

Aus der Klinik für
Innere Medizin I, Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie und klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Zelluläre und Humorale Immunantwort von Patienten mit COVID-19

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von: Igor Age Kos

geb. am 29.03.1993

in Curitiba, Brasilien

Abkürzungen

SARS	Severe acute respiratory syndrome
MERS	Middle East Respiratory Syndrom Coronavirus
CoV-1	Coronavirus type 1
CoV-2	Coronavirus type 2
RNA	Ribonukleinsäure
COVID	Coronavirus Disease
RBD	Rezeptor-bindende Domäne
HR1 und HR2	Heptad repeat regions 1 und 2
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
VOC	Variants of Concern
RKI	Robert Koch-Institut
WHO	World Health Organization
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
ZNS	Zentralnervensystem
IL	Interleukin
IFN	Interferon
MCP	Monocyte chemoattractant protein
IP-10	Interferon gamma inducible protein – 10
CRP	C-reaktives Protein
JAK	Janus kinase
MIP	Macrophage inflammatory protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Th1	Typ-1-Helfer-T-Zellen
CAR	Chimeric antigen receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
CXCL	Chemokine ligand
AngII	Angiotensin-II
AT 1R	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
NF-KB	Nuclear factor- κ B
STAT-3	Signal transducer and activator of transcription 3

DAMP	Damage-associated molecular pattern
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
Ig	Immunglobulin
IL-1R	Interleukin 1 Rezeptor
FcR	Fc-Rezeptor
NCU	Normal care unit
ICU	Intensive care unit
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
SSC	Side scatter (Seitliches Streulicht)
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
HLA	Human leukocyte antigen
USA	United states of America
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein
ADE	Antibody dependent enhancement
ANAs	Antinukleäre Antikörper
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	6
Summary	7
2. Einleitung	8
2.1 SARS-CoV-2: Virus Charakteristika	8
2.1.1 Klassifikation und Struktur.....	8
2.1.2. Infektionsmechanismen und viraler Zyklus	10
2.1.3. Übertragung, Inkubation und Ausscheidung.....	12
2.2 COVID-19	13
2.2.1. Epidemiologie.....	13
2.2.2. Klinische Manifestationen	15
2.2.3. COVID-19 assoziierte Komplikationen.....	16
2.2.4. Therapien von COVID-19.....	19
2.3 COVID-19 und das Immunsystem	25
2.3.1. Der Zytokinsturm	27
2.3.2 Die Rolle der Antikörper	28
2.4. Eigene Fragestellung	30
3. Material und Methodik	31
3.1. Studiendesign	31
3.2. Patienten und Kohorten	31
3.3. Material und Laborparameter	32
3.3.1. Material	32
3.3.2. Zeitlicher Verlauf.....	33
3.3.3. Einzelne Laborparameter.....	33
3.3.4. Durchflusszytometrie und Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS)	34
3.3.4.1. Geräte, Software und Antikörper	35
3.3.4.2. Gating-Strategien	36
3.4. Statistische Methoden	39
3.5. Ethikkommission	39
4. Ergebnisse	40
4.1. Beschreibung des Patientenkollektives	40
4.2. Vergleich zwischen Kohorten zum Aufnahmezeitpunkt	42
4.2.1. Immunstatus.....	42
4.2.2. Monozyten-Subpopulationen.....	43
4.2.4 Immunglobuline.....	44

4.3. Longitudinale Auswertung	45
5. Diskussion	51
6. Literaturverzeichnis	57
7. Publikationen und Danksagung	70
7.1 Publikationen	70
7.2 Danksagung	71
8. Lebenslauf	72

1. Zusammenfassung

Die von SARS-CoV-2 ausgelöste Erkrankung COVID-19 führte seit dem erstmaligen Auftreten in Wuhan 2019 zu einer anhaltenden Pandemie und bisher mehreren Millionen Toten. Frühzeitig gab es Hinweise auf schwere Dysregulationen des Immunsystems in Folge der Infektion. Die Pathogenese der durch SARS-CoV2 ausgelösten Komplikationen ist noch nicht vollständig geklärt. In dieser Arbeit berichten wir über die Analyse des zellulären Immunstatus, der Verhältnisse der Immunzell-Populationen zueinander, Monozyten Subpopulationen, Immunglobuline und klinische Charakteristika von Patienten mit COVID-19, die von April 2020 bis Juli 2020 auf einer Intensivstation (ICU) (N = 23) und einer Normalstation (NCU) (n = 10) behandelt wurden, im Vergleich zu zwei Kontrollgruppen: Diese bestanden ersten aus Patienten, die aus nicht-infektiösen Gründen auf der ICU behandelt wurden (n = 30) und zweiten aus Patienten, die wegen anderer Infektionen als COVID-19 auf der NCU behandelt wurden (n = 21). Patienten mit COVID-19 auf ICU wiesen im Vergleich zu den anderen Kohorten signifikante Unterschiede auf, darunter eine niedrigere Zahl an Lymphozyten, eine geringere Anzahl von CD8+ T-Zellen, einen geringeren Prozentsatz aktivierter und intermediärer Monozyten und ein erhöhtes B/T8-Zellverhältnis. Die verstorbenen Patienten mit COVID-19 auf der ICU wiesen eine geringere Anzahl von B-, T-, CD4+ T-, CD8+ T-Lymphozyten, NK-Zellen und aktivierten Monozyten auf. Das B/T8-Verhältnis zeigte sich in der Gruppe der Patienten, die COVID-19 überlebten signifikant erniedrigt. In Patienten mit COVID-19 auf ICU wurden signifikant höhere IgG1 und IgG3 Werte festgestellt, während Patienten mit COVID-19 auf NCU im Vergleich zu Patienten, die wegen anderen Infektionen als mit SARS-CoV2 auf einer NCU behandelt wurden, erhöhte Werte von IgG3 aufwies. Zusammenfassend neben vielen anderen Veränderungen des Immunsystems wurden ein erhöhtes B/T8-Zell-Verhältnis und eine geringere Anzahl aktivierter Monozyten vor allem bei Patienten mit schwerem COVID-19 beobachtet. Beide Parameter waren in Patienten mit COVID-19 auf ICU mit einem erhöhten Sterberisiko assoziiert.

Summary

Cellular and humoral immune response in patients with COVID-19

The disease caused by SARS-CoV-2 – COVID-19 – initiated a persistent pandemic since its first case in Wuhan in 2019, being responsible for millions of deaths. Already in the earlier phases of the pandemics there were signs of a severe immune dysregulation following the infection. The pathogenesis of complications caused by SARS-CoV2 has not been fully elucidated. In this work, we report of the analysis of cellular immune status, ratios of immune cell populations, monocyte subpopulations, immunoglobulins and clinical characteristics of patients with COVID-19 treated in an intensive care unit (ICU) (cohort 1, N = 23) and a normal care unit (NCU) (cohort 2, n = 10) compared with control groups: patients treated in the ICU for non-infectious reasons (cohort 3, n = 30) and patients treated in the NCU for infections other than COVID-19 (cohort 4, n = 21). Patients in cohort 1 had significant differences compared to the other cohorts, including lower lymphocyte counts, lower CD8+ T cell counts, lower percentages of activated and intermediate monocytes, and increased B/T8 cell ratios. The deceased patients in cohort 1 had lower numbers of B, T, CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, NK cells, and activated monocytes. The B/T8 ratio was found to be significantly decreased in the group of patients who survived COVID-19. Cohort 1 showed significantly higher IgG1 and IgG3 levels, while cohort 2 showed increased levels of IgG3 compared with patients treated for infections other than SARS-CoV2 in an NCU. Among many other immune system changes, an increased B/T8 cell ratio and a lower number of activated monocytes were observed in patients with severe COVID-19. Both parameters were associated with an increased risk of death in cohort 1.

2. Einleitung

2.1 SARS-CoV-2: Virus Charakteristika

2.1.1 Klassifikation und Struktur

Das „Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus Type 2“ (SARS-CoV2) ist ein neuartiges Beta-Coronavirus, das zu der Familie der humanen Coronaviren gehört und im Dezember 2019 in Wuhan als Auslöser der Erkrankung „Corona Virus Disease 2019“ (COVID-19) identifiziert wurde.¹ Coronaviren sind RNA-Viren mit ungewöhnlich langen Genomen. Ihr Name stammt von den Kronen-ähnlicher Strukturen auf ihrer Oberfläche ab.²

Sie gehören zu der Gruppe der *Nidovirales* Viren, die vier Familien umfasst: *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* und *Roniviridae*. Die *Coronaviridae* Familie kann weiter in zwei Unterfamilien klassifiziert werden: *Torovirinae* und *Coronavirinae*. Letztere wird in weitere vier Gattungen unterteilt: Alpha, Beta, Gamma und Delta.² Es gibt insgesamt sieben bekannte Coronaviren, die Menschen infizieren können. (Tabelle 1).³ Während 229E, NL63, OC43, HKU1 nur die oberen Atemwege infizieren und ein milderer Krankheitsbild verursachen, können sich SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS im unteren Atemweg vermehren und schwere Pneumonien mit akutem Lungenversagen (*Acute Respiratory Distress Syndrom*) verursachen.^{1,4,5}

Tabelle 1: Humanpathogene Coronaviren

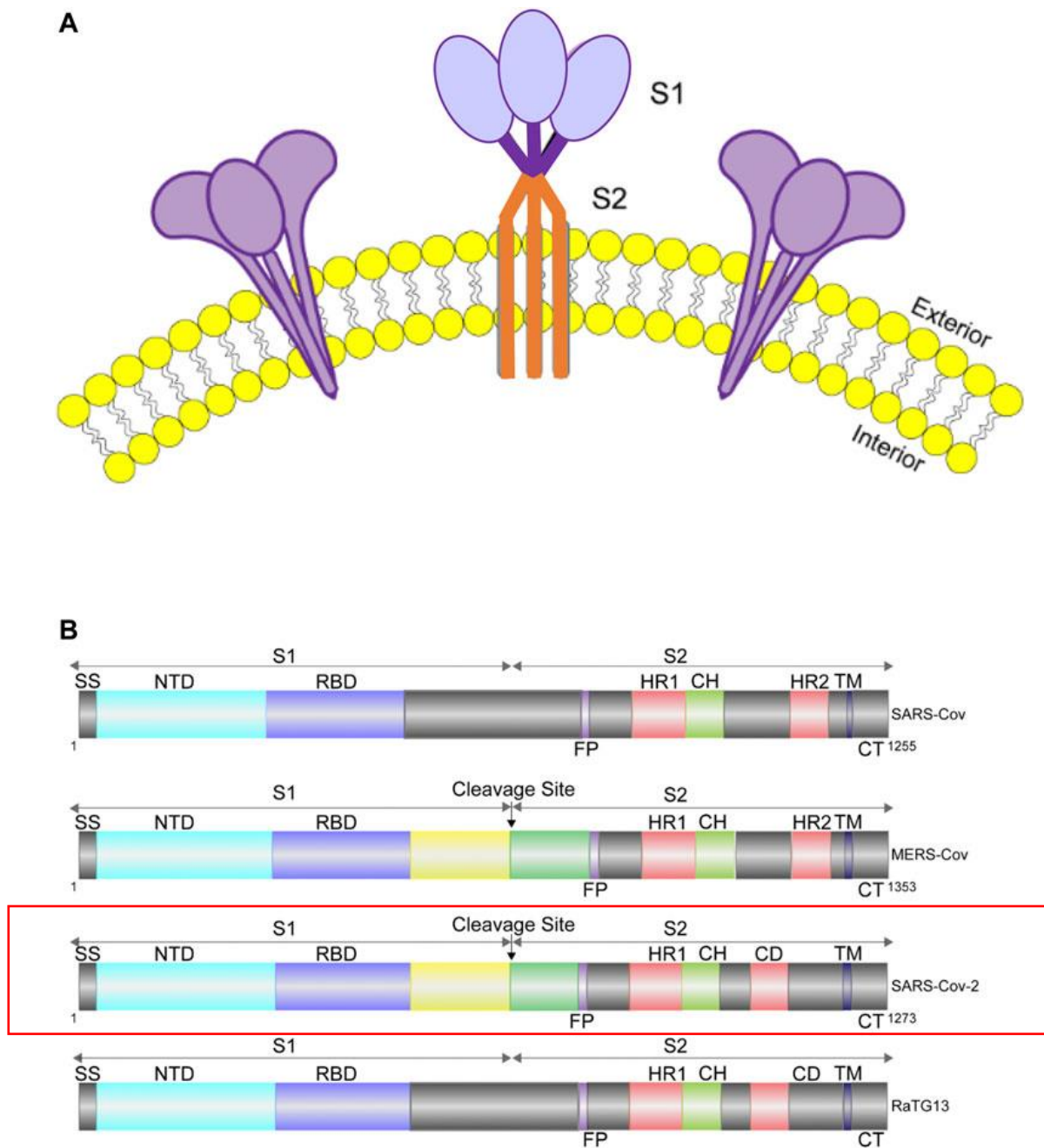
Virus	Gattung
229E	Alpha
NL63	Alpha
OC43	Beta
HKU1	Beta
Middle East Respiratory Syndrom Coronavirus (MERS)	Beta
SARS-CoV-1	Beta
SARS-CoV-2	Beta

SARS-CoV-1 CoV-und 2 enthalten vier strukturelle Hauptproteine: *Spike* (S), *Membrane* (M), *Envelope* (E) und *Nucleocapsid* (N). Die S-Proteine sind Trimere Proteine mit einem

Diameter von circa 150 *Ångström*⁶. Die zwei Untereinheiten (S1 und S2) des S-Proteins werden durch eine Fusion-vermittelte Spaltung gebildet.⁷ S1 besteht aus einer aminoterminalen Domäne und einer rezeptorbindenden Domäne (RBD). Die Untereinheit S2 besteht aus einem Fusionspeptid und zwei „heptad repeat regions“, HR1 und HR2⁶ (Abbildung 1). Obwohl das S Protein eine wichtige Rolle für den Infektionsmechanismus von SARS-CoV2 spielt, triggert die Erkennung des Proteins eine Immunantwort gegen das Virus. Interessanterweise kann das Virus die Präsentation des Spike-Proteins reduzieren, was einen wichtigen Evasionsmechanismus des Virus darstellt.⁸

SARS-CoV-2 ist ein RNA-Virus, das ein Genom von 29.903 Nukleotiden und 29 Proteinen besitzt.⁹ Mutationen können in jeder Region seines Genoms auftreten, allerdings bleiben viele ohne Auswirkung, da sie weder die primäre Aminosäuresequenz noch die Funktion der translatierten Proteine betreffen. Allerdings können manche Mutationen, oder Kombinationen von Mutationen einen Überlebensvorteil bedeuten. Diese viralen Subgruppen, deren Mutationen einen Überlebensvorteil mit sich bringen, haben das Potenzial sich schnell auszubreiten und verändern sowohl die Infektionsraten als auch das klinische Bild von COVID-19. Subgruppen von SARS-CoV-2 mit funktionellen Mutationen werden als Varianten bezeichnet. Seit Beginn der Pandemie wurden bereits verschiedene virale Varianten nachgewiesen wodurch sich das Bild der Pandemie graduell gewandelt hat.¹⁰ Diejenigen Varianten, die eine nachteilige Veränderung der COVID-19-Epidemiologie, eine Zunahme der Virulenz, eine Veränderung des klinischen Krankheitsbildes oder eine Verringerung der Wirksamkeit von Maßnahmen im Bereich der öffentlichen Gesundheits- und Sozialfürsorge oder von verfügbaren Diagnostika, Impfstoffen und Therapeutika bedeuten, werden als besorgniserregende SARS-CoV-2-Virusvarianten („*Variants of concern*“ VOC) bezeichnet.

Besonders relevant sind die Delta Variante (B.1.617.2), die neun Aminosäureänderungen (T19R, G142D, FR156-157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) im Spike-Protein akkumulierte¹¹ und eine erhöhte Mortalität und Morbidität verursachte¹² und die während des Schreibens dieser Arbeit dominante Omikron Variante, die im November 2021 in Afrika entdeckt wurde.^{13,14} Die Variation ihres Spike-Proteins wird durch 30 Mutationen bestimmt, von denen 15 in der RBD auftreten, sowie durch drei Deletionen und eine Insertion. Daten weisen darauf hin, dass die Mutationen der Omikron Variante eine erhöhte Übertragbarkeit bei jedoch verminderter Pathogenität bei Immunkompetenten bedingen.¹⁵

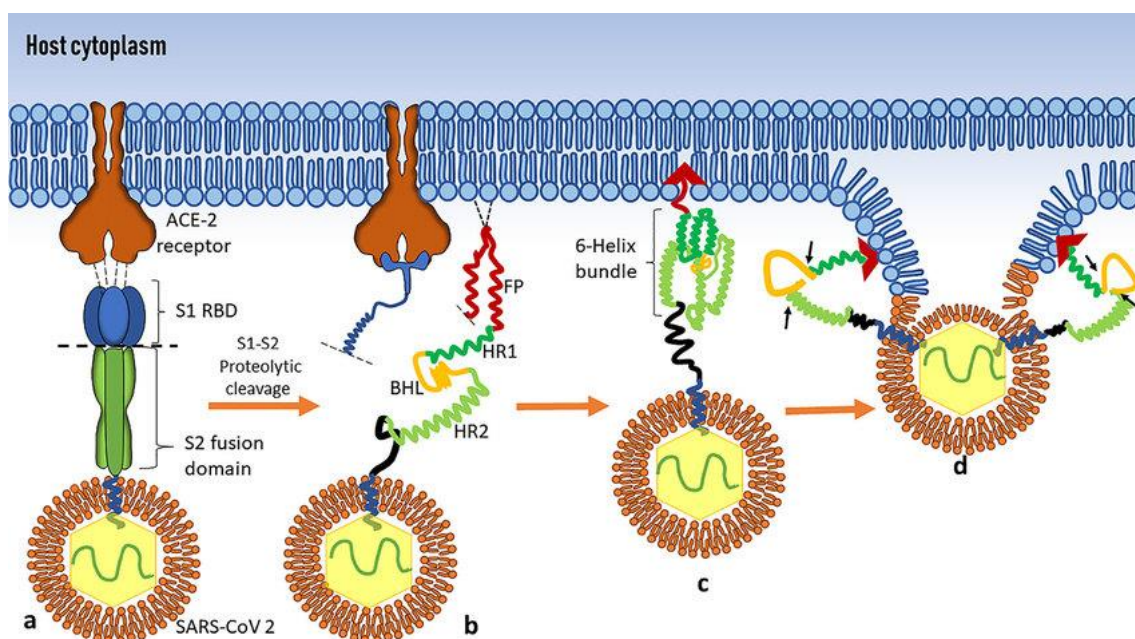


Quelle (A und B): Zhao et al 2021.¹⁶

Abbildung 1 A) zeigt eine graphische Repräsentation der Spike-Protein des SARS-CoV2. B) zeigt die Genkarte der Spike-Protein verschiedener Coronaviren.

2.1.2. Infektionsmechanismen und viraler Zyklus

SARS-CoV-2 infiziert hauptsächlich epitheliale Zellen der Atemwege und der Alveolen, Endothelzellen und Alveolarmakrophagen, die „angiotensin converting enzyme 2“ (ACE-2) und „transmembrane protease, serine 2“ (TMPRSS2) exprimieren, welche als Rezeptoren für den Zelleintritt des Virus dienen.^{17,18} Über S1-RBD bindet SARS-CoV-2 an ACE-2. Zellproteasen (insbesondere TMPRSS2) schneiden anschließend S1/S2, sodass sich das Fusionspeptid mit der Zielzellmembran verbinden kann. Durch weitere strukturelle Veränderungen in S2 verbinden sich HR1 und HR2, was zur Fusion des Virus mit der Zellmembran und Freisetzung des Virusmaterials in das Zytoplasma führt (Abbildung 2).¹⁹



Quelle: Shekhar et al 2020.²⁰

Abbildung 1 zeigt die Virale Infektion durch Interaktion der Spike-Protein (Bindung, Spaltung, Fusion mit Zellmembran und Eintritt in die Wirtszelle) mit dem ACE-2 Zellrezeptor

Im Gegensatz zu SARS-CoV, SARS-CoV2 besitzt eine zusätzliche Schnittstelle, was eine Prä-Aktivierung ermöglicht. Dies könnte die Infektion von Zellen mit niedriger TMPRSS2-Expression erleichtern und so zu der hohen Infektiosität des Virus beitragen.⁸ Alternativ kann der Zelleintritt des Virus über CD147 erfolgen.²¹ SARS-CoV-1 besitzt auch wie SARS-COV-2 ACE-2 als Rezeptor. MERS dagegen DPP4.²

Nach Zellinfektion nutzt das Virus den Transkriptions- und Translationsapparat der Zielzelle zur RNA-Replikation (über eine neu translatierte virale RNA-Polymerase) und

Proteinsynthese.²² Nach Zusammensetzung der viralen Proteine und RNA zu vollständigen Viruspartikeln werden diese durch Exozytose freigesetzt, um weitere Zellen zu infizieren.²³

2.1.3. Übertragung, Inkubation und Ausscheidung

Die Infektion mit SARS-CoV-2 geschieht hauptsächlich durch Kontakt der Schleimhäute, insbesondere der oberen Atemwege, mit infektiösen Tröpfchen, die das Virus enthalten.²⁴ Solche infektiösen Partikel entstehen beim Atmen, Husten, Sprechen, Singen und Niesen und unterteilen sich je nach Größe in größere Tröpfchen (5 - 10 µm Durchmesser), die schnell zu Boden fallen, und kleinere Partikel ($\leq 5 \mu\text{m}$), die Aerosole bilden und über längere Zeit in der Luft bleiben können. Als Aerosol können sich die Partikel über größere Distanzen verteilen.^{25,26}

Ähnlich zu anderen respiratorischen Viren kann SARS-CoV2 durch verschiedene Mechanismen übertragen werden: Direkter Kontakt, Tröpfchen- und Luftübertragung.²⁴ Die Kontaktübertragung entspricht einer Infektion, die durch direkten Kontakt mit einer infektiösen Person (z. B. Händedruck) oder mit kontaminierten Oberflächen stattfindet.²⁷ Studien zeigten, dass SARS-CoV-2 bis zu 72 Stunden auf Plastik und 48 Stunden auf Edelstahl ansteckungsfähig bleiben kann. Auf bestimmten glatten Oberflächen bleibt SARS-CoV-2 sogar bis zu 7 Tage stabil.^{27,28} Zudem kann das Virus mehrere Stunden im Stuhl und drei bis vier Tage im Urin ansteckungsfähig bleiben.²⁸ Obwohl das Virus über längere Zeit auf manchen Oberflächen lebensfähig bleiben kann, gibt es keine Studien, die diesen Übertragungsweg genau untersuchten. Da viele Personen, die Kontakt mit kontaminierten Oberflächen haben, oft auch Kontakt mit infektiösen Patienten hatten, ist es schwierig die Relevanz der Übertragung durch Kontakt zu kontaminierten Oberflächen zu beurteilen. Sie wird aber eher als von geringer Bedeutung eingeschätzt.^{29,30}

Die Infektion durch kontaminierte Tröpfchen geschieht vor allem bei engem Kontakt (bis zwei Meter) mit infizierten Personen, wenn infizierte Sekrete oder Tröpfchen den Mund, die Nase oder die Augen einer weiteren Person erreichen.³¹ Die zwei bisher beschriebenen Übertragungswege stellen die Hauptinfektionmechanismen für SARS-CoV2 dar. Das Virus kann jedoch unter bestimmten Umständen auch über Luft übertragen werden. Hierzu zählen u.a. der Aufenthalt in geschlossenen Räumen, prolongierte Exposition zu respiratorischen Partikeln und unzureichende Belüftung von Räumen.²⁵

Qun et al. beschrieben eine mittlere Inkubationszeit des Virus von 5,2 Tagen wobei die 95. Perzentile bei 12,5 Tagen lag.³² Der Zeitpunkt der höchsten Viruslast in den Atemwegen variiert und tritt zwischen dem Tag des Symptombeginns bis ca. 4 Tage danach auf.^{33,34} Allerdings ist das Virus in manchen Fällen bereits 4 Tage vor Symptombeginn nachweisbar,³³ was bedeutet, dass auch asymptomatische Personen das Virus übertragen können. SARS-CoV-2 kann noch mehrere Tage nach Symptombeginn durch nasopharyngeale Abstriche nachgewiesen werden, jedoch fällt die Viruslast linear nach Beginn der Beschwerden.^{35,36} Die Infektiosität scheint ca. 8 Tage nach Symptombeginn deutlich zu sinken und lebende Viren können zu diesem Zeitpunkt nicht mehr kultiviert werden. Dies kann sich deutlich bei immunsupprimierten Patienten unterscheiden³⁴ Darüber hinaus wurde SARS-CoV-2 auch in analen Abstrichen von COVID-19 Patienten nachgewiesen.³⁷⁻³⁹ In manchen Fällen auch noch nach negativen nasopharyngealen Abstrichen, was dafür spricht, dass eine fäkal-orale Übertragung des Virus möglich sein könnte. Allerdings prüften nur wenige Studien, ob die im analen Abstrich gefundenen Viren vermehrungsfähig waren, was eine wichtige Rolle für die Infektiosität spielt.⁴⁰ In Anbetracht der aktuellen Evidenz scheint eine Übertragung des Virus durch kontaminierten Stuhl möglich zu sein. Recht zuverlässig riesig auf die regionale Ausbreitung durch SARS-CoV-2 Nachweis in der Kanalisation bestimmen.⁴¹

2.2 COVID-19

2.2.1. Epidemiologie

Beginnend im Dezember 2019 wurden in Wuhan, China, mehrere Fälle einer „Pneumonie unbekannter Ursache“ identifiziert.³² Die ersten drei Patienten wurden am 27.12.2019 im Krankenhaus Jin Yin-tan aufgrund einer schweren Pneumonie stationär aufgenommen. Dank des Überwachungsmechanismus, der im Jahr 2003 auf dem Boden des SARS-Ausbruchs implementiert wurde, konnten die chinesischen Gesundheitsbehörden relativ schnell reagieren. Am 31.12.2019 versandte das Chinese Center für Disease Control ein Notfallteam zur weiteren Abklärung.⁴⁰ Innerhalb weniger Wochen hatte sich das Virus weltweit ausgebreitet. In Deutschland wurde der erste Fall einer Infektion am 27. Januar 2020 gemeldet.⁴² Mit Stand 24. Juni 2022, meldet das Robert Koch-Institut (RKI) 27.681.775 laborbestätigte SARS-CoV-2-Fälle und 140.650 Todesfälle in Deutschland.⁴³ Die nachfolgend berichteten Zahlen und Studien beziehen sich auf die epidemiologische Lage wie sie zum Abschluss der Studie Ende Juli 2020 vorlag. Zudem beziehen sich die folgenden klinischen und epidemiologischen Daten auf

die Alpha-Variante, die zum Zeitpunkt der Studie die dominierende Variante war. Diese Daten können in Abhängigkeit der Variante unterschiedlich sein.

Nicht alle mit SARS-CoV-2 infizierten Patienten erkranken unweigerlich. Die Rate asymptomatischer Infektionen liegt bei etwa 40 - 50%.⁴⁴ Diese Tatsache ist von besonderer Bedeutung, da auch asymptomatische Patienten ansteckend sein können, weshalb Hygienemaßnahmen wie z. B. die häusliche Quarantäne bei Personen, die engen Kontakt zu COVID-19 Patienten hatten, auch bei Abwesenheit von Beschwerden wichtig sind. Als Alternative kann das Infektionsgeschehen mit Hilfe der Rate der Patienten, die Symptome entwickeln, über den so genannten Manifestationsindex, abgeschätzt werden. Er wird in verschiedenen Übersichtsarbeiten auf 55 - 85% geschätzt.^{45,46}

Die Mehrheit der Patienten mit COVID-19 entwickeln nur ein mildes Krankheitsbild. Die Hospitalisierungsraten variieren deutlich in Abhängigkeit von Alter und von Virusvariante. Große Kohorten in China fanden Hospitalisierungsraten von 1,2 % für Patienten zwischen 20 - 29 Jahre und bis zu 18,4 % für Patienten, die über 80 Jahre alt sind.⁴⁷ In den USA lag zwischen Januar und May 2020 die generelle Hospitalisierungsrate für COVID-19 bei 14 %, die ICU-Hospitalisierung bei 2 % und die COVID-19 bedingten Todesfälle bei 5 %.⁴⁸ Die Notwendigkeit zur Hospitalisierung war hierbei sechsfach höher bei Patienten mit bekannten Begleiterkrankungen wie chronischer Niereninsuffizienz chronischer Lebererkrankung, chronischen Lungenerkrankungen, Immunsuppression, Autoimmunerkrankungen oder neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen. Die amerikanischen Daten basieren sich auf den Fällen mit ausreichenden Angaben zu den zu Grunde liegenden Gesundheitsbedingungen. Die etwas höheren Zahlen lassen sich am Ehesten durch eine Selektionsverzerrung in dieser Population erklären

Für manche Patienten kann COVID-19 jedoch tödlich verlaufen. Zur Objektivierung dieser Fälle werden verschiedene epidemiologische Konzepte benutzt wie der Fall-Verstorbenen-Anteil und die Letalität.⁴⁹ Der Fall-Verstorbenen-Anteil berichtet den kumulativen Anteil der verstorbenen Fälle in einer Population, der verstorben ist. Mit der Letalität wird der Anteil der an COVID-19 Erkrankten, der verstirbt angegeben. Der Fall-Verstorbenen-Anteil für COVID-19 unterscheidet sich je nach Virusvariante, Ausbruchsort und Alter der betroffenen Population.³ In Wuhan war der Fall-Verstorbenen-Anteil bei 5,8 % im Vergleich zu 0,7 % im Rest Chinas.⁵⁰ Eine Studie mit 72.314 Fällen aus China zeigte einen generellen Fall-Verstorbenen-Anteil von 2,3 %, mit 14.8 % bei Patienten über 80 Jahren und 8 % für Patienten von 70 und 79 Jahren.⁵¹ In

Italien lag der Fall-Verstorbenen-Anteil im März 2020 bei 7,2 %.⁵² Eine weitere, Modellbasierte Analyse mit Daten aus China fand einen Anteil von 1,3 % mit deutlich höheren Werten bei älteren Patienten.⁴⁷

Es gibt steigende Evidenz, dass auch das Geschlecht Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat.⁵³ Eine Metaanalyse von 85 veröffentlichten Arbeiten zeigte eine signifikante Assoziation zwischen männlichem Geschlecht und Mortalität (OR = 1,81) sowie eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen schweren Krankheitsverläufe (OR = 1,46).⁵⁴ Eine Analyse von 10.926 COVID-19 assoziierten Todesfällen im Vereinigten Königreich zeigte ein signifikant erhöhtes Sterberisiko für Männer im Vergleich zu Frauen (HZ = 1,59).⁵⁵

2.2.2. Klinische Manifestationen

Patienten mit manifestem COVID-19 können sich mit verschiedenen schweren Krankheitsverläufen präsentieren. Die Schweregrade der Erkrankung werden von der WHO in leicht, moderat und kritisch unterteilt. Die leichte Erkrankung entspricht einem Krankheitsbild ohne Pneumonie. Die moderate Erkrankung beschreibt eine Pneumonie ohne Symptome einer schweren Pneumonie. Bei Auftreten einer schweren Pneumonie mit Fieber, Atemfrequenz > 30/min, schwerer Luftnot oder peripherer Sauerstoffsättigung < 90 – 94 % unter Raumluft, wird die Krankheit als schwer klassifiziert. Eine kritische Erkrankung wird diagnostiziert, wenn zu den Symptomen des schweren COVID-19 ein akutes Lungenversagen (ARDS) oder eine Hyperinflammation hinzukommen.⁵⁶

Daten großer Kohorten beschreiben milde Symptome (mit oder ohne Pneumonie) in etwa 81 – 86 % der Fälle, einen schweren und kritischen Verlauf in ca. 14 % und 2 – 5 % der Fälle.^{48,50,51} Wie oben beschrieben sind Alter und Komorbiditäten wichtige Risikofaktoren für einen schweren Verlauf.⁵⁷

Die klassischen Symptome sind ähnlich denen anderer respiratorischer Viren und bestehen typischerweise aus Husten, Fieber, Myalgien, Kopfschmerzen, Dyspnoe, Halsschmerzen, Diarrhö, Übelkeit/Erbrechen, abdominelle Schmerzen und Störung des Geruchs- und/oder Geschmackssinns (Tabelle 2).^{48–51,58}

Tabelle 2 Vergleich der Häufigkeit von Symptomen in drei verschiedenen Ländern:

Symptom	Deutschland ⁴⁹	USA ⁴⁸	China ⁵⁰
Husten	40 %	50 %	67,7 %

Fieber	27 %	43 % ¹	87,9 %
Myalgie	*	36 %	14,8 %
Kopfschmerzen	*	34 %	13,6 %
Dyspnoe	*	29 %	18,6 %
Halsschmerzen	*	20 %	13,9 %
Diarrhoe	*	19 %	3,7 %
Übelkeit/Erbrechen	*	12 %	5 %
Störung des Geruchs- und/oder Geschmackssinns	21 %	10 %	*
Schnupfen	28 %	10 %	4,8 %
¹ Definiert als > 38°C; *Daten nicht verfügbar in der ausgewählten Publikation			

Ein sehr spezifisches Symptom von COVID-19 ist die Störung des Geruchs- und/oder Geschmackssinns. Eine Metaanalyse, die 10 verschiedene Studien einschloss, fand eine Prävalenz für Geschmacksstörungen von 43,93 % und Geruchsstörungen von 52,73 %.⁵⁰ Interessanterweise zeigten Kohorten verschiedener Länder sehr unterschiedliche Häufigkeiten dieser Beschwerden. Der Unterschied lässt sich wahrscheinlich aufgrund der zunehmenden Wahrnehmung und Erfassung dieser spezifischen Symptome erklären. In Brasilien wurde für Geruchs- und/oder Geschmacksstörung eine Prävalenz von 62,2 % beschrieben.⁵⁹ Die ersten Berichte aus China meldeten diese Symptome nicht.⁵⁰ Die genauen Pathomechanismen dieser Manifestationen sind noch nicht komplett verstanden, eine mögliche Erklärung wäre aber die Infektion und der Zelltod sustentakulärer Zellen durch SARS-CoV2.⁶⁰

2.2.3. COVID-19 assoziierte Komplikationen

Obwohl Patienten mit schweren COVID-19 Verläufen oft zu Beginn ein respiratorisches Versagen entwickeln, zeigen diese Patienten zusätzlich in vielen Fällen ein sehr komplexes Krankheitsbild mit Beeinträchtigung verschiedener Organsysteme. Zu den nicht respiratorischen COVID-19 Komplikationen gehören kardiovaskuläre, thromboembolische, neurologische, hepatische, renale sowie immunvermittelte Erkrankungen.

Kardiovaskuläre Komplikationen (außer thromboembolische Komplikationen)

Patienten mit COVID-19 können Arrhythmien, Kardiomyopathien, Myokarditiden und einen kardiogenen Schock entwickeln.⁶¹ Eine chinesische Kohorte wies eine Prävalenz für Myokardversagen von 7,2 % bei stationären Patienten und 22 % bei Patienten auf einer Intensivstation auf.⁶² Weitere Berichte zeigten, dass bis 12 % der Patienten ohne bekannte kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhte Troponinwerte aufwiesen oder sogar einen Kreislaustillstand im Rahmen des stationären Aufenthaltes erlitten.⁶³ Das Myokardversagen kann durch zwei mögliche Mechanismen erklärt werden: entweder durch eine direkte Myokardschädigung verursacht von SARS-CoV2 oder sekundär bedingt in Folge eines Zytokinsturms mit Überexpression von proinflammatorischen Substanzen wie z.B. Interleukin 6.⁶¹

Eine Studie aus Hubei in China berichtete, dass 7,3 % der Patienten mit COVID-19 Palpitationen als eines der ersten Symptome wahrnahmen.⁶⁴ Zudem beschrieben Wang et al. eine Prävalenz für Arrhythmien von 17 % der stationär behandelten Patienten und von 44% der Patienten auf einer Intensivstation.⁶² Das Auftreten von Arrhythmien bei diesen Patienten kann wahrscheinlich durch eine Kombination aus schwerem Krankheitsbild mit Hypoxie, Schock oder ausgeprägter Entzündung und Elektrolytstörungen sowie Medikamenten-bedingter QT-Verlängerung erklärt werden.

Thromboembolische Komplikationen

Von auffälligen Gerinnungsstörungen wurde bereits bei den ersten COVID-19-Patienten berichtet.⁶⁵ Initial war nicht klar, ob die Veränderungen im Gerinnungssystem bei diesen Patienten eine direkte Assoziation mit der Erkrankung zeigten. Bei zunehmender Evidenz für ein erhöhtes thromboembolisches Risiko wurde jedoch zügig der Begriff der *COVID-19-assoziierten Koagulopathie* genutzt, um die bei COVID-19 beobachteten Gerinnungsveränderungen zu beschreiben.

Frühe Berichte zeigten, dass 6% der Patienten eine verlängerte aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) aufweisen, bei 5% kann ein erhöhtes Prothrombin gemessen werden und 36% weisen erhöhte D-Dimer Werte auf.⁶⁵ Eine Studie mit 183 COVID-19 Patienten konnte berichten, dass 15 von 21 verstorbenen Patienten eine disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) gemäß den ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*) Kriterien entwickelt hatten. Dies konnte nur bei einem von 78 entlassenen Patienten beobachtet werden.⁶⁵

Eine amerikanische Studie mit 3.334 hospitalisierten Patienten beobachtete thromboembolische Ereignisse bei 16% der Patienten.⁶⁶ Hiervon waren 6,2% venöser

Genese (3,2% Lungenarterienembolie und 3,9% tiefe Venenthrombose, 0,9% beides) und 11,1% traten im arteriellen System auf (1,6% ischämischer Schlaganfall, 8,9 % Herzinfarkt und 1,0 % systemische Thromboembolien). Diese thromboembolischen Ereignisse waren als unabhängige Faktoren mit der Mortalität und dem Schweregrad von COVID-19 assoziiert. 29,4% der auf einer ICU behandelten Patienten erlitten thromboembolische Ereignisse gegenüber nur 11,5% der Patienten, die auf einer Normalstation therapiert wurden.⁶⁶

Thromboembolische Ereignisse wurde in verschiedenen Studien trotz prophylaktischer Antikoagulation beobachtet.⁶⁷

Die Störungen im Gerinnungssystem dieser Patienten sind wahrscheinlich multifaktoriell zu sein, allerdings scheint ein direkter Zusammenhang mit dem Virus-getriggerten entzündlichen Milieu, bestehend aus Hyperinflammation und endothelialer Schädigung, zu bestehen.⁶⁷ Über eine Aktivierung des Komplementsystems und die Ausschüttung von Zytokinen mit Endothel-aktivierender Wirkung kann die Inflammation eine Gerinnungsaktivierung bewirken. Patienten mit schwerem COVID-19-Verlauf haben erhöhte D-Dimer Werte und bei an COVID-19 verstorbenen Patienten konnten höhere D-Dimer Werte und ein Verbrauch von Gerinnungsfaktoren festgestellt werden im Vergleich zu überlebenden Patienten.⁶⁸ Die Dysfunktion des Endothels scheint auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese der COVID-19-assoziierten Gerinnungsstörungen zu spielen. Varga et al. fanden *post mortem* virale Inklusionen im Endothel begleitet von einer Endothelitis in drei verschiedenen Patienten.⁶⁹ Hierzu passend scheint ACE2 nicht nur in den Atemwegen, sondern auch von Endothelzellen exprimiert zu werden, was den Zelleintritt von SARS-CoV2 ermöglichen könnte.

Sonstige Komplikationen

Neurologische Symptome und Komplikationen wurden mit unterschiedlicher Prävalenz in verschiedenen Populationen beobachtet.⁷⁰ Eine spanische Registeranalyse fand neurologische Symptome in 483 von 841 Patienten (57,4 %),⁷¹ während eine amerikanische Analyse hospitalisierter Patienten eine Prävalenz von 7,7 % (50 von 650 Patienten) berichtet.⁷² Die beschriebenen neurologischen Komplikationen umfassen unter anderen die Enzephalopathie, ischämische und hämorrhagische Schlaganfälle, motorische und sensible Störungen, Ataxie und Krampfanfälle.⁷³ Die Enzephalopathie ist eine der häufigsten Komplikationen und betrifft ca. ein Drittel der Patienten mit neurologischen Komplikationen. Sie konnte mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität assoziiert werden.⁷³ Eine weitere neurologische Komplikation von COVID-19, die akute

inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie, wurde bisher nur sehr selten beschrieben.^{71,72,74} In wenigen COVID-19 Fällen mit neurologischen Symptomen konnte SARS-CoV2 im Liquor nachgewiesen werden.^{75,76} Die Infektion des Zentralnervensystems (ZNS) kann zum einen hämatogen erfolgen aber auch über eine neuronale Dissemination. Obwohl die ZNS-Infektion durch SARS-CoV2 nicht ausführlich untersucht wurde, sind diese Infektionswege für andere humane Coronaviren bereits belegt.⁷⁰

Eine Studie mit 5.449 hospitalisierten Patienten mit schwerem COVID-19 in New York zeigte, dass 1.993 (36,6%) der Patienten ein akutes Nierenversagen entwickelten. 14,3% dieser Patienten benötigten im weiteren Krankheitsverlauf eine Hämodialyse. Die Notwendigkeit zur Durchführung einer Dialyse war mit schwerer Erkrankung und respiratorischem Versagen assoziiert.⁷⁷ Eine Kohorte mit 333 Patienten zeigte, dass Patienten mit Nierenbeteiligung eine erhöhte Gesamtmortalität aufwiesen.⁷⁸ In einer Studie, in der Autopsien von 27 Patienten durchgeführt wurden, die an COVID-19 starben, konnte SARS-CoV-2 in den Nieren von 16 Patienten nachgewiesen werden.⁷⁹

Entzündliche und immunvermittelte Komplikationen werden in einem separaten Abschnitt diskutiert (Kapitel 2.3. COVID-19 und das Immunsystem).

2.2.4. Therapien von COVID-19

Aufgrund der verschiedenen Komplikationen, die multiple Organsysteme betreffen können, ist das Management von COVID-19 multidisziplinär. Generelle Maßnahmen wie z.B. Thromboseprophylaxe und Antikoagulation bei stattgehabter Thrombose sowie die Unterstützung der Atemwege und Behandlung sekundärer Infektionen sind in diesem Setting besonders wichtig. Allerdings konnte zunehmende Evidenz ab Mitte 2020 bezüglich spezifischer anti-viraler Therapien, die einen positiven Einfluss auf die COVID-19 assoziierte Mortalität und Morbidität zeigten, generiert werden.

2.2.4.1 Nicht spezifische Therapien

2.2.4.1.1 Steroide

Daten randomisierter Studien, die COVID-19 Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf einschlossen, legen nahe, dass eine Therapie mit Kortikosteroiden die Prognose dieser Patienten verbessern kann. Eine große Studie der „*RECOVERY Collaborative Group*“ untersuchte den Einsatz von Dexamethason (oral oder intravenös) bei stationären Patienten mit COVID-19. Es konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Dexamethason zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität führte. Dies gilt sowohl für

Patienten unter maschineller Beatmung (OR 0.64; [95% CI, 0.51 - 0.81]) als auch für Patienten, die eine nicht invasive Sauerstofftherapie (OR 0.82; [95% CI, 0.72 - 0.94]) benötigten. Eine Metanalyse mit 1.703 COVID-19 Patienten zeigte eine Reduktion der 28-Tage Mortalität unter Steroidtherapie im Vergleich zu Placebo oder anderen Standardmaßnahmen mit einer Odds Ratio von 0.66 (95% CI 0.53 - 0.82) ohne Zunahme unerwünschter Ereignisse.⁸⁰ Eingeschlossene Studien untersuchten folgende Präparate und Dosierungen:

- Dexamethason hoch dosiert (20 mg pro Tag)
- Dexamethason niedrig dosiert (6mg pro Tag)
- Hydrocortison 200 mg pro Tag oder 50 mg alle 6 Stunden
- Methylprednisolon 40 mg alle 12 Stunden

2.2.4.1.2 Interleukin-6 Blockade

COVID-19 Patienten mit schweren Verläufen entwickeln oft eine überschießende Immunantwort mit Ausschüttung pro-inflammatorischer Substanzen wie Interleukin-6 (IL-6), Interferon- γ (IFN- γ), MCP1 und IP-10.⁸¹ Da Interleukin-6 eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Entzündungsprozessen spielt, haben verschiedene Studien die Interleukin-6-Blockade bei Patienten mit schwerem COVID-19-Verlauf untersucht.⁸² Bereits früh getestet wurden die monoklonalen Antikörper Tocilizumab und Sarilumab, die gegen den IL-6 Rezeptor gerichtet sind, sowie der monoklonale Antikörper Siltuximab, der gegen IL-6 gerichtet ist. Für Tocilizumab konnten in einer Metaanalyse unter diesen drei Antikörpern die meisten Daten und damit die beste Evidenz für Wirksamkeit gewonnen werden.⁸³ Im Vergleich zu Placebo oder Standardtherapie wird in dieser Analyse für Tocilizumab eine Reduktion der Gesamtmortalität an Tag 28 mit einem relativen Risiko von 0,89 (95% CI 0,82 – 0,97) angegeben.⁸³ Eine der größten veröffentlichten Studien, die RECOVERY Studie, schloss insgesamt 4.116 Patienten ein. 2.022 dieser Patienten wurden in den Tocilizumab-Therapiearm randomisiert.⁸⁴ Alle eingeschlossenen Patienten wiesen eine Hypoxie auf und hatten laborchemische Zeichen einer systemischen Entzündung (CRP \geq 75 mg/L). Sie erhielten eine Standardtherapie mit oder ohne Tocilizumab.⁸⁴ Patienten, die Tocilizumab erhielten, zeigten eine Reduktion der 28-Tage Mortalität von 35 % auf 31 % mit einem relativen Risiko im Vergleich zur Standardtherapie von 0,85 (95% CI 0,76-0,94; p=0,0028). Auch führte die Hinzunahme zu weniger maschineller Beatmung und früherer Entlassung.

2.2.4.1.3 Baricitinib

Baricitinib ist ein oraler Janus Kinase (JAK) Inhibitor und derzeit zugelassen in der Therapie der rheumatoiden Arthritis.⁸⁵ Die *in vitro* Aktivität von Baricitinib zeigt eine besondere Selektivität für JAK 1 und 2.⁸⁶ Baricitinib wurde durch künstliche Intelligenz Algorithmen als mögliche Therapie für schwer verlaufende COVID-19-Erkrankung identifiziert.⁸⁷ Eine Studie im Tiermodell zeigte eine Hemmung der Produktion von Zytokinen und Chemokinen durch Alveolarmakrophagen, was die Rekrutierung von Neutrophilen hemmt.⁸⁸ Eine große randomisierte, doppelt verblindete Studie (ACTT-2) evaluierte die Kombinationstherapie Baricitinib plus Remdesivir im Vergleich zu Remdesivir als Monotherapie bei stationären Patienten mit COVID-19.⁸⁹ Von den 1.033 eingeschlossenen Patienten wurden 515 mit der Kombinationstherapie behandelt. Die Patienten unter Kombinationstherapie zeigten eine schnellere klinische Verbesserung (mediane Zeit: 7 Tage vs. 8 Tage; Hazard Ratio für Verbesserung, 1,16; 95% CI, 1,01 – 1,32; p = 0,03). Der deutlichste Effekt wurde bei Patienten, die eine nicht-invasive Beatmung oder „*high-flow*“ Sauerstofftherapie benötigten, beobachtet. Diese Patienten erholten sich unter der Kombinationstherapie deutlich schneller als unter Monotherapie (10 Tage vs. 18 Tage; Hazard Ratio für Verbesserung 1,51; 95% CI, 1,10 – 2,08). Die 28-Tage Mortalität war ebenfalls niedriger unter der Kombinationstherapie (5,1% gegen 7,8%, Hazard Ratio für Tod, 0,65; 95% CI, 0,39 – 1,09). Unerwünschte Ereignisse traten seltener auf bei Patienten, die mit beiden Medikamenten behandelt wurden.⁸⁹ Baricitinib wurde auch als Monotherapie untersucht. Eine noch nicht voll publizierte internationale, randomisierte und doppelt verblindete Studie untersuchte die Sicherheit und Wirksamkeit einer Baricitinib-Monotherapie.⁹⁰ Die 28-Tage Gesamtmortalität lag unter Baricitinib bei 8,1 % und unter Placebo bei 13,1 %, was einer Reduktion der Mortalität um 38,2 % entspricht (Hazard Ratio [HR] 0,57, 95% CI 0,41-0,78; nominal p = 0,002).

2.2.4.1.4 Rekonvaleszenten-Plasma

Rekonvaleszenten-Plasma ist ein therapeutisches Verfahren, bei dem antikörperreiches Plasma von Menschen, die sich von einer bestimmten infektiösen Krankheit erholt haben, als Medikament verwendet wird. In der Vergangenheit haben verschiedene Studien die Wirksamkeit und Sicherheit dieser Therapie bei Patienten mit respiratorischen Infektionen untersucht. Eine im Jahr 2015 veröffentlichter Metanalyse von 32 Studien schloss Patienten mit SARS-CoV1- und Influenza-Infektionen ein und zeigte im Vergleich zu Placebo eine statistisch signifikante Reduktion der gepoolten Mortalitätswahrscheinlichkeit nach Behandlung (Odds Ratio, 0,25; 95% CI 0,14 – 0,45).⁹¹ Ein Benefit dieser Therapie bei COVID-19 Patienten ist allerdings noch nicht ausreichend gesichert. Die CAPSID Studie, die 105 Patienten mit COVID-19 einschloss,

fand keinen statistischen relevanten Verbesserung des Outcomes zwischen Patienten mit oder ohne Therapie mit Rekonvaleszenten-Plasma.⁹² In einer Metaanalyse von 4 randomisierten klinischen Studien (1060 Patienten) und 6 anderen randomisierten Studien (10722 Patienten) wurde die Therapie mit Rekonvaleszenten-Plasma mit Placebo oder Standardtherapie verglichen.⁹³ Unter den peer-reviewed RCTs betrug die Hazard Ratio 1,17 (95% CI, 0,07 bis 20,34) für die Dauer des Krankenhausaufenthalts und die zusammengefasste RR 0,76 (95% CI, 0,20 bis 2,87) für den Einsatz von maschineller Beatmung (die absolute Risikodifferenz für den Einsatz von maschineller Beatmung betrug -2,56 % [95% CI, -13,16 % bis 8,05 %]). Die Therapie mit Rekonvaleszenten-Plasma zeigte keine eindeutige Überlegenheit, allerdings könnten manche Patientengruppen, wie z. B. immunsupprimierte Patienten, dennoch von dieser Therapie profitieren.

2.2.4.1.5 Anakinra

Im Einklang mit anderen Therapien, die auf die Kontrolle der durch SARS-CoV-2 verursachten Hyperinflammation abzielen, wurde Anakinra, ein rekombinanter IL-1-Rezeptor-Antagonist, als logischer Kandidat ausgewählt.⁹⁴ In einer Metaanalyse wurden die Daten von 9 Studien mit 895 Patienten zusammengefasst.⁹⁵ Patienten, die Anakinra erhielten, wiesen eine signifikant niedrigere Sterblichkeit auf (38 [11 %] von 342) im Vergleich zu Patienten, die eine Standardbehandlung oder Placebo erhielten (137 [25 %] von 553; Odds Ratio [OR] 0-32 [95 % CI 0-20-0-51]), nachdem die bekannten Faktoren, die die Sterblichkeit beeinflussen, berücksichtigt wurden. Der Überlebensvorteil wurde beobachtet, wenn das Medikament ohne Dexamethason verabreicht wurde (OR 0-23 [95 % CI 0-12-0-43]), aber nicht bei gleichzeitiger Verabreichung von Dexamethason (0-72 [95 % CI 0-37-1-41]). Darüber hinaus wurde in der Gruppe, die Anakinra erhielt, kein höheres Risiko für Sekundärinfektionen beobachtet (OR 1-35 [95 % CI 0-59-3-10]).⁹⁵ Die EMA gewährte im Dezember 2021 eine Erweiterung der Indikation für Erwachsene mit COVID-19 bei denen das Risiko einer schweren Ateminsuffizienz besteht, was anhand des Blutspiegels eines Proteins namens suPAR (soluble urokinase plasminogen activator receptor) festgestellt wird.⁹⁶

2.2.4.2 Antivirale Therapien

2.2.4.2.1 Remdesivir

Remdesivir (GS-5734), ist ein Inhibitor der viralen RNA-Polymerase mit *in vitro* hemmender Aktivität gegen SARS-CoV-1 und MERS.⁹⁷ Präklinische Studien haben auch gegen SARS-CoV-2 eine *in vitro*-Aktivität nachgewiesen.⁹⁸ Aufgrund dessen wurde

Remdesivir in einer großen randomisierten, doppelt verblindeten Studie (ACTT-1) weiter untersucht.⁹⁷ Insgesamt 1.062 Patienten mit COVID-19 und pulmonaler Beteiligung wurden in die Studie eingeschlossen. 541 Patienten wurden in den Remdesivir-Arm randomisiert und bekamen Remdesivir über ein Maximum von 10 Tagen, während 521 Patienten in den Placebo-Arm randomisiert wurden. Die mediane Genesungszeit der mit Remdesivir behandelten Patienten lag bei 10 Tagen, gegenüber 15 Tagen bei den mit Placebo behandelten Patienten (Hazard Ratio für Genesung, 1,29; 95% CI, 1,12 bis 1,49; P < 0.001). Die Sterblichkeit geschätzt durch Kaplan-Meier Kurven betrug 6,7 % mit Remdesivir und 11,9 % mit Placebo bis Tag 15 und 11,4 % und 15,2 % bis Tag 29 (Hazard Ratio 0,73; 95% CI, 0,52 bis 1,03).⁹⁷ In einem Zwischenbericht der multinationalen SOLIDARITY-Studie, die Remdesivir bei stationären Patienten mit COVID-19 untersuchte, zeigte sich keinen Unterschied in der 28-Tage-Gesamtmortalität zwischen den 2750 in den Remdesivir-Arm randomisierten Patienten und den 2.708 Patienten unter Standardtherapie (RR 0,95, 95% CI 0,81 - 1,11).⁹¹

2.2.4.2.2 Molnupiravir

Molnupiravir ist ein Nukleosidanalogen, das die Replikation von SARS-CoV-2 hemmt. Nach verschiedenen Phase 1 und 2 Studien⁹⁹⁻¹⁰¹ wurde dessen Wirksamkeit in einer randomisierten, doppelt verblindeten und Placebo kontrollierten Phase 3 Studie (MOVE-OUT) getestet. Die Studie randomisierte 1.433 Patienten mit leichter oder moderater Erkrankung und mindestens einem Risikofaktor für die Entwicklung eines schweren Verlaufes (Alter > 60 Jahre; aktive Krebserkrankung; chronische Niereninsuffizienz, chronische obstruktive Lungenerkrankung, Adipositas, schwere Herzerkrankung, oder Diabetes mellitus) entweder in den Placebo- oder den Molnupiravir-Arm. Zwischen Nachweis der Infektion und Beginn der Symptome durften nicht mehr als 5 Tage liegen. Patienten im Molnupiravir-Arm zeigten eine statistisch signifikante Reduktion des Risikos für Hospitalisierung oder Tod (6,8 % [48 von 709] vs. 9,7 % [68 von 699]). Der Prozentsatz der Teilnehmer mit mindestens einem unerwünschten Ereignis war in beiden Gruppen vergleichbar (30,40 % in der Molnupiravir-Gruppe und 33,0 % in der Placebo-Gruppe).

2.2.4.2.3 Nirmatrelvir/Ritonavir

Nirmatrelvir (PF-07321332) ist ein oral verabreichtes antivirales Mittel, das über CYP3A4 metabolisiert wird, auf die SARS-CoV-2-Hauptprotease (main protease, Mpro) abzielt und diese hemmt.¹⁰² Ritonavir hemmt als sogenannter Booster den CYP3A-vermittelten Metabolismus von Nirmatrelvir und sorgt so für eine höhere Plasmakonzentration.¹⁰² Die randomisierte, doppelt verblindete und Placebo kontrollierte Phase 2-3 Studie EPIC-HR

untersuchte die Wirksamkeit und Sicherheit von Nirmatrelvir (500 mg) kombiniert mit Ritonavir (100 mg) bei ambulanten Patienten mit COVID-19 und erhöhtem Risiko eines schweren Verlaufes.¹⁰³ Insgesamt 2.246 Patienten wurden eingeschlossen und randomisiert in Nirmatrelvir/Ritonavir- vs. Placebo-Arm. Die Inzidenz von COVID-19 bedingten Krankenhausaufenthalten oder Todesfällen bis zu Tag 28 nach Infektion war in der Nirmatrelvir-Gruppe um 6,32 Prozentpunkte niedriger als in der Placebo-Gruppe ($p < 0,001$; relative Risikoreduktion von 89,1%). Die Rate unerwünschter Ereignisse lag bei 22,6 % unter Nirmatrelvir plus Ritonavir und bei 23,9 % unter Placebo. Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse traten in 1,6 % (Nirmatrelvir/Ritonavir) und 6,6 % (Placebo) auf. Nirmatrelvir/Ritonavir scheint daher sehr effektiv in der Prävention eines schweren COVID-19-Verlaufs und auch gut verträglich zu sein. Aufgrund der CYP3A4-Metabolisierung vor allem wegen des Einsatzes von Ritonavir als Booster wird es empfohlen, mögliche Arzneimittelinteraktionen genau zu überprüfen.¹⁰⁴

2.2.4.3 Monoklonale Antikörper

Die aktuell zugelassenen monoklonalen Antikörper gegen COVID-19 haben als Ziel das Spike-Protein von SARS-CoV-2. Da die verschiedenen Antikörper unterschiedliche Aminosäuresequenzen haben und an unterschiedliche Epitopen binden, sind auch die Affinität, neutralisierende Wirkung und die Wirksamkeit der verschiedenen Produkte gegenüber den COVID-19 Varianten variabel. Zugelassen sind in Deutschland zurzeit drei monoklonale Antikörper: Casirivimab/Imdevimab, Sotrovimab und Tixagevimab/Cilgavimab.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Während der erste nur eine geringe Wirksamkeit gegenüber der Omikron-Variante zeigt, scheint Sotrovimab gegen die Omikron-Varianten BA.1/BA1.1 aber nicht gegen BA.2 zu wirken.^{108,109} Tixagevimab/Imdevimab hat eine etwas reduzierte Wirksamkeit gegenüber der Omikron-Variante, die allerdings nicht vollständig aufgehoben ist.¹¹⁰ Ein breiteres Wirksamkeitsspektrum hat Bebtelovimab, das gegen alle zirkulierenden Omicron-Subvarianten (einschließlich BA.2) neutralisierende Wirkung besitzt. Bebtelovimab wurde in den Vereinigten Staaten für nicht hospitalisierte Patienten mit leichter bis mittelschwerer COVID-19-Erkrankung zugelassen, bei denen das Risiko des Fortschreitens der Krankheit hin zu einer schweren Erkrankung besteht.¹¹¹

Sowohl Casirivimab/Imdevimab als auch Tixagevimab/Cilgavimab sind für die Präexpositionsprophylaxe zugelassen.^{106,107} Diese kann insbesondere bei Patienten erwogen werden, die eine unzureichende Immunantwort nach Impfung entwickelten, wie z.B. nach Therapie mit B-Zell depletierenden Antikörpern wie Rituximab.¹⁰⁴ Tixagevimab/Cilgavimab scheint insbesondere interessant in dieser Indikation zu sein,

auch aufgrund seiner relativ langen Halbwertszeit und geprüften Wirksamkeit von bis zu 6 Monaten.¹¹² Sotrovimab ist aktuell nur zur Behandlung von COVID-19 bei Patienten mit erhöhtem Risiko eines schweren Verlaufs zugelassen.¹⁰⁵

Alle drei Antikörper zeigten in randomisierten Phase 3 Studien eine Reduktion der Raten schwerer Verläufe bei Patienten mit erhöhtem Risiko.¹¹²⁻¹¹⁴

2.3 COVID-19 und das Immunsystem

Die Sterblichkeitsrate von COVID-19 wird für die zu dem Zeitpunkt der Studie (1. Jahreshälfte 2020) dominierende Alpha Variante auf etwa 1 - 2 % geschätzt.¹¹⁵ Bei etwa 10 % der Patienten kann es zu einem schweren Verlauf kommen, was häufig zu der Entwicklung eines schweren ARDS führt.⁴⁷ Zusätzlich hat sich gezeigt, dass andere Symptome wie kardiovaskuläre Manifestationen, Gerinnungsstörungen (z. B. thromboembolische Ereignisse wie Lungenembolie oder Schlaganfall), Krampfanfälle und Leberversagen bei schweren Verläufen eine wichtige Rolle spielen und sowohl die Mortalität als auch die Komplexität der Behandlung erhöhen.^{67,116}

Obwohl das Virus die Atemwege direkt angreift, kann die durch die Infektion ausgelöste Immunreaktion, auch Wirtsantwort genannt, weitere Erklärungsansätze für die Entwicklung einer schweren Erkrankung mit multiplen Organ-Manifestationen liefern.^{81,117}

SARS-CoV-2 infiziert Zellen, die die Oberflächenrezeptoren ACE2 und TMPRSS2 exprimieren.^{17,18} Die virale Replikation in infizierten Zellen verursacht den Zelltod, was zur Aktivierung von Alveolarepithelzellen und Alveolarmakrophagen mit lokaler Entzündungsreaktion führt. Die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen aus diesen Zellen wie IL-6, IFN- γ , MCP1 und IP-10^{58,118} stimuliert eine TH1-Antwort mit Migration von T-Lymphozyten und Monozyten zum Ort der Infektion. Während diese Immunreaktion bei der Mehrheit der Personen für die Virus Elimination verantwortlich ist, zeigen viele Patienten mit schwerer Erkrankung eine abnorme Immunzellaktivierung mit Überexpression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-2, IL-7, IL-10, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), IP-10, MCP1, Makrophagen-Entzündungsprotein 1 α (MIP1 α) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), was zum sogenannten Zytokin-Freisetzungssyndrom führen kann.^{58,117-119} Dieses entzündliche Milieu kann, analog zu einer Sepsis, Organschäden bis hin zu einem Multiorganversagen verursachen.

Die Interaktion zwischen SARS-CoV-2 und dem Immunsystem wurde bereits durch Veränderungen der Zusammensetzung von Leukozyten Subpopulationen im Verlauf der Infektion charakterisiert. Diese Veränderungen scheinen bei Patienten mit schwerer Erkrankung ausgeprägter zu sein. Das Verständnis dieser Veränderungen könnte helfen, Risikofaktoren mit prognostischem Wert sowie neue Optionen für therapeutische Interventionen zu identifizieren.¹¹⁷

Als Beispiel für die Veränderung in der Zusammensetzung der Immunzellen wurde die Lymphopenie beschrieben, die einen prognostischen Wert bei Patienten mit COVID-19 hat,^{58,120,121} da sie bei schwerem Krankheitsverlauf stärker ausgeprägt zu sein scheint.¹²²⁻¹²⁴ Bemerkenswert ist, dass insbesondere die T-Zellen bei Patienten mit schwerer Erkrankung vermindert sind.¹¹⁹ CD8+ und CD4+ T-Zellen sind bei Patienten mit kompliziertem Verlauf deutlich reduziert, was auch als unabhängiger Risikofaktor für eine schlechte Prognose identifiziert werden konnte.^{119,125-127} Darüber hinaus scheint die SARS-CoV-2-Infektion eine Differenzierung von CD4+ T-Lymphozyten zu Typ-1 T-Helfer Zellen (Th1) mit hoher Expression von GM-CSF und IFN- γ zu induzieren. Dieses Zytokin-Milieu, insbesondere GM-CSF, ist auch an der Differenzierung von intermediären Monozyten (CD14+, CD16+) beteiligt, deren Vorhandensein die Entstehung von Gewebeschäden beschleunigen könnte.^{128,129} Die Rolle der intermediären Monozyten und nicht-klassischen Monozyten (CD14-, CD16+) in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematodes und rheumatoider Arthritis wurde bereits beschrieben, insbesondere in Hinblick auf die Zellrekrutierung in Gewebe und die anschließende Gewebeschädigung.¹³⁰ Der Einfluss der monozytären Aktivierung bei viralen Infektionen, insbesondere bei COVID-19, ist hingegen noch nicht geklärt.

Die meisten Forschungsarbeiten, die sich mit COVID-19 befassen, beschreiben die mit SARS-CoV-2 assoziierte Immunreaktion sehr ausführlich, es gibt allerdings nur wenige Studien, die die Immunreaktion bei COVID-19-Patienten mit der von gesunden Probanden und Kontrollpatienten, die an anderen Infektionen und Krankheiten als COVID-19 leiden, vergleichen. Daher bleibt ungeklärt, ob die bisher beschriebene Immundysregulation spezifisch für COVID-19-Patienten ist, oder ob sie nur Ausdruck der schweren Entzündung im Allgemeinen ist und auch bei anderen schweren Krankheitszuständen und Infektionen auftreten kann.

Darüber hinaus ist die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese insbesondere der schweren Erkrankung bisher weniger gut charakterisiert worden. Studien haben gezeigt, dass die Plasmaspiegel spezifischer zirkulierender Antikörper bei Patienten mit schwerer

Erkrankung höher zu sein scheinen.¹³¹ Es wird spekuliert, dass die Antikörper-abhängige Verstärkung der Immunantwort mit einem ungünstigen Infektionsverlauf assoziiert sein könnte.¹³² In unserer Arbeitsgruppe konnten wir zudem bei Patienten mit kritischem COVID-19 neutralisierende Antikörper gegen Progranulin und IL-1-RA nachweisen.^{133,134} Progranulin ist ein Rezeptorantagonist von TNFR1, R2 und DR3.¹³³

2.3.1. Der Zytokinsturm

Es gibt keine allgemein anerkannte und einheitliche Definition des Zytokinsturms oder des Syndroms der Zytokinfreisetzung.¹³⁵ Zytokinsturm ist ein Sammelbegriff für verschiedene Störungen der Immunregulation, die durch konstitutionelle Symptome, systemische Entzündung und Funktionsstörungen multipler Organe gekennzeichnet sind, die bei unzureichender Behandlung zu einem Multiorganversagen führen können.¹³⁵ Verschiedene Erkrankungen und Therapien können einen Zytokinsturm auslösen, wie zum Beispiel die Therapie mit *Chimeric Antigen Receptor* (CAR) T-Zellen oder Patienten die an einer Hämophagozytischen Lymphohistiozytose (HLH) oder einem Makrophagenaktivierungssyndrom leiden.^{136,137} Circa 75 % der Patienten mit schwerem COVID-19-Verlauf entwickeln einen erhöhten IL-6-Spiegel.¹¹⁸ Diese Patienten zeigen oft erhöhte Spiegel verschiedener Zytokine zu denen IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, TNF, CXCL10, MCP1, MIP1 α und Interleukin-6 zählen, was auch mit deren Gesamtüberleben zu korrelieren scheint.^{58,138} Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das SARS-CoV-2-Spike-Glykoprotein ein hochaffines Motiv zur Bindung von TCRs aufweist und einen ternären Komplex mit MHCII bilden kann.¹³⁹ Dies kann zu einer unspezifischen Aktivierung von T-Zellen als Superantigen führen, ähnlich wie bei dem bakteriellen Superantigen Staphylokokken-Enterotoxin B.¹³⁹ Daten aus dem TCR-Repertoire erwachsener COVID-19-Patienten zeigen dazu, dass diejenigen mit schwerer hyperinflammatorischer Erkrankung eine TCR-Verschiebung aufweisen, die mit einer Superantigen-Aktivierung vereinbar ist.¹³⁹

Die genaue Pathogenese wie COVID-19 zu einem Zytokinsturm führt ist noch nicht ausführlich verstanden, es scheinen aber sowohl Virus-spezifische als auf Wirtsspezifische Faktoren eine Rolle zu spielen.

Wie oben beschrieben, erfolgt der virale Infektionsmechanismus über ACE2 und TMPRSS2, was zu der gesteigerten Immunaktivierung beitragen könnte.¹⁴⁰ ACE2 wird zusammen mit SARS-CoV-2 internalisiert, was zu einer Verringerung von ACE2 auf der Zelloberfläche und einem Anstieg von AngII im Serum führt.¹⁴¹ AngII kann durch AT 1R

die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Mediatoren, wie NF- κ B und ADAM17, triggern, deren intrazelluläre Signalkaskade STAT-3 aktivieren kann. NF-KB und STAT-3 können letzten Endes die Wirkung von IL-6 verstärken, was zu verschiedenen Immunphänomenen führen kann.^{140,142}

Nichtsdestotrotz kommt es nur bei einem Teil der COVID-19 Patienten zu einer überschießenden Immunantwort, was vermuten lässt, dass auch Wirts-abhängige Faktoren im Prozess der Hyperinflammation involviert sind. Arbeiten haben gezeigt, dass angeborene Störungen der Typ-I-Interferon-Immunität und Autoantikörper gegen Typ-I-Interferone hierbei eine Rolle spielen können.^{143–145} Andere Autoren schlagen vor, dass „*neutrophil extracellular traps*“ zu einer exazerbierten Immunreaktion mit Zytokinsturm und thromboembolischen Ereignissen beitragen könnten.¹⁴⁶

2.3.2 Die Rolle der Antikörper

Die überschießende Inflammation ist eines der wichtigsten Charakteristika von Patienten mit schwerem COVID-19. Allerdings werden viele weitere klinische Manifestationen von COVID-19 nur durch die erhöhte Freisetzung von Zytokinen nicht ausreichend erklärt, wie beispielweise die häufigen thromboembolischen Ereignisse, Vaskulitiden, Arthritiden und die Myokarditis.¹⁴⁷ Es wird daher vermutet, dass Autoantikörper eine wichtige Rolle bei Patienten mit schwerem COVID-19 oder mit ungewöhnlichen Autoimmunmanifestationen spielen.^{148–150} Antinukleäre Antikörper (ANAs) wurden bei Patienten mit schwerem COVID-19 mit einer Frequenz von 30 – 50 % beobachtet.^{149,151,152} Antiphospholipid Antikörper, die normalerweise bei Patienten mit Antiphospholipid Syndrom gefunden werden, werden auch bei Patienten mit COVID-19 vermehrt produziert. Shanea K. et al. berichteten über eine Häufigkeit der Antiphospholipid Antikörper von 52 %. Höhere Titer dieser Antikörper wurden mit neutrophiler Hyperaktivität, schwereren Atemwegserkrankungen und einer niedrigeren glomerulären Filtrationsrate in Verbindung gebracht.¹⁵³ Durch eine umfangliche Charakterisierung der B-Lymphozyten-Populationen von Patienten mit schwerem COVID-19 konnten Woodruff et al. zeigen, dass eine hohe Zahl von extrafollikulär aktivierten B-Lymphozyten ohne Marker für naive- (IgD) und Gedächtnis B-Zellen (CD27) stark mit hohen Konzentrationen an SARS-CoV-2-neutralisierenden Antikörpern und schlechtem Gesamtüberleben assoziiert ist.¹⁵⁴ Dieses B-Lymphozyten Muster ist sehr ähnlich dem, das bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematodes beobachtet werden kann.¹⁵⁴

Auch weitere Autoantikörper scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von schwerem COVID-19 zu spielen. Bei erwachsenen Patienten mit schwerem COVID-19 berichteten Thurner et al. von Autoantikörper gegen den Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra) in 14 von 30 (46,7 %) Patienten.¹³³ Zudem fanden sich in 36,7 % der Patienten anti-Progranulin Antikörper.¹³³ IL-1Ra ist der physiologische Inhibitor von IL-1 α und IL-1 β , weshalb seine Inhibition durch Autoantikörper zu einer gesteigerten Inflammation führen kann.¹⁵⁵ Progranulin hat neben anderen biologischen Funktionen eine anti-inflammatorische Wirkung durch Bindung der TNF-Rezeptoren 1 und 2 und Antagonisierung von TNF α .¹⁵⁶ Pfeifer et al. fanden Autoantikörper gegen Interleukin-1 Rezeptor Antagonist in 62 % der Kinder mit multisystemischem Entzündungssyndrom nach SARS-CoV2 Infektion, aber nicht in Kindern mit anderen Autoimmunerkrankungen.¹³⁴ Wie oben beschrieben, können Autoantikörper gegen Typ-I-Interferone auch eine Rolle spielen. Bastard et. al konnten neutralisierende IgG Autoantikörper gegen verschiedene Interferone in 101 von 987 Patienten mit lebensbedrohlichem COVID-19 finden.¹⁴³ Diese Autoantikörper wiederum schwächen die antivirale Antwort ab.

Bei COVID-19 konnte beobachtet werden, dass frühe und hohe Antikörperreaktionen mit einer erhöhten Krankheitsschwere korrelierten.¹⁵⁷ Die Antikörper-abhängige Verstärkung der Immunantwort hat zwei Hauptmechanismen:

1. Virus-spezifische Antikörper fördern die Aufnahme des Virus in Monozyten/Makrophagen und Granulozyten des Wirtes über Fc γ -Rezeptoren
2. Über die Fc-Domänen der Virus-spezifischen Antikörper kommt es zu einer gesteigerten Komplementaktivierung.¹⁵⁸

2.4. Eigene Fragestellung

Obwohl in kürzester Zeit viele Forschungsbemühungen in das Verständnis der Immunpathologie von COVID-19 investiert wurden, bleiben viele Unklarheiten bezüglich der Rollen der Immunzellen in der Entstehung eines schweren Verlaufs von COVID-19 offen. Das Konzept des Zytokinsturms und die Mediation durch CD4+ T-Zellen ist zwar gut etabliert, allerdings erklärt es nicht ausreichend die erweiterten klinischen Manifestationen wie thromboembolische Ereignisse.

Aufgrund des fundamentalen Stellenwerts von Immunzellen bei COVID-19 in mehrfache Hinsicht und ihrer prognostischen Bedeutung, zielte unsere Studie darauf ab, die Veränderungen der Lymphozyten- und Monozytenpopulationen im Zeitverlauf bei europäischen hospitalisierten Patienten in der ersten Welle mit schwerer und leichter COVID-19 Erkrankung weiter zu charakterisieren. Zudem erfolgte eine quantitative Analyse der Immunglobuline und IgG Subklassen.

Um weiter zu klären, ob diese Veränderungen spezifisch für COVID-19 sind, verglichen wir die Daten der COVID-19-Patienten mit Patienten, die auf der Normalstation (NCU) und Intensivstation (ICU) aus anderen Gründen als COVID-19 behandelt wurden.

3. Material und Methodik

3.1. Studiendesign

Bei dieser Studie handelt es sich um eine prospektive Kohortenstudie mit 4 Patientenkohorten, die von März 2020 bis Juli 2020 im Universitätsklinikum des Saarlandes stationär behandelt wurden. Die Patienten wurden bis zum Tod oder zur Entlassung aus dem Krankenhaus oder bis Ende Juli 2020 nachbeobachtet. Ein Patient befand sich zum Zeitpunkt der endgültigen Zensierung noch im Krankenhaus und wurde in der Subgruppenanalyse als Überlebender gezählt.

3.2. Patienten und Kohorten

Die Kohorten 1 und 2 setzen sich aus hospitalisierten Patienten mit bestätigter SARS-CoV-2-Infektion zusammen. Der Nachweis erfolgte durch Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) aus Nasopharyngealabstrichen. Patienten aus Kohorte 1 wurden auf einer internistischen Intensivstation des Universitätsklinikums des Saarlandes (UKS) während des Studienzeitraums aufgrund COVID-19 behandelt (ICU COVID+) und Patienten in Kohorte 2 wurden auf einer internistischen Normalstation des UKS aufgrund COVID-19 behandelt (NCU COVID+).

Kohorte 3 (ICU COVID-) umfasste hospitalisierte Patienten, die von April 2020 bis Juli 2020 auf einer internistischen Intensivstation des UKS behandelt wurden, ohne an COVID-19 erkrankt zu sein (bestätigt durch negative Ergebnisse in der SARS-CoV-2-spezifischen RT-PCR). Für den Studieneinschluss in Kohorte 3 waren bis auf die Negativität für SARS-CoV-2 und die Behandlung auf einer Intensivstation keine weiteren Einschlusskriterien vorgesehen, sodass die Diagnosen, die zur Krankenhausaufnahme führten, innerhalb von Kohorte 3 sehr variierten. Kohorte 4 (NCU COVID-) umfasste Patienten, die von April 2020 bis Juli 2020 wegen anderer Infektionen als SARS-CoV-2 auf eine Normalstation des UKS aufgenommen wurden. Kohorten 3 und 4 dienten als Kontrollgruppen.

Zu den erhobenen Patientencharakteristika gehörten Alter, Geschlecht, Vorhandensein von Komorbiditäten, Dauer des Krankenhausaufenthalts und Anzahl der Patienten, die zu irgendeinem Zeitpunkt während des Beobachtungszeitraums eine mechanische Beatmung oder extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) benötigten.

Patienten mit aktiven malignen Erkrankungen oder unter Chemotherapie wurden ausgeschlossen.

3.3. Material und Laborparameter

Allen Patienten wurden in regelmäßigen Abständen Blutproben durch periphere venöse Punktion oder arterielle Entnahme über einen bereits einliegenden Zugang entnommen.

3.3.1. Material

Aus den in die entsprechenden Monovetten gewonnenen Blutproben wurden folgende Parameter erhoben:

2,7 mL Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Monovette

- a) Differentielles Blutbild
- b) Immunstatus (individuelle Gating-Strategie siehe 3.3.4)
- c) Charakterisierung der Monozytenpopulationen (individuelle Gating-Strategie siehe 3.3.4)
- d) Quantitative Bestimmung der Immunglobuline und IgG-Subklassen. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit und des kleinen Volumens der Proben wurde das restliche EDTA Blut zur Plasmagewinnung zentrifugiert. Das Plasma wurde dann zur Bestimmung der Immunglobuline verwendet:
 - a. IgA
 - b. IgG und Subklassen
 - i. IgG1
 - ii. IgG2
 - iii. IgG3
 - iv. IgG4
 - c. IgM
 - d. IgE

4,7 mL Lithium-Heparin Monovette

- a) C-reaktive Protein (CRP)
- b) Ferritin
- c) Interleukin-6

3.3.2. Zeitlicher Verlauf

Immunstatus, Blutbild, CRP und Monozytenprofile wurden 2-mal pro Woche bestimmt bis zur Entlassung und Verlegung aufgrund klinischer Verbesserung oder Tod. Die Monozytencharakterisierung wurde während der gesamten Studie wegen Lieferschwierigkeiten der diagnostischen Antikörper wiederholt unterbrochen, was zu Lücken in den Monozytendaten führte. Die Immunglobuline wurden einmalig bei Aufnahme gemessen und die Ergebnisse anschließend zwischen den Gruppen verglichen.

3.3.3. Einzelne Laborparameter

CRP

CRP-Werte wurden mittels Turbidimetrie auf dem Cobas® (Roche) System gemessen.

Ferritin

Ferritin-Werte wurden mit Hilfe des Elecsys Ferritin Assays, einem immunologischen *in-vitro* Test zur quantitativen Bestimmung von Ferritin in Humanserum und -plasma, auf dem Cobas® (Roche) System gemessen.

IL-6

IL-6 Werte wurden mit dem ElektroChemilumineszenz ImmunoAssay (ECLIA) auf dem Cobas® (Roche) System gemessen.

Immunglobuline

Die Immunglobuline IgA, IgM, IgE und IgG wurden über Turbidimetrie Assays auf dem Cobas® (Roche) System gemessen.

IgG Subklassen

Werte für IgG Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) wurden mittels Nephelometrie (BN II / BN ProSpec® System – Siemens) bestimmt.

Blutbild

Die Messungen von Leukozyten, Hämoglobin und Blutplättchen wurden mit dem automatischen Hämatologie-Analysegerät Sysmex XN-LTM durchgeführt.

Die Immuncharakterisierung von Lymphozyten wurde mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 3.3.4.) unter Verwendung eines BD FACS Canto™ II Cell Analyzers durchgeführt. Die Monozyten-Subpopulationen wurden mit Hilfe eines Beckman-Coulter Navios™ Analyzers charakterisiert. Die Absolut-Zahlen der Lymphozyten und Monozyten-Subpopulationen wurde berechnet mit der durch den Sysmex erhobenen Leukozytenzahl und der über die Durchflusszytometer gemessenen Prozentangaben der Zellpopulationen (Dual-Plattform-System).

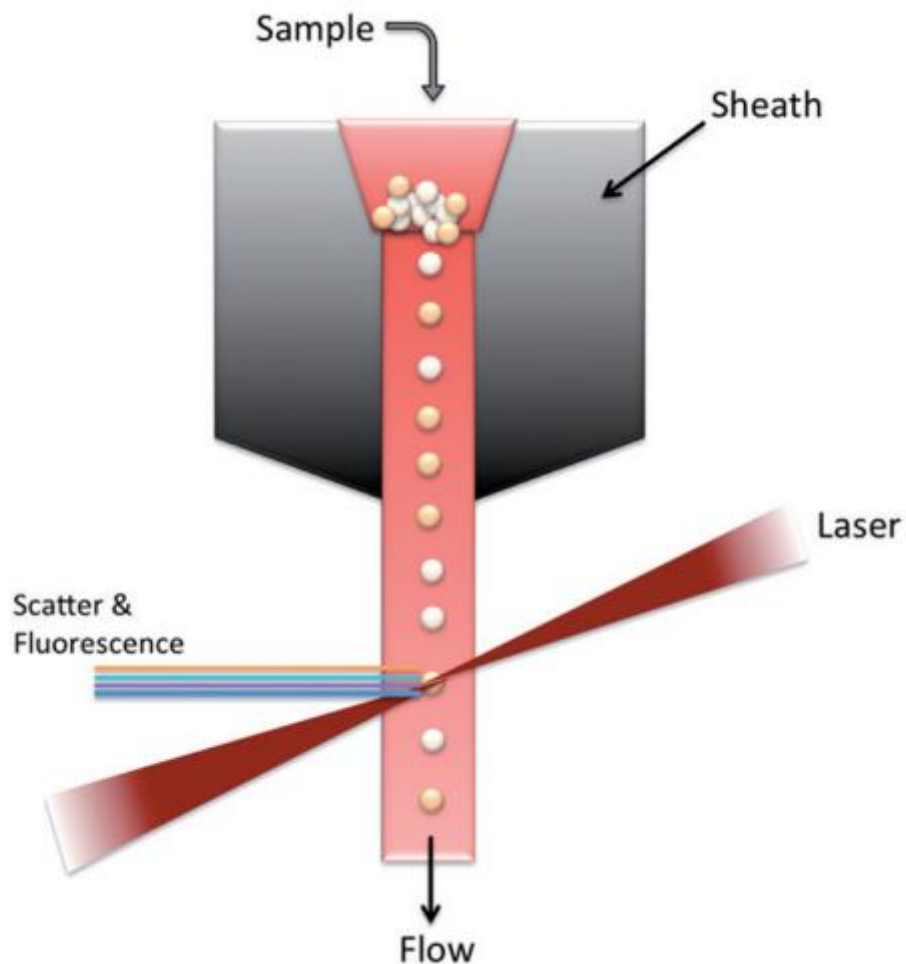
Zu den zellulären Parametern gehörten die lymphozytäre Differenzierung in NK-Zellen (CD56+, CD16+), B-Lymphozyten (CD19+), T-Lymphozyten (CD3+), CD4+ T-Lymphozyten (CD3+, CD4+) und CD8+ T-Lymphozyten (CD3+, CD8+) sowie die Differenzierung der Monozyten in die Subgruppen *klassisch* (CD14+ CD16-), *intermediär* (CD14+ CD16+) und *nicht klassisch* (CD14- CD16+).

Das Zell-Ratio von B-Zellen zu CD8+ Zellen und von CD4+ zu CD8+ T-Lymphozyten wurden aus den Zellzahlen der einzelnen Patienten berechnet und sind als Mittelwert aller individuellen Verhältnisse angegeben.

3.3.4. Durchflusszytometrie und Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine Messmethode, bei der Zellen mithilfe von Laserstrahlen einzeln auf verschiedene Eigenschaften wie Größe und Gehalt an Zellorganellen untersucht werden. Wenn die Zelle den Laserstrahl der Durchflusszytometrie passiert, wird Streulicht erzeugt, dessen Intensität mit den Eigenschaften der Zelle korreliert (Abbildung 3). Vorwärtsstreulicht (FSC), das ein Maß für die Beugung des Lichts in flachen Winkeln ist, hängt von der Größe der Zelle ab.¹⁵ Das seitliche Streulicht (SSC) ist ein Maß für die Brechung von Licht im rechten Winkel und hängt in erster Linie von der Granularität der Zelle ab. Die Granularität von Zellen wird bestimmt über die Anzahl und Zusammensetzung von Zellorganellen. Darüber hinaus können die Zellen vor der Analyse mit Antikörpern angefärbt werden (Immunphänotypisierung), die an einen Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) gekoppelt sind. Je nachdem, ob und wie stark der Fluorochrom-gekoppelte Antikörper das entsprechende Oberflächenmolekül/Antigen bindet, wird die Zelle beim Passieren des Lasers Licht in einer spezifischen Wellenlänge emittieren, das detektiert wird und direkte Rückschlüsse über die Expression des Antigens gibt. Mithilfe von Kombinationen von bestimmten Oberflächenmarker-Mustern (CD: *Cluster of differentiation*) mit FSC und

SSC können Zellen sowohl Zelllinien als auch teilweise deren Unterpopulationen zugeordnet werden. Neben Oberflächenmarkern, können nach einer permeabilisierenden Vorbehandlung auch zytoplasmatische Antigene nachgewiesen werden.^{159,160}



Quelle: Adan et al 2017.¹⁶⁰

Abbildung 2 Funktionsmechanismus eines Durchflusszytometers, während individuelle Zellen den Laserstrahl der Durchflusszytometrie passieren.

3.3.4.1. Geräte, Software und Antikörper

Die Immuncharakterisierung von Lymphozyten erfolgte mit Hilfe eines BD FACSCanto™ II *Cell Analyzer* und die Immunphänotypisierung der Monozyten-Subpopulationen wurde mit einem Beckman-Coulter Navios™ durchgeführt.

Für die Auswertung und Interpretation der Daten wurde die Kaluza Analysesoftware Version 3.1 verwendet.

3.3.4.2. Gating-Strategien

Lymphozyten:

Die Lymphozyten wurden im CD45/SSC Dotplot identifiziert (Dotplot 1). Der prozentuale Anteil der T-Lymphozyten und B-Lymphozyten wurde anhand eines CD3/CD19 Dotplots errechnet (Abbildung 4, Dotplot 4). NK-Zellen wurden anhand eines CD3/CD16+56 Dot-Plots gated (Abbildung 4, Dotplot 5). Der Anteil an CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten wurde in einem CD3/CD4 (Abbildung 4, Dotplot 2) bzw. einem CD3/CD8 (Abbildung 4, Dotplot 3) Dot-Plot bestimmt. Die angezeigten Ergebnisse sind Prozentzahlen, die sich auf die gesamte Lymphozytenpopulation beziehen. Absolutwerte wurden aus der im Sysmex gemessenen Leukozytenzahl errechnet und nicht direkt an den Durchflusszytometern gemessen.

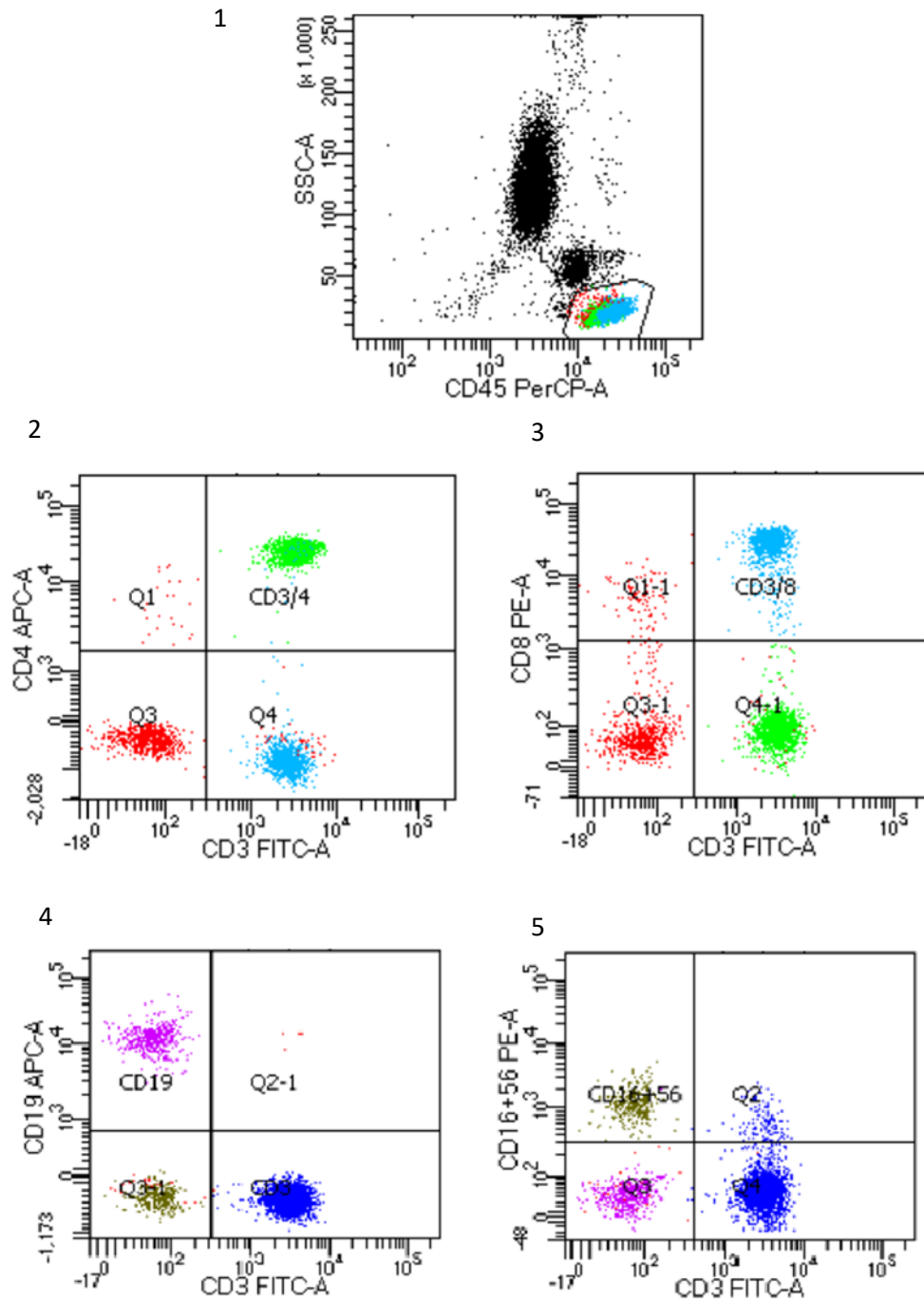


Abbildung 3 Gatingstrategie für die verschiedenen Lymphozytenpopulationen (CD3+CD4+; CD3+CD8+; CD3-CD19+; CD3-CD16+CD56+)

Monozyten:

Monozyten wurden in einem SSC/CD64 Dotplot (Abbildung 5, Dotplot 1) über deren starke CD64 Expression identifiziert. HLA-DR wurde als Marker für die Aktivierung von CD14+ Monozyten verwendet (Abbildung 5, Dotplot 2). Über einen CD14/CD16 Dotplot wurden die Monozyten weiter in klassische (Dotplot 3, CD14+/CD16-), nicht-klassische (Dotplot 3, CD14-/CD16+) und intermediäre Monozyten (Dotplot 3, CD14+/CD16+) gruppiert (Abbildung 5, Dotplot 3).¹³⁰

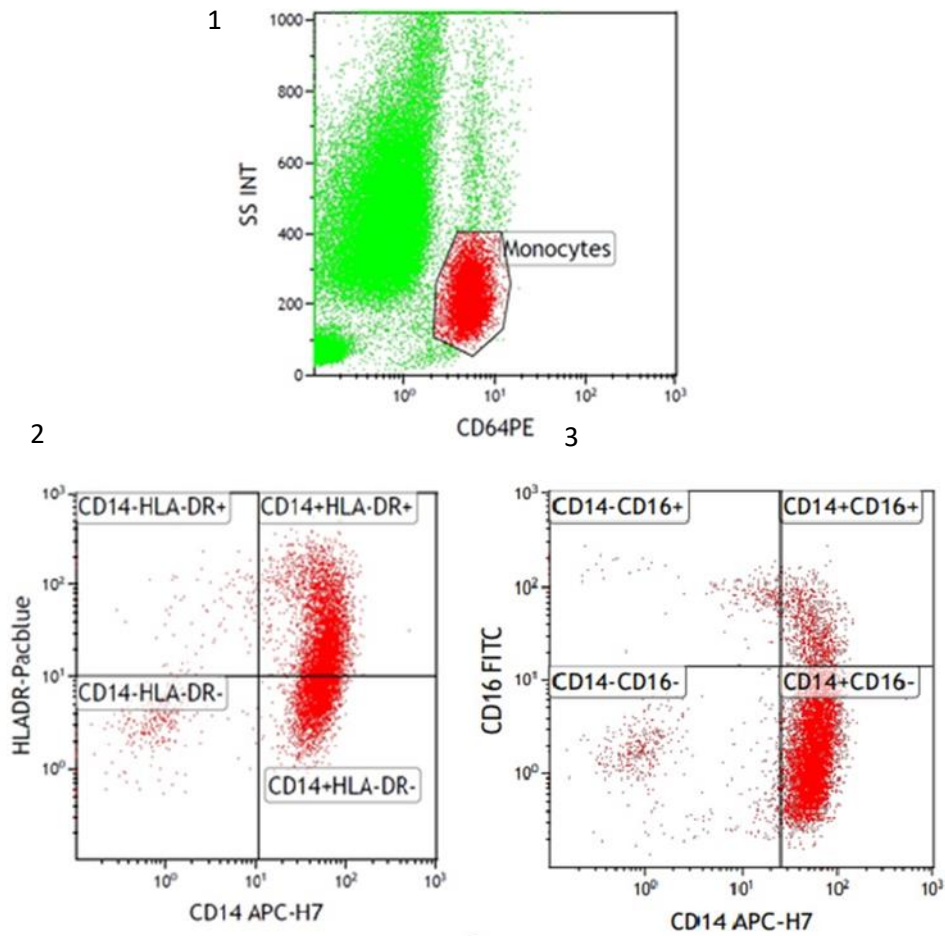


Abbildung 4 Gatingstrategie für die verschiedenen Monozytensubpopulationen (CD14+/HLADR+; CD14+/CD16-; CD14+/CD16+; CD14-/CD16+)

3.4. Statistische Methoden

Die Daten wurden in Microsoft® Excel® 2016 erfasst. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism Version 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Trends im zeitlichen Verlauf wurden mit Hilfe linearer Regression analysiert. Die Vergleiche der Patienten nach Outcome (Überlebende vs. Verstorbene in Kohorte 1) im Zeitverlauf wurden mit Hilfe von „*repeated measures mixed-effect models*“ analysiert. Nichtparametrische Tests (Mann Whitney U und Kruskal-Wallis Test bei nicht parametrischen Ergebnissen mehrerer Gruppen) wurden zum Vergleich der Medianwerte zwischen den Kohorten verwendet, da die meisten Variablen nicht normal verteilt waren (nach dem Kolmogorov–Smirnov-Test). Vergleiche zwischen den Kohorten wurden unter Verwendung der initialen Messwerte bei Aufnahme durchgeführt. Für die Vergleiche der Subgruppen aus Kohorte 1 wurden die über die Zeit erhobenen Einzelwerte als gepoolte Daten verwendet. Hierfür wurde Kohorte 1 in zwei Untergruppen von Patienten mit positivem Outcome (Entlassung aus dem Krankenhaus aufgrund klinischer Verbesserung) und Patienten mit negativem Outcome (Tod aufgrund von COVID-19) unterteilt.

Als Baseline wurde das Datum der Aufnahme auf die Normalstation oder Intensivstation festgelegt, was nicht dem Beginn der Symptome entspricht. Da für das Management von COVID-19 in Deutschland nach dem Schweregrad der Erkrankung triagiert wurde, waren die meisten in unser Krankenhaus aufgenommenen Fälle schwer erkrankt.

3.5. Ethikkommission

Die Studie war Teil der CORSAAR-Registerstudie und wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Nummer 62/20) Deutschland, genehmigt.

4. Ergebnisse

4.1. Beschreibung des Patientenkollektives

Insgesamt wurden 87 Patienten in die Studie eingeschlossen und weiter in vier verschiedene Kohorten aufgeteilt: Kohorte 1 enthielt 24 Patienten, die auf der Intensivstation für COVID-19 behandelt wurden (ICU COVID+), Kohorte 2 enthielt 10 Patienten, die auf der Normalstation mit COVID-19 behandelt wurden (NCU COVID+), Kohorte 3 bestand aus 30 Patienten, die auf der Intensivstation aus anderen Gründen als COVID-19 behandelt wurden (ICU COVID-) und Kohorte 4 umfasste 21 Patienten, die auf der Normalstation wegen einer anderen Infektion als COVID-19 behandelt wurden (NCU COVID-). Tabelle 3 fasst die Patientencharakteristika und Behandlungsparameter aller Kohorten zusammen. Die ICU COVID+ Kohorte hatte mit durchschnittlich 38 Tagen die längste Hospitalisierungszeit, während Kohorte 4 (NCU COVID-) mit nur 5 Tagen die kürzeste Hospitalisierungszeit hatte. Das mediane Alter der ICU COVID+ Gruppe betrug 64,8 Jahre im Vergleich zu 69,5 Jahren der ICU COVID- Gruppe, 71,8 Jahren der NCU COVID- Kohorte und 58,4 Jahren der NCU COVID+ Gruppe, wobei es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gab. Der höchste Prozentsatz an männlichen Patienten wurde mit 87,5 % in der ICU COVID+-Kohorte im Vergleich zu 53 % männlichen Patienten in Kohorte 4 gefunden.

Tabelle 3. Patientencharakteristika und Therapien

	ICU COVID+	NCU COVID+	ICU COVID-	NCU COVID-
Patientenzahl, n	24	10	30	21
Alter, Mittelwert (Jahre)*	65	61	68	66
Männlich, n (%)	21 (87.5)	7 (66%)	23 (76%)	11 (53%)
Mechanische Beatmung	21 (87.5%)	0	14 (43%)	0
Extrakorporale Membranoxygenierung	8 (33%)	0	0	0
Tage Hospitalisierung	38	11	13	5
Mortalität im Krankenhaus	8 (33%)	0	10 (33%)	0
Grund der stationären Aufnahme				
<i>Kardiovaskuläres Ereignis</i>			16	3
<i>Blutung</i>			4	3
<i>Sekundäre Infektionen</i>			5	6
<i>Gastroenterologische oder hepatische Erkrankungen</i>			2	5
<i>Nephrologische Erkrankungen</i>			1	1
<i>Pulmonale Erkrankungen</i>			1	0
<i>Andere</i>			1	3
Schweregrad von COVID-19				
<i>Pneumonie</i>	2	4		
<i>Leichter Verlauf</i>	1	4		
<i>Moderates ARDS</i>	7	0		
<i>Schweres ARDS</i>	14	0		
<i>Asymptomatisch</i>	0	2		
Einsatz von Antibiotika	18	5		
Immunsuppressiva				
<i>Vor Aufnahme</i>	2	3	0	2
<i>Während der Studie**</i>	20	2	0	1
<p>* Unterschiede sind nicht statistisch signifikant ** Die meisten Patienten mit schwerer Erkrankung erhielten Hydroxychloroquin. Für den Einsatz von Steroiden gab es zum Zeitpunkt der Studie noch nicht genügend Evidenz, daher erhielt nur ein kleiner Teil der Patienten Kortison während der Studie. 1 Patient erhielt Tocilizumab.</p>				

4.2. Vergleich zwischen Kohorten zum Aufnahmezeitpunkt

Die initial erhobenen Laborparameter wurden zwischen den Kohorten folgendermaßen verglichen: ICU COVID+ (Kohorte 1) vs. ICU COVID- (Kohorte 3), ICU COVID+ (Kohorte 1) vs. NCU COVID+ (Kohorte 2) und NCU COVID+ (Kohorte 2) vs. NCU COVID- (Kohorte 4). Tabelle 4 fasst die Vergleiche zwischen allen Gruppen zusammen.

4.2.1. Immunstatus

Die ICU COVID+ Kohorte wies unter allen Gruppen die schwerste absolute Lymphopenie auf, mit erniedrigten CD4+ T-, CD8+ T-, B- und NK-Lymphozyten. Der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten an allen Lymphozyten war jedoch in der ICU COVID+ Gruppe am höchsten. Im Folgenden berichten wir über die Unterschiede zwischen den Kohorten mit Schwerpunkt auf den statistisch signifikanten Unterschieden.

ICU COVID+ (Kohorte 1) vs. ICU COVID- (Kohorte 3)

Die Vergleiche zwischen den Kohorten 1 (ICU COVID+) und 3 (ICU COVID-) zeigten statistisch signifikante Unterschiede in den CRP-Werten (180 vs. 119 mg/l, $p = 0,03$), dem prozentualen Anteil der Lymphozyten (7 % vs. 13 %, $p = 0,02$), der Zahl der T-Lymphozyten (475 vs. 784 Zellen/ μL , $p = 0,02$) und deren prozentualen Anteil (67 % vs. 74 %, $p = 0,04$), der Anzahl der CD4+ T-Lymphozyten (359 vs. 533 Zellen/ μL , $p = 0,04$) und der Blutplättchen (239 vs. 182 Blutplättchen/nl, $p = 0,01$). Eine CD8+ T-Lymphopenie wurde in beiden Gruppen beobachtet, war aber in der ICU COVID+ Gruppe signifikant stärker ausgeprägt (114 vs. 232 Zellen/ μl , $p = 0,01$). Die Ergebnisse sind nicht für multiple Testen korrigiert.

Eine explorative Analyse des Verhältnisses von B-Zellen zu CD8+ T-Zellen zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen ICU COVID+ und ICU COVID- Patienten (1,8 vs. 0,98, $p = 0,01$).

ICU COVID+ (Kohorte 1) vs. NCU COVID+ (Kohorte 2)

Vergleiche zwischen ICU COVID+ und NCU COVID+ Patienten zeigten statistisch signifikante Unterschiede in der Leukozytenzahl (11641 vs. 7438 Zellen/ μL , $p < 0,01$), dem prozentualen Anteil der Lymphozyten (7 % vs. 20 %, $p < 0,01$), dem Anteil der B-Lymphozyten (22 % vs. 7,6 %, $p < 0,01$) und CD4+-Lymphozyten (50 % vs. 40 %, $p < 0,01$), der absoluten CD8+ T-Lymphozytenzahl (114 vs. 494 Zellen/ μL , $p < 0,01$), dem Anteil der CD8+ T-Lymphozyten (16 % vs. 31 %, $p < 0,01$) und dem T4/T8-Verhältnis

(4,3 vs. 1,5, $p < 0,01$). Wir fanden auch einen statistisch signifikanten Unterschied der CRP-Werte (180 vs. 37 mg/l, $p < 0,01$) und im Hämoglobin (10 vs. 13 g/dL, $p < 0,01$). Trends für Unterschiede, die keine statistische Signifikanz erreichten, wurden bei den Lymphozytenzahlen (700 vs. 1467 Zellen/ μ l, $p = 0,09$), den Absolutzahlen der T-Lymphozyten (475 vs. 1130 Zellen/ μ l, $p = 0,09$), den CD4+ T-Lymphozytenzahlen (359 vs. 602 Zellen/ μ l, $p = 0,25$) und den Zellzahlen der NK-Zellen (79 vs. 199 Zellen/ μ l, $p = 0,07$) beobachtet.

Die explorative Analyse des Verhältnisses von B-Zellen zu CD8+ T-Zellen zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen COVID-positiven Patienten, die auf der Intensivstation und auf der Normalstation behandelt wurden (1,8 vs. 0,34, $p < 0,01$).

NCU COVID+ (Kohorte 2) vs. NCU COVID- (Kohorte 4)

Der Vergleich zwischen den Laborergebnissen der Kohorten 2 und 4 ergab signifikante Unterschiede im Anteil der CD4+ Lymphozyten (40 % vs. 54 %, $p = 0,01$), im Anteil der CD8+ Lymphozyten (31 % vs. 19 %, $p = 0,01$), dem T4/T8-Verhältnis (1,5 vs. 3,9, $p = 0,01$), dem B/T8-Verhältnis (0,34 vs. 0,67, $p = 0,03$) und dem Anteil der Monozyten (5,0 % vs. 10 %, $p = 0,04$).

4.2.2. Monozyten-Subpopulationen

ICU COVID+ (Kohorte 1) vs. ICU COVID- (Kohorte 3)

Vergleicht man den prozentualen Anteil der Monozyten, so wies die ICU COVID+-Kohorte im Vergleich zur ICU COVID--Gruppe signifikant niedrigere Raten intermediärer Monozyten auf (5,6 % vs. 13 %, $p < 0,01$), was auch für aktivierte HLA-DR+/CD14+ Monozyten galt (17 % vs. 34 %, $p < 0,01$).

ICU COVID+ (Kohorte 1) vs. NCU COVID+ (Kohorte 2)

Bei der Auswertung der Monozytenuntergruppen zeigten ICU COVID+ Patienten im Vergleich zu NCU COVID+ Patienten einen signifikant geringeren Anteil an intermediären Monozyten (5,6 % vs. 14 %, $p = 0,03$) sowie aktivierten HLA-DR+/CD14+ Monozyten (17 % vs. 40 %, $p < 0,01$).

NCU COVID+ (Kohorte 2) vs. NCU COVID- (Kohorte 4)

Der Vergleich der Messungen zwischen den Kohorten 2 und 4 ergab signifikante Unterschiede im prozentualen Anteil der Monozyten (5,0 % vs. 10 %, $p = 0,04$).

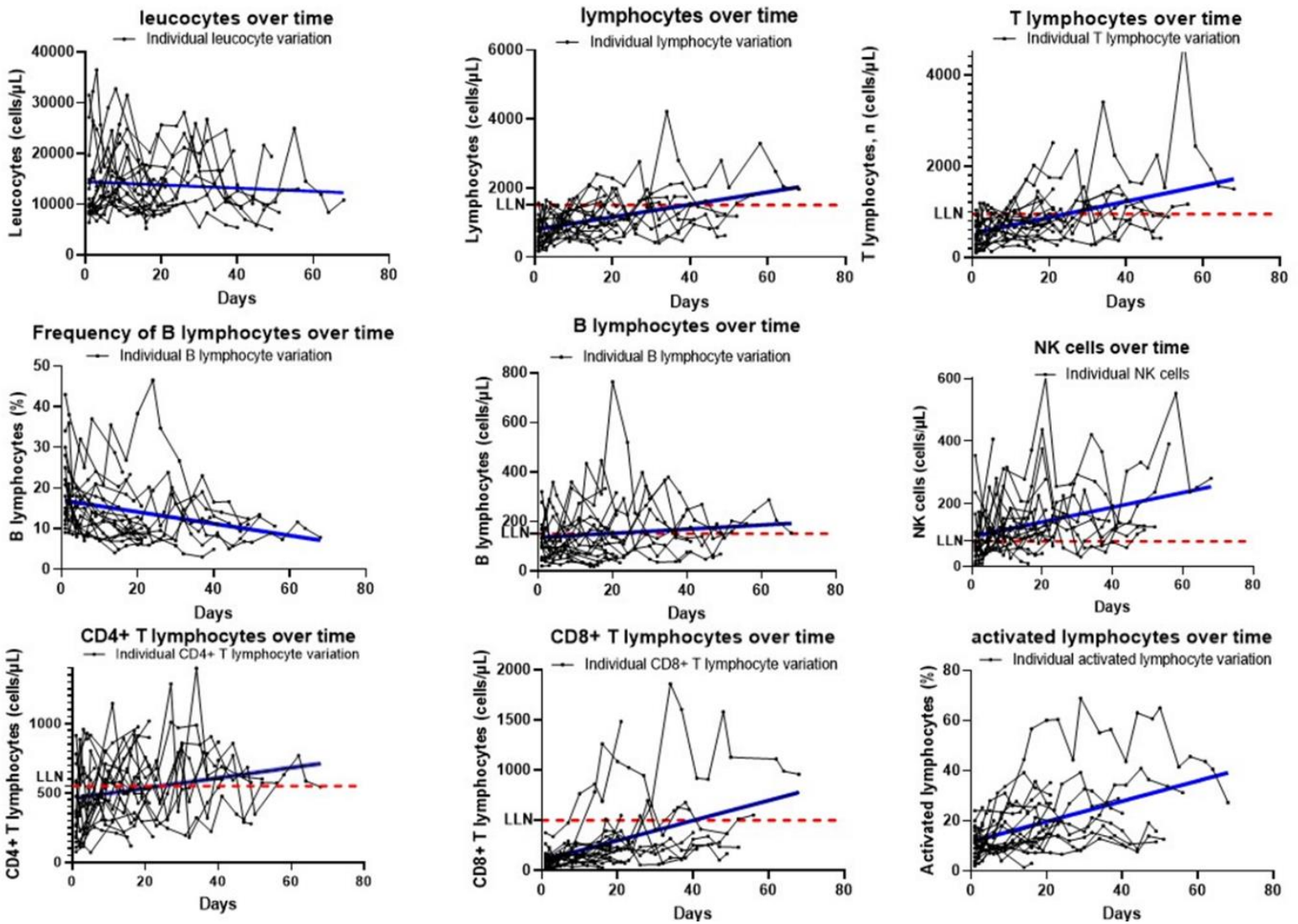
Tabelle 4. Laborparameter zum Aufnahmezeitpunkt									
	ICU COVID+	ICU COVID-	P	ICU COVID+	NCU COVID+	P	NCU COVID+	NCU COVID-	P
Leukozyten*	11641	10929	0,48	11641	7438	<0,01	7438	8965	0,47
Lymphozyten*	700	1208	0,09	700	1467	0,09	1467	1217	0,84
Lymphozyten (%)	7,0	13	0,02	7,0	20	<0,01	20	16	0,39
B Lymphozyten (%)	22	16	0,16	22	7,6	<0,01	7.6	10	0,44
B Lymphozyten *	132	300	0,4	132	134	0,59	134	117	0,32
T Lymphozyten (%)	67	74	0,04	67	74	0,12	74	72	0,71
T Lymphozyten * (/μL)	475	784	0,02	475	1130	0,09	1130	864	0,65
Aktivierte T Lymphozyten (%)	13	10	0,44	13	12	0,80	12	11	0,74
CD4+ Lymphozyten (%)	50	54	0,39	50	40	<0,01	40	54	0,01
CD4+ Lymphozyten *	359	533	0,04	359	602	0,25	602	630	0,85
CD8+ Lymphozyten (%)	16	19	0,19	16	31	<0,01	31	19	0,01
CD8+ Lymphozyten *	114	232	0,01	114	494	<0,01	494	228	0,15
NK Zellen (%)	11	9,2	0,53	11	18	0,26	18	17	0,84
NK-Zellen* (/μL)	79	103	0,57	79	199	0,07	199	224	0,88
T4/T8-Ratio	4,3	3,4	0,45	4,3	1,5	<0,01	1.5	3.9	0,01
B/T8-Ratio	1,8	0,98	0,01	1,8	0,34	<0,01	0,34	0.67	0,03
Monozyten*	609	607	0,9	609	497	0,10	497	728	0,06
Monozyten (%)	4.8	4,8	0,8	4,8	5,0	0,97	5,0	10	0,04
HLA-DR+/CD14+ Monozyten (%)	17	34	<0,01	17	40	<0,01	40	46	0,35
Klassische Monozyten (CD14+/CD16-) (%)	82	80	0,42	82	75	0,13	75	77	0,73
Intermediäre Monozyten (CD14+/CD16+) (%)	5,6	13	<0,01	5,6	14	0,03	14	15	0,73
Nicht klassische Monozyten (CD14-/CD16+) (%)	3,0	1,5	0,25	3,0	1,4	0,3	1.4	3.2	0,21
C-reaktives Protein (mg/l)	180	119	0,03	180	37	<0,01	37	51	0,33
Thrombozyten (/nL)	239	182	0,01	239	252	0,94	252	220	0,53
Hämoglobin (g/dL)	10	10	0,81	10	13	<0,01	13	11	0,09
IgA (mg/dl)	325,3	320,3	0,74	325,3	281,6	0,12	281,7	272,9	0,8
IgM (mg/dl)	119,1	60,5	<0,01	119,1	155,5	0,86	155,5	75,1	0,17
IgG (mg/dl)	1074,8	883,6	0,08	1074,8	1129,8	0,69	1129,8	1042,2	0,5
IgG1 (mg/dl)	758,6	557,3	<0,01	758,6	777,8	0,82	777,8	669,6	0,41
IgG2 (mg/dl)	219,5	230,5	0,9	219,5	276,3	0,15	276,3	282,6	0,94
IgG3 (mg/dl)	59,6	31,6	<0,01	59,6	49,2	0,42	49,2	25,5	0,02
IgG4 (mg/dl)	37,0	64,2	0,11	37	26,6	0,53	26,6	64,4	0,06
*Die angegebenen Werte sind mittlere Zellzahlen/μl									
Fettgedruckte Werte stellen statistisch signifikante Vergleiche dar.									
P-Werte sind nicht für Mehrfachvergleiche angepasst									

4.2.4 Immunglobuline

Wir fanden ebenfalls signifikante Unterschiede in den Immunglobulinkonzentrationen bei Studienbeginn zwischen COVID-Patienten und Nicht-COVID-Patienten. ICU COVID+ Patienten hatten höhere Konzentrationen von IgM (119,1 vs. 60,5 mg/dL $p = 0,002$), IgG1 (758,6 vs. 557,3 mg/dL $p = 0,008$) und IgG3 (59,6 vs. 26,43 mg/dL $p = 0,006$) im Vergleich zu ICU COVID- Patienten. Darüber hinaus wiesen NCU COVID+-Patienten höhere IgG3-Werte (49,2 vs. 25,5 mg/dL $p = 0,02$) im Vergleich zu NCU COVID--Patienten auf. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden COVID+ Kohorten (auf ICU oder NCU behandelt) (Tabelle 4).

4.3. Longitudinale Auswertung

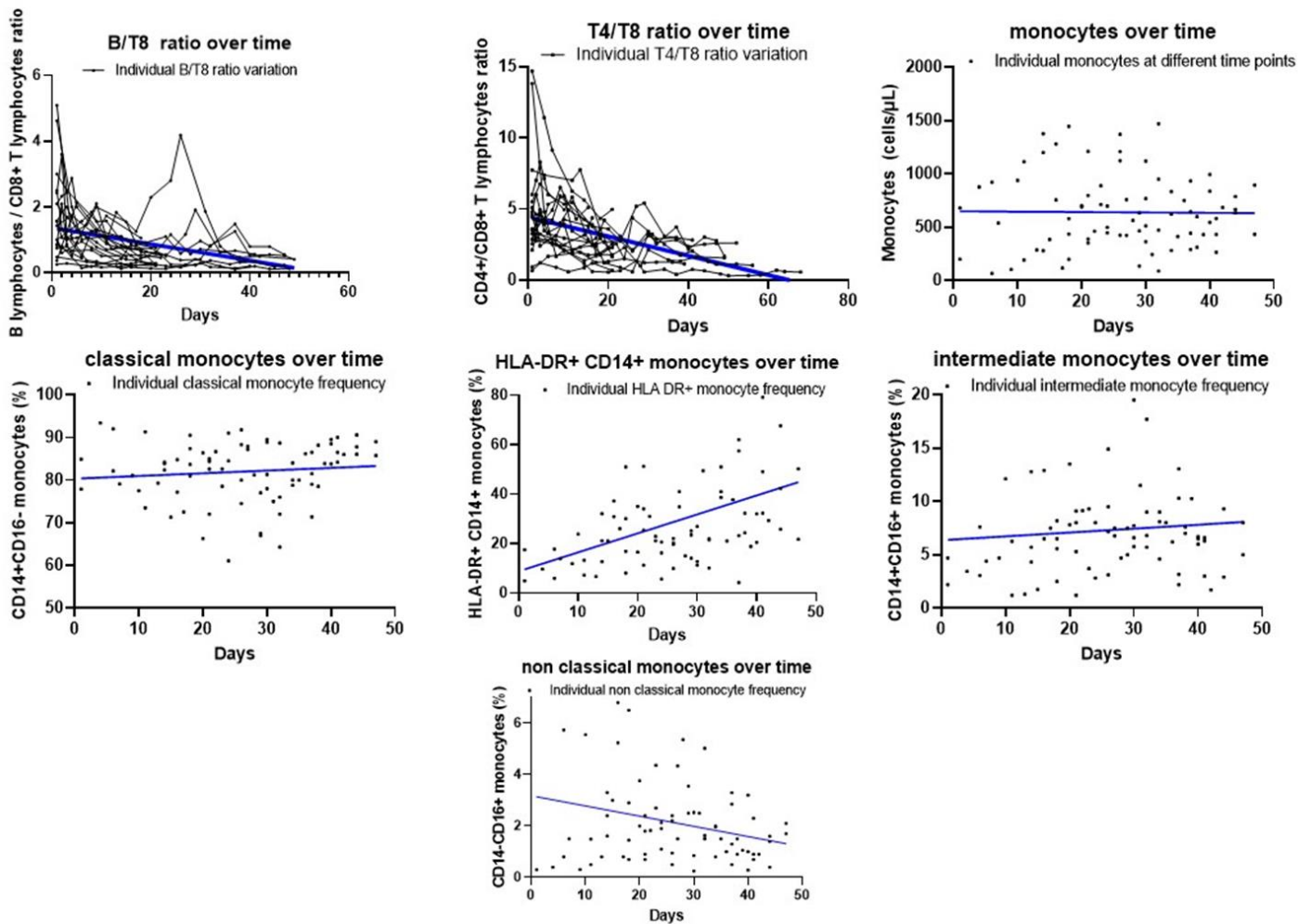
Längsschnittuntersuchungen wurden aufgrund der langen Verweildauer im Krankenhaus nur in Kohorte 1 durchgeführt. In dieser Kohorte wurden in einer Subgruppenanalyse Patienten mit einem günstigen Krankheitsverlauf, die aufgrund einer klinischen Verbesserung aus dem Krankenhaus entlassen wurden (positives Outcome), mit Patienten verglichen, die aufgrund von COVID-19 starben (negatives Outcome). Die Abbildungen 6 und 7 fassen die linearen Regressionsanalysen aus dieser Kohorte (ICU COVID+) zusammen.



Quelle: Kos et al⁶¹

Abbildung 6 zeigt die Veränderungen der einzelnen Lymphozytenpopulationen der ICU COVID+ Kohorte im zeitlichen Verlauf

Die Spaghetti-Plots zeigen die individuellen Veränderungen im zeitlichen Verlauf dar. Einzelne Punkte stellen individuelle Messungen von Zellzahlen im Zeitverlauf dar. Für alle Parameter außer Leukozyten und B-Lymphozyten zeigen die linearen Regressionsanalysen Steigungen, die sich signifikant von Null unterscheiden (p -Werte $< 0,05$). LLN: Untere Grenze der Norm



Quelle: Kos et al⁶¹

Abbildung 7 zeigt die Veränderungen der Zell-Ratios und der Monozytensubpopulationen im zeitlichen Verlauf. Einzelne Punkte stellen individuelle Messungen von Zellen oder Zell-Ratios im Zeitverlauf dar. Lineare Regressionsanalysen zeigen signifikante Steigungen, die sich mit $p < 0,05$ von Null unterscheiden, für die Zell-Ratios B/T8 und T4/T8 sowie für die aktivierten Monozyten (HLA-DR+ CD14+) und die nicht-klassischen Monozyten. Dies trifft nicht zu für die Gesamt-Monozytenzahl, die intermediären Monozyten und die klassischen Monozyten, für die die Veränderungen über die Zeit statistisch nicht signifikant waren.

Parameter ohne Veränderung im Laufe der Zeit

Die Zahl der Leukozyten insgesamt, die B-Lymphozytenzahl, die Zahl der Monozyten insgesamt, die klassischen Monozyten und die intermediären Monozyten zeigten keine signifikanten Veränderungen im Zeitverlauf (Abbildung 7)

Parameter mit statistisch signifikanten Veränderungen im Laufe der Zeit

Die lineare Regressionsanalyse der absoluten Zellzahlen von Lymphozyten, T-Lymphozyten, CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen und NK-Zellen sowie des prozentualen Anteils aktivierter (HLA-DR+) Lymphozyten und Monozyten zeigte einen signifikanten Anstieg der jeweiligen Werte in Richtung Normalisierung (Abbildung 6). Im Gegensatz dazu zeigte der prozentuale Anteil der nicht klassischen Monozyten und der B-

Lymphozyten abnehmende Werte. Auch die Zellverhältnisse von T4/T8 und B/T8 nahmen während des Untersuchungszeitraums deutlich ab (Abbildung 7).

Subgruppenanalyse aus Kohorte 1

Mehr Patienten der Subgruppe aus Kohorte 1 mit positivem Outcome erreichten eine Normalisierung der Lymphozyten und ihrer Subpopulationen als in der Gruppe der Patienten mit negativem Outcome. Die Normalisierung der Werte benötigte in der Gruppe mit positivem Outcome auch weniger Zeit (Tabelle 5, Abbildung 8). In der Gruppe mit negativem Outcome erreichte nur ein Patient eine normale CD8+ T-Lymphozytenzahl. In der Gruppe mit günstigem Outcome dauerte es 12 Tage für die Lymphozyten, 2,9 Tage für die B-Zellen, 7,3 Tage für die CD4-T-Zellen, 19 Tage für die CD8-T-Zellen und 3,4 Tage für die NK-Zellen bis zur Erholung.

Tabelle 5. Mittlere Zeit bis zur Normalisierung je nach Subgruppe (Pos. vs. Neg. Outcome) in Tagen				
	Positives Outcome*		Negatives Outcome*	
		N* (%)		N* (%)
Patienten	15		8	
Lymphozyten	12 d (7,7)	9 (60 %)	22 d (5,3)	3 (37,5 %)
B Lymphozyten	2,9 d (4,9)	10 (66 %)	5 d (5,8)	4 (50 %)
T Lymphozyten	12 d (9,4)	10 (66 %)	23 d (7)	2 (25 %)
CD4+ T Lymphozyten	7,3 d (7)	12 (80 %)	16 d (20)	5 (62,5 %)
CD8+ T Lymphozyten**	19 d (7)	6 (40 %)	52 d (0)	1 (12,5 %)
CD8+ T Lymphozyten (2-fach-Erhöhung)	12 d (12)	12 (80 %)	20 d (18)	6 (75 %)
NK Zellen	3,4 d (10)	10 (66 %)	8,8 d (2,9)	5 (62,5 %)

* Nur Patienten, die normale Werte erreichten, wurden in diese Analyse einbezogen. Einzelne abrupte Zellzahl Erhöhungen, gefolgt von abnormalen Werten, wurden nicht als Normalisierung gewertet.

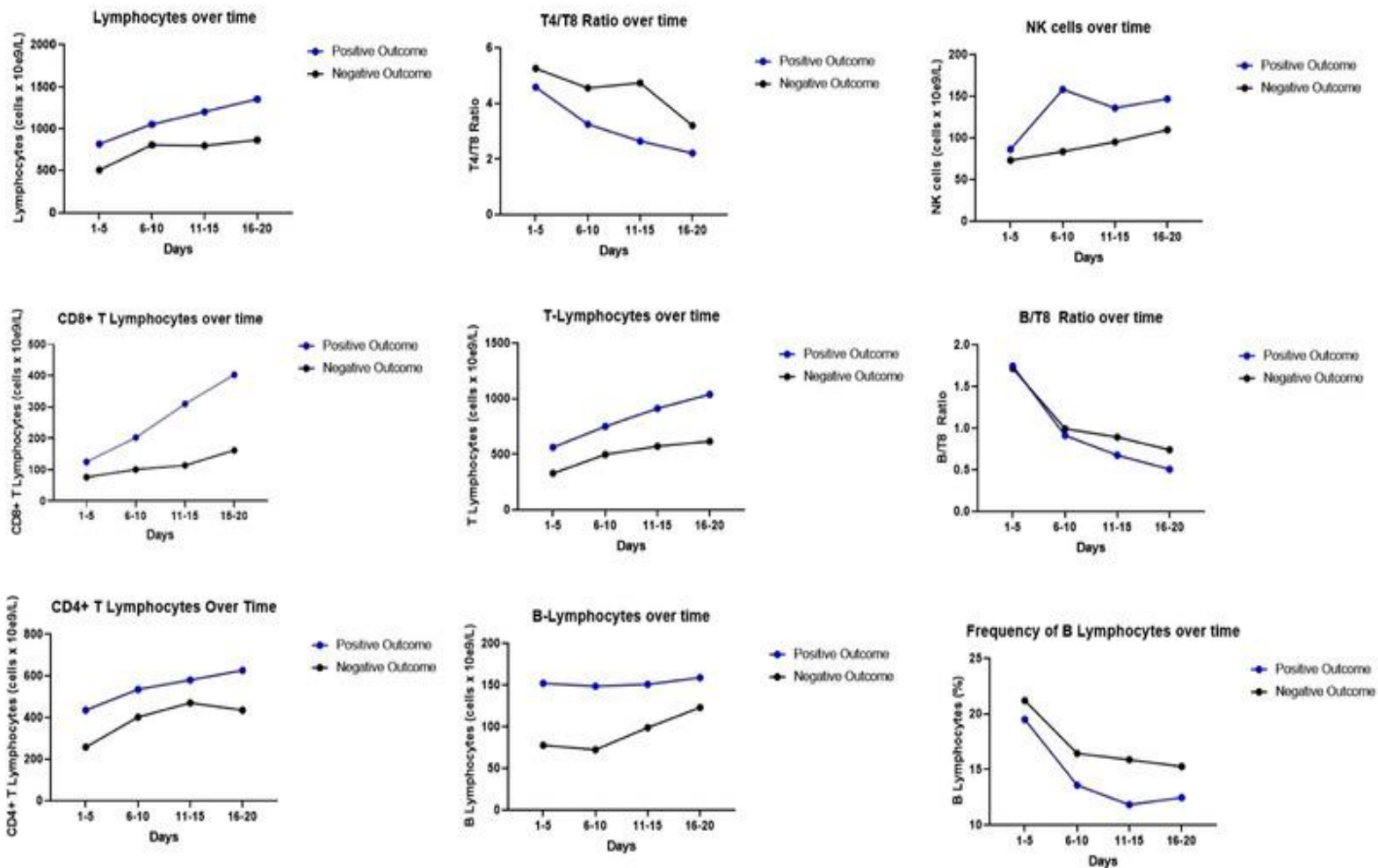
** Nur ein Patient in der Gruppe mit negativem Outcome erreichte normale CD8+-Werte.

In der Gruppe mit positivem Outcome gingen zwei Patienten nach der Entlassung aus dem Krankenhaus verloren, so dass zum Zeitpunkt der Zensierung nur zwei Messungen durchgeführt wurden.

Normalwerte gemäß den lokalen Labordefinitionen: Lymphozyten > 1500 Zellen/µl, B-Lymphozyten > 150/µl, T-Lymphozyten > 950/µl, CD4+ T-Lymphozyten > 550/µl, CD8+ T-Lymphozyten > 500/µl, NK-Zellen > 80/µl. Kritische Schwelle bei CD4+ T Lymphozyten: < 200/µL

SD: Standardabweichung

Die Vergleiche wurden mit Hilfe von „repeated measures mixed-effect models“ durchgeführt und zeigten keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen Outcome und der Zellzahl oder dem Zellverhältnis im Zeitverlauf. Abbildung 8 zeigt die Zellzahlen, Zellverhältnisse und Zellhäufigkeiten in Abhängigkeit vom Outcome bis zu Tag 20.



Quelle: Kos et al⁶¹

Abbildung 8 zeigt Vergleiche einzelner Zellzahl- oder Zell-Ratio-Parameter zwischen Patienten mit positivem und negativem Outcome im Zeitverlauf bis Tag 20. Die Diagramme zeigen die Zellzahlen oder Zellhäufigkeiten zu vier verschiedenen Zeitpunkten für die zwei Untergruppen der ICU COVID+ Kohorte. Blaue Punkte sind Mittelwerte der Untergruppe mit positivem Outcome (Überlebende) (N = 16) und schwarze Punkte sind Mittelwerte der Untergruppe mit negativem Outcome (Verstorbene) (N = 8). „Repeated measures mixed-effect models“ zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kurven.

Eine vergleichende Analyse der Mittelwerte aller im Laufe der Zeit erhobenen Parameter zeigte signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit positivem und negativem Outcome in Bezug auf die Leukozyten (14.466 vs. 12.294 Zellen/ μ L), Lymphozyten (1.183 vs. 993 Zellen/ μ L), B Lymphozyten (887 vs. 631 Zellen/ μ L), CD4+ Lymphozyten (572 vs. 442 Zellen/ μ L), CD8+ Lymphozyten (294 vs. 172 Zellen/ μ L), NK Zellen (141 vs. 105 Zellen/ μ L), die T4/T8 Ratio (3 vs. 3,9), HLA-DR+CD14+ Monozyten (31,1 vs. 21,6 %), und die B/T8 Ratio (0,93 vs. 1,16).

In der Gruppe der Überlebenden wurden ebenfalls niedrigere Konzentrationen von IL-6 (624 vs. 1.560 pg/mL), Ferritin (1253 vs. 2295 µg/L) und CRP (125,6 vs. 197,6 g/dL) beobachtet sowie eine höhere Thrombozytenzahl (262,9 vs. 178,4 Thrombozyten/nL). Tabelle 6 enthält eine Zusammenfassung der gepoolten Analysen aller Parameter.

Tabelle 6 Gepoolte Analyse aller Messwerte der ICU COVID+ Kohorte im Zeitverlauf aufgeteilt nach Outcome

	Überlebende	Verstorbene	P
Patienten (n)	15	8	
Leukozyten*	14.466	12.293	< 0,01
Lymphozyten*	1183	993	< 0,01
Lymphozyten (%)	26,7	7,7	0,15
B Lymphozyten (%)	14,4	16	0,74
B Lymphozyten *	164	135	< 0,01
T Lymphozyten (%)	72,8	70,5	0,625
T Lymphozyten *	887	631	< 0,01
aktivierte T Lymphozyten (%)	18,7	17,7	0,589
CD4+ Lymphozyten (%)	49,6	51,3	0,340
CD4+ Lymphozyten *	572	442	< 0,01
CD8+ Lymphozyten (%)	21,4	17,5	0,01
CD8+ Lymphozyten *	294	172	< 0,01
NK Zellen (%)	11,9	12,1	0,427
NK-Zellen*	141	105	< 0,01
T4/T8-Ratio	3,0	3,9	0,046
Monozyten *	668	637	0,694
Monozyten (%)	5,1	5,5	0,962
HLA-DR+CD14+ Monozyten (%)	31,1	21,6	0,036
Klassische Monozyten (CD14+/CD16-) (%)	83	80,8	0,310
Intermediäre Monozyten (CD14+/CD16+) (%)	7,4	7,2	0,793
Nicht klassische Monozyten (CD14-/CD16+) (%)	2,4	1,7	0,242
C-reaktives Protein (g/dL)	125,6	197,6	< 0,01
Thrombozyten*	262.900	178.400	< 0,01
Hämoglobin (g/dL)	8.6	8.5	0.89
Interleukin 6 (pg/mL)	624	1.560	< 0,01
Ferritin (µg/l)	1.253	2.295	< 0,01
B/T8	0,93	1,16	0,045

*Die angegebenen Werte sind mittlere Zellen/µl

Fettgedruckte Werte stellen statistisch signifikante Unterschiede dar

P-Werte sind nicht für Mehrfachvergleiche angepasst

5. Diskussion

Es hat sich gezeigt, dass Veränderungen des Immunsystems für den Verlauf von COVID-19 eine wichtige Rolle spielen, insbesondere bei schweren Verläufen. Die meisten bisher durchgeführten Studien haben jedoch COVID-19-Patienten mit gesunden Personen verglichen. Daher bleibt die Frage offen, wie spezifisch diese Veränderungen sind und ob sie sich signifikant von denen von Patienten mit anderen schweren Erkrankungen unterscheiden. Um dieses Problem anzugehen, haben wir eine prospektive Kohortenstudie konzipiert, die vier Patientenkohorten umfasst: Patienten, die wegen COVID-19 auf einer Intensivstation behandelt wurden (ICU COVID+, Kohorte 1), Patienten, die wegen COVID-19 auf einer Normalstation behandelt wurden (NCU COVID+, Kohorte 2), Patienten, die aus anderen Gründen als COVID-19 auf einer Intensivstation behandelt wurden (ICU COVID-, Kohorte 3) und Patienten, die wegen anderer Infektionen als COVID-19 auf einer Normalstation behandelt wurden (NCU COVID-, Kohorte 4). Von allen Patientenkohorten wurden umfassende Immunstatus Daten zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme erhoben. Eine Datenerhebung im Zeitverlauf war nur für Patienten möglich, die wegen schwerem COVID-19 auf der Intensivstation behandelt wurden, da die Kohorten 2, 3 und 4 eine wesentlich kürzere Verweildauer im Krankenhaus hatten (Tabelle 3). Für Kohorte 1 wurde eine Subgruppenanalyse (positives vs. negatives Outcome) durchgeführt, um immunologische Marker zu identifizieren, die mit einer schlechten Prognose verbunden sind. Interessanterweise wurde festgestellt, dass zwei der Parameter, die bei den Ausgangsmessungen als spezifisch für schweres COVID-19 identifiziert wurden (erhöhtes B/T8-Verhältnis, niedriger Prozentsatz aktivierter Monozyten), auch in dieser Patientenkohorte mit einer schlechten Prognose korrelierten.

Bei dem Vergleich der immunologischen Ausgangsparameter zeigten beide ICU-Kohorten (ICU COVID+ und COVID-) eine allgemeine Lymphopenie sowie eine Lymphopenie der T-Zellen und CD8+ T-Zellen, wobei in der ICU COVID+-Kohorte schwerwiegendere Veränderungen beobachtet wurden. Ein T-Helferzell-Mangel wurde nur in der ICU COVID+ Kohorte beobachtet. Auch wenn einige dieser Unterschiede statistisch nicht signifikant waren, stehen diese Ergebnisse im Einklang mit bisher veröffentlichten Daten.^{127,128,162,163} Es ist bekannt, dass Patienten, die generell eine schwere internistische Krankheit durchmachen, eine „non-virale“ Lymphopenie entwickeln können, und Studien haben gezeigt, dass bei Intensivpatienten eine anhaltende „non-virale“ Lymphopenie ein unabhängiger Risikofaktor für die 28-Tage-Sterblichkeit ist.^{164,165} Die direkt durch SARS-CoV-2-Replikation sowie von der

Immunreaktion des Wirtes verursachten Veränderungen scheinen jedoch komplexeren Mustern zu folgen. Diese Hypothese wurde durch die vorliegende Arbeit bestätigt. Die Mechanismen, die zu einer Dysfunktion des Immunsystems, insbesondere der T-Lymphozyten, führen, scheinen multifaktoriell zu sein und in einem komplexen Zusammenhang mit Überstimulation, übermäßiger Migration, Zellerschöpfung und Hemmung zu stehen.^{58,123,128,166–168} Darüber hinaus scheinen Patienten mit einer schweren Erkrankung einen höheren Anteil an SARS-CoV2-spezifischen CD4+ T-Lymphozyten zu bilden, die ein eingeschränktes Zytokin-Expressionsprofil mit weniger multifunktionalen Zellen und stark exprimierten CTLA-4 aufweisen.¹⁶⁹ Analysen der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von COVID-19-Patienten zeigten eine T-Lymphozytose.^{166–168} Allerdings scheint der Anteil der CD8+ T-Lymphozyten in der Lunge von Patienten mit leichtem Verlauf höher zu sein als bei Patienten mit schwerem Verlauf.¹⁶⁶ Daher kann die Migration allein die ausgeprägte CD8+ T-Lymphopenie bei Patienten mit schwerer Erkrankung nicht vollständig erklären. Sie ist wahrscheinlich zumindest teilweise durch Zytokinsturm-induzierte Apoptose erklärbar.¹¹⁹

Obwohl die ICU COVID+ Kohorte eine geringfügig niedrigere absolute B-Lymphozytenzahl aufwies, zeigten die relativen Zahlen im Vergleich zu allen anderen Gruppen einen höheren B-Zell-Anteil, was auf eine gesteigerte B-Zell-Aktivität schließen lässt. Ähnliche Ergebnisse wurden von anderen Gruppen berichtet, die ebenfalls B-Lymphozytosen und Aktivierungen bei Patienten mit schwerer Erkrankung im Vergleich zu Patienten mit milderer Erkrankung nachweisen konnten.¹²⁴ Hierauf deuten auch die Ergebnisse von TCR- und BCR-Repertoire-Sequenzierungen, wie auch Zytokin-Profile hin.^{170,171} Da in Kohorte 1 die CD8+ T-Lymphozyten im Vergleich zu anderen Zellpopulationen stärker reduziert waren, führten wir eine explorative Analyse des B/T8-Verhältnisses durch, die signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ICU COVID+ (Kohorte 1) und ICU COVID- (Kohorte 3) sowie zwischen den Gruppen ICU COVID+ (Kohorte 1) und NCU COVID+ (Kohorte 2) zeigte, was darauf hindeutet, dass höhere Quotienten nicht nur einen schwereren Krankheitsverlauf vorhersagen, sondern auch die durch SARS-CoV-2 verursachten Immunveränderungen genauer charakterisieren könnten. Interessanterweise zeigte die gepoolte Analyse aller Messwerte im Zeitverlauf in den ICU COVID+ Untergruppen ebenfalls ein signifikant höheres B/T8-Verhältnis in der Gruppe mit schlechtem Outcome. Auch wenn es sich hierbei im Gegensatz zum etablierten T4/T8-Verhältnis nicht um ein häufig verwendetes Zellverhältnis handelt, könnte es zum einfachen Verständnis der Beteiligung von verschiedenen Lymphozytenpopulationen bei schwerem COVID-19 beitragen. Wie bereits erwähnt, kann eine Überstimulation von CD4+ T-Zellen zu einem Zytokinsturm und einer

übermäßigen Migration mit Apoptose von CD8+ T-Zellen führen.^{123,127,167,172} Die Rolle der B-Zellen bei der Exazerbation der Entzündungsreaktion mit Verschlechterung des Krankheitsverlaufs ist weniger bekannt. Obwohl neutralisierende Antikörper eine wichtige Rolle bei der Virusbeseitigung und der Immunität spielen, könnten die Überstimulation von B-Zellen und die Produktion nicht-neutralisierender antiviraler Antikörper zu einem antikörperabhängigen Enhancement (ADE) führen, das die Inflammation und gegebenenfalls die Infektion selbst verschlimmert.^{132,173} Darüber hinaus haben B-Zellen die Funktion professioneller Antigen-präsentierender Zellen, und beeinflussen somit u.a. die Entwicklung von T-Helferzell-Untergruppen sowie von Zytokinexpressionsmustern.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Außerdem können nicht-neutralisierende Antikörper zur Bildung von Immunkomplexen führen, die eine Komplementaktivierung und Gewebeschädigung begünstigen.¹⁷³ Ein kürzlich veröffentlichter Fallbericht über einen Patienten mit vollständiger B-Zell-Depletion nach einer Rituximab-Therapie gibt interessante Einblicke in die Rolle der B-Zellen bei COVID-19.¹⁶⁸ Obwohl über einen längeren Krankheitsverlauf mit persistierendem Fieber und ausbleibender Viruselimination berichtet wurde, entwickelte der Patient nur mäßige Symptome ohne schwere Lymphopenie. In diesem Fall könnte das Fehlen von ADE dazu beitragen, den weniger aggressiven Verlauf der Krankheit zu erklären. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Patienten gemacht, die mit Ibrutinib, einen Hemmer der Bruton-Tyrosinkinase, bei der es sich um ein Glied des B-Zell-Rezeptors-Signalweges handelt, behandelt wurden und die trotz ihrer hämatologischen Grunderkrankungen nur eine leichte Erkrankung entwickelten.¹⁷⁷ Hier ist allerdings anzumerken, dass Ibrutinib nicht spezifisch BTK in B-Zellen inhibiert, sondern auch die T-Zell-Differenzierung und Funktion beeinflusst.^{178,179} Bei allen unseren Patienten kam es im Laufe der Zeit zu einer Umkehrung des Verhältnisses der B/T8 Ratio (von >1 zu <1), was auf eine Immunrestitution hindeutet und vermuten lässt, dass die Immundysfunktion in frühen Stadien höher ist.

Darüber hinaus könnte zusätzlich das Immunglobulinprofil von COVID-19 Patienten mit einer überschießenden Immunantwort in Zusammenhang stehen.¹⁷¹ In diesem Zusammenhang scheinen nicht nur die über die Fab-Domäne-vermittelten Antikörperreaktivitäten eine Rolle zu spielen,¹⁷¹ sondern auch die Ig-Klasse und IgG-Subklassen und deren Glykosylierungen.^{180,181} In unserer Studie fanden wir bei COVID-19 Patienten statistisch signifikant höhere Konzentrationen an IgG3 und IgG1 im Vergleich zu Kontrollpersonen. Es ist bekannt, dass beide IgG-Subklassen zu einer Verstärkung der Entzündung und einer erhöhten Komplementaktivierung führen.¹⁸² Auch wenn wir keine Unterschiede zwischen den beiden COVID+ Kohorten feststellen

konnten, unterstützen diese Ergebnisse die Entwicklung eines SARS-CoV-2 induzierten pro-inflammatorischen, komplementaktivierenden Immunglobulin-Milieus und stimmen mit kürzlich veröffentlichten Daten überein.¹⁸²

Frühere Arbeiten deuten darauf hin, dass das Zytokinmilieu bei Patienten mit schwerer Krankheit intermediäre Monozyten (CD14+/CD16+) stimuliert, die möglicherweise Entzündungen und Gewebeschäden fördern.¹²⁹ In unseren Daten konnten wir keine Vermehrung intermediärer Monozyten nachweisen. Im Gegensatz dazu waren die intermediären Monozyten und aktivierten Monozyten (HLA-DR+/CD14+) in der ICU COVID+ Kohorte im Vergleich zu den anderen Gruppen bei der initialen Bestimmung reduziert. Da die meisten dieser Patienten in einem bereits kritisch kranken Zustand in unser Krankenhaus verlegt wurden, wurden die Monozytenmessungen wahrscheinlich zu einem Zeitpunkt im Krankheitsverlauf durchgeführt, zu dem die Gewebeschädigung durch eingewanderte Monozyten bereits eingetreten sein könnte. Interessanterweise nahmen aktivierte Monozyten in unseren linearen Regressionsmodellen im Laufe der Zeit signifikant zu, was die Vorstellung eines Verbrauchs dieser Zellen in den früheren Stadien der Krankheit stützen könnte. Im Gegensatz dazu nahm die Zahl nicht-klassischer Monozyten (CD14-, CD16+) in der ICU COVID+ Kohorte im Laufe der Zeit ab. Bemerkenswert ist, dass die Untergruppe der ICU-COVID+ Patienten mit negativem Outcome bei Studienbeginn eine geringere Anzahl von Monozyten aufwies als die Überlebenden, was auch auf eine stärkere Gewebemigration zurückzuführen sein könnte, oder aber auch Folge eines Zytokinsturmes. Beim Vergleich der aktivierten Monozyten im zeitlichen Verlauf wiesen ICU COVID+ Patienten mit günstigem Outcome signifikant höhere Zahlen auf als Patienten mit negativem Ausgang.

Ferritin ist als Akute-Phase-Reaktant und Entzündungsmarker bekannt.¹⁸³ Seine Verwendung hat sich bei Krankheiten mit übertriebener systemischer Entzündung wie dem Makrophagenaktivierungssyndrom konsolidiert.^{184,185} Andererseits sind erhöhte IL-6-Werte bei einer Vielzahl von Krankheiten entzündungsfördernd, und seine Verwendung als Entzündungsmarker hat in den letzten Jahren zugenommen.¹⁸⁶ Diese Studie zeigte, dass die Ausgangswerte von IL-6 und Ferritin in der Gruppe der Überlebenden niedriger waren. Eine retrospektive Studie mit COVID-19 Patienten zeigte, dass erhöhte IL-6-Werte (> 20 pg/ml) mit einer erhöhten Sterblichkeit im Krankenhaus korreliert waren.¹⁸⁷ Im Gegensatz dazu zeigte eine andere retrospektive Analyse von 942 Patienten, dass die Ferritinwerte bei Studienbeginn ein schlechter Prädiktor für die Gesamtmortalität sind.¹⁸⁸ In unserem Datensatz schien IL-6 während der Studie nicht zwischen beiden Gruppen zu variieren, während Ferritin in der Gruppe

der Überlebenden durchgehend niedriger war. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu klären, ob die Längsschnittbeobachtung dieser Faktoren ein prognostisches Potenzial bei Patienten mit COVID-19 haben könnte.

Zu den Einschränkungen unserer Studie gehört die geringe Stichprobengröße, insbesondere des Kollektivs der NCU COVID+ Patienten, das aufgrund der in Deutschland implementierten Versorgungsstruktur klein war. Zudem erfolgte die Immuntypisierung der Immunzellen nach klinischen Standards, was zu einer niedrigeren Auflösung führte. Die Charakterisierung der Untergruppen dieser Zellen z.B. Th17, Tregs, T-Zellen mit Expression von Erschöpfungsmarkern, M1/M2-Polarisierung der Monozyten, oder Differenzierung der B-Zellen z.B. naive B-Zellen, Plasmoblasten oder Memory-B-Zellen konnte nicht durchgeführt werden. Aber die in dieser Arbeit verwendeten Charakterisierungen und Methoden bieten vielleicht andererseits den Vorteil einer Robustheit und klinischen Anwendbarkeit. Darüber hinaus nahm unser Krankenhaus als tertiäres Zentrum hauptsächlich komplexe und schwere Fälle auf, während leichte und mittelschwere Fälle in andere Krankenhäuser verlegt- oder ambulant behandelt wurden. Unsere Ausgangsmessungen am Tag der Krankenhausaufnahme entsprechen nicht dem Beginn der Symptome, was wichtige Informationen über die Immunveränderungen in den frühen Stadien der Krankheit hätte liefern können. Zudem, da praktisch alle Patienten mit einer schweren Erkrankung Hydroxychloroquin erhielten, waren wir nicht in der Lage, mögliche Einflüsse der Therapien auf die verschiedenen Zellkompartimente und das Ergebnis im Allgemeinen zu ermitteln.

Zusammenfassend konnten wir in unserer Arbeit zeigen, dass die durch COVID-19 ausgelösten Veränderungen ein spezifisches Immunzellprofil hervorrufen und obwohl einige Merkmale, denen einer schweren Erkrankung im Allgemeinen ähneln, scheinen einige davon spezifisch für SARS-CoV2-Infektionen zu sein. Das T-Zell-Kompartiment ist besonders betroffen, und dramatische Veränderungen bei CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten könnten eine prognostische Rolle spielen. Darüber hinaus scheinen monozytäre Untergruppen und die Dynamik dieser Zellen mit dem Krankheitsverlauf zu korrelieren. Zusätzlich stellen wir das B/T8-Verhältnis als neuen Marker für Immunveränderungen bei schwerem COVID-19 vor. In Anbetracht dieses besonderen Immunprofils von COVID-19 schlagen wir vor, dass die Überwachung der Immunveränderungen in T-Zell-Kompartimenten, Monozyten sowie des B/T8-Verhältnisses ein nützliches Instrument für die Behandlung dieser Patienten sein könnte. Unsere Ergebnisse könnten bei der Entscheidungsfindung für den Einsatz

immunmodulatorischer Therapien auf der Grundlage des Ausmaßes der Immundysfunktion hilfreich sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020 579:7798 **579**, 265–269 (2020).
2. Fehr, A. R. & Perlman, S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. in *Coronaviruses: Methods and Protocols* vol. 1282 1–23 (Springer New York, 2015).
3. Coronavirus | Human Coronavirus Types | CDC. <https://www.cdc.gov/coronavirus/types.html>.
4. Rota, P. A. *et al.* Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**, 1394–1399 (2003).
5. Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* **367**, 1814–1820 (2012).
6. Beniac, D. R., Andonov, A., Grudeski, E. & Booth, T. F. Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 751–752 (2006).
7. Xiao, X., Chakraborti, S., Dimitrov, A. S., Gramatikoff, K. & Dimitrov, D. S. The SARS-CoV S glycoprotein: Expression and functional characterization. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 1159–1164 (2003).
8. Shang, J. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 11727–11734 (2020).
9. Focosi, D. & Maggi, F. Neutralising antibody escape of SARS-CoV-2 spike protein: Risk assessment for antibody-based Covid-19 therapeutics and vaccines. *Rev Med Virol* **31**, (2021).
10. Hirabara, S. M. *et al.* SARS-COV-2 Variants: Differences and Potential of Immune Evasion. *Front Cell Infect Microbiol* **11**, 1401 (2022).
11. Harvey, W. T. *et al.* SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol* **19**, 409–424 (2021).
12. Sheikh, A., McMenamin, J., Taylor, B. & Robertson, C. SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness. *Lancet* **397**, 2461–2462 (2021).
13. Kumar, S., Thambiraja, T. S., Karuppanan, K. & Subramaniam, G. Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of spike protein. *J Med Virol* **94**, 1641–1649 (2022).
14. Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>.
15. Bálint, G., Vörös-Horváth, B. & Széchenyi, A. Omicron: increased transmissibility and decreased pathogenicity. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1 **7**, 1–3 (2022).
16. Zhao, X., Chen, H. & Wang, H. Glycans of SARS-CoV-2 Spike Protein in Virus Infection and Antibody Production. *Front Mol Biosci* **8**, 53 (2021).

17. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280.e8 (2020).
18. Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020).
19. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280.e8 (2020).
20. Shekhar, N. *et al.* In Silico Structure-Based Repositioning of Approved Drugs for Spike Glycoprotein S2 Domain Fusion Peptide of SARS-CoV-2: Rationale from Molecular Dynamics and Binding Free Energy Calculations. *mSystems* **5**, (2020).
21. Wang, K. *et al.* CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2020 5:1 5**, 1–10 (2020).
22. Gao, Y. *et al.* Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science (1979)* **368**, 779–782 (2020).
23. Kumar, V. Understanding the complexities of SARS-CoV2 infection and its immunology: A road to immune-based therapeutics. *International Immunopharmacology* vol. 88 106980 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106980> (2020).
24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Scientific Brief: SARS-CoV-2 and Potential Airborne Transmission | CDC.* (2020).
25. Morawska, L. & Milton, D. K. It Is Time to Address Airborne Transmission of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis* **71**, 2311–2313 (2020).
26. Li, Y. *et al.* Evidence for probable aerosol transmission of SARS-CoV-2 in a poorly ventilated restaurant. *medRxiv* 2020.04.16.20067728 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.20067728> (2020).
27. van Doremalen, N. *et al.* Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine* **382**, 1564–1567 (2020).
28. Liu, Y. *et al.* Stability of SARS-CoV-2 on environmental surfaces and in human excreta. doi:10.1101/2020.05.07.20094805.
29. World Health Organization. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>.
30. Luo, L. *et al.* Modes of contact and risk of transmission in COVID-19 among close contacts. *medRxiv* Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042606> (2020).
31. World Health Organization. *Infection prevention and control of epidemic-and pandemic-prone acute respiratory infections in health care WHO Guidelines.* (2014).

32. Li, Q. *et al.* Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine* **382**, 1199–1207 (2020).
33. He, X. *et al.* Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 1–4 (2020) doi:10.1038/s41591-020-0869-5.
34. Wölfel, R. *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 1–5 (2020) doi:10.1038/s41586-020-2196-x.
35. To, K. K. W. *et al.* Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* **20**, 565–574 (2020).
36. Zou, L. *et al.* SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *New England Journal of Medicine* **382**, 1177–1179 (2020).
37. Wang, W. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 323 1843–1844 Preprint at <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786> (2020).
38. Xiao, F. *et al.* Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* **158**, 1831-1833.e3 (2020).
39. Zhang, W. *et al.* Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect* **9**, 386–389 (2020).
40. Xiao, F. *et al.* Infectious SARS-CoV-2 in feces of patient with severe COVID-19. *Emerg Infect Dis* **26**, 1920–1922 (2020).
41. EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION RECOMMENDATION on a common approach to establish a systematic surveillance of SARS-CoV-2 and its variants in wastewaters in the EU. https://ec.europa.eu/environment/pdf/water/recommendation_covid19_monitoring_wastewaters.pdf.
42. Kumar, V. Emerging Human Coronavirus Infections (SARS, MERS, and COVID-19): Where They Are Leading Us. *International Reviews of Immunology* Preprint at <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1800688> (2020).
43. RKI COVID-19 Germany. <https://experience.arcgis.com/experience/478220a4c454480e823b17327b2bf1d4>.
44. Oran, D. P. & Topol, E. J. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection : A Narrative Review. *Annals of internal medicine* vol. 173 362–367 Preprint at <https://doi.org/10.7326/M20-3012> (2020).
45. Tindale, L. C. *et al.* Transmission interval estimates suggest pre-symptomatic spread of COVID-19. *medRxiv* 2020.03.03.20029983 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.03.03.20029983> (2020).
46. Buitrago-Garcia, D. *et al.* Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARSCoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Medicine* vol. 17 e1003346 Preprint at <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003346> (2020).

47. Verity, R. *et al.* Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis* **20**, 669–677 (2020).
48. Stokes, E. K. *et al.* Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance — United States, January 22–May 30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **69**, 759–765 (2020).
49. RKI - 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=DA5DEBB9C2D448A7EF484702FF89BF72.internet122?nn=2386228#doc13776792bodyText6.
50. World Health Organization. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-2019) February 16-24, 2020. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>.
51. Wu, Z. & McGoogan, J. M. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 323 1239–1242 Preprint at <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648> (2020).
52. Onder, G., Rezza, G. & Brusaferro, S. Case-Fatality Rate and Characteristics of Patients Dying in Relation to COVID-19 in Italy. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 323 1775–1776 Preprint at <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4683> (2020).
53. Takahashi, T. *et al.* Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature* **588**, 315–320 (2020).
54. 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. *International Journal of Infectious Diseases* **99**, 496–504 (2020).
55. Williamson, E. J. *et al.* Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* **584**, 430–436 (2020).
56. Clinical Spectrum | COVID-19 Treatment Guidelines. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>.
57. Feldt, T. *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. doi:10.25646/6539.20.
58. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* **395**, 497–506 (2020).
59. (Brasil), C. N. de S. de S. Segunda fase da pesquisa ‘Evolução da Prevalência de Infecção por Covid-19 no Brasil: Estudo de Base Populacional’. (2020).
60. Butowt, R. & von Bartheld, C. S. Anosmia in COVID-19: Underlying Mechanisms and Assessment of an Olfactory Route to Brain Infection. *Neuroscientist* (2020) doi:10.1177/1073858420956905.

61. Clerkin, K. J. *et al.* COVID-19 and Cardiovascular Disease. *Circulation* vol. 141 1648–1655 Preprint at <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046941> (2020).
62. Wang, D. *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **323**, 1061–1069 (2020).
63. Yang, J. *et al.* Prevalence of comorbidities and its effects in coronavirus disease 2019 patients: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases* **94**, 91–95 (2020).
64. Liu, K. *et al.* Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province. *Chin Med J (Engl)* **133**, 1025–1031 (2020).
65. Chen, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet* **395**, 507–513 (2020).
66. Bilaloglu, S. *et al.* Thrombosis in Hospitalized Patients with COVID-19 in a New York City Health System. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 324 799–801 Preprint at <https://doi.org/10.1001/jama.2020.13372> (2020).
67. Connors, J. M. & Levy, J. H. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood* vol. 135 2033–2040 Preprint at <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2020006000> (2020).
68. Tang, N., Li, D., Wang, X. & Sun, Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **18**, 844–847 (2020).
69. Varga, Z. *et al.* Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *The Lancet* vol. 395 1417–1418 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30937-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30937-5) (2020).
70. Pezzini, A. & Padovani, A. Lifting the mask on neurological manifestations of COVID-19. *Nat Rev Neurol* **16**, 636–644 (2020).
71. Romero-Sánchez, C. M. *et al.* Neurologic manifestations in hospitalized patients with COVID-19: The ALBACOVID registry. *Neurology* **95**, e1060–e1070 (2020).
72. Pinna, P. *et al.* Neurological manifestations and COVID-19: Experiences from a tertiary care center at the Frontline. *J Neurol Sci* **415**, (2020).
73. Liotta, E. M. *et al.* Frequent neurologic manifestations and encephalopathy-associated morbidity in Covid-19 patients. *Ann Clin Transl Neurol* **7**, 2221–2230 (2020).
74. Paterson, R. W. *et al.* The emerging spectrum of COVID-19 neurology: Clinical, radiological and laboratory findings. *Brain* **143**, 3104–3120 (2020).
75. Moriguchi, T. *et al.* A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *International Journal of Infectious Diseases* **94**, 55–58 (2020).
76. Domingues, R. B. *et al.* First case of SARS-COV-2 sequencing in cerebrospinal fluid of a patient with suspected demyelinating disease. *Journal of Neurology* vol. 267 3154–3156 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00415-020-09996-w> (2020).

77. Hirsch, J. S. *et al.* Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int* **98**, 209–218 (2020).
78. Pei, G. *et al.* Renal involvement and early prognosis in patients with COVID-19 pneumonia. *Journal of the American Society of Nephrology* vol. 31 1157–1165 Preprint at <https://doi.org/10.1681/ASN.2020030276> (2020).
79. Puelles, V. G. *et al.* Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *New England Journal of Medicine* **383**, 590–592 (2020).
80. Sterne, J. A. C. *et al.* Association between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality among Critically Ill Patients with COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **324**, 1330–1341 (2020).
81. Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* 1–12 (2020) doi:10.1038/s41577-020-0311-8.
82. Mehta, P. *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet* vol. 395 1033–1034 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0) (2020).
83. Ghosn, L. *et al.* Interleukin-6 blocking agents for treating COVID-19: a living systematic review. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2021**, (2021).
84. Abani, O. *et al.* Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *The Lancet* **397**, 1637–1645 (2021).
85. Olumiant | European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/olumiant>.
86. McInnes, I. B. *et al.* Comparison of baricitinib, upadacitinib, and tofacitinib mediated regulation of cytokine signaling in human leukocyte subpopulations. *Arthritis Res Ther* **21**, 1–10 (2019).
87. Richardson, P. *et al.* Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *The Lancet* vol. 395 e30–e31 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30304-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30304-4) (2020).
88. Hoang, T. N. *et al.* Baricitinib treatment resolves lower airway inflammation and neutrophil recruitment in SARS-CoV-2-infected rhesus macaques Running title: Baricitinib mitigates inflammation in SARS-CoV-2 infected rhesus macaques. *bioRxiv* 2020.09.16.300277 (2020) doi:10.1101/2020.09.16.300277.
89. Kalil, A. C. *et al.* Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. *New England Journal of Medicine* **384**, 795–807 (2021).
90. Marconi, V. C. *et al.* Baricitinib plus Standard of Care for Hospitalized Adults with COVID-19. *medRxiv* 2021.04.30.21255934 (2021) doi:10.1101/2021.04.30.21255934.
91. WHO Solidarity Trial Consortium. Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 — Interim WHO Solidarity Trial Results. *New England Journal of Medicine* **384**, 497–511 (2021).

92. Körper, S. *et al.* Results of the CAPSID randomized trial for high-dose convalescent plasma in patients with severe COVID-19. *J Clin Invest* **131**, (2021).
93. Janiaud, P. *et al.* Association of Convalescent Plasma Treatment with Clinical Outcomes in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **325**, 1185–1195 (2021).
94. Kooistra, E. J. *et al.* Anakinra treatment in critically ill COVID-19 patients: a prospective cohort study. *Crit Care* **24**, (2020).
95. Kyriazopoulou, E. *et al.* Effect of anakinra on mortality in patients with COVID-19: a systematic review and patient-level meta-analysis. *Lancet Rheumatol* **3**, e690–e697 (2021).
96. EMA recommends approval for use of Kineret in adults with COVID-19 | European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-approval-use-kineret-adults-covid-19>.
97. Beigel, J. H. *et al.* Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *New England Journal of Medicine* **383**, 1813–1826 (2020).
98. Wang, M. *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research* vol. 30 269–271 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0> (2020).
99. Fischer, W. *et al.* Molnupiravir, an Oral Antiviral Treatment for COVID-19. *medRxiv* 2021.06.17.21258639 (2021) doi:10.1101/2021.06.17.21258639.
100. Painter, W. P. *et al.* Human Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Molnupiravir, a Novel Broad-Spectrum Oral Antiviral Agent with Activity Against SARS-CoV-2. *Antimicrob Agents Chemother* **65**, (2021).
101. Khoo, S. H. *et al.* Optimal dose and safety of molnupiravir in patients with early SARS-CoV-2: a Phase I, open-label, dose-escalating, randomized controlled study. *J Antimicrob Chemother* **76**, 3286–3295 (2021).
102. Owen, D. R. *et al.* An oral SARS-CoV-2 M pro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science* **374**, 1586–1593 (2021).
103. Hammond, J. *et al.* Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *New England Journal of Medicine* **386**, 1397–1408 (2022).
104. Coronavirus-Infektion (COVID-19) bei Patient*innen mit Blut- und Krebserkrankungen — Onkopedia. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/coronavirus-infektion-covid-19-bei-patient-innen-mit-blut-und-krebserkrankungen/@@guideline/html/index.html>.
105. Xevudy | European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xevudy>.
106. Ronapreve | European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ronapreve>.
107. Evusheld | European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/evusheld>.

108. Cao, Y. *et al.* Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature* **602**, 657–663 (2022).
109. Iketani, S. *et al.* Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Nature* **604**, 7906–7906 (2022).
110. Vanblargan, L. *et al.* An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. (2021) doi:10.21203/RS.3.RS-1175516/V1.
111. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes New Monoclonal Antibody for Treatment of COVID-19 that Retains Activity Against Omicron Variant | FDA. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-new-monoclonal-antibody-treatment-covid-19-retains>.
112. AZD7442 reduced risk of developing severe COVID-19 or death in TACKLE Phase III outpatient treatment trial. <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2021/azd7442-phiii-trial-positive-in-covid-outpatients.html>.
113. O'Brien, M. P. *et al.* Subcutaneous REGEN-COV Antibody Combination to Prevent Covid-19. *New England Journal of Medicine* **385**, 1184–1195 (2021).
114. Self, W. H. *et al.* Efficacy and safety of two neutralising monoclonal antibody therapies, sotrovimab and BRII-196 plus BRII-198, for adults hospitalised with COVID-19 (TICO): a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* **22**, 622–635 (2022).
115. Mallapaty, S. How deadly is the coronavirus? Scientists are close to an answer. *Nature* vol. 582 467–468 Preprint at <https://doi.org/10.1038/d41586-020-01738-2> (2020).
116. Zhang, B. *et al.* Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19. *medRxiv* 2020.02.26.20028191 (2020) doi:10.1101/2020.02.26.20028191.
117. Vabret, N. *et al.* Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity* vol. 52 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002> (2020).
118. Wan, S. *et al.* Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). *medRxiv* 2020.02.10.20021832 (2020) doi:10.1101/2020.02.10.20021832.
119. Diao, B. *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol* **11**, 827 (2020).
120. Wang, H. *et al.* Neutrophil to CD4+ lymphocyte ratio as a potential biomarker in predicting virus negative conversion time in COVID-19. *Int Immunopharmacol* **85**, (2020).
121. Guan, W. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine* **382**, 1708–1720 (2020).
122. He, R. *et al.* The clinical course and its correlated immune status in COVID-19 pneumonia. *Journal of Clinical Virology* 104361 (2020) doi:10.1016/j.jcv.2020.104361.
123. Deng, Z. *et al.* Dynamic changes of peripheral blood lymphocytes subsets in adult patients with COVID-19. *Int J Infect Dis* (2020) doi:10.1016/j.ijid.2020.07.003.

124. Song, J.-W. *et al.* Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. *Nat Commun* **11**, 3410 (2020).
125. Zeng, Q. *et al.* Mortality of COVID-19 is Associated with Cellular Immune Function Compared to Immune Function in Chinese Han Population. *medRxiv* (2020) doi:10.1101/2020.03.08.20031229.
126. Nie, S. *et al.* Metabolic disturbances and inflammatory dysfunction predict severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a retrospective study. *medRxiv* 2020.03.24.20042283 (2020) doi:10.1101/2020.03.24.20042283.
127. Zheng, M. *et al.* Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular and Molecular Immunology* vol. 17 533–535 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2> (2020).
128. XU, B. *et al.* Suppressed T cell-mediated immunity in patients with COVID-19: a clinical retrospective study in Wuhan, China. *Journal of Infection* (2020) doi:10.1016/j.jinf.2020.04.012.
129. Zhou, Y. *et al.* Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *National Science Review* vol. 7 998–1002 Preprint at <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa041> (2020).
130. Narasimhan, P. B., Marcovecchio, P., Hamers, A. A. J. & Hedrick, C. C. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol* **37**, 439–456 (2019).
131. Zhao, J. *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases* (2020) doi:10.1093/cid/ciaa344.
132. Tetro, J. A. Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? *Microbes Infect* **22**, 72–73 (2020).
133. Thurner, L. *et al.* Autoantibodies against Progranulin and IL-1 receptor antagonist due to immunogenic posttranslational isoforms contribute to hyperinflammation in critically ill COVID-19. *bioRxiv* 2021.04.23.441188 (2021) doi:10.1101/2021.04.23.441188.
134. Pfeifer, J. *et al.* Autoantibodies against interleukin-1 receptor antagonist in multisystem inflammatory syndrome in children: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Rheumatol* **4**, e329–e337 (2022).
135. Fajgenbaum, D. C. & June, C. H. Cytokine Storm. *New England Journal of Medicine* **383**, 2255–2273 (2020).
136. Griffin, G., Shenoi, S. & Hughes, G. C. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: An update on pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **34**, (2020).
137. Frey, N. & Porter, D. Cytokine Release Syndrome with Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* **25**, e123–e127 (2019).
138. Del Valle, D. M. *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* **26**, 1636–1643 (2020).

139. Cheng, M. H. *et al.* Superantigenic character of an insert unique to SARS-CoV-2 spike supported by skewed TCR repertoire in patients with hyperinflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 25254–25262 (2020).
140. Hirano, T. & Murakami, M. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. *Immunity* **52**, 731 (2020).
141. Kuba, K. *et al.* A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* **11**, 875–879 (2005).
142. Eguchi, S., Kawai, T., Scalia, R. & Rizzo, V. Understanding Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling in Vascular Pathophysiology. *Hypertension* **71**, 804–810 (2018).
143. Bastard, P. *et al.* Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, (2020).
144. Zhang, Q. *et al.* Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, (2020).
145. Hadjadj, J. *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* **369**, 718–724 (2020).
146. Barnes, B. J. *et al.* Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* **217**, (2020).
147. Tang, K. T., Hsu, B. C. & Chen, D. Y. Autoimmune and Rheumatic Manifestations Associated With COVID-19 in Adults: An Updated Systematic Review. *Front Immunol* **12**, 628 (2021).
148. Paik, P. K. *et al.* Tepotinib in Non–Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations. *New England Journal of Medicine* **383**, 931–943 (2020).
149. Muratori, P., Lenzi, M., Muratori, L. & Granito, A. Antinuclear antibodies in COVID 19. *Clin Transl Sci* **14**, 1627–1628 (2021).
150. Fujii, H. *et al.* High levels of anti-SSA/Ro antibodies in COVID-19 patients with severe respiratory failure: a case-based review: High levels of anti-SSA/Ro antibodies in COVID-19. *Clin Rheumatol* **39**, 3171–3175 (2020).
151. Zhou, Y. *et al.* Clinical and Autoimmune Characteristics of Severe and Critical Cases of COVID-19. *Clin Transl Sci* **13**, 1077–1086 (2020).
152. Vlachoyiannopoulos, P. G. *et al.* Autoantibodies related to systemic autoimmune rheumatic diseases in severely ill patients with COVID-19. *Ann Rheum Dis* **79**, 1661–1663 (2020).
153. Zuo, Y. *et al.* Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci Transl Med* **12**, 3876 (2020).
154. Woodruff, M. C. *et al.* Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nature Immunology* **2020 21:12** **21**, 1506–1516 (2020).
155. Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. & Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237–241 (2006).

156. Tang, W. *et al.* The growth factor progranulin binds to tnf receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science (1979)* **332**, 478–484 (2011).
157. Chen, W. *et al.* SARS-CoV-2 neutralizing antibody levels are correlated with severity of COVID-19 pneumonia. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **130**, 110629 (2020).
158. Wen, J. *et al.* Antibody-dependent enhancement of coronavirus. *International Journal of Infectious Diseases* **100**, 483 (2020).
159. Schmit, T., Klomp, M. & Khan, M. N. The Application of Flow Cytometry for Simultaneous and Multi-parametric Analysis of Heterogenous Cell Populations in Basic and Clinical Research. *Methods Mol Biol* **2223**, 183–200 (2021).
160. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. & Nalbant, A. Flow cytometry: basic principles and applications. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876> **37**, 163–176 (2016).
161. Kos, I. *et al.* Increased B-cell activity with consumption of activated monocytes in severe COVID-19 patients. *Eur J Immunol* **51**, 1449–1460 (2021).
162. Ganji, A., Farahani, I., Khansarinejad, B., Ghazavi, A. & Mosayebi, G. Increased expression of CD8 marker on T-cells in COVID-19 patients. *Blood Cells Mol Dis* **83**, (2020).
163. Shi, H. *et al.* The inhibition of IL-2/IL-2R gives rise to CD8+ T cell and lymphocyte decrease through JAK1-STAT5 in critical patients with COVID-19 pneumonia. *Cell Death Dis* **11**, (2020).
164. Jiang, J. *et al.* Nonviral infection-related lymphocytopenia for the prediction of adult sepsis and its persistence indicates a higher mortality. *Medicine* **98**, e16535 (2019).
165. Adrie, C. *et al.* Persistent lymphopenia is a risk factor for ICU-acquired infections and for death in ICU patients with sustained hypotension at admission. *Ann Intensive Care* **7**, 30 (2017).
166. Liao, M. *et al.* The landscape of lung bronchoalveolar immune cells in COVID-19 revealed by single-cell RNA sequencing. *medRxiv* 2020.02.23.20026690 (2020) doi:10.1101/2020.02.23.20026690.
167. Wang, F. *et al.* Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis* **221**, 1762–1769 (2020).
168. Kos, I. *et al.* Prolonged Course of COVID-19-Associated Pneumonia in a B-Cell Depleted Patient After Rituximab. *Front Oncol* **10**, 1578 (2020).
169. Schub, D. *et al.* High levels of SARS-CoV-2 specific T-cells with restricted functionality in patients with severe course of COVID-19. *medRxiv* 2020.07.08.20148718 (2020) doi:10.1101/2020.07.08.20148718.
170. Herr, C. *et al.* Distinct Patterns of Blood Cytokines Beyond a Cytokine Storm Predict Mortality in COVID-19. *J Inflamm Res* **14**, 4651 (2021).

171. Schultheiß, C. *et al.* Next-Generation Sequencing of T and B Cell Receptor Repertoires from COVID-19 Patients Showed Signatures Associated with Severity of Disease. *Immunity* **53**, 442-455.e4 (2020).
172. Soy, M. *et al.* Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin Rheumatol* **39**, 2085 (2020).
173. Lee, W. S., Wheatley, A. K., Kent, S. J. & DeKosky, B. J. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. *Nat Microbiol* **5**, 1185–1191 (2020).
174. Wilson, C. L. *et al.* Presentation of the candidate rheumatoid arthritis autoantigen aggrecan by antigen-specific B cells induces enhanced CD4(+) T helper type 1 subset differentiation. *Immunology* **135**, 344–354 (2012).
175. Ghosh, D., Jiang, W., Mukhopadhyay, D. & Mellins, E. D. New insights into B cells as antigen presenting cells. *Curr Opin Immunol* **70**, 129–137 (2021).
176. Duncan, D. D. & Swain, S. L. Role of antigen-presenting cells in the polarized development of helper T cell subsets: evidence for differential cytokine production by Th0 cells in response to antigen presentation by B cells and macrophages. *Eur J Immunol* **24**, 2506–2514 (1994).
177. Treon, S. P. *et al.* The BTK inhibitor ibrutinib may protect against pulmonary injury in COVID-19–infected patients. *Blood* **135**, 1912–1915 (2020).
178. Long, M. *et al.* Ibrutinib treatment improves T cell number and function in CLL patients. *J Clin Invest* **127**, 3052 (2017).
179. Davis, J. E. *et al.* Ibrutinib protects T cells in patients with CLL from proliferation-induced senescence. *J Transl Med* **19**, 1–13 (2021).
180. Chakraborty, S. *et al.* Proinflammatory IgG Fc structures in patients with severe COVID-19. *Nature Immunology* **22**, 67–73 (2020).
181. Yates, J. L. *et al.* Serological analysis reveals an imbalanced IgG subclass composition associated with COVID-19 disease severity. *Cell Rep Med* **2**, (2021).
182. Mazzoni, A. *et al.* Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. *Journal of Clinical Investigation* **130**, 4694–4703 (2020).
183. Baynes, R., Bezwoda, W., Bothwell, T., Khan, Q. & Mansoor, N. The non-immune inflammatory response: serial changes in plasma iron, iron-binding capacity, lactoferrin, ferritin and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest* **46**, 695–704 (1986).
184. Ruscitti, P. *et al.* Increased level of H-ferritin and its imbalance with L-ferritin, in bone marrow and liver of patients with adult onset Still's disease, developing macrophage activation syndrome, correlate with the severity of the disease. *Autoimmun Rev* **14**, 429–437 (2015).
185. Brands, X. *et al.* Plasma Ferritin as Marker of Macrophage Activation-Like Syndrome in Critically Ill Patients With Community-Acquired Pneumonia. *Crit Care Med* **49**, 1901–1911 (2021).
186. Rincon, M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol* **33**, 571–577 (2012).

187. Luo, M. *et al.* IL-6 combined with CD8+ T cell count early predict in-hospital mortality for patients with COVID-19. *JCI Insight* **5**, (2020).
188. Feld, J., Tremblay, D., Thibaud, S., Kessler, A. & Naymagon, L. Ferritin levels in patients with COVID-19: A poor predictor of mortality and hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Int J Lab Hematol* (2020) doi:10.1111/ijlh.13309.

7. Publikationen und Danksagung

7.1 Publikationen

Kos I, Balensiefer B, Roth S, Ahlgrimm M, Sester M, Schmidt T, et al. **Prolonged Course of COVID-19-Associated Pneumonia in a B-Cell Depleted Patient After Rituximab.** Front Oncol. 2020 Sep 2;10:1578.

Kos I, Balensiefer B, Lesan V, et al. **Increased B-cell activity with consumption of activated monocytes in severe COVID-19 patients.** Eur J Immunol. 2021 Jun;51(6):1449-1460.

Lesan V, Bewarder M, Metz C, Becker A, Mang S, Regitz E, Thurner L, Neumann F, Kos I, Christofyllakis K, Danziger G, Stilgenbauer S, Bals R, Lepper PM, Kaddu-Mulindwa D, Rixecker T. **Killer immunoglobulin-like receptor 2DS5 is associated with recovery from coronavirus disease 2019.** Intensive Care Med Exp. 2021 Sep 3;9(1):45.

Pfeifer J, Thurner B, Kessel C, Fadle N, Kheiroddin P, Regitz E, Hoffmann MC, Kos IA, Preuss KD, Fischer Y, Roemer K, Lohse S, Heyne K, Detemple MC, Fedlmeier M, Juenger H, Sauer H, Meyer S, Rohrer T, Wittkowski H, Becker SL, Masjosthusmann K, Bals R, Gerling S, Smola S, Bewarder M, Birk E, Keren A, Böhm M, Jakob A, Abdul-Khaliq H, Anton J, Kabesch M, Pino-Ramirez RM, Foell D, Thurner L. **Autoantibodies against interleukin-1 receptor antagonist in multisystem inflammatory syndrome in children: a multicentre, retrospective, cohort study.** Lancet Rheumatol. 2022 May;4(5):e329-e337.

Thurner, L., Kessel, C., Fadle, N., Regitz, E., Seidel, F., Kindermann, I., Lohse, S., Kos, I., Tschöpe, C., Kheiroddin, P., Kiblboeck, D., Hoffmann, M.-C., Bette, B., Carbon, G., Cetin, O., Preuss, K.-D., Christofyllakis, K., Bittenbring, J. T., Pickardt, T., ... Klingel, K. (2022). **IL-1RA Antibodies in Myocarditis after SARS-CoV-2 Vaccination.** New England Journal of Medicine, 387.

Thurner, L., Fadle, N., Regitz, E., Preuss, K.-D., Neumann, F., Cetin, O., Schormann, C., Hoffmann, M.-C., Herr, C., Kheiroddin, P., Rixecker, T. M., Bals, R., Muller, S., Thurner, B., Kessel, C., Kabesch, M., Bewarder, M., Heyne, K., Lensch, C., & **Kos, I. A.** (2022). **Autoantibodies against SUMO1-DHX35 in long-COVID.** Journal of Translational Autoimmunity, 5, 100171. <https://doi.org/10.1016/J.JTAUTO.2022.100171>

7.2 Danksagung

Dieses Projekt wäre nicht möglich ohne die unermüdliche Arbeit aller Mitarbeiter des Gesundheitssystems, die Patienten mit COVID-19 behandelten und sich dabei oft selbst Risiken aussetzten. Das gilt insbesondere für die vielen anderen Pflegepersonal, Ärzte und Krankenhausmitarbeiter, die während der Pandemien ihr Leben verloren haben. Ich danke ihnen vielmals. Besonders im Universtätsklinikum des Saarlandes bedanke ich mich bei dem medizinischen Personal der beiden internistischen Intensivstationen und der INF-Station, deren Arbeit die Gewinnung von Proben und klinischen Daten ermöglichte. Mein großer Dank gilt auch den Klinikdirektoren der Inneren Medizin während der Pandemie, insbesondere Prof. Stephan Stilgenbauer, Prof. Robert Bals, Prof. Michael Böhm und Prof. Frank. Lammert.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Betreuer, PD Moritz Bewarder sowie meinem Doktorvater PD. Lorenz Thurner, die mich ermutigt haben, diese Arbeit zu verfolgen und mir in den Zeiten der Schwierigkeiten mit der Sprache oder mit der Zusammenführung von Arbeit und Forschung unterstützt haben

Ich danke auch meinen Kolleginnen und Kollegen aus der Klinik für Innere Medizin I und ganz besonders dem Team des hämatologischen Labors, die mir bei dieser Arbeit so sehr geholfen haben.

Natürlich wäre das alles nicht möglich ohne die liebevolle Unterstützung meiner Familie, insbesondere meiner Frau Marcela, meiner Eltern, Yara und Marco, und meines Bruders, Tiago, die mir trotz der Entfernung von mehreren Kilometern geholfen haben, die Pandemien zu überstehen und dieses Projekt zu vervollständigen.

Diese Promotionsarbeit ist allen Patienten und Gesundheitsfachkräfte gewidmet, die während der Pandemien ihr Leben verloren haben.

8. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 12.06.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Lorenz Thurner

Prof. Martina Sester