

Aus dem Institut für Virologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Jörg Timm

Humorale Immunantwort nach monovalenter, adjuvantierter Impfung gegen die pandemische  
Influenza H1N1 (2009)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Sandra Hauka

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ortwin Adams

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Colin MacKenzie

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Grund S, Pietzonka S, Michel S, Adams O. Serum antibodies against native and denatured hemagglutinin glycoproteins detected by ELISA as correlates of protection after influenza vaccination in healthy vaccinees and in kidney transplant recipients. *J Virol Methods*. 2013 Nov;193(2):558-64. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.07.032. Epub 2013 Jul 26. PMID: 23896019.

## I Zusammenfassung

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, mittels eines neu-etablierten r-ELISA die bereits im Vorfeld mittels NT gemessenen Immunantworten von Gesunden und NTx-Patienten, zur Überprüfung des Impferfolges nach pandemischer Influenzaimpfung zu bestätigen und weiter zu charakterisieren.

Die Antikörper-Messungen des r-ELISA zeigten, dass sie bei NTx-Patienten ungenügend mit den NT-Ergebnissen korrelierten und bei den Gesunden sich der lang anhaltende Antikörper-Anstieg im NT im r-ELISA nur zeitlich begrenzt (3 Wochen p.i.) zeigte. Durch zusätzliche Aviditätsmessungen der Antikörper zur weiteren Charakterisierung der Immunantwort konnten ebenfalls keine systematischen Erkenntnisse gewonnen werden.

Somit kam die Frage auf, ob ein r-ELISA überhaupt geeignet ist, um eine Alternative zum NT bei der Überprüfung des Impferfolges nach Influenzaimpfung zu sein. Studien mit kommerziellen Produkten, die vergleichbare Protokolle zum r-ELISA der vorliegenden Arbeit verwenden, ließen den Schluss zu, dass die Herkunft der Untersuchungsproben (immunkompetente versus immuninkompetente Probanden) und das Zeitintervall nach Impfung von großer Relevanz sind und einen möglichen Einsatz definieren. So können der r-ELISA oder der modifizierte f-ELISA, bei dem das Virusantigen über ein Fetuin an die ELISA-Festphase gekoppelt ist, durchaus eine zeit- und kostensparende Alternative sein, wenn die Impfantwort bei Gesunden kurzfristig (ca. 3-4 Wochen) nach Impfung bestimmt werden soll. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie vergleichbare Publikationen aber auch, dass zur Überprüfung der Immunantwort bei immunsupprimierten Patienten weiterhin auf die gängigen Methoden (NT/HHT) gesetzt werden bzw. der Nutzen der Antikörperbestimmung hinterfragt werden sollte. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre die direkte Boosterimpfung ohne die zuvor aufwändige Kontrolle des Serostatus.

Der Stellenwert der Bestimmung der serologischen Immunantwort nach Influenza-Impfung ist somit insgesamt als eher gering zu bewerten. Dennoch kann letztendlich nicht komplett auf Testverfahren wie den NT verzichtet werden, um im Rahmen von Studien Fragestellungen wie z.B. die Detektion von *Non-Respondern* zu untersuchen. Eine weitere Indikation für serologische Testverfahren ergibt sich mit dem Auftauchen neuer pandemischer Influenzaviren, bei dem mit Hilfe serologischer Verfahren zeitnah epidemiologisch wichtige Erkenntnisse wie die Durchseuchung in der Bevölkerung und das Impfansprechen beantwortet werden können. Dies hat sich deutlich gezeigt bei der SARS-CoV-2-Pandemie seit 2020 und wäre mit dem Auftauchen eines neuen pandemischen Influenzavirus ähnlich zu erwarten.

## II Abstract

The aim of the present study was to confirm and further characterize the previously measured immune responses of healthy and NTx patients by means of a newly established r-ELISA to verify the vaccination success after pandemic influenza vaccination.

Antibody measurements by r-ELISA showed that they correlated insufficiently with NT results in NTx patients, and in healthy individuals the long-lasting antibody increase in NT was evident in r-ELISA only over time (3 weeks p.i.). Additional avidity measurements of the antibodies to further characterize the immune response also failed to provide systematic findings.

Thus, the question arose whether an r-ELISA is at all suitable to be an alternative to NT in the verification of vaccination success after influenza vaccination. Studies with commercial products using comparable protocols to the r-ELISA of the present work suggested that the origin of the test samples (immunocompetent versus immunocompetent subjects) and the time interval after vaccination are of high relevance and define a possible use. Therefore, the r-ELISA or the modified f-ELISA, in which the viral antigen is coupled to the ELISA solid phase via a fetuin, may well be a time- and cost-saving alternative if the vaccination response in healthy subjects is to be determined in the short term (approx. 3-4 weeks) after vaccination. At the same time, however, the results of the present study as well as comparable publications show that for testing the immune response in immunocompromised patients, the current methods (NT/HHT) should continue to be used or the usability of antibody determination should be discussed. A possible conclusion might be the direct booster vaccination without the previously time-consuming control of the serostatus.

The significance of the determination of the serological immune response after influenza vaccination therefore has to be assessed as rather low overall. Nevertheless, in the end it is not possible to completely work without test procedures such as NT in order to investigate questions such as the detection of non-responders within the framework of studies. Another indication for serological test procedures arises with the emergence of new pandemic influenza viruses, where serological procedures can be used to provide timely answers for epidemiologically important findings such as the dissemination in the population and the vaccination response. This has been clearly demonstrated with the SARS-CoV-2 pandemic since 2020 and would be similarly expected with the emergence of a new pandemic influenza virus.

### III Liste der verwendeten Abkürzungen

$\Delta E$	Extinktion
AG Influenza	Arbeitsgemeinschaft Influenza des RKI; Berlin
Ag	Antigen
AI	Aviditätsindex
Ak	Antikörper
AU	<i>Arbitrary Units</i>
BAL	Bronchioalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum Albumin
CDC	<i>Centers of Diseases Control</i>
CPE	cytopathischer Effekt
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
f-ELISA	Fetuin-ELISA
r-ELISA	rekombinanter ELISA
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FKS	Fetales Kälberserum
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GfV	Gesellschaft für Virologie
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
GSK	<i>GlaxoSmithKlineBiologicals</i>
HA	Hämagglutinin
HHT	Hämagglutinationshemmtest
HLA	humane Leukozyten-Antigene
HS	Harnstoff
HTx	Herztransplantation
IAV	Influenza-A-Virus
IBV	Influenza-B-Virus

IfSG	Infektionsschutzgesetz
Ig	Immunglobulin (IgA; IgM; IgG...)
KG	Kontrollgruppe
M bzw. xM	molar (z.B. 8 molarer Harnstoff)
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i> = Hundenierenzellen
MMF	Mycophenolat Mofetil
hMPV	humanes Metapneumovirus
NA	Neuraminidase
NP	Nukleoproteine
NT	Neutralisationstest
NTx	Nierentransplantation
OD	Optische Dichte
OPD	<i>o-phenylenediamine-dihydrochloride</i>
PA	<i>Polymerase acidic protein</i>
PB1/PB2	<i>polymerase basic protein 1/2</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung/ <i>phosphate-buffered-saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> /Polymerase-Ketten-Reaktion
PEI	Paul Ehrlich Institut, Langen
PEP	Post-Expositions-Prophylaxe
PSA	Persönliche Schutzausrüstung
RKI	Robert Koch Institut, Berlin
RNA	Ribonukleinsäure
cRNA	<i>complementary RNA</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
vRNA	<i>viral RNA</i>
RSV	Respiratorisches Synzitial Virus
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
STIKO	Ständige Impfkommision (RKI)
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
WHO	<i>World Health Organization</i>

## IV Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Influenza .....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Epidemiologie und Infektionsweg .....	2
1.2.2. Verlauf und Klinik .....	3
1.2.3. Diagnostik .....	4
1.2.4. Prävention und Therapie .....	6
<b>1.3. Influenzaviren .....</b>	<b>6</b>
1.3.1. Aufbau und Struktur .....	6
1.3.2. Replikationszyklus .....	8
1.3.3. Antigen drift und shift .....	9
1.3.4. Pandemievirus A-H1N1 2009 „Neue Grippevirus“- A (H1N1) pdm09.....	10
<b>1.4. Influenzaimpfstoffe .....</b>	<b>11</b>
1.4.1. Allgemeines, Herstellung und Zusammensetzung von saisonalen Influenzaimpfstoffen .....	11
1.4.2. Pandemieimpfstoffe gegen H1N1 pdm09 .....	12
<b>1.5. Impferfolg .....</b>	<b>14</b>
1.5.1. Humorale Immunantwort nach Totimpfung .....	14
1.5.2. Impferfolg von Influenzaimpfungen .....	15
1.5.3. Überprüfung des Impferfolges .....	15
<b>1.6. Impfungen für besondere Patientengruppen .....</b>	<b>16</b>
1.6.1. Impfpfempfehlung in Deutschland allgemein .....	16
1.6.2. Nierentransplantierte - Allgemeines sowie ihr Ansprechen auf Impfungen .....	16
<b>1.7. Fragestellung/ Zielsetzung der Arbeit und Vorarbeiten .....</b>	<b>17</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Material .....</b>	<b>18</b>
2.1.1. Seren .....	18
2.1.1.1 Untersuchungsgruppe Nierentransplantierte Patienten (NTx) .....	18
2.1.1.2 Kontrollgruppe .....	19
2.1.1.3 Verdünnungsseren Impfpool (Standardkurve ELISA) .....	19
2.1.2. Antigene .....	20
2.1.3. Antikörper .....	20
2.1.4. Chemikalien, Puffer und Lösungen .....	20
2.1.5. Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.6. Geräte .....	21
2.1.7. Software .....	22



<b>2.2. Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.2.1. Vortestung mittels Neutralisationstest .....	22
2.2.2. Testung mittels ELISA-Techniken .....	22
2.2.2.1 Indirekter ELISA mit rekombinatem HA des pandemischen Influenzavirus <i>H1N1 California04/09</i> bzw. <i>07/09</i> zum Nachweis humaner IgG Antikörper .....	23
2.2.2.2 Indirekter ELISA zur Spezifitätstestung mit Antikörpern gegen die saisonalen Influenzastämme .....	26
2.2.2.3 Indirekter ELISA zur Testung der Seren auf Kreuzreaktivität gegen einen saisonalen Influenzastamm mit HA <i>Influenza A/Brisbane/59/2007(H1N1)-ähnlich</i> .....	27
2.2.2.4 Aviditäts-ELISA pandemische Influenza <i>California 04/09</i> bzw. <i>07/09</i> mit Harnstoff – Bestimmung des Aviditätsindex (AI) .....	28
2.2.3. Statistische Auswertungen .....	30
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
3.1. Indirekter ELISA zur Spezifitätstestung mit Schaf-Antikörpern gegen die saisonalen Influenzastämme .....	31
3.2. Indirekter ELISA zur Testung der Seren auf Kreuzreaktivität gegen einen saisonalen Influenzastamm mit HA <i>Influenza A/Brisbane/59/2007(H1N1)-ähnlich</i> .....	32
3.3. Indirekter ELISA mit rekombinatem HA des pandemischen Influenzavirus <i>H1N1 California 04/09</i> bzw. <i>07/09</i> zum Nachweis humaner IgG-Antikörper .....	34
3.4. Aviditäts-ELISA gegen die pandemische Influenza <i>California 04/09</i> bzw. <i>07/09</i> mit Harnstoff – Bestimmung des Aviditätsindex (AI) .....	39
3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	42
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>43</b>
4.1. Nachweis von Influenzavirus-(Impf-)Antikörpern - Was ist in Deutschland der aktuelle..... Standpunkt ? .....	44
4.2. Welche weiteren ELISA-Protokolle zur Bestimmung der humoralen Immunantwort nach (pandemischer) Influenzaimpfung sind in der Literatur beschrieben? - Welche Unterschiede gibt es zu diesem Protokoll? .....	46
4.3. Der Stellenwert der Überprüfung des Impferfolges nach Influenzaimpfung bei Immunsupprimierten in Deutschland –was ist die Alternative? .....	50
<b>5. Literatur</b> .....	<b>52</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Abb.1 Vereinfachte Skizze zum Aufbau eines Influenzavirus
- Abb.2 Übersicht der untersuchten Seren (n=71)
- Abb.3 Vereinfachte grafische Darstellung einer indirekten ELISA-Methode
- Abb.4 Vereinfachte grafische Darstellung indirekter ELISA mit rekombinantem HA des pandemischen Influenzavirus H1N1 *California 04/09 bzw. 07/09*
- Abb.5 Beispiel Belegungsschema ELISA-Platte rekombinanter HA-ELISA (r-ELISA)
- Abb.6 4 Punkte-Kalibration-Standardkurve
- Abb.7 Beispiel Belegungsschema ELISA-Platte Kreuzreaktivität mit *Influenza A/Brisbane59/07* für NTx-Patienten *Non-Responder*
- Abb.8 Beispiel Belegungsschema ELISA-Platte Aviditätsbestimmung für Probandenserum
- Abb.9 Spezifitätstestung des ELISA mittels Schafantikörpern gegen die drei saisonal-zirkulierenden Influenzastämme der Saison 2009/10
- Abb.10 Austestung Seren der Kontrollgruppe (KG) auf Kreuzreaktivität gegen den saisonalen Influenzastamm *A/Brisbane/59/2007 (H1N1)*-ähnlich in AU
- Abb.11 Austestung Seren der Probandengruppe (NTx gesamt) auf Kreuzreaktivität gegen den saisonalen Influenzastamm *A/Brisbane/59/2007 (H1N1)*-ähnlich in AU
- Abb.12 *Anti-Influenza A/California 04/09 bzw. 07/09* IgG Verlauf Kontrollgruppe (n=30) in AU
- Abb.13 *Anti-Influenza A/California 04/09 bzw. 07/09* IgG Verlauf NTx Gesamt (n=39) in AU
- Abb.14 *Anti-Influenza A/California 04/09 bzw. 07/09* IgG Verlauf Responder (n=26) in AU
- Abb.15 *Anti-Influenza A/California 04/09 bzw. 07/09* IgG Verlauf *Non-Responder* (n=13/n=10) in AU
- Abb.16 IgG-Aviditätsindices pandemische Influenza *California 04/09 bzw. 07/09* Kontrollgruppe (n=30)
- Abb.17 IgG-Aviditätsindices pandemische Influenza *California 04/09 bzw. 07/09* Responder NTx (n= 26)
- Abb.18 IgG-Aviditätsindices pandemische Influenza *California 04/09 bzw. 07/09* *Non-Responder* NTx (n= 13/10)

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Tabelle1 Vergleich der Mittelwerte der <i>Anti-Influenza A/California 04/09</i> bzw. <i>07/09</i> IgG-Nachweise in AU
-----------	---

# 1 Einleitung

## 1.1 Einleitung

Erkrankungen durch Influenzaviren, allgemein Grippe genannt, sind schon lange bekannt und treten jährlich in unterschiedlicher Stärke und Ausprägung auf. Da die klinischen Symptome sehr unterschiedlich sein können, vom milden Verlauf mit schwachen Symptomen wie Schnupfen bis hin zu schweren Verläufen mit intensivpflichtigen Pneumonien oder letalem Ausgang, wird nicht jede Influenzainfektion auch als diese erkannt. Es ist daher schwierig, genaue Fallzahlen zu erfassen. Laut Modellrechnungen können an der saisonalen Influenza jährlich weltweit über 500.000 Menschen versterben (Iuliano, Roguski et al. 2018). Auf Deutschland bezogen sind das gemäß Schätzungen des Robert Koch Instituts (RKI, Berlin) je nach Stärke der Saison zwischen einigen Hundert bis über 20.000 Todesfälle (Robert-Koch-Institut 2019). Zu den Patientengruppen, die ein erhöhtes Risiko aufweisen schwer zu erkranken, zählen besonders ältere Menschen sowie Patienten mit Grunderkrankungen. Dieses spiegelt sich auch in den Hospitalisierungszahlen wider (Robert-Koch-Institut 2019). Betrachtet man dazu die letzte große Influenzapandemie von 2009/10, so erbrachten nachträgliche Modellrechnungen weitaus mehr pandemieassoziierte Todesfälle weltweit als die knapp 20000 laborbestätigten Fälle. Die Schätzungen belaufen sich auf über 200.000 letale Verläufe (Dawood, Iuliano et al. 2012). In vorherigen Pandemien (wie die „Spanische Grippe“ von 1918/19) wurden dagegen weitaus mehr Verstorbene verzeichnet (Taubenberger and Morens 2006). Durch die Möglichkeit einer Impfung gegen Influenza können mittlerweile schwere Erkrankungsverläufe sowie Todesfälle besonders bei älteren Menschen gemindert werden. Daten dazu liefern *Cochrane*-Re-Analysen (Beyer, McElhaney et al. 2013). Doch der Schutz der Bevölkerung durch die Impfung (Effektivität) ist nicht vollständig (Mertens 2013). Drei Hauptfaktoren können die generelle Wirksamkeit des Impferfolges beeinflussen: die Impfquote in der Bevölkerung, die Zusammensetzung des Impfstoffes (Übereinstimmung mit den zirkulierenden Viren) und die individuelle Immunantwort jedes Geimpften. Letzteres kann besonders bei Patienten mit Störung des Immunsystems, wie etwa nach Organtransplantation, von Bedeutung sein. Bei dieser Patientengruppe ist nach verschiedenen Impfungen z.B. gegen Hepatitis-B oder saisonale Influenza bekannt, dass die Impfantwort schlechter als bei immunkompetenten Patienten ausfallen kann (Eckerle, Rosenberger et al. 2013). Doch gerade diese Patientengruppe hat ein hohes Risiko für schwere Verläufe bei Influenzavirus-Infektionen (Zatorski, Adamczyk et al. 2018, Marinelli and Kumar 2020).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die humorale Immunantwort von nierentransplantierten Patienten (NTx) nach pandemischer Influenzaimpfung (*Pandemrix*®) 2009/2010 untersucht werden.

## 1.2 Influenza

### 1.2.1 Epidemiologie und Infektionsweg

Die klassische Influenzasaison liegt in Europa (Deutschland) in den Wintermonaten mit Tendenz zum Jahresanfang. In tropischen Regionen hingegen können Influenzaviren über das ganze Jahr verteilt auftreten. Während einer Saison zirkulieren verschiedene Influenzastämme mit unterschiedlich starkem Auftreten. Dazu gehören zum einen das Influenza-A-Virus (IAV), eingeteilt in Subtypen (z.B. H1N1 und H3N2) welche weiter in Varianten (z.B. A/Michigan) unterteilt werden. Zum anderen das Influenza-B-Virus (IBV), welches wiederum in Linien (z.B. Yamagata) differenziert und dann weiter in Varianten (z.B. Phuket) unterteilt wird (Krammer, Smith et al. 2018). Die Varianten einer solchen Influenzapopulation können sich von Saison zu Saison ändern, da das virale Genom regelmäßig kleinen Veränderungen (Punktmutationen) unterliegt (Krammer, Smith et al. 2018). Diese Veränderungen können sich auch auf die immunitätsbildenden Oberflächenstrukturen (Antigene) auswirken, man spricht dann von einem Antigen drift (Boni 2008). Verfügt das Immunsystem über Antikörper aus vorherigen Immunisierungen, so kann im Falle einer Infektion mit den veränderten Varianten die Effektivität des Immunsystems, welches noch auf die „alten, bekannten“ Antigenstrukturen geprimt ist, herabgesetzt sein. Das Immunsystem erkennt die veränderten Viren zwar weiterhin, da kein komplett neues Virus entstanden ist, doch die spezifische Immunantwort über eine gezielte Antigenbindung kann schwächer sein (Sasaki, He et al. 2008). Eine regelmäßige Anpassung des Impfstoffes an die für das entsprechende Jahr prognostiziert zirkulierenden Influenzapopulation ist somit notwendig (Sasaki, He et al. 2008).

Eine Überwachung und Auswertung des jährlichen Influenzageschehens erfolgt durch viele verschiedene Institutionen wie der *World Health Organization* (WHO) (Hay and McCauley 2018) und für Deutschland dem RKI. Die sogenannte AG Influenza des RKI veröffentlicht regelmäßig „Saisonberichte“ für Deutschland (Robert-Koch-Institut 2019) in welchen die jeweiligen Saisons bis auf die einzelnen Wochen detailliert beobachtet und auf bestimmte Aspekte hin (z.B. Mortalität allgemein, Altersklassen, Anteil der einzelnen Influenzaviren) analysiert werden. Die Fallzahlen für Deutschland setzen sich teilweise aus Modellrechnungen und tatsächlichen Labormeldungen nach §7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) zusammen, wobei letztere meist niedriger ausfallen, da nicht jede Influenzainfektion auch im Labor untersucht wird. Anhand dieser Daten sind starke Schwankungen in einzelnen Saisons (z.B. 2017/18, starke Saison) leicht erkennbar und eine Ursachenanalyse (z.B. schwacher Impfstoff) kann rasch eingeleitet werden. Die jährlichen Labormeldungen liegen im Schnitt unter 100.000 Meldungen pro Saison, die eigentlichen Fallzahlen werden jedoch höher vermutet (Robert-Koch-Institut 2019). Eine derartige Influenza-*Surveillance* ist mittlerweile unerlässlich, denn nur so können Hinweise auf mögliche Pandemien frühzeitig erkannt werden.

Ursächlich für Influenzapandemien können „neue“ Influenzaviren sein. Diese entstehen beispielsweise durch einen sogenannten Antigen shift, oftmals verursacht durch einen vorangegangenen Wirtswechsel des Virus. Dabei findet ein Austausch von genetischer Information zwischen bestehenden Influenzasubtypen/-linien statt, was auch als Reassortment bezeichnet wird.

Somit entsteht genetisch ein neues Influenzavirus (siehe auch 1.3.3) (Krammer, Smith et al. 2018). Ein solches neues Virus ist für das menschliche Immunsystem nahezu unbekannt und kann sich somit gut verbreiten. In der Geschichte der Influenzavirus-erkrankungen sind seit Beginn des 20. Jahrhunderts vier große Pandemien (1918/19 = „Spanische Grippe“ H1N1; 1957/58 „Asiatische Grippe“ H2N2; 1968-70 „Hong-Kong-Grippe“ H3N2 und 2009/10 „Neue Grippe/Schweinegrippe“ H1N1) dokumentiert. Die Ursache für die Entstehung des H1N1 Virus der Spanischen Grippe ist bis heute jedoch nicht eindeutig geklärt. So wie es Autoren gibt, die ebenfalls ein *Reassortment* für möglich halten, so ist auch ein reiner Wirtwechsel mit Übertragung eines nicht-reassortierten Genoms nicht ausgeschlossen (Short, Kedzierska et al. 2018).

Die natürlichen Eintrittspforten der Influenzaviren in den Körper sind die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes. Wie die meisten respiratorischen Viren werden auch die Influenzaviren über Tröpfchen übertragen. Eine Übertragung über kleinere Partikel in Form von Aerosolen (= Tröpfchenkerne) wird jedoch ebenfalls beschrieben (Tellier 2006). Über den Kontakt mit kontaminierten Oberflächen (z.B. kontaminierten Türklinke) kann es zu einer Schmierinfektion kommen, nicht zuletzt, da das Influenzavirus gerade bei niedrigen Temperaturen eine hohe Umweltstabilität aufweist (Polozov, Bezrukov et al. 2008). Hat das Virus die Schleimhautbarriere des Wirts überwunden, so bindet es dort an spezifische Sialinsäurerezeptoren auf den Zielzellen, dem zilienträgenden Flimmerepithel, des Respirationstraktes (de Graaf and Fouchier 2014). Die Anheftung an die Sialinsäurerezeptoren erfolgt durch das Hüllprotein Hämagglutinin (HA) auf der Oberfläche des Influenzavirus. Nach dem Andocken benötigt das Virus zusätzliche wirtszellspezifische Enzyme, um vollständig in die Wirtszelle eindringen zu können und die Replikation zu starten. Die Sialinsäurerezeptoren sind wirtsspezifisch und unterscheiden sich zum Teil zwischen Säugern und Vögeln: Säuger besitzen  $\alpha$ -2,6-Sialinrezeptoren, die im oberen Respirationstrakt sitzen, Vögel hingegen  $\alpha$ -2,3-Sialinsäurerezeptoren. Die herkömmlichen, humanpathogenen Influenzaviren binden an die  $\alpha$ -2,6 Strukturen, die aviären Formen gezielt an  $\alpha$ -2,3-Strukturen. Da der Mensch zusätzlich zu den  $\alpha$ -2,6-Rezeptoren tief im Respirationstrakt ebenfalls  $\alpha$ -2,3-Rezeptoren besitzt, ist eine Infektion mit aviären Stämmen nicht ausgeschlossen. Aufgrund der tiefen Lage ist die Infektion jedoch erschwert, ein Grund für das deutlich seltenere Auftreten von aviärer Influenza beim Menschen (de Graaf and Fouchier 2014).

### 1.2.2 Verlauf und Klinik

Nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von etwa 1-2 Tagen ist mit den ersten Symptomen zu rechnen. Influenzotypisch ist der rasche Beginn von Symptomen, wie etwa hohes Fieber bis 40°C sowie Kopf- und Gliederschmerzen. Eine eher unspezifische Klinik wie Husten und Schnupfen, Pharyngitis sowie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö ist ebenfalls beschrieben. Da der klinische Verlauf von Patient zu Patient sehr unterschiedlich sein kann, ist die richtige Diagnosestellung häufig nur durch eine virologische Diagnostik möglich. Der Immunstatus des einzelnen Patienten kann dabei den Krankheitsverlauf beeinflussen. So kann durch eine Teilimmunisierung z.B. durch vorherige

Influenzainfektionen oder Impfung die Klinik abgeschwächt sein (Coudeville, Bailleux et al. 2010, Krammer, Smith et al. 2018). Gehäuft bei immungeschwächten Menschen (Zatorski, Adamczyk et al. 2018) oder Patienten mit Lungenvorerkrankungen treten auch schwere Verläufe in Form von Pneumonien auf. Durch ein gestörtes lokales Immunsystem des Respirationstraktes können die Viren bis tief in die Lunge vorbringen. Eine zusätzliche Beeinträchtigung der Alveolarzellen kann diese so verändern, dass Bakterien wie Pneumokokken dort ein optimales Milieu vorfinden und sich ungehindert ausbreiten können. Eine bakterielle Superinfektion bis hin zur systemischen Infektion (Sepsis) kann die Folge sein (Shrestha, Foxman et al. 2013). In seltenen Fällen kommt es zu Enzephalitiden, raschen fulminanten Verläufen oder Myokarditiden, auch unabhängig vom Immunstatus (Fukuda, Yoshida et al. 2019). Da allgemein ein abgeschwächtes Immunsystem gehäuft mit schwereren Verläufen assoziiert sein kann, werden Patienten, die dieses aufweisen gemäß dem RKI als Risikopatienten eingestuft. Zu diesen Risikopatienten zählen beispielsweise Ältere, chronisch Kranke (inkl. Kinder), Schwangere und gezielt immunsupprimierte Patienten wie Transplantationspatienten. Für diese Menschen gibt es seitens der ständigen Impfkommission des RKI (STIKO) eine Impfempfehlung für die jährliche saisonale Influenzaimpfung (Robert-Koch-Institut 2020).

### 1.2.3 Diagnostik

Die meisten respiratorischen Infektionen, besonders in der kalten Jahreszeit, werden durch Viren verursacht. Das klinische Bild ist dabei häufig nicht erregerspezifisch, sodass eine virologische Diagnostik sinnvoll sein kann. Diese sollte dabei möglichst breit gestalten werden, um die wichtigsten Differentialdiagnosen abzudecken. Zu den häufigsten viralen Erregern eines respiratorischen Infektes zählen altersunabhängig zusätzlich zu den Influenzaviren: Rhinoviren, Enteroviren, Parainfluenzaviren 1-4, Respiratorische Synzytial Viren (RSV), humane Metapneumoviren (hMPV), Adenoviren, Parechoviren und saisonale Coronaviren sowie seit Beginn des Jahres 2020 auch SARS CoV-2. Durch eine zuverlässige Virusdiagnostik kann auch in manchen Fällen eine unnötige Antibiotikagabe vermieden werden. Neuere Diagnostiksysteme decken häufig schon den Nachweis von bakteriellen und viralen Erregern in einem Ansatz (Multiplexdiagnostik) ab. Da sich die Infektion in der Regel lokal auf das respiratorische System beschränkt, ist es sinnvoll, Material vom „Ort des Geschehens“ zu untersuchen. Bei Infektionen des oberen Atemwegtraktes ist die Entnahme eines tiefen Nasen-Rachenabstriches sinnvoll. Ist der Fokus der Infektion im tieferen Respirationstrakt, so ist Material aus diesem Bereich (bronchioalveoläre Lavage (BAL), Sputum oder Trachealsekret) Mittel der Wahl (Chow, Doyle et al. 2019).

Als diagnostisches Nachweisverfahren sollte ein Direktnachweis gewählt werden wie ein Erregergenomnachweis mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. PCR) (Chow, Doyle et al. 2019). Aufgrund der geringeren Sensitivität der Antigen-Nachweise ist die PCR als Nachweismethode zu bevorzugen (Merckx, Wali et al. 2017). Testungen auf Antikörper spielen bei der Akutdiagnostik keine Rolle (Chow, Doyle et al. 2019). Auch der Erregerdirektnachweis mittels Anzucht in Zellkultur

ist mangels Sensitivität und wegen des hohen Arbeitsaufwands kein Standarddiagnostikum mehr. Meist (siehe oben) wird das Material nicht speziell auf einen Erreger untersucht, sondern mittels Multiplexdiagnostik ein breites (virales) Erregerspektrum abgedeckt (Kim, Yun et al. 2016). Das spart gerade in der Akutdiagnostik Zeit und Material. Die Untersuchung ist mittlerweile rasch möglich und das Ergebnis kann je nach Hersteller/Gerät bereits nach wenigen Stunden (1,5-3 Stunden) vorliegen. Bei besonders kritischen Fällen, die einen unmittelbaren Therapiebeginn benötigen oder aus hygienischen Aspekten (Isolierung), kann ein noch schnellerer Nachweis wichtig sein. Dazu sind seit längerem Bedside-Schnelltests auf Antigenbasis im Gebrauch, welche bei einfacher Handhabung Virusantigene nachweisen können. Diese Tests können bei Verdacht auf eine Influenzainfektion zwar erste Hinweise geben, in Bezug auf ihre Sensitivität sind sie aber bei weitem nicht mit der herkömmlichen Diagnostik vergleichbar (Uyeki, Prasad et al. 2009). Seit wenigen Jahren stehen für den schnellen Nachweis „molekulare Schnelltests“ zur Verfügung welche zum Beispiel mittels PCR in weniger als 60 Minuten einen Erregernachweis erzielen. Die Geräte sind einfach zu bedienen und in Bezug auf diagnostische Genauigkeit mit den herkömmlichen PCR-Testungen vergleichbar (Brendish, Malachira et al. 2017). Da sie jedoch meist nur Einzelproben testen können, ein schmales Erregerspektrum abdecken (z.B. Influenza-A/B-Viren und RSV) und je Testung verhältnismäßig teuer sind, eignen sich diese Geräte nur für die Akutdiagnostik z.B. in der Notaufnahme (Benirschke, McElvania et al. 2019). Sowohl aus epidemiologischer Sicht als auch aus hygienischen Aspekten kann die Differenzierung zwischen Influenza-A- und Influenza-B-Viren von Bedeutung sein. Nahezu alle gängigen Nachweisverfahren, inklusive der molekularen Schnelltests, können differenzieren (Kim, Yun et al. 2016, Benirschke, McElvania et al. 2019). Sollte bei einem Influenza-A-Virus-Nachweis der Subtyp relevant sein, müssen zusätzlich Genom-Sequenzierung erfolgen. Das trifft auch auf den Nachweis von möglichen Resistenzen gegen Neuraminidasehemmer zu. Sequenzierungsuntersuchungen sind jedoch aufwendiger, sowohl in Zeit und Arbeit und in der normalen Influenzadiagnostik nicht von Bedeutung.

Die spezielle Antikörperdiagnostik findet in der Routinediagnostik keine Anwendung, sondern kommt eher in der Forschung zum Einsatz. Eine Fragestellung kann beispielsweise bei immungeschwächten Patienten, wie Organtransplantierten, der Immunstatus nach Influenzaimpfung sein. Ein anerkanntes Verfahren zum Nachweis von neutralisierenden Impfantikörpern ist der Neutralisationstest mittels replikationsfähigem Virus in der Zellkultur (Grund, Pietzonka et al. 2013). Dabei handelt es sich um ein sehr aufwendiges Verfahren, welches für die Durchführung und Auswertung erfahrenes Laborpersonal benötigt. Weitere Verfahren, wie der Hämagglutinationshemmtest (HHT) oder der *Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay* (ELISA), der auch Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist, können ebenfalls Anwendung finden (Grund, Pietzonka et al. 2013).



### 1.2.4 Prävention und Therapie

Präventive Maßnahmen können dazu beitragen eine Infektion mit Influenzaviren zu vermeiden. Dazu zählen als einfachste Maßnahme für Jeden das Einhalten der Standardhygiene, wie Flächendesinfektion von potentiell kontaminierten Bereichen und eine ordentliche Händehygiene. Bei medizinischem Personal kommt zusätzlich das Tragen einer geeigneten persönlichen Schutzausrüstung (PSA) dazu. Eine weitere wichtige Möglichkeit der Prävention stellt seit vielen Jahren die jährliche Influenzaimpfung dar. Durch eine regelmäßige Anpassung des Impfstoffes an die aktuell zirkulierenden Viren, wird, wie bereits erläutert, versucht, einen möglichst hohen Schutz zu gewährleisten. Da der Totimpfstoff in der Regel eine gute Verträglichkeit zeigt, ist er mit wenigen Ausnahmen (z.B. stark ausgeprägte Eiweißallergie) für fast Jeden geeignet und für einige Risikogruppen gemäß STIKO sogar explizit empfohlen (Robert Koch Institut). Mittlerweile wird in Deutschland einheitlich nur noch ein quadrivalenter Impfstoff (derzeit 2x Influenza-A/2x Influenza-B) verimpft. Das starke Durchdringen der B-Variante (Yamagata) in der Saison 2017/18, die nicht in dem trivalenten Standardimpfstoffvorhanden war, hat zur Empfehlung der einheitlichen Verwendung eines Vierfachimpfstoffes geführt (Kwetkat, Leischker et al. 2018).

Bei ungeschützten Kontakt zu Influenzainfizierten gibt es die Möglichkeit, Neuraminidasehemmer als Postexpositionsprophylaxe (PEP) einzusetzen (Sander, Hayden et al. 2006). Die eigentliche Anwendung der Neuraminidasehemmer (Oseltamivir (oral) oder Zanamivir (inhalativ)) ist jedoch die Therapie einer Influenza-A- oder Influenza-B-Virus Infektion. Eine einheitliche Empfehlung zur Anwendung gibt es in Deutschland derzeit nicht, in einer Stellungnahme der Gesellschaft für Virologie (GfV) schließt sich diese jedoch den Empfehlungen des Centers of Diseases Control (CDC) an: rascher Einsatz bei Patienten mit schwerem Verlauf sowie Patienten mit erhöhtem Risiko auf Komplikationen (SchmidtkeM 2014). Resistenzen sind bei dieser Behandlung möglich und die jährlichen Entwicklungen werden für Deutschland über die AG Influenza engmaschig überwacht (Robert-Koch-Institut 2019). Als weitere Medikamente sind Membranprotein-2-Hemmer (z.B. Amantadin) bekannt, doch diese Präparate finden aufgrund einer hohen Resistenzrate und ihrer fehlenden Wirkung auf Influenza B Viren mittlerweile keine Anwendung mehr (Krammer, Smith et al. 2018). Mit dem Wirkstoff Baloxavir als Endonukleasehemmer (Enzym der Virusreplikation) gegen Influenza-A- und Influenza-B-Viren kommt eine neue Wirkstoffklasse als Alternative zu den Neuraminidasehemmern dazu (Hamza, Shehata et al. 2021).

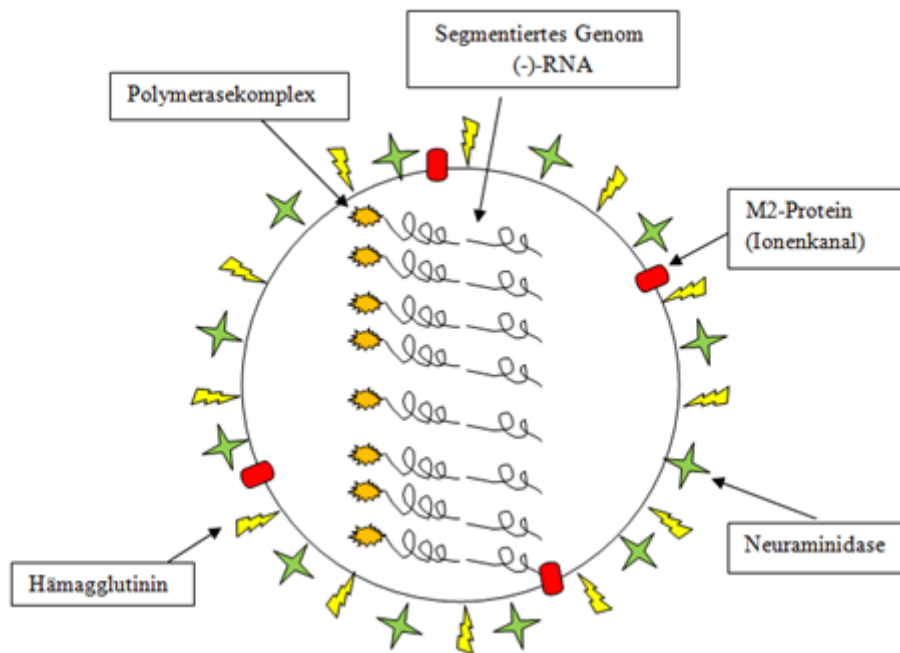
## 1.3 Influenzaviren

### 1.3.1 Aufbau und Struktur

Influenzavirengehören zur Familie der Orthomyxoviridae. Diese Virusfamilie lässt sich weiter in 7 Gattungen (Genera) unterteilen, zu denen die Alpha-, Beta- und Gammainfluenzaviren gehören. Diesen Gattungen entsprechend zugeordnet sind als sogenannte Spezies die bekannten Influenza-A- ( $\alpha$ ) und Influenza-B-Viren ( $\beta$ ) sowie die weit weniger bekannten Influenza-C-Viren ( $\gamma$ ). Die Bedeutung dieser Viren ist noch nicht eindeutig geklärt. Nach derzeitigem Wissensstand können

Influenza-C-Viren beim Menschen leichte Formen der Grippe auslösen (Krammer, Smith et al. 2018). Influenzaviren-A-Viren lassen sich aufgrund der Zusammensetzung ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) weiter in Subtypen einteilen (z.B. H1N1, H7N7). Es sind mindestens 18 verschiedene HA und 11 NA bekannt. Alle Subtypen haben als gemeinsames Reservoir Wildvögel, mit Ausnahme von H17N10 und H18N11, die bisher nur in Fledermäusen gefunden wurden (Tong, Zhu et al. 2013). Influenza-B-Viren werden hingegen weiter in Stammlinien nach dem Ort des erstmaligen Auftretens unterteilt (Krammer, Smith et al. 2018). Das derzeit bekannte Wirtsreservoir von Influenza-B-Viren ist auf den Menschen und Robbentiere begrenzt (Bodewes, Morick et al. 2013).

Orthomyxoviridae sind einzelsträngige, behüllte RNA-Viren die eine negative Polarität besitzen. Mit einer Größe von etwa 80-120 nm zählen sie zu den eher kleineren Viren. Das Genom der Influenza-A- und Influenza-B-Viren besteht aus jeweils 8 Genomsegmenten (segmentiertes Genom), die damit für die viralen Proteine mit unterschiedlichen Funktionen (z.B. Matrixproteine, Protease) kodieren. Zwei dieser viralen Proteine sind die Strukturproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), die aufgrund ihrer Position auf der Virushülle auch als Hüllproteine bezeichnet werden. Hämagglutinine sind Glykoproteine, die jedoch nur auf der Oberfläche weniger Viren zu finden sind und dabei verschiedene Funktionen erfüllen. Zum einen wirken sie als Rezeptorbindungsproteine, welche über Bindung an die N-Acetylneuraminsäuren der Wirtszelle den Viruseintritt in diese vermitteln (Byrd-Leotis, Cummings et al. 2017), zum anderen zählen sie zu den Antigenen, da sie immunitätsbildende Oberflächenstrukturen darstellen. Von bestimmten Zellen des adaptiven Immunsystems (zelluläre Immunantwort) werden diese Strukturen präsentiert und so als Antigene klassifiziert. Weiterhin können sie rezeptorvermittelt Erythrozyten agglutinieren, was auch den Namen erklärt (Krammer, Smith et al. 2018). Das zweite Hüllprotein die Neuraminidase ist mit seiner Enzymfunktion für die Freisetzung neu gebildeter Influenzaviren verantwortlich, indem es die N-Acetylneuraminsäure-Enden der HA-Rezeptoren entfernt (Byrd-Leotis, Cummings et al. 2017). Abbildung 2 stellt den schematischen Aufbau eines Influenzavirus dar. Gezeigt sind im Virusinneren die acht Genomsegmente sowie Nukleoproteine (NP) und der Polymerasekomplex (bestehend aus drei Untereinheiten PB1, PB2 und PA). Diese Strukturen bilden zusammen mit weiteren, hier nicht definierten Proteinen, das Ribonukleoprotein, die Funktionseinheit für die Virus-Replikation. Die M2-Proteine auf der Virushülle haben Ionenkanalfunktion und sind für die Freisetzung des Ribonukleinkomplexes aus dem Endosom nach Aufnahme in die Wirtszelle von Bedeutung (Krammer, Smith et al. 2018).



**Abb.1: Vereinfachte Skizze zum Aufbau eines Influenzavirus**

### 1.3.2 Replikationszyklus

Zielzellen der Influenzavirusreplikation im Menschen sind das zilientragende Flimmerepithel des Respirationstraktes. Das Virus bindet über sein Hämagglutinin an die Sialinsäurerezeptoren ( $\alpha 2,6$ ) der Wirtszelle (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Die eigentliche Aufnahme in die Zelle erfolgt dann Endozytose-vermittelt. Die viruseigenen Ionenkanäle (M2-Proteine) sorgen mittels der Ansäuerung des Milieus für eine Verschmelzung der Virusmembran mit der Endosomenmembran. Die Replikationsfunktionseinheit (Ribonukleoprotein) des Influenzavirus wird zunächst ins Zytosol freigesetzt und anschließend weiter in den Zellkern eingeschleust. Bei Orthomyxoviren findet im Gegensatz zu anderen RNA-Viren Teile der Replikation im Zellkern statt. Daher müssen alle dafür benötigten Enzyme im Virus-Kapsid enthalten sein und mit in den Kern gelangen. Im Zellkern angelangt, zerfällt das Ribonukleoprotein in seine Funktionseinheiten. Da Influenzaviren Einzelstrangviren sind und der vorliegende Strang für das direkte Ablesen und somit für die Bildung neuer RNA-Stränge nicht geeignet ist (falsche Leserichtung), muss zunächst mit Hilfe der viruseigenen Polymerasen eine Kopie der viralen RNA (vRNA) hergestellt werden, die für Wirtsribosomen lesbar ist (also in mRNA=messenger RNA). Mit der zum eigentlichen Strang komplementären Kopie (cRNA) liegt die virale Erbinformation nun in doppelter Form vor. Der neue Strang ist das Ablesemuster für die Bildung neuer vRNA-Stränge. Anders als bei DNA-Viren läuft die mRNA Bildung über eine zusätzliche 5' Cap-Struktur wesentlich aufwändiger ab. Die fertige mRNA gelangt aus dem Zellkern zu den Ribosomen, damit dort die für das neue Virus benötigten Proteine translatiert werden. Alle fertiggestellten Proteine wandern erneut in den Zellkern, um dann mit der viralen RNA zusammen eine neue Viruseinheit (Nukleokapsid) zu bilden. Die noch fehlende Virushülle mitsamt allen viralen Hüllstrukturen erhält das Tochtervirus beim Ausschleusen aus der

Wirtszelle über die Zellmembran selbst. In einem letzten Schritt spaltet die Neuraminidase die Bindung des Tochtervirus mit der Wirtszelle, sodass das neue Virus endgültig freigesetzt werden kann (Krammer, Smith et al. 2018).

### 1.3.3 Antigen drift und shift

Als RNA-Viren sind Influenzaviren im ständigen Wandel. Durch einen fehlerhaften Kontrolllesemechanismus während der Replikation entstehen Mutationen (Punktmutationen), die sich langsam auf die Folgegenerationen auswirken (Heaton, Sachs et al. 2013). Mutationen in den Genomabschnitten, die für die Bildung des Hämagglutinins kodieren, können dabei die Antigeneigenschaften des HAs beeinflussen. Man spricht von einem Antigen drift (s.o.). Für die Immunantwort ist das Hämagglutinin als Antigenstruktur von besonderer Bedeutung (Coudeville, Bailleux et al. 2010, Bullard and Weaver 2021), denn die durch eine Infektion bzw. Impfung gebildeten Antikörper sind hauptsächlich gegen das Hämagglutinin, weniger gegen die Neuraminidase gerichtet (Coudeville, Bailleux et al. 2010). Dennoch kann auch ein Antigen drift in der Neuraminidase vorliegen (Kirkpatrick Roubidoux, McMahon et al. 2021). Fallen die Immunantworten in der Bevölkerung durch die Veränderungen an den antigenen Hüllstrukturen geschwächt aus, so können sogar vereinzelt Epidemien entstehen. Die Veränderungen bleiben jedoch insgesamt so gering, dass kein neuer Virussubtyp entsteht.

Für die Bildung neuer Viren im Sinne eines Antigen-shifts reichen kleine Punktmutationen nicht aus, es müssen größere Genomabschnitte ausgetauscht werden. Da Influenzaviren ein segmentiertes Genom besitzen, kann es bei gleichzeitiger Infektion von mindestens zwei verschiedenen Influenzaviren einer Wirtszelle zu einem Austausch der Genomstücke kommen (Bouvier and Palese 2008). Diese Neuverteilung bzw. Umstrukturierung der Genomabschnitte nennt man *Reassortment* (Krammer, Smith et al. 2018). Findet dieser Vorgang bei Influenza-A-Viren statt, so können dadurch neue Influenzasubtypen entstehen. Man spricht von einem Antigen shift. Ist der neue Subtyp für den Menschen immunologisch unbekannt, so können sich daraus Pandemien entwickeln. Häufig geschieht dieses, wenn durch das *Reassortment* eine Durchmischung von bisher rein tierischen mit humanen Influenzaviren stattfindet (Bouvier and Palese 2008). Dazu muss die Wirtszelle jedoch suszeptibel für diese Viren sein. So eignen sich Schweine mit ihren diversen Sialinsäurerezeptoren als optimale Vermischungswirte (Ma, Kahn et al. 2008). Bei den letzten großen Pandemien („Asiengrippe“, „Hong-Kong-Grippe“ und „Neue Grippe 2009“) setzen sich die neuen Viren aus einem humanen und mindestens einem tierischen Virus zusammen. Die „Asiengrippe“ und die „Hong-Kong-Grippe“ zeigen humane und aviäre Anteile auf, das Pandemievirus von 2009/10 setzte sich sogar aus porcinen (Schwein), aviären und humanen Anteilen zusammen (Schrauwen and Fouchier 2014). Da das so neu entstandene Virus für das menschliche Immunsystem in weiten Teilen fremd sein kann, ist wie zuletzt 2009/10 die rasche Entwicklung eines stärker spezifischen Pandemieimpfstoffes von großer Bedeutung. Nach Abklingen einer Pandemie finden sich die pandemischen Viren wenn auch mit der Zeit durch Antigen drift verändert, für mehrere Jahre bis Jahrzehnte bei den saisonal zirkulierenden Viren

ein. Daher ist auch in den letzten Saisons, wie 2019/20, weiterhin ein pandemieähnlicher Influenza-A-Stamm (*A/Brisbane/02/2018 (H1N1) pdm09*-ähnlicher Stamm) in der Impfstoffauswahl vertreten (Rose, Kissling et al. 2020).

#### 1.3.4 Pandemievirus A-H1N1 2009 „Neue Grippevirus“- A (H1N1) pdm09

Vom Frühjahr 2009 bis in den Sommer 2010 hinein erstreckte sich die letzte große pandemische Influenzawelle. Beginnend in Mexiko und den USA breiteten sich die Infektionen weltweit rasch von Mensch zu Mensch aus. Im Juni 2009 wurde das Geschehen seitens der WHO zur Pandemie erklärt (Baldo, Bertoncetto et al. 2016). Das dafür ursächliche Influenzavirus konnte überraschenderweise als Influenza-A-Virus Subtyp H1N1 identifiziert werden. So wurde als ein neues Virus mit Pandemiepotential ein komplett neues, unbekanntes Virus erwartet und nicht ein Subtyp der bereits zur Zeit der Spanischen Grippe 1918/19 und danach saisonal bis in die 50er Jahre hinein zirkulierte (Taubenberger and Morens 2006). Doch das neue Influenza-A-Virus H1N1 unterschied sich in seinem Verhalten von den bisher bekannten Pandemieviren. Es ähnelte es in seiner Infektiosität eher saisonalen Viren. Die Virulenz jedoch, gerade bei Kindern und jungen Menschen (<65 Jahren), war aber eine andere. Unter den schweren Verläufen und Todesopfern fand sich vermehrt diese Gruppe (Baldo, Bertoncetto et al. 2016). Schaute man sich dazu die Mutationen des neuen Virus genauer an, so fiel eine Variante mit einer D222G Mutation im Hämagglutinin-Gen auf. Diese Mutation veränderte die HA-Bindungen an die Sialinsäurerezeptoren des Wirtes, sodass es an  $\alpha$ -2,3 und  $\alpha$ -2,6-glykosidische Bindungen binden konnte. Der direkte Zugang sowohl zum oberen als auch unteren Atemwegstrakt (mit möglicher Pneumonie) war somit gegeben. Diese Mutation ist möglicherweise eine Erklärung für die teilweise raschen, fatalen Verläufe bei jungen Patienten (Goka, Vallely et al. 2014, Baldo, Bertoncetto et al. 2016). Um eine taxonomische Abgrenzung vom bisherigen H1N1-Virus zu schaffen, wurde es *H1N1 pdm09* genannt. Bei allen neuen Viren ist der Ursprung von großer Relevanz. Bis dieser geklärt werden konnte, mussten viele phylogenetische Analysen durchgeführt werden. (Smith, Vijaykrishna et al. 2009). Der Originalstamm trägt letztendlich den Namen *A/California/7/2009 (H1N1)*. Bei allen Analysen konnte man humane, aviäre und (mehrere) porcine Anteile finden. Die Vermutung lag daher nahe, dass das *Reassortment* am ehesten im Schwein stattgefunden haben muss (Smith, Vijaykrishna et al. 2009). Bis letztendlich der Name „Neues Grippevirus 2009“ festgelegt wurde, hieß es zwischenzeitlich „Mexikogrippevirus“ und „Schweinegrippevirus“. Einen nicht nur phylogenetischen Zusammenhang mit dem „alten H1N1“ Virus aus dem frühen 20. Jahrhundert mit dem „neuen Virus“ zeigte sich durch die Altersstruktur der erkrankten Patienten, darunter viele Junge (<60 Jahre). Verhältnismäßig viele ältere Menschen > 60 Jahre erkrankten nicht oder nur schwach. Es liegt daher der Verdacht nahe, dass in dieser Bevölkerungsgruppe ein Restschutz gegen die damaligen H1N1-Influenzaviren vorlag (Hancock, Veguilla et al. 2009). Der durch die saisonalen Impfungen der vorherigen Jahre aufgebaute Immunschutz zeigte bei jungen Menschen (<65 Jahre) hingegen kaum bis gar keine Wirkung, auch hier gab es eine Steigerung der kreuzreaktiven Antikörpern eher bei Älteren (>65 Jahre) (Hancock,

Veguilla et al. 2009). Der Verlauf der Pandemie forderte ein rasches Handeln seitens der Gesundheitsorganisationen. Es wurden in recht kurzer Zeit virusstammspezifische Pandemieimpfstoffe entwickelt (z.B. *Pandemrix*®), um die Ausbreitung des Virus zu stoppen. Rückblickenden Analysen zu Folge hat sich das Pandemiegeschehen jedoch nicht in dem Ausmaß entwickelt wie initial angenommen (Fineberg 2014).

## 1.4 Influenzaimpfstoffe

### 1.4.1 Allgemeines, Herstellung und Zusammensetzung von saisonalen Influenzaimpfstoffen

Die ersten Influenzaimpfstoffe gegen IAV und IBV (bivalent) wurde in den 1940er Jahren mit der Entdeckung der Influenza-B-Viren entwickelt (Hannoun 2013). Heutzutage zählen sie zu den wichtigsten und bekanntesten Impfstoffen und sind von der WHO auf die „Liste der unentbehrlichen Arzneimittel“ gesetzt (WHO 2017). Die saisonale Grippeimpfung sollte nach den deutschen Empfehlungen der STIKO jährlich erfolgen, möglichst im Herbst. Besondere Empfehlungen gelten beispielsweise für Menschen über 60, Schwangere in der Regel ab dem 2. Trimenon, Patienten mit Immundefekten und chronisch Kranke, aber auch für Menschen, die berufsbedingt einem „erhöhten Risiko“ ausgesetzt sind (Robert-Koch-Institut 2020). Generell ist eine Influenzaimpfung für Jeden möglich, außer es bestehen Kontraindikationen wie allergische Reaktionen gegen Bestandteile des Impfstoffes (Fiore, Uyeki et al. 2010, Grohskopf, Alyanak et al. 2020).

Derzeit sind in Deutschland für Erwachsene Totimpfstoffe (z.B. Spaltvakzinen) empfohlen. Für immunkompetente Kinder ist zusätzlich zum Totimpfstoff ab dem 6. Lebensmonat ein nasal applikativer Lebendimpfstoff für Kinder ab 2 Jahren bis zur Vollendung des 17. Lebensjahres erhältlich. Eine Empfehlung für die Bevorzugung des Lebendimpfstoffes wurde seitens der STIKO aufgehoben (Robert-Koch-Institut 2020). Bis zur Saison 2017/18 waren sowohl trivalente (H1N1, H3N2 sowie eine B-Komponente) als auch tetravalente Impfstoffe (zweite B-Komponente zusätzlich) verfügbar. Mit dem starken Durchbruch des „fehlenden“ Phuket-Stamms der Yamagata-Linie (Influenza-B-Virus) im trivalenten Impfstoff und der daraus resultierenden starken Saison wurde ab 2017/18 in Deutschland für alle Menschen nur noch ein quadrivalenter Impfstoff verimpft (Kwetkat, Leischker et al. 2018). Um die aktuell zirkulierenden Viren bestmöglich abzudecken, wird der jährliche, saisonale Impfstoff regelmäßig angepasst. Die Empfehlungen zur Zusammensetzung der Referenzstämme, die auf epidemiologischen Beobachtungen und Auswertungen beruhen, werden von der WHO veröffentlicht. Kontrolle über die Herstellung und Zulassung der erhältlichen Impfstoffe liegt in Deutschland beim Paul-Ehrlich-Institut (PEI, Langen). An diese Behörde werden auch jegliche Auffälligkeiten nach Impfung gemeldet, die einen Verdacht auf eine Impfkomplikation vermuten lassen. Auf den Internetseiten des PEI sind alle (aktuell) zugelassenen Impfstoffe einsehbar (PEI 2022). Saisonale Influenzaimpfstoffe werden von vielen Herstellern produziert. Zu den derzeit in Deutschland verwendeten Totimpfstoffen zählen Spaltvakzinen (Teilpartikelimpfstoffe) und Untereinheitenimpfstoffe (freigelöste Hüllproteine HA und NA). Die HA-Anteile entsprechen den zwei Influenza-A-Komponenten, z.B. in der Saison 2020/21 das HA von H1N1- sowie H3N2-

ähnlichen Stämmen sowie HA von den B-Linien Yamagata (Phuket) und Victoria (Washington), zusätzlich sind HA und NA-Monomere enthalten (PEI 2022). Die Herstellung der Impfstoffe erfolgt derzeit überwiegend in Hühnereiern, wobei es letztlich Unterschiede in ihrem Proteinanteil (Reinheit), im Antigengehalt und, sofern verwendet, in der Auswahl der Adjuvantien gibt. Adjuvantien sind Wirkungsverstärker der Immunantwort, die in Totimpfstoffen Verwendung finden können (Yamayoshi and Kawaoka 2019). Da eine starke Eiweißallergie immer noch eine Kontraindikation zur Impfung darstellt, wurden für diese Patienten Alternativen entwickelt (Fiore, Uyeki et al. 2010, Grohskopf, Alyanak et al. 2020). Mit der Zulassung von zellkulturbasierten Impfstoffen, z.B. „Flucelvax®“ ein Impfstoff auf MDCK-Zellkulturbasis (*Madin Darby canine kidney*/Hundenierenzellen) (Lamb 2019) entfällt diese. Um das bekannt schwächere Immunansprechen im Alter (Immunoseneszenz) (McElhaney, Verschoor et al. 2020) zu verbessern, können adjuvantierte Impfstoffe (*Fluad Tetra*® ab 65 Jahren) verwendet werden. Zusätzlich gibt es eine neue STIKO-Empfehlung zur kommenden Saison 2021. Für Patienten ab 65 Jahren wird es einen Hochdosis-Impfstoff ohne Adjuvans geben, der durch eine vierfach höhere Dosis an HA-Anteilen die Impfantwort optimieren soll (Wilkinson, Wei et al. 2017, Michaelis, Scholz et al. 2020).

#### 1.4.2 Pandemieimpfstoffe gegen H1N1 pdm09

Pandemieimpfstoffe stellen eine Besonderheit unter den (Influenza-)Impfstoffen dar. Es handelt sich um Impfstoffe, die zum Notfalleinsatz in einer Pandemiephase bestimmt sind. Sie werden in kürzester Zeit entwickelt, sollten dabei möglichst adäquat auf den neuen Erreger mit möglicherweise bereits vorhandenen Mutationen passen und trotzdem den hohen Ansprüchen der Arzneimittelsicherheit entsprechen (Richter-Kuhlmann and Siegmund-Schultze 2009).

Im Rahmen der letzten Influenzapandemie 2009/10 wurde seitens der WHO mit der höchsten Pandemiestufe 6 der Einsatz eines Pandemieimpfstoffes auf internationaler Ebene gefordert (Fineberg 2014). Mit der Zulassung des ersten Pandemieimpfstoffes *Pandemrix*® für Deutschland gegen den Stamm der „neuen Influenza H1N1“ (*California/7/2009*), der Firma *GlaxoSmithKlineBiologicals* (GSK) konnte seitens der STIKO am 12.10.2009 die „Empfehlung zum Einsatz von Pandemieimpfstoffen gegen das Neue Influenzavirus A (H1N1)“ erfolgen. Weitere Empfehlungsanpassungen an das epidemiologische Geschehen folgten z.B. im November 2009. Die geplante Impfreiherfolge wurde gestaffelt festgelegt, beginnend mit dem medizinischem Personal und Menschen ab sechs Lebensmonaten mit „erhöhter gesundheitlicher Gefährdung“, über Schwangere und junge Menschen bis hin zur letzten Gruppe, Menschen mit einem Alter über 65 Jahre (STIKO 2009).

Bei den Impfstoffen handelte es sich um ein monovalentes Vakzin, einzig gegen den pandemischen Influenzastamm gerichtet und im Gegensatz zu den saisonalen Impfstoffen überwiegend adjuvantiert. Neben dem Präparat *Pandemrix*® gab es für Deutschland weitere Zulassungen, doch *Pandemrix*® war die am meisten verimpfte Vakzine (Wichmann, Stocker et al. 2010). *Pandemrix*® ist eine auf Hühnereibasis hergestellte Spaltvakzine, die als Haupt-Antigen das HA (3,75µg) des pandemischen

Stamms (*A/California/7/2009* (H1N1) enthält. Zusätzlich ist als Wirkverstärker das Adjuvans AS03 beigefügt. AS03 besteht aus Squalen, alpha-Tocopherol und Polysorbat 80 (Cohet, van der Most et al. 2019).

Die während der Pandemiephase tatsächlich verabreichten Impfdosen waren jedoch wesentlich weniger als initial geplant. Dafür gibt es verschiedene Gründe. So zeigten erste Daten zum Impfansprechen nach der ersten Impfung rasch, dass die gemessenen Antikörpertiter wesentlich höher ausfielen als anfangs angenommen. Somit wurde der erwünschte Impfschutz nach nur einer Impfung angenommen und die Zweitimpfung als Boosterung entfiel (Wichmann, Stocker et al. 2010). Ein weiterer Punkt ist der bereits zuvor erwähnte, insgesamt eher schwache Verlauf der Pandemie. Auch die Impfbereitschaft der Bevölkerung ist zu erwähnen. Mit leichten Unterschieden in den einzelnen Bundesländern lag die Impfbereitschaft unter 15%, beim medizinischen Personal mit etwa 16% nicht wesentlich höher (Robert-Koch-Institut 2010). Aufgrund von regelmäßig veröffentlichten Risikofallberichten des PEI über möglicherweise unerwünschte Nebenwirkungen/Impfzwischenfällen der *Pandemrix*<sup>®</sup>-Vakzine kam es zu Verunsicherung in der Bevölkerung. Diese Risikofallberichte wurden zu verschiedenen Symptom/Organbereichen erstellt, darunter auch zu neurologischen Auffälligkeiten wie dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS, aufsteigende, meist reversible Lähmung) (PEI 2009). Zeitlich verzögert kamen Verdachtsfälle von Narkolepsie (gehäuft bei Jugendlichen in Skandinavien), nach Impfung mit dem Präparat *Pandemrix*<sup>®</sup> auf (Sarkanen, Alakuijala et al. 2018) hinzu. Da viele Verdachtsfälle bei Kindern unter 20 Jahren mit der Zeit nicht nur in Skandinavien gesichert werden konnten, wurde seitens der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) im Juli 2011, als die Pandemie bereits beendet war, eine Warnung für die Verwendung bei unter 20-Jährigen ausgesprochen (EMA 2011). Verschiedene Hinweise und mögliche Erklärungen zum Pathomechanismus konnten durch diverse postpandemische Studien erbracht werden (Oberle, Pönisch et al. 2013, Vaarala, Vuorela et al. 2014, Sarkanen, Alakuijala et al. 2018, Hallberg, Smedje et al. 2019). Eine denkbare Erklärung für die Narkolepsie ist eine Autoimmunreaktion des Körpers überwiegend bei Menschen mit einem bestimmten humanen Leukozyten-Antigen-(HLA)-Haplotyp (DQB1\*06:02). Bei diesen Patienten konnten isoliert Antikörper gegen das Influenzavirus (gegen Nukleoprotein-A) nachgewiesen werden, welche ebenfalls Affinität zu Rezeptoren von körpereigenen Hormonen (Hypokretin) des Schlaf-Wachrhythmus zeigten und diese somit ungewollt hemmten. Dabei kam jedoch die Frage auf, warum diese Fälle nur nach Verwendung des Impfpräparates *Pandemrix*<sup>®</sup> auftraten und nicht bei vergleichbaren Produkten, wie beispielsweise dem kanadischen Präparat *Arepanrix*<sup>®</sup>. Vaarala et al ging dieser Frage nach und untersuchte beide Impfstoffe bis auf die Proteinebene. Tatsächlich waren die Präparate in ihrer Zusammensetzung vergleichbar, die verwendeten Adjuvantien (AS03) glichen sich, der HA-Anteil war vergleichbar und fiel im Pandemieimpfstoff sogar insgesamt geringer aus als in nicht adjuvantierten Grippeimpfstoffen. Einzig der Anteil an viralem Nukleoprotein (NP) zeigte sich in den Proteinanalysen im Präparat *Pandemrix*<sup>®</sup> verhältnismäßig hoch, was ebenfalls zu den Erkenntnissen von Hallberg et al passt (Hallberg, Smedje et al. 2019). Vaarala begründet den unterschiedlichen Nukleoproteinanteil der zwei Impfpräparate mit



dem jeweils herstellerspezifischen Produktionsverfahren in der Impfstoffherstellung (Vaarala, Vuorela et al. 2014). Da jedoch auch Fälle bei Menschen ohne diesen HLA-Typ aufgetreten sind, muss es auch noch andere Pathomechanismen geben (Oberle, Pönisch et al. 2013, Hallberg, Smedje et al. 2019).

## 1.5 Impferfolg

### 1.5.1 Humorale Immunantwort nach Impfung mit Totimpfstoffen

Mit einer aktiven Immunisierung sollen die Zellen des erworbenen Immunsystems angeregt werden, um auf einen tatsächlichen Kontakt mit dem jeweiligen Pathogen/Erreger vorbereitet zu sein (Immungedächtnis). Diese aktivierten Zellen des erworbenen Immunsystems sind Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten), die es wiederum aufgrund ihrer Eigenschaften in einen zelladaptierten und einen humoralen Part unterteilen. T-Lymphozyten bilden dabei die zelladaptierte Immunabwehr, da sie entweder als zytotoxische T-Zellen körpereigene, jedoch veränderte Zellen (beispielsweise durch den Erregerbefall) erkennen und direkt angreifen um sie zu vernichten oder durch T-Helferzellen die die Antikörperproduktion über B-Lymphozyten anregen. B-Lymphozyten (über Plasmazellen) hingegen sind direkt an der Antikörperproduktion, sowie an der Bildung von Gedächtniszellen beteiligt und stellen das humorale Immunsystem dar (Leidel 2015, Murphy and Weaver 2018). Antikörper (Immunglobuline = Ig) lassen sich in unterschiedliche Klassen wie zum Beispiel IgM, IgG und IgA einteilen. IgM hat seine Funktion als Antikörper der Frühphase, IgG Antikörper besitzen eine lange Persistenz und sind plazentagängig, IgA wirkt vorrangig in den Schleimhäuten (Leidel 2015). Speziell IgG können noch weiter in Subklassen (IgG 1-4) mit teilweise unterschiedlichen Funktionen differenziert werden. Die einzelnen Subklassen liegen in unterschiedlichen Konzentrationen vor und bilden das Gesamt-IgG (Murphy and Weaver 2018).

Antikörper können über verschiedene Funktionsweisen die Pathogene bekämpfen. So gibt es Antikörper, die das Pathogen binden, um die Aufnahme in die Wirtszelle zu hemmen und somit die Infektion dieser verhindern (neutralisierende Antikörper). Eine andere Möglichkeit ist die Bindung der Antikörper an das Pathogen, dadurch kann es zu einer Opsonierung („anpreisen“) durch das Komplementsystem, einem Bestandteil der angeborenen Immunität, kommen, sodass das Pathogen von phagozytierenden Zellen eliminiert werden kann (Murphy and Weaver 2018). Wie gut die Immunantwort auf einen Impfstoff ausfällt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen spielt die Immunogenität/Antigenität des Impfstoffes eine wichtige Rolle. So gilt beispielsweise für Totimpfstoffe, dass je reiner der Impfstoff ist, desto besser ist die Verträglichkeit bei schlechterer Immunstimulation (Leidel 2015). Auch die passende Auswahl des Impfantigens ist, besonders bei der saisonalen Influenzaimpfung, ausschlaggebend. Umgekehrt kann die Funktion des Immunsystems die Immunantwort ebenfalls beeinflussen. Ist das Immunsystem supprimiert, ob durch einen Immundefekt, medikamentös bedingt oder durch das Alter (Immunoseneszenz), ist mit einer schwächeren Antwort als bei Immunkompetenten rechnen.

### 1.5.2 Impferfolg von Influenzaimpfungen

Durch den erfolgreichen Einsatz von Influenzaimpfungen sollen nicht nur Erkrankungen und damit assoziierte Sterbefälle verhindert werden, gewünscht ist eine generelle Reduktion der Viruszirkulation in der Bevölkerung (Grund, Wichmann et al. 2012). Doch der Impferfolg ist, wie bereits in 1.1 erwähnt, von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben der Impfquote in der Bevölkerung ist auch die Effektivität des jeweiligen Impfstoffes relevant. Eine allgemein schwankende Wirksamkeit der (saisonalen) Impfstoffe zwischen den Saisons ist mittlerweile bekannt (Osterholm, Kelley et al. 2012). Influenzaviren haben eine hohe Variabilität in ihrer Antigenstruktur, sodass die passende Auswahl der jeweiligen Impfviren trotz intensiver epidemiologischer Beobachtungen schwierig ist. Auswertungen zur Wirksamkeit für die einzelnen Jahre zeigen dies. Für Deutschland können diese Daten über die AG Influenza des RKI eingesehen werden (Robert-Koch-Institut 2019). Wie erfolgreich ein saisonaler Impfstoff letztendlich war lässt sich jedoch häufig erst nach Ende der Saison genau ermitteln. Ein weiterer, wichtiger Punkt ist das individuelle Ansprechen des Geimpften auf den Impfstoff.

### 1.5.3 Überprüfung des Impferfolges

Eine Überprüfung des Impferfolges nach Influenzaimmunisierung stellt keine routinemäßige Untersuchung dar. Sie ist eine Zusatztestung bei spezieller Fragestellung, häufig als retrospektive Testungen im Rahmen von epidemiologischen Studien (Robert-Koch-Institut 2016) oder wissenschaftlichen Studien.

Eine Möglichkeit zur Aussage über den Immunstatus nach Impfung ist der Nachweis von neutralisierenden Antikörpern in einem Neutralisationstest (NT) (Grund, Adams et al. 2011, Grund, Pietzonka et al. 2013). In der Routinediagnostik findet dieses Verfahren heutzutage nur noch in einigen Laboren zur Bestimmung des Polioimpftiters Verwendung (Diedrich and Keeren 2017) In einem ersten Schritt wird das zu untersuchende Patientenserum in definierten Verdünnungsstufen, beispielsweise 1:4; 1:8; 1:16 ff., mit dem Erreger vorinkubiert, gegen den die neutralisierenden Antikörper gerichtet sein sollen. Danach werden die Serum-Virusverdünnungs-Stufen auf Mikrotiterplatten pipettiert, auf welche eine zum Virus passende Zelllinie (beispielsweise suszeptible MDCK-Zellen) vorgelegt wurde. Sind im Patientenserum neutralisierende Antikörper vorhanden, so binden diese das Virus, sodass es nicht mehr in die Zellen eindringen kann. Die Zellen bleiben unberührt, es wird keine Veränderung durch die Invasion des Virus sichtbar (bei Virusvermehrung wird ein sogenannter cytopathischer Effekt (CPE) als Veränderung der Zellen sichtbar). Da die Seren in einer Verdünnungsreihe vorliegen, kommt es schließlich zu der Stufe, bei der die Antikörper soweit ausverdünnt sind, dass ein CPE nicht mehr verhindert werden kann. Sind nun mehr als 50% der Zellen durch einen CPE verändert, so ist dieses die Stufe, ab der die Patientenantikörper nicht mehr ausreichend neutralisieren. Als Titer wird nun die letzte Verdünnungsstufe davor abgelesen (Grund, Adams et al. 2011). Zur Auswertung von Neutralisationstesten wird erfahrenes Laborpersonal benötigt. Für jeden erregerspezifischen NT ist ein *cut-off* Titer festgelegt, der mindestens erreicht werden muss, um ausreichenden Schutz gewährleisten zu können (Grund, Adams et al. 2011, Grund,

Pietzonka et al. 2013). Studien, wie von Hancock et al. zeigen, dass kreuzreaktive Antikörper durch vorherige Impfungen oder Wildtypinfektionen mit reagieren können (Hancock, Veguilla et al. 2009). Um gezielte Stamm-spezifische Antikörper zu detektieren oder Antikörper weiter zu spezifizieren (z.B. über ihren Reifegrad mittels Aviditätstestung) bietet sich ein ELISA an (Grund, Adams et al. 2011). Je nach Design des ELISA können unterschiedliche Fragestellungen bedient werden. Wie in 1.7 beschrieben, stellen unterschiedlich aufgebaute ELISA-Testungen die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit dar.

## **1.6 Impfungen für besondere Patientengruppen**

### **1.6.1 Impfpflicht in Deutschland allgemein**

Die STIKO ist in Deutschland als unabhängiges Expertengremium beratend für das aktuelle Impfgeschehen zuständig. Ihre Empfehlungen beruhen auf neuen Forschungsergebnissen zu bereits bekannten Impfstoffen oder auf der Anwendung neuzugelassener Präparate. Obwohl die STIKO reine Empfehlungen ausspricht, haben diese allgemein großen Einfluss, beispielsweise auf die Kostenübernahme der Impfungen durch die gesetzlichen Krankenkassen (GKV) (Harder, Koch et al. 2019). Die Empfehlungen können Patientengruppen direkt betreffen (sog. Risikogruppen) oder sollen übergreifenden Schutz für eine große Gruppe erzielen (z.B. arbeitsmedizinische Indikation). Über die Veröffentlichungen des RKI im „Epidemiologischen Bulletin“ und im aktuellen „Impfkalender“ werden diese verschriftlicht (Robert-Koch-Institut 2020). Zu den Risikogruppen zählen auch Patienten nach Organtransplantation. Viele dieser Impfpflichtungen können gerade für diese Menschen sinnvoll sein, so auch die Empfehlung zur jährlichen saisonalen Influenzaimpfung.

### **1.6.2 Nierentransplantierte Patienten-Allgemeines sowie ihr Ansprechen auf Impfungen**

Nierentransplantierte Patienten stellen unter allen Organtransplantierten in Deutschland die größte Gruppe dar. Es werden jährlich etwa 2.000 Nieren transplantiert (2020: 1909 Nieren), dabei überwiegt die Anzahl postmortaler Spender gegenüber Lebendspenden eindeutig (DSO 2021). Die neue Niere stellt für den Körper ein Fremdorgan dar, sodass das Empfängerimmunsystem lebenslang mittels therapeutischer Immunsuppressiva moduliert werden muss. Als Therapie wird in der Regel eine Kombinationstherapie eingesetzt, die sich im Verlauf nach Nierentransplantation (NTx) in Dosierung und Zusammensetzung ändert. Typische Immunsuppressiva sind Proliferationshemmer wie Mycophenolat-Mofetil (MMF), Calcineurininhibitoren wie Tacrolimus oder Ciclosporin zusammen mit Glukokortikoiden. Ziel der Therapie ist eine lange Funktionsfähigkeit des Transplantats ohne Abstoßung. Daher ist die Therapieeinstellung der Patienten oft individuell gewählt (der Nierentransplantationszentren Nordrhein-Westfalens 2019). Eine Behandlung mit oben genannten Immunsuppressiva zur Unterdrückung der körpereigenen Immunabwehr gegen die neue Niere hat ebenfalls Einfluss auf das Abwehrverhalten gegen Erreger (erhöhte Infektanfälligkeit) sowie auf die Immunantwort nach (Influenza)Impfung (Gangappa, Wrammert et al. 2019).

Notwendige Impfungen, die keine kontinuierliche Auffrischung benötigen, sollten bestenfalls schon vor der Transplantation abgeschlossen sein (der Nierentransplantationszentren Nordrhein-Westfalens 2019). Durch die Empfehlung zur jährlichen Influenzaimmunisierung entfällt diese Option und die Impfungen erfolgen unter Immunsuppression. Die Datenlage zur Impfantwort unter Immunsuppression bei Zustand nach NTx lässt jedoch noch einige Fragen offen, nicht zuletzt da die Therapien sehr komplex und individuell sein können. Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang mit dem verwendeten Immunsuppressivum und der Impfantwort besteht, zeigen sich mittlerweile in einigen Studien. Einige Daten zum Impfansprechen nach saisonaler Influenzaimpfung liefert beispielsweise die Publikation von Kunisaki und Janoff aus 2009, die sich mit dem Thema „Influenza bei immunsupprimierten Patienten“ befasst (Kunisaki and Janoff 2009). Doch nicht nur die Wahl der Immunsuppressiva, auch die Zeit nach Transplantation sowie die Transplantatfunktion können die Immunantwort beeinflussen (Gangappa, Wrammert et al. 2019). Somit lag die Vermutung nahe, dass das Impfansprechen auf die pandemische Influenzaimpfung 2009 unter den NTx-Patienten ebenfalls zu unterschiedlichem Impfansprechen geführt haben kann, was uns zur Fragestellung der vorliegenden Arbeit führte.

### **1.7 Fragestellung/ Zielsetzung der Arbeit und Vorarbeiten**

Unterschiede im Impfansprechen bei NTx-Patienten konnten in Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe mittels Neutralisationstest, als Goldstandard zur Messung der Immunantwort nach Influenzaimpfungen (Grund, Pietzonka et al. 2013), tatsächlich aufgezeigt werden. Dazu wurden NTx-Patienten mit einer Kontrollgruppe aus gesunden Probanden verglichen. Bei der Kontrollgruppe waren drei Wochen nach Impfung neutralisierende Antikörper nachweisbar (Neutralisations-Titer (NT-Titer)  $> 1:160$ ), die sich bis zu sechs Monate nach Impfung immer noch in gleicher Höhe bestätigen ließen. Die Gruppe der nierentransplantierten Patienten ( $n=57$ ) ließ sich jedoch anhand ihrer Neutralisationstiter in sogenannte *Responder* ( $n=37$ ), die in ihrer Immunantwort den gesunden Probanden glichen und in *Non-Responder* ( $n=20$ ), Patienten, die auch drei Wochen nach Impfung noch keinen adäquaten Impfschutz zeigten (NT Titer  $<1:160$ ), unterteilen. Nachtestungen dieser Patienten zeigten auch nach 6 Monaten keinen Anstieg des Impftiters, sodass Einige eine Zweitimpfung erhielten. Um nun die Unterschiede in den Immunantworten genauer charakterisieren zu können, wurde ein rekombinanter HA-IgG-ELISA etabliert und modifiziert (Grund, Pietzonka et al. 2013). Mit Hilfe dieser Testmethode sollten die Ergebnisse des Neutralisationstestes spezifiziert bzw. ergänzt werden. Zusätzlich sollten die neuen Ergebnisse zeigen, ob mittels des ELISA-Tests Aussagen über das Impfansprechen nach einer (pandemischen) Influenzaimpfung getroffen werden können, die den Ergebnissen der Neutralisationstestung entsprechen. Somit stünde ein alternatives Verfahren zur Verfügung, welches schneller und einfacher umzusetzen wäre.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Seren

Die verwendeten Serumproben stammten von zwei Probandengruppen, zum einen von der Kontrollgruppe (gesunden Probanden), sowie von nierentransplantierten Patienten (NTx) der Klinik für Nephrologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Alle Teilnehmer waren gemäß RKI Empfehlung mit dem Pandemieimpfstoff *Pandemrix*® des Herstellers GSK geimpft worden. Vorherige Impfungen gegen die saisonale Influenza wurden nicht berücksichtigt. Die Proben wurden bereits im Vorfeld zu der vorliegenden Arbeit gesammelt, abesert und bei -20°C gelagert. Pro Person wurden zu festdefinierten Zeitpunkten (s.u.) drei Serumproben entnommen. Eine Vortestung mittels Neutralisationstest zum Nachweis des Impferfolges wurde mit den Proben „3 Wochen nach Impfung“ durchgeführt. Als Grenztiter für einen ausreichenden Schutz wurde dabei ein Titer von 1:160 ermittelt, wie von Grund et al veröffentlicht (Hansen, Grund et al. 2012) worden. Anhand der Testergebnisse ließen sich somit die NTx-Patienten in *Responder*-und *Non-Responder* ( $\geq 1:160$ ) einteilen (Grund, Adams et al. 2011, Hansen, Grund et al. 2012). Bei den *Non-Respondern* wurde nach erneuter Impfung zusätzlich eine vierte Serumprobe entnommen.

1. vor der Impfung
2. ca. 3 Wochen nach Impfung
3. ca. 6 Monate nach Impfung
- 4 *Non-Responder* zusätzlich ca. 3 Wochen nach 2. Impfung

#### 2.1.1.1 Untersuchungsgruppe Nierentransplantierte Patienten (NTx)

39 Patienten (männlich=30/weiblich=9, Durchschnittsalter 54 Jahre) der hiesigen nephrologischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. med. Rump) bildeten das Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit. Alle Patienten befanden sich  $\geq 3$  Monate nach Nierentransplantation (Lebend-/Leichenniere) sowie unter individueller immunsuppressiver Therapie (Hansen, Grund et al. 2012). Die Vortestungen mittels NT erbrachten bei 66% (n=26) dieser Patienten bereits 3 Wochen nach Impfung einen adäquaten Neutralisationstiter, sodass sie als *Responder* eingestuft werden konnten. Die restlichen Patienten (n=13) zeigten im 2.Serum einen verhältnismäßig niedrigen NT-Titer (maximal 1:40 mit einer Ausnahme von 1:80) sodass sie definitionsgemäß als *Non-Responder* galten. Ihnen wurde eine erneute Impfung als Boosterung 6 Monate nach der ersten Impfung angeboten. Von allen Patienten wurde, wie oben beschrieben, zu diesem Zeitpunkt das dritte Serum entnommen. Unter den *Non-Respondern* fanden sich 10 Patienten, bei denen 3 Wochen nach Impfauffrischung eine 4. Serumprobe gewonnen werden konnte, um daraus einen möglichen Einfluss der Boosterung untersuchen zu können.

### 2.1.1.2 Kontrollgruppe (KG)

Die für die vorliegende Arbeit verwendete Kontrollgruppe setzte sich aus Seren zusammen, die bereits für die Testung mittels Influenza-NT verwendet worden waren (NT-Probandensammlung). Anhand der somit bestimmten Ergebnisse konnten gezielt Proben gewählt werden die spätestens im 3. Serum einen Titer von  $\geq 1:160$  aufwiesen. Dieser definierte *Cut-off* traf auf 32 gesunde Probanden im Durchschnittsalter von 36 Jahren zu. Zwei dieser Probanden wurden zwecks Qualitätssicherung des ELISA als stetige Kontrollproben ausgewählt und in den jeweiligen Versuchsauswertungen nicht mit der Kontrollgruppe ausgewertet. Somit bestand die eigentliche Kontrollgruppe letztendlich aus 30 Probanden.

### 2.1.1.3 Verdünnungsseren-Impfpool (Standardkurve ELISA)

Ausgewählte Seren aus der NT-Probandensammlung ( $n=12$ ), die einen Titer von  $\geq 1:1280$  im 2. Serum aufwiesen, wurden in den durchgeführten ELISA-Testungen zur Ermittlung von Standardkurven (4 Punkte-Kalibration) verwendet. Acht dieser Proben gehören zu Probanden dieser Kontrollgruppe. Anhand dieser Standardkurven konnten die gemessenen ELISA-Ergebnisse quantifiziert werden (in AU). Dazu wurden die Proben gepoolt und als Vierfachverdünnungsreihen auf den Testplatten mitgeführt.

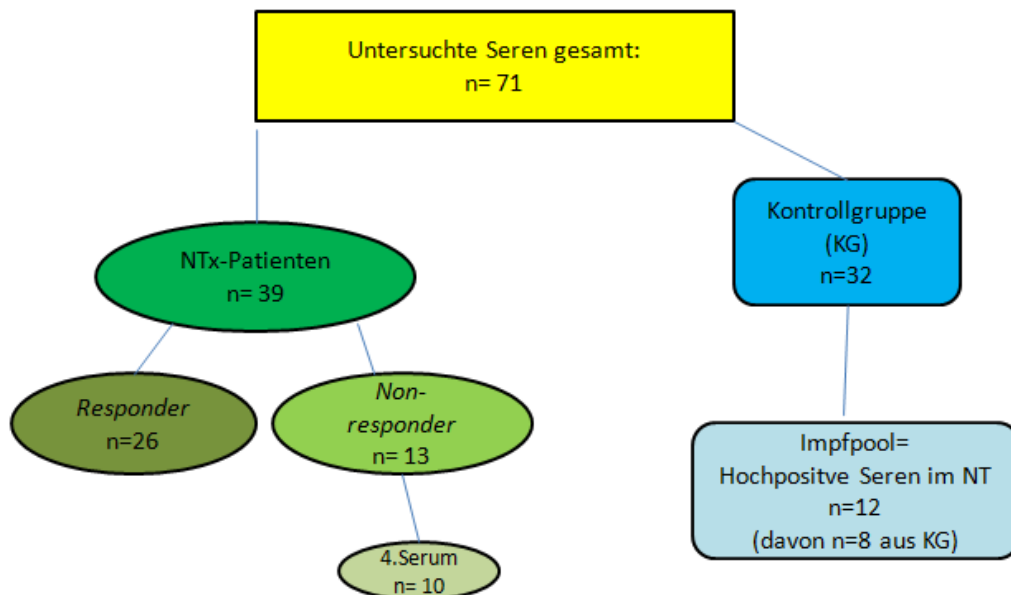


Abb.2: Übersicht der untersuchten Seren (n=71)

## 2.1.2 Antigene

- rekombinantes HA *Influenza A/California 04/09* (Konz: 775 µg/ml) (Protein Science Corp.; Meriden, CT, USA no. 3006)
- rekombinantes HA *Influenza A/California 07/09* (Konz: 840 µg/ml) (B. Schweiger RKI, Berlin, BRD)
- rekombinantes HA *Influenza A/Brisbane 59/07* (Konz: 939µg/ml) (Protein Science Corp.; Meriden, CT, USA no. 3006)

## 2.1.3 Antikörper

- Sekundärantikörper: Peroxidase gekoppelter-Maus-Anti-IgG-HRPO, Sigma: A0293-1ML
- Kreuz-Antikörper gegen die saisonale Influenza (gegen HA):

<i>Anti-Influenza A/Brisbane/59/2007 (H1N1)</i>	}	(Schafantikörper NIBSC, London, England)
<i>Anti-Influenza A/Brisbane/10/2007 (H3N2)</i>		
<i>Anti-Influenza B/Brisbane/60/2008</i>		

- Antikörper Pandemiestamm:

*Anti-Influenza A/California07/09 H1N1* (Schafantikörper NIBSC, London, England)

## 2.1.4 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Für die einzelnen Testungen wurden überwiegend Chemikalien der Firmen Sigma, Serva, Roth und Merck verwendet. Bei Abweichungen ist dieses extra vermerkt.

- Beschichtungspuffer „*Coating buffer*“ auf pH 9.6  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,59g; NaHCO<sub>3</sub> 2,93g; Aqua dest.1l
- Blockierungspuffer:  
FKS 5ml (5%); BSA 2g (2%); PBS 0,1l
- Verdünnungspuffer:  
5% FKS; 0,5% *Tween20* aufgefüllt mit PBS
- Waschpuffer:  
PBS mit 0,5% *Tween20*
- Harnstofflösung (nach Austestung):  
8 M Harnstofflösung
- Substrate:  
OPD+Na-Borat-Kapseln+100ml Aqua dest.
- Stopplösung:  
Schwefelsäure 0,5M

## 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

- ELISA-Platten *U96 Maxisorp Nunc-Immuno-Plate*, Cat.No. 449824, Nunc, Dänemark
  - Zellstoff, Tork
  - Plastikkammer- *Reagent Cartridges Blood 200µl* Qiagen Lot.No. 160033928
  - Pipetten:
    - Einkanalpipette Gilson Pipetman, Frankreich, diverse Volumina (0,1-1000µl)
    - Einkanalpipette Eppendorf, Hamburg Deutschland diverse Volumina (0,1-1000µl)
    - Mehrkanalpipette 8 bzw. 12-Kanal-Pipette- Eppendorf, Hamburg Deutschland
  - Pipettenspitzen (Starlab-GmbH, Ahrensburg, Deutschland)
    - 0,1-10 µl *Bevelled Filter Tips*, Cat. No. S1121-3810, TipOne Filter Tip
    - 1-20µl *Bevelled Filter Tips*, Cat. No. S1120-1810, TipOne Filter Tip
    - 1-200µl *Bevelled Filter Tips*, Cat. No. S1120-8810, TipOne Filter Tip
    - 100-1000µl *Bevelled Filter Tips*, Cat. No. S1122-1830, TipOne Filter Tip
  - Sterile Einmalpipetten
    - 1ml Cat. No. 604181, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
    - 2ml Cat. No. 4486 Costar, Corning USA
    - 5 ml Cat.No. 4487 Costar, Corning USA
    - 10 ml Cat. No. 4488 Costar, Corning, USA
    - 25 ml Cat. No. 4489 Costar, Corning USA
  - Falcon® Tubes
    - 15ml Cat.No. 734-0451, BD, Franklin Lakes USA
    - 50ml Cat.No. 734-0448, BD, Frankling Lakes USA
- 
- 2.1.6 Geräte
- Vortexer
    - VV3, VWR, Darmstadt Deutschland
    - Vibrofix VF1 Electronic*, Janke& Kunkel, IKA Labortechnik, Littau, Schweiz
  - Waagen
    - Feinwaage, MC 210 S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
    - Mettler PC 2000, Mettler-GmbH, Gießen, Deutschland
  - Pipettierhilfe „*Pipetboy acu*“, IBS Integra Bioscience, Chur, Schweiz
  - Magnetrührer IKAMAG RH, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Littau, Schweiz
  - ELISA-Reader (*Sunrise Magellan Absorbance Reader*, Tecan, Crailsheim, BRD; REF 16039400)



### 2.1.7 Software

- SigmaPlot Version 10.0
- Microsoft Word 2010
- Microsoft Excel 2010
- Microsoft Powerpoint 2010 (für Abbildungen)
- Microsoft Paint 2010 (für Abbildungen)
- Endnote X6
- Übersetzertool DeepL

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Vortestung mittels Neutralisationstest

Alle Seren wurden im Vorfeld in einem neu etablierten Neutralisationstest getestet. Da die Messungen jedoch nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, ist die genaue Methodenbeschreibung der Publikation Grund et al (Grund, Adams et al. 2011) zu entnehmen. Als Grenztiter für einen ausreichenden Impfschutz und somit *Responder*-Status wurde, wie bereits beschrieben, ein Titer von  $\geq 1:160$  festgelegt.

### 2.2.2 Testung mittels ELISA-Techniken

Zur weiteren Charakterisierung der gemessenen humoralen Immunantwort wurde für die vorliegende Arbeit ein indirekter, rekombinanter ELISA (r-ELISA) etabliert (Grund, Pietzonka et al. 2013), welcher im Verlauf der Testungen stetig weiter modifiziert wurde.

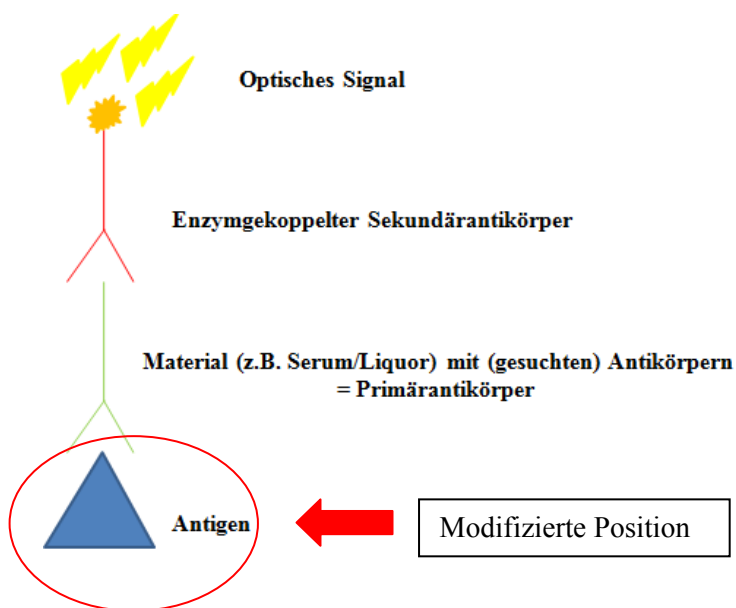


Abb. 3: Vereinfachte grafische Darstellung einer indirekten ELISA-Methode

### 2.2.2.1 Indirekter ELISA mit rekombinantem HA des pandemischen Influenzavirus *H1N1 California 07/09* bzw. *04/09* zum Nachweis humaner IgG Antikörper

#### - Antigen:

Rekombinantes HA *Influenza A/California 04/09* (Konz: 775 µg/ml)

Rekombinantes HA *Influenza A/California 07/09* (Konz: 840 µg/ml)

- Sekundärantikörper: Peroxidase gekoppelt z.B. Maus- $\alpha$ -hIgG-HRPO, Sigma: A0293-1M

#### - Lösungen:

- Beschichtungspuffer (*Coating buffer*)

- Blockierungspuffer

- Verdünnungspuffer

- Waschlösung

- Substrat

- Stopplösung

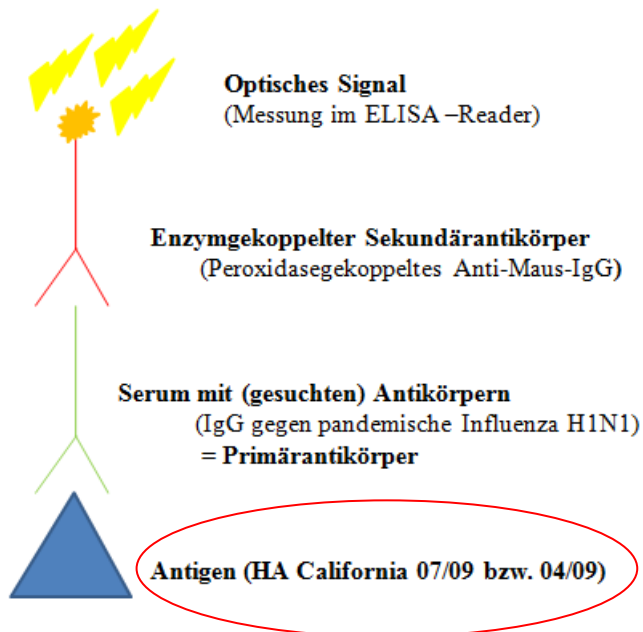
- Probandenserum

- Standardkurven-Serumpool

- Standard-Kontrollproben der KG (zwecks Qualitätssicherung)

- Verbrauchsmaterial: ELISA-Platten *U96 Maxisorp Nunc-Immuno-Plate*, Plastikammer,

Pipettenspitzen



**Abb.4:** Vereinfachte grafische Darstellung indirekter ELISA mit rekombinantem HA des pandemischen Influenzavirus *H1N1 California 04/09* bzw. *07/09*

Zu Beginn mussten die 96 U-Loch-ELISA-Platten mit dem rekombinanten HA vorbeschichtet werden. Dazu wurde das jeweilige HA auf eine gewünschte Konzentration von 0,25 µg/ml gebracht (04/09 3,6 µl HA auf 11 ml Beschichtungspuffer, 07/09: 3,2 µl HA auf 11 ml Beschichtungspuffer) und in jedes Loch (*Well/Cup*) 100µl der hergestellten Mischung mittels 12-Kanal-Pipette pipettiert. Die Platten wurden abgedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten entleert und in jedes *Well* 150µl Blockierungspuffer mittels 12-Kanal-Pipette überführt. Es folgte eine erneute Inkubation von 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Entleerung der Platten wurden diese zweimal mit Waschpuffer (jeweils 200µl/*Well*) gefüllt, um möglichst alle Reste des Blockierungspuffers zu entfernen und umgedreht auf Zellstoff getrocknet. Der Waschschrift konnte mit einer Spritzflasche erfolgen. Die getrockneten Platten konnten für die Testung direkt weiterverwendet oder auf Vorrat bei 4°C geschützt gelagert werden. Im nächsten Schritt wurden die ausgewählten Patientenserum auf die vorbereitete Platte gegeben. Dazu wurde im Vorfeld für jede Platte ein Belegungsschema/-plan erstellt. Zur Kontrolle wurden auf jeder Platte Negativkontrollen (mock) sowie als Positivkontrollen die Verdünnungsstandards aus dem Serumpool (siehe Abb. 5) in Reihe 1 mitgeführt. Die jeweiligen Verdünnungsstufen wurden anhand einer im Vorfeld durchgeführten Austestung des Kontrollpools mit 4-Punkt-Kalibrationskurve zur Quantifizierung der IgG-Werte in AU festgelegt (Siehe dazu Abb. 5/6 sowie 2.1.1.3). Die Abkürzung AU steht dabei für *arbitrary units*, eine „willkürliche Einheit“, die es ermöglicht, verschiedene Messungen auf gleichem Level miteinander zu vergleichen.

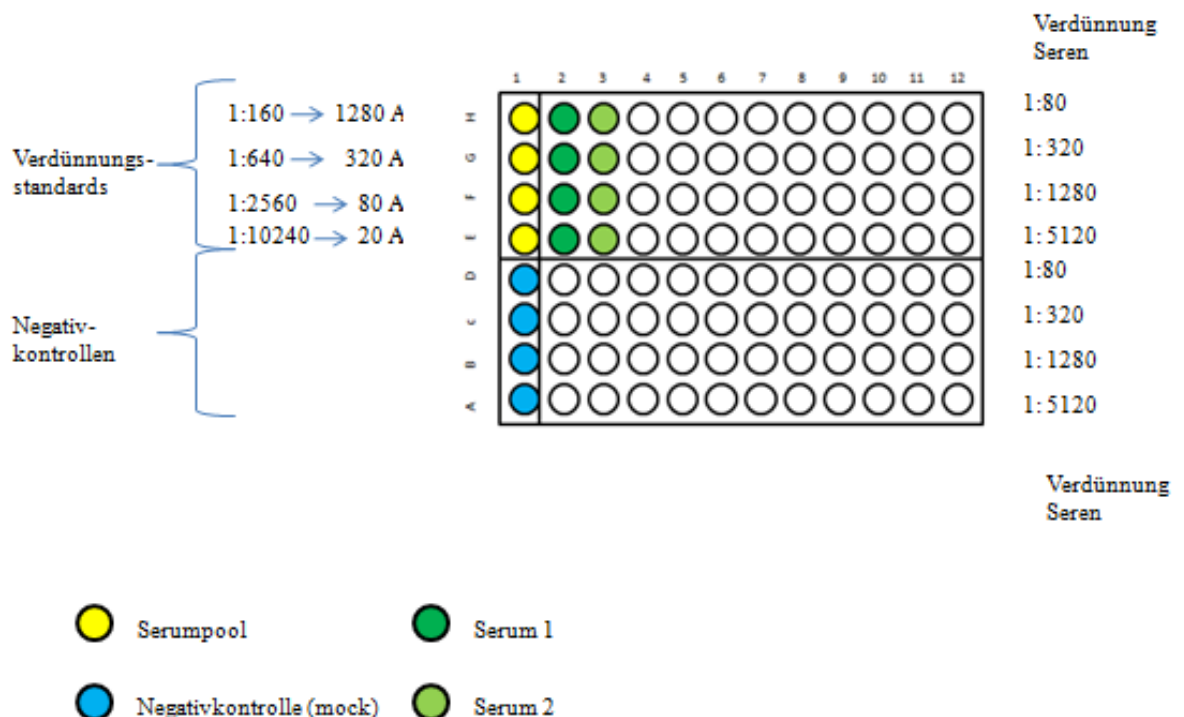
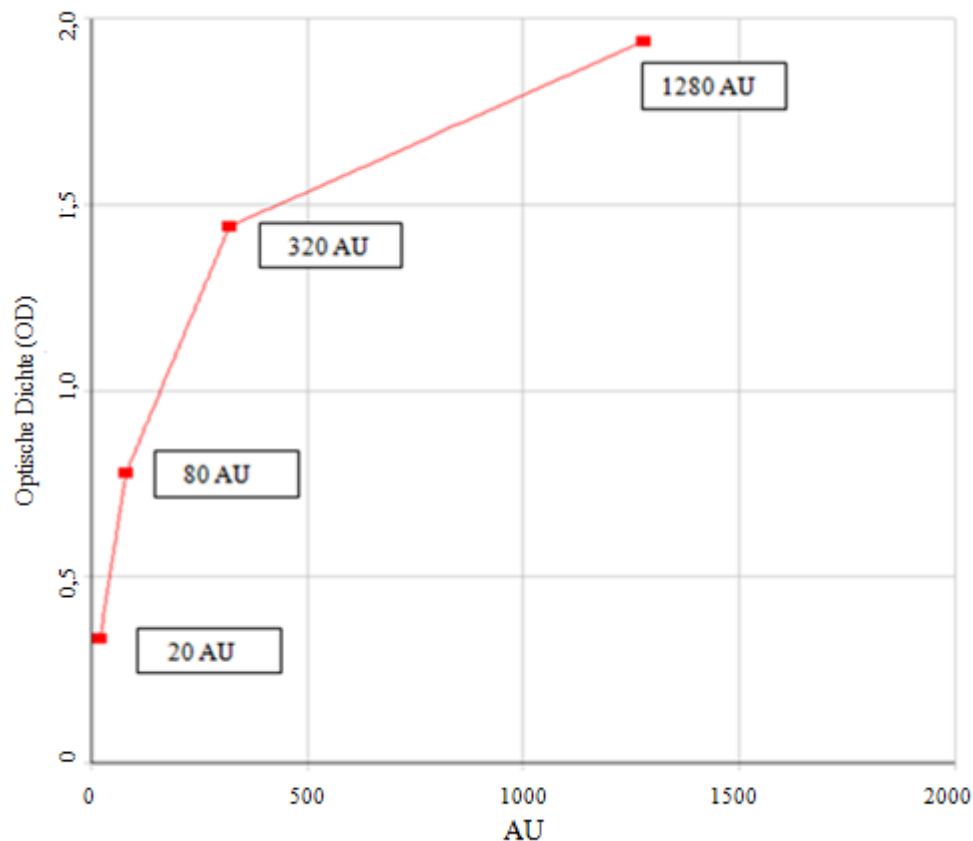


Abb.5: Beispiel Belegungsschema ELISA- Platte rekombinanter HA-ELISA (r-ELISA)



**Abb.6: 4 Punkt-Kalibration Standardkurve** (4-fach Verdünnungsstufen 20/80/320/1280 AU) der Standardkurve aus definiertem Impfpool (n=12, NT-Ergebnis  $\geq 1:1280$  im 2.Serum) zur jeweiligen Quantifizierung der ELISA-Ergebnisse. Der Y-Achse sind die Extinktionen in OD zu entnehmen, der X-Achse die Ergebnisse in AU.

Um eine Kontrolle der Qualität der selbsthergestellten ELISA Platten zu haben, wurden sporadisch die ausgewählten Kontrollproben mit in die Plattenbelegung eingeplant. Die Bearbeitung dieser Seren erfolgte identisch zu den restlichen Proben. In die restlichen *Wells* wurden die Versuchsproben pipettiert, die ebenfalls anhand einer zuvor ermittelten Kalibrationskurve in Verdünnungsstufen festgelegt wurden. Für die Verdünnungstitrationen wurden zunächst in jede Vertiefung 90 $\mu$ l Verdünnungspuffer mittels 12-Kanalpipette vorgelegt. Dazu wurde in die *Wells* der oberste Reihe (A und E) mit einer Einzelkanalpipette 30 $\mu$ l des jeweiligen Materials (Kontrollpool oder Versuchsprobe) in seiner Startverdünnung gegeben. Die Startverdünnung lag für die Standards bei 1:40, bei den Versuchsproben bei 1:20, hergestellt durch Ansatz von jeweiligem Material mit Verdünnungspuffer. Somit konnte für den Verdünnungsstandard in *Well* A1 ein Ausgangstiter von 1:160 und für die Versuchsproben in Reihe A und E von 1:80 eingestellt werden (90 $\mu$ l Verdünnungspuffer + 30  $\mu$ l Startverdünnung). Die anschließende Austitration wurde durch vertikale Übertragung (von A nach D

bzw. E nach H) von je 30µl nach 3-maligem Durchmischen je *Well* mit einer 12-Kanal-Pipette bei den Patientenseren und mit einer Einkanalpipette bei den Verdünnungsstandards durchgeführt. Nach dem jeweils letzten *Well* wurden die restlichen 30µl verworfen. Die fertig pipettierte Platte wurde zur Bildung möglicher Antikörper-Antigen-Komplexe (IgG-HA) in einer feuchten Kammer 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Dazu wurde in eine Plastikbox (z.B. Umverpackung aus den Qiagen-EZ Kits „*Reagent Cartridges*“) ein Stück feuchter Zellstoff gelegt, die ELISA-Platte hineingestellt und die Kammer fest verschlossen. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Platten erneut gewaschen um alle nicht gebundenen freien Antikörper zu entfernen. Nach dreimaligem Waschen wurden die Platten wieder umgedreht auf Zellstoff gelagert angetrocknet. Mittels Sekundäntikörper wurden im Folgeschritt die HA-gebundenen Antikörper markiert. Dazu wurde dieser im Vorfeld in Verdünnungspuffer gelöst, indem 2µl Maus-α-hIgG Sekundäntikörper auf 40 ml Verdünnungspuffer gegeben und gut vermischt wurde. Mittels 12-Kanalpipette konnte in jedes *Well* 100 µl des Sekundäntikörpergemischs pipettiert werden. Es folgte eine erneute Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer, danach wieder Waschvorgang und Trocknung wie im Schritt zuvor. Zur optischen Detektion der Bindung des Sekundäntikörpers wurde in einem vorletzten Schritt das Substrat hinzugefügt. Pro Platte wurde dazu 1 Tablette OPD in 100 ml Verdünnungspuffer gelöst und mittels 12-Kanal-Pipette 100µl/*Well* pipettiert. Die letzte Inkubationsphase erfolgte bei Raumtemperatur, lichtgeschützt für 20 Minuten. Das Substrat verfärbte sich in Plattenvertiefungen mit positivem Antikörper-Nachweis türkisblau, je nach Verdünnung in unterschiedlicher Intensität. Die Zugabe der Stopplösung von 100 µl pro *Well* führte zu einem erneuten Farbumschwung auf gelb. Die Farbintensität bzw. die folgend gemessene Extinktion war proportional zur Menge der IgG-Antikörper im jeweiligen Material. Zur genauen Bestimmung der eigentlichen Extinktion folgte eine Auswertung mittels *ELISA-Reader/Photometer* bei 495 nm, sowie anhand der mitgeführten Standardkurve = Kalibrationskurve die Berechnung der quantitativen Ergebnisse in AU.

#### 2.2.2.2 Indirekter ELISA zur Spezifitätstestung mit Antikörpern gegen die saisonalen Influenzastämme

- Antigen: Rekombinantes HA *Influenza A/California 07/09* (Konz: 840 µg/ml)

- Primär-Antikörper vom Schaf = saisonale Stämme:

*Anti-Influenza A/Brisbane/59/2007 (H1N1)*

*Anti-Influenza A/Brisbane/10/2007 (H3N2)*

*Anti-Influenza B/Brisbane/60/2008*

Saisonale Influenzastämme gemäß der saisonalen Impfstoffzusammensetzung der Saison 2009/2010 (PEI)
--

- Positivkontrolle: *Anti-Influenza A/California/7/2009* Pandemiestamm

- Standard-Kontrollproben der KG

- Standardkurven-Serumpool

- restliche Reagenzien/Materialien siehe 2.2.2.1

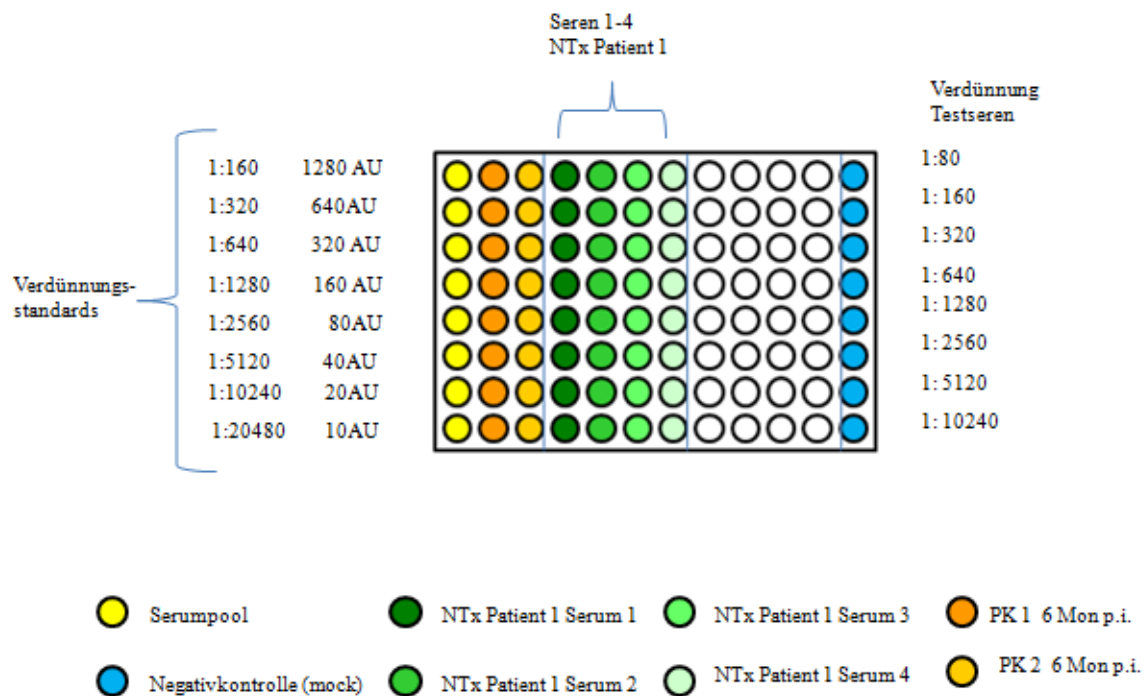
Um die Spezifität des neu etablierten ELISA zu sichern, wurden Kontrollläufe mit Antikörpern gegen die saisonalen Influenzastämme durchgeführt. Dazu wurden drei Schafseren mit jeweils reinsubtypenspezifischen Antikörpern verwendet. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle Antikörper gegen den pandemischen Influenzastamm (NIBSC London), routinemäßig die Standardkurve sowie zur Qualitätssicherung die definierten Kontrollseren mitgeführt. Die Beschichtung der Platte erfolgte wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Da die Verdünnungen der Proben den Verdünnungsstufen des NT angepasst sein sollten, musste das Plattenbelegungsschema geändert werden. Die Verdünnungsstufen sollten in jeweils 1:2 Verdünnungsschritten beginnend bei 1:160 bis 1:20480 verlaufen; sodass jeder Probe eine komplette Plattenreihe (A-H) zugeordnet werden musste. In jede Vertiefung wurde zunächst mittels 8-Kanal-Pipette 100µl Verdünnungspuffer vorgelegt. Die einzelnen Proben wurden dann alle auf eine 1:80 Verdünnung vorbereitet. Nun konnte von jeder Probe in die einzelnen *Wells* der Reihe A 100µl pipettiert werden. Um die Proben mittels 1:2 Verdünnung bis zur Stufe von 1:20480 aus zu verdünnen wurden nun jeweils 100µl in das folgende untere *Well* überführt. Die restlichen 100µl aus den *Wells* der letzten Reihe H wurden verworfen. Der weitere Verlauf bis einschließlich der Extinktionsmessung mittels Photometer glich dem Protokoll unter 2.2.2.1.

2.2.2.3 Indirekter ELISA zur Testung der Seren auf Kreuzreaktivität gegen einen saisonalen Influenzastamm mit HA *Influenza A/Brisbane/59/2007(H1N1)*-ähnlich

- Antigen: Rekombinantes HA *Influenza A/Brisbane/59/07* (Konz.: 939µg/ml)
- Probandenserum
- Standard-Kontrollproben der KG
- Standardkurven-Serumpool
- restliche Reagenzien/Materialien siehe 2.2.2.1

Der Nachweis einer hohen Spezifität des neu etablierten ELISA-Verfahrens auf Antikörper gegen den pandemischen Influenzastamm alleine sollte für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit nicht ausreichen. Zusätzlich sollte auch ein möglicher Einfluss durch Kreuzreaktionen im Patientenserum gegen die saisonale Influenza (hier *Influenza A/Brisbane/59/07*) abgeklärt werden. Daher wurden die Versuchsseren ebenfalls auf Antikörper gegen diesen saisonalen Influenzastamm getestet. Das bereits bekannte Protokoll wurde dazu leicht abgeändert. Für die Plattenbeschichtung wurde als Antigen das HA *Influenza A/Brisbane/59/07* (Konz: 939µg/ml) verwendet (3µl rHA in finalen 11 ml Beschichtungspuffer). Zusätzlich wurde das Belegungsschema angepasst. So wurden je Lauf zwei festgelegte Positivkontrollen mit pipettiert. Bei diesen Kontrollen handelte es sich um zwei Probanden-Proben der Kontrollgruppe mit einem hohen Titer im NT  $\geq 6$  Monate nach Impfung. Die eigentlichen Testseren wurden jeweils im drei-bzw.- vierfachen Ansatz (Serum vor Impfung, 3 Wochen und 6 Monate nach Impfung, 4. *Non-Responder*-Serum) auf die Platte gegeben. Die Austitrierung erfolgte bei diesen Testläufen jeweils 1:2 bis auf eine Verdünnung von 1:10.240 bei den

Testseren (*Well* A-H) und bis 1:20480 (*Well* A-H) für die Standardkurve herunter. Der restliche Testaufbau glich dem etablierten Protokoll.



**Abb.7: Beispiel Belegungsschema ELISA- Platte Kreuzreaktivität mit *Influenza A/Brisbane59/07* für NTx-Patienten *Non-Responder***

#### 2.2.2.4 Aviditäts-ELISA pandemische Influenza *California 04/09* bzw. *07/09* mit Harnstoff – Bestimmung des Aviditätsindex (AI)

- Antigen: Rekombinantes HA *Influenza A/California 04/09* (Konz: 775 µg/ml)  
Rekombinantes HA *Influenza A/California 07/09* (Konz: 840 µg/ml)
- Harnstofflösung 8.0 M
- restliche Reagenzien/Materialien siehe 2.2.2.1
- Probandenserum
- Standardkurven-Serumpool
- Standard-Kontrollproben der KG

Mit diesem rekombinanten ELISA sollen zunächst alle IgG Antikörperklassen, die gegen das vorgelegte HA gerichtet sind und binden können, nachgewiesen werden. Somit kann vorerst keine Aussage über die Qualität der Antikörper getroffen werden. Mit Hilfe der Aviditätsmessung, zur Bestimmung der Bindungsstärke der Antikörper (über seine Mehrfachbindungen) an das Antigen, kann die Reife der Antikörper gemessen und damit die Qualität der detektierten Antikörper genauer definiert werden. Messungen der Avidität können mittels Harnstofflösungen durchgeführt werden.

Dabei werden alle nicht ausreichend gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexe durch die denaturierende Wirkung des Harnstoffes (HS) wieder gelöst. Nur wirklich starke Bindungen halten der Behandlung stand (=hochavide Antikörper).

Für das verwendete Aviditätsprotokoll wurden im Vorfeld Testreihen mit unterschiedlicher Molarität (Stoffmengenkonzentration) der Harnstofflösung durchgeführt, bis letztendlich eine 8 molare (8M) Harnstofflösung als Optimum festgelegt werden konnte. Gearbeitet wurde nach dem initialen ELISA-Protokoll (Beschichtung 04/09: 3,6µl rHA in finalen 11ml Beschichtungspuffer; 07/09: 3,2 µl HA auf 11 ml Beschichtungspuffer), die Plattenkonfiguration wurde jedoch wieder angepasst (siehe Abb.7). Dazu wurde die Platte wie folgt eingeteilt: A-D ohne Harnstoff und E-H mit Harnstoff. Jede Probe wurde pro Hälfte im 4-fach Ansatz pipettiert, pro *Well* 30µl Probe auf 90µl Verdünnungspuffer. Damit in allen Proben eine vergleichbare Ausgangskonzentration vorlag, wurden alle Seren im Vorfeld auf einen Ausgangswert von 250 AU eingestellt. Der zusätzliche Harnstoffschritt erfolgte nach Inkubation mit den Testseren. Dazu wurden je *Well* entweder 150µl Waschpuffer (A-D) oder 150µl 8M Harnstoff (E-H) hinzu pipettiert. Nach 30 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Platten gewaschen, getrocknet und weiter bearbeitet. Die in AU gemessenen Extinktionen pro Serum wurden je Anteil (mit HS bzw. ohne HS) gemittelt. Beide Ergebnisse wurden für die Berechnung der Avidität mittels Aviditätsindex (AI) benötigt:  $(AU \text{ mit HS} / AU \text{ ohne HS}) (\times 100)$ .

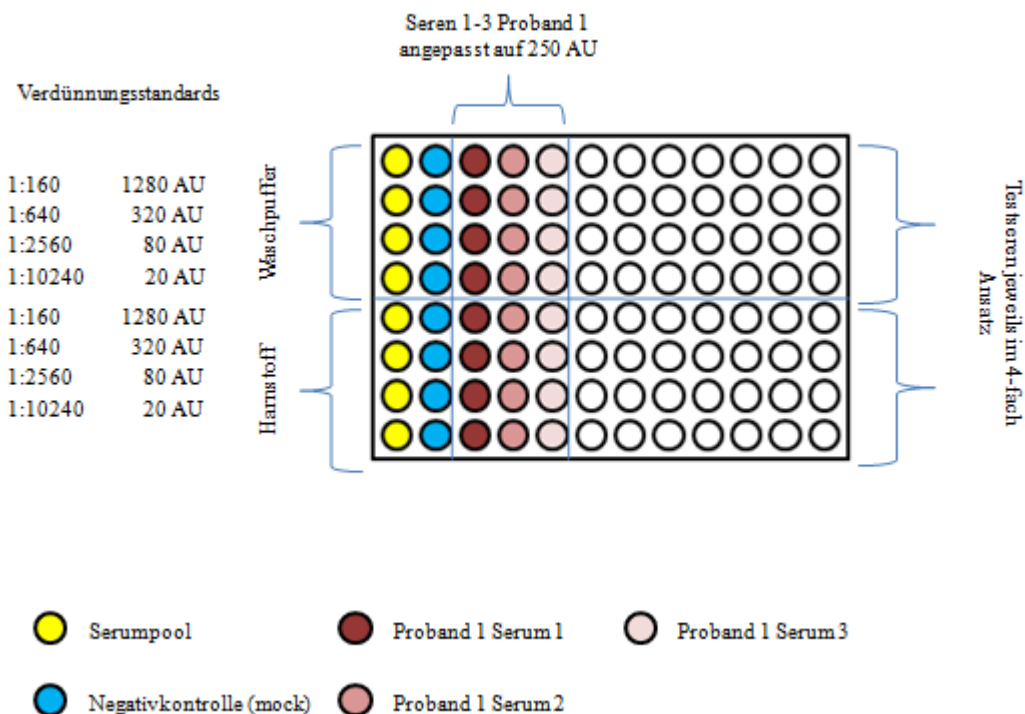


Abb.8: Beispiel Belegungsschema ELISA-Platte Aviditätsbestimmung für Probandenserum



### 2.2.3 Statistische Auswertungen

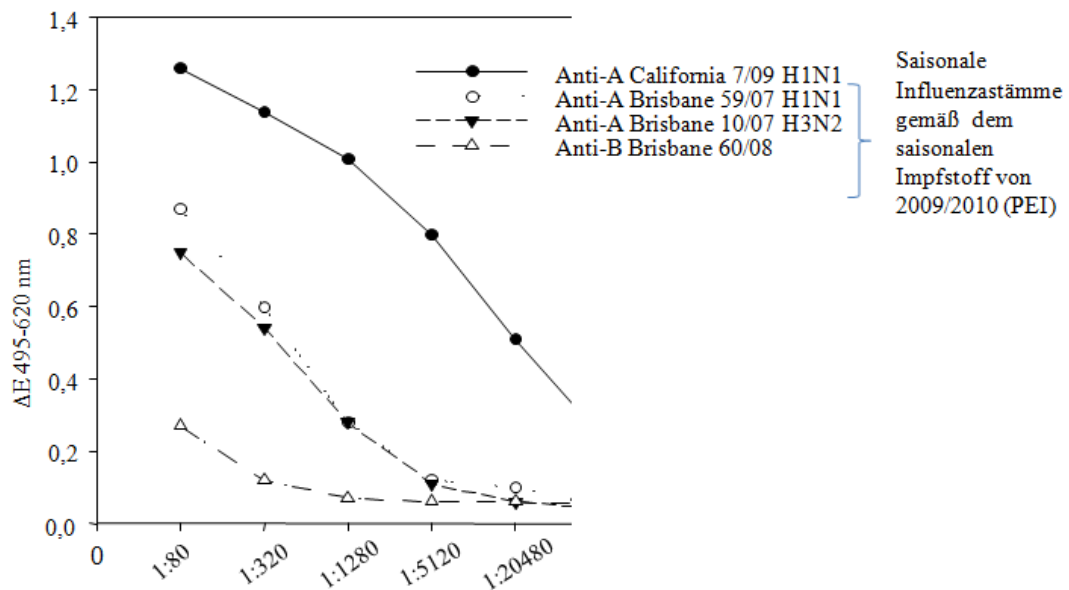
Die Extinktionsmessungen in AU der einzelnen Platten erfolgte mittels eines *ELISA-Readers* (*Sunrise Magellan Absorbance Reader* Firma Tecan) bei einer Wellenlänge von 495 nm.

Die statistischen Berechnungen wurden mittels *Wilcoxon-signed-rank* Test durchgeführt, für die anschließende statistische Darstellung wurden die Programme SigmaPlot Version 10.0, Microsoft Excel 2010 und Microsoft Power Point 2007 verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Indirekter ELISA zur Spezifitätstestung mit Schaf-Antikörpern gegen die saisonalen Influenzastämme

Damit eine eindeutige Aussage über die mittels dieses ELISA gemessene humorale Immunantwort gegen das pandemische Influenzavirus getroffen werden konnte, musste die Spezifität des Testes gesichert werden. Die gemessenen IgG-Antworten sollten ausschließlich Antikörpern gegen A California H1N1 entsprechen und möglicherweise vorhandene Antikörper gegen die drei damals zirkulierenden saisonalen Influenzastämme (sowohl IAV und IBV) aus der Betrachtung folglich ausgeschlossen werden können. Die Austestung der Spezifität der ELISA-Platten konnte durch den Einsatz von spezifischen Schafantisera, die isoliert Antikörper gegen die jeweiligen saisonalen Influenzastämme enthielten, erfolgen. Zusätzlich wurden in dem Ansatz die vordefinierte Standardkurve sowie die Kontrollseren zur Stabilitätskontrolle mit getestet. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der Antikörpernachweise gegen den Pandemiestamm im Vergleich zu den drei saisonalen Stämmen. Die Verdünnungsstufen orientierten sich an der definierten Standardkurve und gingen noch eine Verdünnungsstufe darüber hinaus. Betrachtet man zunächst die Austestung der Schafantikörper gegen den saisonalen Influenza-B-Stamm, so zeigten sich nahezu keine messbaren Extinktionen (Verdünnung 1:80  $\Delta E < 0,3$ ). Ein Einfluss durch mögliche kreuzreaktive Antikörper gegen den saisonalen B-Stamm in den Versuchsproben konnte somit ausgeschlossen werden und die Spezifität dieses ELISA gegen diesen Stamm war gesichert. Anders jedoch fielen die Ergebnisse der Schafseren der beiden Influenza-A-Stämme *Brisbane* H1N1 und H3N2 aus. Beide Kurven verliefen nahezu deckungsgleich und zeigten im Vergleich zum B-Stamm in den Verdünnungen über 1:80 hinaus messbare Extinktionen, die jedoch in ihrer Höhe die Extinktion der rein pandemischen Antikörper nicht erreichen konnten (max.  $\Delta E$  ca. 0,8 bei 1:80 im Vergleich zu  $> 1,2$  H1N1pmd). Dennoch mussten diese Extinktionsergebnisse, im Vergleich zum B-Stamm, als auffällige Signale gewertet werden. Mögliche Antikörper gegen saisonale A-Stämme konnten durch den ELISA detektiert werden, die Spezifität erschien somit nicht klar gesichert. Die stärkere Kreuzreaktion der Antikörper gegen die saisonalen A-Stämme im Vergleich zu den Antikörpern gegen den B-Stamm konnte auf ihre phylogenetische Zugehörigkeit zurückgeführt werden. Da für diese Austestung kommerzielle, subtypenspezifische Antikörperproben verwendet wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse jeweils stärker ausfielen als bei den Versuchsseren zu erwarten war. Diese wurden bei Vorhandensein von Kreuzantikörpern eher als „Mischproben“, mit geringerer Aktivität eingestuft. Um diese These unterstützen zu können und die geschwächte Spezifität des ELISA gegen Influenza-A-Stämme zu stärken, wurden die Versuchsseren auf das Vorhandensein von Kreuzantikörpern gegen *Influenza A/Brisbane/59/2007* (H1N1)-ähnlich geprüft.



**Abb.9: Spezifitätstestung des ELISA mittels Schafantikörpern gegen die drei saisonal-zirkulierenden Influenzastämme der Saison 2009/10.** Als Kontrolle zusätzliche Austestung von Primärantikörpern gegen den Pandemiestamm. Dargestellt sind die Extinktionen in nm der einzelnen Primärantikörper in definierten Verdünnungsstufen, die gemäß den Verdünnungsstufen der NT-Vortestung gewählt wurden.

### 3.2 Indirekter ELISA zur Testung der Seren auf Kreuzreaktivität gegen einen saisonalen Influenzastamm mit HA *Influenza A/Brisbane/59/2007* (H1N1)-ähnlich

Die Überprüfung auf das Vorhandensein möglicher Kreuzantikörper gegen *Influenza A/Brisbane/59/2007* (H1N1)-ähnlich wurde mit allen Seren, sowohl der Kontrollgruppe, als auch der Patientengruppe der Nierentransplantierten (NTx-Patienten) durchgeführt. Dieser Stamm wurde aufgrund der nächsten Verwandtschaft zum pandemischen Stamm ausgewählt. Die Ergebnisse dazu sind den Abbildungen 10 und 11 zu entnehmen. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der Dreifach-Seren der Kontrollgruppe, welche im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Veränderungen in den Antikörperkonzentrationen auf zeigten. Diese Resultate ließen indirekt darauf schließen, dass es im Zeitraum der Untersuchungen scheinbar weder natürlichen Kontakt zum Virus gab, noch saisonale Impfungen stattgefunden haben. Der Range der gemessenen Antikörperkonzentrationen reichte zu allen drei Zeitpunkten von etwa 60 AU (63,1/65,2/62,3 AU) bis etwa 270 AU (270,8/275,6/267,4 AU), der Median lag bei etwa 180 AU (186/188/168 AU), Ausreißer ausgenommen. Mit etwa 180 AU liegt der Median verhältnismäßig hoch, was sich möglicherweise durch vorherige Impfungen gegen saisonale Influenzaviren oder durchgemachte Infektionen begründen lässt. Zusammengefasst konnten die Ergebnisse in der Kontrollgruppe jedoch als nicht relevanter Hintergrund interpretiert werden. Es konnten zwar insgesamt bei den meisten Probanden Kreuzantikörper gemessen werden, die jedoch aufgrund der fehlenden Verlaufskinetik keinen relevanten Einfluss auf die Verlaufsmessung der pandemischen Antikörper haben sollten.

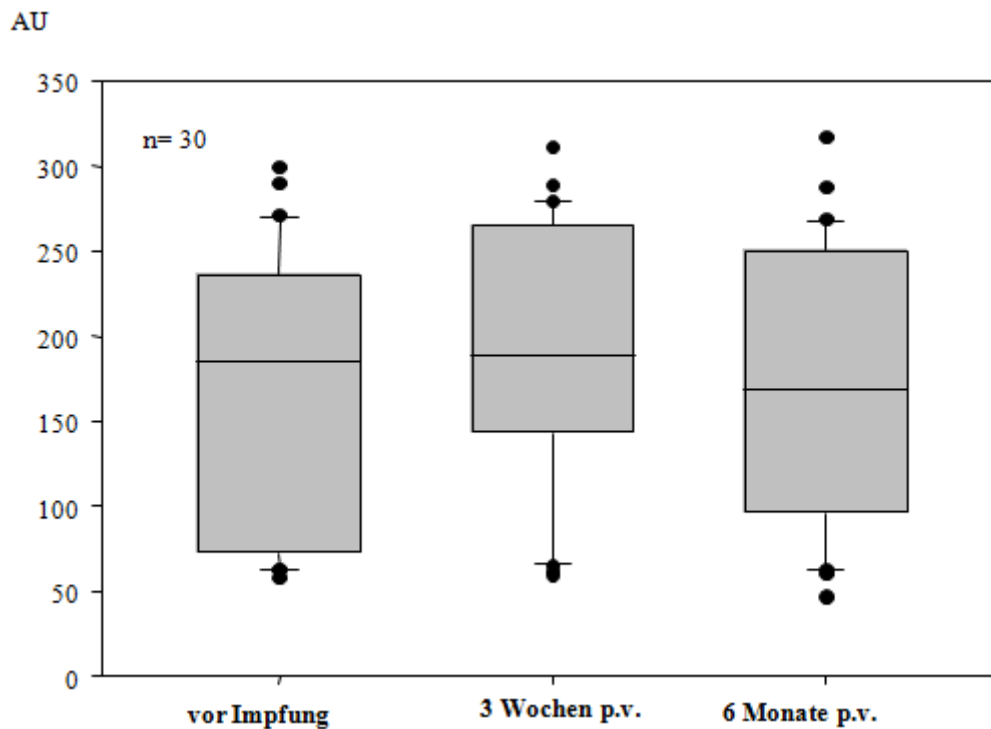
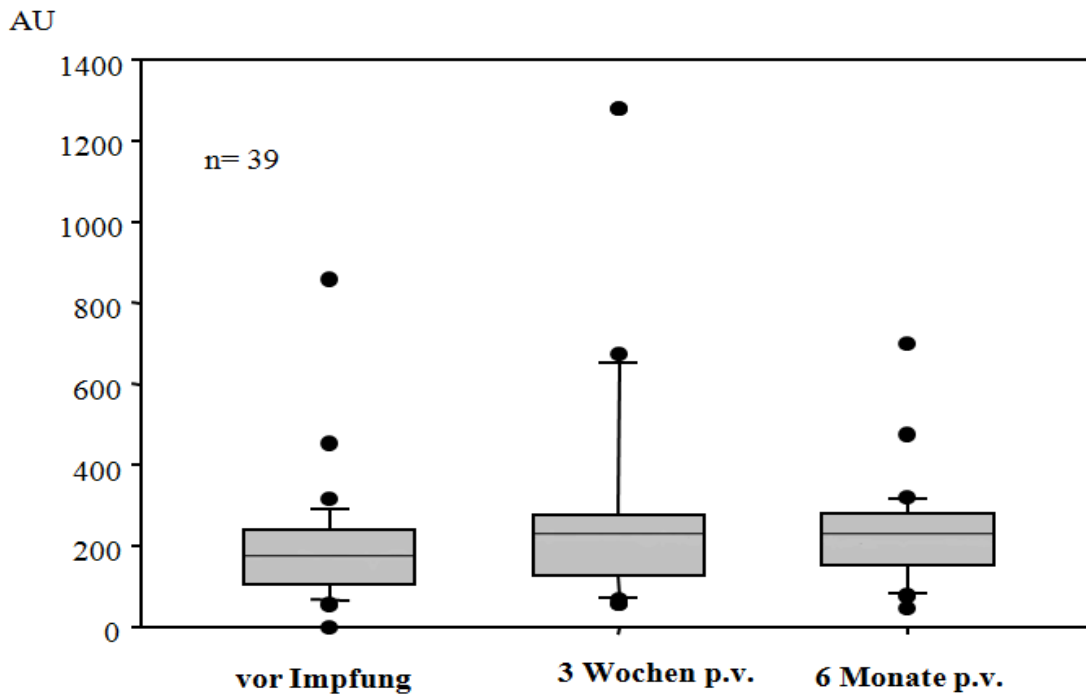


Abb.10: Austestung Seren der Kontrollgruppe (KG) auf Kreuzreaktivität gegen den saisonalen Influenzastamm *A/Brisbane/59/2007* (H1N1)-ähnlich in AU zu drei Zeitpunkten (vor Impfung, 3 Wochen nach Impfung, 6 Monate nach Impfung), dargestellt im Box-Plot. Die Linie innerhalb des Balkendiagramms zeigt den Median bzw. das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Der untere Whisker stellt das 2,5% Quantil und der obere Whisker das 97,5% Quantil dar. Die schwarzen Punkte zeigen die Ausreißer.

Die Ergebnisse der NTx-Patienten, wie in Abbildung 11 dargestellt, zeigen ebenfalls im Gesamtverlauf keine signifikante Kinetik. Aufgrund von höheren Ausreißern musste zwar die Skalierung der y-Achse mit höheren AU-Werten versehen werden, die Hauptresultate gleichen jedoch denen der Kontrollgruppe, mit Ausnahme der zweiten Seren im oberen Whisker, der bis auf 661,5 AU reicht. Beginnend bei etwa 50 AU im unteren Whisker (58,6/58,5/59,8 AU) zu allen drei Untersuchungszeitpunkten, reichten die Werte der oberen Whisker vor Impfung und 6 Monate p.v. vergleichbar den Proben der Kontrollgruppe bis etwa 300 AU (293,2/303,8 AU). Der Median lag im Mittel bei 200 AU (174/217/217 AU). Eine Beeinflussung der im ELISA gemessenen Immunantworten gegen den Influenzapandemiestamm durch kreuzreaktive Antikörper gegen den saisonalen H1N1 Stamm konnte für die NTx Patienten ebenfalls ausgeschlossen werden. Somit konnten die Testungen der Untersuchungsseren mit dem eigentlichen ELISA durchgeführt werden.



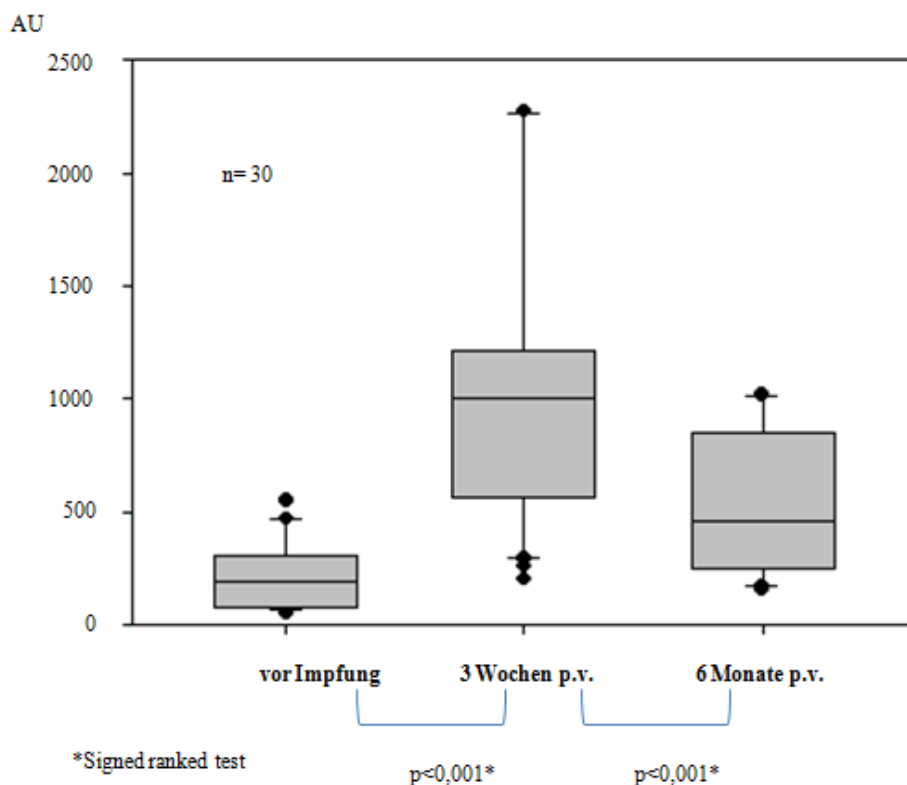
**Abb.11: Austestung Seren der NTx-Patienten (NTx gesamt) auf Kreuzreaktivität gegen den saisonalen Influenzastamm *A/Brisbane/59/2007* (H1N1)-ähnlich in AU zu drei Zeitpunkten (vor Impfung, 3 Wochen nach Impfung, 6 Monate nach Impfung), dargestellt im Box-Plot. Die Serumproben der 10 *Non-Responder*, von denen ein 4. Serum nach Boosterimpfung gewonnen werden konnte, werden nicht dargestellt. Die Linie innerhalb des Balkendiagramms zeigt den Median bzw. das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Der untere Whisker stellt das 2,5% Quantil und der obere Whisker das 97,5% Quantil dar. Die schwarzen Punkte zeigen die Ausreißer.**

### 3.3 Indirekter ELISA mit rekombinantem HA des pandemischen Influenzavirus *H1N1 California 04/09* bzw. *07/09* zum Nachweis humaner IgG-Antikörper

In den Vortestungen mittels NT konnten in den Proben der gesunden Probanden bereits 3 Wochen nach Impfung Antikörper nachgewiesen werden, welche sich auch noch nach 6 Monaten in gleicher Höhe zeigten. Mit wenigen Ausnahmen unter den NTx-Patienten (= *Non-Responder*) wies auch diese Patientengruppe eine vergleichbare Immunantwort auf.

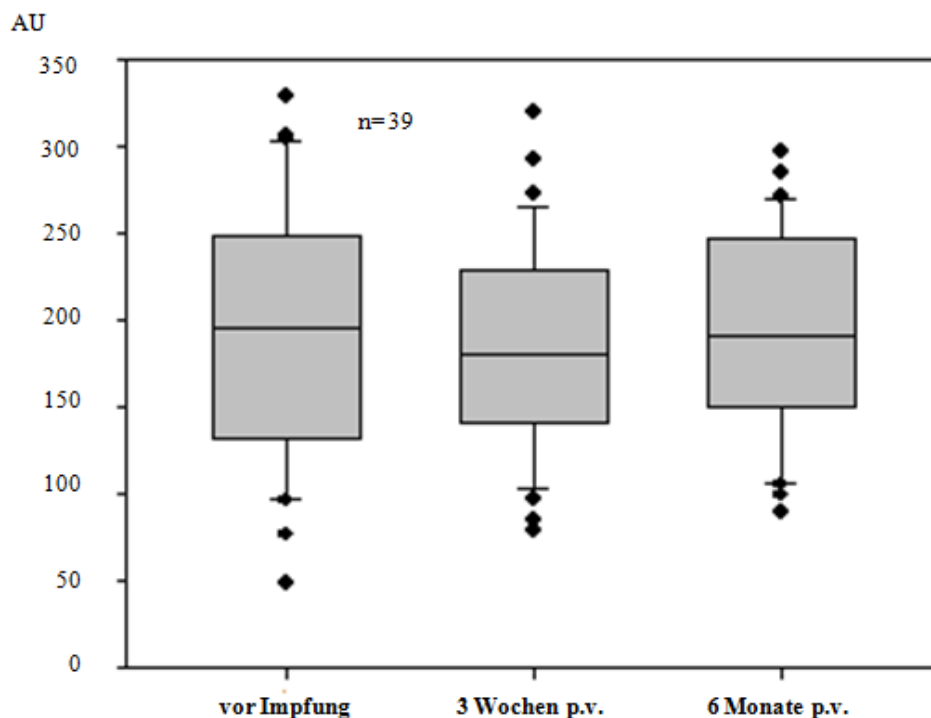
Mittels dieses indirekten ELISA mit rekombinantem HA des pandemischen Influenzavirus sollte geprüft werden, ob die Ergebnisse der Vortestungen bestätigt werden, sowie ob weitere Informationen zur humoralen Immunantwort im Vergleich der beiden Gruppen gewonnen werden konnten. Dazu wurden alle Serumproben gemessen und anhand der definierten Kalibrationskurve für jeden Zeitpunkt die Konzentration des Serum-IgG gegen das pandemische Influenzavirus *H1N1 California 04/09* bzw. *07/09* in AU berechnet (Abb.12-15). Die Ergebnisse der Kontrollgruppe sind in Abb. 12 dargestellt. Beginnend zum Zeitpunkt vor Impfung (1.Serum) war der Range der nachgewiesenen Antikörper

schmal von etwa 70 AU (72,71 AU) bis knapp 500 AU (447,28 AU), der Median lag bei 194 AU. Es entsprach etwa dem messbaren Hintergrund der Kreuzreaktivitätstestung des Brisbane Stammes in Abbildung 10, mit geringer Verbreitung nach oben ( $> 300$  AU). Bereits 3 Wochen nach Impfung (= zweites Serum) war ein deutlicher Anstieg des Serum-IgG erkennbar, welcher sich im *Wilcoxon-signed-rank Test* als signifikant ( $p < 0,001$ ) erwies. Der untere Whisker lag bei etwa 350 AU (362,7 AU) und erstreckte sich im oberen Whisker bis etwa 2250 AU (2271,8 AU), Ausreißer ausgenommen. Der Median lag bei 1056 AU. Im Vergleich mit den IgG-Serumkonzentrationen aus dem dritten Serum, etwa sechs Monate nach Impfung, wurde deutlich, dass der IgG-Anstieg nur zeitlich begrenzt war, dennoch erneut signifikant. Die IgG Konzentrationen fielen wieder ab, blieben jedoch deutlich oberhalb der Ausgangskonzentrationen (1. Probennahme). Der Median lag bei 463 AU, bei einem unteren Whisker bei knapp 150 AU (171,6 AU) bis zum oberen Whisker bei knapp 1000 AU (993,6 AU), Ausreißer ausgenommen. Zusammengefasst konnte in der Probandengruppe mittels dieses ELISA nur ein temporärer, signifikanter IgG Konzentrationsanstieg (3 Wochen) aufgezeigt werden, die Ergebnisse der NT-Vortestung konnten insbesondere in Bezug auf das 3. Serum nicht vollständig bestätigt werden.

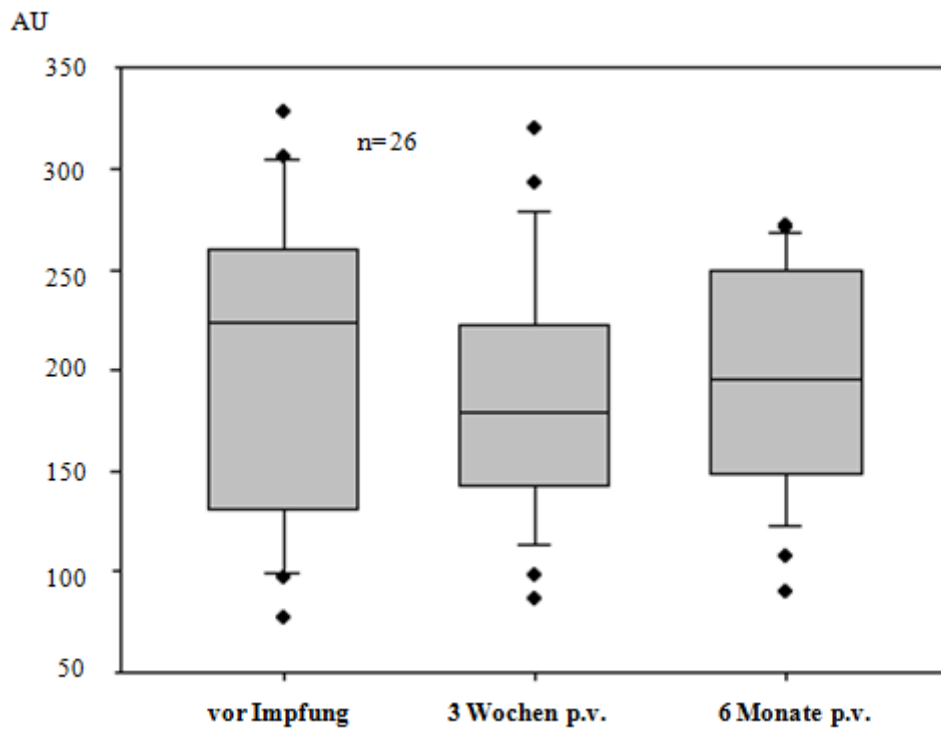


**Abb.12: Anti-Influenza A/California 04/09 bzw. 07/09 IgG Verlauf Kontrollgruppe (n=30) in AU zu drei Zeitpunkten (vor Impfung, 3 Wochen nach Impfung, 6 Monate nach Impfung).** Die Darstellung erfolgt mittels Box-Plot. Die Linie innerhalb des Balkendiagramms zeigt den Median bzw. das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Der untere Whisker stellt das 2,5% Quantil und der obere Whisker das 97,5% Quantil dar. Die schwarzen Punkte zeigen die Ausreißer. Die p-Werte wurden mittels Signed-rank Test ermittelt und sind mit einem \* markiert.

Abbildung 13 stellt zum Vergleich die IgG Serumkonzentrationen der gesamten NTx Patienten dar. Die Breite der Messungen reichte dabei von knapp 100 AU (97,6/102,8/107 AU) bis etwa 275 AU (302,8/259,4/261,6 AU), Ausreißer ausgenommen. Der Median der drei Messpunkte lag recht konstant bei etwa 190 AU (195,8/181,1/191 AU), mit leicht fallender Tendenz im 2. Serum. Diese Ergebnisse zeigen demnach, im Vergleich zur Kontrollgruppe, im gesamten zeitlichen Verlauf keine relevante Kinetik in der Antikörperantwort auf. Tabelle 1, welcher die Mittelwerte der IgG Messungen zu allen drei Messzeitpunkten zu entnehmen sind, verdeutlicht dies ebenfalls. Um einen möglichen *Bias* durch den Anteil von 1/3 *Non-Responder* (n=13/39) an den NTx-Patienten gesamt ausschließen zu können, wurden die Ergebnisse der *Responder* und *Non-Responder* zusätzlich getrennt ausgewertet und dargestellt (siehe Abb.14 und 15). Die Ergebnisse der *Responder* sind Abbildung 14 zu entnehmen. Abbildung 15 zeigt die *Non-Responder*, ergänzt um die Messergebnisse der zehn Patienten, die eine weitere Impfung als Boosterung sechs Monate nach der Erstimpfung erhalten hatten (=4. Serum). Doch auch nach Aufteilung konnte bei den *Respondern* kein Anstieg im zeitlichen Verlauf der Serum-IgG-Konzentrationen festgestellt werden, die Messergebnisse beider Patientengruppen zeigten sich sehr ähnlich. Die mittels NT detektierte gesteigerte Immunantwort bei den *Respondern* konnte mit diesem ELISA, auch nicht wie in der Kontrollgruppe zeitlich auf 3 Wochen nach Impfung begrenzt, nicht aufgezeigt werden.

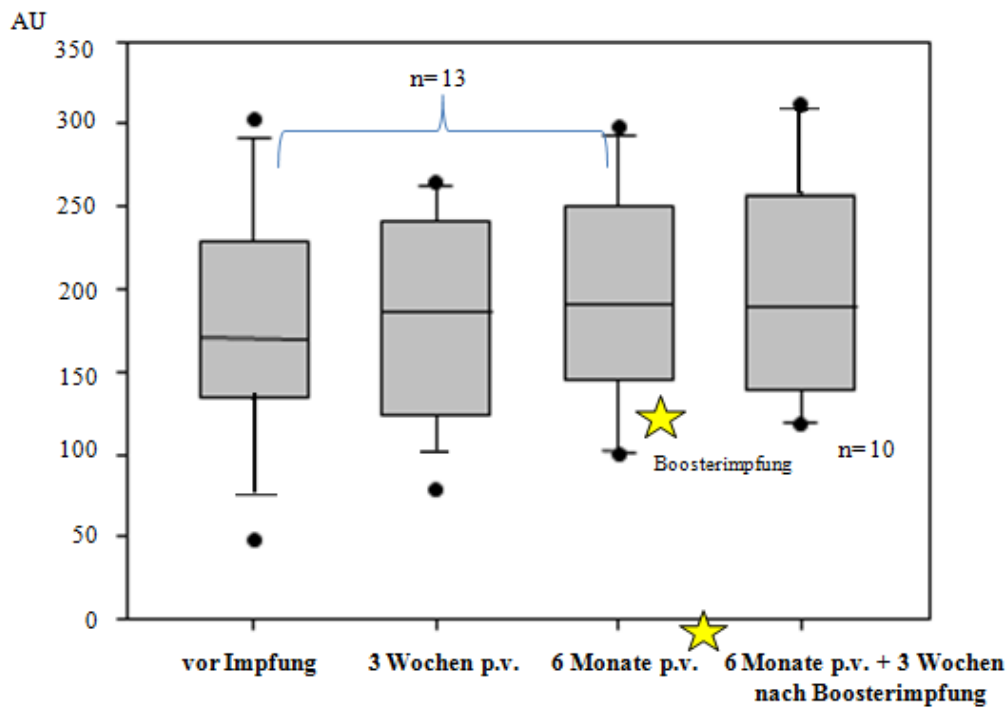


**Abb.13:** *Anti-Influenza A/California 04/09 bzw. 07/09 IgG Verlauf NTx gesamt (n=39) in AU* zu drei Zeitpunkten (vor Impfung, 3 Wochen nach Impfung, 6 Monate nach Impfung). Die Darstellung erfolgt mittels Box-Plot. Die Linie innerhalb des Balkendiagramms zeigt den Median bzw. das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Der untere Whisker stellt das 2,5% Quantil und der obere Whisker das 97,5% Quantil dar. Die schwarzen Punkte zeigen die Ausreißer.



**Abb.14:** *Anti-Influenza A/California 04/09 bzw. 07/09 IgG Verlauf Responder (n=26) in AU* zu drei Zeitpunkten (vor Impfung, 3 Wochen nach Impfung, 6 Monate nach Impfung). Die Darstellung erfolgt mittels Box-Plot. Die Linie innerhalb des Balkendiagramms zeigt den Median bzw. das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Der untere Whisker stellt das 2,5% Quantil und der obere Whisker das 97,5% Quantil dar. Die schwarzen Punkte zeigen die Ausreißer.





**Abb.15:** *Anti-Influenza A/California 04/09 bzw. 07/09 IgG Verlauf Non-Responder (n=13/n=10) in AU zu vier Zeitpunkten (vor Impfung, 3 Wochen nach Impfung, 6 Monate nach Impfung, 3 Wochen nach Boosterimpfung). Die Darstellung erfolgt mittels Box-Plot. Die Linie innerhalb des Balkendiagramms zeigt den Median bzw. das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Der untere Whisker stellt das 2,5% Quantil und der obere Whisker das 97,5% Quantil dar. Die schwarzen Punkte zeigen die Ausreißer. Der Zeitpunkt der Boosterimpfung ist mit einem gelben Stern markiert.*

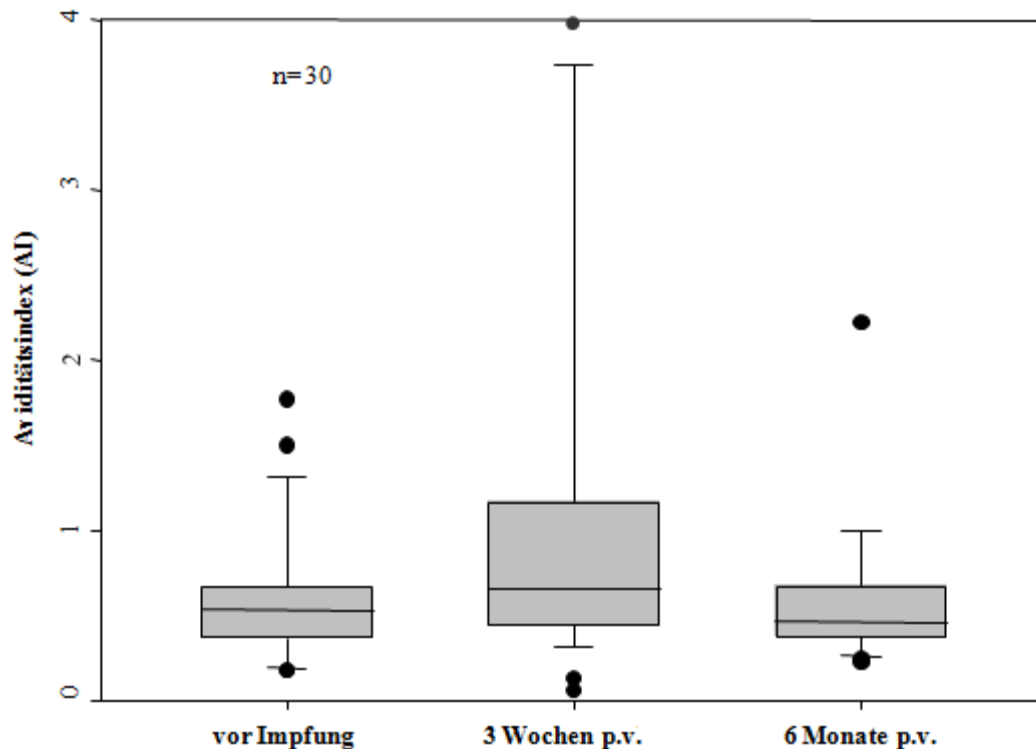
	Probanden n= 30	NTx-Patienten n= 39
3 Wochen p.v	<b>340.6</b>	195.5
3 Wochen p.v	<b>1161.6</b>	185.3
6 Monate p.v.	<b>660.6</b>	196.4

**Tabelle1** Vergleich der Mittelwerte der *Anti-Influenza A/California 04/09 bzw. 07/09 IgG*-Nachweise in AU zu drei Zeitpunkten (vor Impfung, 3 Wochen nach Impfung, 6 Monate nach Impfung), der Kontrollgruppe zu den NTx-Patienten gesamt. Die hervorgehobenen Ergebnisse der Kontrollgruppe (= fett gedruckt) zeigen den signifikanten Verlauf an.

Zusammengefasst lässt sich aus den Ergebnissen dieses Immunoassays ableiten, dass sich bei den immunkompetenten Probanden im Vergleich zu vor der Impfung ein genereller Anstieg der Antikörperkonzentration gegen das pandemische Influenzavirus messen ließ. Der mittels NT nachgewiesene kontinuierliche Anstieg im zeitlichen Verlauf blieb jedoch aus. In der Gruppe der NTx-Patienten konnte keinerlei messbare Kinetik ihrer humoralen Antwort detektiert werden. Die mittels NT definierte Einteilung in *Responder* und *Non-Responder* war für die Ergebnisse der ELISA-Testung nicht möglich. Da derartige Ergebnisse im Vorfeld nicht erwartet wurden, sollte in einem weiteren Schritt gezielt beim Unterschied zwischen dem Nachweis mittels NT und dieses ELISA angesetzt werden. Mittels NT können verschiedene Antikörperklassen (IgM, IgA und IgG) detektiert werden, dieser ELISA detektiert hingegen gezielt IgG. Um zu Überprüfen, ob spezifische IgG Eigenschaften für den teilweise sichtbaren Unterschied in der Immunantwort zwischen immungesunden und immungeschwächten Menschen verantwortlich war, wurde ein weiteres Testverfahren durchgeführt. Dazu eignete sich das Verfahren der Aviditätsmessung zur Bestimmung des Reifegrades der neugebildeten Antikörper in Immungesunden (KG). Zur Kontrolle wurden ebenfalls die Immungeschwächten (NTx-Patienten) mit betrachtet.

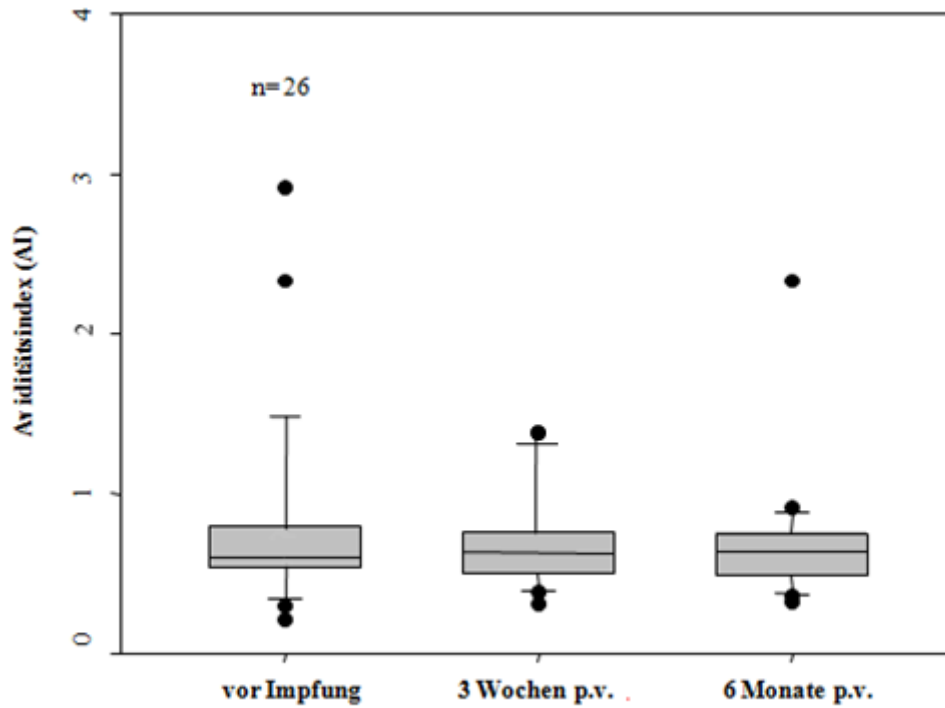
#### 3.4. Aviditäts-ELISA gegen die pandemische Influenza *California 04/09* bzw. *07/09* mit Harnstoff – Bestimmung des Aviditätsindex (AI)

Um eine mögliche Antwort für die verschiedenen Testergebnisse im ELISA in den unterschiedlichen Immunstadien zu finden, wurde der Reifegrad der Antikörper mittels Aviditätstestung untersucht. Dazu wurden alle Seren im Aviditäts-ELISA gemessen und aus den Ergebnissen zu jedem Serum der Aviditätsindex (AI) berechnet. Die Ergebnisse der Aviditätsindices der Kontrollgruppe sind in Abb. 16 dargestellt. Insgesamt konnte jedoch kein signifikanter Anstieg der Avidität über die Zeit aufgezeigt werden, erneut Ausreißer ausgenommen. Die Mediane lagen alle nahezu auf einer Geraden, unter einem AI von 1 (0,53/0,65/0,46 AI). In Bezug auf die Ergebnisse aus 3.3 (Abb.12) lies sich 3 Wochen p.v. eine leichte Ausbreitung des oberen Quartils erkennen, der obere Whisker erreichte fast einen AI von 4 (3,74 AI), jedoch war der Gesamtverlauf ohne Signifikanz. Im gesamten zeitlichen Verlauf über die definierten 6 Monate p.v. zeigte sich keine Zunahme im AI, es konnte somit für die Kontrollgruppe keine Zunahme in der Bindungsstärke der Antikörper detektiert werden.

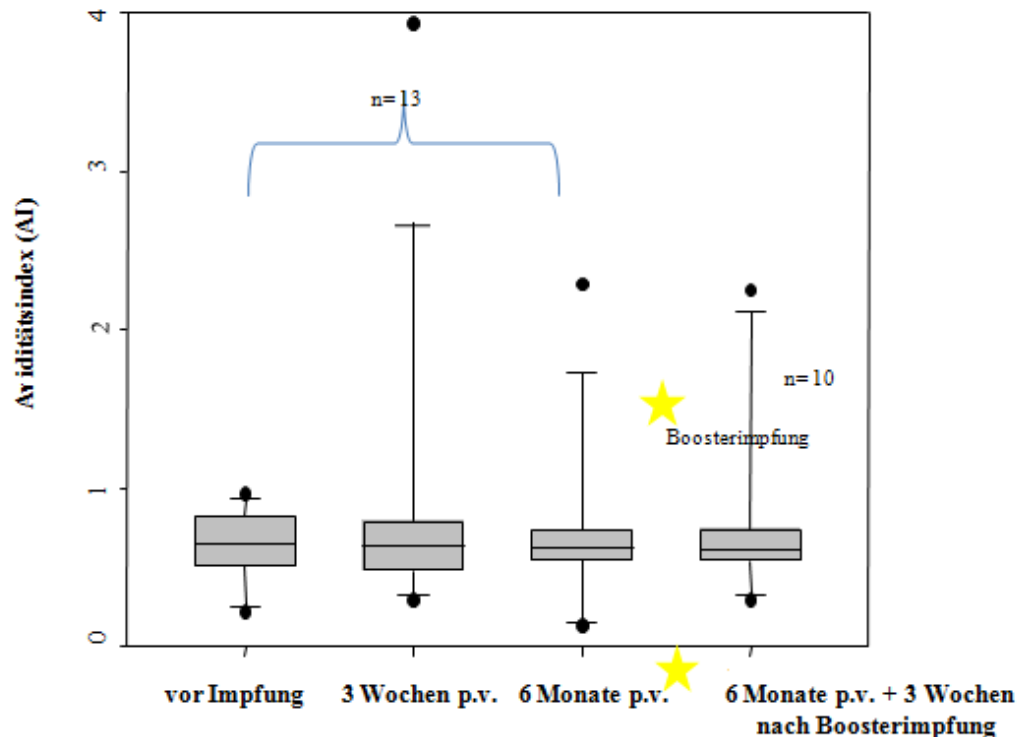


**Abb.16: IgG-Aviditätsindices (AI) pandemische Influenza *California 04/09* bzw. *07/09* Kontrollgruppe (n=30) zu drei Zeitpunkten (vor Impfung, 3 Wochen nach Impfung, 6 Monate nach Impfung), dargestellt im Box-Plot. Die Linie innerhalb des Balkendiagramms zeigt den Median bzw. das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Der untere Whisker stellt das 2,5% Quantil und der obere Whisker das 97,5% Quantil dar. Die schwarzen Punkte zeigen die Ausreißer.**

Die Ergebnisse der Austestungen der NTx-Patienten wurden erneut eingeteilt in *Responder* und *Non-Responder* ausgewertet und getrennt dargestellt (Abb.17 und 18). Dabei zeigten die Auswertungen der Messergebnisse zwischen den zwei Gruppen, wie bereits in 3.3 (Abb. 14/15), keinen signifikanten Unterschied. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war insgesamt ebenfalls kein zeitlicher Anstieg im AI erkennbar. Die Mediane lagen in beiden Gruppen und zu allen Zeitpunkten nahezu gleich und blieben ebenfalls  $< 1$  (*Responder*: 0,63/0,64/0,63 *Non-Responder* 0,65/0,64/0,63). Gesamt betrachtet erbrachten auch die Austestungen beider Kollektive in Bezug auf einen möglichen Unterschied im Reifegrad der Antikörper aufgrund der verschiedenen Immunstati keine Begründung für die diskrepanten Ergebnisse in 3.3 untereinander und zu den NT-Ergebnissen.



**Abb.17: IgG-Aviditätsindices (AI) pandemische Influenza *California 04/09* bzw. *07/09* Responder NTx (n= 26) zu drei Zeitpunkten (vor Impfung, 3 Wochen nach Impfung, 6 Monate nach Impfung), dargestellt im Box-Plot. Die Linie innerhalb des Balkendiagramms zeigt den Median bzw. das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Der untere Whisker stellt das 2,5% Quantil und der obere Whisker das 97,5% Quantil dar. Die schwarzen Punkte zeigen die Ausreißer.**



**Abb.18: IgG-Aviditätsindices (AI) pandemische Influenza *California 04/09 bzw. 07/09 Non-Responder NTx* (n= 13/10) zu vier Zeitpunkten (vor Impfung, 3 Wochen nach Impfung, 6 Monate nach Impfung, 3 Wochen nach Boosterimpfung), dargestellt im Box-Plot. Die Linie innerhalb des Balkendiagramms zeigt den Median bzw. das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Der untere Whisker stellt das 2,5% Quantil und der obere Whisker das 97,5% Quantil dar. Die schwarzen Punkte zeigen die Ausreißer. Der Zeitpunkt der Boosterimpfung ist mit einem gelben Stern markiert.**

### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Vortestung der Serumproben mittels Neutralisationstest zeigte sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei 2/3 der NTx-Patienten (= *Responder*) einen bleibenden Anstieg der neutralisierenden Antikörper bis zu 6 Monate nach Impfung. Da diese Antikörper auch unter den Immunglobulinen der Klasse G (IgG) zu finden sind, lag die Vermutung nahe, mit diesem rekombinanten ELISA, der insbesondere IgG gegen den Pandemiestamm nachweisen sollte, vergleichbare Ergebnisse der humoralen Immunantworten aufzeigen zu können. Dieser ELISA sollte bestenfalls ein gleichwertiges Testsystem zur Influenza-Impfantikörper-Bestimmung darstellen. Doch die Auswertungen zeigten große Diskrepanzen zwischen den beiden Testsystemen auf, die bei der Gruppe der NTx-Patienten gesamt noch stärker ausfiel, als bei der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse aus den Vortestungen ließen sich demnach nicht wiederholen. Auch zusätzliche Aviditätstestung, aufbauend auf diesem ELISA, zur weiteren Charakterisierung der IgG-Immunantworten, erbrachten keine weiteren Hinweise die die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den zwei Testsystemen erklären konnten.

## 4 Diskussion

Abgeschwächte Immunantworten auf Totimpfstoffe nach Organtransplantationen, nicht nur bei Influenzaimpfungen, sind mehrfach beschrieben (Eckerle, Rosenberger et al. 2013, Gangappa, Wrammert et al. 2019). Eine breite Übersicht dazu bietet beispielsweise die Publikation von Eckerle et al., die als systemisches Review die Datenlage der unterschiedlichen Impfansprechen organtransplantierte Patienten auf diverse Totimpfstoffe zusammenstellt (Eckerle, Rosenberger et al. 2013). Während bei planbaren Organtransplantationen der Impfstatus vor dem Eingriff am besten vollständig sein sollte (= Grundimmunisierung), um möglichst wenig unter Immunsuppression impfen zu müssen, gibt es dringend empfohlene Impfindikationen nach erfolgter Transplantation. Dazu zählen beispielsweise Auffrischimpfungen, neue Impfindikationen (z.B. SARS-CoV2), oder die jährlich wiederkehrenden Influenzaimpfungen. In seltenen Fällen, bei ungeplanten „Notfalltransplantationen“, können auch komplette Grundimmunisierungen unter Immunsuppression erforderlich werden. Bei Impfung unter Immunsuppression generell kann für einige Impfstoffe eine Überprüfung des Impferfolges sinnvoll sein, um mögliche Impflücken zu entdecken (Niehues, Bogdan et al. 2017). Der Nachweis des Impferfolges kann für viele Parameter mittels maschineller ELISA-Techniken im Laborroutinebetrieb erfolgen. Handelt sich jedoch um neue Impfstoffe bzw. besteht keine allgemeine/anerkannte Indikation zum Antikörpernachweis, so erfolgt die Überprüfung des Immunstatus nicht selten in Form von Impfstudien. Häufig werden dabei aufwendige, auch teilweise neu etablierte Tests verwendet, die nicht der Routine entsprechen. Davon waren auch die Patienten betroffen, deren Seren in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Mit ihrer Teilnahme an einer Impfstudie zur Wirksamkeit des adjuvantierten Pandemieimpfstoffes *Pandemrix*®-im Vergleich zu Dialysepatienten und Gesunden wurden ihre Proben alle mittels NT getestet (Hansen, Grund et al. 2012). Auch aktuell gibt es zur Überprüfung des Impferfolges nach saisonalen Influenzaimpfungen für Immunsupprimierte keine einheitliche Empfehlung (Laws, Baumann et al. 2020).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Frage zu beantworten, ob die NT-Ergebnisse mit einem weniger arbeitsaufwendigen ELISA zu reproduzieren und weiter zu charakterisieren sind. Wie die Ergebnisse jedoch zeigten, stellte der ELISA keine gleichwertige Alternative zum NT dar. Auch konnten keine weiteren, ergänzenden Informationen mittels Aviditätsbestimmung über die humorale Immunantwort auf die Pandemieimpfung gewonnen werden.

Die nun folgende Diskussion soll daher genutzt werden, um einerseits den aktuellen Standpunkt zum Nachweis von (Impf-) Antikörpern gegen Influenzaviren in Deutschland zu beleuchten. Andererseits sollen die Ergebnisse der ELISA-Testungen diskutiert werden. Gibt es vergleichbare Arbeitsprotokolle? Was ist der Unterschied bzw. was zeigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen? Kann ein ELISA-Verfahren einem Neutralisationstest gleichgesetzt werden? Zuletzt soll ein Ausblick gegeben werden, welchen Stellenwert eine Überprüfung des Impfansprechens nach Influenzaimpfung insbesondere bei Risikopatienten wie Organtransplantierten in Zukunft haben wird.

#### 4.1 Nachweis von Influenzavirus-(Impf-)Antikörpern - Was ist in Deutschland der aktuelle Stellenwert?

Die Diagnostik von Influenzaantikörpern unterscheidet sich in der Fragestellung, ob der Nachweis einer natürlichen Infektion erbracht werden soll oder ob die Überprüfung des Impferfolges das Ziel ist. Es gibt Labore, die den Nachweis von Influenza-IgG-, IgA- und IgM-Antikörpern durchführen mit der Zielsetzung, eine natürliche Infektion detektieren zu können. Dieser Antikörpernachweis dient jedoch nur als Zusatzuntersuchung zur gängigen Influenza-Diagnostik mittels PCR, die weiterhin Goldstandard bleibt (für Ärzte 2020). Als Verfahrensmethode finden beispielsweise kommerzielle ELISA-Verfahren wie vom Hersteller Virion\Serion Anwendung, die als Antigen (Ag)-Zielstrukturen virale Nukleokapsid- und Matrixproteine verwenden. Der Verwendungszweck wird vom Hersteller klar definiert, zudem würde dieser Test aufgrund der gewählten Antigenzielstruktur (Nukleokapsid/Matrixproteine) nicht ausreichen, eine Aussage über die Impfmunitätslage treffen zu können (Virion\Serion, Würzburg). Etwas anders sieht es bei dem Test der Firma Virotech aus, bei welchem laut Herstellerangaben mit saisonal aktuellem rekombinanten HA als Zielantigen gearbeitet wird. Somit kann mittels IgG Testung eine Bestimmung der Impfantikörper erfolgen, in Kombination mit IgM und IgA eine Infektionsdiagnostik durchgeführt werden (Virotech, Rüsselsheim am Rhein). Doch wie bereits in der Diskussionseinleitung erwähnt gibt es in Deutschland keine generelle Empfehlung zur Überprüfung des Impfstatus nach Influenzaimpfung, auch nicht für Patienten mit Immundefizienz. Diese Empfehlung betrifft einzig sehr spezielle Patientengruppen mit Immundefizienz und ist dem Grundlagenpapier „*Impfen bei Immundefizienz*“ Kapitel (III) zu entnehmen (Laws, Baumann et al. 2020). Dieses Dokument, bestehend aus vier Kapiteln, wurde von Experten aus der STIKO und fachspezifischen Experten verfasst und im Bundesgesundheitsblatt als Hilfestellung zu diesem Thema“ veröffentlicht. In dieser Publikation, die jedoch keinen Leitliniencharakter hat, werden detailliert die einzelnen Gruppen immunsupprimierter Patienten sowie dazu die jeweiligen Impfstoffe bzw. das Vorgehen bei und nach Impfung dargestellt. Zu diesen Patientengruppen gehören beispielsweise Patienten nach Organtransplantation, mit Autoimmunerkrankungen oder hämatologisch/onkologische Patienten. Anders als für andere Impfstoffe, wie beispielsweise gegen Hepatitis-B-Infektionen, grenzt die Empfehlung zur Überprüfung des Influenzaimpferfolges eine sehr geringe Anzahl der immunsupprimierten Patienten (z.B. Leukämiepatienten mit Tyrosinkinaseinhibitortherapie (TKI) mit Impfung 6 Monate nach der letzten TKI-Gabe) ein. NTx-Patienten fallen nicht unter diese Empfehlung. Mit welchem Nachweisverfahren die „Antikörper (Ak)-Bestimmung“ zu erfolgen hat, ist der Empfehlung jedoch nicht zu entnehmen (Laws, Baumann et al. 2020). Das RKI benennt in seinem „Ratgeber für Ärzte“ den Hämagglutinationshemmtest sowie den Neutralisationstest als geeignete Nachweisverfahren für serologische Influenzadiagnostik, ordnet diese Testungen jedoch nicht der Influenzaroutinediagnostik zu (für Ärzte 2020). Da die Studienlage zu Impfungen unter Immunsuppression stetig zunimmt, nicht zuletzt, da es immer neue Immunsuppressiva gibt, ist mittlerweile für viele Präparate bekannt, bei

welchen Impfungen mit herabgesetzten Immunantworten zu rechnen ist. Dieses trifft auch für einige Immunsuppressiva zu, die bei NTx-Patienten Anwendung finden. Für das Präparat Mycophenolat-Mofetil (MMF) beispielsweise ist eine dosisabhängige, herabgesetzte Immunantwort auf Influenzaimpfstoffe als gesichert zu betrachten (Wagner, Assmus et al. 2019), eine Überprüfung des Impferfolges wird in diesem Kontext nicht empfohlen. Zusammengefasst unterliegt der Nachweis von Impfantikörpern gegen Influenzaimpfungen in Deutschland keiner hohen Nachfrage. Dieses verdeutlicht sich auch dadurch, dass die seitens RKI definierten Nachweisverfahren, überwiegend der NT, nur von wenigen Laboren als laboreigene, sogenannte inhouse Verfahren angeboten werden. Im Zuge der derzeitigen SARS-CoV-2 Pandemie hat dieses Verfahren wieder stark an Zuspruch gewonnen. Mit zunehmender Verfügbarkeit an Impfstoffen gegen das Coronavirus SARS CoV2 ist auch die Nachfrage an Antikörpernachweisen zur Überprüfung des Impferfolges insgesamt (ELISA und NT) gestiegen. Dabei zielt die Überprüfung nicht nur darauf ab, ein Monitoring von immunsupprimierten Patienten durchzuführen, da die Wirksamkeit von mRNA-Impfstoffen gerade bei diesen Patienten nicht bis kaum bekannt ist. Vielmehr zeigt sich jedoch ein allgemein gesteigerter Trend zur SARS-CoV 2 Antikörpertestung, obwohl seitens der STIKO keine allgemeine Empfehlung zur Überprüfung des Impferfolges vorliegt (Impfkommission 2021). Viele Testhersteller haben in kürzester Zeit verschiedene SARS-CoV-2 Immunoassays etabliert, sowohl zur Überprüfung von Impfantikörpern als auch zum Nachweis einer erfolgten Infektion. Auch wurden erste „Pseudo-NT-Verfahren“ als sogenannte Surrogat-NT entwickelt, die auf ELISA-Basis beruhen und unter einfacheren Bedingungen als ein herkömmlicher NT einsetzbar sind. Die Studienlage ist dabei jedoch recht heterogen und unterscheidet sich vor allem in Bezug auf die genaue Anwendung. So zeigen die Daten von Tan et al eine gute Korrelationen zwischen dem herkömmlichem NT-Ansatz und den Surrogat-NT-Ergebnissen (Tan, Chia et al. 2020). Meyer et al, der in seiner Studie jedoch einen Ansatz des Verfahrens wählte, wie es am ehesten in einem diagnostischen Labor Anwendung findet, konnte so die von Tan präsentierten Ergebnisse nicht vollständig bestätigen. Bei zusätzlicher Detektion falsch positiver Ergebnisse sieht er weiterhin den herkömmlichen NT als Goldstandard an und kommt zu dem Schluss den Einsatz des Surrogat-NT genau abzuwägen (Meyer, Reimerink et al. 2020). Trotz unterschiedlicher Studienlage finden diese Tests von verschiedenen Herstellern in einigen Laboren mittlerweile Verwendung, wo ein herkömmlicher NT unter Sicherheitsstufe 3 Bedingungen zuvor nicht möglich gewesen wäre. Es ist regelrecht ein Antikörpernachweis-Boom entstanden, der auf schnellste Weise durch diverse Hersteller bedient werden konnte. So konnten bisher sehr viele Daten gewonnen werden und werden es noch weiterhin, die jedoch noch nicht vollständig interpretiert werden konnten. Es bleiben weiterhin viele Fragen offen, die die Ergebnisse der serologischen Nachweisverfahren sowie die Verfahren selbst betreffen, insbesondere in Bezug auf Patienten mit Immundefizienz. Es entstehen somit Daten von denen man sicherlich in einer zukünftigen Influenzapandemie profitieren wird. Denn die Vermutung liegt nahe, dass es auch bei einer nächsten Influenza-Pandemie mit neuen Pandemieimpfstoffen zu einer verstärkten Nachfrage an Antikörpernachweisen zur Überprüfung von Impferfolgen kommen kann. Deshalb sollte ein relativ



einfaches Nachweisverfahren, wie der in der vorliegenden Arbeit verwendete ELISA, sowie mögliche Alternativen noch einmal genauer betrachtet werden.

4.2 Welche weiteren ELISA-Testsysteme zur Bestimmung der humoralen Immunantwort nach (pandemischer) Influenzaimpfung sind in der Literatur beschrieben?

Wie unter 4.1 bereits gesagt, sind mittlerweile (kommerzielle) ELISA zum Nachweis von Influenza-Antikörpern verfügbar, für die Bestimmung von Impfantikörpern spricht sich das RKI jedoch weiterhin für Neutralisationsteste oder Hämagglutinationshemmteste aus. Daher stellt sich die Frage, warum für die Überprüfung des Impferfolges bisher kaum Immunoassays als Alternativmethode Anwendung finden. In der gängigen Literatur gibt es einige Publikationen zum Nachweis von Antikörpern gegen Influenzaviren mittels ELISA, die sowohl den Pandemiestamm von 2009/10 als auch saisonale Stämme betreffen. Dabei handelt es sich jedoch meist um den Nachweis natürlich erworbener Antikörper nach Infektion. Dennoch gibt es auch vereinzelt Studien zur Überprüfung des Impferfolges, die Vergleiche zwischen neu-etablierten ELISA-Protokollen, kommerziellen Testkits und den gängigen Methoden (NT/HHT) aufzeigen. In der Publikation von S. Grund werden Ergebnisse des in dieser Arbeit verwendeten ELISA (rekombinanter ELISA = r-ELISA) mit einem abgeänderten ELISA-Protokoll (Fetuin-ELISA = f-ELISA) sowie dem NT als Goldstandard verglichen (Grund, Pietzonka et al. 2013). Das Protokoll des f-ELISA unterscheidet sich von dem des r-ELISA darin, dass die Platten initial mit 0,02% Fetuin vorbeschichtet wurden, um danach mit dem pandemischen Influenzastamm = Vollvirus (California 7/2009) zu inkubieren. Während der Inkubation mit Fetuin konnte dieses die gefalteten HA-Strukturen von der Virusoberfläche „einfangen“, sodass die Vorbeschichtung der ELISA-Platten letztendlich aus nativem, gefaltetem Virusproteinen (HA) und nicht aus ungefaltetem HA wie im r-ELISA bestand. Fetuine sind in der Leber produzierte Bindeproteine im Blut, wie beispielsweise Albumin. In dieser Publikation wird verdeutlicht, was schon länger vermutet wird. Für den Nachweis der Immunitätslage mittels ELISA kann die Art der gemessenen Antikörper für bestimmte Patientengruppen relevant sein. Es kann gezeigt werden, dass der Nachweis von Antikörpern gegen native, gefaltete Virusproteine (= f-ELISA), die im Gegensatz zu Antikörpern gegen ungefaltetes HA scheinbar zur Virusneutralisation beitragen können, effektiver sein kann. Grund et al schlussfolgert somit, dass bei Verwendung eines ELISA-Verfahrens zum Nachweis von (Impf-) Antikörpern gegen Influenzaviren als Antigen-Zielstruktur ein gefaltetes, natives Hämagglutinin (HA) gewählt und das f-ELISA-Protokoll verwendet werden sollte. Gestützt wurde diese Aussage dadurch, dass die Austestung der gleichen Proben mit dem f-ELISA-Protokoll im direkten Vergleich zum Protokoll der vorliegenden Arbeit zunächst eine allgemein höhere Antikörperkonzentration bei den Messungen mit dem f-ELISA (siehe Tab. 1 und 2 der Publikation) zeigte. Verglichen mit den Ergebnissen des NT gab es jedoch für beide ELISA Verfahren eine Korrelation mit der Gruppe der gesunden Probanden (siehe Fig. 4 der Publikation).

Anders als im r-ELISA korrelierten die Ergebnisse der NTx-Patienten im f-ELISA mit den NT-Ergebnissen, allerdings nur zeitlich begrenzt auf den Nachweis 3 Wochen nach Impfung. In den Messungen nach 6 Monaten fielen die Antikörperkonzentrationen in beiden ELISA im Vergleich zum NT wieder ab (siehe Tab. 1 und 2 der Publikation). Fasst man nun die Aussagen dieser Publikation zusammen, so erscheint der ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen gefaltete HA-Proteine (z.B. f-ELISA) die erfolgreichere ELISA-Methode im Vergleich zum r-ELISA zu sein. Limitiert wird der ELISA-Nachweis jedoch allgemein durch die fehlenden Daten zu der Bedeutung der damit gemessenen Antikörper – es werden nicht nur neutralisierende Antikörper gemessen, - der fehlenden Grenzwerte zur Definition eines Impferfolges sowie durch die Abweichung zu den NT Ergebnissen > 3 Wochen nach Impfung.

In der Literatur lassen sich noch weitere Publikationen finden, in welchen ELISA Protokolle zur Überprüfung des Impferfolges beschrieben werden. So beispielsweise die Arbeit von Luo et al, in welcher ebenfalls ein ähnlicher r-ELISA etabliert wurde, um die Impfantwort von gesunden Probanden 21 Tage nach vergleichbarer Impfung (*Arepanrix*®) zu untersuchen. Die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen eines HAH verglichen und zeigten eine Übereinstimmung von 94%, was den Test als gute Alternative zu den aufwendigen Labortests wie HAH darstellt (Luo, Nishi et al. 2013). Eine weitere Publikation von Sun et al zeigt ähnliche Ergebnisse. Mittels eines inhouse r-ELISA wurden von 58 gesunden Probanden die Impfantworten ab dem 3. Tag nach Impfung bis zum Tag 60 gemessen. Geimpft wurden die Probanden mit einer nicht adjuvantierten Splitvakzine. Dennoch konnten bereits ab dem 10. Tag erste relevante Impfantworten detektiert werden, die bis zum Tag 60 anhielten. Eingeteilt wurden die Probanden gemäß ihrer Impfanamnese an saisonalen Influenzaimpfungen und den Ergebnissen des HHT vor Impfung (Grenzwert 1:40) (Sun, Bian et al. 2010). Anhand dieser Einteilung wurde deutlich, dass die Probanden mit positiver Impfanamnese und HHT-Titer  $\geq 1:40$  insgesamt eine stärkere humorale Immunantwort auf den pandemischen Impfstoff zeigten, ein Aspekt, der bei den Messungen der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt wurde. Betrachtet man nun die Ergebnisse dieser beiden Arbeiten lassen diese sich gut mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe der Seren 3 Wochen nach Impfung vergleichen (Abb. 14). Jedoch enthalten diese beiden Publikationen weder Daten zum langfristigen Antikörperverlauf bis zu 6 Monate nach Impfung, noch wurden Immunsupprimierte untersucht. Hinweise dazu kann die Publikation von (Meyer, Adam et al. 2011) liefern. Untersucht wurde das Impfansprechen 21 Tage nach einmaliger Pandemieimpfung (*Pandemrix*®) bei 47 Herztransplantierten (HTx) mittels HHT sowie zum Vergleich mit einem kommerziellen IgG-ELISA-Kit (Genzyme Virotech, Rüsselsheim). Bei weniger als der Hälfte der Patienten (15 Patienten= 32%) konnte nach 3 Wochen mittels HHT ein akzeptables Impfansprechen ( $\geq 1:40$  HHT) detektiert werden, mittels ELISA nur bei 12 Patienten. Dieses entspricht im Vergleich zum HHT einer Sensitivität von gerade 80%. Zusätzlich wurden viele falsch positive Ergebnisse detektiert (17%), was den ELISA im Vergleich zum HHT als weniger geeignetes Testverfahren zur Überprüfung des Impferfolges in einem derart speziellen Patientenkollektiv darstellt. Interessanterweise wurden die Ergebnisse der HTx-Patienten weder durch das Alter, die Art

der Immunsuppression sowie den Zeitpunkt der Transplantation signifikant beeinflusst. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt auch die Publikation von Lagler et al., in welcher ebenfalls der Vergleich HHT mit demselben kommerziellen ELISA-Kit auf HIV-Patienten angewandt wird. Geimpft wurden diese Patienten mit einem nicht-adjuvantierten Impfstoff. Vergleicht man nun die ELISA-Resultate des kommerziellen Kits mit denen der vorliegenden Arbeit, nur in Bezug auf immunkompromittierte Patienten, so erscheinen die Ergebnisse des kommerziellen Tests sensitiver (der Test detektiert positive Patienten) als die Ergebnisse der NTx-Patienten, insbesondere der *Responder*, der vorliegenden Arbeit (siehe z.B. NTx-Patienten *Responder* Abb.14). Dennoch werden auch mit diesem kommerziellen Test insgesamt die Anforderungen, die an ein alternatives Testsystem zu stellen sind, nicht erfüllt (Lagler, Grabmeier-Pfistershammer et al. 2012). Die Entwicklung eines validen ELISA-Protokolls zum Nachweis von Influenza-Impfantikörpern bei immungeschwächten Patienten gestaltet sich scheinbar als schwierig.

Ein weiterer Aspekt, der in diesem Diskussionspunkt über ELISA-Methoden zur Bestimmung humoraler Immunantworten angesprochen werden soll, ist die Avidität. Studien zur Aviditätsmessung von (pandemischen) Influenzaantikörpern in der gängigen Literatur beziehen sich häufig auf Aviditätsbestimmungen nach erfolgter Infektion, nicht nach Impf-Immunsierung und untersuchen häufig den möglichen Zusammenhang des Schweregrades der Infektion mit der Avidität (To, Zhang et al. 2012). Erfolgt die Aviditätsmessung nach Influenzaimpfung, so kann es zur Untersuchung des Einflusses/der Bedeutung von Adjuvantien sein, wie beispielsweise bei Canelle et al. In dieser Publikation wird untersucht, ob zwei gleichartige, adjuvantierte Impfstoffe (*Pandemrix®/Arepanrix®*) Antikörper mit gleichem Aviditätsverhalten induzieren. Von Interesse war dies, da nur nach Verimpfung des Impfstoffes *Pandemrix®* Narkolepsiefälle aufgetreten waren (Canelle, Dewé et al. 2016). Generell ist die Bedeutung der Avidität in der humoralen Immunantwort noch nicht eindeutig geklärt und es gibt widersprüchliche Ansichten (Canelle, Dewé et al. 2016). Fraglich ist beispielsweise der Anteil nicht-neutralisierender Antikörper an der Gesamt-Avidität. To et al. beschreibt, dass nach erfolgter Infektion möglicherweise durch den Einfluss nicht-neutralisierender Antikörper zu hohe Aviditäten gemessen werden können, obwohl die eigentliche Immunfunktion (= neutralisierende Antikörper) schlechter ist (To, Zhang et al. 2012). Dazu passt auch die Annahme, dass sich die Gesamtheit an neutralisierenden und nicht-neutralisierenden Antikörpern nach Infektion von dem Zustand nach einer Impfung unterscheiden vermag (Chan, To et al. 2011). Somit stellt die Bestimmung der Avidität zur Charakterisierung von humoralen Immunantworten eine diskussionswürdige Methode dar, die in ihrer Interpretation noch nicht ausgereift scheint. Vergleicht man die Methoden für den Nachweis der Aviditäten (entweder nach Impfung oder Infektion), so sind sie nahezu identisch und unterscheiden sich häufig nur in der Molarität des Harnstoffes und der Inkubationszeit. Die bei To et al. beschriebenen Probleme, die zur Ablösung des beschichteten Antigens bei Harnstoffmolaritäten  $> 4 \text{ M}$  führten (To, Zhang et al. 2012), wurden beispielsweise von Yam et al. nicht bestätigt. In dieser Studie mit Seren von geimpften Kindern wurden zum Nachweis der Avidität sogar Harnstofflösungen bis  $8 \text{ M}$  mit 30 Minuten Inkubationszeit verwendet (Yam, Gupta

et al. 2013). Verglichen mit dem für die vorliegende Arbeit verwendeten Protokoll fallen keine Unterschiede auf, die die schwachen Ergebnisse in der Aviditätsmessung der gesunden Probanden auf den ersten Blick erklären könnten. Einzig die Berechnung des AI weicht im Yam-Protokoll etwas von der Berechnungsgrundlage bei To et al und der vorliegenden Arbeit ab. Bei To et al. hingegen wurde statt eines rekombinanten HA zur Plattenbeschichtung eine Splitvakzine verwendet, die neben hauptanteilig HA ebenfalls NA, Matrixprotein sowie Nukleoprotein enthält (To, Zhang et al. 2012). Auch der Zeitpunkt der Aviditätsmessung, beginnend 3 Wochen nach Impfung, scheint gut gewählt, wie die Studie von Yam et al, zeigt (Yam, Gupta et al. 2013). Ein Vergleich von Ergebnissen der Kinder mit Ergebnissen Erwachsener scheint unter Berücksichtigung der Zunahme des Antikörperprimings mit dem Alter ebenfalls akzeptabel (El-Madhun, Cox et al. 1999).

Da die in der vorliegenden Arbeit gemessenen schwachen Aviditätsergebnisse somit nicht auf offensichtliche oder grundlegende Anwendungsfehler im Versuchsprotokoll zurückzuführen sind, sollen die Ergebnisse nun im Folgenden diskutiert werden. Bei den Probanden war nach drei Wochen ein schwacher Anstieg in der Avidität zu erkennen, der jedoch nicht signifikant ist (Abb. 16). Die Gruppe der NTx- Patienten hingegen zeigte keine Kinetik (Abb. 17/18). Diese Ergebnisse stimmen jeweils mit den Verläufen der einfachen IgG Antworten gegen das pandemische HA überein (Abb. 12/13/14) und lassen sich darauf zurückführen, dass die Ergebnisse der IgG Messungen als Grundlage für Vorverdünnung der Proben für die Aviditätsbestimmung genutzt wurden. Eine derartige Korrelation war demnach zu erwarten. In der Publikation von To et al gibt es Hinweise darauf, dass Patienten mit hohen ELISA-Werten auch höhere Aviditäten aufgewiesen haben. Einschränkend ist bei dieser These jedoch, dass diese Daten bei erkrankten Patienten mit einem schweren Verlauf erhoben wurden. Zusätzlich wird aufgrund der Verwendung einer Splitvakzine anstelle eines reinen rekombinanten HA-Präparates darauf hingewiesen, dass diese Tatsache ebenfalls einen Einfluss auf die Avidität haben könnte (To, Zhang et al. 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durchaus vergleichbare Protokolle gibt, die den r-ELISA für den Nachweis des Impferfolges bei gesunden Menschen in einem begrenzten Zeitraum nach Impfung (ca. 4-6 Wochen) als eine Alternative zu Verfahren wie NT oder HHT, wie auch die vorliegende Arbeit zeigt, bestätigen können. Zusätzlich gibt es aber auch noch Protokolle, die durch Modifikation möglicherweise bessere Ergebnisse erzielen können (Grund, Pietzonka et al. 2013). Für den Einsatz zur Überprüfung des Impferfolges bei immunsupprimierten Patienten ist der r-ELISA jedoch nicht geeignet, was sich auch in weiteren Publikationen gezeigt hat. Zuletzt sollte von Aviditätsbestimmungen zur Charakterisierung der Immunantwort (nach Influenzaimpfung) aufgrund fehlender Reife, besonders in der Interpretation der Ergebnisse, abgesehen werden.

### 4.3 Der Stellenwert der Überprüfung des Impferfolges nach Influenzaimpfung bei Immunsupprimierten in Deutschland – was ist die Alternative?

Im letzten Diskussionspunkt soll noch einmal der eigentliche Stellenwert der Überprüfung des Impferfolges nach Influenzaimpfung für besondere Patientengruppen, wie Immunsupprimierte, aufgegriffen werden. Somit soll hinterfragt werden, ob es weiterhin Sinn macht, Arbeit in die Etablierung einer möglichen Alternative zu den arbeitsaufwändigen Nachweisverfahren wie NT oder HHT zu investieren. Dabei sollte zwischen saisonaler und pandemischer Impfung unterschieden werden. Wie bereits unter 4.1 erwähnt, gibt es in Deutschland generell nur für sehr wenige immunsupprimierte Patienten eine Empfehlung zur Überprüfung des Impferfolges nach saisonaler Influenzaimpfung.

Welche Bedeutung kommt dieser Empfehlung zu? Es soll anhand des Antikörperstatus entschieden werden, ob eine Boosterung der eigentlichen Einfachimpfung notwendig ist. Für viele Patienten ist bereits der Einfluss ihrer Immunsuppressiva bzw. ihr Status der Immunsuppression auf die Antikörperentwicklung nach Influenzaimpfung durch die stetig wachsenden Studiendaten soweit bekannt, sodass dem Empfehlungsschreiben „Impfung unter Immunsuppression“ für fast jede Art der Immunsuppression eine Hilfestellung zum Umgang mit der jährlich empfohlenen Influenzaimpfung und einer möglichen Boosterung zu entnehmen ist. So gibt es wiederum Patientengruppen, bei denen die Boosterung nicht explizit empfohlen wird, da es die Datenlage bisher nicht notwendig macht (z.B. Erwachsene mit „onkologischen Erkrankungen mit antineoplastischer Therapie“) während für „Patienten unter autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation“ für die erste Influenzaimpfung nach Transplantation „2 Impfstoffdosen im Abstand von 4 Wochen“ in Erwägung gezogen werden sollen (Laws, Baumann et al. 2020). Für Organtransplantierte kann gemäß der Hilfestellung bei Impfung unter „starker Immunsuppression“ ebenfalls eine Boosterung nach 4 Wochen erfolgen (Laws, Baumann et al. 2020). Beschäftigt man sich ausführlich mit dieser Empfehlung, findet man für nahezu jeden Patienten eine passende, durch Studiendaten belegte, Empfehlung, dennoch ist das Dokument recht umfangreich und enthält einige Ausnahmen. Auch wenn es eigentlich nur eine Hilfestellung darstellt, von der durchaus z.B. in Rahmen von Studien abgewichen werden kann, wird es für viele behandelnden Ärzte nahezu „Leitliniencharakter“ haben, nicht zuletzt da bei Impfungen dieser Patienten viele Ärzte immer noch recht unsicher sind (Niehues, Bogdan et al. 2017). Hilfreich wäre demnach ein vereinfachtes und einheitlicheres Vorgehen zu schaffen, wodurch vielleicht sogar noch die Impfquoten bei diesen Patientengruppen gesteigert werden könnten. Als gutes Beispiel geht dabei Österreich voran. Dort gibt es gemäß „Influenza Impfeempfehlung Saison 2021/2022- Version 1.1“ ein spezielles „Impfschema Risikopersonen“. Zu diesen Risikopersonen zählen schwer chronisch Kranke sowie Immunsupprimierte (Immundefekte und/oder mittelgradige oder schwere Immunsuppression bzw. immunsupprimierende Therapien). Für diese Patienten gilt, altersunabhängig, abweichend von der Fachinformation sowie nach Absprache mit den behandelnden Ärzten eine einheitliche Empfehlung, es wird: *„eine Impfung mit dem tetravalenten adjuvantierten oder dem tetravalenten*

*Hochdosisimpfstoff empfohlen*“. „Bei Personen mit schwerer Immunsuppression kann darüber hinaus eine 2. Impfung mit einem tetravalenten, inaktivierten Impfstoff (2. Dosis nicht adjuvantiert, kein Hochdosis-Impfstoff) angeraten werden, um einen bestmöglichen Schutz über die gesamte Influenzasaison zu erreichen“ (Sozialministerium Österreich 2021). Stellt sich somit die Frage, ob ein derartiges Vorgehen auch für Deutschland denkbar wäre. Auch wenn bei Impfungen von Immunsupprimierten immer noch viele Fragen offen sind und durch neue Therapieansätze immer wieder neue Fragen dazu kommen, wächst durch neue Daten aber auch mehr und mehr das Verständnis dieser Thematik. Manche Länder erscheinen dabei vielleicht etwas „mutiger“ im Umgang mit diesen Patienten zu sein. In Bezug auf den initialen Diskussionspunkt, den Stellenwert der Überprüfung des Impferfolges in Bezug auf Influenza, scheint dieser aktuell sehr niedrig zu sein, wenn nicht sogar noch weiter abnehmend. Die empfohlenen Indikationen sind sehr wenige, möglicherweise wird entgegen den Empfehlungen teilweise sogar auf den Nachweis verzichtet und stattdessen direkt aufgeboostert. Somit wäre der Bedarf an einem alternativen Testsystem, wie eines ELISA, zur Überprüfung des Impferfolges nach saisonalen Influenza-Impfungen für Patienten mit Immundefizienz zu vernachlässigen. Für die durchaus wichtige Detektion von möglichen *Non-Respondern* steht mit einem NT ein optimales Testsystem zur Verfügung. Das geringe Laborangebot an derartigen Testverfahren spiegelt zusätzlich wider, wie gering der Bedarf aktuell zu sein scheint. In Anbetracht einer möglichen neuen Influenzapandemiewelle sollte jedoch nicht jede Überlegung dazu außer Betracht gelassen werden. Die aktuelle Pandemiesituation, ausgelöst durch das neue Coronavirus SARS-CoV-2, zeigt, wie schnell der Bedarf an einer Überprüfung des Impferfolges (nicht nur bei Immunsupprimierten) steigen kann. Da die Entwicklungen pandemischer Impfstoffe in Bedarfssituationen, wie sowohl in der Vergangenheit für den pandemischen Influenzaimpfstoff (2009/10) als auch gegenwärtig für die aktuellen SARS-CoV-2 Präparate bekannt, rasch verlaufen können, können sich Nachfragen zum Impfantikörpernachweis ebenfalls rasch anschließen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen zusammenfassend folgende Überlegungen zu: Bei saisonalen Influenzaimpfungen sollte für Patienten mit Immundefizienz zunächst die Notwendigkeit der Impfstatusüberprüfung hinterfragt werden. Bleibt der Bedarf bestehen, so sollte auf die Verwendung eines NT geachtet werden. Alternativ könnte, vergleichbar Österreich, eine direkte Boosterimpfung erfolgen. Tritt erneut eine pandemische Influenzasituation ein, so wird sich der Bedarf an Impfstatusüberprüfungen wahrscheinlich nicht nur auf immundefiziente Patienten beschränken lassen. Die Auswahl der Testmethode sollte daher anhand des Immunstatus erfolgen. Für Immunkompetente, bei denen eine normale Immunantwort zu erwarten ist, würde sich ein ELISA-Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen das Protein Hämagglutinin, wie in der vorliegenden Arbeit verwendet, alternativ als f-ELISA, eignen. Dieses Verfahren ist kostengünstig und wäre schnell zu etablieren, denkbar auch für die gängigen Automaten. Bei Patienten mit (V. a.) Immundefizienz, sollte direkt ein NT verfügbar sein, Testung mittels ELISA sollten nur als Zusatzuntersuchung und nicht als Alternative möglich sein. Zusätzlich sollte die Option einer Boosterimpfung mit dem jeweiligen Pandemieimpfstoff frühzeitig bedacht und diskutiert werden.

## 5 Literatur

- Baldo, V., C. Bertonecello, S. Cocchio, M. Fonzo, P. Pillon, A. Buja and T. Baldovin (2016). "The new pandemic influenza A/(H1N1)pdm09 virus: is it really "new"?" Journal of preventive medicine and hygiene 57(1): E19-E22.
- Benirschke, R. C., E. McElvania, R. B. Thomson, Jr., K. L. Kaul and S. Das (2019). "Clinical Impact of Rapid Point-of-Care PCR Influenza Testing in an Urgent Care Setting: a Single-Center Study." Journal of clinical microbiology 57(3): e01281-01218.
- Beyer, W. E., J. McElhane, D. J. Smith, A. S. Monto, J. S. Nguyen-Van-Tam and A. D. Osterhaus (2013). "Cochrane re-arranged: support for policies to vaccinate elderly people against influenza." Vaccine 31(50): 6030-6033.
- Bodewes, R., D. Morick, G. de Mutsert, N. Osinga, T. Bestebroer, S. van der Vliet, S. L. Smits, T. Kuiken, G. F. Rimmelzwaan, R. A. Fouchier and A. D. Osterhaus (2013). "Recurring influenza B virus infections in seals." Emerg Infect Dis 19(3): 511-512.
- Boni, M. F. (2008). "Vaccination and antigenic drift in influenza." Vaccine 26 Suppl 3(Suppl 3): C8-C14.
- Bouvier, N. M. and P. Palese (2008). "The biology of influenza viruses." Vaccine 26 Suppl 4(Suppl 4): D49-D53.
- Brendish, N. J., A. K. Malachira and T. W. Clark (2017). "Molecular point-of-care testing for respiratory viruses versus routine clinical care in adults with acute respiratory illness presenting to secondary care: a pragmatic randomised controlled trial protocol (ResPOC)." BMC Infect Dis 17(1): 128.
- Bullard, B. L. and E. A. Weaver (2021). "Strategies Targeting Hemagglutinin as a Universal Influenza Vaccine." Vaccines 9(3): 257.
- Byrd-Leotis, L., R. D. Cummings and D. A. Steinhauer (2017). "The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase." International journal of molecular sciences 18(7): 1541.
- Canelle, Q., W. Dewé, B. L. Innis and R. van der Most (2016). "Evaluation of potential immunogenicity differences between Pandemrix™ and Arepanrix™." Human vaccines & immunotherapeutics 12(9): 2289-2298.
- Chan, K. H., K. K. To, I. F. Hung, A. J. Zhang, J. F. Chan, V. C. Cheng, H. Tse, X. Y. Che, H. Chen and K. Y. Yuen (2011). "Differences in antibody responses of individuals with natural infection and those vaccinated against pandemic H1N1 2009 influenza." Clin Vaccine Immunol 18(5): 867-873.
- Chow, E. J., J. D. Doyle and T. M. Uyeki (2019). "Influenza virus-related critical illness: prevention, diagnosis, treatment." Crit Care 23(1): 214.
- Cohet, C., R. van der Most, V. Bauchau, R. Bekkat-Berkani, T. M. Doherty, A. Schuind, F. Tavares Da Silva, R. Rappuoli, N. Garçon and B. L. Innis (2019). "Safety of AS03-adjuvanted influenza vaccines: A review of the evidence." Vaccine 37(23): 3006-3021.
- Coudeville, L., F. Bailleux, B. Riche, F. Megas, P. Andre and R. Ecochard (2010). "Relationship between haemagglutination-inhibiting antibody titres and clinical protection against influenza: development and application of a bayesian random-effects model." BMC medical research methodology 10: 18-18.
- Dawood, F. S., A. D. Iuliano, C. Reed, M. I. Meltzer, D. K. Shay, P. Y. Cheng, D. Bandaranayake, R. F. Breiman, W. A. Brooks, P. Buchy, D. R. Feikin, K. B. Fowler, A. Gordon, N. T. Hien, P. Horby, Q. S. Huang, M. A. Katz, A. Krishnan, R. Lal, J. M. Montgomery, K. Mølbak, R. Pebody, A. M. Presanis, H. Razuri, A. Steens, Y. O. Tinoco, J. Wallinga, H. Yu, S. Vong, J. Bresee and M. A. Widdowson (2012). "Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study." Lancet Infect Dis 12(9): 687-695.
- de Graaf, M. and R. A. Fouchier (2014). "Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis." EMBO J 33(8): 823-841.
- der Nierentransplantationszentren Nordrhein-Westfalens, A. (2019). Manual zur Vereinheitlichung der Evaluation vor Nierentransplantation und Nierenlebendspende, der Wartelistenführung vor Nierentransplantation und zur Nachsorge nach Nierentransplantation und Nierenlebendspende.

- Diedrich, S. and K. Keeren (2017). Die Polioeradikation ist ohne Laborcontainment chancenlos, Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
- DSO, D.-S.-O. (2021). "DSO-Jahresbericht 2020.pdf."
- Eckerle, I., K. D. Rosenberger, M. Zwahlen and T. Junghanss (2013). "Serologic vaccination response after solid organ transplantation: a systematic review." PLoS One 8(2): e56974.
- El-Madhun, A. S., R. J. Cox and L. R. Haaheim (1999). "The effect of age and natural priming on the IgG and IgA subclass responses after parenteral influenza vaccination." J Infect Dis 180(4): 1356-1360.
- EMA, E.-M.-A. (2011). "European-medicines-agency-recommends-restricting-use-pandemrix."
- Fineberg, H. V. (2014). "Pandemic preparedness and response--lessons from the H1N1 influenza of 2009." N Engl J Med 370(14): 1335-1342.
- Fiore, A. E., T. M. Uyeki, K. Broder, L. Finelli, G. L. Euler, J. A. Singleton, J. K. Iskander, P. M. Wortley, D. K. Shay, J. S. Bresee and N. J. Cox (2010). "Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010." MMWR Recomm Rep 59(RR-8): 1-62.
- Fukuda, M., T. Yoshida, M. Moroki, N. Hirayu, M. Nabeta, A. Nakamura, H. Uzu and O. Takasu (2019). "Influenza A with hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome in an adult: A case report." Medicine (Baltimore) 98(14): e15012.
- für Ärzte, R. R.-R. (2020). Influenza (Teil 1): Erkrankungen durch saisonale Influenzaviren. 2018c.
- Gangappa, S., J. Wrammert, D. Wang, Z. N. Li, J. S. Liepkalns, W. Cao, J. Chen, M. Z. Levine, J. Stevens, S. Sambhara, B. Begley, A. Mehta, T. C. Pearson, R. Ahmed and C. P. Larsen (2019). "Kinetics of antibody response to influenza vaccination in renal transplant recipients." Transpl Immunol 53: 51-60.
- Goka, E. A., P. J. Vally, K. J. Mutton and P. E. Klapper (2014). "Mutations associated with severity of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in humans: a systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence." Arch Virol 159(12): 3167-3183.
- Grohskopf, L. A., E. Alyanak, K. R. Broder, L. H. Blanton, A. M. Fry, D. B. Jernigan and R. L. Atmar (2020). "Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices - United States, 2020-21 Influenza Season." MMWR Recomm Rep 69(8): 1-24.
- Grund, S., O. Adams, S. Wählisch and B. Schweiger (2011). "Comparison of hemagglutination inhibition assay, an ELISA-based micro-neutralization assay and colorimetric microneutralization assay to detect antibody responses to vaccination against influenza A H1N1 2009 virus." J Virol Methods 171(2): 369-373.
- Grund, S., S. Pietzonka, S. Michel and O. Adams (2013). "Serum antibodies against native and denatured hemagglutinin glycoproteins detected by ELISA as correlates of protection after influenza vaccination in healthy vaccinees and in kidney transplant recipients." J Virol Methods 193(2): 558-564.
- Grund, S., O. Wichmann, T. Mertens and H. Hengel (2012). Konzepte, Wirksamkeit und Perspektiven pandemischer und nichtpandemischer Influenzaimpfungen, Robert Koch-Institut, Infektionsepidemiologie. 56.
- Hallberg, P., H. Smedje, N. Eriksson, H. Kohnke, M. Daniilidou, I. Öhman, Q.-Y. Yue, M. Cavalli, C. Wadelius, P. K. E. Magnusson, A.-M. Landtblom, M. Wadelius and Swedegene (2019). "Pandemrix-induced narcolepsy is associated with genes related to immunity and neuronal survival." EBioMedicine 40: 595-604.
- Hamza, H., M. M. Shehata, A. Mostafa, S. Pleschka and O. Planz (2021). "Improved in vitro Efficacy of Baloxavir Marboxil Against Influenza A Virus Infection by Combination Treatment With the MEK Inhibitor ATR-002." Frontiers in microbiology 12: 611958-611958.
- Hancock, K., V. Veguilla, X. Lu, W. Zhong, E. N. Butler, H. Sun, F. Liu, L. Dong, J. R. DeVos, P. M. Gargiullo, T. L. Brammer, N. J. Cox, T. M. Tumpey and J. M. Katz (2009). "Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus." N Engl J Med 361(20): 1945-1952.
- Hannoun, C. (2013). "The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines." Expert Rev Vaccines 12(9): 1085-1094.



- Hansen, A., S. Grund, G. Hetzel, K. Ivens, H. A. Sümchen, P. Zgoura, H. Hengel, O. Adams and L. C. Rump (2012). "Noncontrolled trial of monovalent AS03A-adjuvanted vaccine for 2009 pandemic influenza A(H1N1) in long-term dialysis patients and transplant recipients." Am J Kidney Dis 59(3): 471-473.
- Harder, T., J. Koch, R. von Kries and O. Wichmann (2019). "Die neue Standardvorgehensweise der Ständigen Impfkommission (STIKO): Entstehung, Struktur und Umsetzung." Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 62(2019): 392--399.
- Hay, A. J. and J. W. McCauley (2018). "The WHO global influenza surveillance and response system (GISRS)-A future perspective." Influenza Other Respir Viruses 12(5): 551-557.
- Heaton, N. S., D. Sachs, C. J. Chen, R. Hai and P. Palese (2013). "Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins." Proc Natl Acad Sci U S A 110(50): 20248-20253.
- Impfkommission, S. (2021). "Beschluss der STIKO zur 11. Aktualisierung der COVID-19-Impfempfehlung." (39): 3--11.
- Iuliano, A. D., K. M. Roguski, H. H. Chang, D. J. Muscatello, R. Palekar, S. Tempia, C. Cohen, J. M. Gran, D. Schanzer, B. J. Cowling, P. Wu, J. Kyncl, L. W. Ang, M. Park, M. Redlberger-Fritz, H. Yu, L. Espenhain, A. Krishnan, G. Emukule, L. van Asten, S. Pereira da Silva, S. Aungkulanon, U. Buchholz, M.-A. Widdowson, J. S. Bresee and N. Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator (2018). "Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study." Lancet (London, England) 391(10127): 1285-1300.
- Kim, Y.-G., S. G. Yun, M. Y. Kim, K. Park, C. H. Cho, S. Y. Yoon, M. H. Nam, C. K. Lee, Y.-J. Cho and C. S. Lim (2016). "Comparison between Saliva and Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of Respiratory Viruses by Multiplex Reverse Transcription-PCR." Journal of clinical microbiology 55(1): 226-233.
- Kirkpatrick Roubidou, E., M. McMahon, J. M. Carreño, C. Capuano, K. Jiang, V. Simon, H. van Bakel, P. Wilson and F. Krammer (2021). "Identification and Characterization of Novel Antibody Epitopes on the N2 Neuraminidase." mSphere 6(1).
- Krammer, F., G. J. D. Smith, R. A. M. Fouchier, M. Peiris, K. Kedzierska, P. C. Doherty, P. Palese, M. L. Shaw, J. Treanor, R. G. Webster and A. García-Sastre (2018). "Influenza." Nature reviews. Disease primers 4(1): 3-3.
- Kunisaki, K. M. and E. N. Janoff (2009). "Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses." Lancet Infect Dis 9(8): 493-504.
- Kwetkat, A., A. Leischker and H. J. Heppner (2018). "[Influenza: special aspects in old age]." Z Gerontol Geriatr 51(5): 585-596.
- Lagler, H., K. Grabmeier-Pfistershammer, V. Touzeau-Römer, S. Tobudic, M. Ramharter, J. Wenisch, G. A. Gualdoni, M. Redlberger-Fritz, T. Popow-Kraupp, A. Rieger and H. Burgmann (2012). "Immunogenicity and tolerability after two doses of non-adjuvanted, whole-virion pandemic influenza A (H1N1) vaccine in HIV-infected individuals." PloS one 7(5): e36773-e36773.
- Lamb, Y. N. (2019). "Cell-Based Quadrivalent Inactivated Influenza Virus Vaccine (Flucelvax®) Tetra/Flucelvax Quadrivalent®): A Review in the Prevention of Influenza." Drugs 79(12): 1337-1348.
- Laws, H. J., U. Baumann, C. Bogdan, G. Burchard, M. Christopeit, J. Hecht, U. Heining, I. Hilgendorf, W. Kern, K. Kling, G. Kobbe, W. Külper, T. Lehrnbecher, R. Meisel, A. Simon, A. Ullmann, M. de Wit and F. Zepp (2020). "Impfen bei Immundefizienz (III) Impfen bei hämatologischen und onkologischen Erkrankungen (antineoplastische Therapie, Stammzelltransplantation), Organtransplantation und Asplenie." Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 63(5): 588-644.
- Leidel, J. (2015). "Impfungen: Die Abwehr stimulieren." Heilberufe 67(4): 12-14.
- Luo, L., K. Nishi, E. MacLeod, M. I. Sabara, B. L. Coleman, J. B. Gubbay and Y. Li (2013). "Expression of recombinant HA1 protein for specific detection of influenza A/H1N1/2009 antibodies in human serum." Microbiology and Immunology 57(1): 77-81.
- Ma, W., R. E. Kahn and J. A. Richt (2008). "The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications." J Mol Genet Med 3(1): 158-166.

- Marinelli, T. M. and D. Kumar (2020). "Influenza Virus Infection and Transplantation." Transplantation.
- McElhaney, J. E., C. P. Verschoor, M. K. Andrew, L. Haynes, G. A. Kuchel and G. Pawelec (2020). "The immune response to influenza in older humans: beyond immune senescence." Immun Ageing 17: 10.
- Merckx, J., R. Wali, I. Schiller, C. Caya, G. C. Gore, C. Chartrand, N. Dendukuri and J. Papenburg (2017). "Diagnostic Accuracy of Novel and Traditional Rapid Tests for Influenza Infection Compared With Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction: A Systematic Review and Meta-analysis." Ann Intern Med 167(6): 394-409.
- Mertens, T. (2013). "Influenzaimpfung." Dtsch Arztebl International 110(47): 791-792.
- Meyer, B., J. Reimerink, G. Torriani, F. Brouwer, G. J. Godeke, S. Yerly, M. Hoogerwerf, N. Vuilleumier, L. Kaiser, I. Eckerle and C. Reusken (2020). "Validation and clinical evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT)." Emerg Microbes Infect 9(1): 2394-2403.
- Meyer, S., M. Adam, B. Schweiger, C. Ilchmann, C. Eulenburg, E. Sattinger, H. Runte, M. Schlüter, T. Deuse, H. Reichenspurner and A. Costard-Jäckle (2011). "Antibody response after a single dose of an AS03-adjuvanted split-virion influenza A (H1N1) vaccine in heart transplant recipients." Transplantation 91(9): 1031-1035.
- Michaelis, K., S. Scholz, S. Buda, E. Garbe, T. Harder, T. Ledig, M. Terhardt, O. Wichmann, S. Wicker, F. Zepp and T. Mertens (2020). "Beschluss und Wissenschaftliche Begründung der Ständigen Impfkommision (STIKO) für die Aktualisierung der Influenza-Impfempfehlung für Personen im Alter von  $\geq 60$  Jahren." (1): 3--25.
- Murphy, K. and C. Weaver (2018). "Die humorale Immunantwort." Janeway Immunologie: 517-580.
- Niehues, T., C. Bogdan, J. Hecht, T. Mertens, M. Wiese-Posselt and F. Zepp (2017). "Impfen bei Immundefizienz (I) Grundlagenpapier " Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 60(6): 674-684.
- Oberle, D., C. Pönisch, G. Mayer and B. Keller-Stanislawski (2013). "Fall-Kontroll-Studie zu Risikofaktoren von Narkolepsie in Deutschland." Somnologie - Schlafforschung und Schlafmedizin 17(1): 39-48.
- Osterholm, M. T., N. S. Kelley, A. Sommer and E. A. Belongia (2012). "Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis." Lancet Infect Dis 12(1): 36-44.
- PEI, P.-E.-I. (2009). "7. Bericht: Information zu Verdachtsfallberichten, KW 44-53 ".
- Polozov, I. V., L. Bezrukov, K. Gawrisch and J. Zimmerberg (2008). "Progressive ordering with decreasing temperature of the phospholipids of influenza virus." Nat Chem Biol 4(4): 248-255.
- Richter-Kuhlmann, E. and N. Siegmund-Schultze (2009). "Pandemieimpfstoffe: „Die Sicherheit ist gewährleistet“." Dtsch Arztebl International 106(33): 1610-.
- Robert-Koch-Institut (2010). Epidemiologisches Bulletin 25 / 2010, Robert Koch-Institut.
- Robert-Koch-Institut (2016). Epidemiologisches Bulletin 07 / 2016, Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
- Robert-Koch-Institut (2019). Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2018/19, Robert Koch-Institut.
- Robert-Koch-Institut (2020). "Epidemiologisches Bulletin 34 / 2020."
- Rose, A., E. Kissling, H.-D. Emborg, A. Larrauri, J. McMenamin, F. Pozo, R. Trebbien, C. Mazagatos, H. Whitaker, M. Valenciano and I. V. E. g. European (2020). "Interim 2019/20 influenza vaccine effectiveness: six European studies, September 2019 to January 2020." Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 25(10): 2000153.
- Sander, B., F. G. Hayden, M. Gyldmark and L. P. Garrison (2006). "Post-Exposure Influenza Prophylaxis with Oseltamivir." PharmacoEconomics 24(4): 373-386.
- Sarkanen, T. O., A. P. E. Alakuijala, Y. A. Dauvilliers and M. M. Partinen (2018). "Incidence of narcolepsy after H1N1 influenza and vaccinations: Systematic review and meta-analysis." Sleep Med Rev 38: 177-186.

- Sasaki, S., X.-S. He, T. H. Holmes, C. L. Dekker, G. W. Kemble, A. M. Arvin and H. B. Greenberg (2008). "Influence of prior influenza vaccination on antibody and B-cell responses." *PLoS one* 3(8): e2975-e2975.
- Schmidtke M, M. (2014). "Brauchen wir die Grippemittel Tamiflu und Relenza?" *GMS Infect Dis.*
- Schrauwen, E. J. and R. A. Fouchier (2014). "Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals." *Emerging microbes & infections* 3(2): e9-e9.
- Short, K. R., K. Kedzierska and C. E. van de Sandt (2018). "Back to the Future: Lessons Learned From the 1918 Influenza Pandemic." *Front Cell Infect Microbiol* 8: 343.
- Shrestha, S., B. Foxman, S. Dawid, A. E. Aiello, B. M. Davis, J. Berus and P. Rohani (2013). "Time and dose-dependent risk of pneumococcal pneumonia following influenza: a model for within-host interaction between influenza and *Streptococcus pneumoniae*." *Journal of the Royal Society, Interface* 10(86): 20130233-20130233.
- Smith, G. J., D. Vijaykrishna, J. Bahl, S. J. Lycett, M. Worobey, O. G. Pybus, S. K. Ma, C. L. Cheung, J. Raghvani, S. Bhatt, J. S. Peiris, Y. Guan and A. Rambaut (2009). "Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic." *Nature* 459(7250): 1122-1125.
- STIKO (2009). Mitteilung der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut: Impfung gegen die Neue Influenza A (H1N1), Robert Koch-Institut.
- Sun, Y., C. Bian, K. Xu, W. Hu, T. Wang, J. Cui, H. Wu, Z. Ling, Y. Ji, G. Lin, L. Tian, Y. Zhou, B. Li, G. Hu, N. Yu, W. An, R. Pan, P. Zhou, Q. Leng, Z. Huang, X. Ma and B. Sun (2010). "Immune protection induced on day 10 following administration of the 2009 A/H1N1 pandemic influenza vaccine." *PLoS one* 5(12): e14270-e14270.
- Tan, C. W., W. N. Chia, X. Qin, P. Liu, M. I. Chen, C. Tiu, Z. Hu, V. C. Chen, B. E. Young, W. R. Sia, Y. J. Tan, R. Foo, Y. Yi, D. C. Lye, D. E. Anderson and L. F. Wang (2020). "A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction." *Nat Biotechnol* 38(9): 1073-1078.
- Taubenberger, J. K. and D. M. Morens (2006). "1918 Influenza: the mother of all pandemics." *Emerg Infect Dis* 12(1): 15-22.
- Tellier, R. (2006). "Review of Aerosol Transmission of Influenza A Virus." *Emerging Infectious Disease journal* 12(11): 1657.
- To, K. K., A. J. Zhang, I. F. Hung, T. Xu, W. C. Ip, R. T. Wong, J. C. Ng, J. F. Chan, K. H. Chan and K. Y. Yuen (2012). "High titer and avidity of nonneutralizing antibodies against influenza vaccine antigen are associated with severe influenza." *Clin Vaccine Immunol* 19(7): 1012-1018.
- Tong, S., X. Zhu, Y. Li, M. Shi, J. Zhang, M. Bourgeois, H. Yang, X. Chen, S. Recuenco, J. Gomez, L. M. Chen, A. Johnson, Y. Tao, C. Dreyfus, W. Yu, R. McBride, P. J. Carney, A. T. Gilbert, J. Chang, Z. Guo, C. T. Davis, J. C. Paulson, J. Stevens, C. E. Rupprecht, E. C. Holmes, I. A. Wilson and R. O. Donis (2013). "New world bats harbor diverse influenza A viruses." *PLoS Pathog* 9(10): e1003657.
- Uyeki, T. M., R. Prasad, C. Vukotich, S. Stebbins, C. R. Rinaldo, Y. H. Ferng, S. S. Morse, E. L. Larson, A. E. Aiello, B. Davis and A. S. Monto (2009). "Low sensitivity of rapid diagnostic test for influenza." *Clin Infect Dis* 48(9): e89-92.
- Vaarala, O., A. Vuorela, M. Partinen, M. Baumann, T. L. Freitag, S. Meri, P. Saavalainen, M. Jauhiainen, R. Soliymani, T. Kirjavainen, P. Olsen, O. Saarenpää-Heikkilä, J. Rouvinen, M. Roivainen, H. Nohynek, J. Jokinen, I. Julkunen and T. Kilpi (2014). "Antigenic differences between AS03 adjuvanted influenza A (H1N1) pandemic vaccines: implications for pandemrix-associated narcolepsy risk." *PLoS One* 9(12): e114361.
- Wagner, N., F. Assmus, G. Arendt, E. Baum, U. Baumann, C. Bogdan, G. Burchard, D. Föll, E. Garbe, J. Hecht, U. Müller-Ladner, T. Niehues, K. Überla, S. Vygen-Bonnet, T. Weinke, M. Wiese-Posselt, M. Wojcinski and F. Zepp (2019). "Impfen bei Immundefizienz (IV) Impfen bei autoimmunkrankheiten, bei anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen und unter immunmodulatorischer Therapie." *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 62(4): 494-515.
- WHO, W.-H.-O. (2017). "WHO model list of essential medicines, 20th list (March 2017, amended August 2017)."

- Wichmann, O., P. Stocker, G. Poggensee, D. Altmann, D. Walter, W. Hellenbrand, G. Krause and T. Eckmanns (2010). "Pandemic influenza A(H1N1) 2009 breakthrough infections and estimates of vaccine effectiveness in Germany 2009-2010." Euro Surveill 15(18).
- Wilkinson, K., Y. Wei, A. Szwajcer, R. Rabbani, R. Zarychanski, A. M. Abou-Setta and S. M. Mahmud (2017). "Efficacy and safety of high-dose influenza vaccine in elderly adults: A systematic review and meta-analysis." Vaccine 35(21): 2775-2780.
- Yam, K. K., J. Gupta, A. Brewer, D. W. Scheifele, S. Halperin and B. J. Ward (2013). "Unusual patterns of IgG avidity in some young children following two doses of the adjuvanted pandemic H1N1 (2009) influenza virus vaccine." Clin Vaccine Immunol 20(4): 459-467.
- Yamayoshi, S. and Y. Kawaoka (2019). "Current and future influenza vaccines." Nat Med 25(2): 212-220.
- Zatorski, P., A. Adamczyk, M. Kosieradzki, T. Baczkowska, D. Kosson and J. Trzebicki (2018). "Fatal Acute Respiratory Distress Syndrome Due to Influenza A (H1N1) Infection in Patients After Kidney Transplantation: A Report of Five Cases." Annals of transplantation 23: 218-223.

#### URL:

PEI 2022: Paul-Ehrlich-Institut Influenza Impfstoffe

<https://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoffe/influenza-grippe/influenza-node.html>

Zugegriffen am 13.02.2022

Virotech Influenza ELISA IgG/IgM

[http://www.virotechdiagnostics.com/produkte/product-details.html?categories\\_id%5B0%5D=17&products\\_id=1352&tx\\_multishop\\_pi1%5Bpage\\_section%5D=products\\_detail](http://www.virotechdiagnostics.com/produkte/product-details.html?categories_id%5B0%5D=17&products_id=1352&tx_multishop_pi1%5Bpage_section%5D=products_detail)

[http://www.virotechdiagnostics.com/uploads/tx\\_multishop/images/cmsfiles/5e18720f28af4.pdf](http://www.virotechdiagnostics.com/uploads/tx_multishop/images/cmsfiles/5e18720f28af4.pdf)

Zugegriffen am 13.02.2022

Virion\serion ELISA IgG/IgM/IgA

<https://www.serion-diagnostics.de/produkte/serion-elisa-classic-antigen/influenza-a-b-virus/>

Zugegriffen am 13.02.2022

Sozialministerium Österreich Impfplan Influenza

[https://www.sozialministerium.at/Themen/Gesundheit/Impfen/Influenza-Impfung/Empfehlung-Influenza-Impfung-\(Grippeimpfung\)-Saison-2021-2022.html](https://www.sozialministerium.at/Themen/Gesundheit/Impfen/Influenza-Impfung/Empfehlung-Influenza-Impfung-(Grippeimpfung)-Saison-2021-2022.html)

Zugegriffen am 13.02.2022

## Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle:

Besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Ortwin Adams für die Bereitstellung dieser interessanten Fragestellung, der tollen Betreuung über viele Jahre hinweg und nicht zuletzt für viele gute Anregungen und Diskussionen.

Herrn Dr. med. Sebastian Grund für die Übernahme der Co-Betreuung besonders während meiner Laborzeit.

Allen Mitarbeitern der Virologie, insbesondere der AG Adams sowie der Diagnostik für die tolle Arbeitsatmosphäre, gute Zusammenarbeit und nicht zuletzt stete Unterstützung.

Meinem Mann Sebastian der mich stets motiviert hat und immer für mich da ist.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Großmutter, die mich immer unterstützt haben und es mir ermöglicht haben diesen (Berufs-)Weg zu gehen.