

Aus dem
Max von Pettenkofer-Institut
Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)
Lehrstuhl für Virologie
Vorstand: Prof. Dr. med. Oliver T. Keppler



Etablierung, Evaluierung und klinisch-epidemiologische Anwendung virologisch-diagnostischer Methoden während der SARS-CoV-2-Pandemie

Kumulative Habilitationsschrift
vorgelegt von

Dr. med. Andreas Osterman

im Jahr 2023

Inhalt

1. Zusammenfassung	2
2. Einleitung.....	4
3. Zielsetzung	5
4. Wissenschaftliche Projekte/Diskussion der eigenen Arbeit.....	6
4.1. Nukleinsäure-Amplifikations-Technik-basierte Direktnachweisverfahren	6
4.2. Antigen-basierte Direktnachweisverfahren.....	10
4.3. Indirekte Direktnachweisverfahren	13
4.3.1. Sero-epidemiologische Studien	13
4.3.2. Bestimmung des SARS-CoV-2-Antikörperspezifitäts-Index.....	16
5. Danksagung.....	19
6. Abkürzungen	20
7. Liste der für die Habilitation zusammengefassten Arbeiten	21
Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor.....	21
Originalarbeiten als Koautor	22
Kasuistiken/Case Reports.....	23
8. Referenzen.....	24

1. Zusammenfassung

Die Ausbreitung des Ende 2019 in China neu aufgetretenen Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) entwickelte sich in kurzer Zeit zu der wissenschaftlich bislang am intensivsten erforschten Pandemie eines viralen respiratorischen Erregers. Basis dieser weltweiten Forschungsbestrebungen war die Verfügbarkeit geeigneter virologisch-diagnostischer Methoden. Nur so war es möglich die klinischen und epidemiologischen Aspekte dieser Infektion rasch und umfassend zu verstehen.

Die im Folgenden beschriebene kumulative Habilitationsschrift befasst sich mit wissenschaftlichen Erkenntnissen aus insgesamt 17 Originalarbeiten, die Zielsetzungen aus vier Hauptthemenbereichen zur Etablierung, Evaluierung und klinisch-epidemiologische Anwendung virologisch-diagnostischer Methoden während der SARS-CoV-2-Pandemie untersucht haben.

Mittels Nukleinsäure-Amplifikations-Technik-basierter Direktnachweisverfahren wurden Proben von COVID-19-Patienten aus verschiedenen Organsystemen untersucht. In longitudinalen respiratorischen Proben, wie Nasopharynx-Abstrichen und endotrachealer Absaugungen von mild/moderat und schwer verlaufenden SARS-CoV-2-Infektionen, konnte gezeigt werden, dass schwer Erkrankte und immunsupprimierte Lymphompatienten signifikant mehr und länger Virus-RNA ausscheiden. Die Analyse verschiedener Entzündungsparameter dieser Patientengruppen gab einen Hinweis auf die Bedeutung hoher Zytokin-Konzentrationen in der Pathogenese schwer COVID-19-Verläufe. Untersuchungen von Proben der ableitenden Harnwege und des Auges bestätigten einen möglichen Tropismus von SARS-COV-2 in diesen Organsystemen, welche Grundlage für Studien auftretender COVID-19-Symptome wie Pollakisurie und Konjunktivitis waren, aber auch Hygieneempfehlungen für Untersucher und Behandler der entsprechenden medizinischen Fachbereiche begründeten.

Zur Evaluierung Antigen-basierter Direktnachweisverfahren wurden insgesamt 11 Antigen Schnelltests und vier automatisierte kommerzielle Tests mittels Abstrichproben und angezüchtetem SARS-CoV-2 verglichen. Die Analysen von point-of-care Testen konnten zeigen, dass sich die ermittelte klinische Sensitivität deutlich von der durch die Hersteller angegebenen Werte unterscheidet und eine signifikant schlechtere Erkennung der

Omikron Variant of concern nach Bestimmung der analytischen Sensitivitäten bei verschiedenen Antigenschnelltests zu verzeichnen war. Automatisierte Antigentests zeigten diesbezüglich teilweise eine höhere Leistungsfähigkeit basierend auf der Möglichkeit einer semi-/quantitativen Untersuchung und individuellen cut-off Anpassung.

In zwei Sero-epidemiologischen Studien an über 7000 Beschäftigten des LMU Klinikums konnte die Leistungsfähigkeit neuer Labormethoden zum indirekten SARS-CoV-2 Nachweis mittels Antikörperdetektion untersucht werden. Die auf diese Weise zuverlässig detektierten Infektionen konnten in Verbindung mit detaillierten Fragebögen in den untersuchten Kohorten ein Risikoprofil für Beschäftigte im Gesundheitswesen kartieren. Das statistisch bestimmte, höchste Risiko für eine SARS-CoV-2 Infektion während der ersten pandemischen Welle hatten demnach Personen, die entweder männlich, Pflegekräfte von COVID-19 Schwerpunktstationen oder Nichtraucher waren oder bekannte Risikokontakte hatten. Durch weitergehende serologische Analysen wurde gezeigt, dass sowohl eine vorbestehende Immunität gegen saisonale Coronaviren aber auch die Höhe der gemessenen SARS-CoV-2-spezifischen Antikörper mit Empfänglichkeit, Schwere des Verlaufs oder Langzeiteffekten einer SARS-CoV-2-Infektion in Verbindung stehen.

Der vierte Hauptthemenbereich dieser Habilitationsarbeit baut auf der Anwendung bereits präpandemisch entwickelter Auswertemethoden zur verbesserten Liquor/Serum-Diagnostik auf. Nach Verfügbarwerden entsprechend geeigneter serologischer Testsysteme zu Beginn der SARS-CoV-2-Pandemie erlaubten diese Rechenalgorithmen eine rasche Etablierung der Bestimmung eines SARS-CoV-2-Antikörperspezifitäts-Index bei COVID-19-Patienten mit ZNS-Symptomatik.

Der Inhalt dieser Habilitationsschrift gliedert sich in eine kurze Einleitung und Übersicht relevanter Aspekte der SARS-CoV-2-Pandemie (Kapitel 2), die Formulierung der Forschungsziele und anschließende Zusammenfassung der einzelnen Forschungsprojekte (Kapitel 3 und 4 mit Unterpunkten) sowie Diskussion der Bedeutung der erhobenen Daten. Abschließend sind Sonderdrucke der in Fachzeitschriften veröffentlichten Originalarbeiten angefügt (Kapitel 9).

2. Einleitung

Bereits Ende des Jahres 2019 wurde die WHO von der chinesischen Stadt Wuhan über eine Ansammlung von Fällen einer Lungenentzündung unklarer Ursache informiert (1). In den folgenden Wochen und Monaten war eine dramatische regionale und globale Zunahme registrierter Fälle zu verzeichnen, sodass am 11. März 2020 die WHO den Beginn einer Pandemie ausrief. Als verursachender Erreger war bereits im Januar 2020 Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) identifiziert worden und die hierdurch verursachte Krankheit international als COVID-19 (Coronavirus disease 2019) bezeichnet (2). Es handelt sich um die innerhalb kürzester Zeit am besten überwachte und untersuchte Ausbreitung eines viralen Erregers jemals (3). Weltweite Diagnostik- und Forschungsinitiativen, sowie nationale und internationale Netzwerke generierten einen rasanten Zuwachs an Wissen über diesen bisher unbekanntem Erreger (4). Bereits etablierte Methoden wurden sowohl in Forschungslaboren als auch kommerziellen Einrichtungen genutzt, um zum einen die Funktionsweise des Virus zu charakterisieren, aber auch um diagnostische Methoden den zunehmend überlasteten Gesundheitssystemen zur Verfügung zu stellen (5). In der klinischen Virologie bestand somit ein hoher Bedarf an der raschen Entwicklung und Anpassung von diagnostischen Werkzeugen, die zur Identifizierung von infizierten Personen notwendig waren (6). Behördliche und politische Entscheidungsträger waren nur so in der Lage, Maßnahmen zur Steuerung der Pandemie sinnvoll einzusetzen und deren Wirksamkeit zu bewerten (7). Die Bewertung und Evaluation der eingesetzten Methoden war somit auch eine zeitkritische und hochrelevante Aufgabe virologischer Institute während der COVID-19-Pandemie. Methoden für den Direktnachweis von SARS-CoV-2 wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (8) oder Antigentest (9), aber auch für den indirekten Nachweis virusspezifischer Antikörper nach durchgemachter Infektion (10) waren hiervon betroffen. Der diagnostische Einsatz ermöglichte so ein Nachverfolgen von Infektionsketten und die Charakterisierung der Übertragung und Ausscheidung des Virus bei Infizierten (11). Mittels Sequenzierungen des Virusgenomes im Next-Generation-Sequencing (NGS) konnte eine genaue epidemiologische Analyse des Infektionsgeschehens vorgenommen werden (12). Sogenannte Sero-Surveys konnten von Infektionsepidemiologen genutzt werden, um in bestimmten Populationen unbemerkte Infektionen rückblickend zu identifizieren und so Risikokonstellationen für Infektionen aufzudecken (13). Aufgrund der drohenden

Überlastung des Gesundheitswesens in der Pandemie war der Schutz von Personal im Gesundheitssystem von hoher Wichtigkeit und wurde gezielt untersucht (14). In dieser Arbeit wird die rasche Etablierung und Evaluierung virologisch-diagnostischer Methoden aus verschiedenen Bereichen dargestellt und hoch aktuelle klinisch-epidemiologische Anwendung dieser während der ersten zwei Jahre der SARS-CoV-2-Pandemie für ausgewählte Bereiche ausgeführt.

3. Zielsetzung

Diese Habilitationsarbeit basiert auf vier wesentlichen Studienbereichen:

(1) Untersuchungen verschiedener **COVID-19-Patienten-Proben aus unterschiedlichen Organsystemen** mit den folgenden Schwerpunkten:

- Beschreibung der Dynamik der Ausscheidung von SARS-CoV-2-RNA in verschiedenen Organsystemen
- Untersuchung von Zusammenhängen der SARS-CoV-2-Ausscheidung und des COVID-19-Krankheitsverlauf
- Ableiten von immun- und pathophysiologischen Zusammenhängen im Verlauf einer COVID-19-Erkrankung
- Beurteilung der ausgeschiedenen SARS-CoV-2-RNA-Menge verschiedener Organsysteme in Hinblick auf das Infektionsrisiko direkter Kontaktpersonen

(2) Untersuchung von Abstrichproben mittels verschiedener **Antigenschnelltests und automatisierter Antigentests** für SARS-CoV-2 mit folgenden Schwerpunkten:

- Beschreibung der klinischen und analytischen Sensitivität
- Beurteilung und Bewertung der Spezifität
- Erfassung Varianten-spezifischer Unterschiede in der Leistungsfähigkeit der Testsysteme
- Charakterisierung der Messdynamik automatisier SARS-CoV-2-Antigentests

(3) Untersuchungen von Serumproben von COVID-19-Patienten zum **Nachweis SARS-CoV-2-spezifischer Antikörper** mit den folgenden Schwerpunkten:

- Validierung serologischer Tests zur Detektion von Anti-SARS-CoV-2-Nukleokapsid und Spike-Antikörpern
 - Erhebung sero-epidemiologischer Daten während der ersten pandemischen Welle zur Beurteilung der Inzidenz und Ermittlung von Risikofaktoren unter Angestellten des Gesundheitswesens
 - Charakterisierung Coronavirus-spezifischer Antikörper-Reaktivität und Korrelation mit dem klinischen Verlauf vor und nach der Infektion
- (4) Untersuchung von Serum-Liquor-Probenpaaren zur Bestimmung des **SARS-CoV-2 Antikörperspezifitäts-Index (AI)**
- Etablierung und Evaluierung von Rechenalgorithmen zur Standard-unabhängigen AI-Bestimmung
 - Verbesserung der Präzision der AI-Bestimmung durch postanalytische Berechnungen
 - Anwendung der neuen Methodik zur Bestimmung des SARS-CoV-2-spezifischen AIs

4. Wissenschaftliche Projekte/Diskussion der eigenen Arbeit

Im Nachfolgenden werden die einzelnen Bestandteile dieser kumulativen Habilitationsschrift inhaltlich zusammengefasst. Die Diskussion bezieht sich auf insgesamt 17 Originalarbeiten und Fallberichte in PubMed-gelisteten Journalen mit Peer-Review-Verfahren, wobei ich bei acht Publikationen als Erstautor fungierte. Es werden die wichtigsten Studienergebnisse kurz dargestellt, nachdem die inhaltlichen Zusammenhänge eingangs bereits erläutert wurden. Die jeweilige Relevanz wird kurz erläutert, für die ausführliche Diskussion der Inhalte verweise ich auf die Sonderdrucke der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Originalarbeiten im Kapitel 6 und 7.

4.1. Nukleinsäure-Amplifikations-Technik-basierte Direktnachweisverfahren

[Dynamics of SARS-CoV-2 shedding in the respiratory tract depends on the severity of disease in COVID-19 patients.](#)

Die Ausscheidung von SARS-CoV-2 über den Respirationstrakt erlaubt die Anwendung einer PCR-Methode aus respiratorischem Material um die Infektion eines Patienten

nachzuweisen. In einer retrospektiven Analyse am LMU Klinikum wurden von 41 Patienten mit schwerem COVID-19-Verlauf sowie 51 Patienten mit mildem/moderatem Verlauf die Ausscheidungsdynamiken in respiratorischen Proben verglichen. Hier zeigte sich, dass schwer Erkrankte ab der zweiten Krankheitswoche signifikant mehr Virus ausscheiden und diese Ausscheidung auch signifikant länger als 17 Tage anhält.

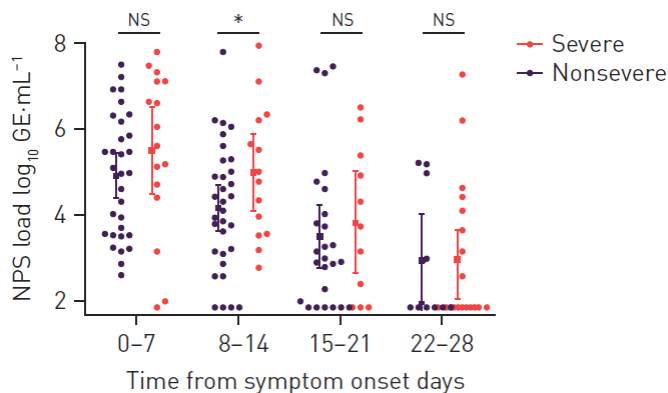


Abbildung 1: Vergleich der Virusausscheidung (GE: Genom-Äquivalente) in Nasopharynx (NPS)-Abstrichproben bei Patienten mit „nicht-schwerer“ und „schwerer“ Erkrankung in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Auftreten von Symptomen. "Nicht-schwer" umfasst "leichte und mittelschwere" Verläufe. Fehlerbalken zeigen Mittelwert \pm SD. p-Werte wurden mit dem t-Test berechnet. *: $p < 0.05$; NS: nicht signifikant

Quelle: Munker, Osterman et al., Eur Respir J. 2021

Gleichzeitige Analysen des zeitlichen Verlaufs verschiedener Entzündungsparameter konnten ebenso einen Unterschied der Pathogenese abhängig von der Symptomschwere bestätigen.

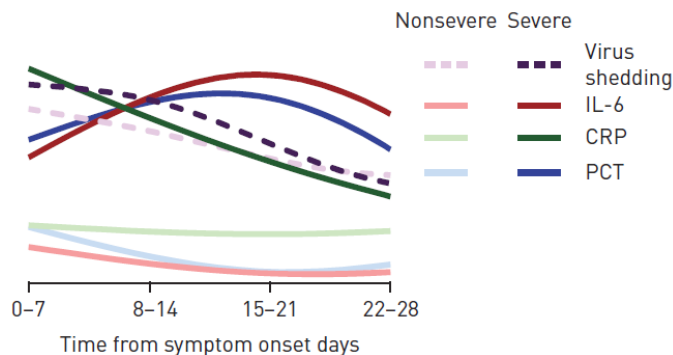


Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der Entzündungsreaktion bei Patienten mit nicht-schwerer und schwerer Erkrankung; Repräsentativer Überblick über den Längsschnittverlauf der Entzündungsparameter und der Virusausscheidung in NPS-Proben. Für die Kurvenanpassung wurde ein Spline mit vier Knotenpunkten berechnet.

Quelle: Munker, Osterman et al., Eur Respir J. 2021

Diese Studie trägt somit nicht nur Erkenntnisse zum Verständnis verschiedener Krankheitsverläufe bei, sondern weist auch auf die potenzielle Gefahr einer verlängerten Infektiosität und Notwendigkeit der überwachten Isolation von Patienten mit schweren COVID-19-Verläufen hin. So können möglicherweise Folgeinfektionen auch bei betreuendem Krankenhauspersonal und Angehörigen vermieden werden.

[COVID-19 in Patients Receiving CD20-depleting Immunochemotherapy for B-cell Lymphoma.](#)

Eine besondere Subgruppe von Patienten mit schwerem COVID-19-Verlauf stellen immunsupprimierte Patienten dar. In einer Studie in Kooperation mit der Medizinischen Klinik und Poliklinik III wurde bei Patienten unter B-Zell-depletierender Therapie und gleichzeitiger SARS-CoV-2-Infektion ebenso festgestellt, dass diese signifikant länger SARS-CoV-2 im Respirationstrakt ausscheiden als Patienten der Kontrollgruppe (alters- und geschlechtsgleiche Patienten ohne Lymphom, die aufgrund von COVID-19 im Krankenhaus behandelt wurden). Dies ist einerseits auf die Unfähigkeit eine dauerhafte SARS-CoV-2-Antikörperreaktion aufzubauen zurückzuführen, aber auch auf zahlreiche Dysregulationen des Immunsystems dieser Lymphompatienten, welche in dem Manuskript ausführlich dargestellt werden.

[Urinary Frequency as a Possibly Overlooked Symptom in COVID-19 Patients: Does SARS-CoV-2 Cause Viral Cystitis?](#)

und

[Dynamics of urinary and respiratory shedding of Severe acute respiratory syndrome virus 2 \(SARS-CoV-2\) RNA excludes urine as a relevant source of viral transmission.](#)

und

[Spatially resolved qualified sewage spot sampling to track SARS-CoV-2 dynamics in Munich - One year of experience.](#)

Aufgrund der klinischen Symptomatik der Pollakisurie in einer Fallserie wurde in Kooperation mit der Urologischen Klinik und Poliklinik am LMU Klinikum das Ausscheidungsverhalten von SARS-CoV-2-RNA über den Harntrakt untersucht. Auch wenn der positive Nachweis der Expression des ACE2-Virusrezeptors in Geweben des Urogenitaltrakts

nachgewiesen werden konnte, konnten nur geringe Mengen SARS-CoV-2-RNA bei wenigen Patienten (5 von 64 Patienten, zumeist in der initialen Probe bei schweren COVID-19-Verläufen) im Urin nachgewiesen werden (5 von 199 Proben). Die Menge und Dynamik der SARS-CoV-2-RNA-Ausscheidung lassen keinen relevanten Übertragungsweg über die Harnwege vermuten, sodass eine Untersuchung aus respiratorischem Material vor einer Zystoskopie oder anderen endo-urologischen Verfahren ausreicht, um behandelnde Urologen unter angemessenen hygienischen Bedingungen vor SARS-CoV-2 Infektionen zu schützen.

Von Infizierten über den Urin, aber auch Stuhl ausgeschiedene SARS-CoV-2-RNA wurde im Laufe der Pandemie häufig zur Überwachung im Sinne „Abwasser-basierter Epidemiologie“ genutzt. In einer Zwischenauswertung solcher Erhebungen in Kooperation mit dem Institut für Tropenmedizin des LMU Klinikums konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der RNA-Quantitäten von SARS-CoV-2 in verschiedenen Gebieten Münchens gut mit den offiziell gemeldeten, regionalen 7-Tage-Inzidenzdaten korreliert. Auch eine Vorhersage der Dynamik und Früherkennung von neu auftretenden besorgniserregender Varianten (VoC) unterstreicht das Potenzial dieser Surveillance-Methode.

[Detection of SARS-CoV-2-RNA in post-mortem samples of human eyes.](#)

Ob in gleicherweise Ophthalmologen bei der Untersuchung oder Intervention/Operation am Auge einem Infektionsrisiko ausgesetzt sind, konnte eine Studie an 20 Leichen und post-mortem entnommenen Proben des Auges untersuchen: SARS-CoV-2-RNA wurde in 10 konjunktivalen (50%) und 6 vitrealen (30%) Proben nachgewiesen. Somit stellen diese Ergebnisse einen relevanten Anhaltspunkt für die behandelnden Augenärzte dar, welche sich bei entsprechendem Patientenkontakt vor Infektionen über diese Körperflüssigkeiten schützen sollten. Des Weiteren ist diese Studie Basis von Untersuchungen, welche sich mit der klinischen Bedeutung dieser Nachweise beschäftigen. Dies schließt Studien über mögliche Übertragungswege aber auch Tropismus des Virus in verschiedenen Geweben des Auges ein, um so die Korrelation des Schweregrads okulärer Manifestationen mit der Schwere des COVID-19 Verlaufs auch in Hinblick auf das post-COVID-Syndrom zu verstehen.

4.2. Antigen-basierte Direktnachweisverfahren

[Evaluation of two rapid antigen tests to detect SARS-CoV-2 in a hospital setting.](#)

und

[Comparison of four commercial, automated antigen tests to detect SARS-CoV-2 variants of concern.](#)

und

[Impaired detection of omicron by SARS-CoV-2 rapid antigen tests.](#)

In der nationalen Teststrategie (Testverordnung des Bundesministeriums für Gesundheit) wurden Antigenschnelltests (AGST) eine zentrale Rolle eingeräumt, um potenziell infektiöse Patienten zu identifizieren. Hierzu wurde nicht nur eine Anwendung durch medizinisches Personal, sondern auch Laien zugelassen. Aufgrund des hohen Bedarfs dieser PCR-Ressourcen-schonenden Testalternative wurden die Kriterien für die Inverkehrbringung und Erstattungsfähigkeit vorerst anhand von Herstellerangaben definiert. Erst später erfolgte eine unabhängige Evaluation und Bewertung der Leistungsfähigkeit der AGST federführend durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI). Die durch die Hersteller propagierten hohen klinischen Sensitivitäten führten zu einer Fehlinformation der Bevölkerung und eine korrekte Einschätzung der Bedeutung eines AGST-Ergebnisses erwies sich bis zuletzt als schwierig. In zwei unabhängigen, retrospektiven Laborstudien an gelagerten Einzelabstrichproben untersuchten wir in klinischen Kohorten sowohl die klinische als auch analytische Sensitivität von insgesamt 11 AGST und konnten zeigen, dass diese sich dramatisch von den Angaben der Hersteller, aber auch der am PEI durchgeführten Evaluation an gepoolten Proben unterschieden.

Assay	Sample description	Sensitivity (%)	95% CI (%)	Positive/Total
STANDARD F COVID-19 Ag FIA	Primary diagnosis	60.85	53.74–67.52	115/189
	Follow-up	30.21	24.15–37.04	58/192
	Total	45.41	40.48–50.43	173/381
SARS-CoV-2 Rapid Ag Test	Primary diagnosis	64.45	58.42–70.06	165/256
	Follow-up	31.21	25.04–38.14	59/189
	Total	50.34	45.71–54.96	224/445

Quelle: Osterman, Baldauf et al., *Med Microbiol Immunol.* 2021

Tabelle 1: Bestimmung der Assay-Sensitivität für zwei handelsübliche SARS-CoV-2-Antigentests bei SARS-CoV-2-PCR-positiven Atemwegsabstrichen, die bei der Primärdiagnose oder der Nachuntersuchung während des Krankenhausaufenthalts entnommen wurden (Binomiale Konfidenzintervalle wurden unter Verwendung des Wilson-Score-Intervalls berechnet).

Auch die unterschiedliche Erkennung des SARS-CoV-2-Nukleokapsidproteins verschiedener *Variants of concern* (VoC) wurde im Rahmen unserer Studie für die Omikron-Variante veröffentlicht.

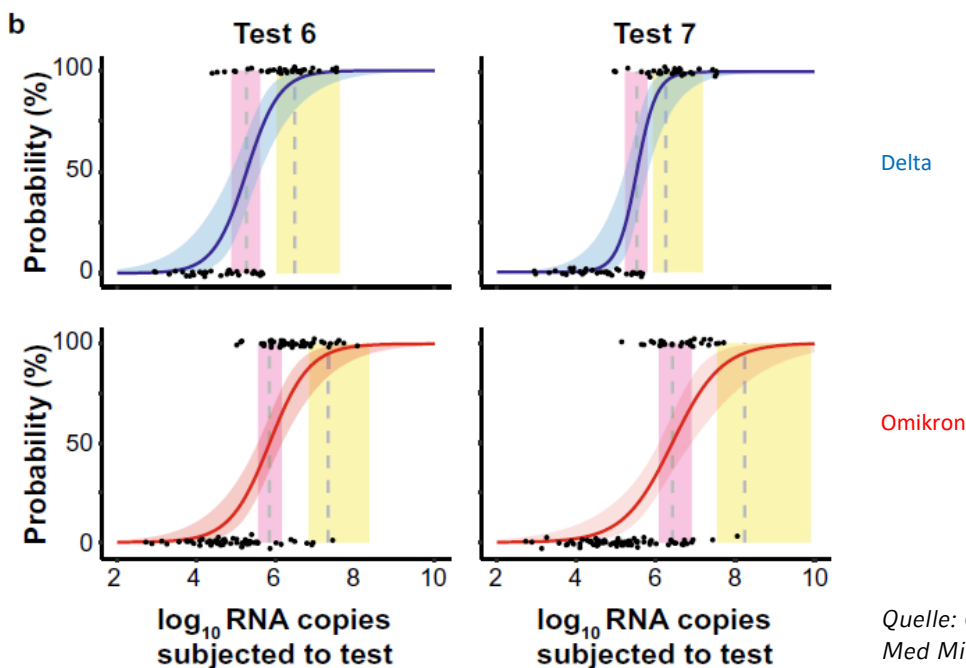
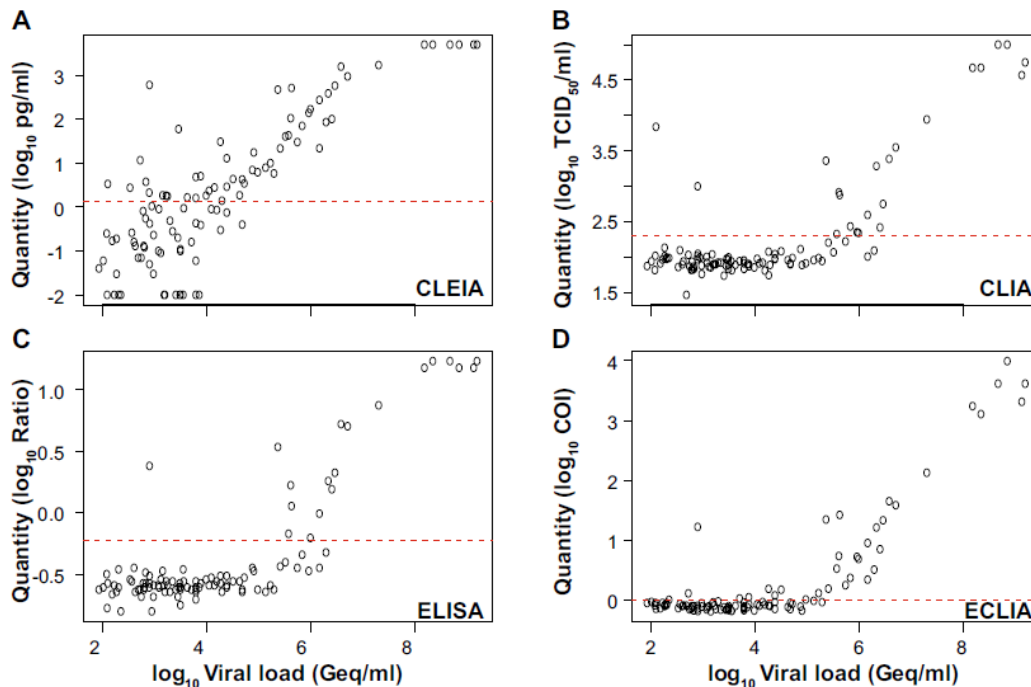


Abbildung 3: Analyse der Nachweisgrenze von Atemwegsproben, die entweder für Delta (obere Felder) oder Omikron (untere Felder) mittels RT-qPCR positiv waren, beispielhaft für zwei Antigenschnelltests aus der Studie (Test 6 und 7). Die Anzahl der RNA-Kopien aus quantifizierten Proben, die in den Test eingesetzt wurden, werden auf der x-Achse gegen ein positives (+ 1) oder negatives (0) Testergebnis auf der y-Achse aufgetragen. Blaue (Delta) bzw. rote (Omikron) Kurven zeigen logistische Regressionen der Viruslast in Bezug auf das Testergebnis; vertikale gestrichelte Linien geben die Anzahl der eingesetzten RNA-Kopien an bei dem 50 % (LoD50) bzw. 95 % (LoD95) der Proben auf der Grundlage der Regressionsergebnisse voraussichtlich positiv sind. Test 7 zeigt signifikante Unterschiede für LoD50 und LoD95.

Neben AGST wurden von verschiedenen Herstellern auch automatisierte Antigentests auf großen Laborplattformen auf den Markt gebracht. Die erhobenen Evaluationsergebnisse zeigen deutlich, dass sich diese Antigentests deutlich in ihrer Messkinetik aber auch analytischen Sensitivität unterscheiden und AGST dahingehend nicht immer überlegen sind.



Quelle: Osterman et al., Med Microbiol Immunol. 2021

Abbildung 4: Analytische Sensitivität von PCR-positiven SARS-CoV-2-Patientenproben für (semi-)quantitative, automatisierte SARS-CoV-2 Ag-Tests. a) CLEIA von Fujirebio, b) CLIA von Diasorin, c) ELISA von Euroimmun und d) ECLIA von Roche Diagnostics. Die Nukleokapsid-Antigen Messwerte der quantifizierten Proben wurden gegen die berechneten Viruslasten aufgetragen. Die horizontale gestrichelte rote Linie zeigt den vom Hersteller empfohlenen Cutoff-Wert an.

Die vorgestellten Studien trugen so wichtige Aspekte zu einer fortwährenden Diskussion über die Sinnhaftigkeit und Bewertung von Antigentest in nationalen Teststrategien bei.

4.3. Indirekte Direktnachweisverfahren

4.3.1. Sero-epidemiologische Studien

[Prospective Longitudinal Serosurvey of Healthcare Workers in the First Wave of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 \(SARS-CoV-2\) Pandemic in a Quaternary Care Hospital in Munich, Germany.](#)

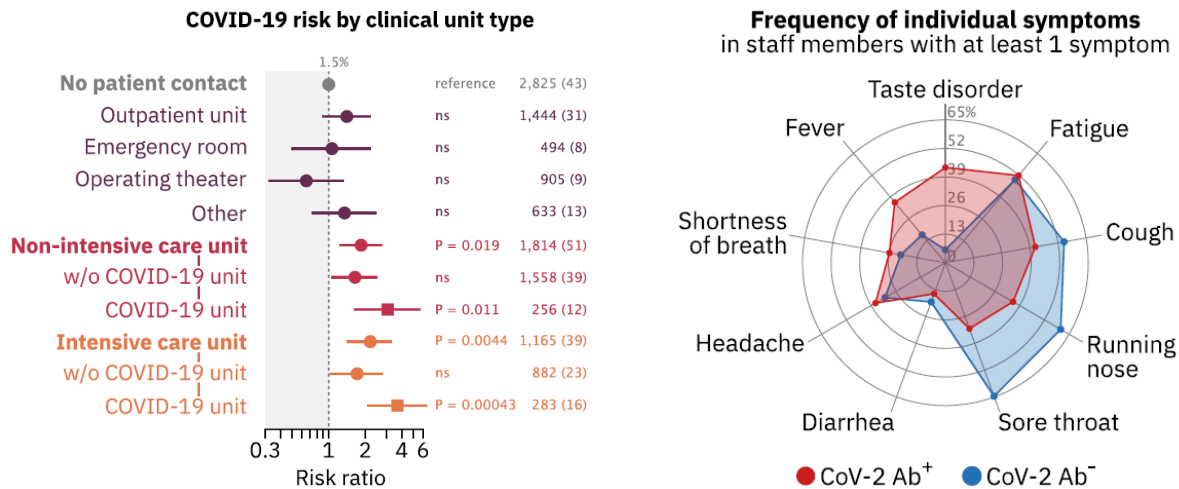
und

[In-depth profiling of COVID-19 risk factors and preventive measures in healthcare workers.](#)

und

[Genomic epidemiology reveals multiple introductions of SARS-CoV-2 followed by community and nosocomial spread, Germany, February to May 2020.](#)

Hauptziele der *All-Corona-Care-Studie* (ACC-Studie) und *Care-Corona-Immune-Studie* (CCI-Studie) am LMU Klinikum waren, die Risikofaktoren für COVID-19 bei Beschäftigten im Gesundheitswesen in der Frühphase der Pandemie zu bestimmen und die Präventivmaßnahmen gegen die weitere Verbreitung des neuen Coronavirus, SARS-CoV-2, in Krankenhäusern zu bewerten. Nach der ersten Welle der Pandemie wurde in der ACC-Querschnittsstudie im Frühsommer 2020 die Seroprävalenz gegen das neue Coronavirus bei über 7,000 Beschäftigten des LMU Klinikums erfasst. Die CCI-Studie wurde während der ersten Welle als longitudinale Kohorten-Studie an 300 Mitarbeitern des LMU Klinikums durchgeführt. Der Nachweis spezifischer Antikörper gegen SARS-CoV-2 diente hierbei als Indikator für eine durchgemachte Erkrankung. Mithilfe eines Fragebogens, der epidemiologische und COVID-19-spezifische Fragen enthielt, wurden durch eine multivariate statistische Analyse Risikogruppen und -faktoren identifiziert, typische Symptome von COVID-19 charakterisiert und Maßnahmen zur Erkennung und Prävention einer Infektion bei den Beschäftigten bewertet.



Quelle: Wratil, Schmacke, Osterman et al., Infection. 2021

Abbildung 5 links: Risikofaktoren für SARS-CoV-2-Seropositivität bei Beschäftigten im Gesundheitswesen, die nach eigenen Angaben Patientenkontakt in verschiedenen klinischen Einheiten hatten. *p*-Werte der RRs wurden mit dem Fisher's Exact Test exakten Test von Fisher berechnet und werden als bereinigte *p*-Werte nach der Holm'schen Mehrfachtest-Korrektur angegeben. Die Zahlen neben den Datenpunkten geben die Anzahl der Mitarbeiter*innen pro Gruppe und die Zahlen in geschweiften Klammern geben die Anzahl der Antikörper positiven Mitarbeiter an. Die gestrichelten Linien entsprechen dem Risiko des Personals ohne Patientenkontakt Kontakt (1,5 %). **Rechts:** Häufigkeit der einzelnen Symptome bei SARS-CoV-2 Antikörper positiven (rot) und Antikörper negativen (blau) Mitarbeiter mit mindestens einem selbstberichteten Symptom in Prozent der jeweiligen Gruppe.

In beiden Studien war das Risiko einer SARS-CoV-2-Infektion für Beschäftigte des Gesundheitswesens in der Patientenbetreuung während der ersten Pandemiewelle am LMU Klinikum erhöht. Somit bestätigten unsere Studien, dass strenge Maßnahmen zur Infektionskontrolle unerlässlich sind, um das gesamte Personal, das mit Patienten zu tun hat, während der laufenden Pandemie zu schützen. Im Rahmen der CCI-Studie und einer weiteren NGS-basierte Analyse konnte das Studienteam mehrere unabhängige Einschleppungen des SARS-CoV-2 in der Metropolregion München in den ersten Wochen der ersten Pandemiewelle, hauptsächlich durch Reisende, die aus beliebten Skigebieten in den Alpen zurückkehrten, feststellen. Dies

betraff auch infizierte Mitarbeiter des LMU Klinikums. So konnten retrospektiv infizierte Studienteilnehmern Clustern nosokomialer Ausbrüche oder Einträgen aus dem privaten Umfeld zugeordnet werden.

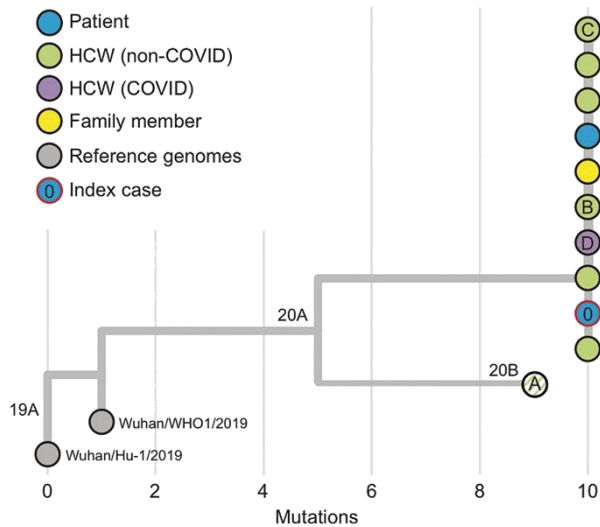


Abbildung 6: Maximum-Likelihood-Phylogenie von SARS-CoV-2-Sequenzen von COVID- und nicht-COVID-betreuendem Klinikumspersonal (grüne und violette Kreise), Patienten (blauer Kreis) und der am Ausbruch beteiligten Indexperson (Patient 0, blau mit rotem Rand) im Verhältnis zu zwei Referenzgenomen aus Wuhan, China. Die Anzahl der Mutationen im Verhältnis zur Referenzsequenz Wuhan/Hu-1/2019 ist auf der x-Achse dargestellt.

Quelle: Weinberger, Steffen, Osterman et al., Clin Infect Dis. 2021

[Evidence for increased SARS-CoV-2 susceptibility and COVID-19 severity related to pre-existing immunity to seasonal coronaviruses.](#)

und

[Pulmonary function impairment of asymptomatic and persistently symptomatic patients 4 months after COVID-19 according to disease severity.](#)

In den oben genannten ACC- und CCI-Studien kamen mehrere und unterschiedliche serologische Testsysteme zum Einsatz, sodass anhand dieser Kohorten auch eine Evaluation dieser kommerziellen, aber auch selbst hergestellten Assays durchgeführt werden konnte. In zwei weiteren Studien wurde zudem die Bedeutung serologischer Befunde vor und nach einer SARS-CoV-2-Infektion beleuchtet. So konnte einerseits gezeigt werden, dass eine spezifische, bereits vorhandene Immunität gegen saisonale Coronaviren die Anfälligkeit für SARS-CoV-2 wahrscheinlich erhöhen und Personen für einen ungünstigeren COVID-19-Verlauf prädisponieren kann. Ebenso unterstreicht die zweite Studie in Kooperation mit der Medizinischen Klinik und Poliklinik V des LMU Klinikums,

dass die Höhe der gemessenen SARS-CoV-2-spezifischen Antikörper nach einer Infektion nicht nur mit der Schwere des Verlaufs, sondern auch in einer Erhebung nach vier Monaten mit einem signifikant schlechteren Gasaustausch zwischen Blut und Luft in der Lunge assoziiert ist. Beide Studien unterstützen somit die Vermutung, dass Antikörperreaktionen eine wichtige Rolle bei einer überschießenden Entzündungsreaktion und Immunpathologie bei COVID-19 spielen.

4.3.2. Bestimmung des SARS-CoV-2-Antikörperspezifitäts-Index

[Multiple-Point Evaluation Algorithms for Enhanced Precision of Pathogen-Specific Cerebrospinal Fluid/Serum Antibody Index Calculation.](#)

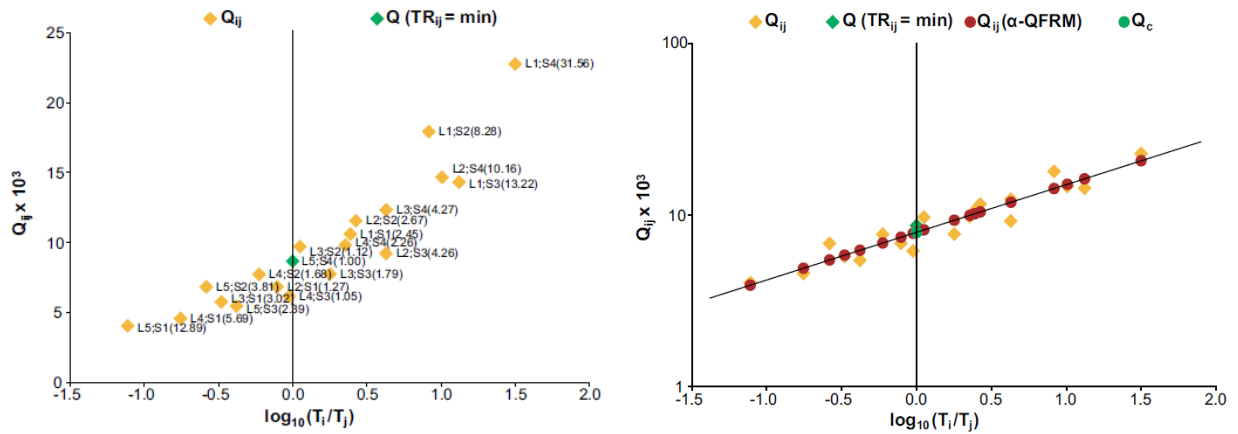
und

[Accuracy, precision, and consistency of methods for pathogen-specific cerebrospinal fluid/serum Q-value calculation.](#)

und

[Case Report: Unilateral Sixth Cranial Nerve Palsy Associated With COVID-19 in a 2-year-old Child.](#)

Die Bestimmung erregerspezifischer Antikörperindizes (AI) in Liquor und Serum ist ein wesentlicher Eckpfeiler bei der Beurteilung neurologischer Erkrankungen und erfordert eine zuverlässige hohe Präzision. Verschiedene Unternehmen bieten ELISA-Kits für den Nachweis der jeweiligen Antikörperkonzentrationen an und berechnen den AI auf der Grundlage gemessener zweier optischer Dichten (ODs) einer Liquor/Serum-Probe. In vorangehenden Studien konnten wir verschiedene Algorithmen zur Bestimmung des AI aus Mehrpunkt-Messungen (Verwendung von mehr als zwei OD-Werten pro Liquor/Serum-Probe) entwickeln und evaluieren.



Quelle: Osterman et al., SLAS Technol. 2019

Abbildung 6 links: Typische Q-Matrix. Q_{ij} -Werte, berechnet aus OD-Werten OD_i , OD_j , gemessen für verschiedene Verdünnungsfaktoren n_i , n_j gemessen wurden, zeigen keine horizontale Verteilung. Die schräge Wolke mit ihren verstreuten Werten lässt sich teilweise durch die Annahme einer inkonsistenten Methodenparameter bei der Datenauswertung erklären. Die Datenbezeichnungen L_i , S_j beziehen sich auf die Liquorprobe i bzw. die Serumprobe j . Die Zahl in Klammern ist $TR_{ij} = \max(T_i, T_j)/\min(T_i, T_j)$. T_i/T_j ist das Liquor/Serum-Titer-Verhältnis.

Rechts: Die Q-Matrix Simple Reference Method (α -QSRM) wurde an die realen Q_{ij} -Daten der linken Abbildung angepasst. Die errechneten Parameterwerte sind $\alpha_c = 2,7198$, $\beta_c = \beta$ und $Q_c = 7,92$, in guter Übereinstimmung mit $Q_c = 7,86$ in der linken Abbildung.

Analysen zeigen, dass diese neuen post-analytischen Methoden eine verbesserte Präzision und Genauigkeit der AI-Berechnung ermöglichen.

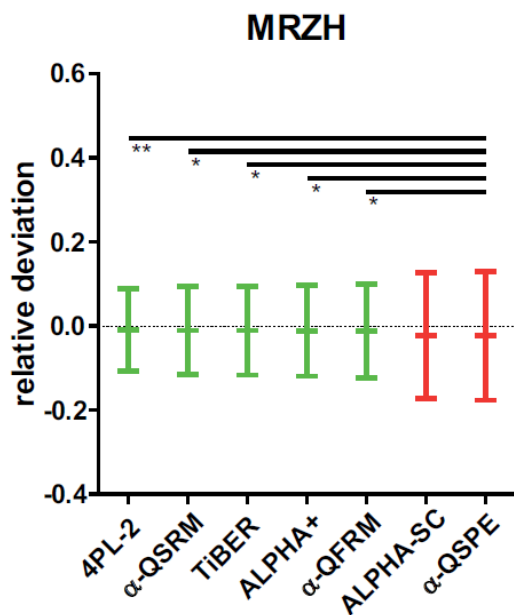


Abbildung 7: Standardabweichungswert (SD) der relativen Abweichungen (RD) für jede Auswertungsmethode, ermittelt für vier Virusparameter der MRZH-Reaktion. Rot markierte Methoden (ALPHA-SC und α -QSPE) verwenden die Methodenparameter α und β des Herstellers. Grün markierte Methoden (4PL-2, α -QSRM, TiBER, ALPHA+ und α -QFRM) verwenden mindestens einen variablen Methodenparameter in einer neu entwickelten Methode. Statistisch signifikante ($p < 0,05$) und hoch signifikante ($p < 0,05/n$) F-Test Unterschiede sind mit einem bzw. zwei Sternchen gekennzeichnet.

Quelle: Osterman et al., SLAS Technol. 2019

Als Besonderheit dieser Methoden gilt zudem die Standardkurven-unabhängig Berechnung des AI, welches eine breite Anwendung auf verschiedene virologische Parameter erlaubt. So konnten wir innerhalb kürzester Zeit eine zuverlässige Bestimmung des SARS-CoV-2 spezifischen AI etablieren, auch wenn hierfür kein Serum/Liquor spezifisches Testkit, beziehungsweise quantitativer Assay auf dem Markt erhältlich war. Ein Beispiel der klinischen Anwendung dieser diagnostischen Methode wurde im Rahmen eines Fallberichts eines Kindes mit neurologischen Symptomen im Rahmen einer SARS-CoV-2 Infektion publiziert. Auch wenn die meisten neurologischen mit SARS-CoV-2 assoziierten Komplikationen wahrscheinlich nicht mit direkter Neuroinvasion des Virus verknüpft sind, war die Bestimmung SARS-CoV-2 spezifischer AI auch im Rahmen der Bewertung möglicher Impfnutzenwirkungen im ZNS von großer Bedeutung.

5. Danksagung

Die Inhalte dieser Habilitationsarbeit hätte ohne die interdisziplinäre Unterstützung zahlreicher Personen und Institutionen während der Coronavirus-Pandemie in dieser Form nicht realisiert werden können. An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich für die kollegiale Hilfe und ausgezeichneten Kooperationen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Oliver T. Keppler für die hervorragende Förderung meiner Weiterbildung und Forschungstätigkeit. Prof. Dr. Josef Eberle danke ich für die langjährige pädagogische Ausbildung und meinen Oberärzt*innen Dr. Gundula Jäger und Dr. Stephan Böhm, sowie Dr. Hans Nitschko für meine klinisch-diagnostische Weiterbildung.

An diesen Arbeiten haben starke Teams mit vielen Mitarbeiter*innen innerhalb der LMU München mitgewirkt, insbesondere in der virologischen Diagnostik des Max von Pettenkofer-Instituts. All diesen Beteiligten möchte ich hiermit meinen Dank aussprechen.

Für Ihre Beteiligung an unseren Studien danke ich allen Studienteilnehmer*innen vielmals.

Meiner Frau und meinen Kindern möchte ich ganz besonders herzlich danken für das liebevolle Verständnis auch in schwierigen Zeiten dieser Habilitationsarbeit. Von ganzem Herzen danke ich ihnen für die ermutigende Unterstützung, ihre Liebe und den familiären Zusammenhalt während dieser Coronavirus-Pandemie. Dies war stets ein großer Rückhalt für mich, der als wichtiger Teil zum Erfolg meiner Habilitation beigetragen hat.

Folgende Forschungseinrichtungen haben finanziell die hier vorgestellten Studien mit meiner Erst-/Letztautorenschaft finanziell unterstützt:

- - Deutsche BMBF-Initiative "NaFoUniMedCovid19" Teilprojekt B-FAST
- - Freistaat Bayern (Forschungsinitiativen Bay-VOC und FORCOVID)
- - Medizinische Fakultät der LMU München
- - Stiftungen zu Gunsten der Medizinischen Fakultät
- - DEAL-Projekt

6. Abkürzungen

AGST	Antigenschnelltest
AI	Antikörperindex
COVID-19	Coronavirus disease 2019
NGS	Next Generation Sequenzierung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
VoC	Variant of Concern

7. Liste der für die Habilitation zusammengefassten Arbeiten

Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

<p>Impaired detection of omicron by SARS-CoV-2 rapid antigen tests. Osterman A, Badell I, Basara E, Stern M, Kriesel F, Eletreby M, Öztan GN, Huber M, Autenrieth H, Knabe R, Späth PM, Muenchhoff M, Graf A, Krebs S, Blum H, Durner J, Czibere L, Dächert C, Kaderali L, Baldauf HM, Keppler OT. Med Microbiol Immunol. 2022 Feb;210(1):65-72. doi: 10.1007/s00430-020-00698-8. [Epub ahead of print] PMID: 33452927</p>
<p>Comparison of four commercial, automated antigen tests to detect SARS-CoV-2 variants of concern. Osterman A, Iglhaut M, Lehner A, Späth P, Stern M, Autenrieth H, Muenchhoff M, Graf A, Krebs S, Blum H, Baiker A, Grzimek-Koschewa N, Protzer U, Kaderali L, Baldauf HM, Keppler OT. Med Microbiol Immunol. 2021 Dec;210(5-6):263-275. doi: 10.1007/s00430-021-00719-0. Epub 2021 Aug 20. PMID: 34415422</p>
<p>Prospective Longitudinal Serosurvey of Healthcare Workers in the First Wave of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Pandemic in a Quaternary Care Hospital in Munich, Germany. Weinberger T*, Steffen J*, Osterman A*, Mueller TT, Muenchhoff M, Wratil PR, Graf A, Krebs S, Quartucci C, Spaeth PM, Grabein B, Adorjan K, Blum H, Keppler OT, Klein M. Clin Infect Dis. 2021 Nov 2;73(9):e3055-e3065. doi: 10.1093/cid/ciaa1935. PMID: 33388756</p>
<p>In-depth profiling of COVID-19 risk factors and preventive measures in healthcare workers. Wratil PR*, Schmacke NA*, Osterman A*, Weinberger T, Rech J, Karakoc B, Zeilberger M, Steffen J, Mueller TT, Spaeth PM, Stern M, Albanese M, Thun H, Reinbold J, Sandmeyer B, Kressirer P, Grabein B, Falkai P, Adorjan K, Hornung V, Kaderali L, Klein M, Keppler OT. Infection. 2021 Aug 11 doi: 10.1007/s15010-021-01672-z. [Epub ahead of print] PMID: 34379308</p>
<p>Dynamics of SARS-CoV-2 shedding in the respiratory tract depends on the severity of disease in COVID-19 patients. Munker D*, Osterman A*, Stubbe H, Muenchhoff M, Veit T, Weinberger T, Barnikel M, Mumm JN, Milger K, Khatamzas E, Klauss S, Scherer C, Hellmuth JC, Giessen-Jung C, Zoller M, Herold T, Stecher S, de Toni EN, Schulz C, Kneidinger N, Keppler OT, Behr J, Mayerle J, Munker S. Eur Respir J. 2021 Jul;58(1). doi: 10.1183/13993003.02724-2020. Print 2021 Jul. PMID: 33602859</p>
<p>Evaluation of two rapid antigen tests to detect SARS-CoV-2 in a hospital setting. Osterman A*, Baldauf HM*, Eletreby M, Wettengel JM, Afridi SQ, Fuchs T, Holzmann E, Maier A, Döring J, Grzimek-Koschewa N, Muenchhoff M, Protzer U, Kaderali L, Keppler OT. Med Microbiol Immunol. 2021 Feb;210(1):65-72. doi: 10.1007/s00430-020-00698-8. Epub 2021 Jan 16. PMID: 33452927</p>
<p>Accuracy, precision, and consistency of methods for pathogen-specific cerebrospinal fluid/serum Q-value calculation. Osterman A, Böhm S, Osterman P. J Immunol Methods. 2020 Feb;477:112691.</p>

doi: 10.1016/j.jim.2019.112691. Epub 2019 Oct 31.
PMID: 31678266

[Multiple-Point Evaluation Algorithms for Enhanced Precision of Pathogen-Specific Cerebrospinal Fluid/Serum Antibody Index Calculation.](#)

Osterman A, Späth PM, Jäger G, Böhm S, Osterman P.

SLAS Technol. 2019 Feb;24(1):96-104.

doi: 10.1177/2472630318783483. Epub 2018 Jun 27.

PMID: 29949398

Originalarbeiten als Koautor

[Pulmonary function impairment of asymptomatic and persistently symptomatic patients 4 months after COVID-19 according to disease severity.](#)

Munker D, Veit T, Barton J, Mertsch P, Mümmler C, **Osterman A**, Khatamzas E, Barnikel M, Hellmuth JC, Münchhoff M, Walter J, Ghiani A, Munker S, Dinkel J, Behr J, Kneidinger N, Milger K.

Infection. 2022 Feb;50(1):157-168.

doi: 10.1007/s15010-021-01669-8. Epub 2021 Jul 28.

PMID: 34322859

[Detection of SARS-CoV-2-RNA in post-mortem samples of human eyes.](#)

Penkava J, Muenchhoff M, Badell I, **Osterman A**, Delbridge C, Niederbuchner F, Soliman S, Rudelius M, Graf A, Krebs S, Blum H, Ulbig M, Baumann C, Zapp D, Maier M, Keppler OT, Lohmann CP, Ledderose S.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2021 Dec 28

doi: 10.1007/s00417-021-05529-x. [Epub ahead of print]

PMID: 34962592

[Evidence for increased SARS-CoV-2 susceptibility and COVID-19 severity related to pre-existing immunity to seasonal coronaviruses.](#)

Wratil PR, Schmacke NA, Karakoc B, Dulovic A, Junker D, Becker M, Rothbauer U, **Osterman A**, Spaeth PM, Ruhle A, Gapp M, Schneider S, Muenchhoff M, Hellmuth JC, Scherer C, Mayerle J, Reincke M, Behr J, Käab S, Zwissler B, von Bergwelt-Baildon M, Eberle J, Kaderali L, Schneiderhan-Marra N, Hornung V, Keppler OT

Cell Rep. 2021 Dec 28;37(13):110169.

doi: 10.1016/j.celrep.2021.110169. Epub 2021 Dec 7.

PMID: 34932974

[Spatially resolved qualified sewage spot sampling to track SARS-CoV-2 dynamics in Munich - One year of experience.](#)

Rubio-Acero R, Beyerl J, Muenchhoff M, Roth MS, Castelletti N, Paunovic I, Radon K, Springer B, Nagel C, Boehm B, Böhmer MM, Graf A, Blum H, Krebs S, Keppler OT, **Osterman A**, Khan ZN, Hoelscher M, Wieser A.

Sci Total Environ. 2021 Nov 25;797:149031.

doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149031. Epub 2021 Jul 21.

PMID: 34346361

[Dynamics of urinary and respiratory shedding of Severe acute respiratory syndrome virus 2 \(SARS-CoV-2\) RNA excludes urine as a relevant source of viral transmission.](#)

Mumm JN, Ledderose S, **Osterman A**, Rudelius M, Hellmuth JC, Münchhoff M, Munker D, Scherer C, Volz Y, Ebner B, Giessen-Jung C, Lampert C, Vilsmaier T, Schneider S, Gapp M, Milger-Kneidinger K, Behr J, von Bergwelt-Baildon M, Keppler OT, Stief C, Magistro G, Staehler M, Rodler S.

Infection. 2021 Oct 30

doi: 10.1007/s15010-021-01724-4. [Epub ahead of print]

PMID: 34716901

[Genomic epidemiology reveals multiple introductions of SARS-CoV-2 followed by community and nosocomial spread, Germany, February to May 2020.](#)

Muenchhoff M, Graf A, Krebs S, Quartucci C, Hasmann S, Hellmuth JC, Scherer C, **Osterman A**, Boehm S, Mandel C, Becker-Pennrich AS, Zoller M, Stubbe HC, Munker S, Munker D, Milger K, Gapp M, Schneider S, Ruhle A, Jocham L, Nicolai L, Pekayvaz K, Weinberger T, Mairhofer H, Khatamzas E, Hofmann K, Spaeth PM, Bender S, Käab S, Zwissler B, Mayerle J, Behr J, von Bergwelt-Baildon M, Reincke M, Grabein B, Hinske CL, Blum H, Keppler OT.

Euro Surveill. 2021 Oct;26(43).

doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.43.2002066.

PMID: 34713795

[COVID-19 in Patients Receiving CD20-depleting Immunochemotherapy for B-cell Lymphoma.](#)

Gaitsch E, Passerini V, Khatamzas E, Strobl CD, Muenchhoff M, Scherer C, **Osterman A**, Heide M, Reischer A, Subklewe M, Leutbecher A, Tast B, Ruhle A, Weiglein T, Stecher SS, Stemmler HJ, Dreyling M, Giral P, Georgi E, Wölfel R, Mateyka L, D'Ippolito E, Schober K, Busch DH, Kager J, Spinner CD, Treiber M, Rasch S, Lahmer T, Iakoubov R, Schneider J, Protzer U, Winter C, Ruland J, Quante M, Keppler OT, von Bergwelt-Baildon M, Hellmuth J, Weigert O.

Hemasphere. 2021 Jul;5(7):e603.

doi: 10.1097/HS9.0000000000000603. eCollection 2021 Jul.

PMID: 34235400

Kasuistiken/Case Reports

[Case Report: Unilateral Sixth Cranial Nerve Palsy Associated With COVID-19 in a 2-year-old Child.](#)

Knoflach K, Holzapfel E, Roser T, Rudolph L, Paolini M, Muenchhoff M, **Osterman A**, Griese M, Kappler M, von Both U.

Front Pediatr. 2021;9:756014.

doi: 10.3389/fped.2021.756014. eCollection 2021.

PMID: 34976891

[Urinary Frequency as a Possibly Overlooked Symptom in COVID-19 Patients: Does SARS-CoV-2 Cause Viral Cystitis?](#)

Mumm JN, **Osterman A**, Ruzicka M, Stihl C, Vilsmaier T, Munker D, Khatamzas E, Giessen-Jung C, Stief C, Staehler M, Rodler S.

Eur Urol. 2020 Oct;78(4):624-628.

doi: 10.1016/j.eururo.2020.05.013. Epub 2020 May 19.

PMID: 32475747

8. Referenzen

1. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*. 2020;395(10223):470-3.
2. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265-9.
3. Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(5):533-4.
4. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020;25(3).
5. Muenchhoff M, Mairhofer H, Nitschko H, Grzimek-Koschewa N, Hoffmann D, Berger A, et al. Multicentre comparison of quantitative PCR-based assays to detect SARS-CoV-2, Germany, March 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(24).
6. Dachert C, Muenchhoff M, Graf A, Autenrieth H, Bender S, Mairhofer H, et al. Rapid and sensitive identification of omicron by variant-specific PCR and nanopore sequencing: paradigm for diagnostics of emerging SARS-CoV-2 variants. *Med Microbiol Immunol*. 2022;211(1):71-7.
7. Kretschmer A, Kossow A, Grune B, Schildgen O, Mathes T, Schildgen V. False positive rapid antigen tests for SARS-CoV-2 in the real-world and their economic burden. *J Infect*. 2022;84(2):248-88.
8. van Kasteren PB, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, de Jonge J, van den Brandt A, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol*. 2020;128:104412.
9. Corman VM, Haage VC, Bleicker T, Schmidt ML, Muhlemann B, Zuchowski M, et al. Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid point-of-care antigen tests: a single-centre laboratory evaluation study. *Lancet Microbe*. 2021;2(7):e311-e9.
10. Wratil PR, Stern M, Priller A, Willmann A, Almanzar G, Vogel E, et al. Three exposures to the spike protein of SARS-CoV-2 by either infection or vaccination elicit superior neutralizing immunity to all variants of concern. *Nat Med*. 2022;28(3):496-503.
11. Wolf GK, Glueck T, Huebner J, Muenchhoff M, Hoffmann D, French LE, et al. Clinical and Epidemiological Features of a Family Cluster of Symptomatic and Asymptomatic Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2020;9(3):362-5.
12. Deng X, Gu W, Federman S, du Plessis L, Pybus OG, Faria NR, et al. Genomic surveillance reveals multiple introductions of SARS-CoV-2 into Northern California. *Science*. 2020;369(6503):582-7.
13. Pritsch M, Radon K, Bakuli A, Le Gleut R, Olbrich L, Guggenbuehl Noller JM, et al. Prevalence and Risk Factors of Infection in the Representative COVID-19 Cohort Munich. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(7).
14. Erber J, Kappler V, Haller B, Mijocevic H, Galhoz A, Prazeres da Costa C, et al. Infection Control Measures and Prevalence of SARS-CoV-2 IgG among 4,554 University Hospital Employees, Munich, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2022;28(3):572-81.