höheren Verzerrungsrisiko³²⁸.

Darüber hinaus fehlen detaillierte Daten über geographische, sozioökonomische und demographische Aspekte des Infektionsgeschehens¹²: Welche Berufsgruppen sind besonders häufig infiziert? In welchem Maß trägt der universitäre oder Schulbetrieb zum Infektionsgeschehen bei? Wie groß ist der Einfluss der Wohnsituation? Welchen Effekt haben Lockdown, Telearbeit oder Ausgangsbeschränkungen? Da nicht-pharmakologische Interventionen mit einer hohen Belastung für die physische und psychische Gesundheit, Wirtschaft und das öffentliche Leben einhergehen, können sie nur als temporäre Lösung dienen und bedürfen einer empirischen Legitimation³²⁹. Sie benötigen Daten. Erst damit lassen sich Gegenmaßnahmen zielgerichtet einleiten und beurteilen¹².

Serologische Assays können eine frühere Infektion mit SARS-CoV-2 anzeigen und haben aufgrund ihrer geringen Kosten das Potential einer großvolumigen Anwendung³³⁰. Daher wurden sie in zahlreichen Studien eingesetzt, um die Verbreitung von SARS-CoV-2 und die durch das Virus ausgelöste Immunreaktion zu untersuchen^{78,235,326,331}. Auf Populationsebene konnten Gudbjartsson et al. durch Testung von über 30.000 Teilnehmenden in Island eine Prävalenz von 0,9 Prozent während der ersten Pandemiewelle ermitteln. Nur die Hälfte der Infektionen war vorab durch PCR-Testungen bekannt⁷⁸. Pollán et al. fanden nach der ersten Pandemiewelle in Spanien bei Untersuchung von über 60.000 Menschen eine Prävalenz von annähernd fünf Prozent. Ein Drittel der Seropositiven hatte zuvor keine Symptome gezeigt³³¹. Ward et al. konnten in Großbritannien durch wiederholte Testungen repräsentativer Populationen (insgesamt 100.000 Menschen) eine Seroprävalenz von sechs Prozent während der ersten Pandemiewelle beobachten³³², die nach drei Monaten auf 4,5 Prozent abfiel und im Rahmen der

Impfkampagne im Mai 2021 auf über 60 Prozent anstieg^{333,334}. Eine deutlich höhere Seroprävalenz ließ sich unter Menschen schwarzer und asiatischer Ethnizität nachweisen³³⁵. Die im Kontext der britischen Studie erhobenen Daten stellten die Entscheidungsgrundlage für die Einführung regionaler Lockdowns dar³³⁰. Auch in Deutschland wurden und werden Seroprävalenzstudien durchgeführt³³⁶. Häufig beziehen sich diese auf ausgewählte Bevölkerungs- oder Berufsgruppen. Populationsbasierte Studien wurden beispielsweise von der Universität Mainz mit 10.000 Teilnehmenden oder multilokal vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung mit fast 20.000 Teilnehmenden durchgeführt^{337,338}. Neben der Untererfassung unterstreichen die Studienergebnisse, dass ein zeitnaher flächendeckender Immunschutz durch alleinige Durchseuchung kaum erreicht werden kann. Hierfür sind Impfungen unabdingbar.

Vereinzelte Initiativen, beispielsweise in Schweden²⁶⁷, Luxemburg³³⁹, den USA²⁶⁶ oder Kanada³⁴⁰, haben zur Untersuchung der Seroprävalenz getrocknete Blutstropfen eingesetzt. In Kanada konnte unter Einschluss von mehr als 10.000 Probanden festgestellt werden, dass insbesondere Kinder und Jugendliche sowie Einwohner, die „zu visuellen Minderheiten zählten“, höhere Seroprävalenzraten aufwiesen³⁴⁰. Ein Drittel aller Seropositiven hatte – meist aus Mangel an Symptomen – zuvor keinen PCR-Test durchgeführt. Der Einsatz getrockneter Blutstropfen erwies sich als extrem hilfreich, große Distanzen zu überwinden und in Regionen mit eingeschränkten diagnostischen Kapazitäten Testungen durchzuführen.

Prinzipiell können gut konzipierte seroepidemiologische Studien als Pars pro toto der Allgemeinbevölkerung verstanden oder zur Untersuchung einer spezifischen Kohorte oder Fragestellung eingesetzt werden. Auch wenn von der WHO ein Protokoll zur Durchführung populationsbasierter, altersgeschichteter seroepidemiologischer Studien vorgelegt wurde³²⁷, sind die bislang durchgeführten seroepidemiologischen Studien häufig nicht repräsentativ für ihre Zielpopulation^{235,338}. Unter Einsatz von DBS wäre es denkbar, eine repräsentative Kohorte von beispielsweise 30.000 Menschen ein Jahr lang zu verfolgen und alle zwei Wochen mittels Selbstentnahme auf Vorliegen von Antikörpern zu testen. So könnten wichtige Informationen über Untererfassung, Impffortschritt, soziodemografische Aspekte, Auswirkungen implementierter Maßnahmen oder Infektionsketten gesammelt werden. Eine regelmäßige Testung in kurzen Intervallen würde der Antikörperabnahme im Zeitverlauf zuvorkommen. Bei geringerer Entnahmefrequenz ließe sich die Abnahme möglicherweise mittels mathematischer Modelle korrigieren, wie beispielsweise von Kayoko et al. vorgeschlagen³⁴¹. Alternativ könnten DBS eingesetzt werden, um eine eng umschriebene Kohorte, beispielsweise Angehörige einer bestimmten Berufsgruppe, zu untersuchen. So ermittelten McDade et al. die Seroprävalenz unter Haushaltsangehörigen essentieller Berufsgruppen mittels DBS²⁵. Durch Auswahl eines definierten Clusters ließe sich die Auswirkung einer für eine spezifische Gruppe getroffenen Maßnahme, beispielsweise die Einführung des Wechselunterrichts in Schulen, beurteilen – und im Zweifelsfall wieder verwerfen.

5.3.2. Untersuchung des Infektionsgeschehens an der DSHS

Um das Infektionsgeschehen unter den DSHS-Beschäftigten mit dem in der Stadt Köln zu vergleichen und damit den potentiellen Einfluss des Semesters zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Zahlen erhoben: Am 03.11.20 beziehungsweise 06.04.21 waren jeweils 90 Prozent der Proben von DSHS I beziehungsweise II eingegangen und wurden als Referenztage für den Vergleich mit dem Infektionsgeschehen im Kölner Stadtgebiet festgesetzt. Diese Maßnahme war notwendig, da die restlichen Proben mit teilweise deutlichem zeitlichen Verzug eingingen. Bis zum ersten Stichtag gab es in Köln 11.647 laborbestätigte Corona-Fälle, bis zum zweiten 40.232³⁴². Wie das Amt für Stadtentwicklung und Statistik der Stadt Köln auf Anfrage am 5. Mai 2021 mitteilte, lag die Bevölkerungszahl zu den jeweiligen Terminen bei 1.087.867 beziehungsweise 1.085.365. Der Anteil bestätigter Fälle an der Gesamtbevölkerung der Stadt Köln betrug vor dem Wintersemester somit 1,08 Prozent, nach dem Wintersemester 3,71 Prozent. Die Seroprävalenz in den DSHS-Kohorten betrug zu den zwei Zeitpunkten 1,53 beziehungsweise 2,61 Prozent. Während die kumulative Inzidenz in der Stadt Köln um den Faktor 3,4 zunahm, stieg die Seroprävalenz an der DSHS um den Faktor 1,7. Aufgrund der unterschiedlichen Erfassungsmodalitäten und Nachweisverfahren, Vorselektion der Teilnehmenden der DSHS-Studie, geringen Zahl detektierter Infektionen unter den DSHS-Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie unabhängigen Stichproben sind die Zahlen nur eingeschränkt miteinander vergleichbar. Jedoch kann in Bezug auf das Infektionsgeschehen der Stadt Köln davon ausgegangen werden, dass eine höhere kumulative Inzidenz gemeldeter Fälle auch mit einer höheren Seroprävalenz verbunden ist²³⁵. Unter der Voraussetzung, dass die DSHS-Kohorten repräsentativ für die Gesamtheit der Mitarbeiterschaft sind, hat die Aufrechterhaltung des Semesterbetriebs mit reduziertem Studierendenkontakt nicht zu einer unverhältnismäßigen Zunahme der Infektionen an der DSHS geführt. Dies korrespondiert mit den Beobachtungen von Chen et al., die in Großbritannien anhand genomischer Daten die Ansteckungswahrscheinlichkeit in spezifischen Umgebungen untersucht haben. Der universitäre Betrieb war dabei mit einer unterdurchschnittlichen Ansteckungswahrscheinlichkeit assoziiert. Das höchste Ansteckungsrisiko zeigte sich im Kontext persönlicher Kontakte, Freundes- oder Verwandtenbesuche, KITAS und Schulen³²⁹.

In DSHS I konnte bei der einzigen Probandin mit zuvor positivem PCR-Test mittels Messung von DBS und Überprüfung im Plasma keine Seropositivität nachgewiesen werden. Angesichts ihrer negativen Krankheitsanamnese ist dies ein Hinweis darauf, dass eine subklinische Infektion entweder zu einer geringen Antikörperantwort oder -persistenz führt oder PCR-Ergebnisse mit Hilfe serologischer Tests überprüft werden können. Gleichsam könnte die frustrane Nachweisbarkeit von Antikörpern mit einer variablen Antikörperproduktion oder -affinität gegen verschiedene virale Antigene zusammenhängen oder durch Testeigenschaften wie das verwendete Antigen oder die Inkubationsdauer beeinflusst worden sein²²⁶. Die „Bestätigung“ nicht-reaktiver Proben unter Verwendung des gleichen Assays ist dementsprechend problematisch: Was bereits einmal nicht detektiert wurde, wird ohne Veränderung des Testverfahrens schlichtweg erneut nicht detektiert. Bei Vorliegen klinischer Merkmale

oder einer suggestiven Anamnese sollte ein negatives Antikörperergebnis daher mit einem alternativen Assay analysiert werden, um ein falsch negatives Ergebnis zu vermeiden²²⁶. Bei den als reaktiv identifizierten Proben kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine Kreuzreaktion mit zirkulierenden endemischen Coronaviren handelt³⁴³. Da Roche die Kreuzreaktivität der Assays getestet hat, ist dies jedoch unwahrscheinlich^{231,232}. Fünf der 327 Probanden von DSHS I konnten mittels DBS-Messung erstmalig als seropositiv identifiziert werden, ohne dass eine vorhergehende SARS-CoV-2-Infektion bekannt war. Diese Beobachtung in einer – im Vergleich zur Gesamtbevölkerung – kleinen Kohorte unterstreicht den Mehrwert von DBS-Testungen zur Aufklärung des Infektionsgeschehens.

Zum Zeitpunkt von DSHS II war die epidemiologische Lage eine andere, Deutschland nicht im Anstieg seiner zweiten, sondern dritten Pandemiewelle begriffen, erste Teile der Bevölkerung geimpft, PCR- und Antikörper-Testungen ein weniger rares Gut. Die Teilnehmerzahl von DSHS II war kleiner als die von DSHS I. Acht Probanden hatten eine positive Testanamnese. Von diesen konnten lediglich fünf mittels DBS bestätigt werden. Die fehlende Reaktivität der restlichen drei Proben mit positiver Testanamnese (PCR-Test ein bis drei Monate vor Antikörpermessung) war im Einklang mit der jeweiligen Krankengeschichte und zeigte sich bei Wiederholungsmessung von DBS oder Plasma konsistent, wobei die oben genannten Einschränkungen berücksichtigt werden müssen. Eine der 230 Proben konnte erstmalig als reaktiv identifiziert werden. Fraglich ist, ob die höhere Verfügbarkeit von PCR- und Antikörper-Tests zum Zeitpunkt von DSHS II einen Einfluss auf die Studienteilnahme hatte, Menschen mit PCR- und klinisch gesicherter Diagnose beispielsweise weniger motiviert waren, an einer experimentellen Studie teilzunehmen oder eine Selektion zugunsten von Beschäftigten stattfand, die die Stichhaltigkeit ihrer PCR-Diagnose bezweifelten.

Für die zwei Proben mit in DSHS I uneindeutigem Befund zeigte sich in der Messung nach dem Wintersemester, dass eine Probandin niedrigere Werte in DBS- und Plasmaprobe aufwies als in der Messung vor dem Wintersemester (wohlwissend, dass der N-Assay lediglich eine semiquantitative Aussage zulässt), während der DBS-Wert der anderen Probandin unter die Nachweisgrenze gefallen war. Diese Indizien für eine Antikörperabnahme unterstreichen den Mehrwert von Wiederholungsmessungen und sind mittels DBS leicht umzusetzen.

Die WHO hat in ihrem Protokoll zur Durchführung seroepidemiologischer Studien drei Studientypen skizziert: Einmalige Querschnittuntersuchungen, wiederholte Querschnittuntersuchungen mit nicht zwangsläufig den gleichen Probanden sowie Kohorten-Längsschnittuntersuchung mit seriellen Stichproben derselben Personen³²⁷. Die DSHS-Studie folgt dem zweiten Modell. Bei erneuter Durchführung wäre es sinnvoll, die gleichen Probanden einzuschließen und mit personifizierten Fragebögen zu arbeiten, um virologische und verhaltensbezogene Daten miteinander in Bezug setzen zu können. Darüber hinaus wäre eine systematische Erfassung der Krankheitsanamnese (Beschreibung von Symptomintensität und –dauer sowie möglicher Krankenhausaufenthalte) interessant, insbesondere nach Implementierung des durch diese Arbeit kreuzvalidierten quantitativen S-Assays. Um einer Verzerrung der Teilnehmenden durch eine notwendige aktive Registrierung vorzubeugen, könnten DBS-

Testpakete proaktiv an alle Hochschulbeschäftigte versendet werden und dadurch die Hemmschwelle der Teilnahme gesenkt werden. DBS-Pakete passen in jeden Briefkasten.

Technisch ist hervorzuheben, dass die Verwendung von DBS die problemlose zeitnahe Analyse (meist am Tag des Probeneingangs) von 557 Proben mit wenig Personal erlaubte (meist durch eine Arbeitskraft). Alle als uneindeutig klassifizierten Proben (COI zwischen 0,2 und 0,5) erwiesen sich bei Messung einer korrespondierenden Plasmaprobe als reaktiv, sodass eine weitere Absenkung des Schwellenwerts erwogen werden könnte.

5.3.3. Limitationen der Aussagekraft serologischer Assays

Es ist es möglich, dass auch Antikörperuntersuchungen die wahre Prävalenz unterschätzen³⁴⁴. Die vom Robert Koch-Institut an vier Hotspots in Deutschland durchgeführte Studie „Corona-Monitoring lokal“ konnte bei 53, 37, 24 und 11 Prozent der Teilnehmenden mit in der Vergangenheit positivem PCR-Test keine Antikörper nachweisen²³⁶. Eine Studie aus Schweden zeigte, dass nach milder oder asymptomatischer Infektion oder Kontakt zu Erkrankten mehr Menschen SARS-CoV-2-spezifische T-Zellen aufwiesen als SARS-CoV-2-spezifische Antikörper¹¹². In DSHS II zeigten drei der acht Proben mit zuvor PCR-bestätigter SARS-CoV-2-Diagnose keine Reaktivität. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass serologische Tests oft mit Patienten evaluiert wurden, die einen schweren Krankheitsverlauf und somit höhere Antikörpertiter hatten^{76,77,345}, die Mehrzahl der SARS-CoV-2 Erkrankungen jedoch milde oder gar asymptomatisch verlaufen^{73,122}. Auch wenn sich für die individuellen Teilnehmenden der Hochschulstudie möglicherweise nur eine eingeschränkte Aussage über eine vergangene Infektion treffen lässt, ermöglicht die größere Skalierung der Studie jedoch eine Einschätzung der Prävalenzentwicklung an der DSHS. Laut Kanadischer Gesellschaft klinischer Chemiker haben serologische Tests auf individueller Ebene einen begrenzten klinischen Nutzen, können jedoch für Seroprävalenzstudien hilfreich sein³⁴⁶. Krammer et al. und die Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin rufen bei der Interpretation seroepidemiologischer Studien zu Vorsicht auf: Neben der Dauer der Immunantwort und Intensität der Erkrankung müssten auch die Sensitivität und Spezifität des verwendeten Tests sowie die Prävalenz in der Bevölkerung berücksichtigt werden^{17,212}. Für Tests mit einer Spezifität unter 100 Prozent verhält sich die Rate falsch positiver Ergebnisse umgekehrt proportional zur Prävalenz¹⁷. Diese ist in Deutschland wahrscheinlich im niedrigen einstelligen Bereich zu verorten³³⁷.

Einen Einfluss hat außerdem der Zeitpunkt der Testung: Wird zu früh nach Infektion getestet, sind Antikörper möglicherweise noch nicht nachweisbar¹⁷. Wird zu spät getestet, können sie bereits nicht mehr nachweisbar sein¹²⁵. Ferner spielen die zu detektierenden Antikörperklassen und Zielantigene eine Rolle: Die üblicherweise chronologische Reihenfolge von IgM und IgG scheint bei SARS-CoV-2 variabel zu sein⁷³. Für IgG wurde eine längere Persistenz beobachtet als für IgM und IgA^{78,88}. Antikörper gegen das Nukleokapsid-Protein scheinen schneller abzunehmen als Antikörper gegen das Spike-

Protein^{77,78,130,223}. Zusätzlich präsentieren sich Antikörperkinetiken je nach Krankheitsverlauf unterschiedlich^{79,98}. Chen et al. kritisieren, dass die große Heterogenität verwendeter Antikörperklassen, Antigene und Schwellenwerte sowie fehlende externe Validierung von Sensitivität und Spezifität dazu führt, dass die Ergebnisse von Seroprävalenzstudien kaum miteinander vergleichbar sind²³⁵.

Ein zuverlässigeres Resultat serologischer Untersuchungen kann erreicht werden, indem mehrere Antikörperklassen gegen unabhängige Antigene berücksichtigt werden^{78,218,267}. Das Testen auf verschiedene Antigenstrukturen (zum Beispiel die S2-Einheit und RBD) gäbe zudem größere Sicherheit über das Vorliegen neutralisierender Antikörper⁷⁷. Hinsichtlich der Assays von Roche, die beide Pan-Immunglobulin-Assays sind, jedoch unterschiedliche Antigene detektieren, könnte in einer kombinierten Anwendung möglicherweise eine höhere Sensitivität erreicht werden.

5.4 Fazit

SARS-CoV-2 ist auch eine Krankheit der sozialen, globalen, kulturellen und ökonomischen Ungleichheit. DBS haben das Potential, einige dieser Faktoren zu umgehen und dank ihrer einfachen Zugänglichkeit eine Brücke zwischen Biomedizin und Sozialwissenschaften herzustellen²⁵⁷. Diese funktioniert in zwei Richtungen: Einerseits erhalten Patientengruppen, die möglicherweise von laborchemischer Versorgung ausgeschlossen wären, Zugang zu dieser. Andererseits erhalten Virologen, Biomediziner, Epidemiologen und Statistiker einen Einblick „unter die Haut“ zahlreicher und diverser Menschen. All das kann nur hilfreich sein, die Ausbreitung von SARS-CoV-2 besser zu verstehen – mit dem Ziel, sie moderieren und schlussendlich kontrollieren zu können.

2018 skizzierte die WHO eine Übersicht prioritär zu behandelnder Krankheiten, die aufgrund ihres epidemischen Potentials oder fehlender Gegenmaßnahmen beschleunigte Forschung und Entwicklung erfordern, darunter eine bis dahin unspezifizierte „Disease X“³⁴⁷. 2020 ist SARS-CoV-2 an die Stelle dieses Platzhalters getreten. Es ist davon auszugehen, dass „Disease Y“ und „Z“ folgen werden.

Um ein Déjà-vu zu vermeiden und neuen Pandemien nicht schutzlos gegenüberzutreten, appelliert das *Independent Panel for Pandemic Preparedness and Response*, dass die Welt ein neues internationales System zur Pandemievorsorge und -bekämpfung brauche, um zu verhindern, dass zukünftige Ausbrüche von Infektionskrankheiten zu katastrophalen Pandemien werden. In diesem System könnten DBS als Baustein fungieren.

Bereits zum jetzigen Zeitpunkt könnten DBS im Rahmen von SARS-CoV-2 als preiswertes Instrument mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten eingesetzt werden.

Denn noch gilt: Die Pandemie ist nicht vorbei.

6. Literaturverzeichnis

- 1 WHO (World Health Organization). WHO Director-General’s statement on IHR Emergency Committee on Novel Coronavirus (2019-nCoV). [https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ih-er-emergency-committee-on-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ih-er-emergency-committee-on-novel-coronavirus-(2019-ncov)) (zuletzt abgerufen am 25. April 2021).
- 2 Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 2020; **395**: 470–3.
- 3 WHO (World Health Organization). Pneumonia of unknown cause – China. <https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unkown-cause-china/en/> (zuletzt abgerufen am 23. Mai 2021).
- 4 Huang C, Wang Y, Li X, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; **395**: 497–506.
- 5 Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; **579**: 270–3.
- 6 Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020; **5**: 536–44.
- 7 Lu R, Zhao X, Li J, *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020; **395**: 565–74.
- 8 WHO (World Health Organization). Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report – 22. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf> (zuletzt abgerufen am 23. Mai 2021).
- 9 WHO (World Health Organization). WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (zuletzt abgerufen am 5. Mai 2021).
- 10 WHO (World Health Organization). Weekly epidemiological update on COVID-19 - 24 August 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---24-august-2021> (zuletzt abgerufen am 25. August 2021).
- 11 The Independent Panel for Pandemic Preparedness and Response. COVID-19: Make it the Last Pandemic. <https://theindependentpanel.org/mainreport/> (zuletzt abgerufen am 23. Mai 2021).
- 12 ZDFheute. Statistiker zu Corona-Daten: Kritik an ‘Unterlassungssünden’ der Politik. <https://www.zdf.de/nachrichten/politik/corona-daten-grundlage-kritik-antes-100.html> (zuletzt abgerufen am 4. Mai 2021).
- 13 Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, *et al.* Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2021; **27**: 1205–1211.
- 14 Weitz JS, Beckett SJ, Coenen AR, *et al.* Modeling shield immunity to reduce COVID-19

- epidemic spread. *Nat Med* 2020; **26**: 849–54.
- 15 RKI (Robert Koch-Institut). Coronavirus SARS-CoV-2 - Hinweise zur Testung von Patienten auf Infektion mit dem neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html;jsessionid=A01755FE19D6CE567CAC376780B64DD8.internet062?nn=13490888#doc13490982bodyText9 (zuletzt abgerufen am 23. Mai 2021).
- 16 WHO (World Health Organization). Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501> (zuletzt abgerufen am 23. Mai 2021).
- 17 Özçürümez MK, Ambrosch A, Frey O, *et al.* SARS-CoV-2 antibody testing—questions to be asked. *J Allergy Clin Immunol* 2020; **146**: 35–43.
- 18 Yong G, Yi Y, Tuantuan L, *et al.* Evaluation of the auxiliary diagnostic value of antibody assays for the detection of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *J Med Virol* 2020; **92**: 1975–9.
- 19 Ong DSY, Fragkou PC, Schweitzer VA, *et al.* How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clin Microbiol Infect* 2021; **27**: 981–6.
- 20 Moshe M, Daunt A, Flower B, *et al.* SARS-CoV-2 lateral flow assays for possible use in national covid-19 seroprevalence surveys (React 2): Diagnostic accuracy study. *BMJ* 2021; **372**: n423.
- 21 Conklin SE, Martin K, Manabe YC, *et al.* Evaluation of serological SARS-CoV-2 lateral flow assays for rapid point-of-care testing. *J Clin Microbiol* 2021; **59**: e02020-20.
- 22 Moat SJ, Zelek WM, Carne E, *et al.* Development of a high-throughput SARS-CoV-2 antibody testing pathway using dried blood spot specimens. *Ann Clin Biochem* 2021; **58**: 123–31.
- 23 Morley GL, Taylor S, Jossi S, *et al.* Sensitive Detection of SARS-CoV-2 – Specific Antibodies in Dried Blood Spot Samples. *Emerg Infect Dis* 2020; **26**: 2970–3.
- 24 Thevis M, Knoop A, Schaefer MS, *et al.* Can dried blood spots (DBS) contribute to conducting comprehensive SARS-CoV-2 antibody tests? *Drug Test Anal* 2020; **12**: 994–7.
- 25 McDade TW, McNally EM, Zelikovich AS, *et al.* High seroprevalence for SARS-CoV-2 among household members of essential workers detected using a dried blood spot assay. *PLoS One* 2020; **15**: e0237833.
- 26 Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: Maier HJ, Bickerton E, Britton P, eds. *Coronaviruses: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, 2015: 1–23.
- 27 Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019; **17**: 181–92.
- 28 Su S, Wong G, Shi W, *et al.* Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol* 2016; **24**: 490–502.
- 29 Hui DSC, Wong PC, Wang C. SARS: Clinical features and diagnosis. *Respirology* 2003; **8**:

- S20–4.
- 30 Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet* 2015; **386**: 995–1007.
- 31 RKI (Robert Koch-Institut). Coronavirus SARS-CoV-2 - SARS-CoV-2: Virologische Basisdaten sowie Virusvarianten. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virologische_Basisdaten.html (zuletzt abgerufen am 25. April 2021).
- 32 Mukherjee R. Global efforts on vaccines for COVID-19: Since, sooner or later, we all will catch the coronavirus. *J Biosci* 2020; **45**: 1–10.
- 33 Hotez PJ, Corry DB, Bottazzi ME. COVID-19 vaccine design: the Janus face of immune enhancement. *Nat Rev Immunol* 2020; **20**: 347–8.
- 34 Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020; **181**: 271–80.
- 35 Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 2020; **367**: 1444–8.
- 36 Wrapp D, Wang N, Corbett KS, *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020; **367**: 1260–3.
- 37 Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med* 2020; **14**: 185–92.
- 38 Sungnak W, Huang N, Bécavin C, *et al.* SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med* 2020; **26**: 681–7.
- 39 Muus C, Luecken MD, Eraslan G, *et al.* Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. *Nat Med* 2021; **27**: 546–59.
- 40 Li Q, Guan X, Wu P, *et al.* Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med* 2020; **382**: 1199–207.
- 41 Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, *et al.* The incubation period of coronavirus disease 2019 (CoVID-19) from publicly reported confirmed cases: Estimation and application. *Ann Intern Med* 2020; **172**: 577–82.
- 42 RKI (Robert Koch-Institut). Infektionskrankheiten A-Z - Epidemiologischer Steckbrief zu SARS-CoV-2 und COVID-19. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html;jsessionid=3C5C1BBB9123770A9B357FDA44269160.internet052?nn=2386228#doc13776792bodyText17 (zuletzt abgerufen am 14. Mai 2021).
- 43 Gupta A, Madhavan M V., Sehgal K, *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med* 2020; **26**: 1017–32.
- 44 Korompoki E, Gavriatopoulou M, Hicklen RS, *et al.* Epidemiology and organ specific sequelae

- of post-acute COVID19: A Narrative Review. *J Infect* 2021; **83**: 1–16.
- 45 Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, *et al.* Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* 2021; **27**: 601–15.
- 46 Bryce C, Grimes Z, Pujadas E, *et al.* Pathophysiology of SARS-CoV-2: the Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. *Mod Pathol* 2021; **34**: 1456–67.
- 47 Ortolan A, Lorenzin M, Felicetti M, Doria A, Ramonda R. Does gender influence clinical expression and disease outcomes in COVID-19? A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2020; **99**: 496–504.
- 48 Zhou F, Yu T, Du R, *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020; **395**: 1054–62.
- 49 Petrilli CM, Jones SA, Yang J, *et al.* Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: Prospective cohort study. *BMJ* 2020; **369**: m1966.
- 50 Levin AT, Hanage WP, Owusu-Boaitey N, Cochran KB, Walsh SP, Meyerowitz-Katz G. Assessing the age specificity of infection fatality rates for COVID-19: systematic review, meta-analysis, and public policy implications. *Eur J Epidemiol* 2020; **35**: 1123–38.
- 51 Liguoro I, Pilotto C, Bonanni M, *et al.* SARS-COV-2 infection in children and newborns: a systematic review. *Eur J Pediatr* 2020; **179**: 1029–46.
- 52 Jones TC, Biele G, Mühlemann B, *et al.* Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. *Science* 2021; **373**: eabi5273.
- 53 GAeF (Gesellschaft für Aerosolforschung). Positionspapier der Gesellschaft für Aerosolforschung zum Verständnis der Rolle von Aerosolpartikeln beim SARS-CoV-2 Infektionsgeschehen. <https://www.info.gaef.de/positionspapier> (zuletzt abgerufen am 19. Mai 2021).
- 54 Cheng Y, Ma N, Witt C, *et al.* Face masks effectively limit the probability of SARS-CoV-2 transmission. *Science* 2021; **372**: 1439–43.
- 55 van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, *et al.* Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* 2020; **382**: 1564–7.
- 56 Liu Y, Li T, Deng Y, *et al.* Stability of SARS-CoV-2 on environmental surfaces and in human excreta. *J Hosp Infect* 2021; **107**: 105–7.
- 57 Oran DP, Topol EJ. The Proportion of SARS-CoV-2 Infections That Are Asymptomatic. *Ann Intern Med* 2021; **174**: 655–62.
- 58 Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, *et al.* SARS-CoV-2 Transmission from People without COVID-19 Symptoms. *JAMA Netw Open* 2021; **4**: e2035057.
- 59 Sun K, Wang W, Gao L, *et al.* Transmission heterogeneities, kinetics, and controllability of SARS-CoV-2. *Science* 2021; **371**: eabe2424.
- 60 Majra D, Benson J, Pitts J, Stebbing J. SARS-CoV-2 (COVID-19) superspreader events. *J*

- Infect* 2021; **82**: 36–40.
- 61 Swinkels K. SARS-CoV-2 Superspreading Events Around the World [Google Sheet]. 2020. www.superspreadingdatabase.com (zuletzt abgerufen am 24. Mai 2021).
- 62 Feldt T, Guggemos W, Heim K, *et al.* Ständiger Arbeitskreis der Kompetenz- und Behandlungszentren für Krankheiten durch hochpathogene Erreger am Robert Koch-Institut. Hinweise zu Erkennung, Diagnostik und Therapie von Patienten mit COVID-19. www.rki.de/covid-19-therapie-stakob (zuletzt abgerufen am 25. Mai 2021).
- 63 Mager S, Mikolajewska A, Weber S, *et al.* Medikamentöse Therapie bei COVID-19 mit Bewertung durch die Fachgruppe COVRIIN am Robert Koch-Institut. www.dgi-net.de (zuletzt abgerufen am 14. August 2021).
- 64 Li Q, Wu J, Nie J, *et al.* The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. *Cell* 2020; **182**: 1284–94.
- 65 Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, *et al.* Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* 2020; **182**: 812–27.
- 66 WHO (World Health Organization). Special edition: Proposed working definitions of SARS-CoV-2 Variants of Interest and Variants of Concern Working Definition of ‘SARS-CoV-2 Variant of Interest’. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20210225_weekly_epi_update_voc-special-edition.pdf (zuletzt abgerufen am 25. Mai 2021).
- 67 Shiels MS, Almeida JS, García-Closas M, Albert PS, Freedman ND, de González AB. Impact of Population Growth and Aging on Estimates of Excess U.S. Deaths During the COVID-19 Pandemic, March to August 2020. *Ann Intern Med* 2021; **174**: 437–43.
- 68 Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021; **184**: 861–80.
- 69 Siggins MK, Thwaites RS, Openshaw PJM. Durability of immunity to SARS-CoV-2 and other respiratory viruses. *Trends Microbiol* 2021; **29**: 648–62.
- 70 Dan JM, Mateus J, Kato Y, *et al.* Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 2021; **371**: eabf4063.
- 71 Galipeau Y, Greig M, Liu G, Driedger M, Langlois MA. Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. *Front Immunol* 2020; **11**: 610688.
- 72 Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, *et al.* Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* 2020; **181**: 1489–501.
- 73 Long QX, Liu BZ, Deng HJ, *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020; **26**: 845–8.
- 74 Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* 2020; **584**: 437–42.

- 75 Masiá M, Telenti G, Fernández M, *et al.* SARS-CoV-2 Seroconversion and Viral Clearance in Patients Hospitalized with COVID-19: Viral Load Predicts Antibody Response. *Open Forum Infect Dis* 2021; **88**: ofab005.
- 76 Long QX, Tang XJ, Shi QL, *et al.* Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* 2020; **26**: 1200–4.
- 77 Ripperger TJ, Uhrlaub JL, Watanabe M, *et al.* Orthogonal SARS-CoV-2 Serological Assays Enable Surveillance of Low-Prevalence Communities and Reveal Durable Humoral Immunity. *Immunity* 2020; **53**: 925–33.
- 78 Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, *et al.* Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med* 2020; **383**: 1724–34.
- 79 Röltgen K, Powell AE, Wirz OF, *et al.* Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. *Sci Immunol* 2021; **5**: eabe0240.
- 80 Lucas C, Klein J, Sundaram ME, *et al.* Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19. *Nat Med* 2021; **27**: 1178–1186.
- 81 Sonnleitner ST, Prelog M, Jansen B, *et al.* Maintenance of neutralizing antibodies over ten months in convalescent SARS-CoV-2 afflicted patients. *Transbound Emerg Dis* 2021; **00**: 1–10.
- 82 Chen X, Pan Z, Yue S, *et al.* Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* 2020; **5**: 1–6.
- 83 Chen Y, Tong X, Li Y, *et al.* A comprehensive, longitudinal analysis of humoral responses specific to four recombinant antigens of SARS-CoV-2 in severe and non-severe COVID-19 patients. *PLoS Pathog* 2020; **16**: e1008796.
- 84 Stephens DS, McElrath MJ. COVID-19 and the Path to Immunity. *JAMA - J Am Med Assoc* 2020; **324**: 1279–81.
- 85 Guo L, Ren L, Yang S, *et al.* Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin Infect Dis* 2020; **71**: 778–85.
- 86 Anderson EM, Goodwin EC, Verma A, Bates P, Rader DJ, Hensley Correspondence SE. Seasonal human coronavirus antibodies are boosted upon SARS-CoV-2 infection but not associated with protection. 2021; **184**: 1858–1864.
- 87 Ortega N, Ribes M, Vidal M, *et al.* Seven-month kinetics of SARS-CoV-2 antibodies and role of pre-existing antibodies to human coronaviruses. *Nat Commun* 2021; **12**: 1–10.
- 88 Isho B, Abe KT, Zuo M, *et al.* Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci Immunol* 2020; **5**: eabe5511.
- 89 Oved K, Olmer L, Shemer-Avni Y, *et al.* Multi-center nationwide comparison of seven serology assays reveals a SARS-CoV-2 non-responding seronegative subpopulation. *EClinicalMedicine* 2020; **29**: 100651.

- 90 Jiang C, Wang Y, Hu M, *et al.* Antibody seroconversion in asymptomatic and symptomatic patients infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Transl Immunol* 2020; **9**: e1182.
- 91 Kellam P, Barclay W. The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. *J. Gen. Virol.* 2020; **101**: 791–7.
- 92 Liu L, Wang P, Nair MS, *et al.* Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* 2020; **584**: 450–6.
- 93 Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesele D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 2020; **181**: 281–92.
- 94 Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, *et al.* Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science* 2020; **370**: 1227–30.
- 95 Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, *et al.* Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell* 2020; **183**: 1024–42.
- 96 Andreano E, Rappuoli R. SARS-CoV-2 escaped natural immunity, raising questions about vaccines and therapies. *Nat Med* 2021; **27**: 759–61.
- 97 Grzelak L, Temmam S, Planchais C, *et al.* A comparison of four serological assays for detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum samples from different populations. *Sci Transl Med* 2020; **12**: 3103.
- 98 Atyeo C, Fischinger S, Zohar T, *et al.* Distinct Early Serological Signatures Track with SARS-CoV-2 Survival. *Immunity* 2020; **53**: 524–32.
- 99 Zohar T, Loos C, Fischinger S, *et al.* Compromised Humoral Functional Evolution Tracks with SARS-CoV-2 Mortality. *Cell* 2020; **183**: 1508–19.
- 100 Lau EHY, Tsang OTY, Hui DSC, *et al.* Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun* 2021; **12**: 1–7.
- 101 McMahan K, Yu J, Mercado NB, *et al.* Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature* 2021; **590**: 630–4.
- 102 Chandrashekar A, Liu J, Martino AJ, *et al.* SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science* 2020; **369**: 812–7.
- 103 Tortorici MA, Beltramello M, Lempp FA, *et al.* Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple mechanisms. *Science* 2020; **370**: 950–7.
- 104 Addetia A, Crawford KHD, Dingens A, *et al.* Neutralizing antibodies correlate with protection from SARS-CoV-2 in humans during a fishery vessel outbreak with a high attack rate. *J Clin Microbiol* 2020; **58**: e02107-20.
- 105 Yu J, Tostanosk LH, Peter L, *et al.* DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science* 2020; **369**: 806–11.
- 106 Mercado NB, Zahn R, Wegmann F, *et al.* Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-

- CoV-2 in rhesus macaques. *Nature* 2020; **586**: 583–8.
- 107 van Kampen JJA, van de Vijver DAMC, Fraaij PLA, *et al.* Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat Commun* 2021; **12**: 1–6.
- 108 Baum A, Ajithdoss D, Copin R, *et al.* REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters. *Science* 2020; **370**: 1110–5.
- 109 Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, *et al.* REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med* 2021; **384**: 238–51.
- 110 Bal A, Pozzetto B, Trabaud M-A, *et al.* Evaluation of High-Throughput SARS-CoV-2 Serological Assays in a Longitudinal Cohort of Patients with Mild COVID-19: Clinical Sensitivity, Specificity, and Association with Virus Neutralization Test. *Clin Chem* 2021; **67**: 742–52.
- 111 Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, *et al.* Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell* 2020; **183**: 996-1012.e19.
- 112 Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, *et al.* Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell* 2020; **183**: 158–68.
- 113 Pray IW, Gibbons-Burgener SN, Rosenberg AZ, *et al.* COVID-19 Outbreak at an Overnight Summer School Retreat — Wisconsin, July–August 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020; **69**: 1600–4.
- 114 Lumley SF, O’Donnell D, Stoesser NE, *et al.* Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *N Engl J Med* 2021; **384**: 533–40.
- 115 Harvey RA, Rassen JA, Kabelac CA, *et al.* Association of SARS-CoV-2 Seropositive Antibody Test with Risk of Future Infection. *JAMA Intern Med* 2021; **181**: 672–9.
- 116 Hansen CH, Michlmayr D, Gubbels SM, Mølbak K, Ethelberg S. Assessment of protection against reinfection with SARS-CoV-2 among 4 million PCR-tested individuals in Denmark in 2020: a population-level observational study. *Lancet* 2021; **397**: 1204–12.
- 117 Hall VJ, Foulkes S, Charlett A, *et al.* SARS-CoV-2 infection rates of antibody-positive compared with antibody-negative health-care workers in England: a large, multicentre, prospective cohort study (SIREN). *Lancet* 2021; **397**: 1459–69.
- 118 Libster R, Pérez Marc G, Wappner D, *et al.* Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent Severe Covid-19 in Older Adults. *N Engl J Med* 2021; **384**: 610–8.
- 119 Edridge AWD, Kaczorowska J, Hoste ACR, *et al.* Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nat Med* 2020; **26**: 1691–3.
- 120 To KK-W, Hung IF-N, Ip JD, *et al.* Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Re-infection by a Phylogenetically Distinct Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Strain Confirmed by Whole Genome Sequencing. *Clin Infect Dis* 2020; online veröffentlicht am 25. August 2020

DOI:10.1093/cid/ciaa1275.

- 121 van Binnendijk RS, den Hartog G, Reimerink J, *et al.* Serological Evidence for Reinfection with SARS-CoV-2; An Observational Cohort Study. *SSRN Electron J* 2021; online veröffentlicht am 18. März 2021. DOI:10.2139/ssrn.3800076.
- 122 Liu L, To KKW, Chan KH, *et al.* High neutralizing antibody titer in intensive care unit patients with COVID-19. *Emerg Microbes Infect* 2020; **9**: 1–30.
- 123 Duysburgh E, Mortgat L, Barbezange C, *et al.* Persistence of IgG response to SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis* 2021; **21**: 163–4.
- 124 Reynolds CJ, Swadling L, Gibbons JM, *et al.* Discordant neutralizing antibody and T cell responses in asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infection. *Sci Immunol* 2020; **5**: eabf3698.
- 125 Ibarrondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, *et al.* Rapid Decay of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Persons with Mild Covid-19. *N Engl J Med* 2020; **383**: 1085–7.
- 126 Seow J, Graham C, Merrick B, *et al.* Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol* 2020; **5**: 1598–607.
- 127 Ward H, Cooke GS, Atchison C, *et al.* Prevalence of antibody positivity to SARS-CoV-2 following the first peak of infection in England: Serial cross-sectional studies of 365,000 adults. *Lancet Reg Heal – Eur* 2021; **4**: 100098.
- 128 Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, *et al.* Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature* 2021; **591**: 639–44.
- 129 Anand SP, Prévost J, Nayrac M, *et al.* Longitudinal analysis of humoral immunity against SARS-CoV-2 Spike in convalescent individuals up to eight months post-symptom onset. *Cell Reports Med* 2021; **15**: 100290.
- 130 Wheatley AK, Juno JA, Wang JJ, *et al.* Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19. *Nat Commun* 2021; **12**: 1–11.
- 131 Marot S, Malet I, Leducq V, *et al.* Rapid decline of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 among infected healthcare workers. *Nat Commun* 2021; **12**: 1–7.
- 132 Yamayoshi S, Yasuhara A, Ito M, *et al.* Antibody titers against SARS-CoV-2 decline, but do not disappear for several months. *EClinicalMedicine* 2021; **32**: 100734.
- 133 Chia WN, Zhu F, Ong SWX, *et al.* Dynamics of SARS-CoV-2 neutralising antibody responses and duration of immunity: a longitudinal study. *The Lancet Microbe* 2021; **2**: e240-9.
- 134 He Z, Ren L, Yang J, *et al.* Seroprevalence and humoral immune durability of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Wuhan, China: a longitudinal, population-level, cross-sectional study. *Lancet* 2021; **397**: 1075–84.
- 135 Cao W-C, Liu W, Zhang P-H, Zhang F, Richardus JH. Disappearance of Antibodies to SARS-Associated Coronavirus after Recovery. *N Engl J Med* 2007; **357**: 1162–3.
- 136 Wu LP, Wang NC, Chang YH, *et al.* Duration of antibody responses after severe acute

- respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis* 2007; **13**: 1562–4.
- 137 Guo X, Guo Z, Duan C, *et al.* Long-Term Persistence of IgG Antibodies in SARS-CoV Infected Healthcare Workers. *medRxiv* 2020; : 2020.02.12.20021386.
- 138 Anderson DE, Tan CW, Chia WN, *et al.* Lack of cross-neutralization by SARS patient sera towards SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect* 2020; **9**: 900–2.
- 139 Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, *et al.* A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat Commun* 2020; **11**: 4704.
- 140 Lee WS, Selva KJ, Davis SK, *et al.* Decay of Fc-dependent antibody functions after mild to moderate COVID-19. *Cell Reports Med* 2021; **2**: 100296.
- 141 Tso FY, Lidenge SJ, Poppe LK, *et al.* Presence of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against SARS-CoV-2 in COVID-19 plasma. *PLoS One* 2021; **16**: e0247640.
- 142 Dufloo J, Grzelak L, Staropoli I, *et al.* Asymptomatic and symptomatic SARS-CoV-2 infections elicit polyfunctional antibodies. *Cell Reports Med* 2021; **2**: 100275.
- 143 Liu Y, Soh WT, Kishikawa J, *et al.* An infectivity-enhancing site on the SARS-CoV-2 spike protein targeted by antibodies. *Cell* 2021; **184**: 3452-3466.e18.
- 144 Turner JS, Kim W, Kalaidina E, *et al.* SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature* 2021; **595**: 421–5.
- 145 Wang P, Nair MS, Liu L, *et al.* Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature* 2021; **593**: 130–5.
- 146 WHO (World Health Organization). COVID-19 vaccine tracker and landscape. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (zuletzt abgerufen am 25. August 2021).
- 147 European Commission. Timeline of EU action. https://ec.europa.eu/info/live-work-travel-eu/coronavirus-response/timeline-eu-action_en (zuletzt abgerufen am 13. Mai 2021).
- 148 Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol* 2021; **21**: 83–100.
- 149 Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 2020; **383**: 2603–15.
- 150 Baden LR, El Sahly HM, Essink B, *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* 2021; **384**: 403–16.
- 151 Voysey M, Costa Clemens SA, Madhi SA, *et al.* Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials. *Lancet* 2021; **397**: 881–91.
- 152 Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, *et al.* Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med* 2021; **384**: 2187–201.
- 153 Thompson MG, Burgess JL, Naleway AL, *et al.* Interim Estimates of Vaccine Effectiveness of

- BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 Vaccines in Preventing SARS-CoV-2 Infection Among Health Care Personnel, First Responders, and Other Essential and Frontline Workers — Eight U.S. Locations, December 2020–March 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2021; **70**: 495–500.
- 154 Hall VJ, Foulkes S, Saei A, *et al.* COVID-19 vaccine coverage in health-care workers in England and effectiveness of BNT162b2 mRNA vaccine against infection (SIREN): a prospective, multicentre, cohort study. *Lancet* 2021; **397**: 1725–35.
- 155 Dagan N, Barda N, Kepten E, *et al.* BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. *N Engl J Med* 2021; **384**: 1412–23.
- 156 Pritchard E, Matthews PC, Stoesser N, *et al.* Impact of vaccination on new SARS-CoV-2 infections in the United Kingdom. *Nat Med* 2021 2021. DOI:10.1038/s41591-021-01410-w.
- 157 Regev-Yochay G, Amit S, Bergwerk M, *et al.* Decreased Infectivity Following BNT162b2 Vaccination. *SSRN Electron J* 2021; **7**: 100150.
- 158 Harris RJ, Hall JA, Zaidi A, Andrews NJ, Dunbar JK, Dabrera G. Effect of Vaccination on Household Transmission of SARS-CoV-2 in England. *N Engl J Med* 2021; online veröffentlicht am 23. Juni 2021. DOI:10.1056/NEJMc2107717.
- 159 Burioni R, Topol EJ. Has SARS-CoV-2 reached peak fitness? *Nat Med* 2021; **6**: 1.
- 160 Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, *et al.* Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med* 2020; **383**: 2439–50.
- 161 Sahin U, Muik A, Vogler I, *et al.* BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. *Nature* 2021; **595**: 572–577.
- 162 Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, *et al.* An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. *N Engl J Med* 2020; **383**: 1920–31.
- 163 Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M, *et al.* Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19. *N Engl J Med* 2021; **384**: 2259–61.
- 164 Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, *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; **396**: 467–78.
- 165 Barrett JR, Belij-Rammerstorfer S, Dold C, *et al.* Phase 1/2 trial of SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1 nCoV-19 with a booster dose induces multifunctional antibody responses. *Nat Med* 2021; **27**: 279–88.
- 166 Sadoff J, Le Gars M, Shukarev G, *et al.* Interim Results of a Phase 1–2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 2021; **384**: 1824–35.
- 167 Reynolds CJ, Pade C, Gibbons JM, *et al.* Prior SARS-CoV-2 infection rescues B and T cell responses to variants after first vaccine dose. *Science* 2021; **372**: 1418–23.
- 168 Krammer F, Srivastava K, Alshammary H, *et al.* Antibody Responses in Seropositive Persons after a Single Dose of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine. *NEJM* 2021; **384**: 1372–4.

- 169 Stamatatos L, Czartoski J, Wan Y-H, *et al.* mRNA vaccination boosts cross-variant neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Science* 2021; online veröffentlicht am 25. März 2021. DOI:10.1126/SCIENCE.ABG9175.
- 170 Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, *et al.* Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature* 2021; **595**: 426–31.
- 171 Krammer F. Correlates of protection from SARS-CoV-2 infection. *Lancet* 2021; **397**: 1421–3.
- 172 Su F, Patel GB, Hu S, Chen W. Induction of mucosal immunity through systemic immunization: Phantom or reality? *Hum Vaccines Immunother* 2016; **12**: 1070–9.
- 173 Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* 2020; **586**: 516–27.
- 174 Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, *et al.* Antibody Response to 2-Dose SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Series in Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA* 2021; **325**: 2204–6.
- 175 Rincon-Arevalo H, Choi M, Stefanski AL, *et al.* Impaired humoral immunity to SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients and dialysis patients. *Sci Immunol* 2021; **6**: 1031.
- 176 Lim SH, Campbell N, Johnson M, *et al.* Antibody responses after SARS-CoV-2 vaccination in patients with lymphoma. *Lancet Haematol* 2021; **8**: e542-4.
- 177 Khayat-Khoei M, Conway S, Rubinson DA, Jarolim P, Houtchens MK. Negative anti-SARS-CoV-2 S antibody response following Pfizer SARS-CoV-2 vaccination in a patient on ocrelizumab. *J. Neurol.* 2021; **1**: 3.
- 178 Collier DA, Ferreira IATM, Kotagiri P, *et al.* Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. *Nature* 2021; online veröffentlicht am 30. Juni 2021. DOI:10.1038/s41586-021-03739-1.
- 179 Anderson EJ, Roupheal NG, Widge AT, *et al.* Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med* 2020; **383**: 2427–38.
- 180 Alter G, Yu J, Liu J, *et al.* Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans. *Nature* 2021; online veröffentlicht am 9. Juni 2021. DOI:10.1038/s41586-021-03681-2.
- 181 Tarke A, Sidney J, Methot N, *et al.* Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4 + and CD8 + T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Reports Med* 2021; **2**: 100355.
- 182 Turner JS, O’Halloran JA, Kalaidina E, *et al.* SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature* 2021; **596**: 109–13.
- 183 CDC (Centers for Disease Control and Prevention). COVID-19 Breakthrough Case Investigations and Reporting. <https://www.cdc.gov/vaccines/covid-19/health-departments/breakthrough-cases.html> (zuletzt abgerufen am 28. April 2021).
- 184 Thompson MG, Burgess JL, Naleway AL, *et al.* Prevention and Attenuation of Covid-19 with the BNT162b2 and mRNA-1273 Vaccines. *N Engl J Med* 2021; online veröffentlicht am 30.

- Juni 2021. DOI:10.1056/NEJMoa2107058.
- 185 Kumar VJ, Sowpati DT, Munigela A, *et al.* Clinical outcomes in vaccinated individuals hospitalized with Delta variant of SARS-CoV-2. *medRxiv* 2021; online veröffentlicht am 16. Juli 2021. DOI:10.1101/2021.07.13.21260417.
- 186 Madhi SA, Baillie V, Cutland CL, *et al.* Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. *N Engl J Med* 2021; **384**: 1885–98.
- 187 Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, *et al.* mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature* 2021; **592**: 616–22.
- 188 Emary KRW, Golubchik T, Aley PK, *et al.* Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* 2021; **397**: 1351–62.
- 189 Mlcochova P, Kemp S, Shanker Dhar M, *et al.* SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant emergence and vaccine breakthrough 1 2. *bioRxiv* 2021; online veröffentlicht am 28. Juni 2021. DOI:10.1101/2021.05.08.443253.
- 190 Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, Weisser K, Kyrle PA, Eichinger S. Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *N Engl J Med* 2021; online veröffentlicht am 9. April 2021. DOI:10.1056/nejmoa2104840.
- 191 Schultz NH, Sørvoll IH, Michelsen AE, *et al.* Thrombosis and Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *N Engl J Med* 2021; online veröffentlicht am 9. April 2021. DOI:10.1056/nejmoa2104882.
- 192 RKI (Robert Koch-Institut). Beschluss der STIKO zur 4. Aktualisierung der COVID-19-Impfempfehlung und die dazugehörige wissenschaftliche Begründung. https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/STIKO/Empfehlungen/Vierte_Empfehlung_01042021_Download.pdf?__blob=publicationFile (zuletzt abgerufen am 13. Mai 2021).
- 193 Liu X, Shaw RH, Stuart AS, *et al.* Safety and Immunogenicity Report from the Com-COV Study – a Single-Blind Randomised Non-Inferiority Trial Comparing Heterologous And Homologous Prime-Boost Schedules with An Adenoviral Vectored and mRNA COVID-19 Vaccine. *SSRN Electron J* 2021. DOI:10.2139/ssrn.3874014.
- 194 RKI (Robert Koch-Institut). Empfehlungen der STIKO - Mitteilung der STIKO zur COVID-19-Impfung: Impfabstand und heterologes Impfschema nach Erstimpfung mit Vaxzevria (1.7.2021). https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/STIKO/Empfehlungen/PM_2021-07-01.html;jsessionid=F95D8160665AC3D037E3DA5EA72B41B6.internet092 (zuletzt abgerufen am 2. Juli 2021).
- 195 Corman VM, Landt O, Kaiser M, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* 2020; **25**: 2000045.
- 196 Wikramaratna PS, Paton RS, Ghafari M, Lourenço J. Estimating the false-negative test probability of SARSCoV- 2 by RT-PCR. *Eurosurveillance* 2020; **25**: 2000568.

- 197 Yang Y, Yang M, Yuan J, *et al.* Laboratory Diagnosis and Monitoring the Viral Shedding of SARS-CoV-2 Infection. *Innov* 2020; **1**: 100061.
- 198 Ryan DJ, Toomey S, Madden SF, *et al.* Use of exhaled breath condensate (EBC) in the diagnosis of SARS-CoV-2 (COVID-19). *Thorax* 2021; **76**: 86–8.
- 199 Tu Y-P, Jennings R, Hart B, *et al.* Swabs Collected by Patients or Health Care Workers for SARS-CoV-2 Testing. *N Engl J Med* 2020; **383**: 494–6.
- 200 Yan Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev Med Virol* 2020; **30**: e2106.
- 201 Hay JA, Kennedy-Shaffer L, Kanjilal S, *et al.* Estimating epidemiologic dynamics from cross-sectional viral load distributions. *Science* 2021; **373**: eabh0635.
- 202 Dramé M, Tabue Teguo M, Proye E, *et al.* Should RT-PCR be considered a gold standard in the diagnosis of COVID-19? *J. Med. Virol.* 2020; **92**: 2312–3.
- 203 Xie X, Zhong Z, Zhao W, Zheng C, Wang F, Liu J. Chest CT for Typical Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. *Radiology* 2020; **296**: E41–5.
- 204 Ai T, Yang Z, Hou H, *et al.* Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology* 2020; **296**: E32–40.
- 205 Arevalo-Rodriguez I, Buitrago-Garcia D, Simancas-Racines D, *et al.* False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review. *PLoS One* 2020; **15**: e0242958.
- 206 Surkova E, Nikolayevskyy V, Drobniowski F. False-positive COVID-19 results: hidden problems and costs. *Lancet Respir Med* 2020; **8**: 1167–8.
- 207 Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe* 2021; **2**: e13–22.
- 208 Wajnberg A, Mansour M, Leven E, *et al.* Humoral response and PCR positivity in patients with COVID-19 in the New York City region, USA: an observational study. *The Lancet Microbe* 2020; **1**: e283–9.
- 209 Infantino M, Damiani A, Li Gobbi F, *et al.* Serological Assays for SARS-CoV-2 Infectious Disease: Benefits, Limitations and Perspectives. *Isr Med Assoc J* 2020; **22**: 203–10.
- 210 Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, *et al.* Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2021; online veröffentlicht am 24. März 2021. DOI:10.1002/14651858.CD013705.pub2.
- 211 Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, *et al.* A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med* 2020; **26**: 1033–6.
- 212 Krammer F, Simon V. Serology assays to manage COVID-19. *Science* 2020; **368**: 1060–1.
- 213 Stadlbauer D, Amanat F, Chromikova V, *et al.* SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A

- Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup. *Curr Protoc Microbiol* 2020; **57**: e100.
- 214 Bohn MK, Loh TP, Wang C Bin, *et al.* IFCC Interim Guidelines on Serological Testing of Antibodies against SARS-CoV-2. *Clin Chem Lab Med* 2020; **58**: 2001–8.
- 215 Roche. Elecsys. Korrelation mit der Erkennung neutralisierender Antikörper. <https://a.storyblok.com/f/94122/x/353e67763a/1-bullet-infektion.pdf> (zuletzt abgerufen am 31. Mai 2021).
- 216 Tang MS, Case JB, Franks CE, *et al.* Association between SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies and Commercial Serological Assays. *Clin Chem* 2020; **66**: 1538–47.
- 217 WHO (World Health Organization). Target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.1.0. 2020. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-target-product-profiles-for-priority-diagnostics-to-support-response-to-the-covid-19-pandemic-v.0.1> (zuletzt abgerufen am 6. Juni 2021).
- 218 Klumpp-Thomas C, Kalish H, Drew M, *et al.* Standardization of ELISA protocols for serosurveys of the SARS-CoV-2 pandemic using clinical and at-home blood sampling. *Nat Commun* 2021; **12**: 1–13.
- 219 Li Z, Yi Y, Luo X, *et al.* Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol* 2020; **92**: 1518–24.
- 220 Severance EG, Bossis I, Dickerson FB, *et al.* Development of a nucleocapsid-based human coronavirus immunoassay and estimates of individuals exposed to coronavirus in a U.S. metropolitan population. *Clin Vaccine Immunol* 2008; **15**: 1805–10.
- 221 Theel ES, Slev P, Wheeler S, Couturier MR, Wong SJ, Kadkhoda K. The role of antibody testing for sars-cov-2: Is there one? *J Clin Microbiol* 2020; **58**: e00797-00720.
- 222 Lustig Y, Keler S, Kolodny R, *et al.* Potential antigenic cross-reactivity between SARS-CoV-2 and Dengue viruses. *Clin Infect Dis* 2020; online veröffentlicht am 14. August 2020. DOI:10.1093/cid/ciaa1207.
- 223 Ainsworth M, Andersson M, Auckland K, *et al.* Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. *Lancet Infect Dis* 2020; **20**: 1390–400.
- 224 Müller L, Ostermann PN, Walker A, *et al.* Sensitivity of anti-SARS-CoV-2 serological assays in a high-prevalence setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2021; **40**: 1063–71.
- 225 Brochot E, Demey B, Handala L, François C, Duverlie G, Castelain S. Comparison of different serological assays for SARS-CoV-2 in real life. *J Clin Virol* 2020; **130**: 104569.
- 226 Trabaud MA, Icard V, Milon MP, Bal A, Lina B, Escuret V. Comparison of eight commercial, high-throughput, automated or ELISA assays detecting SARS-CoV-2 IgG or total antibody. *J Clin Virol* 2020; **132**: 104613.

- 227 Mattiuzzo G, Bentley EM, Hassall M, Routley S. Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. WHO/BS/2020.2403. 2020. <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2403> (zuletzt abgerufen am 8. Juni 2021).
- 228 First WHO International Standard Anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin (Human). https://www.nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=20/136 (zuletzt abgerufen am 22. Juni 2021).
- 229 Schallier A, De Baets S, De Bruyne D, Dauwe K, Herpol M, Couck P. Assay dependence of long-term kinetics of SARS-CoV-2 antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2021; **100**: 115403.
- 230 Brinc D, Biondi MJ, Li D, *et al.* Evaluation of Dried Blood Spot Testing for SARS-CoV-2 Serology Using a Quantitative Commercial Assay. *Viruses* 2021; **13**: 962.
- 231 Elecsys Anti-SARS-CoV-2. Packungsbeilage 2020-11, V 3.0 Deutsch. Materialnummer 09203095190.
- 232 Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S. Packungsbeilage 2021-02, V 1.0 Deutsch. Materialnummer 09289267190.
- 233 Riestler E, Findeisen P, Hegel JK, *et al.* Performance evaluation of the Roche Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S immunoassay. *medRxiv* 2021; online veröffentlicht am 2. März 2021. DOI:10.1101/2021.03.02.21252203.
- 234 Lerner AM, Eisinger RW, Lowy DR, *et al.* The COVID-19 Serology Studies Workshop: Recommendations and Challenges. *Immunity* 2020; **53**: 1–5.
- 235 Chen X, Chen Z, Azman AS, *et al.* Serological evidence of human infection with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Heal* 2021; **9**: e598–609.
- 236 RKI (Robert Koch-Institut). CORONA-MONITORING lokal. https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Studien/cml-studie/cml-studie_node.html (zuletzt abgerufen am 14. Mai 2021).
- 237 Tuaille E, Kania D, Pisoni A, *et al.* Dried Blood Spot Tests for the Diagnosis and Therapeutic Monitoring of HIV and Viral Hepatitis B and C. *Front Microbiol* 2020; **11**: 373.
- 238 Bang I BJ. Der Blutzucker. <https://archive.org/details/derblutzucker00bang> (zuletzt abgerufen am 20. Mai 2021).
- 239 Hannon WH, Therrell BL. History, applications, and healthcare, Dried Blood Spots Appl. Tech. https://media.wiley.com/product_data/excerpt/95/11180546/1118054695-1.pdf (zuletzt abgerufen am 21. Mai 2021).
- 240 Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; **32**: 338–43.
- 241 Capiou S, Veenhof H, Koster RA, *et al.* Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot-Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *Ther Drug Monit* 2019; **41**: 409–30.

- 242 Mei J. Dried Blood Spot Sample Collection, Storage, and Transportation. In: Li W, Lee MS, eds. *Dried Blood Spots: Applications and Techniques*. Hoboken, New Jersey: Wiley Blackwell, 2014: 21–31.
- 243 Adam BW, Hall EM, Sternberg M, *et al.* The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clin Biochem* 2011; **44**: 1445–50.
- 244 Grüner N, Stambouli O, Ross RS. Dried blood spots - Preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *J Vis Exp* 2015; **2015**. DOI:10.3791/52619.
- 245 UPS (United Parcel Service). Shipping Guidelines for Dried-Blood Spot Specimens. https://pe.usps.com/text/pub52/pub52c3_024.htm?q=infectious&t=H (zuletzt abgerufen am 23. Mai 2021).
- 246 Londhe V, Rajadhyaksha M. Opportunities and obstacles for microsampling techniques in bioanalysis: Special focus on DBS and VAMS. *J Pharm Biomed Anal* 2020; **182**: 113102.
- 247 Gaugler S, Sottas PE, Blum K, Luginbühl M. Fully automated dried blood spot sample handling and extraction for serological testing of SARS-CoV-2 antibodies. *Drug Test Anal* 2021; **13**: 223–6.
- 248 Knoop A, Thevis M, Geyer H, Lerch O, Rubio A, Schrader Y. Detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies in dried blood spots utilizing manual or automated spot extraction and electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA). *Anal Sci Adv* 2021; : 1–7.
- 249 Parker SP, Cubitt WD. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *J Clin Pathol* 1999; **52**: 633.
- 250 Wilhelm AJ, den Burger JCG, Swart EL. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. *Clin. Pharmacokinet.* 2014; **53**: 961–73.
- 251 Timmerman P, White S, Globig S, Lüdtke S, Brunet L, Smeraglia J. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. *Bioanalysis* 2011; **3**: 1567–75.
- 252 Protti M, Mandrioli R, Mercolini L. Quantitative microsampling for bioanalytical applications related to the SARS-CoV-2 pandemic: Usefulness, benefits and pitfalls. *J Pharm Biomed Anal* 2020; **191**: 113597.
- 253 Beaudette P, Bateman KP. Discovery stage pharmacokinetics using dried blood spots. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2004; **809**: 153–8.
- 254 Edelbroek PM, Heijden J Van Der, Stolk LML. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: Methods, assays, and pitfalls. *Ther Drug Monit* 2009; **31**: 327–36.
- 255 Barfield M, Spooner N, Lad R, Parry S, Fowles S. Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2008; **870**: 32–7.
- 256 Thomas A, Geyer H, Schänzer W, *et al.* Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass

- spectrometer. *Anal Bioanal Chem* 2012; **403**: 1279–89.
- 257 McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography* 2007; **44**: 899–925.
- 258 Demirev PA. Dried blood spots: Analysis and applications. *Anal Chem* 2013; **85**: 779–89.
- 259 Yamamoto C, Nagashima S, Isomura M, *et al.* Evaluation of the efficiency of dried blood spot-based measurement of hepatitis B and hepatitis C virus seromarkers. *Sci Rep* 2020; **10**: 1–10.
- 260 Su X, Carlson BF, Wang X, *et al.* Dried blood spots: An evaluation of utility in the field. *J Infect Public Health* 2018; **11**: 373–6.
- 261 Brantsæter AB, Johannessen A, Holberg-Petersen M, *et al.* Cytomegalovirus viremia in dried blood spots is associated with an increased risk of death in HIV-infected patients: A cohort study from rural Tanzania. *Int J Infect Dis* 2012; **16**: e879–85.
- 262 Baidjoe A, Stone W, Ploemen I, *et al.* Combined DNA extraction and antibody elution from filter papers for the assessment of malaria transmission intensity in epidemiological studies. *Malar J* 2013; **12**: 1–9.
- 263 Amini F, Auma E, Hsia Y, *et al.* Reliability of dried blood spot (DBS) cards in antibody measurement: A systematic review. *PLoS One* 2021; **16**: e0248218.
- 264 Valentine-Graves M, Hall E, Guest JL, *et al.* At-home self-collection of saliva, oropharyngeal swabs and dried blood spots for sars-cov-2 diagnosis and serology: Postcollection acceptability of specimen collection process and patient confidence in specimens. *PLoS One* 2020; **15**: e0236775.
- 265 Guest JL, Sullivan PS, Valentine-Graves M, *et al.* Suitability and sufficiency of telehealth clinician-observed, participant-collected samples for SARS-CoV-2 testing: The iCollect cohort pilot study. *JMIR Public Heal Surveill* 2020; **6**: e19731.
- 266 Kalish H, Klumpp-Thomas C, Hunsberger S, *et al.* Undiagnosed SARS-CoV-2 seropositivity during the first 6 months of the COVID-19 pandemic in the United States. *Sci Transl Med* 2021; **13**: eabh3826.
- 267 Roxhed N, Bendes A, Dale M, *et al.* Multianalyte serology in home-sampled blood enables an unbiased assessment of the immune response against SARS-CoV-2. *Nat Commun* 2021; **12**: 1–9.
- 268 Liu F, Nguyen M, Vijayakumar P, *et al.* Newborn Dried Blood Spots for Serologic Surveys of COVID-19. *Pediatr Infect Dis J* 2020; **39**: 454–6.
- 269 Van De Merbel NC, De Vries R. Aging of biological matrices and its effect on bioanalytical method performance. *Bioanalysis* 2013; **5**: 2393–407.
- 270 Harahap Y, Diptasaadya R, Purwanto DJ. Volumetric absorptive microsampling as a sampling alternative in clinical trials and therapeutic drug monitoring during the covid-19 pandemic: A review. *Drug Des Devel Ther* 2020; **14**: 5757–71.

- 271 Karp DG, Danh K, Espinoza NF, Seftel D, Robinson P V., Tsai C ting. A serological assay to detect SARS-CoV-2 antibodies in at-home collected finger-prick dried blood spots. *Sci Rep* 2020; **10**: 20188.
- 272 Weisser H, Steinhagen K, Höcker R, Borchardt-Lohölter V, Anvari Ö, Kern PM. Evaluation of dried blood spots as alternative sampling material for serological detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies using established ELISAs. *Clin Chem Lab Med* 2021; **59**: 979–85.
- 273 Toh ZQ, Higgins RA, Anderson J, *et al.* The use of dried blood spots for the serological evaluation of SARS-CoV-2 antibodies. *J Public Heal* 2021; online veröffentlicht am 22. Februar 2021. DOI:10.1093/pubmed/fdab011.
- 274 Krishnamurthy HK, Jayaraman V, Krishna K, *et al.* Antibody profiling and prevalence in US patients during the SARS-CoV2 pandemic. *PLoS One* 2020; **15**: e0242655.
- 275 Zava TT, Zava DT. Validation of dried blood spot sample modifications to two commercially available COVID-19 IgG antibody immunoassays. *Bioanalysis* 2021; **13**: 13–28.
- 276 Mulchandani R, Brown B, Brooks T, *et al.* Use of dried blood spot samples for SARS-CoV-2 antibody detection using the Roche Elecsys ® high throughput immunoassay. *J Clin Virol* 2021; **136**: 104739.
- 277 De Vries R, Barfield M, Van De Merbel N, *et al.* The effect of hematocrit on bioanalysis of DBS: Results from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis* 2013; **5**: 2147–60.
- 278 Ren X, Paehler T, Zimmer M, Guo Z, Zane P, Emmons GT. Impact of various factors on radioactivity distribution in different DBS papers. *Bioanalysis* 2010; **2**: 1469–75.
- 279 Deprez S, Paniagua-González L, Velghe S, Stove CP. Evaluation of the Performance and Hematocrit Independence of the HemaPEN as a Volumetric Dried Blood Spot Collection Device. *Anal Chem* 2019; **91**: 14467–75.
- 280 Leuthold LA, Heudi O, Déglon J, *et al.* New microfluidic-based sampling procedure for overcoming the hematocrit problem associated with dried blood spot analysis. *Anal Chem* 2015; **87**: 2068–71.
- 281 Velghe S, Stove CP. Evaluation of the Capitainer-B Microfluidic Device as a New Hematocrit-Independent Alternative for Dried Blood Spot Collection. *Anal Chem* 2018; **90**: 12893–9.
- 282 Denniff P, Spooner N. Volumetric absorptive microsampling: A dried sample collection technique for quantitative bioanalysis. *Anal Chem* 2014; **86**: 8489–95.
- 283 hemaPEN - Trajan Scientific and Medical. <https://www.trajanscimed.com/pages/hemapen> (zuletzt abgerufen am 10. Juni 2021).
- 284 HemaXis DX | HemaXis Micro Blood Sampling. <https://hemaxis.com/products/hemaxis-dx/> (zuletzt abgerufen am 10. Juni 2021).
- 285 Neoteryx | Blood Collection Devices - Microsampling Bio-fluids. <https://www.neoteryx.com/> (zuletzt abgerufen am 10. Juni 2021).
- 286 Roche. Elecsys. Quantitativer Assay - abgeglichen am WHO Standard.

- <https://a.storyblok.com/f/94122/x/e45cd9d902/3-bullet-impfung.pdf> (zuletzt abgerufen am 31. Mai 2021).
- 287 Elecsys Anti-SARS-CoV-2. <https://www.roche.de/diagnostik-produkte/produktkatalog/tests-parameter/elecsys-anti-sars-cov-2/> (zuletzt abgerufen am 31. Mai 2021).
- 288 Elecsys Anti-SARS-CoV-2-S. <https://www.roche.de/diagnostik-produkte/produktkatalog/tests-parameter/elecsys-anti-sars-cov-2-s/> (zuletzt abgerufen am 31. Mai 2021).
- 289 Perkmann T, Perkmann-Nagele N, Breyer MK, *et al.* Side-by-Side Comparison of Three Fully Automated SARS-CoV-2 Antibody Assays with a Focus on Specificity. *Clin Chem* 2020; **66**: 1405–13.
- 290 Tang MS, Hock KG, Logsdon NM, *et al.* Clinical Performance of the Roche SARS-CoV-2 Serologic Assay. *Clin Chem* 2020; **66**: 1107–9.
- 291 Higgins V, Fabros A, Kulasingam V. Quantitative measurement of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies: Analytical and clinical evaluation. *J Clin Microbiol* 2021; **59**: e03149-2.
- 292 Roche Diagnostics GmbH. Elecsys Anti-SARS-CoV-2: Immunoassay for the qualitative detection of antibodies against SARS-CoV-2. <https://diagnostics.roche.com/content/dam/diagnostics/Blueprint/en/pdf/cps/Elecsys-Anti-SARS-CoV-2-factsheet.pdf> (zuletzt abgerufen am 14. Juni 2021).
- 293 Bundesministerium für Gesundheit. COVID-19 Impfdashboard. <https://impfdashboard.de/> (zuletzt abgerufen am 28. Juli 2021).
- 294 Kupke I, Kather B, Zeugner S. On the composition of capillary and venous blood serum. *Clin Chim Acta* 1981; **112**: 177–85.
- 295 Marchand A, Roulland I, Semence F, Ericsson M. Adaptation of Elecsys® anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 immunoassay to dried blood spots: proof of concept. *Bioanalysis* 2021; **13**: 165–71.
- 296 Fontaine E, Saez C. Analysis of SARS-CoV-2 antibodies from dried blood spot samples with the Roche Elecsys Immunochemistry method. *Pract Lab Med* 2021; **25**: e00234.
- 297 Garcia-Beltran WF, Miller TE, Kirkpatrick G, *et al.* Remote Fingerstick Blood Collection for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Antibody Testing. *Arch Pathol Lab Med* 2021; **145**: 415–8.
- 298 Bond MM, Richards-Kortum RR. Drop-to-Drop Variation in the Cellular Components of Fingerprick Blood Implications for Point-of-Care Diagnostic Development. *Am J Clin Pathol* 2015; **144**: 885–94.
- 299 Marchand A, Roulland I, Semence F, Audran M. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) technology for IGF-1 quantification by automated chemiluminescent immunoassay in dried blood. *Growth Horm IGF Res* 2020; **50**: 27–34.
- 300 RKI (Robert Koch-Institut). Epidemiologisches Bulletin 27/2021. www.rki.de/epidbull (zuletzt abgerufen am 6. August 2021).

- 301 RKI (Robert Koch-Institut). COVID-19 und Impfen: Antworten auf häufig gestellte Fragen (FAQ). <https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/COVID-Impfen/gesamt.html> (zuletzt abgerufen am 25. August 2021).
- 302 Mueller T. Antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) in individuals with and without COVID-19 vaccination: A method comparison of two different commercially available serological assays from the same manufacturer. *Clin Chim Acta* 2021; **518**: 9–16.
- 303 Greaney AJ, Loes AN, Gentles LE, *et al.* Antibodies elicited by mRNA-1273 vaccination bind more broadly to the receptor binding domain than do those from SARS-CoV-2 infection. *Sci Transl Med* 2021; **13**: eabi9915.
- 304 Suthar MS, Zimmerman MG, Kauffman RC, *et al.* Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. *Cell Reports Med* 2020; **1**: 100040.
- 305 Iankov I, Viker K, Turgeon C, Matern D, Galanis E. Parameters of immunoglobulin extraction from dried blood spot cards and immunoassays for detection of antibody response to pathogens including the novel SARS-CoV-2. *J Immunol Methods* 2021; **492**: 112996.
- 306 Favresse J, Eucher C, Elsen M, Tré-Hardy M, Dogné J-M, Douxfils J. Clinical Performance of the Elecsys Electrochemiluminescent Immunoassay for the Detection of SARS-CoV-2 Total Antibodies. *Clin Chem* 2020; **66**: 1104–6.
- 307 WHO (World Health Organization). COVID-19 vaccine tracker and landscape. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (zuletzt abgerufen am 6. August 2021).
- 308 Earle KA, Ambrosino DM, Fiore-Gartland A, *et al.* Evidence for antibody as a protective correlate for COVID-19 vaccines. *Vaccine* 2021; online veröffentlicht am 24. Mai 2021. DOI:10.1016/j.vaccine.2021.05.063.
- 309 Ramasamy MN, Minassian AM, Ewer KJ, *et al.* Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *Lancet* 2020; **396**: 1979–93.
- 310 Schmidt T, Klemis V, Schub D, *et al.* Immunogenicity and reactogenicity of heterologous ChAdOx1 nCoV-19/mRNA vaccination. *Nat Med* 2021 2021; online veröffentlicht am 26. Juli 2021. DOI:10.1038/s41591-021-01464-w.
- 311 Dunning A, DiazGranados C, Voloshen T, Hu B, Landolfi V, Talbot H. Correlates of Protection against Influenza in the Elderly: Results from an Influenza Vaccine Efficacy Trial. *Clin Vaccine Immunol* 2016; **23**: 228–35.
- 312 Yang HS, Costa V, Racine-Brzostek SE, *et al.* Association of Age With SARS-CoV-2 Antibody Response. *JAMA Netw Open* 2021; **4**: e214302–e214302.
- 313 Shrotri M, Krutikov M, Palmer T, *et al.* Vaccine effectiveness of the first dose of ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2 against SARS-CoV-2 infection in residents of long-term care

- facilities in England (VIVALDI): a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2021. DOI:10.1016/S1473-3099(21)00289-9.
- 314 Krammer F, Srivastava K, Team the P, Simon V. Robust spike antibody responses and increased reactivity in seropositive individuals after a single dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *medRxiv* 2021; online veröffentlicht am 1. Februar 2021. DOI:10.1101/2021.01.29.21250653.
- 315 FDA (Food and Drug Administration). Antibody Testing Is Not Currently Recommended to Assess Immunity After COVID-19 Vaccination: FDA Safety Communication. <https://www.fda.gov/medical-devices/safety-communications/antibody-testing-not-currently-recommended-assess-immunity-after-covid-19-vaccination-fda-safety> (zuletzt abgerufen am 26. Juli 2021).
- 316 Tang MS, Farnsworth CW. Associating SARS-CoV-2 Serological Assays with Protection: Where the Field Stands. *Clin Chem* 2021; **67**: 707–9.
- 317 Krammer F. A correlate of protection for SARS-CoV-2 vaccines is urgently needed. *Nat Med* 2021 277 2021; **27**: 1147–8.
- 318 Cohen J. Can immune responses alone reveal which COVID-19 vaccines work best? *Science* 2021; online veröffentlicht am 1. Juli 2021. DOI:10.1126/SCIENCE.ABK2437.
- 319 Weinstein MC, Freedberg KA, Hyle EP, Paltiel AD. Waiting for Certainty on Covid-19 Antibody Tests — At What Cost? *N Engl J Med* 2020; **383**: e37.
- 320 Iwasaki A, Yang Y. The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2020; **20**: 339–41.
- 321 Aziz NA, Corman VM, Echterhoff AKC, *et al.* Seroprevalence and correlates of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies from a population-based study in Bonn, Germany. *Nat Commun* 2021; **12**: 1–10.
- 322 Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, *et al.* Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* 2020; **586**: 589–93.
- 323 Burton DR, Topol EJ. Toward superhuman SARS-CoV-2 immunity? *Nat Med* 2021; **27**: 5–6.
- 324 Hartley GE, Edwards ESJ, Aui PM, *et al.* Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci Immunol* 2020; **5**: 8891.
- 325 Lucas C, Vogels CBF, Yildirim I, *et al.* Impact of circulating SARS-CoV-2 variants on mRNA vaccine-induced immunity in uninfected and previously infected individuals. *medRxiv* 2021; online veröffentlicht am 18. Juli 2021. DOI:10.1101/2021.07.14.21260307.
- 326 Uyoga S, Adetifa IMO, Karanja HK, *et al.* Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Kenyan blood donors. *Science* 2021; **371**: 79 LP – 82.
- 327 WHO (World Health Organization). Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for coronavirus 2019 (COVID-19) infection.

- <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-> (zuletzt abgerufen am 20. Juli 2021).
- 328 Meyerowitz-Katz G, Merone L. A systematic review and meta-analysis of published research data on COVID-19 infection fatality rates. *Int J Infect Dis* 2020; **101**: 138–48.
- 329 Chen C, Packer S, Turner C, *et al.* Using Genomic Concordance to Estimate COVID-19 Transmission Risk Across Different Community Settings in England 2020/21. *SSRN Electron J* 2021. DOI:10.2139/SSRN.3867682.
- 330 Mercer TR, Salit M. Testing at scale during the COVID-19 pandemic. *Nat Rev Genet* 2021; **22**: 415–26.
- 331 Pollán M, Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, *et al.* Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet* 2020; **396**: 535–44.
- 332 Ward H, Atchison C, Whitaker M, *et al.* SARS-CoV-2 antibody prevalence in England following the first peak of the pandemic. *Nat Commun* 2021; **12**: 905.
- 333 Ward H, Whitaker M, Tang SN, *et al.* Vaccine uptake and SARS-CoV-2 antibody prevalence among 207,337 adults during May 2021 in England: REACT-2 study. *medRxiv* 2021; online veröffentlicht am 18. Juli 2021. DOI:10.1101/2021.07.14.21260497.
- 334 Faculty of Medicine Imperial College London. Real-time Assessment of Community Transmission (REACT) Study. <https://www.imperial.ac.uk/medicine/research-and-impact/groups/react-study/> (zuletzt abgerufen am 20. Juli 2021).
- 335 Ward H, Cooke GS, Atchison C, *et al.* Prevalence of antibody positivity to SARS-CoV-2 following the first peak of infection in England: Serial cross-sectional studies of 365,000 adults. *Lancet Reg Heal – Eur* 2021; **4**: 100098.
- 336 RKI (Robert Koch-Institut). Coronavirus SARS-CoV-2 - Seroepidemiologische Studien in Deutschland. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/AK-Studien/AKS_Liste.html (zuletzt abgerufen am 20. Juli 2021).
- 337 Universität Mainz. Gutenberg COVID-19 Studie | Dashboard der Studie. <https://www.unimedizin-mainz.de/gcs/dashboard-der-studie.html> (zuletzt abgerufen am 20. Juli 2021).
- 338 Gornyk D, Harries M, Glöckner S, *et al.* SARS-CoV-2 seroprevalence in Germany - a population based sequential study in five regions. *medRxiv* 2021; online veröffentlicht am 13. Mai 2021. DOI:10.1101/2021.05.04.21256597.
- 339 Le Gouvernement du Grand-Duché de Luxembourg. Testing for COVID-19 antibodies on dry blood spot (DBS) using the code provided in the invitation received by post or email. <https://guichet.public.lu/en/citoyens/sante-social/coronavirus/rdv-large-scale-testing/depistage-dbs-covid-19.html> (zuletzt abgerufen am 15. Juli 2021).
- 340 COVID-19 Immunity Task Force. Study reveals children and youth had highest rates of SARS-CoV-2 infection in Canada before third wave.

- <https://www.covid19immunitytaskforce.ca/study-reveals-children-and-youth-had-highest-rates-of-sars-cov-2-infection-in-canada-before-third-wave/> (zuletzt abgerufen am 15. Juli 2021).
- 341 Shioda K, Lau MSY, Kraay ANM, *et al.* Estimating the Cumulative Incidence of SARS-CoV-2 Infection and the Infection Fatality Ratio in Light of Waning Antibodies. *Epidemiology* 2021; : 518–24.
- 342 Stadt Köln. Corona-Virus in Köln - Entwicklung der Fallzahlen. <https://www.stadt-koeln.de/artikel/69443/index.html> (zuletzt abgerufen am 4. Mai 2021).
- 343 Ng KW, Faulkner N, Cornish GH, *et al.* Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science* 2020; **370**: 1339–43.
- 344 Burgess S, Ponsford MJ, Gill D. Are we underestimating seroprevalence of SARS-CoV-2? *BMJ* 2020; **370**: m3364.
- 345 Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, *et al.* Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020; online veröffentlicht am 25. Juni 2020. DOI:10.1002/14651858.CD013652.
- 346 Bailey D, Konforte D, Barakauskas VE, *et al.* Canadian society of clinical chemists (CSCC) interim consensus guidance for testing and reporting of SARS-CoV-2 serology. *Clin Biochem* 2020; **86**: 1–7.
- 347 WHO (World Health Organization). 2018 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint . http://www.who.int/csr/research-and-development/documents/prioritizing_diseases_progress/en/ (zuletzt abgerufen am 17. Juli 2021).

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inhalt der DBS-Pakete	33
Abbildung 2: Funktionsprinzip des Elektrochemilumineszenz-Immunoassays (ECLIA).....	35
Abbildung 3: Korrelation von rDBS/ rMitra®- und Plasmawerten nach Infektion	40
Abbildung 4: Korrelation von DBS- und Plasma-/Serumwerten nach Impfung	42
Abbildung 5: Repräsentation venöser Antikörperkonzentrationen durch DBS	43
Abbildung 6: Korrelation zwischen Mitra®-Proben mit DBS- und Plasmaproben	44
Abbildung 7: Abweichung von linearem Verdünnungsverhalten insbesondere im niedrigen Messbereich	46
Abbildung 8: Füllungsverhalten der Mitra®-Spitzen in Abhängigkeit vom Applikationsmodus	47
Abbildung 9: Einfluss der Absorptionsdauer auf die ermittelte Antikörperkonzentration.....	48
Abbildung 10: Longitudinale Überwachung der Antikörperantwort in DBS von sechs Probanden mit zweifacher BNT162b2-Impfung.....	49
Abbildung 11: Longitudinale Überwachung der Antikörperantwort in DBS von sechs Probanden mit zweifacher mRNA-1273-Impfung	50
Abbildung 12: Longitudinale Überwachung der Antikörperantwort von Probanden mit zweifacher ChAdOx1 nCoV-19-Impfung in DBS (A) und Plasma (B)	51
Abbildung 13: Longitudinale Überwachung der Antikörperantwort in DBS von neun Probanden mit Erstimpfung ChAdOx1 nCoV-19 und Zweitimpfung BNT162b2 (AZ-BT) oder mRNA-1273 (AZ-Mod)	52
Abbildung 14: Werte der DBS-Proben von DSHS I und II, gemessen mit dem N-Assay	53

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörperwerte nach Infektion nahe der Grenzen des Messbereichs (0,4 und 250 U/mL)	39
Tabelle 2: Antikörperwerte nach Impfung nahe der Grenzen des Messbereichs (0,4 und 250 U/mL)	41
Tabelle 3: Verdünnungsverhalten einer Serumprobe bei Verdünnung mit vier verschiedenen Medien	45
Tabelle 4: Abhängigkeit der Gewichts Differenz und Antikörperkonzentration vom Applikationsmodus	47
Tabelle 5: Übersicht über DSHS I-Proben mit Spezialbefund	54
Tabelle 6: Übersicht über DSHS II-Proben mit Spezialbefund.....	54
Tabelle 7: Angaben zu wöchentlicher Anzahl und Ort der Studierendenkontakte.....	55

7.3 Zusatztabellen

Messwerte von Proben unterhalb der Nachweisgrenze werden von Roche und daher auch in dieser Arbeit mit 0,4 U/mL angegeben.

Zusatztable 1: DBS-Überwachung nach zweifacher Impfung mit BNT162b2 (BT) im Zeitverlauf. Dargestellt sind die absoluten Messwerte in zeitlicher Relation zu erstem und zweitem Impftermin. Alle Probanden entnahmen die Proben stets zum gleichen Zeitpunkt.

Tage nach Erstimpfung	Tage nach Zweitimpfung	BT-1	BT-2	BT-3	BT-4	BT-5	BT-6
2	-14	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
9	-12	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
16	-5	0,4	0,4	0,537	1,55	0,4	0,4
26	5	16,69	64,02	11,23	124,2	9,23	5,5
30	9	130,7	123,2	146	250	47,74	45,19
37	16	63,67	73,25	60,44	250	20,45	21,97
44	23	73,42	50,98	55,54	178,4	49,34	27,14
70	49	29,79	61,73	25,45	81,75	19,37	33,32
77	56	27,44	52,75	24,91	102,4	22,95	19,37

Zusatztable 2: DBS-Überwachung nach zweifacher Impfung mit mRNA-1273 (Mod) im Zeitverlauf. Dargestellt sind die absoluten Messwerte. Bei der selbständigen Probenentnahme kam es zu individuellen Abweichungen von den vorgegebenen Entnahmetermi­nen, weshalb die Messwerte in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zu erster und zweiter Impfung für jeden Probanden einzeln aufgeführt sind.

Mod-1			Mod-2			Mod-3			Mod-4			Mod-5			Mod-6		
Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert
1	-27	0,4	3	-33	0,4	4	-24	0,4	1	-29	0,4	2	-33	0,4	-1	-29	0,4
8	-20	0,4	10	-26	0,4	11	-17	0,553	8	-22	3,36	9	-26	0,4	7	-21	0,4
15	-13	50,92	17	-19	2,49	18	-10	15,69	15	-15	15,29	16	-19	2,73	13	-15	1,47
22	-6	138,9	24	-12	5,35	25	-3	24,22	22	-8	9,77	23	-12	3,94	21	-7	2,37
29	1	131,6	31	-5	5,62	32	4	40,09	29	-1	10,83	30	-5	7,1	28	0	3,52
36	8	250	38	2	52,17	39	11	250	36	6	250	37	2	13,56	36	8	173,2
43	15	250	45	9	250	46	18	250	43	13	250	44	9	250	42	14	166,9
50	22	250	52	16	250				50	20	250	51	16	250	49	21	222
57	29	250	59	23	250				57	27	250	58	23	250	56	28	192,9
															65	37	216
															75	47	250

Zusatztable 3: DBS-Überwachung nach zweifacher Impfung mit ChAdOx1 nCoV-19 (AZ) im Zeitverlauf. Dargestellt sind die absoluten Messwerte. Bei der selbständigen Probenentnahme kam es zu individuellen Abweichungen von den vorgegebenen Entnahmetermen, weshalb die Messwerte in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zu erster und zweiter Impfung für jeden Probanden einzeln aufgeführt sind. Probandin AZ-6 konnte nur bis sechs Wochen nach Erstimpfung verfolgt werden.

AZ-1			AZ-2			AZ-3			AZ-4			AZ-5			AZ-6		
Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert
6	-55	0,4	6	-78	0,4	6	-84	0,4							7	/	0,4
14	-47	0,4	14	-70	7,59	13	-77	0,4	15	-49	0,4	15	-49	0,4	14	/	0,4
21	-40	3,56	21	-63	8,95	19	-71	0,4	22	-42	0,989	22	-42	0,4	21	/	0,4
28	-33	27,77	28	-56	9,98	27	-63	1,48	29	-35	3,09	29	-35	1,18	28	/	0,478
35	-26	15,7	35	-49	7,05	34	-56	1,82	36	-28	2,46	36	-28	1,42	35	/	0,525
42	-19	17,12	42	-42	7,56	41	-49	2,09	43	-21	3,15	43	-21	2,19	42	/	1,2
48	-13	13,14				48	-42	2,43	51	-13	2,74	51	-13	2,76			
54	-7	16,13	55	-29	8,84	54	-36	2,54	56	-8	3,98	56	-8	3,69			
61	0	9,12	63	-21	6,69				64	0	2,93	64	0	3,14			
68	7	250	70	-14	6,26	69	-21	2	71	7	72,99	71	7	6,76			
75	14	250	77	-7	9,77				78	14	207,6	78	14	13,01			
			83	-1	6,87												
89	28	134,4	91	7	146	90	6	11,39	94	30	185	94	30	10,11			
			98	14	130,8	97	13	19,98									
			105	21	113,6	104	20	202,9									
110	49	101,2	112	28	121,7	111	27	250	113	49	250	117	53	12,52			

Zusatztable 5: DBS-Überwachung nach heterologer Impfung von ChAdOx1 nCoV-19 mit mRNA-1273 (AZ-Mod) im Zeitverlauf. Dargestellt sind die absoluten Messwerte. Bei der selbständigen Probenentnahme kam es zu individuellen Abweichungen von den vorgegebenen Entnahmetermi­nen, weshalb die Messwerte in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zu erster und zweiter Impfung für jeden Probanden einzeln aufgeführt sind.

AZ-Mod1			AZ-Mod2			AZ-Mod3		
Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert	Tage nach Erst-Impfung	Tage nach Zweit-Impfung	DBS-Wert
-1	-85	0,4	0	-84	0,4	0	-84	0,4
7	-77	0,4	6	-78	0,4	6	-78	0,4
14	-70	0,4	13	-71	0,4	13	-71	0,4
21	-63	0,4	21	-63	0,939	23	-61	0,599
28	-56	0,547	28	-56	3,84	29	-55	0,839
35	-49	2,4	35	-49	3,68	36	-48	1,2
44	-40	6,17	43	-41	5,05	44	-40	1,32
			50	-34	4,67	50	-34	2,17
56	-28	6,32	56	-28	5,26	57	-27	1,25
						64	-20	1,5
70	-14	8,81	70	-14	3,89	71	-13	1,98
						78	-6	1,01
84	0	9,98	84	0	3,55	84	0	1,96
91	7	250	91	7	250	92	8	250
99	15	250				99	15	250

Zusatztable 6: Antikörperwerte der DSHS-Beschäftigten in DBS nach Impfung, gemessen mit dem S-Assay. Ab drei Wochen nach Erstimpfung mit Impfstoff der Firma ChAdOx1 nCoV-19 (AZ) sind elf von zwölf Proben reaktiv. Die Probe nach Zweifachimpfung mit BNT162b2 (BT) hat einen deutlich höheren Wert.

ID		Datum Impfung	Datum Probe	Tage nach Erstimpfung	Messwert DBS [U/mL]
552	AZ 01	22.3.21	30.3.21	8	0,4
441	AZ 02	15.3.21	29.3.21	14	0,4
564	AZ 03	28.3.21	19.4.21	22	129,1
381	AZ 04	07.3.21	31.3.21	24	1,01
533	AZ 05	25.3.21	19.4.21	25	4,01
474	AZ 06	11.3.21	08.4.21	26	0,794
377	AZ 07	23.3.21	19.4.21	27	6,35
472	AZ 08	23.3.21	19.4.21	27	0,941
506	AZ 09	23.3.21	19.4.21	27	1,32
422	AZ 10	22.3.21	19.4.21	28	4,66
512	AZ 11	22.3.21	19.4.21	28	0,4
540	AZ 12	22.3.21	19.4.21	28	0,514
400	AZ 13	24.3.21	23.4.21	30	4,06
576	AZ 14	03.2.21	29.3.21	55	2,0
483	BT 01	02. und 23.2.21	29.3.21	55	17,83