

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
(Direktor: Prof. Dr. Helmut Fickenscher)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Etablierung und Validierung  
direkter und indirekter Nachweisverfahren zur  
Diagnostik von Infektionen durch das  
Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**ANNABELLE STRÖMER**

aus Wildeshausen

Kiel 2024

1. Berichterstatter Priv.-Doz. Dr. Andi Krumbholz

2. Berichterstatter Prof. Dr. Stefan Krautwald

Tag der mündlichen Prüfung 26.09.2025

Zum Druck genehmigt Kiel den, 13.08.2025

gez. Priv.-Doz. Dr. Andi Krumbholz

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Ausbreitung eines neuartigen humanpathogenen Coronavirus .....	1
1.2 Phylogenetische Einordnung von SARS-CoV-2.....	2
1.3 Erkenntnisse zum Ursprung von SARS-CoV-2.....	4
1.4 Ultrastruktur von SARS-CoV-2.....	6
1.5 Übertragungswege von SARS-CoV-2.....	7
1.6 Eintritt von SARS-CoV-2 in die Wirtszelle und virale Replikation .....	8
1.7 Entstehung der Variants of Concern.....	9
1.8 Symptomatik und Verlauf der Coronavirus-Erkrankung.....	10
1.9 Risikofaktoren für einen schweren Krankheitsverlauf.....	11
1.10 Prävention und Prophylaxe der SARS-CoV-2-Infektion.....	12
1.11 Therapie der SARS-CoV-2-Infektion .....	15
1.12 Diagnostik der Infektion mit SARS-CoV-2.....	16
1.12.1 Direkter Nachweis der viralen RNA .....	16
1.12.2 Direkter Nachweis viraler Proteine .....	19
1.12.3 Indirekter Nachweis einer abgelaufenen SARS-CoV-2-Infektion.....	20
1.13 Zielsetzungen dieser Dissertation .....	22
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.1 Votum der Ethikkommission.....	23
2.2 Virusgenomnachweis .....	23
2.2.1 Probenentnahme.....	23
2.2.2 Extraktion der Nukleinsäuren.....	23
2.2.3 Verwendete Oligonukleotid- <i>Primer</i> und Sonden .....	24
2.2.4 RT-PCR-Mastermix und Zugabe der extrahierten Nukleinsäuren .....	25
2.2.5 Programmierung der RT-PCR-Geräte.....	26
2.3 Virusantigennachweis .....	26
2.3.1 Antigen-Schnelltest .....	26
2.3.2 Auswahl definierter Proben zur Testung unterschiedlicher Antigentests .....	27
2.4 Nachweis von SARS-CoV-2-spezifischen Antikörpern im Serum.....	27
2.4.1 Untersuchte SARS-CoV-2-Antikörpertests.....	27
2.4.2 Serumbank von COVID-19-Patienten und präpandemischen Proben .....	28
2.4.3 Auswertung.....	28
2.4.4 Bestimmung der IgG-Avidität.....	29

2.4.5	Kinetik der SARS-CoV-2-IgG-Indizes und IgG-Aviditäten.....	29
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
3.1	SARS-CoV-2-Diagnostik durch den Nachweis viraler RNA.....	30
3.1.1	Experimenteller Aufbau.....	30
3.1.2	Nachweis der Spezifität der SARS-CoV-2-Triplex-PCR .....	30
3.1.3	Vergleich der E- und N-Gen-PCR.....	31
3.1.4	Linearität und Nachweisgrenze.....	32
3.1.5	Vergleich der N-Gen-Triplex-RT-PCR zu einer zugelassenen PCR.....	33
3.1.6	Einfluss des 5-Carboxy-Rhodamin-X auf die Triplex-RT-PCR .....	34
3.1.7	Vergleich von individuellen und Pool-Testungen verschiedenen Umfangs.....	35
3.1.8	Vergleich verschiedener Methoden der Nukleinsäuren-Extraktion.....	36
3.1.9	Vergleichende Untersuchung von SARS-CoV-2-Antigen-Schnelltests .....	38
3.2	Validierung von Verfahren zum indirekten Virusnachweis .....	42
3.2.1	Sensitivität von acht SARS-CoV-2-IgG- bzw. Gesamtantikörpertests.....	42
3.2.2	Nachweis der Spezifität der untersuchten Antikörper-Tests .....	44
3.2.3	Diagnostische Qualität der untersuchten Antikörper-Tests.....	45
3.2.4	Nachweis der Eignung der Verfahren für die Routinetestung .....	45
3.2.5	Kinetik der SARS-CoV-2-IgG-Antikörper im Zeitverlauf.....	46
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>48</b>
4.1	SARS-CoV-2-Diagnostik durch PCR-Nachweis der viralen RNA .....	48
4.2	SARS-CoV-2-Diagnostik durch Antigen-Schnelltests.....	52
4.3	Indirekter, serologischer Nachweis einer SARS-CoV-2-Infektion .....	55
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
	<b>Summary.....</b>	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>99</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>105</b>
<b>9.</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>106</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE2	<i>Angiotensin Converting Enzyme 2</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementäre DNA
CoV	Coronavirus, Coronaviren
COVID-19	<i>Coronavirus-induced disease of 2019</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , Enzymimmuntest
E-Protein	<i>envelope-Protein</i> , Hüllprotein
FFP2	<i>filtering face pieces</i> ; partikelfiltrierende Halbmasken Typ 2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
hCoV	humanes Coronavirus, humane Coronaviren
Ig	Immunglobulin
MERS	<i>Middle-East Respiratory Syndrome</i>
M-Protein	Membranprotein
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
N-Protein	<i>nucleocapsid-Protein</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
POCT	<i>Point of Care Test</i> , vor-Ort-Soforttest
RBD	Rezeptorbindungsdomäne
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus</i>
S-Protein	<i>Spike-Protein</i>
TMPRSS2	transmembrane Serinprotease 2
UDG	Uracil-Glycosylase
VOC	<i>variant of concern</i> , Besorgnis-erregende Variante

## 1. Einleitung

### 1.1 Ausbreitung eines neuartigen humanpathogenen Coronavirus

Am 08.12.2019 trat in Wuhan, der Hauptstadt der Provinz Hubei in China, ein Fall einer atypischen Pneumonie unbekannter Ursache auf. Nur wenige Wochen später, am 31.12.2019, wurden bereits 27 derartige Fälle berichtet, die mit dem Besuch oder der Tätigkeit auf einem lokalen Fisch- und Wildtiermarkt in Zusammenhang gebracht wurden (Lu et al., 2020a).

Im Januar 2020 wurde ein bis dahin unbekanntes Coronavirus (CoV) aus der Gruppe der Beta-Coronaviren als Auslöser dieser Infektionen identifiziert (World Health Organization, 2020). Dieses wurde als *Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus type 2* (SARS-CoV-2) bezeichnet (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020). Das Krankheitsbild, das vor allem durch Fieber, Husten, Muskelschmerzen und Abgeschlagenheit gekennzeichnet ist (Huang et al., 2020), wurde als *CoronaVirus-Induced Disease of 2019* (COVID-19) beschrieben (World Health Organization, 2021c). Das anthropozoonotische Potential der bei Säugetieren weitverbreiteten CoV ist schon länger bekannt (Ye et al., 2020). So kam es im Jahr 2002 zu schwer verlaufenden Pneumonien, die durch das mit SARS-CoV-2 eng verwandte klassische *Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus* (SARS-CoV) ausgelöst wurden (Drosten et al., 2003). Dieser Ausbruch führte innerhalb eines halben Jahres zu 8096 Infektionen und 774 Todesfällen (World Health Organization, 2021a). Etwa ein Jahrzehnt danach wurden in Saudi Arabien atypische Pneumonien durch das *middle east respiratory syndrome coronavirus* (MERS-CoV) beschrieben (Zaki et al., 2012). Infektionen durch MERS-CoV wurden im Folgenden neben Saudi Arabien auch in Qatar, Jordanien, Tunesien, Korea, dem Vereinigten Königreich, Deutschland, Frankreich, Italien und den USA nachgewiesen (Bermingham et al., 2012; Buchholz et al., 2013; Centers for Disease Control and Prevention, 2012; Guery et al., 2013; Health Protection Agency, UK Novel Coronavirus Investigation team collective, 2013). Das Risiko einer anhaltenden Virusübertragung in der Bevölkerung wurde bisher als gering eingeschätzt, wenn geeignete Maßnahmen zur raschen Infektionseindämmung ergriffen werden (Assiri et al., 2013; European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

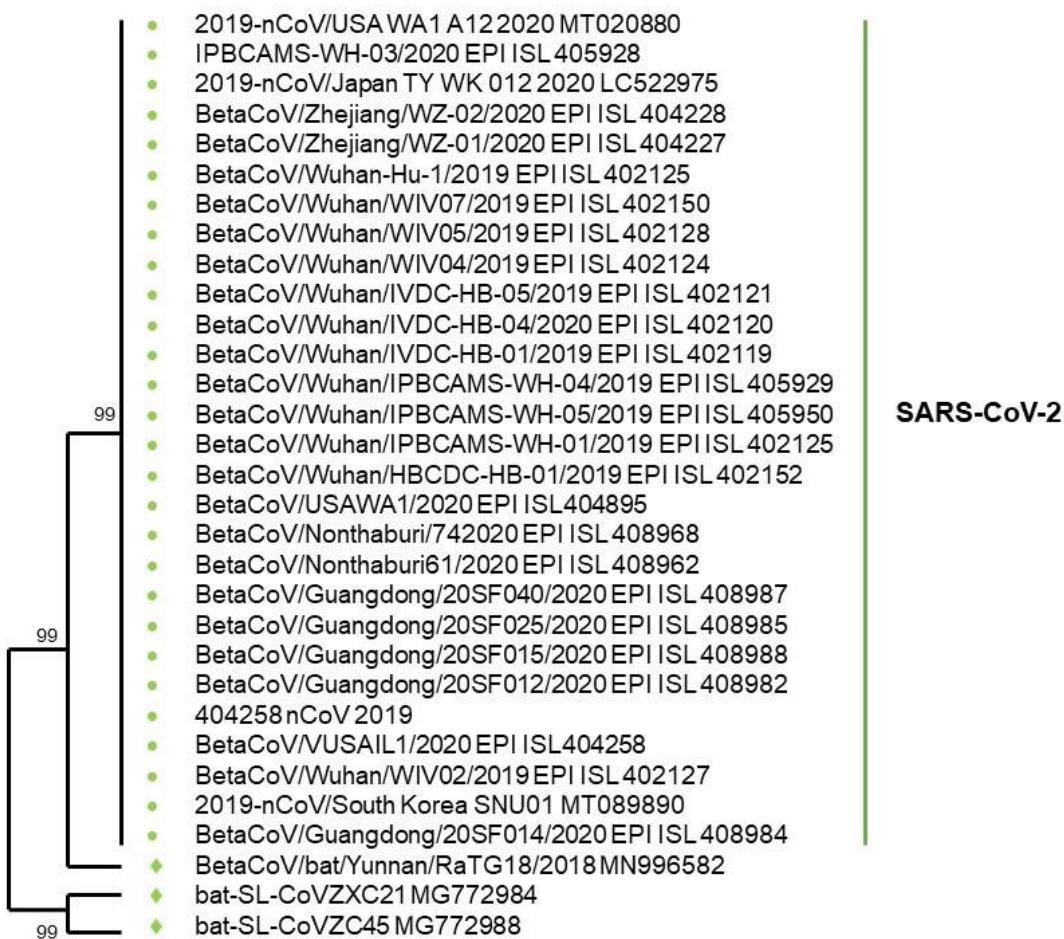
Innerhalb weniger Wochen fand SARS-CoV-2 weltweite Verbreitung, sodass die Weltgesundheits-Organisation am 11.03.2020 den Status der Pandemie ausrief (World Health Organization, 2021b). Am 11.10.2022 meldete die Weltgesundheits-Organisation weltweit 619.161.228 SARS-CoV-2-Infektionen und 6.537.636 Todesfälle. In Deutschland wurden bis zum 11.10.2022 34.121.168 Fälle und 150.720 Todesfälle registriert (Robert Koch-Institut, Daten vom 11.10. 2022).

## 1.2 Phylogenetische Einordnung von SARS-CoV-2

Nach den Kriterien des *International Committee on Taxonomy of Viruses* gehören CoV zur Subfamilie der *Coronavirinae* aus der Familie der *Coronaviridae* innerhalb der Ordnung *Nidovirales*. Sie können in die Subgruppen der Alpha-, Beta-, Gamma- und Delta-CoV unterteilt werden (Cui et al., 2019). Die CoV sind behüllte Viren mit einem Genom aus einzelsträngiger Ribonukleinsäure (RNA) positiver Polarität. Dieses stellt mit 26.000-32.000 Basen das größte bekannte Genom unter den RNA-Viren dar (Weiss und Navas-Martin, 2005). Vor dem Auftreten des SARS-CoV-2 waren bereits die sechs humanen, medizinisch relevanten CoV 229E, OC43, HKU1, NL63, SARS-CoV und MERS-CoV bekannt (Li et al., 2007; Bermingham et al., 2012).

Alle CoV weisen am 5'-Ende eine Cap-Struktur und am 3'-Ende der RNA einen Poly-A-Schwanz auf. Die nicht für Proteine kodierenden Genomanteile machen mit zwei Dritteln den größten Teil des viralen Erbguts aus. Am 5'-Ende befinden sich neben einer Leader-Sequenz und einer untranslatierten Region mehrere Haarnadel-Strukturen, die für die Regulation der RNA-Replikation und Translation von Bedeutung sind. Das Genom kodiert für das Spike-(S)-Protein, das Envelope-(E)-Protein, das Membran-(M)-Protein und das Nucleocapsid-(N)-Protein (Fehr und Perlman, 2015). Außerdem finden sich auf bestimmten Abschnitten Leserahmen, die für akzessorische Proteine kodieren, von denen man annimmt, dass sie für die Pathogenität des Virus von Bedeutung sind (Zhao et al., 2012; Redondo et al., 2021).

Durch die Sequenzierung der SARS-CoV-2-RNA wurde festgestellt, dass das Erbgut dieses Beta-CoV nur zu 79 % mit dem klassischen SARS-CoV bzw. nur zu 50 % mit MERS-CoV übereinstimmt. Demgegenüber wurde eine mit 88 % als sehr hoch einzuschätzende Übereinstimmung zum Genom zweier Fledermaus-CoV gefunden, bat-SL CoVZC45 und bat-SL CoVZXC21 (Lu et al., 2020b). Die genaue Einordnung des SARS-CoV-2 in die Familie der CoV ist Abb. 1 zu entnehmen. Ein hohes Maß an Verwandtschaft wurde ebenfalls zu einem CoV des malaiischen Pangolin (Schuppentier, Tannenzapfentier) nachgewiesen (Morel et al., 2021).

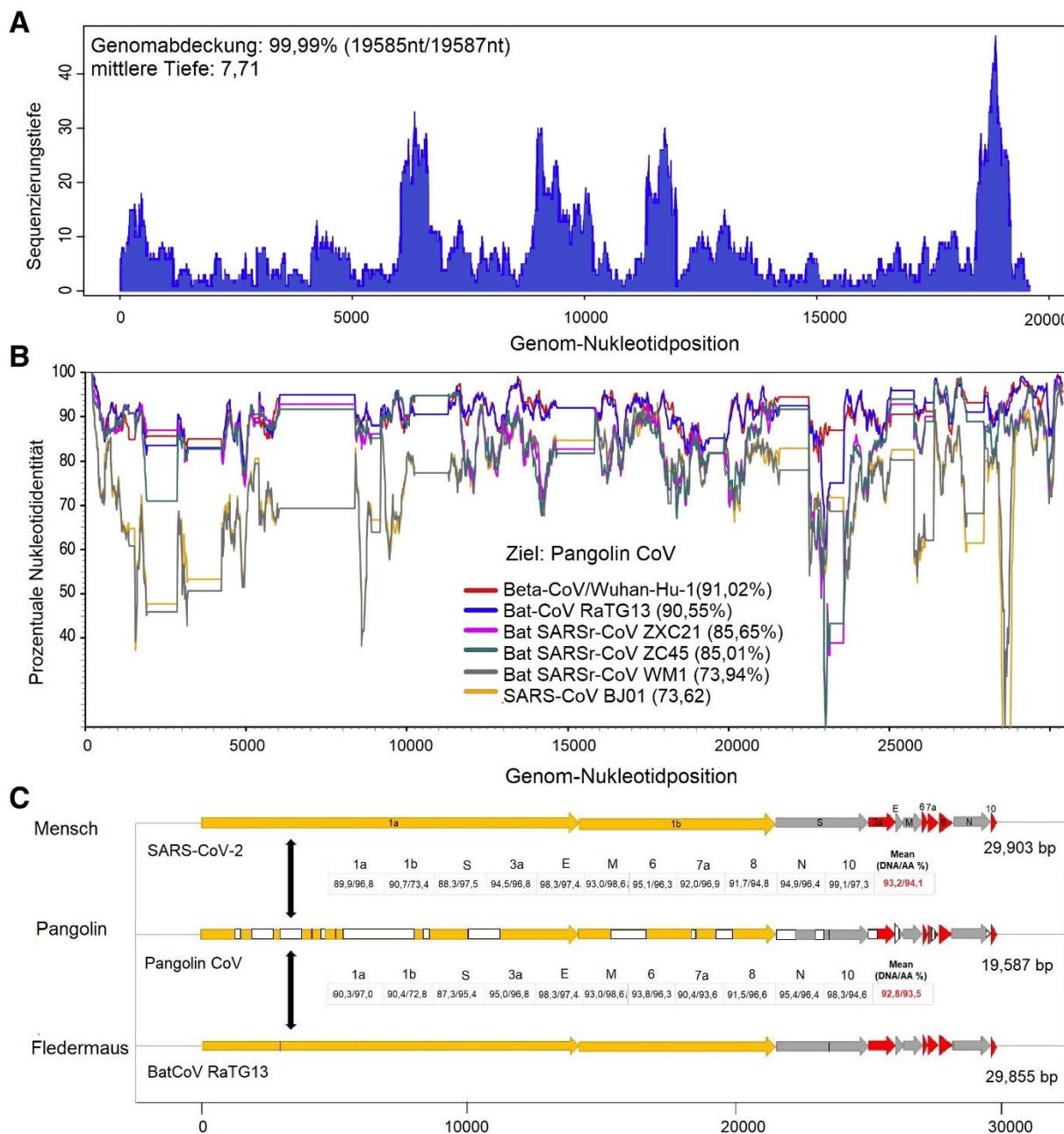


**Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Coronaviren.** Die Analyse basiert auf der für das Spike-Protein kodierenden RNA-Sequenz und wurde mit der MEGA 6-Software, der Neighbour-Joining-Methode und 1000 Bootstrap-Werten erstellt. Die SARS-CoV-2-Sequenzen werden durch Punkte gekennzeichnet, Sequenzen der eng verwandten Fledermaus-CoV sind durch Rauten wiedergegeben (nach Biswas et al., 2020).

### 1.3 Erkenntnisse zum Ursprung von SARS-CoV-2

Im Hinblick auf zukünftig zu erwartende Pandemien ist die Identifizierung des Ursprungs von SARS-CoV-2 von hohem Interesse. Dabei gilt es herauszufinden, wie ein Virus aus dem Tierreservoir kommend Artengrenzen überwindet und letztendlich in der Lage ist, effizient menschliche Zellen so zu infizieren, dass es zur Entwicklung von Krankheitsbildern wie COVID-19 kommt. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse zur Verbreitung von CoV ist anzunehmen, dass Fledermäuse eine wichtige Rolle als Reservoir für die Entwicklung des neuartigen SARS-CoV-2 spielten. So konnten in südostasiatischen Fledermäusen Viren identifiziert werden, die molekulargenetisch und serologisch eng mit SARS-CoV-2 verwandt sind (Wacharapluesadee et al., 2021). Zunächst wurde gezeigt, dass eine hohe Sequenzübereinstimmung für einen kurzen Abschnitt der RNA-abhängigen RNA-Polymerase zwischen SARS-CoV-2 und dem Fledermaus-CoV RaTG13 besteht. Daraufhin wurde das gesamte Genom von RaTG13 analysiert, für das sich dann eine sehr hohe Ähnlichkeit von 96,2 % zu SARS-CoV-2 ergab. Auch für das auf der Oberfläche des Virions lokalisierte S-Protein betrug die Übereinstimmung zwischen SARS-CoV-2 und RaTG13 noch 93,1 %. Demgegenüber stimmte dieses Oberflächenprotein zwischen SARS-CoV-2 und dem SARS-Virus von 2003 nur zu 75 % überein (Zhou et al., 2020a).

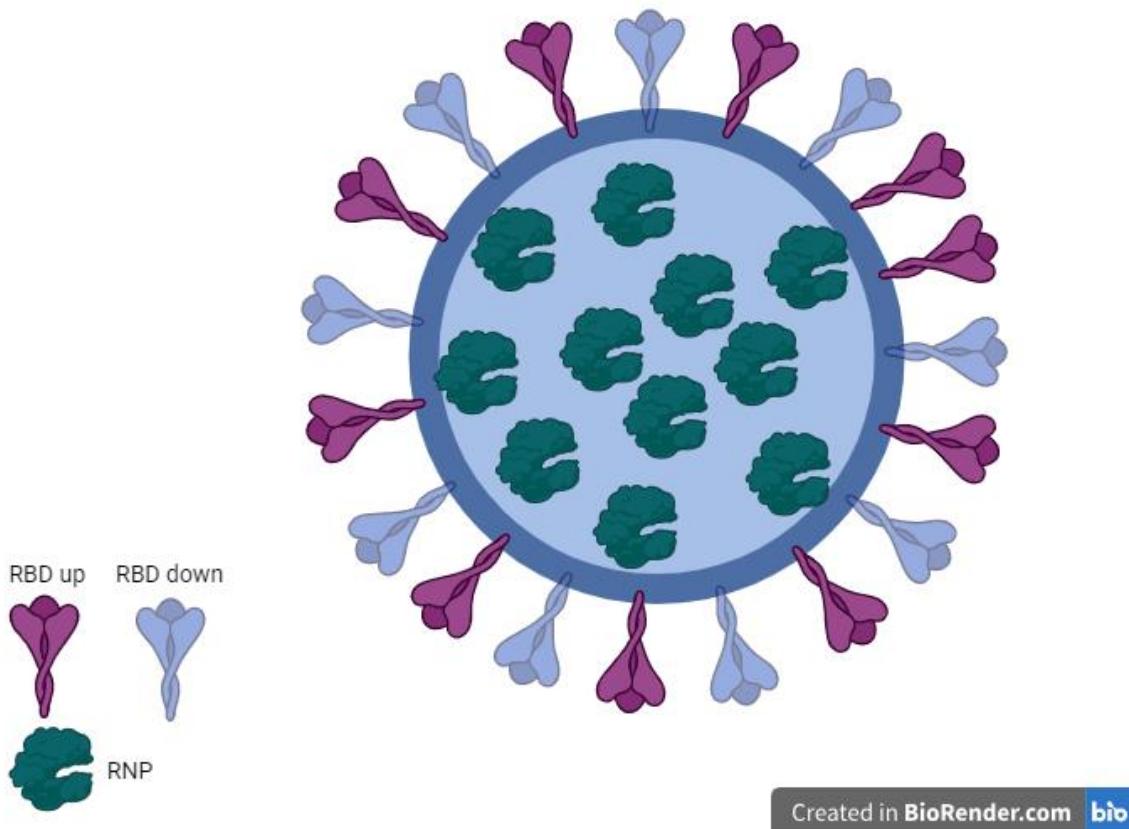
Bereits vor Ausbruch der Pandemie wurde in dem Lungensekret zweier verendeter malaiischer Pangoline (Schuppentiere, *Manis javanica*, (Liu et al., 2019)) ein CoV nachgewiesen, das nur wenig Ähnlichkeit zu den damals bekannten Viren aufwies, welche diese Tiere sonst infizieren (Zhang et al., 2020). Die Analyse dieses als Pangolin-CoV bezeichneten Virus ergab, dass das Gesamtgenom eine Übereinstimmung von 76,02 % mit SARS-CoV-2 aufwies. Eine genauere Untersuchung der zusammengesetzten Sequenzen zeigte, dass 22 von 36 Virusvarianten eine Aminosäureidentität von durchschnittlich 95,41 % mit SARS-CoV-2 aufwiesen, was die Vermutung unterstützt, dass diese Schuppentiere ein Vorläufervirus von SARS-CoV-2 trugen (Zhang et al., 2020). Also liegt es nahe, dass sich SARS-CoV-2 über mehrere Zwischenwirte so veränderte, dass eine produktive Infektion des Menschen möglich wurde. Abb. 2 zeigt die verschiedenen Genomsequenzen von SARS-CoV-2 sowie verschiedener Fledermaus- und Pangolin-CoVs im Vergleich.



**Abb. 2: Sequenzvergleich von SARS-CoV-2 zu zwei eng verwandten Coronaviren, die bei Schuppentieren (Pangolin) und Fledermäusen (Bat) vorkommen.** (A) Sequenztiefe der zu Pangolin-CoV neu zugeordneten Abschnitte. (B) Vergleich der Genomsequenzen von Pangolin-CoV und SARS-CoV-2 (Beta-CoV/Wuhan-Hu-1), Fledermaus-CoV RaTG13, Fledermaus-SARSr-CoV-21, Fledermaus-SARSr-CoV-45, Fledermaus-SARSr-CoV WIV1 und SARS-CoV BJ01 basierend auf jeweils dem gesamten Genom. (C) Vergleich der Genomorganisation von SARS-CoV-2, Pangolin-CoV und BatCoV RaTG13. Die Übereinstimmung der Nukleotid(DNA)- und Aminosäure(AA)-Sequenzen ist in Prozent angegeben (nach Zhang et al., 2020).

## 1.4 Ultrastruktur von SARS-CoV-2

Unter dem Kryo-Elektronenmikroskop zeigen sich die Virionen von SARS-CoV-2 als ellipsoide, kugelförmige, umhüllte Partikel, deren Durchmesser sich auf  $64,8 \pm 11$  für die kurze,  $85,9 \pm 9,4$  für die mittlere und  $96,6 \pm 11,8$  nm für die lange Achse belaufen (Angaben in Durchschnitt  $\pm$  Standardabweichung) (Yao et al., 2020). Durch die S-Proteine und die Ribonukleokapsid-Proteine wird dem Virus die charakterisierende Struktur verliehen. Durchschnittlich wurden  $26 \pm 15$  Präfusions-S-Proteine auf der Virusoberfläche gefunden. Diese kommen mit nach oben oder nach unten gerichteter Rezeptorbindungsdomäne (RBD up/ down) vor. Lediglich in der aufwärtsgerichteten Formation werden die Rezeptorbindungsstellen freigelegt und es kann zur Fusion mit der Wirtszelle kommen. Die durchschnittliche Anzahl der Ribonukleokapsid-Proteine im Inneren der Viruspartikel wurde auf 30-35 geschätzt (Yao et al., 2020). Abb. 3 zeigt die Ultrastruktur des SARS-CoV-2.



**Abb. 3: Ultrastruktur des SARS-CoV-2 schematisch dargestellt.** Die Präfusions-S-Proteine in der Rezeptor-Bindungs-Domäne-(RBD)-down-Formation, also mit nach unten orientierter RBD, sind hellblau dargestellt. Lila sind sie in der RBD-up-Formation, demnach mit nach oben orientierter Rezeptor-Bindungs-Domäne, abgebildet. Die Lipidhülle ist blau dargestellt und grün werden die Ribonukleokapsid-Proteine (RNPs) visualisiert (schematisch vereinfacht nach Yao et al., 2020, erstellt mit BioRender.com).

## 1.5 Übertragungswege von SARS-CoV-2

In der Atemluft des Menschen befinden sich Tröpfchen aus der Flüssigkeit der Lungenschleimhaut. Hierin können infektiöse Partikel aus dem Respirationstrakt enthalten sein. Beim Sprechen, Singen, Niesen, Husten, auch bereits beim Atmen, werden diese Partikel freigesetzt. Sie lassen sich nach Größe in Tröpfchen mit einem Durchmesser ab 5 µm und in Aerosole mit einem Durchmesser kleiner als 5 µm einteilen (Widmer und Tietz, 2005; Prather et al., 2020). Aerosole bleiben lange in der Luft bestehen und verteilen sich im Raum. Tröpfchen sinken aufgrund ihres etwas höheren Gewichts schneller zum Boden ab. Insbesondere bei hoher Luftfeuchtigkeit im Raum kann die Verdunstungszeit solcher Tröpfchen verlangsamt werden, sodass diese länger in der Luft angereichert bleiben und Erreger durch Inspiration von Mensch zu Mensch übertragen werden können (Ji et al., 2018; Haslbeck et al., 2010). Bei einer durchschnittlichen SARS-CoV-2-Konzentration von  $7 \times 10^6$  pro ml (Wölfel et al., 2020) erzeugt lautes Sprechen circa 1000 Virionen-haltige Tröpfchen, die sich länger als 8 min in der Raumluft halten können und somit zu neuen COVID-19-Infektionen führen könnten (Stadnytskyi et al., 2020). SARS-CoV-2 war in Aerosolen relativ lange stabil und infektiös. So verringerte sich die für eine Infektion von Zellkulturen nötige *Tissue Culture Infection Dose 50* innerhalb von 3 h lediglich leicht (van Doremalen et al., 2020).

Ein weiterer möglicher Übertragungsweg ist die Kontakt- bzw. Schmierübertragung. Solche Transmissionwege sind besonders bei Rotaviren (Anderson und Weber, 2004) und Noroviren (Koch et al., 2006) von Relevanz, die beide als Durchfallerreger bekannt sind. Bei SARS-CoV-2 sank die *Tissue Culture Infection Dose 50* pro µl innerhalb von 72 h auf Plastik- und Edelstahloberflächen sowie auf Kupfer und Pappe deutlich (van Doremalen et al., 2020). Andere Autoren berichten jedoch vom Nachweis infektiöser Viruspartikel auf Oberflächen aus Kunststoff, Edelstahl, Glas, Keramik und Holz sowie auf Latexhandschuhen und medizinischem Mundschutz, und zwar über einen Zeitraum von bis zu sieben Tagen (Liu et al., 2021). Im menschlichen Stuhl ließ sich SARS-CoV-2 ebenfalls nachweisen. Bei einigen Patienten wurde der Stuhl noch positiv auf SARS-CoV-2-RNA-getestet, während das Genom in den Atemwegsproben nicht mehr nachweisbar war (Xiao et al., 2020). Replikationsfähiges Virus wurde jedoch nur in wenigen Stuhlproben gefunden (Wang et al., 2020).

Es wurde ebenfalls über eine mögliche Übertragung über die Konjunktiva diskutiert. Allerdings konnte in einer Studie mit 63 Patienten nur ein Konjunktiva-Abstrich als sicher SARS-CoV-2-positiv identifiziert werden. Somit ist der Stellenwert dieses möglichen Übertragungsweges umstritten (Zhou et al., 2020b). Als Hauptübertragungsweg wird daher die Aufnahme der Viruspartikel über den Respirationstrakt durch Atmen, Sprechen, Husten, Niesen oder Singen angesehen (Wang et al., 2021a).

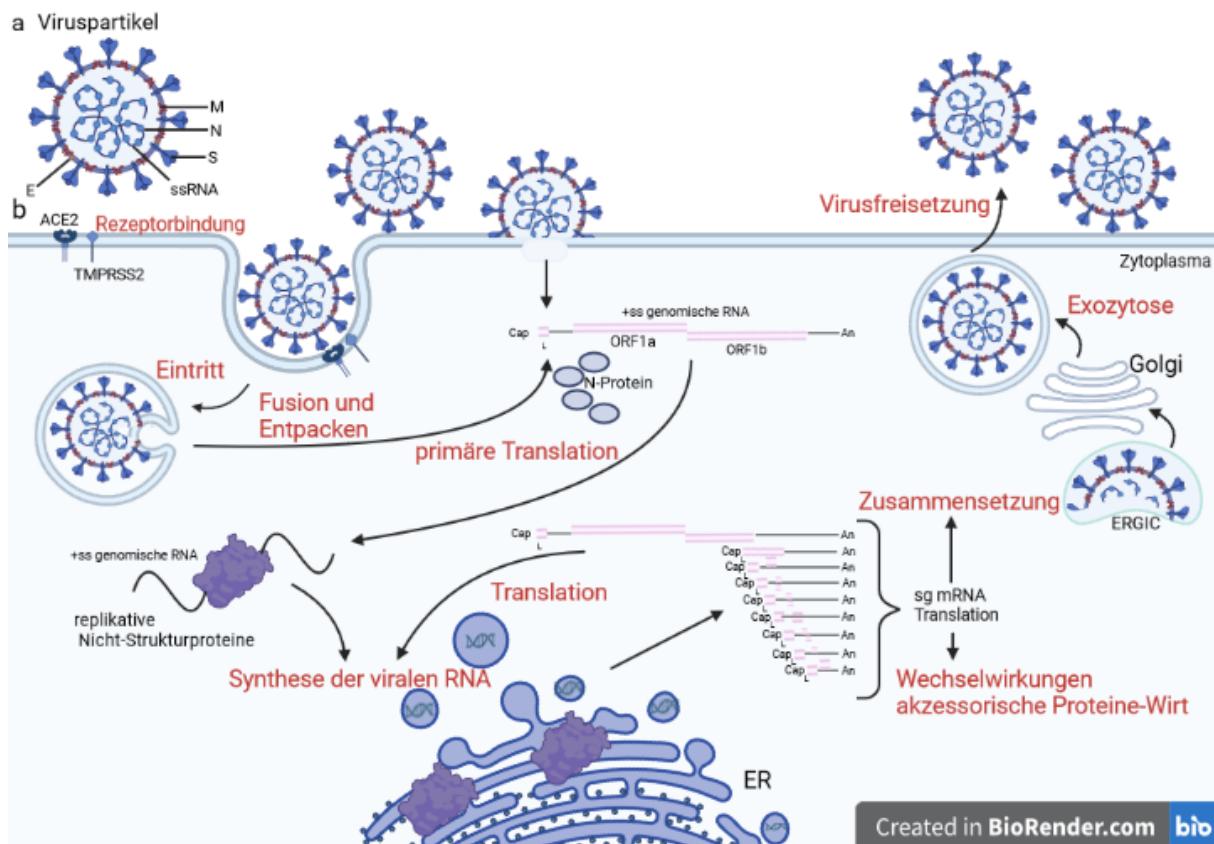
## 1.6 Eintritt von SARS-CoV-2 in die Wirtszelle und virale Replikation

Für den Eintritt von SARS-CoV-2 in die Wirtszelle spielt das auf der Virusoberfläche vorhandene S-Protein die entscheidende Rolle. Es lässt sich in die S1- und die S2-Untereinheit ein teilen. Durch zelluläre Proteasen wird das S-Protein an der S1/S2- und der S'-Position gespalten, sodass die Fusion der viralen und zellulären Membran ermöglicht wird, die durch die S2-Untereinheit maßgeblich beeinflusst wird (Hoffmann et al., 2020). Experimentell erzeugte T-Zellen, die nach Transfektion das virale S-Protein exprimieren, können an das zelleigene Angiotensin-Converting-Enzyme-2 (ACE2) binden und somit die Zell-Zell-Fusion antreiben. Das ACE2-Protein spielt also als Wechselwirkungspartner des S-Proteins für den viralen Zelleintritt eine wichtige Rolle (Li et al., 2003). Des Weiteren ist die zelleigene transmembrane Serinprotease 2 (TMPRSS2) für die Fusion von hoher Bedeutung. TMPRSS2 muss auf der Zielzelle exprimiert werden, damit das S-Protein aktiviert werden kann (Matsuyama et al., 2010). Die Anwesenheit von TMPRSS2 ermöglicht eine Zellfusion unabhängig von Cathepsin L und anderen sauren Proteasen (Shulla et al., 2011).

In Nasenabstrichen fand sich eine höhere Viruslast als in Rachenabstrichen (Zhou et al., 2020a), was nahelegt, dass das Nasenepithel die Eintrittspforte für das Virus ist. In weiterführenden Untersuchungen zur Expressionsrate von ACE2 und TMPRSS2 in verschiedenen Organen und Zellverbänden sollten Rückschlüsse auf den Zelltropismus von SARS-CoV-2 gezogen werden. Die ACE2-Expression war in allen Geweben relativ schwach, die Protease TMPRSS2 wurde sowohl stärker als auch breiter gestreut exprimiert. Die Anwesenheit von ACE2 scheint daher eher eine Limitation für den initialen Zellbefall durch das Virus darzustellen. In Zellen des Respirationstrakts, der Cornea, des Ösophagus, des Ileums, des Colon, der Gallenblase und des Hauptgallengangs sind ACE2 und TMPRSS2 gleichzeitig auf der Zelloberfläche vorhanden. Bei genauerer Untersuchung der Atemwegszellen zeigte sich die höchste Expression von ACE2 in den Becher- und Flimmerzellen im Nasenepithel. Die erhöhte Anwesenheit der unterstützenden Rezeptoren im Nasenepithel könnte also auf eine höhere Wahrscheinlichkeit der Übertragung auf diesem Wege hindeuten (Sungnak et al., 2020).

Nach Fusion von Zellmembran und Virus wird das virale Genom aus Endosomen in das Cytoplasma freigesetzt und an Ribosomen translatiert, sodass neben Strukturproteinen auch die RNA-abhängige RNA-Polymerase entsteht. Diese bewerkstelligt die Vervielfältigung der viralen RNAs innerhalb von durch Membranen geschützten Kompartimenten (Replikationskomplexe). Im Anschluss daran werden die so entstandenen RNA-Genome in die

Virusproteinhüllen integriert und die viralen Partikel durch Knospung aus der Zelle freigesetzt (Ueffing et al., 2020). In Abb. 4 ist der Replikationsweg von SARS-CoV-2 schematisch dargestellt.



**Abb. 4: Aufbau und Replikationszyklus von SARS-CoV-2.** In Teil A ist ein Virion mit einzelsträngiger positiv orientierter RNA (ssRNA) und mit den Strukturproteinen Spike (S), Hülle (E), Membran (M) und Nukleokapsid (N) dargestellt. In Teil B wird der Replikationsweg des Virus beschrieben. Nach Fusion des Virions mit der Zelloberfläche über den ACE2-Rezeptor und unter Einfluss der Transmembran-Serinprotease TMPRSS2 werden die Leseraster ORF1a und ORF1b translatiert. Hierbei entstehende Nicht-Strukturproteine dienen als viraler Replikations- und Transkriptionskomplex. Weitere Replikationsorganellen wie Doppelmembranvesikel, gewundene Membranen und kleine offene Doppelmembrankügelchen bilden eine schützende Umgebung für die virale genomische RNA-Replikation und Transkription subgenomischer mRNAs (sg-mRNAs). Die viralen Proteine werden im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat zu neuen Viruspartikeln fertiggestellt und nach der Knospung im Lumen der sekretorischen Vesikel über Exozytose aus der Zelle abgegeben (Abb. nach V'kovski et al., 2021, erstellt mit BioRender.com).

## 1.7 Entstehung der Variants of Concern

Durch genetische Mutationen des ursprünglichen Virus entstehen neue Varianten. Schon beim Ausbruch des ersten SARS-CoV führte eine Mutation des S-Gens zur Entstehung einer dominierenden Variante (Sui et al., 2008). Ein wichtiger Mechanismus ist der Gendrift. Darunter versteht man Änderungen der Nukleotidsequenz, die durch Fehler während der viralen Replikation entstehen. Ebenso ist der Genshift möglich, der die Rekombination der Genome zweier verschiedener Stämme beschreibt, die beide gleichzeitig eine Wirtszelle infiziert haben (Greenbaum und Ghedin, 2015). Die Ausbreitung solcher Mutanten wird unter anderem durch

Populationsdynamik und positive Selektion beeinflusst, falls die Mutation einen Vorteil in Bezug auf die Übertragbarkeit bietet (Volz et al., 2021).

Die SARS-CoV-2-Varianten wurden zum Zeitpunkt ihres Auftretens je nach Pathogenität als *Variants of interest*, *Variants under monitoring* und *Variants of concern* (VOC) bezeichnet (Choi und Smith, 2021). Unter die letzte Kategorie fallen die Mutanten Alpha, Beta, Gamma und Delta (Choi und Smith, 2021) sowie Omikron (Gao et al., 2021).

Die Alpha-Variante B.1.1.7 wurde im Dezember 2020 im Vereinigten Königreich zum ersten Mal nachgewiesen (Public Health England, 2020). Bei dieser Variante betrafen acht von 17 Mutationen das S-Gen (Davies et al., 2021). Einige dieser Mutationen sorgten für eine verbesserte Virusübertragung (Davies et al., 2021; Peacock et al., 2021; Starr et al., 2020). Ebenfalls im Dezember 2020 trat die Beta-Variante B.1.351 erstmals in Südafrika auf (Tegally et al., 2021). Bei dieser Variante befanden sich neun Mutationen innerhalb des S-Gens. Auch hier wurde eine erhöhte Bindungsaffinität festgestellt (Davies et al., 2021; Starr et al., 2020). Die Gamma-Variante P.1 wurde zunächst bei Reiserückkehrern aus Brasilien im Januar 2021 festgestellt (Fujino et al., 2021). Bei dieser Variante waren zehn Mutationen im S-Gen zu finden (Faria et al., 2021). Darunter gab es Überschneidungen mit den Mutationen der Alpha- und Beta-Varianten (Davies et al., 2021; Starr et al., 2020).

Die Omikron-Variante B.1.1.529 trat im November 2021 in Südafrika zum ersten Mal auf und wurde nur kurze Zeit später von der Weltgesundheitsorganisation als VOC klassifiziert (Araf et al., 2022; Torjesen, 2021). Im S-Gen dieser Variante fanden sich mindestens 32 Mutationen, sie war deutlich ansteckender als die bereits aufgetretenen VOC (Gao et al., 2021). Seit Anfang 2022 zirkulierten auch diverse rekombinante Stämme mit genetischen Anteilen verschiedener Omikron-Linien (Bobay et al., 2020) sowie von Omikron und Delta (Bolze et al., 2022). Besonders bei immunsupprimierten Patienten besteht das Risiko einer anhaltenden Infektion (Corey et al., 2021), sodass neue Mutationen und somit Varianten auftreten können (Avanzato et al., 2020; Truong et al., 2021; Kemp et al., 2021). Vermutlich ist dadurch diese VOC entstanden (Corey et al., 2021).

## 1.8 Symptomatik und Verlauf der Coronavirus-Erkrankung

Bei der Infektion mit SARS-CoV-2 zeigten sich bei etwa 81 % der Patienten milde Symptome. Demgegenüber wiesen 14 % der Infizierten einen schwereren und etwa 5 % einen kritischen Krankheitsverlauf auf (Wu und McGoogan, 2020). Dies gilt für eine noch nicht geimpfte, immunologisch naive Bevölkerung. Als häufigste Akutsymptome klagten die Betroffenen über Husten, Fieber und Atemnot. In mehreren Studien wurde berichtet, dass auch Patienten mit

milden Symptomen unter Störungen des Geruchs- und Geschmackssinns leiden (Lechien et al., 2020; Tong et al., 2020; Yan et al., 2020). Zudem deuteten Spätfolgen und Organschäden der Patienten auf Befall von Endothel, Nieren, Herz, Leber und sogar des Zentralnervensystems oder auf eine lokalisierte Immunreaktion hin (Yang et al., 2020; Sardu et al., 2020). In einer italienischen Studie, in der COVID-19-Genesene untersucht wurden, klagten 53,1 % der Befragten noch über Müdigkeit, 43,4 % über Atemnot, 27,3 % über Gelenkschmerzen und 21,7 % über Brustschmerzen (Carfi et al., 2020).

Die SARS-CoV-2-Infektion manifestierte sich zunächst hauptsächlich im Respirationstrakt. Hierbei zeigte sich, dass besonders ältere und bereits vorerkrankte Patienten zu einem schweren Verlauf mit gegebenenfalls notwendig werdender Beatmungspflicht neigen (Grasselli et al., 2020). Die Symptome konnten über trockenen Husten bis zu einem *Acute respiratory distress syndrome* führen. Dies war eine schwere, oft lebensbedrohliche Erkrankung, bei der es nach akutem Beginn innerhalb von sieben Tagen zu einer Hypoxämie und bilateralen Lungeninfiltraten kam (Diamond et al., 2021). Neben den die Atemwege betreffenden Symptomen traten in dieser Patientengruppe auch neurologische Manifestationen wie akute zerebrovaskuläre Erkrankungen, Bewusstseinsstörungen und Skelettmuskelaffektionen auf (Mao et al., 2020a). In einigen Fällen zeigte eine Infektion mit SARS-CoV-2 auch Auswirkungen auf den Gastrointestinaltrakt. Typische Symptome waren dann Appetitlosigkeit, Übelkeit, abdominelle Schmerzen, Durchfall und Erbrechen in Verbindung mit Leberfunktionsstörungen (Mao et al., 2020b). Bei einer SARS-CoV-2-Infektion kann es zu einer Verschlechterung der Herzleistung kommen. In der Nachuntersuchung wurde bei Patienten, deren Zustand sich verschlechterte, zu 80 % eine akute Rechtsherzinsuffizienz, bei 20 % jedoch auch eine akute Linksherzinsuffizienz festgestellt (Puntmann et al., 2020; Szekely et al., 2020). Bei an COVID-19 Erkrankten trat zudem eine Hypokaliämie auf (Chen et al., 2020). Bei schweren Infektionen kann es zu einer Reihe kardiovaskulärer Erkrankungen kommen, bis hin zum akuten Myokardinfarkt (Long et al., 2020a). Zudem stellte eine Infektion mit SARS-CoV-2 durch die gesteigerte Gerinnungsaktivität ein erhöhtes Risiko für Thrombembolien, Lungenarterienembolien sowie zerebrovaskuläre Embolien dar (Kollias et al., 2020). Vor allem bei schwer an COVID-19 Erkrankten und beatmungspflichtigen Patienten konnte eine Nierenfunktionsstörung bis hin zu Nierenversagen mit Dialysepflicht oder sogar die Notwendigkeit einer späteren Nierentransplantation beobachtet werden (Hirsch et al., 2020).

## 1.9 Risikofaktoren für einen schweren Krankheitsverlauf

Obgleich Männer und Frauen ungefähr gleich häufig an COVID-19 erkrankten, konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass unter den beatmungspflichtigen Patienten der Anteil

männlicher Individuen deutlich höher war bei weiblichen Erkrankten (Williamson et al., 2020). Teilt man die Gruppe der Untersuchten in nicht beatmungspflichtig und beatmungspflichtig ein, so fanden sich in der Gruppe der nicht beatmungspflichtigen Patienten 49 % Männer, in der beatmungspflichtigen Gruppe jedoch 66 % männliche Personen. Ein direkter Vergleich der Wahrscheinlichkeit, auf eine Beatmung angewiesen zu sein, ergab 12 % für Frauen und 22 % für Männer (Karagiannidis et al., 2020).

Neben dem Geschlecht hatten auch Vorerkrankungen Einfluss auf die Schwere des COVID-19-Verlaufs. Die am häufigsten beobachteten Komorbiditäten waren Hypertonie mit 56 % (5575 von 10.021 Patienten), Diabetes mit 28 % (2791 Patienten), Herzrhythmusstörungen mit 27 % (2699 Patienten), Nierenversagen mit 23 % (2287 Patienten), Herzinsuffizienz mit 20 % (1963 Patienten) und chronisch obstruktive Lungenerkrankung mit 14 % (1358 Patienten). Diese Komorbiditäten traten bei beatmungspflichtigen Patienten häufiger auf (Karagiannidis et al., 2020; Kirtipal et al., 2020). Die Letalität bei mechanisch beatmeten Patienten lag bei 53 %, während nicht beatmungspflichtige Patienten nur eine Letalität von 16 % aufwiesen (Karagiannidis et al., 2020). In einer weiteren groß angelegten Studie wurden Komorbiditäten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes, Atemwegserkrankungen (einschließlich schwerem Asthma), Adipositas, hämatologische Malignome in der Vorgeschichte oder kürzlich aufgetretene andere Krebserkrankungen, Nieren-, Leber- und neurologische Erkrankungen sowie Autoimmunerkrankungen als Risikofaktoren beschrieben (Williamson et al., 2020). Diese Ergebnisse bestätigten die Resultate einer relativ früh nach Ausbruch der Krankheit durchgeführten Studie, die ebenfalls Vorerkrankungen wie Diabetes, Bluthochdruck und Herz-Kreislauferkrankungen als Risikofaktoren feststellen konnte (Huang et al., 2020).

Das Alter der Patienten zeigte sich als entscheidend für die Schwere der Infektion. In der Altersgruppe zwischen 18 und 59 Jahren verstarben 28 % der beatmeten Patienten, im Alter von 60 - 69 waren dies 46 %, bei beatmungspflichtigen Patienten zwischen 70 und 79 Jahren lag die Letalität bei 63 %, ab einem Alter von 80 Jahren bei 72 % (Karagiannidis et al., 2020). Ein höheres Risiko, an COVID-19 zu erkranken, wurde bei medizinischem Personal beobachtet (Nguyen et al., 2020). Schweren Verläufe traten auch bei Patienten ohne bekannte Vorerkrankung auf (Huang et al., 2020).

## 1.10 Prävention und Prophylaxe der SARS-CoV-2-Infektion

Zur Vermeidung einer SARS-CoV-2-Infektion konnten Hygienemaßnahmen ergriffen werden. Von großer Effektivität war das Tragen von Schutzmasken, insbesondere *filtering face pieces* (FFP2) Masken (Prather et al., 2020). Sowohl FFP2-Masken als auch medizinische Operations-Masken konnten die Partikelemission beim Sprechen um 90 % und beim Husten um 74

% senken (Asadi et al., 2020). Da Aerosole in nicht belüfteten Innenräumen sehr lange verbleiben können, war das Lüften bzw. der Einbau von Luftfiltern besonders in Verbindung mit dem Tragen von hochwertigen Schutzmasken ein weiteres Mittel zur effektiven Infektionsprophylaxe (Lelieveld et al., 2020). Auch das Abstandthalten stellte einen Pfeiler in der Prävention dar, denn gerade größere Tröpfchen neigen im Radius von 1,5 m zum Absinken (Liu et al., 2017). SARS-CoV-2 blieb auch in Aerosolen für mindestens drei Stunden infektiös (van Doremalen et al., 2020). Auf Schutzmasken sollte daher trotz Abstand nicht verzichtet werden.

Die Händehygiene spielt im Bereich der Übertragung infektiöser Krankheiten eine übergeordnete Rolle. Schon durch einfaches Waschen der Hände mit Wasser und Seife kann ein Großteil der Mikroorganismen von der Haut entfernt werden. Das Waschen der Hände bildet außerdem die Grundlage zur wirksamen Desinfektion der Hände, da in Sekret oder Schmutz eingebettete Erreger schlechter inaktiviert werden können (Brunke et al., 2021).

Aufgrund dieser Säulen in der Prävention wurde das sogenannte „AHA+L-Prinzip“ vorgeschlagen, damit die Verbreitung des Virus eingedämmt werden konnte. Hierbei steht das Akronym für Abstand halten, Hygieneregeln beachten und das Tragen eines Atemschutzes. Die drei Grundpfeiler wurden durch das Lüften ergänzt, damit die in Innenräumen erhöhte Infektionsgefahr gezielt reduziert werden konnte. Auch die Nutzung einer Smartphone-App, mit der Infektionsketten leichter verfolgt und frühzeitig unterbrochen werden sollten, wurde als wirksames Mittel der Pandemieindämmung gesehen (Bundesregierung, 2021).

Bereits bis Anfang 2021 wurden in der Europäischen Union vier Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 zugelassen. Am 21.12.2020 machte der mRNA-Impfstoff Comirnaty der Firma BioNTech Manufacturing GmbH den Anfang (Polack et al., 2020); das Spikevax-Vakzin der Firma Moderna Biotech aus Spanien folgte am 06.01.2021, ebenfalls ein Impfstoff aus synthetischer Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) (Baden et al., 2021). Am 29.01. 2021 wurde der Impfstoff Vaxzevria der Firma AstraZeneca AB, Schweden, zugelassen (Ramasamy et al., 2021) und am 11.03.2021 folgte schließlich die Zulassung des COVID-19 Vaccine Janssen von der Firma Janssen-Cilag International NV (Sadoff et al., 2021). Die zwei letztgenannten Impfstoffe waren Vektorimpfstoffe. Diese basierten auf der gezielten Nutzung adenoviraler Vektoren, die so verändert werden, dass sie nach der Verimpfung in den Muskelzellen zur Produktion des SARS-CoV-2-S-Proteins führen (Poland et al., 2020).

Diese Technologie bietet die Vorteile, dass eine hohe Zahl an Vektorvarianten zur Verfügung steht und ein großes Maß an Wissen über ihre Funktion und Wirkweise vorliegt. Daher war eine gute Antigenerzeugung, Zielsteuerung und Verarbeitung möglich. Da durch die Behandlung mit vektorbasierten Impfstoffen in der Zielzelle die Nachahmung einer natürlichen

Infektion ausgelöst und somit eine starke Immunreaktion hervorgerufen wird, können Vektorimpfstoffe ohne Adjuvantien verabreicht werden. Des Weiteren wird infolge der Replikationsdefizienz eine hohe Sicherheit der Vektorimpfstoffe gewährleistet werden. Durch optimierte Produktionsprozesse können moderne Vektorimpfstoffe zudem mit hoher Ausbeute hergestellt werden. Allerdings könnten vektorbasierte Impfstoffe Nebenwirkungen aufweisen, wie etwa eine Integration in das Wirtsgenom oder eine anhaltende Replikation von replikationskompetenten Vakzinrevertanten. Dies wurde allerdings bei diesen Impfstoffen nicht beobachtet. Zudem ist die Herstellung solcher Impfstoffe kostenintensiv (Rauch et al., 2018).

Die verwendeten mRNA-Impfstoffe basieren auf nicht-replizierender mRNA, die in der Wirtszelle translatiert wird. Gegen das gebildete Protein wird eine spezifische Immunantwort ausgelöst (Iavarone et al., 2017). Die nicht-replizierenden mRNA-Impfstoffe werden von einer linearisierten Plasmid-DNA mit einer rekombinanten RNA-Polymerase und Nukleosidtriphosphaten als Hauptbestandteilen synthetisiert. Am 5'- bzw. 3'-Ende werden zusätzlich eine Cap-Struktur bzw. ein Poly-A-Schwanz der mRNA angehängt. Die Herstellung der selbst-amplifizierenden mRNA-Impfstoffe basiert auf Funktionen von Positivstrang-RNA-Viren. Hier werden nur die für die RNA-Replikation zuständigen Bereiche belassen, die strukturellen Genomsequenzen jedoch durch das gewünschte Gen ersetzt. Die resultierenden Genome werden als Replikons bezeichnet (Zhang et al., 2019). Obwohl die Instabilität der mRNA in der Vergangenheit ein großes Hindernis bei deren Anwendung darstellte, konnte durch Komplexbildung mit effizienten Trägern ein Schutz vor Abbau der RNA durch ubiquitär vorkommende Ribonukleaseen gewährleistet werden. Da diese Art von Impfstoff im Herstellungsprozess aufgrund der in-vitro-Systeme ohne Amplifikation in Bakterien oder Zellkulturen auskommt, ist dieser besonders gut zu überwachen (Rauch et al., 2018).

Am 20.12.2021 wurde Nuvaxovid, einem proteinbasierten Impfstoff, durch die Europäische Kommission die bedingte Marktzulassung erteilt (Parums, 2022). Dieser Impfstoff besteht aus der Kombination des rekombinant hergestellten S-Proteins von SARS-CoV-2 in voller Länge mit einem Saponin-basierten Adjuvans zur Verstärkung der Immunantwort (Tian et al., 2021). Dieser ist ein Nanopartikel-Impfstoff (Bangaru et al., 2020), der sowohl eine T- als auch B-Zell-Antwort induziert (Tian et al., 2021; Keech et al., 2020). Zur Herstellung rekombinanter Impfstoffe können *Escherichia coli* oder verschiedene Hefen, Insekten- und Säugetierzellen, aber auch auf pflanzliche Zellen verwendet werden (Pollet et al., 2021). Da rekombinante Proteine allein eine schwache Immunantwort auslösen, werden sie mit Adjuvantien kombiniert. Diese aktivieren am Ort der Applikation die angeborene Immunantwort, die wiederum die adaptive Immunantwort verstärkt. Die Antigenpräsentation für die CD4+ T-Zellen wird verbessert, wodurch auch B-Zellen und CD8+ T-Zellen mobilisiert werden (Pollet et al., 2021).

## 1.11 Therapie der SARS-CoV-2-Infektion

Bei milden COVID-19-Fällen genügt meist eine symptomatische, unterstützende Therapie, ggf. ergänzt durch Verlaufskontrollen, damit bei einer Verschlechterung eine stationäre Therapie eingeleitet werden kann.

Während bestimmter Pandemiephasen sollte besonders bei Risikopatienten eine prophylaktische Therapie mit monoklonalen Antikörpern in Betracht gezogen werden (Ständiger Arbeitskreis der Kompetenz- und Behandlungszentren für Krankheiten durch hochpathogene Erreger, 2020). Bei ambulanten Risikopatienten führte die Injektion einer Kombination neutralisierender monoklonaler Antikörper (2,8 mg Bamlanivimab und 2,8 mg Etesevimab) zu einer deutlichen Reduktion der Viruslast und zur Vermeidung von Todesfällen (Dougan et al., 2021). Auch in anderen Studien wurde eine Reduktion der Viruslast durch Antikörper-Präparate beobachtet (Weinreich et al., 2021). Bei den Varianten B1.351 (Zhou et al., 2021) und P.1 (Chen et al., 2021) konnte jedoch schon zum Zeitpunkt der Studie eine Resistenz gegenüber mehreren monoklonalen Antikörpern, darunter auch Bamlanivimab/Etesevimab beobachtet werden (Birmingham et al., 2012; Araf et al., 2022). Wegen der verbreiteten Resistenz bei den neuen Virusvarianten sind neutralisierende Antikörper nicht mehr in Gebrauch (Hoffmann et al., 2021; Wang et al., 2021b; Wang et al., 2021c;).

Remdesivir, ein Inhibitor der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase, der auch gegen MERS-CoV inhibitorische Aktivität zeigte (Sheahan et al., 2020), hatte einen positiven Effekt auf die Genesung von COVID-19-Patienten (Beigel et al., 2020), war aber lange Zeit nur begrenzt verfügbar und wegen der intravenösen Anwendung für die ambulante Therapie ungeeignet. Paxlovid ist eine Kombination aus Nirmatrelvir, das die Protease 3CL von SARS-CoV-2 hemmt, und Ritonavir, das den Abbau von Nirmatrelvir verzögert (Fishbane et al., 2022). In einer Zwischenanalyse reduzierte Paxlovid die COVID-19-bedingten Krankenhausseinweisungen und Todesfälle im Vergleich zur Placebo-Gruppe um 89 % (Mahase, 2021). Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten wurden jedoch beobachtet, weswegen die Gabe von Paxlovid streng überwacht werden muss (Fishbane et al., 2022). Des Weiteren wurde festgestellt, dass Kortikosteroide wie Dexamethason und Betamethason die Hauptprotease (*main protease*), einen wichtigen Bestandteil der viralen Replikation, inhibieren und somit möglicherweise auch antivirale Funktion haben könnten (Ghosh et al., 2020). Kortikosteroide hemmen die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und aktivieren antiinflammatorische Gene, so dass der Entzündungsprozess abgeschwächt wird (Barnes, 2006).

Bei einer stationären COVID-19-Therapie sollen neben der Überwachung der Vital-Parameter eine restriktive Flüssigkeitstherapie bzw. Ernährungsoptimierung, eine Thromboseprophylaxe,

regelmäßige Kontrollen der Entzündungswerte, Bildgebung, die Untersuchung auf Sekundärinfektionen und gegebenenfalls eine mikrobiologische Diagnostik über Blutkulturen durchgeführt werden. Verläuft die Erkrankung schwer, so wird eine Sauerstoffgabe und Lagerung auf dem Bauch im frühen Stadium empfohlen. Bei Bedarf sollte die Extrakorporale Membran-Oxygenierung durchgeführt werden. Außerdem stellt die Prävention von Thrombembolien, Sekundärinfektionen und der Sepsis eine wichtige Säule in der COVID-19-Therapie dar (Ständiger Arbeitskreis der Kompetenz- und Behandlungszentren für Krankheiten durch hochpathogene Erreger, 2020).

## 1.12 Diagnostik der Infektion mit SARS-CoV-2

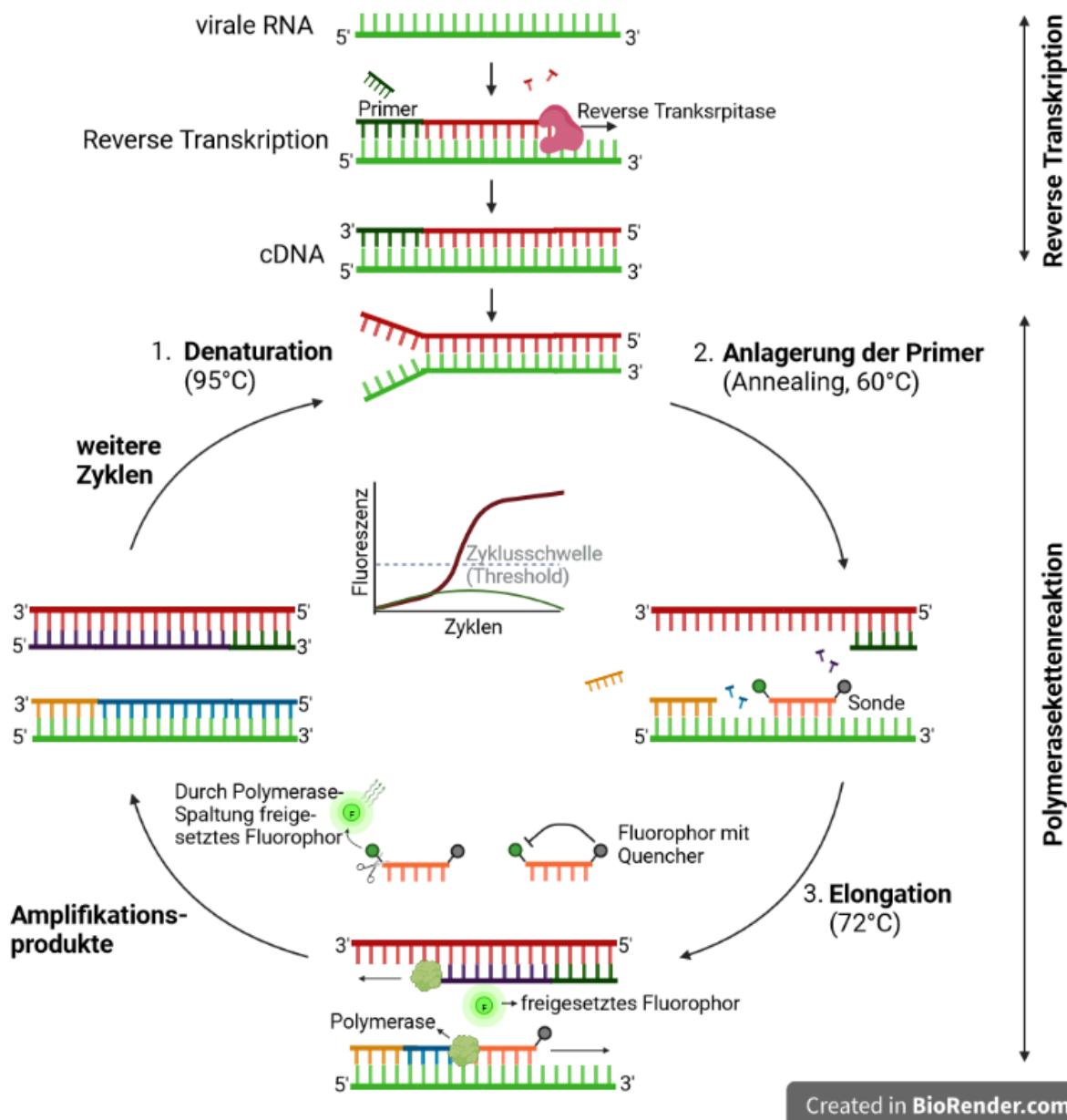
In der SARS-CoV-2-Pandemie und auch danach ist eine schnelle und zuverlässige Diagnostik von COVID-19 von herausragender Bedeutung. Für die Akutdiagnostik ist nur der direkte Erregernachweis geeignet. Durch die Antikörper-Diagnostik können zurückliegende Infektionen oder Impfungen nachgewiesen werden.

### 1.12.1 Direkter Nachweis der viralen RNA

Molekularbiologische Methoden wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellen ein schnelles, hochgradig sensitives und spezifisches diagnostisches Verfahren für den Nachweis des Virusgenoms dar (van Beek et al., 2020). Da Coronaviren ein RNA-Genom haben, muss der PCR eine Reverse Transkription vorgeschaltet werden, so dass sich eine Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion ergibt (RT-PCR). Diese Methode ermöglichte bereits unmittelbar nach der Erstbeschreibung von SARS-CoV und MERS-CoV die Diagnostik der durch diese Viren verursachten Erkrankungen (Drosten et al., 2003; Corman et al., 2012a).

Die von Higuchi et al. (1992) entwickelte Echtzeit-(*real time*)-PCR weist im Vergleich zur regulären PCR den Vorteil auf, dass die Zunahme der künstlich entstehenden DNA-Menge während der Durchführung der PCR direkt gemessen werden kann. Dafür werden unter anderem farbstoffmarkierte Sonden verwendet, wodurch eine Quantifizierung möglich ist (Kubista et al., 2006). Für den Nachweis werden anhand der viralen Genomsequenz spezifische Oligonukleotide (*Primer*) definiert. Diese binden an einen konservierten Abschnitt des Virusgenoms. Die virale RNA wird zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Danach wird der von den Bindungsstellen für die *Primer* flankierte DNA-Bereich durch die Polymerase vervielfältigt, ohne dass das Reaktionsgefäß noch einmal geöffnet werden muss (*one-step RT-PCR*). Zunächst wird die reverse Transkriptase für mehrere min bei 95 °C inaktiviert und gleichzeitig die Polymerase aktiviert. Für die eigentliche PCR wird der DNA-Doppelstrang dann kurz auf 95 °C erhitzt, sodass er aufbricht (Schmelzen). Die komplementären *Primer* können sich nach Absenkung der Temperatur

anlagern (*Annealing*) und die Polymerase kann die Desoxynukleotidtriphosphate einbauen (*Elongation*). Diese Schritte bilden einen Zyklus, der 35 bis 40 Mal wiederholt wird. Der Spezifitätsnachweis gelingt durch farbstoffmarkierte Taqman-Sonden. Werden diese beim Einbau der zugegebenen Nukleotide aus der DNA verdrängt und abgebaut, so wird der Farbstoff freigesetzt und kann durch definierte Lichtimpulse angeregt werden, sodass dieser Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Dieses Signal kann in Echtzeit gemessen werden. Abb. 5 zeigt eine schematische Darstellung der RT-PCR.



**Abb. 5: Schematische Abbildung der Schritte einer RT-PCR.** Zunächst wird die virale RNA durch die Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) übersetzt. Für die Amplifikation wird diese cDNA zunächst de-naturiert (1), woraufhin sich Primer und Sonde anlagern können, das sogenannte Annealing (2). Die Polymerase kann nun die Desoxynukleotidtriphosphate einbauen (3). Anschließend werden durch die DNA-Polymerase weitere Kopien erstellt (4) (nach Afzal, 2020, erstellt mit BioRender.com).

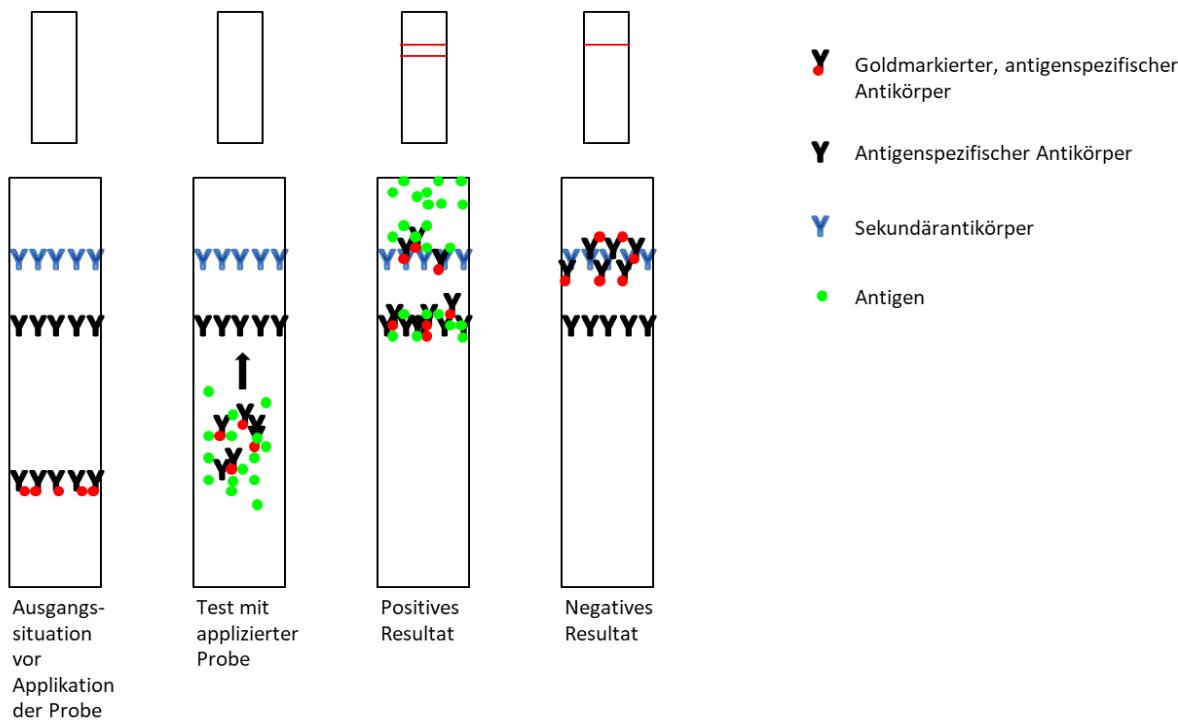
Der Zyklus, ab dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert (*threshold*) übersteigt, wird als *cycle threshold* (Ct-Wert) bezeichnet und angegeben. Aus dem Ct-Wert kann auf die in der Probe vorhanden Menge an viralen Genomäquivalenten in semiquantitativer Weise zurückgeschlossen werden. Ein niedriger Ct-Wert spricht für eine hohe Viruslast, während ein hoher Ct-Wert bei niedrigen Viruslasten beobachtet wird. Bei einem Ct-Wert von unter 40 gilt der PCR-Test in der Regel als positiv (Heid et al., 1996; Wong und Medrano, 2005; Sethuraman et al., 2020; Fuchs et al., 2021; Lantz et al., 1994; Corman et al., 2012b). Die Spezifität der SARS-CoV-2-RT-PCR beträgt bis zu 100 % (Sethuraman et al., 2020). Die Sensitivität wird unter klinischen Bedingungen auf mindestens 70 % geschätzt (Woloshin et al., 2020).

Anhand der Aneinanderlagerung (*Alignment*) der in der GenBank des National Centers for Biological Information verfügbaren CoV-Sequenzen wurden bereits kurz nach den ersten Fallberichten *Primer* und Sonden zum Nachweis des E-Protein-Gens, des N-Protein-Gens, des S-Protein-Gens und des Gens der RNA-abhängigen RNA-Polymerase definiert und zur Verfügung gestellt, obgleich noch keine detaillierten Kenntnisse über das SARS-CoV-2-Genom vorlagen (Corman et al., 2020; Sethuraman et al., 2020). Die *Primer* und Sonden zum Nachweis des E- und N-Gens von SARS-CoV-2 haben sich in der virologischen Diagnostik bewährt. Hingegen sind die Bereiche, die einem erhöhten Mutationsdruck unterliegen, wie beispielsweise das S-Gen, für die diagnostische RT-PCR nur bedingt geeignet und dürfen keinesfalls als einzige Zielregion der PCR verwendet werden. So wurden die ersten VOC, die etliche Mutationen des S-Gens tragen, durch Ausfälle der S-spezifischen RT-RCR entdeckt (Hilti et al., 2024). Diese Besonderheiten kann man allerdings für die Virusvarianten-spezifische Diagnostik nutzen, indem Sonden definiert werden, welche die Anwesenheit einer Schlüsselmutation durch Änderungen der Schmelztemperatur anzeigen. Entsprechende Sonden wurden rasch von der Firma TibMolbiol (Berlin) zur Verfügung gestellt, sodass eine schnelle Identifikation verschiedener VOC ermöglicht wurde.

Neben der RT-PCR können auch alternative Verfahren zum Nachweis des viralen Genoms eingesetzt werden, wie die Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikations-Technik. Dieses im Vergleich zur RT-PCR etwas weniger sensitive Verfahren hat den Vorteil, dass es weitgehend unabhängig von Geräten durchgeführt und das Ergebnis sogar mit bloßem Auge abgelesen werden kann. Zudem bedarf es keiner vorherigen Extraktion der Nukleinsäuren, sondern erlaubt sogar eine direkte Testung unmittelbar nach Abstrichnahme (Anastasiou et al., 2021).

### 1.12.2 Direkter Nachweis viraler Proteine

In der Vor-Ort-Testung direkt am Patienten (*point of care test, POCT*) werden vor allem sogenannte *lateral-flow-Tests* eingesetzt.



**Abb. 6: Funktionsprinzip eines Antigen-Schnelltests.** Die linke, erste Zeichnung zeigt eine Testkassette vor der Nutzung. Im unteren Drittel sind die mobilen, markierten Antikörper zu erkennen (*goldmarkierter, antigenspezifischer Antikörper*, schwarz/rot), die mitsamt der Probe durch Kapillarwirkung zunächst zu den fixierten Primärantikörpern (*antigenpezifischer Antikörper*, schwarz) und weiter zu den fixierten Sekundärantikörpern (*Sekundärantikörper*, blau) gelangen. Enthält die Probe Virus-Antigene (grün), wie auf der zweiten und dritten Zeichnung, binden die mobilen Antikörper diese und werden somit auch von den immobilen Primärantikörpern gebunden. Wenn ein farbiger Strich entsteht, wie in der dritten Schemazeichnung zu erkennen, ist der Test positiv. Enthält die Probe kein Virusmaterial, färbt sich lediglich die Kontroll-Linie durch die Bindung der mobilen Primär- an die Sekundärantikörper, wie in der vierten Zeichnung zu erkennen (nach Vitrosens, 2022).

*Lateral flow*-Tests sind chromatographische Immunassays, die Antikörper unterschiedlicher Antigen-Spezifität nutzen. Erstens sind dies mobile, markierte Primärantikörper, die in der Lage sind, ein definiertes virales Protein von Interesse zu binden. Zweitens bestehen solche Tests aus immobilen Primärantikörpern, die ebenfalls dieses Protein binden können. Der dritte Bestandteil sind sekundäre Antikörper, die wiederum an die primären Antikörper binden. Nach Einbringen der in einem Extraktionspuffer eingerührten Probe fließt diese durch Kapillarwirkung entlang des Teststreifens. Enthält die Probe Viruspartikel, binden die mobilen Primärantikörper an diese und wandern gemeinsam mit ihnen den Filterstreifen entlang. Passieren die mobilen Antikörper nun die Linie aus fixierten Antikörpern, binden letztere einen Teil der Viruspartikel-Antikörper-Komplexe, indem auch sie das virale Protein binden. Die nicht gebundenen primären Antikörper wandern weiter und werden durch die sekundären Antikörper gebunden. Wenn sowohl die immobilen Primärantikörper als auch die Sekundärantikörper die an

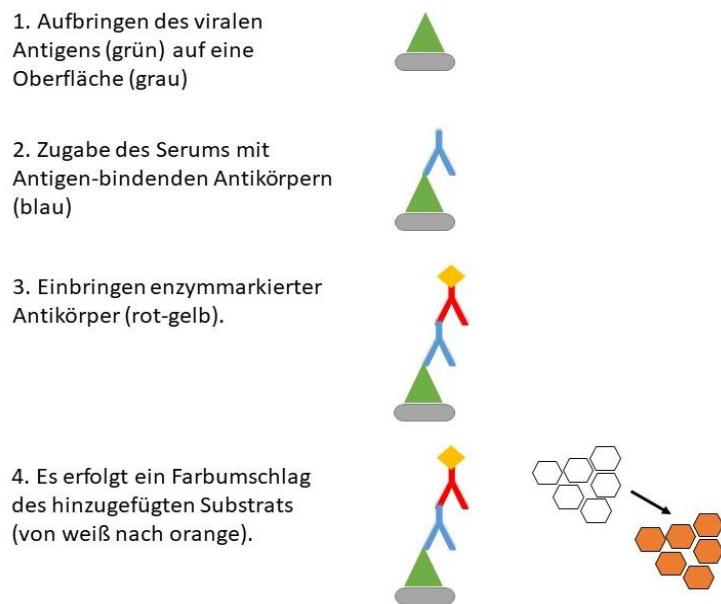
Viruspartikel gebundenen mobilen Antikörper binden, werden Test- (T) und Kontroll-Linie (C) sichtbar, der Test ist dann positiv. Ist kein Virus in der Probe vorhanden, werden die mobilen Primärantikörper lediglich durch die Sekundärantikörper, nicht aber durch die fixierten Primärantikörper gebunden. Erscheint allein die Kontroll-Linie, ist der Test negativ (Vitrosens, 2022). Zur Visualisierung für das Auge kann beispielsweise kolloidales Gold als Marker genutzt werden (Li et al., 2021; Terpos et al., 2021; Medoro et al., 2022). Das Funktionsprinzip dieser Lateral-Flow-Assays ist in Abb. 6 schematisch dargestellt.

Einige dieser einfach durchzuführenden Tests sind für den Laiengebrauch zugelassen. Sie belegen mittels Antikörper-Antigen-Reaktion die Anwesenheit von SARS-CoV-2-Proteinen, meist des N-Proteins, im Nasen-Rachenraum (Corman et al., 2021; Berger et al., 2021; Liotti et al., 2021; van Beek et al., 2020; Igloi et al., 2021; Krüger et al., 2020) oder im Sputum (Kashiwagi et al., 2021; Stokes et al., 2021).

### 1.12.3 Indirekter Nachweis einer abgelaufenen SARS-CoV-2-Infektion

Eine weitere Möglichkeit zur Diagnostik einer SARS-CoV-2-Infektion stellt der Nachweis von Antikörpern im Patienten-Blut dar. Im Rahmen der humoralen Immunabwehr werden Immunglobuline (Ig) gebildet, die Antigene spezifisch binden und somit unschädlich machen können. Diese Ig lassen sich in mehrere Klassen unterteilen: IgM ist als Antigenrezeptor auf naiven B-Zellen der wirksamste und frühste Antikörper zur Agglutination von Bakterien und Partikeln. IgG zirkuliert im Blutplasma und ist als größte Fraktion der Immunglobuline unter anderem verantwortlich für Komplementbindung und -aktivierung, die Opsonierung von Erregern und die Neutralisation von Toxinen. IgA sind unter anderem auf Schleimhäuten zu finden und IgE ist hauptsächlich für die Abwehr von Parasiten und für allergische Reaktionen zuständig (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019). Der Spiegel von SARS-CoV-2-spezifischem IgM erreicht das Maximum an Tag 21, der IgG-Spiegel an Tag 29 (Lou et al., 2020).

Die Mehrzahl der gegen SARS-CoV-2 gerichteten Antikörper wird gegen das N-Protein gebildet. Gegen das S-Protein gerichtete Antikörper gelten aber als spezifischer und können zudem das Virus von der Infektion der Zelle abhalten, also neutralisierend wirken (Sethuraman et al., 2020). Bei dem Nachweis von SARS-CoV-2-Antikörpern in Patientenserum sind daher insbesondere die Antikörper gegen das N-Protein und gegen die S1-Untereinheit von Bedeutung (Algaissi et al., 2020). Diese Antikörperforschungen können beispielsweise über den *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) erfolgen. Das Prinzip dieses Tests ist in Abb. 7 dargestellt.



**Abb. 7: Prinzip des Enzymimmuntests (ELISA).** Das virale Antigen wird an eine Oberfläche gebunden. Im Folgenden wird Serum appliziert. Sind darin Antikörper enthalten, binden diese an das Antigen und werden im nächsten Schritt durch einen enzymmarkierten Zweitantikörper gebunden. Durch Hinzufügen von Substrat erfolgt nun ein Enzym-vermittelter Farbumschlag, durch den die Anwesenheit der Antikörper im Serum nachgewiesen wird.

Mit dem sogenannten Plaque-Reduktions-Neutralisationstest kann nach Anzucht der Viren in Zellen, Fixierung und Anfärbung der entstandenen Plaques die Neutralisationskapazität der Antikörper untersucht werden. Dazu werden Verdünnungen des Patientenserums mit einer fixen Virusmenge inkubiert und die Proben auf Zellen gebracht. Ist das Patientenserum in der Lage, die Infektionen durch das Virus zu verhindern, liegen neutralisierende Antikörper vor. Der Titer stellt dabei die maximale Verdünnungsstufe dar, bei der die Neutralisation noch stattfindet (Focosi et al., 2021; Neumann et al., 2021; Strömer et al., 2020b). Diese Methode wird auch für die Abschätzung der Impfantwort genutzt (Rose et al., 2022a; Neumann et al., 2021; Okba et al., 2020).

Auch die Abschätzung der T-Zell-Antwort nach SARS-CoV-2-Infektion kann zur Einschätzung des Immunstatus der Bevölkerung herangezogen werden (Echeverría et al., 2021; Lipsitch et al., 2020). Die T-Zell-Antwort kann mittels sogenannter Interferon-γ-Freisetzungstests bestimmt werden. Hierbei werden T-Zellen mit viralem Antigen stimuliert und die Konzentration des dann freigesetzten Interferon-γ bestimmt (Murugesan et al., 2021). Dieses kann mit ELISA-Testverfahren (Echeverría et al., 2021) oder mit ImmunoSpot®-Kits (Ni et al., 2020) erfolgen. Interessanterweise wurden auch präformierte SARS-CoV-2-reaktive T-Zellen bei Nichtexponierten gefunden (Echeverría et al., 2021). Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen Neutralisationskapazitäten und der Menge der SARS-CoV-2-spezifischen T-Zellen nachgewiesen (Ni et al., 2020).

## 1.13 Zielsetzungen dieser Dissertation

Aus den vorangegangenen grundsätzlichen Überlegungen ergibt sich das wichtige Ziel, Verfahren für den direkten und indirekten Nachweis von SARS-CoV-2-Infektionen zu etablieren, zu validieren und auf ihre Eignung für die Routinediagnostik zu prüfen.

### **A) Bestimmung der Leistungsfähigkeit einer laboreigenen Methode zum Nachweis von SARS-CoV-2-Genomäquivalenten**

Die rasche und zuverlässige Erreger-Diagnostik einer SARS-CoV-2-Infektion ist entscheidend für die Eindämmung einer Pandemie. Dazu wurde bereits Ende Januar 2020 im Labor Dr. Krause und Kollegen MVZ GmbH ein PCR-Verfahren etabliert und orientierend validiert. Dieses Verfahren nutzt die *Primer* und Sonden, die von Corman für den Nachweis des E- und des N-Gens von SARS-CoV-2 vorgeschlagen wurden, sowie ein *Primerpaar* und eine Sonde für den Nachweis der humanen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase als interne Kontrolle. Dadurch soll nachgewiesen werden, dass die korrekte Probenentnahme erfolgt ist. Zur Sicherstellung der erfolgreichen Nukleinsäure-Extraktion und reversen Transkription für jede Probe werden alle Proben vor ihrer Extraktion mit einer Suspension des behüllten RNA-Phagen  $\Phi$ 6 versetzt, der dann durch spezifische *Primer* und Sonde nachgewiesen wird. Diese laboreigene Triplex-RT-PCR sollte umfassend validiert und ihre Eignung für die Routinediagnostik damit nachgewiesen werden.

### **B) Untersuchung der Leistungsfähigkeit kommerzieller Verfahren für den direkten Nachweis von SARS-CoV-2-Antigen (Schnelltests)**

Antigen-Schnelltests, sogenannte *Point-of-Care-Tests*, sollten auf ihre diagnostische Genauigkeit im Vergleich zum Goldstandard der zuvor validierten Triplex-RT-PCR geprüft werden, als Voraussetzung einer Vor-Ort-Testung unabhängig von Laborgeräten und Laborpersonal.

### **C) Untersuchung der Eignung von Antikörpertests für den Nachweis einer abgelaufenen SARS-CoV-2-Infektion**

Kommerziell erhältliche Tests für den Nachweis von SARS-CoV-2-IgG oder Gesamt-SARS-CoV-2-Antikörpern sollten miteinander verglichen und hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität analysiert werden und damit ihre Eignung für die SARS-CoV-2-Diagnostik und für sero-epidemiologische Studien festgestellt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Votum der Ethikkommission

Design und Durchführung von Untersuchungen für den direkten und indirekten Nachweis einer SARS-CoV-2-Infektion aus Proben von Patienten und Spendern wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter dem Aktenzeichen AZ D467/20 genehmigt.

### 2.2 Virusgenomnachweis

#### 2.2.1 Probenentnahme

Abstriche aus dem oberen Respirationstrakt wurden im Rahmen der SARS-CoV-2-Routinediagnostik entnommen. Hierbei wurde mit einem trockenen, sterilen Tupfer zunächst von der Rachenrückwand und im Folgenden von der Nasenschleimhaut Material entnommen. Der Tupfer wurde in phosphatgepufferter Salzlösung aufgenommen und die Suspension bei 4 °C gelagert.

#### 2.2.2 Extraktion der Nukleinsäuren

**Manuelle Extraktion:** Nukleinsäuren wurden manuell aus Atemwegsproben mit dem Qiagen Viral RNA Mini Kit extrahiert (Qiagen, Hilden, Deutschland).

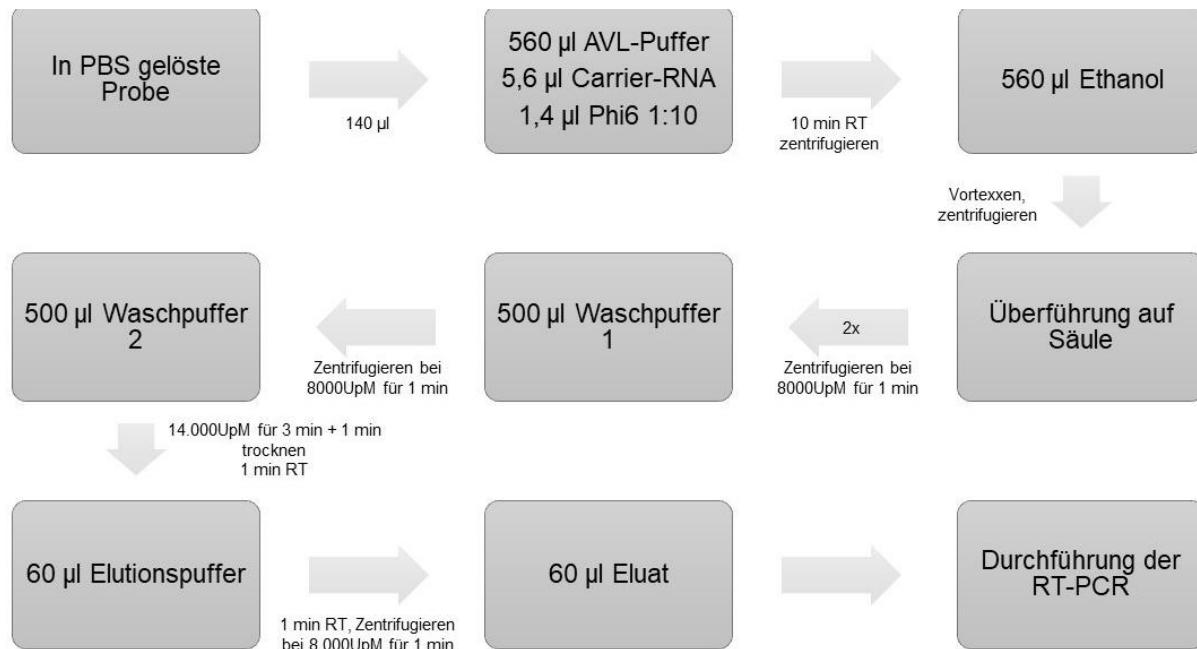


Abb. 8: Schematische Darstellung des Ablaufs der manuellen Nukleinsäure-Extraktion mit dem Qiagen Viral RNA Mini Kit (nach Qiagen, Hilden, Deutschland).

Hierfür wurden 140 µl Probenmaterial verwendet und mit 1,4 µl einer 1:10 verdünnten  $\Phi 6$ -Phagensuspension (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) gemischt. Dieser Bakteriophage ist ein behülltes RNA-Virus aus der Familie *Cystoviridae*, das Pseudomonaden infiziert (King et al., 2012). Weiterhin wurden 560 µl AVL-Puffer und 5,6 µl Carrier-RNA hinzugegeben. Die so hergestellte Suspension wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Dann wurden 560 µl Ethanol hinzugefügt, gemischt und zentrifugiert, daraufhin wurde das Gemisch auf die Säule überführt und bei 8000 Umdrehungen pro min für 1 min zentrifugiert. Aufgrund der Menge der Suspension erfolgte dieser Schritt zweimal. Die Säule wurde anschließend mit dem Waschpuffer 1 für 1 min bei 8000 Umdrehungen pro min und mit dem Waschpuffer 2 für 3 min bei 14.000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. Nachdem die Säule für 1 min bei 14.000 Umdrehungen pro min zur Entfernung von Pufferresten trocken zentrifugiert worden war, wurde die RNA mit 60 µl Elutionspuffer zur Elution gebracht. Dafür wurde die Säule nach 1 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur für 1 min bei 8000 Umdrehungen pro min zentrifugiert (Abb. 8).

**Maschinelle Extraktion:** Die automatische Extraktion von Nukleinsäuren erfolgte mit dem MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit auf dem Roche MagNA Pure Compact Instrument (Roche, Mannheim, Deutschland). Die Aufarbeitung erfolgte streng nach den Empfehlungen des Herstellers. Der Tupfer wurde in 500 µl steriler phosphatgepufferter Salzlösung gerührt. Die Suspension wurde mit 20 µl der 1:10 verdünnten  $\Phi 6$ -Phagensuspension gemischt und auf dem MagNA Pure Compact Instrument im Programm Total\_NA\_Plasma\_100\_400\_V3\_2 mit einem Lyse-Schritt, einer Bindungs-Reaktion und einem Wasch-Schritt verarbeitet.

Zudem wurden Nukleinsäuren mit dem KingFisher-Flex-System extrahiert (ThermoFisher Scientific). Hierzu wurden 200 µl der Probensuspension in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte (ThermoFisher Scientific) gefüllt und mit Puffer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein 1:1 Mastermix aus Proteinase K und der  $\Phi 6$ -Phagensuspension (1:10 verdünnt) hergestellt und je 10 µl dieser Mixtur zur Probe hinzugefügt. Außerdem wurden je 10 µl der *binding beads* (ThermoFisher Scientific) eingebracht. Die Platte wurde in das KingFisher-Flex-Gerät geladen und das Protokoll MVP\_2Wash\_200\_Flex gestartet.

### 2.2.3 Verwendete Oligonukleotid-Primer und Sonden

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und Taqman-Sonden wurden der Literatur entnommen (Tab. 1). Die Synthese wurde bei biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland, durchgeführt. Anschließend wurde durch Verdünnung in sterilem Wasser eine Konzentration von 100 µM hergestellt (Stammlösung). Diese Stammlösung wurde bei -20 °C gelagert. Für Endkonzentrationen von 4 bis 16 µM wurden diese Stammlösungen in sterilem Wasser verdünnt

und dann im Verhältnis 1:1:1 (*Primer:Primer:Sonde*) gemischt und bei -20 °C gelagert (Tab. 1).

**Tab. 1: Primer- und Sondensequenzen** der im Labor entwickelten Triplex-RT-PCRs zum Nachweis von SARS-CoV-2 mit Einbeziehung des Φ6-Phagen und der menschlichen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (nach Strömer et al., 2020b). Atto490LS ist ein besonders für Mehrfarbenexperimente geeigneter Farbstoff der Firma ATTO-TEC. BMNQ530, BMNQ535, BMNQ620 und BHQ2 sind die jeweils zu den Farbstoffen passenden Quencher, welche die Fluoreszenz der Sonden abschirmen und die Verlängerung der Sonde während der qPCR verhindern und damit störende Hintergrundsignale minimieren. 6-Carboxyfluorescein, FAM; Cyanine5, Cy5; Hexachloro-Fluorescein, HEX.

Zielregion	Bezeichnung der Nukleotidsequenz (5'-3') Vorwärts (F)-, Rückwärts (R)- Primer und Son- den		Verdünnung der Stammlö- sung/Kon- zentration in µM	Referenz
<b>SARS-CoV-2 E-Gen</b>	SARS2-E-F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	1:6.25/16	Corman et al., 2020
	SARS2-E-R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	1:6.25/16	
	SARS2-E-Sonde	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BMNQ530	1:12.5/8	
<b>SARS-CoV-2 N-Gen</b>	SARS2-N-F	CACATTGGCACCCGCAATC	1:6.25/16	
	SARS2-N-R	GAGGAACGAGAACAGAGGCTTG	1:6.25/16	
	SARS2-N-Sonde	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAAACATTGCCA-BMNQ530	1:12.5/8	
<b>Pseudomonas Φ6 Phage</b>	Phi6-F	TGGCGGCGGTCAAGAGC	1:10/10	Verreault et al., 2015
	Phi6-R	GGATGATTCTCCAGAACGCTGCTG	1:10/10	
	Phi6-Sonde	HEX-CGGTCGTCGCAGGTCTGACACTCGC-BMNQ535	1:25/4	
<b>GAPDH</b>	GAPDH-F	GGACTGAGGCTCCCACCTT	1:10/10	Payan et al., 2007
	GAPDH-R	GCATGGACTGTGGTCTGCAA	1:10/10	
	GAPDH-Sonde (für LC2.0)	Atto490LS-ATCCAAGACTGGCTCCTCCCTGC-BMNQ620	1:25/4	
	GAPDH-Sonde (für ABI7500)	Cy5-ATCCAAGACTGGCTCCTCCCTGC-BHQ2	1:25/4	

## 2.2.4 RT-PCR-Mastermix und Zugabe der extrahierten Nukleinsäuren

Von den hergestellten Arbeitsmischungen wurden jeweils 1 µl der E- oder 2 µl der N-Gen-*Primer/Sonden*-mischung, 1 µl der Φ6-*Primer/Sonden*-mischung sowie 0,5 µl der GAPDH-*Primer/Sonden*-mischung zu 10 µl Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2x) mit oder ohne 5-Carboxy-Rhodamin-X (ROX) gegeben. Anschließend wurden 1 µl Luna WarmStart® RT-Enzymmix (20 x), 0,5 µl thermolabile Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) (alle New England Biolabs GmbH, NEB, Frankfurt/Main, Deutschland) und gegebenenfalls 1 µl Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 15 µl (für die N-Gen-PCR wurde kein Wasser zugegeben) hinzugefügt und gemeinsam mit 5 µl der extrahierten Nukleinsäuren in eine Glaskapillare oder in ein *Micro-Amp reaction Tube* gefüllt (Tab. 2). Dann wurden die Proben kurz zentrifugiert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und in einem Echtzeit-Kapillar-Cycler (LightCycler2.0®, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) oder einem 96-Well Echtzeit-Platten-Cycler (ABI7500, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) untersucht.

**Tab. 2: Zusammensetzung der verwendeten RT-PCR-Mastermixe.** Primer- und Sondensequenzen nach Corman et al., 2020.

N-Gen	E-Gen	E-Gen ohne ROX			
Luna Universal Probe One Step RT-qPCR Reaction Mix	10 µl	Luna Universal Probe One Step RT-qPCR Reaction Mix	10 µl	Luna Universal Probe One Step RT-qPCR Reaction Mix ohne ROX	10 µl
N-Sarboco-Primer-Sonde-Mix	2 µl	E-Sarboco-Primer-Sonde-Mix	1 µl	E-Sarboco-Primer-Sonde-Mix	1 µl
Phage-Primer-Sonde-Mix	1 µl	Phage-Primer-Sonde-Mix	1 µl	Phage-Primer-Sonde-Mix	1 µl
GAPDH-Primer-Sonde-Mix	0,5 µl	GAPDH-Primer-Sonde-Mix	0,5 µl	GAPDH-Primer-Sonde-Mix	0,5 µl
Luna WarmStart® RT Enzyme Mix	1 µl	Luna WarmStart® RT Enzyme Mix	1 µl	Luna WarmStart® RT Enzyme Mix	1 µl
Antarctic Thermolabile UDG	0,5 µl	Antarctic Thermolabile UDG	0,5 µl	Antarctic Thermolabile UDG	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	-	H <sub>2</sub> O	1 µl	H <sub>2</sub> O	1 µl
RNA	5 µl	RNA	5 µl	RNA	5 µl

## 2.2.5 Programmierung der RT-PCR-Geräte

Die PCR wurde auf einem LightCycler2.0-System gemäß den Herstellerangaben (NEB) durchgeführt. Auf die reverse Transkription (55 °C, 10 min) folgten ein anfänglicher Denaturierungsschritt (95 °C, 1 min) und dann 45 Zyklen aus Denaturierung (95 °C, 10 s) und Verlängerung (60 °C, 30 s). Die PCR wurde durch Abkühlen beendet. Vor den Experimenten wurde eine Farbkompensationsdatei erstellt. Für die PCR auf einem ABI7500-System wurden die folgenden Bedingungen gewählt: 10 min bei 55 °C, danach 1 min bei 95 °C, gefolgt von 45-55 Zyklen für 10 s bei 95 °C und 30 s bei 60 °C. Zur Anpassung an den ABI7500 wurde für die GAPDH-Sonde ein passender Farbstoff verwendet (Tab. 1).

## 2.3 Virusantigennachweis

### 2.3.1 Antigen-Schnelltest

Zusätzlich zum Nachweis des Virusgenoms mittels RT-PCR wurde ein Antigen-Schnelltest (Standard Q COVID19 Ag von SD Biosensor) an verschiedenen Proben aus der Routinediagnostik sowie an Instand-Ringversuchsproben getestet. Das Protokoll folgte den Anweisungen des Herstellers. Der Tupfer wurde mit einer Probenmatrix beschickt, in ein Extraktionspufferröhrchen eingeführt und mindestens fünfmal gerührt, während das Pufferröhrchen zusammengedrückt wurde. Anschließend wurde der Tupfer während des Zusammendrückens entfernt, so dass möglichst viel Flüssigkeit im Röhrchen verblieb. Drei Tropfen der extrahierten Probe wurden auf die Testkammer gegeben. Nach 15 min wurden die Testergebnisse abgelesen und fotografisch dokumentiert.

Außerdem wurde der Antigenschnelltest NADAL® COVID-19 Ag-Test (nal von Minden GmbH, Moers, Deutschland) untersucht. 100 µl der Lösung aus der Patientenprobe in phosphatgepufferter Salzlösung wurden entnommen (20 %, 100 µl pro 500 µl) und mit drei Tropfen (ca. 100 µl) des Probenextraktionspuffers gemischt. Nach 2 min wurden zwei Tropfen (ca. 70 µl) auf das Probenfeld der Testkassette gegeben. Die Auswertung erfolgte nach 15 min. Die optische Dichte der Antigenbande konnte automatisch mit dem RSS-Reader (nal von Minden) gemessen werden. Ergänzend wurde das Resultat digital aufgenommen und gespeichert. Darüber hinaus wurde die Leistungsfähigkeit des Panbio™ COVID-19-Antigen-Schnelltests (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) vergleichend bewertet. Zur Testdurchführung wurden 100 µl (20 %) einer Patientenprobe in Phosphat-gepufferter Salzlösung mit 200 µl Extraktionspuffer inkubiert. Fünf Tropfen (ca. 175 µl) wurden auf das Probenfeld überführt. Auch dieser Assay wurde nach 15 min bewertet und fotografisch dokumentiert. Beispiele für positive und negative Reaktionsausfälle der Tests sind im Anhang zu finden (Abb. A1-A3, siehe Anhang).

### **2.3.2 Auswahl definierter Proben zur Testung unterschiedlicher Antigentests**

Für die vergleichende Bewertung der Leistungsfähigkeit der Antigentests der Firma nal von Minden und der Firma Abbott wurde eine Probensammlung angelegt, die sowohl in der SARS-CoV-2-PCR hoch positive (ab einem Ct-Wert 25 und niedriger in der N-Gen-PCR), schwach positive (Ct-Werte über 25 bis 39 in der N-Gen- bzw. E-Gen PCR) als auch virusnegative Proben einschließt. Die Proben wurden aus der Routinediagnostik des Labors Dr. Krause & Kollegen MVZ GmbH sowie aus einer Auswahl von Ringversuchsproben von Instand e.V. (Tab. 3) zusammengestellt.

## **2.4 Nachweis von SARS-CoV-2-spezifischen Antikörpern im Serum**

### **2.4.1 Untersuchte SARS-CoV-2-Antikörpertests**

In dieser Studie wurden sieben SARS-CoV-2-IgG-Assays (1, Abbott SARS-CoV-2 IgG, Wiesbaden, Deutschland; 2, DiaSorin Liaison® SARS-CoV-2 S1/2 IgG, Diasorin, Dietzenbach, Deutschland; 3, Epitope EDI™ Novel Coronavirus COVID-19 IgG ELISA Kit, Epitope Diagnostics, San Diego, USA; 4, Euroimmun-Anti-SARS-CoV-2-ELISA (IgG), Euroimmun AG, Lübeck, Deutschland; 5, Mikrogen recomWell SARS-CoV-2-IgG, Mikrogen GmbH, Neuried, Deutschland; 6, SARS-CoV-2 ViraChip® IgG-Test, Viramed Biotech AG, Planegg, Deutschland; 7, SERION ELISA agiles SARS-CoV-2 IgG, Institut Virion\Serion GmbH, Würzburg, Deutschland) und ein Gesamt-Antikörpertest (Roche Elecsys Anti -SARS-CoV-2, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) vergleichend untersucht.

Diese Tests erkennen humane IgG-Antikörper, die gegen das virale N-Protein (N; Abbott, Epitope, Mikrogen, Roche), das komplexe S-Protein (S; Virion-Serion) oder dessen S1-

Domäne (Euroimmun) bzw. die S1- und S2-Domäne (DiaSorin) gerichtet sind. Im SARS-CoV-2 ViraChip® IgG-Testkit wurden durch den Hersteller die Oberflächenantigene S1 und S2 sowie das Nukleokapsid-Antigen N als separate Antigene auf eine Nitrocellulose-Membran aufgebracht.

Für die Testung der Seren wurden durchweg die Vorgaben der Hersteller beachtet. Der Assay der Firma Abbott wurde auf einem Architect- oder Alinity-Gerät, der Test der Firma DiaSorin auf einem Liaison XL, der Assay der Firma Roche auf einem Cobas e 411 und die Tests der Firmen Epitope, Euroimmun, Mikrogen, Viramed und Virion-Serion mit dem BEP-2000-System durchgeführt (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland). Für die Auswertung des ViraChip®-Tests stand ein ViraChip®-Lesegerät zur Verfügung, die Auswertung erfolgte über die ViraChip®-Software.

#### **2.4.2 Serumbank von COVID-19-Patienten und präpandemischen Proben**

Insgesamt wurden 37 Serumproben von 26 ambulanten COVID-19-Patienten ausgewählt, die im Labor Dr. Krause und Kollegen MVZ für diagnostische Zwecke vorrätig waren. Bei den Patienten wurde eine SARS-CoV-2-Infektion durch die bereits beschriebene Triplex-RT-PCR entweder auf das E- oder das N-Gen anhand respiratorischer Proben nachgewiesen. Seren von Patienten wurden ausgewählt, bei denen das Signal der Atemwegsprobe im Ct-Wert unter 35 lag (Median 26,8). Die Blutentnahme erfolgte zwischen vier und 60 d nach positivem Testergebnis, der Median lag hier bei 19 d. Anschließend wurde Serum aus den gewonnenen Proben hergestellt und bei -20 °C gelagert. Für diese Rekonvaleszenzseren war anzunehmen, dass SARS-CoV-2-IgG bzw. Gesamtantikörper nachzuweisen sind, sodass sie sich zur Bestimmung der Empfindlichkeit der serologischen Assays eignen (Kellam und Barclay, 2020).

Zur Bestimmung der Spezifität der Tests wurden 50 archivierte Seren aus dem Sommer 2018 sowie 50 aus dem Winter 2018/2019 verwendet, in denen SARS-CoV-2-Antikörper nicht zu erwarten sind. Damit wurden präpandemische Seren zur Bestimmung der Spezifität genutzt, wie schon von Kellam und Barclay (2020) vorgeschlagen.

#### **2.4.3 Auswertung**

Neben den eindeutig positiven Testergebnissen wurden ebenfalls alle im Grenzbereich angegebenen Ergebnisse als positiv ausgewertet. Mit dem Ziel einer besseren Vergleichbarkeit wurden aus den Rohdaten der Experimente gemäß der Entscheidungsgrenzen relative Indizes erstellt. Hierzu wurde nach Vorbild von Krüttgen et al. (2020) ein Signal(S)/Cut-Off(CO)-Wert bestimmt, der als negativ bewertet wurde, sobald er unter eins lag, und als positiv galt, sofern er größer oder gleich eins war (grenzwertige Ergebnisse eingeschlossen). Das Erstellen eines solchen Index war bei dem SARS-CoV-2-ViraChip®-IgG-Test nicht möglich. Die Ergebnisse

wurden in diesem Fall lediglich qualitativ bewertet und als IgG-positiv bzw. IgG-negativ vermerkt. Die Assay-Genauigkeit wurde ermittelt, indem der Anteil der korrekt identifizierten Proben je Assay relativ zur gewählten Referenzmethode berechnet wurde.

#### 2.4.4 Bestimmung der IgG-Avidität

Die Avidität beschreibt die Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen (Gressner und Arndt, 2007). Zur Bestimmung der Avidität der IgG-Antikörper wurden zwei Versionen eines IgG-Lineassays (Mikrogen *recomLine* Coronavirus IgG [Avidität], Prototyp; *recomLine* SARS-CoV-2 IgG [Avidität] / RUO, *research use only*) verwendet. Hierzu wurden die Rekonvaleszenzseren in An- und Abwesenheit eines von Mikrogen zur Verfügung gestellten Aviditätsreagenz getestet. Die erste Version des Tests beinhaltet das N-Protein der saisonalen humanen Coronaviren (HCoVs) 229E, HKU1, NL63 und OC43, das N-Protein des ursprünglichen SARS-CoV von 2002/2003 sowie das N-Protein von SARS-CoV-2 als separate Antigene. Die zweite Version wurde durch den Hersteller um das S1-Antigen und die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des S-Proteins als Antigene erweitert (Abb. A5, siehe Anhang). Für die Experimente wurde das Dynablot Plus-System genutzt und die Streifen wurden dann mit Hilfe des BLOTRix-Lesegerätes der *recomScan*-Software (Fa. Mikrogen) automatisch gelesen und bewertet.

#### 2.4.5 Kinetik der SARS-CoV-2-IgG-Indizes und IgG-Aviditäten

Da sie Aufschluss über den Krankheitsverlauf bzw. den Schutz vor Neuinfektionen geben könnten, wurden 11 der 26 Patientenproben über einen Zeitraum von bis zu 161 d im Verlauf untersucht. Hierzu wurden die N- und S-spezifischen Assays ausgewählt, die zuvor jeweils entweder bzgl. Empfindlichkeit, Spezifität oder Genauigkeit die zuverlässigsten Ergebnisse gezeigt hatten. Diese Seren wurden ebenfalls auf ihre IgG-Avidität hin untersucht, wobei die verbesserte zweite Version des Assays verwendet wurde. In diese Untersuchungen wurden Follow-up-Proben von vier Routineproben einbezogen, darunter drei Familienmitglieder eines COVID-19-Patienten.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 SARS-CoV-2-Diagnostik durch den Nachweis viraler RNA

##### 3.1.1 Experimenteller Aufbau

Der Grad der Ergebnisübereinstimmung der laboreigenen Triplex-Echtzeit-PCRs für den Nachweis des viralen E- bzw. N-Gens wurde bestimmt. Zudem wurde der Einfluss der Zugabe von 5-Carboxy-Rhodamin-X (ROX) untersucht. Zusätzlich wurde die Nachweisgrenze anhand von SARS-CoV-2-tragenden Proben bestimmt, die in virusfreien Proben verdünnt wurden. Dafür wurde auf definierte Ringversuchsproben von Instand e.V. zurückgegriffen. Zur Etablierung einer effizienten und kostengünstigen Diagnostik wurde untersucht, ob auch die Testung gepoolter Patientenproben möglich ist. Ebenso wurde untersucht, inwieweit die RT-PCRs auf verschiedenen Geräteplattformen wie dem Roche LightCycler2.0 und dem 96-Well-Platencycler ABI750 von ThermoFisher Scientific durchgeführt werden können und ob die so erzielten Ergebnisse vergleichbar sind.

##### 3.1.2 Nachweis der Spezifität der SARS-CoV-2-Triplex-PCR

Zum Ausschluss, dass die verwendete Triplex-PCR neben SARS-CoV-2-RNA weitere hCoV bzw. andere relevante respiratorische Viren nachweist, wurden Proben aus dem Instand-Ringversuchsprogramm eingesetzt. Für keine dieser Proben ergab sich ein positives Testergebnis (Tab. 3).

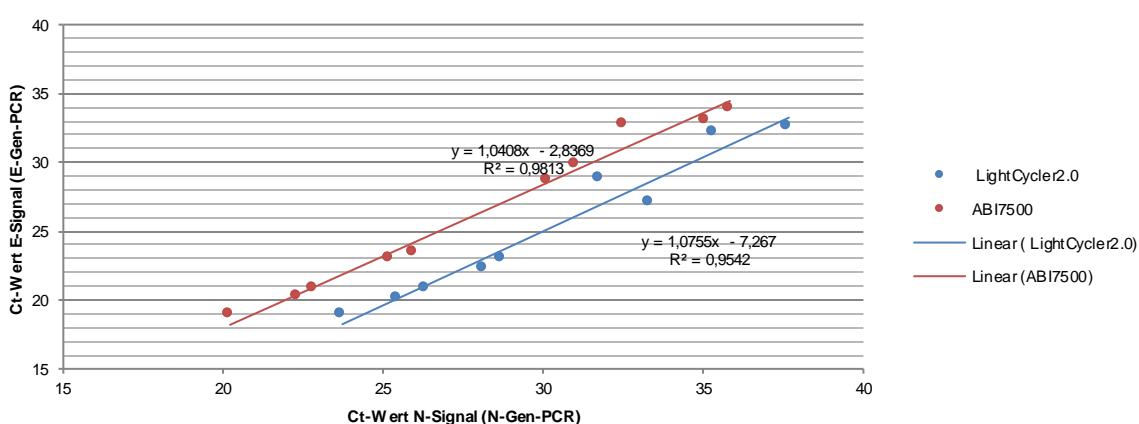
**Tab. 3: Instand-Ringversuchsproben, die zum Test herangezogen wurden, um die Eignung der Protokolle nachzuweisen.** Weder Kreuzreaktionen zu schon bekannten menschlichen Coronaviren noch zu anderen gängigen Atemwegsviren traten auf (abgeändert nach Strömer et al., 2020b). Die Ringversuchs- und Quantifizierungs-Proben stammten von Instand e.V.

Virus	Ringversuchs-probe	SARS-CoV-2 Kopien/ml	Ct-Wert	
			E-Gen	N-Gen
<b>Coronaviren</b>				
MERS-CoV	340051/19	0	neg	neg
MERS-CoV	340067/20	0	neg	neg
HCoV 229E	340052/19	0	neg	neg
HCoV 229E	340065/20	0	neg	neg
HCoV 229E	340068/20	0	neg	neg
HCoV NL63	340047/19	0	neg	neg
HCoV NL63	340072/20	0	neg	neg
HCoV OC43	340050/19	0	neg	neg
HCoV OC43	340060/20	0	neg	neg
HCoV OC43	340074/20	0	neg	neg
Coronavirus negativ	340062/20	0	neg	neg
Coronavirus negativ	340070/20	0	neg	neg

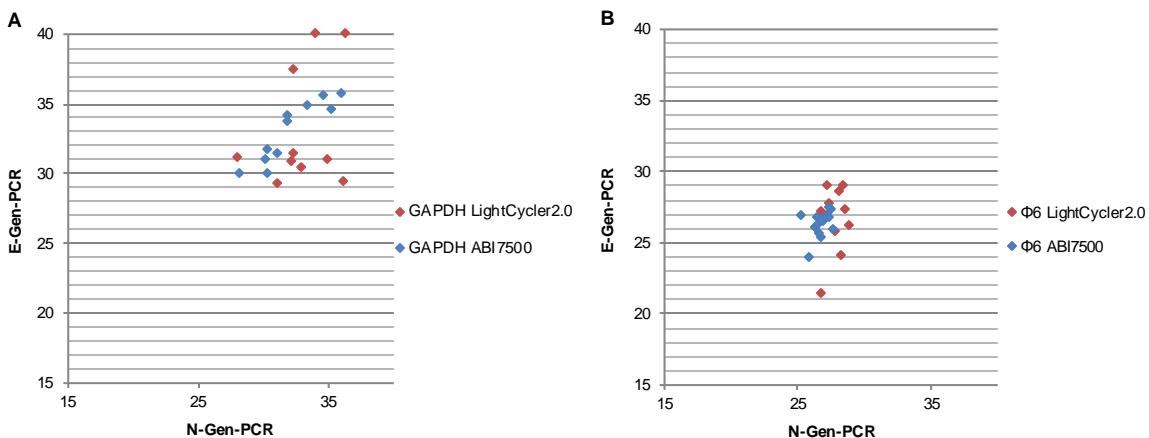
Virus	Ringversuchs-probe	SARS-CoV-2 Kopien/ml	Ct-Wert	
			E-Gen	N-Gen
<b>Andere respiratorische Viren und Enteroviren</b>				
Enterovirus (Coxackievirus A21)	372077/19	0	neg	neg
Influenza-A-Virus (A(H1N1)pdm09)	370120/20	0	neg	neg
Influenza-B-Virus (B/Victoria-Linie)	370119/20	0	neg	neg
Metapneumovirus (Typ A)	385047/19	0	neg	neg
Parainfluenzavirus (PIV-2)	388052/20	0	neg	neg
Respiratorisches Synzytial-Virus (RSV A)	359057/19	0	neg	neg
Rhinovirus (HRV A Type 30)	393035/19	0	neg	neg

### 3.1.3 Vergleich der E- und N-Gen-PCR

Ein Set von für SARS-CoV-2 hoch positiven, niedrig positiven und negativen Proben wurde sowohl in der E- als auch in der N-Gen-PCR sowie auf dem LightCycler2.0 und dem ABI7500 getestet. Die Ergebnisse zeigten eine höhere Empfindlichkeit der E-Gen-PCR. Der durchschnittliche Ct-Wert variierte um 4,2 (durchschnittlicher Ct-Wert E-Gen-PCR: 25,8; N-Gen-PCR: 30,1) auf dem LightCycler und um 1,7 (durchschnittlicher CT-Wert E-Gen-PCR: 26,4; N-Gen-PCR: 28,1) auf dem ABI7500 (Abb. 9). Zum Nachweis der korrekten Probennahme aus dem Respirationstrakt, der Nukleinsäure-Extraktion und der Umschreibung der RNA in cDNA sowie deren Amplifikation wurden die Ct-Werte des GAPDH-Nachweises und des  $\Phi$ 6-Phagen dokumentiert. In unserer Untersuchung lagen die Ct-Werte des GAPDH Signals im Mittel bei 32,6, streuten aber zwischen 28 und 43,2. Diese Variabilität spiegelt am Ehesten Unterschiede in der Abnahmetechnik wider. Demgegenüber waren die Ct-Werte des Phagensignals sehr homogen und lagen alle im Mittel um  $26 \pm 1,5$  (Standardabweichung E-Gen) und  $\pm 0,8$  (Standardabweichung N-Gen) (Abb. 10 A und B).



**Abb. 9: Vergleich der E- und N-Gen-basierten Triplex-RT-PCRs.** Getestet wurden zehn Proben, von denen fünf zuvor in der E-Gen-PCR auf dem LightCycler2.0 einen Ct-Wert zwischen 20 und 30 und fünf einen Ct-Wert über 30 gezeigt hatten. Zunächst wurde die E-Gen-PCR auch auf einem ABI7500 durchgeführt. Anschließend wurden dieselben Proben in einer N-Gen PCR sowohl auf dem LightCycler2.0 als auch auf dem ABI7500 getestet und die Ergebnisse einander gegenübergestellt. Die E-Gen-PCR weist die virale RNA circa drei Ct-Werte früher nach als die N-Gen-PCR. Außerdem erscheinen die virusspezifischen Signale auf dem ABI7500-System circa einen Ct-Wert früher als auf dem LightCycler2.0.



**Abb. 10: Streuung der Ct-Werte** für das Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-(GAPDH)-Signal und das Φ6-Phagen-Signal in der E- und N-Gen-spezifischen Triplex-PCR untersucht anhand von zehn Beispielproben. (A) Dargestellt sind die in der Triplex-PCR ermittelten Werte der menschlichen GAPDH, die als Kontrolle für die korrekte Probenentnahme diente. (B) Durch die Testung des Φ6-Phagen wurde die erfolgreiche PCR-Durchführung nachgewiesen werden. Der Wert liegt bei einem Ct von circa 26.

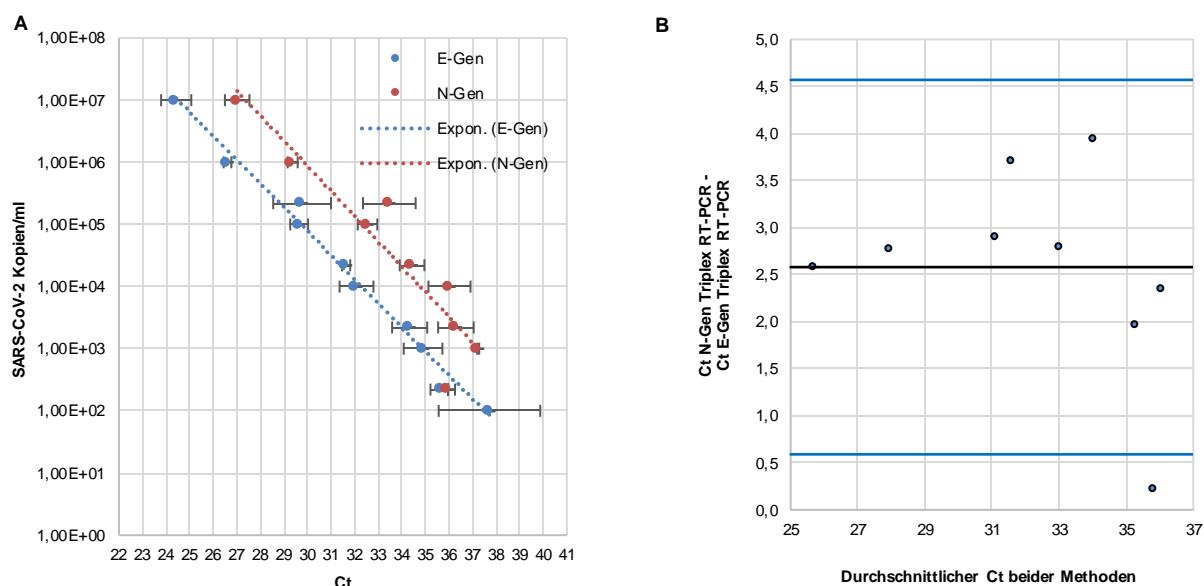
### 3.1.4 Linearität und Nachweisgrenze

Zur Ermittlung, bis zu welcher Viruskonzentration die im Labor entwickelten Protokolle eine SARS-CoV-2-Infektion nachweisen können, wurden mehrere Ringversuchsproben aus dem Instand-Ringversuchsprogramm (siehe Tab. 4) herangezogen. Die Proben 340059/20, 340063/20 und 340064/20 wurden in einer zuvor negativ auf SARS-CoV-2 getesteten Patientenprobe auf eine definierte Anzahl an Viruskopien pro  $\mu\text{l}$  eingestellt und jede Verdünnung wurde jeweils fünfmal (Probe 340059/20, 340063/20) bzw. sechsmal (Probe 340064/20) auf mindestens drei verschiedenen Geräten getestet.

Bei einer Viruslast von  $10^7$  Kopien/ml zeigte sich in der N-Gen-PCR ein Ct-Wert von 27 und in der E-Gen-PCR ein Ct von 24, eine Viruslast von  $10^3$  Kopien/ml ergab einen Ct-Wert von circa 37 in der N-Gen-PCR und 35 in der E-Gen-PCR. Je Zehnerpotenz Viruslastabnahme stieg der Ct-Wert um durchschnittlich 2,6 Werte in der N-Gen-PCR und um 2,7 in der E-Gen-PCR. Im Weiteren wurden die Nukleinsäuren aus diesen Proben auf drei unterschiedlichen LightCycler2.0-Maschinen sowie mit dem ABI7500-System getestet. Ein Unterschied von circa 2,6 Ct-Werten zwischen der E- und N-Gen-Triplex-PCR zeigte sich erneut. In Abb. 11 ist die Viruslast in Kopien/ml gegen den Ct-Wert aufgezeichnet (A). Die Übereinstimmung der Methoden wurde im Bland-Altman-Diagramm graphisch dargestellt (Bland und Altman, 1986) (B). Ein Beispiel für einen Kurvenverlauf in der N-Gen-Triplex-RT-PCR ist in Abb. A4 dargestellt (siehe Anhang). Beide im Labor entwickelten Assays konnten eine SARS-CoV-2-positive Patientenprobe also zuverlässig nachweisen (Abb. A4, siehe Anhang).

**Tab. 4: Instand-Ringversuchsproben, die zur Eignungsprüfung der RT-Triplex-PCR genutzt wurden.** Angegeben sind die eingesetzten Viruskopien/ml (eingestellt anhand der Angaben von Instand e.V.) sowie die erzielten Ergebnisse der E- und N-Gen PCR (nach Strömer et al., 2020b).

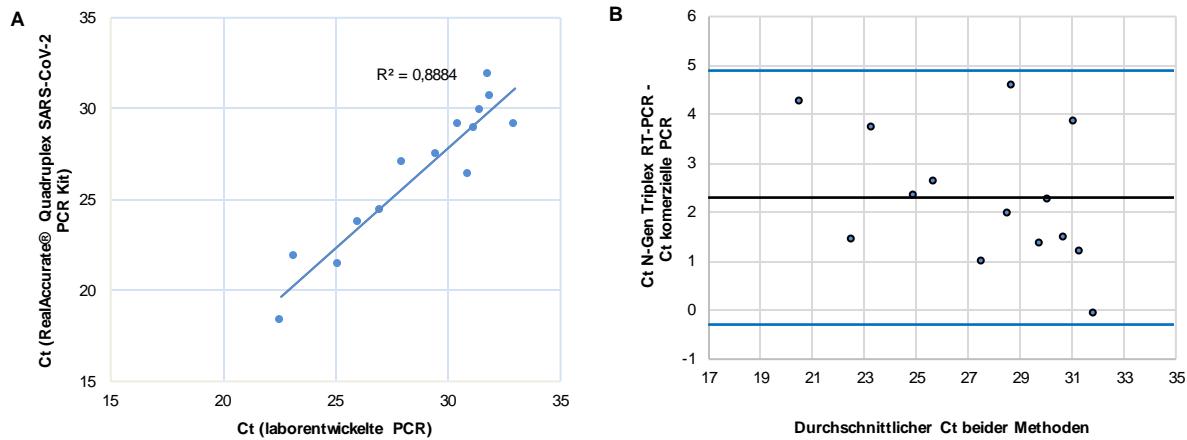
Virus	Ringversuchsprobe (Instand e.V.)	SARS-CoV-2 Kopien/ml (Instand e.V.)	Ct-Wert	
			E-Gen	N-Gen
SARS-CoV-2	340059/20	17.071.604	22,8	25,7
SARS-CoV-2	340063/20	2.198.982	25,6	28,7
SARS-CoV-2	340069/20	268.471	28,5	31,8
SARS-CoV-2	340064/20	220.046	28,8	32,4
SARS-CoV-2	340061/20	25.978	32,4	36,2
SARS-CoV-2	340073/20	25.002	32,6	35,7
SARS-CoV-2	340066/20	2.943	35,6	38,3
SARS-CoV-2	340071/20	294	38,1	neg



**Abb. 11: Linearität der E- und N-Gen-PCR.** (A) Linearität des SARS-CoV-2-Signals in der E- und der N-Gen Triplex-RT-PCR. Zwei Instand-Ringversuchsproben wurden mit Hilfe SARS-CoV-2-negativer Proben auf eine definierte Konzentration eingestellt. Diese wurden sowohl in der N-Gen- als auch in der E-Gen-PCR getestet. Sechs PCRs wurden durchgeführt und daraus die mittleren Ct-Werte sowie die Standardabweichung bestimmt. (B) Bland-Altman-Diagramm, in dem die Abweichung, errechnet aus der Differenz der Ct-Werte der unterschiedlichen Methoden durch den Mittelwert beider Methoden (schwarze Linie), und die 95-prozentige Übereinstimmung (blaue Linien) dargestellt sind (nach Strömer et al., 2020b).

### 3.1.5 Vergleich der N-Gen-Triplex-RT-PCR zu einer zugelassenen PCR

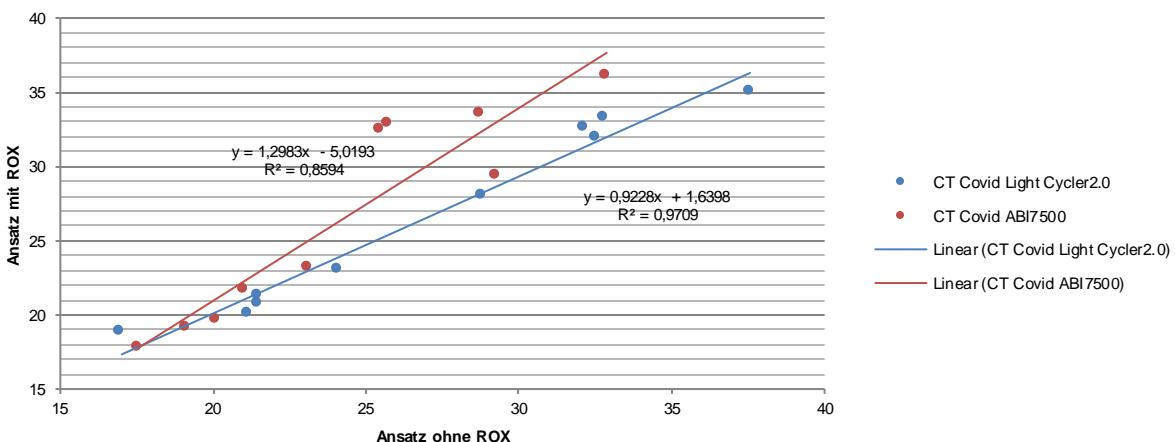
Zur besseren Einschätzung der Leistungsfähigkeit der laboreigenen Methode wurde diese mit einer In-vitro-Diagnostik-lizenzierten, kommerziellen Methode (RealAccurate® Quadruplex SARS-CoV-2 PCR Kit) verglichen. Die Ct-Werte des N-Signals korrelierten in hohem Maße, wobei das Fluoreszenzsignal der kommerziellen Methode etwa 2,3 Zyklen vor dem der laboreigenen Methode als positiv zu bewerten war. Im Bland-Altman-Diagramm (Bland und Altman, 1986) zeigte sich das Ausmaß der Übereinstimmung beider Methoden (Abb. 12).



**Abb. 12: Vergleich der hauseigenen N-Gen-Triplex-PCR mit einer kommerziellen RT-PCR.** In Teil A der Abb. werden die Ct-Werte von 14 SARS-CoV-2-positiven Proben gegenübergestellt. Diese wurden vergleichend sowohl in der laboreigenen N-Gen-Triplex-RT-PCR als auch in einer kommerziellen RT-PCR für den N-Gen-Nachweis getestet. Das Bland-Altman-Diagramm in Teil B zeigt die Abweichung der beiden Methoden (schwarze Linie) sowie die 95-prozentigen Übereinstimmungsgrenzen (blaue Linien) (nach Strömer et al., 2020b).

### 3.1.6 Einfluss des 5-Carboxy-Rhodamin-X auf die Triplex-RT-PCR

5-Carboxy-Rhodamin-X (ROX) ist ein zur Normalisierung nicht-PCR-bedingter Schwankungen des Fluoreszenzsignals verwendet Farbstoff (SignaGen, 2019). In Anbetracht möglicher Lieferchwierigkeiten der Hersteller von Laborchemikalien wurde ein alternativer PCR-Mastermix ohne Zugabe von ROX getestet. Unabhängig von der verwendeten Geräteplattform (LightCycler2.0 oder ABI7500) zeigte sich eine gute Korrelation der E-Gen-spezifischen Ct-Werte, die entweder mit oder ohne Zusatz von ROX im Mastermix ermittelt wurden (Abb. 13).

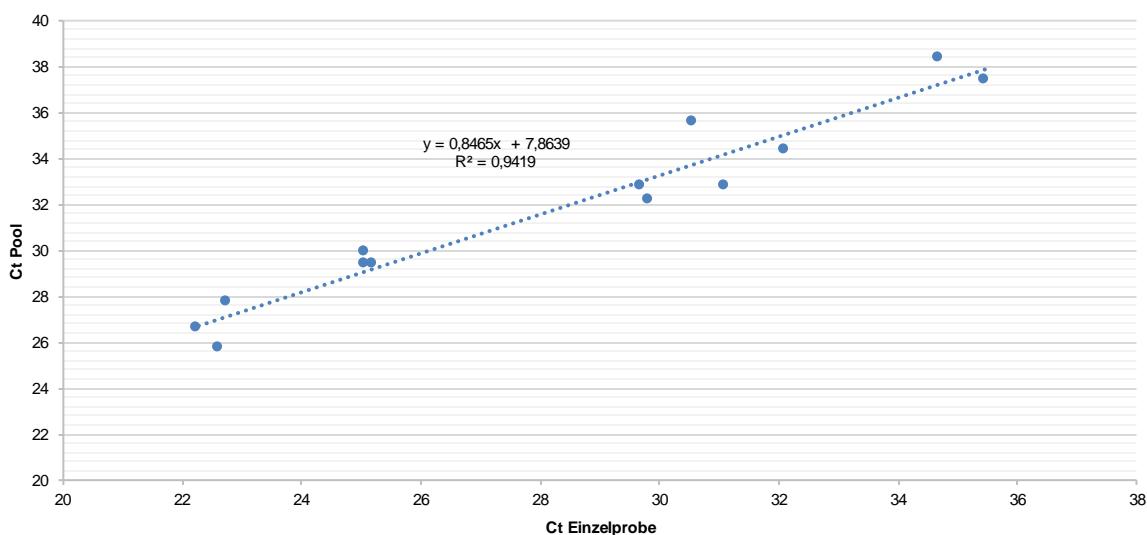


**Abb. 13: Korrelation der E-Gen-spezifischen Ct-Werte von zehn Patientenproben mit und ohne Zugabe von 5-Carboxy-Rhodamin-X (ROX) im Mastermix.** Die Proben wurden vergleichend auf den Geräteplattformen LightCycler2.0 und ABI7500 mit und ohne Zusatz von 5-Carboxy-Rhodamin-X (ROX) im Mastermix getestet.

### 3.1.7 Vergleich von individuellen und Pool-Testungen verschiedenen Umfangs

Pooltestungen können einen Beitrag zur rationellen Diagnostik leisten, wenn in der zu untersuchenden Kohorte eine niedrige Virusprävalenz vorliegt (Hanel und Thurner, 2020). Die gewählte Poolgröße hat wahrscheinlich einen Einfluss auf die Sensitivität der PCR. Daher wurden die viruspezifischen Ct-Werte dreier verschiedener Poolgrößen (zusammengesetzt aus acht, 16 und 30 Proben) mit den Ct-Werten der Einzeltestung dieser Proben verglichen.

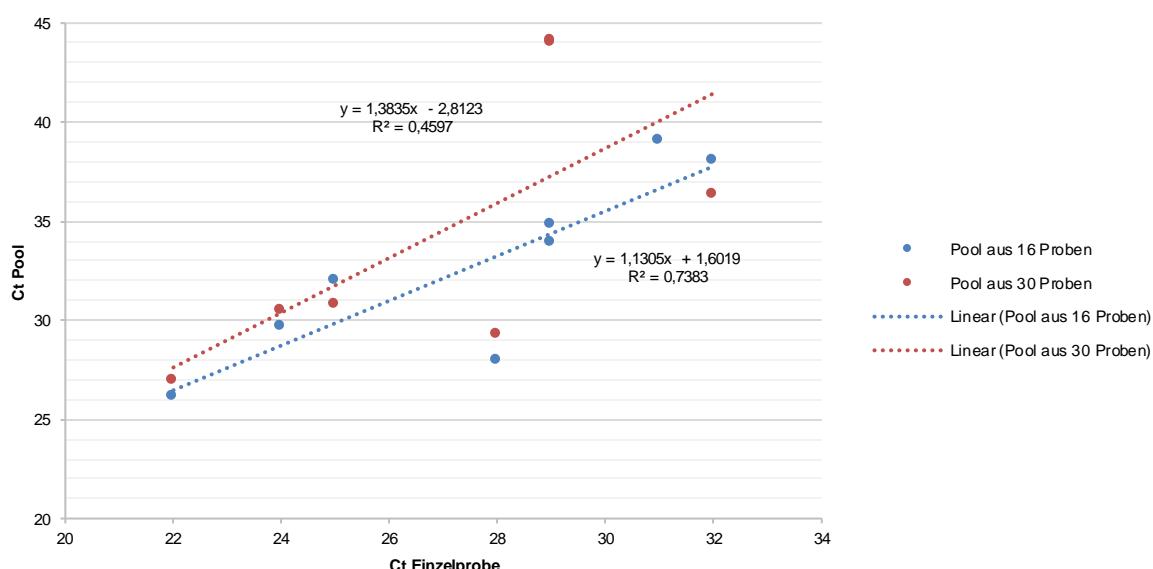
Für die Erstellung eines definierten Achterpools wurden sieben vorab negativ getestete Patientenproben mit einer vorab SARS-CoV-2-positiven Probe vermischt und diese Proben gemeinsam analysiert. Der Ct-Wert erhöhte sich im Achterpool im Median von 3,7 (Abb. 14). Des Weiteren wurden 16 Proben mit verschiedenen Ct-Werten sowohl in einem 16er- als auch in einem 30er-Pool in negativer Probenmatrix getestet (Tab. 5). Hierbei war festzustellen, dass in einem Pool aus 16 Proben nur die Hälfte der Proben als viruspositiv erkannt werden konnte. Proben mit einem Ct-Wert  $> 30$  in der Individualtestung konnten im Pool nur in zwei von zehn Fällen nachgewiesen werden. Proben mit einem Original-Ct  $< 30$  konnten zuverlässig nachgewiesen werden. Der mittlere Ct-Wert stieg von 27,5 auf 32,7. Auch von in 30er-Pools getesteten Proben konnten solche mit in der Individualtestung Ct  $< 30$  verlässlich nachgewiesen werden. Allerdings wurden von den Proben mit einem Ct  $> 30$  nur noch eine von zehn Proben als positiv detektiert. Der mittlere Ct stieg hier von 27 auf 34,5 (Abb. 15). Auffällig war eine größere Streuung der Ct-Werte mit zunehmender Poolgröße (Abb. 14 und 15).



**Abb. 14: Testung von Proben in Achterpools in der N-Gen-PCR.** Die Abb. zeigt die Ct-Werte von 13 sowohl singulär als auch in einer Matrix aus sieben anderen, allerdings im Voraus als SARS-CoV-2 negativ getesteten Patientenproben. Durch das Poolen steigt der Median der Ct-Werte um 3,7.

**Tab. 5: Aufstellung der Ct-Werte der 16 einzeln, in 16er- und in 30er-Pools getesteten SARS-CoV-2-Proben.**

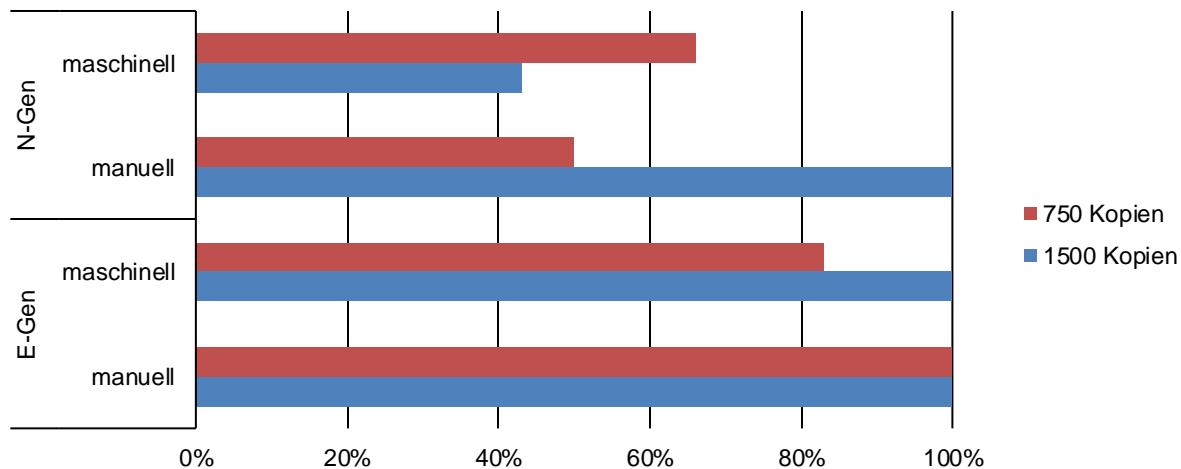
Probe	Original-Ct	Ct 16er-Pool verdünnt in einer Matrix aus 15 negativ getesteten Patientenproben	Ct 30er-Pool verdünnt in einer Matrix aus 29 negativ getesteten Patientenproben
M073059	22	26,2	26,9
M074218	24	29,6	30,4
M074079	25	32,0	30,8
M070008	28	28,0	29,2
M070969	29	33,9	44,1
M074216	29	34,9	44,0
M063653	31	39,0	neg
M073055	31	neg	neg
M072071	31	neg	neg
M073748	32	neg	neg
M072650	32	neg	neg
M072549	32	38,0	36,4
M072013	32	neg	neg
M072555	33	neg	neg
M067727	34	neg	neg
M068836	36	neg	neg

**Abb. 15: Vergleich der Ct-Werte von Proben in 16er- und 30er-Pools in der N-Gen-PCR.** Dargestellt sind die Ct-Werte von 16 sowohl im Einzelverfahren als auch in einem Pool aus 15 bzw. 29 anderen, im Voraus negativ auf SARS-CoV-2 getesteten Patientenproben. Im Vergleich zur Individualtestung steigen die Ct-Werte der Proben in 16er-Pools um circa 5 und in 30er-Pools um 7,5.

### 3.1.8 Vergleich verschiedener Methoden der Nukleinsäuren-Extraktion

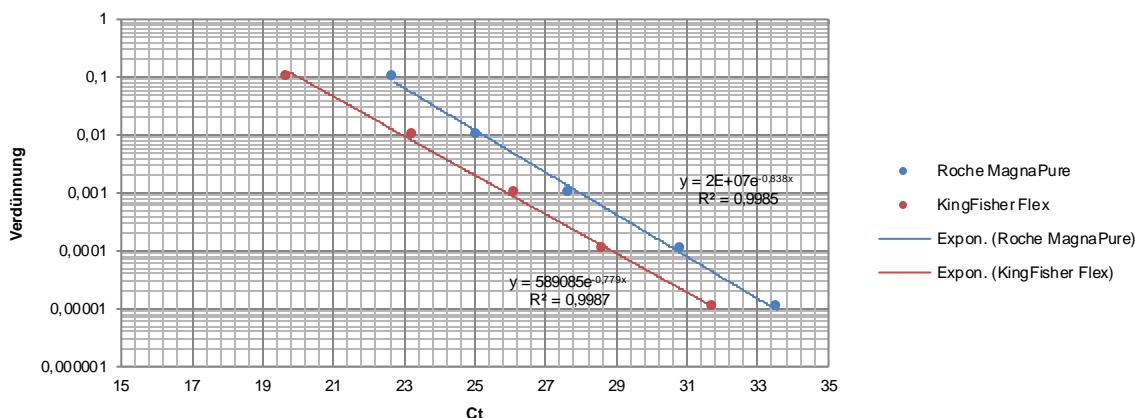
Zur Beurteilung, ob die Anwendung unterschiedlicher Methoden zur Extraktion der Nukleinsäuren einen nennenswerten Unterschied in Bezug auf die Ergebnisse der RT-PCR ausmachen kann, wurden Proben sowohl mit dem Qiagen Viral RNA Mini Kit (manuelle Aufbereitung), dem MagNA-Pure-Compact-Instrument, als auch im KingFisher-Flex-System (beide

letzteren automatisiert) extrahiert und die Ergebnisse über das PCR-Verfahren getestet. Die manuelle Extraktion mittels des Qiagen Viral RNA Mini Kit wurde mit dem maschinellen System auf dem MagNA-Pure-Compact-Instrument verglichen, indem dieselbe Probe (Ringversuchsprobe 340066, siehe Tab. 4) im Mehrfachansatz sowohl in der E- als auch in der N-Gen-PCR getestet wurde. Hier zeigte sich eine leichte Überlegenheit der manuellen Extraktion (Abb. 16).



**Abb. 16: Vergleich der manuellen und maschinellen Extraktion von Nukleinsäuren.** Die Ringversuchsprobe 340066 wurde durch Verdünnung auf 1500 bzw. 750 Kopien/ml eingestellt. Danach erfolgte die manuelle bzw. maschinelle Extraktion. Im Anschluss wurden die Proben beider Konzentrationen 14-mal (1500 Kopien/ml) und zwölfmal (750 Kopien/ml) auf dem LightCycler2.0 in der E- und N-Gen-PCR getestet. Die E-Gen-PCR war etwas sensitiver, die manuelle Extraktion erzielte in dieser Variante der PCR sowohl bei einer Viruslast von 1500 Kopien/ml als auch bei 750 Kopien/ml eine Nachweisrate von 100 %. Die maschinelle Aufbereitung zeigte für 1500 Kopien/ml eine Nachweisrate von 100 %. Diese fällt bei einer Konzentration von 750 Kopien/ml auf 83 %. Die N-Gen-PCR zeigte generell eine etwas schlechtere Sensitivität als die E-Gen-PCR. In diesem Versuch wurde mit der manuellen Extraktion bei 1500 Kopien/ml noch eine 100 %-ige Nachweisrate erzielt, die Ergebnisse der maschinellen Extraktion fielen jedoch bei dieser Konzentration mit einer Nachweisrate von 43 % recht gering aus. Interessanterweise konnte in der N-Gen-PCR mit maschineller Nukleinsäure-Extraktion bei einer Konzentration von 750 Kopien/ml wieder eine Nachweisrate von 66 % beobachtet werden. In der E-Gen-PCR wurde unter diesen Konditionen eine Nachweisrate von 50 % beobachtet.

Zudem wurden zwei automatisierte Extraktionsverfahren verglichen, indem Verdünnungsreihen angefertigt und die Proben in der N-Gen-PCR getestet wurden. Hier zeigte sich, dass Proben, die mit dem KingFisher Flex System extrahiert wurden, um etwa 2 Ct-Werte niedrigere Viruslasten zeigten als Proben, die mit dem MagNa-Pure-Compact-Gerät bearbeitet wurden (Abb. 17).



**Abb. 17: Vergleich zweier maschineller Extraktionsverfahren.** Dargestellt ist die Verdünnungsreihe einer Patientenprobe, die durch Mischung mit negativer Probenmatrix jeweils 1:10, 1:100, 1:1.000 1:10.000 und 1:100.000 verdünnt und im Folgenden durch beide Systeme in der N-Gen-PCR getestet wurde. Leicht niedrigere Ct-Werte der via KingFisher-Flex-System extrahierten Proben sind zu erkennen, was für eine leichte Überlegenheit dieses Extraktionsverfahrens gegenüber Extraktionen mit dem MagNa-Pure-Instrument spricht.

### 3.1.9 Vergleichende Untersuchung von SARS-CoV-2-Antigen-Schnelltests

Im Antigen-Schnelltest (Ag-Test) Standard Q COVID19 Ag von SD Biosensor wurden die in Tab. 6 aufgeführten, vorab durch PCR charakterisierten Proben getestet. Hier zeigte sich, dass der Schnelltest Proben mit einem  $Ct \leq 23$  als positiv erkennen (8 von 8 getesteten Proben), Proben mit einem  $Ct \geq 24$  (E-Gen-PCR) jedoch nicht mehr zuverlässig nachweisen konnte. Nur in zwei Fällen (M035491: CT 31 und M038281: CT 28) erwies sich der Schnelltest als positiv. In einem Fall konnte mit diesem Test selbst eine Probe mit einem Ct von 24 (E-Gen) nicht nachgewiesen werden. Für Proben mit  $Ct$ -Werten  $\leq 24$  ergab sich eine Sensitivität von 88,9 %, für Proben mit einem  $Ct \leq 31$  eine Sensitivität von 83,3 %.

Außerdem wurde der NADAL® COVID-19 Ag-Test mit 134 Patientenproben durchgeführt. Diese wurden vorher durch die N-Gen-Triplex-RT-PCR als positiv (124 Proben Ct 17-37) oder negativ (zehn Proben) bestimmt. Proben mit einer hohen Viruslast konnten von dem Test zuverlässig erkannt werden. Eine Empfindlichkeit von 100 % wurde bei einem  $Ct < 25$  beobachtet. Zu dieser Kategorie gehörten 32 Patientenproben. Die Erkennungsrate des POCT wurde mit steigendem Ct-Wert niedriger. Bei einem Ct von 25 erkannte der Schnelltest 14 von 18 getesteten Proben, die Sensitivität lag also bei 77,8 %. Die Empfindlichkeit für Proben mit einem Ct von 29 ergab 41,7 %, von zwölf getesteten Proben wurden fünf als positiv erkannt. Keine der 16 Proben mit einem  $Ct > 30$  konnte in diesem Antigen-Schnelltest als positiv erkannt werden. Eine Gesamtsensitivität von 73,1 % wurde für Proben mit einem  $Ct \leq 30$  ermittelt (Abb. 18).

Mittels des *Rapid-Slice-Scanners* (nal von Minden) konnte die Intensität der Antigen-Testbande automatisch bestimmt werden. Dies stellt einen deutlichen Vorteil im Vergleich zu der

Auswertung durch Personal dar, da die Maschine nicht zu interpretationsbedingten Fehlern neigt. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Abnahme der mittleren Intensitäten im Bereich zwischen Ct 17 und 24 (N-Gen-PCR). Im weiteren Verlauf zwischen den Ct-Werten 25 bis 30 bildete sich ein niedriges Plateau, da die Intensitäten einen gleichbleibenden Wert erreichten. Über Ct 30 erreichten die Intensitäten die Nulllinie (Abb. 19). Zur Beurteilung der Spezifität wurden zehn SARS-CoV-2-PCR-negative Proben getestet. Diese zeigten alle ein negatives Ergebnis. Auf detaillierte Untersuchungen der Spezifität wurde in dieser Studie verzichtet, da diese seitens des Herstellers zur Verfügung standen.

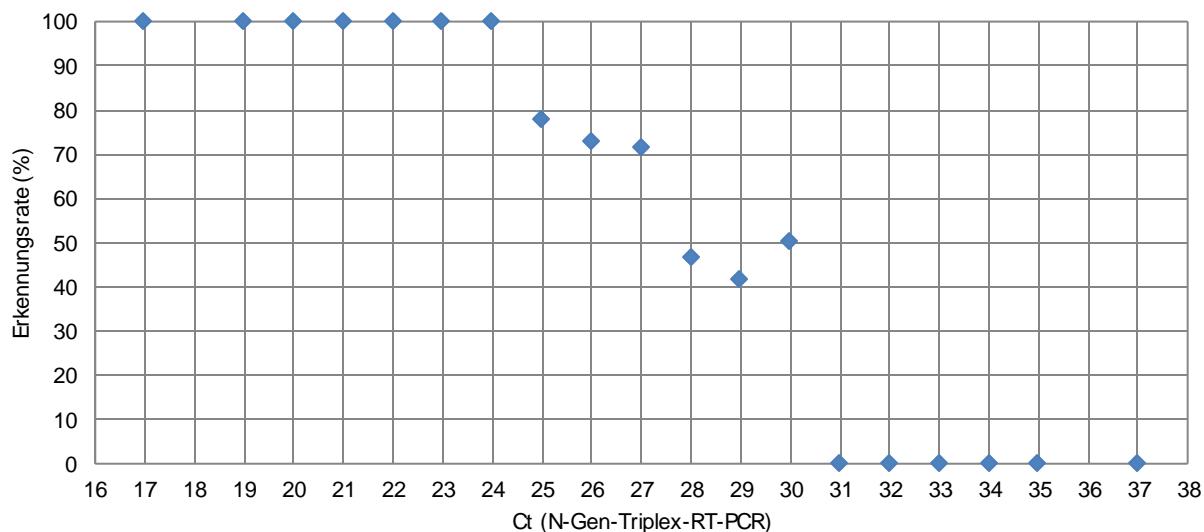
Zum Vergleich wurde auch der Panbio™ COVID-19 Antigen-Schnelltest (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) untersucht. Insgesamt wurden 21 Proben mit einem Ct von 19 bis 32 (N-Gen) bewertet, die zuvor schon mit dem NADAL® COVID-19 Ag-Test getestet worden waren. Qualitativ vergleichbare Ergebnisse wurden erzielt (Abb. 20, Tab. 7). In Tab. 8 ist die Leistungsfähigkeit aller getesteten POCTs in Zusammenhang mit der Viruslast der Proben dargestellt.

**Tab. 6: Die im SD Biosensor Ag-Test untersuchten Patientenproben sind inklusive der mit E-Gen-PCR ermittelten Ct-Werte dargestellt.**

Probe	Ct	PCR	Ergebnis Schnelltest
M023963	18	E-Gen	positiv
M023963 1:10	20	E-Gen	schwach positiv
M024305	20	E-Gen	positiv
M024797	21	E-Gen	positiv
M023963 1:100	22	E-Gen	schwach positiv
M023981	22	E-Gen	positiv
M024379	23	E-Gen	positiv
M029484	23	E-Gen	schwach positiv
M023957	24	E-Gen	negativ
M031218	28	E-Gen	positiv
M037212	30	E-Gen	negativ
M035491	31	E-Gen	positiv
M035173	32	E-Gen	negativ
M037232	32	E-Gen	negativ
M025745	33	E-Gen	negativ
M036662	35	E-Gen	negativ
M035503	36	E-Gen	negativ
M036282	37	E-Gen	negativ
M038648	37	E-Gen	negativ
M025533	Neg	E-Gen	negativ

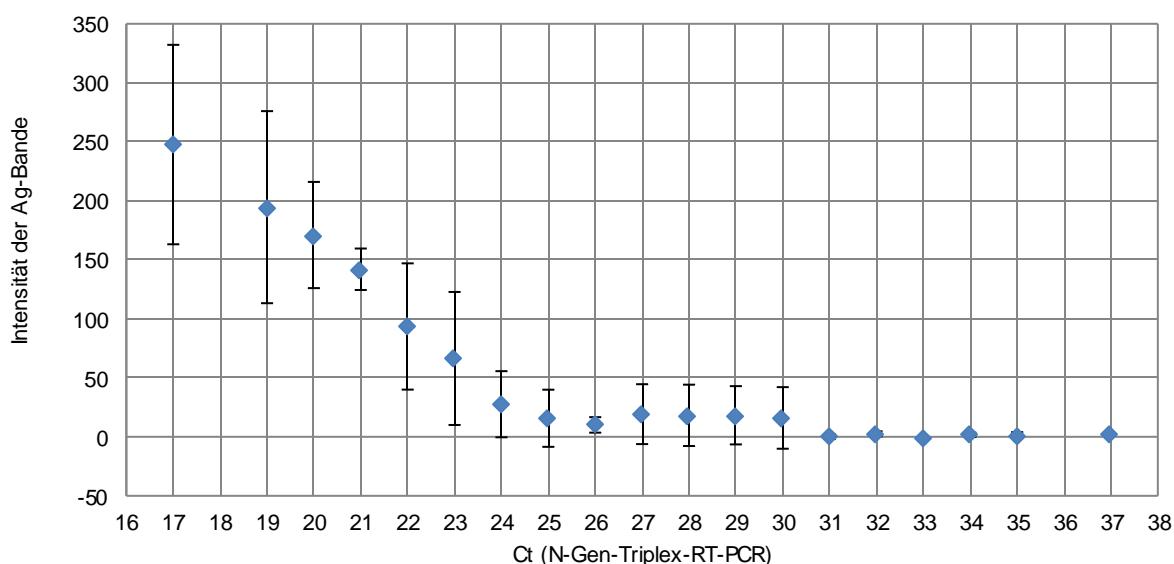
  

PCR	pos.	neg.	PCR ≤ 24	pos.	neg.	PCR ≤ 31	pos.	neg.
pos.	10	0	pos.	8	0	pos.	10	0
neg.	9	1	neg.	1	0	neg.	2	0
	19	1		9	0		12	0
Sensitivität	52,6 %		Sensitivität	88,9 %		Sensitivität	83,3 %	
Spezifität	100,0 %		Spezifität	100,0 %		Spezifität	100,0 %	

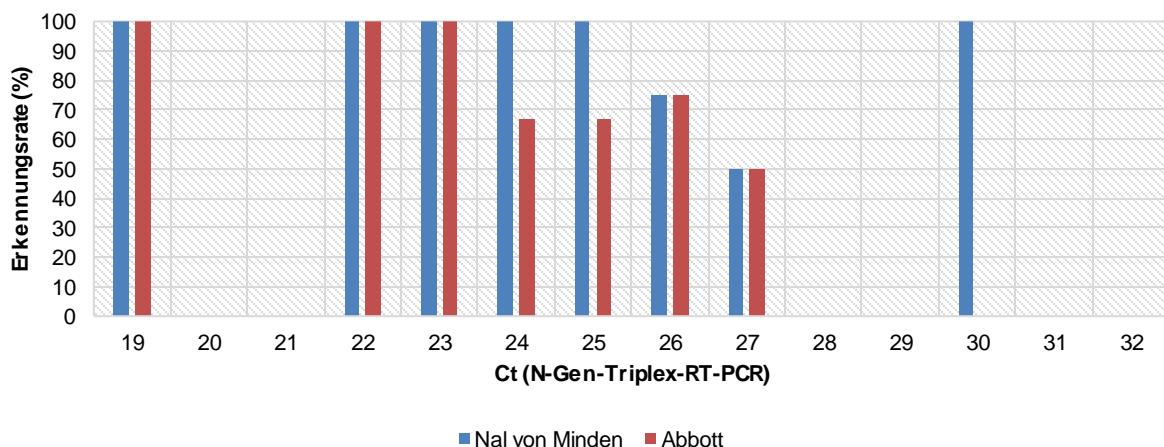


Ct (N-Gen)	17	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	37	$\Sigma$
N	3	5	2	3	6	5	8	18	11	14	15	12	6	4	4	2	3	2	1	124
Ag pos	3	5	2	3	6	5	8	14	8	10	7	5	3	0	0	0	0	0	79	

**Abb. 18: Nachweisrate des NADAL® COVID-19 Ag-Tests** (nal von Minden). Ergebnisse angegeben in Prozent in Abhängigkeit vom Ct-Wert der untersuchten Probe, der vorher durch eine N-Gen-Triplex-RT-PCR bestimmt worden war. Der Tab. sind die zugrundeliegenden Daten zu entnehmen (nach Strömer et al., 2020b).



**Abb. 19: Ergebnisse der automatischen Bestimmung der Intensität der Antigen-Banden im NADAL® COVID-19 Ag-Test** (nal von Minden). Die Ergebnisse wurden anhand der N-Gen-basierten Ct-Werte analysiert. Im Diagramm sind mittlere Intensitäten sowie die Standardabweichungen zu erkennen. Die Proben entsprechen denjenigen aus Abb. 18 (nach Strömer et al., 2020b).



Ct (N-Gen)	19	22	23	24	25	26	27	28	30	31	32	$\Sigma$
N	1	2	1	3	3	4	2	2	1	1	1	21
Ag pos (nal von Minden)	1	2	1	3	3	3	1	0	1	0	0	15
Ag pos (Abbott)	1	2	1	2	2	3	1	0	0	0	0	12

**Abb. 20: Vergleichende Testung von 21 Proben im NADAL® COVID-19 Ag-Test (nal von Minden) und im Panbio™ COVID-19 Antigen-Schnelltest (Abbott).** Die zugrundeliegenden Rohdaten sind in der Tab. aufgeführt (nach Strömer et al., 2020b).

**Tab. 7: Zusammenfassung des direkten Vergleichs zweier Antigen-Schnelltests** (nach Strömer et al., 2020b). Die Gleichwertigkeit der beiden Tests wurde statistisch mit Hilfe des zweiseitigen Fischer-Tests gezeigt, der P-Wert betrug 0,5204 (bestimmt auf <https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>, zuletzt aufgerufen am 19.11.2020).

	nal von Minden (NADAL® COVID-19 Ag Test)		
	pos	neg	n
Abbott (Panbio™ COVID-19 Antigen rapid test)	pos	12	0
	neg	3	6
	n	15	6
			21

**Tab. 8: Getestete POCTs mit ihren Ergebnissen in Zusammenhang mit den zugehörigen Viruslasten in Bezug zu einem Standard (Instand e.V.).**

Test	PCR	Ct	Viruslast in Kopien/ml (näherungsweise)	Ergebnis	Bilanz
<b>NADAL® COVID-19 Ag-Test</b>	N-Gen	19	$10^{10,2}$	positiv	1 von 1
	N-Gen	22	$10^9$	positiv	2 von 2
	N-Gen	23	$10^{8,6}$	positiv	1 von 1
	N-Gen	24	$10^{8,2}$	positiv	3 von 3
	N-Gen	25	$10^{7,8}$	positiv	3 von 3
	N-Gen	26	$10^{7,4}$	positiv	3 von 4
	N-Gen	27	$10^7$	positiv	1 von 2
	N-Gen	28	$10^{6,6}$	negativ	0 von 2
	N-Gen	30	$10^{5,8}$	positiv	1 von 1
	N-Gen	31	$10^{5,4}$	negativ	0 von 1
	N-Gen	32	$10^5$	negativ	0 von 1

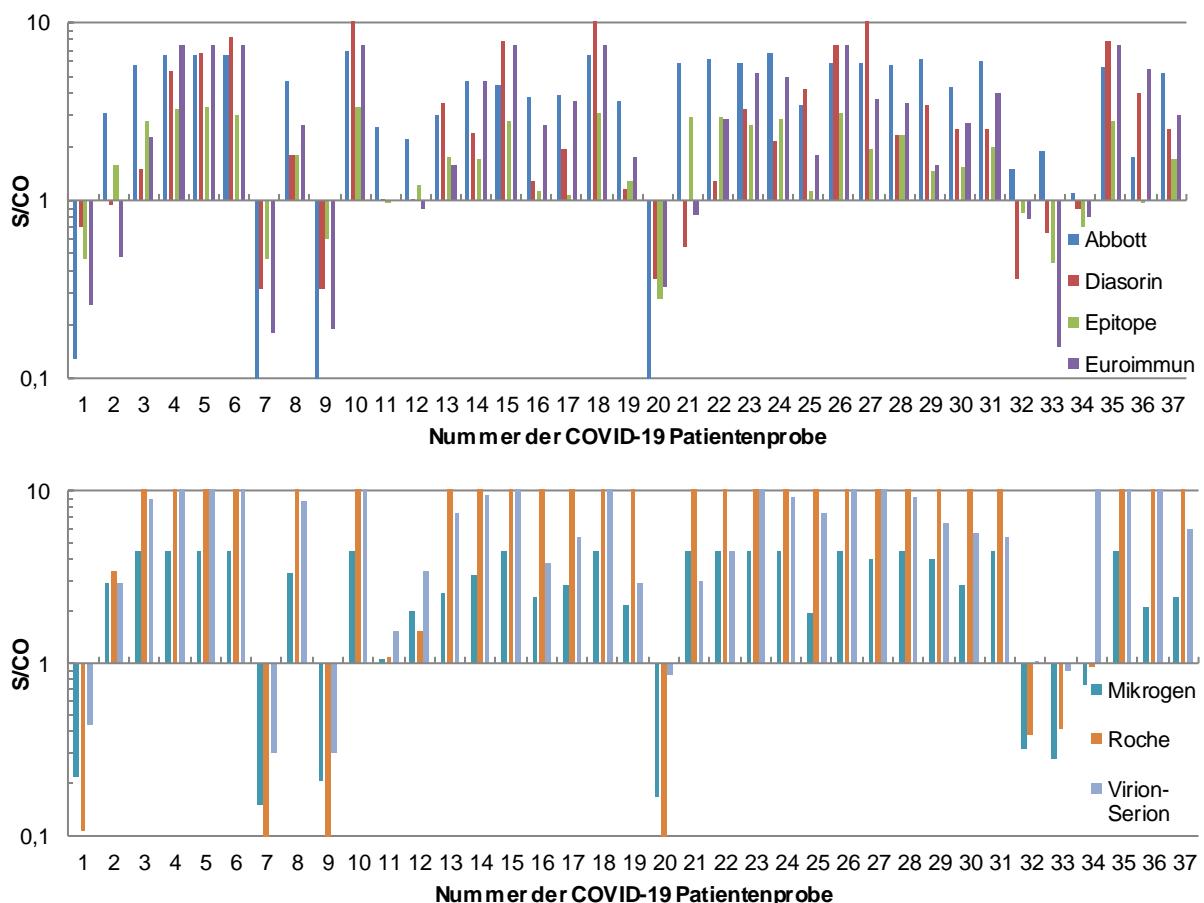
Test	PCR	Ct	Viruslast in Kopien/ml (näherungsweise)	Ergebnis	Bilanz
<b>Panbio™ COVID-19 Antigen-Schnell-test</b>	N-Gen	19	$10^{10,2}$	positiv	1 von 1
	N-Gen	22	$10^9$	positiv	2 von 2
	N-Gen	23	$10^{8,6}$	positiv	1 von 1
	N-Gen	24	$10^{8,2}$	negativ	2 von 3
	N-Gen	25	$10^{7,8}$	positiv	2 von 3
	N-Gen	26	$10^{7,4}$	negativ	3 von 4
	N-Gen	27	$10^7$	positiv	1 von 2
	N-Gen	28	$10^{6,6}$	negativ	0 von 2
	N-Gen	30	$10^{5,8}$	negativ	0 von 1
	N-Gen	31	$10^{5,4}$	negativ	0 von 1
	N-Gen	32	$10^5$	negativ	0 von 1
<b>Standard Q COVID19 Ag</b>	E-Gen	18	$10^{9,3}$	positiv	1 von 1
	E-Gen	20	$10^{8,9}$	positiv	2 von 2
	E-Gen	21	$10^{8,5}$	positiv	1 von 1
	E-Gen	22	$10^{8,1}$	positiv	2 von 2
	E-Gen	23	$10^{7,7}$	positiv	2 von 2
	E-Gen	24	$10^{7,3}$	negativ	0 von 1
	E-Gen	28	$10^{5,7}$	positiv	1 von 1
	E-Gen	30	$10^{4,9}$	negativ	0 von 1
	E-Gen	31	$10^{4,6}$	positiv	1 von 1
	E-Gen	32	$10^{4,2}$	negativ	0 von 2
	E-Gen	33	$10^{3,8}$	negativ	0 von 1
	E-Gen	35	$10^3$	negativ	0 von 1
	E-Gen	36	$10^{2,6}$	negativ	0 von 1
	E-Gen	37	$10^{2,4}$	negativ	0 von 2
	E-Gen	neg		negativ	

## 3.2 Validierung von Verfahren zum indirekten Virusnachweis

### 3.2.1 Sensitivität von acht SARS-CoV-2-IgG- bzw. Gesamtantikörpertests

Die Sensitivität eines Tests beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der kranke Individuen einer Gruppe durch den Test erfolgreich als krank identifiziert werden können (Eusebi 2013). Für die vergleichende Untersuchung der Antikörpertests wurden 37 Seren herangezogen. Sie stammen von 26 COVID-19-Patienten, die eine positive N-Gen-Triplex-RT-PCR aus respiratorischem Material aufwiesen. Bei Probe Nr. 1, Nr. 7 und Nr. 9 zeigte sich in allen Assays ein negatives Ergebnis. Die Blutentnahme bei diesen Patienten erfolgte 9 d vor bis 4 d nach der PCR. Da bei all diesen Proben im Verlauf eine Serokonversion zu beobachten war, wurden sie nicht in die Berechnung der Empfindlichkeit einbezogen. 33 der restlichen 34 Proben zeigten sich in mindestens einem der Assays reaktiv, lediglich die Probe Nr. 20, die 10 d nach der positiven PCR entnommen wurde, konnte von keinem der Assays als positiv erkannt werden. Die Ig-recomLine-Assays wiesen eine Sensitivität von 92,3 % auf, da 24 der 26 Seren positiv

getestet wurden. Die Testergebnisse der ersten und der verbesserten zweiten Version dieses Immunblots unterschieden sich bei drei Proben (Abb. 21).



Patient	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37											
d nach PCR	4	6	8	11	15	26	-9	19	0	29	16	15	3	24	24	10	16	13	19																													
VM	n	p	p	p	p	p	n	p	n	p	p	n	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p								
blot V1	nd	p	n	p	n	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p																	
blot V2	n	n	p	p	p	p	n	p	n	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p									
Patient	12	13	14	15	16	17	18	18	19	19	20	21	22	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37																			
Probe	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37																														
d nach PCR	10	14	22	31	16	38	26	46	27	47	31	19	43	60	12	20	17	35																														
VM	n	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	P	n	n	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p				
blot V1	nd	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	P	nd	n	n	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p				
blot V2	n	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	P	n	n	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p				

**Abb. 21: Ergebnisse der IgG- oder Gesamtantikörpertests für 37 Individualseren, die von 26 Patienten stammen.** Der Probenmesswert wurde durch den vom Hersteller vorgegebenen Cut-Off dividiert. Grenzwertige Ergebnisse wurden generell als positiv bewertet. Ein Sample/Cut-Off-Index > 1 ist als antikörperpositiv anzusehen. Den Tab.n können die Anzahl der Tage nach der PCR, die Ergebnisse des ViraChip® IgG-Test (Viramed; VM) sowie die Resultate der recomLine-ImmunoBlots (Blot v1 und v2) entnommen werden. P steht hier für positiv, n für negativ und nd für nicht durchgeführt (nach Strömer et al., 2020a).

### 3.2.2 Nachweis der Spezifität der untersuchten Antikörper-Tests

Die Spezifität beschreibt die Anzahl der durch einen Test erfolgreich als nicht erkrankt erkannten gesunden Testpersonen (Eusebi, 2013). Einhundert Seren, die vor Ausbruch der Pandemie archiviert wurden und daher keine SARS-CoV-2-Antikörper beinhalten sollten, wurden zur Bestimmung der Spezifität der untersuchten Assays verwendet. Zehn Seren wurden von mindestens einem Antikörper-Test als reaktiv bewertet (Tab. 9). Probe 7 wurde sowohl im Test der Firma Mikrogen mit einem S/CO von 1,33 und der Firma Roche mit einem S/CO von 3,46 als auch im Assay der Firma Viramed mit einem Ergebnis von 125 ViraChip®-Einheiten als positiv bewertet. Außerdem zeigte sich diese Probe auch in der ersten Version des Immunblots reaktiv, in der zweiten, verbesserten Version allerdings nicht mehr (Tab. 9).

**Tab. 9: Ergebnisse der Testung 100 archivierter Seren aus dem Sommer 2018 und Winter 2018/2019, in denen keine SARS-CoV-2-Antikörper enthalten sein sollten, von denen zehn jedoch in einem oder mehreren Assays Reaktivität zeigten. Auch in diesem Versuch wird ein S/CO-Wert von  $\geq 1$  als positiv gewertet.**

Patienten-Nr.	Euroimmun S/CO <0,8/>1,0 x1,25 S/CO = 1,0	Epitope Extinkt. 0,358 x2.79 S/CO = 1,0	Mikrogen U/ml (<=20/>24) x0.05 S/CO = 1,0	Abbott Index (<1,4) /1.4 S/CO = 1,0	Diasorin AU/ml (<12/>15) /12 S/CO = 1,0
1	0,20	0,47	0,25	0,02	<b>1,02</b>
2	0,85	0,72	<b>1,54</b>	0,04	0,32
3	0,20	0,20	0,09	0,01	<b>1,01</b>
4	0,25	0,53	0,35	<b>1,64</b>	0,32
5	<b>1,11</b>	0,28	0,61	0,05	0,83
6	0,28	0,22	0,09	0,05	<b>1,59</b>
7	0,23	0,47	<b>1,33</b>	0,02	0,32
8	<b>1,36</b>	0,28	0,19	0,04	0,48
9	0,63	0,47	0,12	0,01	<b>2,26</b>
10	<b>1,01</b>	0,20	0,14	0,01	0,41

Patienten-Nr.	Roche COI<1/>=1 S/CO = 1,0	Viramed Wert/10	Virion Serion	Mikrogen Blot	Mikrogen Blot
				V1 recom line	V2 recom Line
1	0,08	negativ	0,30	negativ	negativ
2	0,17	negativ	0,30	negativ	negativ
3	0,06	negativ	0,30	negativ	negativ
4	0,07	negativ	0,30	negativ	negativ
5	0,07	negativ	0,30	negativ	negativ
6	0,06	negativ	0,30	negativ	negativ
7	<b>3,46</b>	<b>positiv</b>	0,30	<b>positiv</b>	negativ
8	0,07	negativ	0,30	negativ	negativ
9	0,06	negativ	0,30	negativ	negativ
10	0,07	negativ	0,30	negativ	negativ

### 3.2.3 Diagnostische Qualität der untersuchten Antikörper-Tests

Die diagnostische Genauigkeit lässt sich berechnen, indem alle korrekt als positiv erkannten Proben mit allen korrekt als negativ erkannten Proben addiert werden und deren Summe anschließend durch die Gesamtheit aller getesteten Proben geteilt wird (Eusebi, 2013). In unserer Studie ergeben sich Genauigkeiten von 93,7 % (DiaSorin und Euroimmun) bis 99,2 % für VirionSerion (Tab. 10).

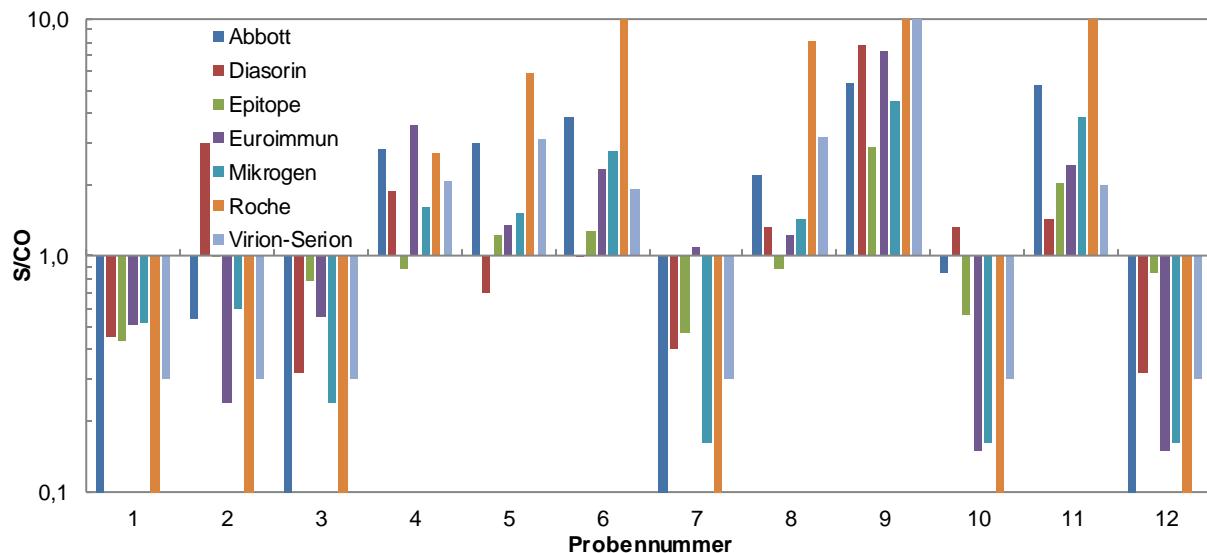
**Tab. 10: Auflistung der Sensitivitäten, Spezifitäten und Genauigkeiten der acht getesteten Antikörpertests auf SARS-CoV-2-IgG- oder Gesamtantikörper.** Die höchsten Werte sind grün, die niedrigsten Werte rot dargestellt (abgeändert nach Strömer et al., 2020a).

Referenztest	Sensitivität (%) N-Gen-PCR	Spezifität (%)	Genauigkeit (%)
Test / n	26	100	126
Abbott	96,2	99,0	98,4
Diasorin	84,6	96,0	93,7
Epitope	80,8	100,0	96,0
Euroimmun	80,8	97,0	93,7
Mikrogen	88,5	98,0	96,0
Roche	88,5	99,0	96,8
Viramed	88,5	99,0	96,8
Virion-Serion	96,2	100,0	99,2

### 3.2.4 Nachweis der Eignung der Verfahren für die Routinetestung

Des Weiteren wurden zwölf Routineproben von an ihrem SARS-CoV-2-Antikörperstatus interessierten Patienten in allen acht Tests nachgetestet. Unter diesen befanden sich ebenfalls drei Proben von Familienmitgliedern (Nr. 4 bis Nr. 6) eines bestätigten COVID-19-Falls (Nr.14, Abb. 21). Sechs dieser Proben, darunter auch die Seren der drei Familienmitglieder, zeigten sich in der Mehrheit der Tests als reaktiv. Bei den Proben 2, 7 und 10 ließ sich eine isolierte Reaktivität in einzelnen Tests feststellen, wobei Serum 1 und 10 im Test der Firma DiaSorin und Serum 7 im Test der Firma Euroimmun als positiv bewertet wurden.

Im ViraChip®-Assay wurden fünf der sechs in der Mehrheit der IgG- bzw. Gesamtantikörpertests als positiv identifizierten Patientenproben positiv bestätigt. Lediglich Probe 8 konnte durch diesen Test nicht als reaktiv bewertet werden. Neun der zwölf Proben wurden durch die erste Version, alle zwölf durch die zweite Version des Immunblots getestet, auch hier bestätigten sich die vorausgehenden Ergebnisse. Die achte Probe konnte in der ersten Version zwar nicht als positiv bestätigt werden, dafür allerdings in der zweiten, verbesserten Version (Abb. 22).



Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VM	n	n	n	p	p	p	n	n	p	n	p	n
blot V1	nd	n	nd	p	p	p	n	n	p	n	p	nd
blot V2	n	n	n	p	p	p	n	p	p	n	p	n

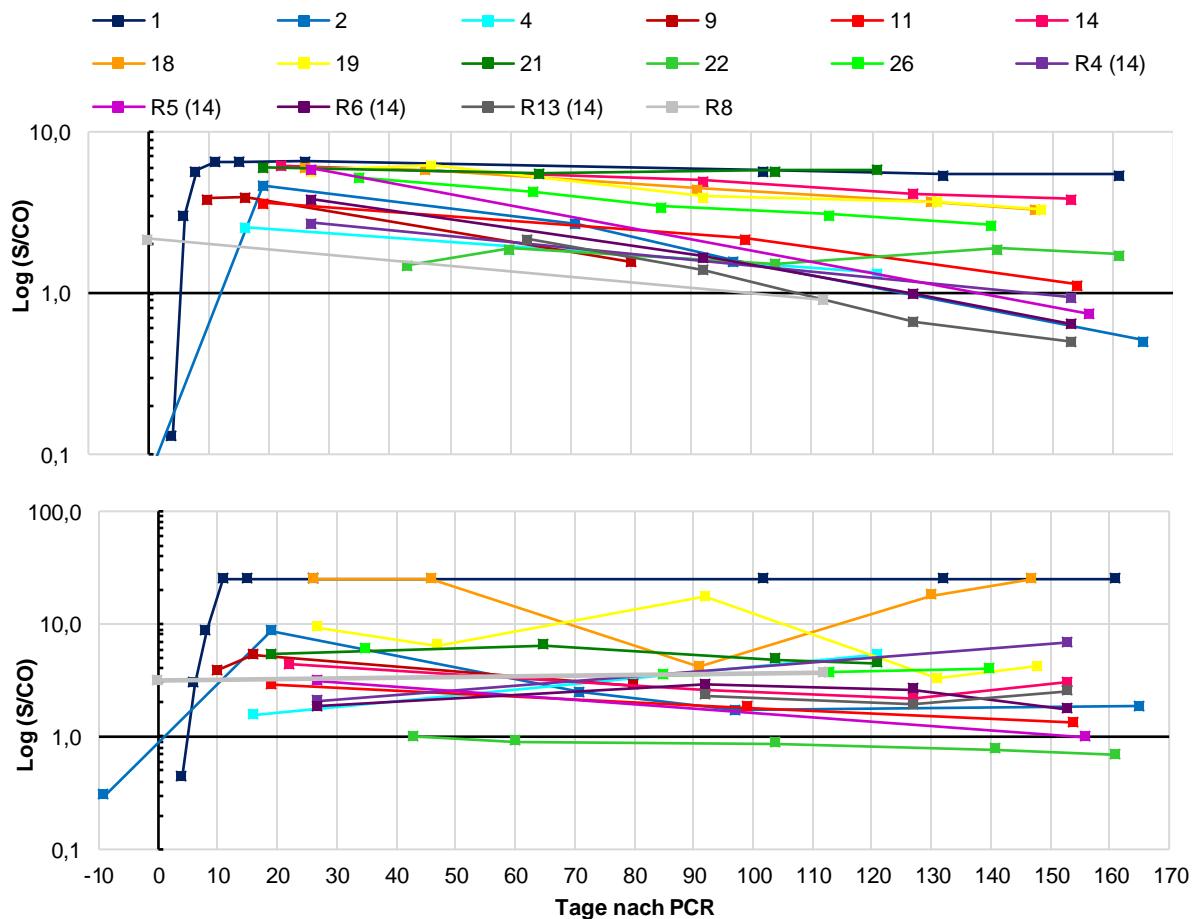
**Abb. 22: Ergebnisse der Testung von zwölf Routineproben in allen acht SARS-CoV-2-IgG- bzw. Gesamtantikörpertests.** Ein S/CO-Wert größer gleich eins wurde als positiv festgelegt. In der Tab. unterhalb sind die Ergebnisse des ViraChip® IgG-Tests und der recomLine-Immunoblots dargestellt. N steht für negativ, p für positiv und nd für nicht durchgeführt. Die positiven Ergebnisse sind rot gekennzeichnet (abgeändert nach Strömer et al., 2020a).

### 3.2.5 Kinetik der SARS-CoV-2-IgG-Antikörper im Zeitverlauf

Da in den zuvor getesteten Assays der auf dem N-Protein-basierende Test der Firma Abbott und der auf dem S-Protein als Antigen beruhende Test der Firma Virion-Serion die höchste Sensitivität und eine sehr hohe Spezifität zeigten (Tab. 9), wurden beide Tests zur Untersuchung der Kinetik der SARS-CoV-2-spezifischen IgG verwendet. Von insgesamt 16 Patienten wurde hierzu zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blut entnommen und im Verlauf getestet. Elf dieser Patienten hatten eine COVID-19-Erkrankung, vier waren Familienmitglieder des COVID-19-Patienten Nr. 14 und die Routineprobe Nr. 8 wurde ebenfalls in die Untersuchung einbezogen. Die Entnahme der letzten Probe lag in einem Bereich zwischen 80 und 161 d, der Median betrug 148 d nach der PCR. In der Beurteilung auf die Entwicklung der N-spezifischen IgG-Antikörper, die durch den Assay der Firma Abbott untersucht wurde, entstanden zwei unterschiedliche Gruppen von Testpersonen. Die erste Gruppe zeigte im Verlauf einen recht stabilen IgG-Spiegel. Sie bestand aus sechs der 16 getesteten Proben. In der zweiten Gruppe zeigte sich eine deutliche Abnahme der IgG-Antikörper (Abb. 23 A).

Die durch den Test der Firma Virion-Serion analysierte S-Protein-spezifische IgG-Reaktion wurde bei nahezu allen Testpersonen nachgewiesen und zeigte sich bei zehn Proben (91,0 %) stabil. Lediglich das Serum des COVID-19-Patienten Nr. 22 wies einen IgG-Verlust auf

(Abb. 23 B). Drei von 16 Patienten (ca. 19 %) entwickelten in einem Zeitraum von 65 bis 130 d nach der Infektion virusspezifisches IgG mit hoher Antigenbindungsstärke (Avidität) (Abb. A5, siehe Anhang).



**Abb. 23: Zeitverläufe von SARS-CoV-2-IgG bei elf COVID-19-Patienten sowie fünf Routinepatienten** (mit R gekennzeichnet), zu denen vier Proben der Familienmitglieder eines bestätigten COVID-19-Patienten gehören. Ein S/CO-Wert >1 wird als IgG-positiv angesehen. Teil A der Abb. zeigt die Ergebnisse des auf dem N-Protein als Antigen basierenden Assays der Firma Abbott, in Teil B sind die Resultate des S-Protein-spezifischen Virion-Serion-Tests dargestellt (nach Strömer et al., 2020a).

## 4. Diskussion

### 4.1 SARS-CoV-2-Diagnostik durch PCR-Nachweis der viralen RNA

Zum Nachweis von SARS-CoV-2 wurden seit Beginn der Pandemie mehrere Protokolle für Echtzeit-RT-PCRs veröffentlicht (Jayamohan et al., 2021). Für die vorgelegte Arbeit wurden die von der Arbeitsgruppe Prof. Drosten/Dr. Corman im Januar 2020 veröffentlichten *Primer*- und Sondensequenzen zum Nachweis des E- bzw. N-Gens von SARS-CoV-2 (Corman et al., 2020) genutzt. Zusätzlich wurden diese um ein *Primerpaar* sowie Sonden für den Nachweis des menschlichen GAPDH-Gens (Verreault et al., 2015) ergänzt, sodass eine korrekte Probenentnahme demonstriert werden konnte. Ein weiteres *Primerpaar* und Sonden (Payan et al., 2007) dienten dem RNA-Nachweis des behüllten RNA-Phagen  $\Phi 6$ , der zu den Patientenproben gegeben wurde. Dadurch konnte sowohl die erfolgreiche Nukleinsäure-Extraktion als auch die reverse Transkription der RNA in cDNA und deren anschließende RCR-Amplifikation überprüft werden. Beide Triplex-Protokolle (E-Gen/GAPDH/ $\Phi 6$  bzw. N-Gen/GAPDH/  $\Phi 6$ ) wurden vergleichend untersucht. Dabei zeigte sich, dass sie in der Lage sind, eine SARS-CoV-2-Infektion sicher und spezifisch nachzuweisen. Die E-Gen-Triplex-PCR zeigt etwas bessere Resultate, der Ct-Wert liegt im Mittel circa 2,6 unter dem der N-Gen-PCR.

Innerhalb einer PCR können mehrere SARS-CoV-2-Gene gleichzeitig nachgewiesen werden. Diese sogenannten *dual-* oder *triple-target*-Strategien könnten die Qualität der Ergebnisse beeinflussen (Colton et al., 2021). Allerdings wurde berichtet, dass die Leistung unterschiedlicher Kits nicht unbedingt mit der Anzahl der Targets korreliert (Hu et al., 2020). Daher kann eine Monotarget-Strategie mit der E-Gen-PCR verbunden mit dem Nachweis von GAPDH und dem Phagen  $\Phi 6$  zur Sicherung der Prozessqualität ebenfalls in der Routinediagnostik genutzt werden, zumal die E-Gen-Region ausreichend konserviert ist (Okamaoto et al., 2020). Die *Primer*- und Sondensequenzen sollten jedoch regelmäßig überprüft und gegebenenfalls aktualisiert werden. Dies kann unter anderem durch die externe Qualitätssicherung gewährleistet werden, die im Rahmen von Ringversuchen regelmäßig erfolgt.

Die minimale Viruslast, die für den Virusnachweis in den PCRs ausreicht, schwankt zwischen 200 und 1000 Kopien/ml (E-Gen-PCR) und 2000 und 10.000 Kopien/ml (N-Gen-PCR). Gesichert positive Ergebnisse können bei einer Viruslast von 2000 Kopien/ml für die E-Gen-PCR und 22.000 Kopien/ml für die N-Gen-PCR erwartet werden. Dies zeigt, dass die Echtzeit-RT-PCR das Genom des SARS-CoV-2-Virus auch bei geringer Viruskonzentration in der Patientenprobe nachweisen kann.

Betrachtet man die Infektiosität immungesunder COVID-19-Patienten im Zeitverlauf, so wird zu Beginn der Symptomatik eine sehr hohe Viruslast gemessen. Am 21. d fällt diese unter die Nachweisgrenze. Der Höhepunkt der Infektiosität zeigt sich um den Zeitpunkt des Symptombeginns herum, danach nimmt die Infektiosität innerhalb von 7 d rasch ab (He et al., 2020). In einer Studie wurde die höchste Viruslast mit  $10^8$  Kopien/ml circa 4,3 d nach Beginn der Virusausscheidung geschätzt (Jones et al., 2021). Neben der Bestimmung der Viruslast kann über die erfolgreiche Anzucht des Virus in Zellkulturen die Infektiosität abgeschätzt werden. Die mittlere Kulturisolations-Wahrscheinlichkeit sinkt 5 d nach Messung der höchsten Viruskonzentration deutlich (Jones et al., 2021).

Im Vergleich zu einem kommerziellen PCR-Kit, das auf den Nachweis des viralen N-Gens abzielt, schnitt die im Labor entwickelte N-Gen-PCR gut ab. Der Unterschied in der Leistungsfähigkeit zwischen beiden Methoden war zu vernachlässigen. Der besondere Vorteil der im Labor entwickelten PCR ist die Verwendung der thermolabilen UDG in dem Präamplifikationsschritt, wodurch amplifikationsbedingte Kontaminationen vermieden werden und der Entstehung falsch-positiver PCR-Ergebnisse vorgebeugt werden kann, die durch Verschleppungen von Amplifikationsprodukten vorausgegangener Experimente verursacht wird (Kwok und Higuchi, 1989; Longo et al., 1990). Das eingesetzte Enzym UDG entfernt Uracil, einen RNA-Baustein, der statt Thymidin in den Nukleotidmix der PCR gegeben wird, aus PCR-Amplikaten. Daher entstehen freies Uracil und apyrimidische Stellen in der DNA (Schormann et al., 2014; Dianov und Lindahl, 1994). Ab 55 °C wird die thermolabile UDG allerdings vollständig inaktiviert, sodass die Reverse Transkriptase in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt wird (Bei et al., 2021). Ein robustes PCR-Protokoll, das wenig anfällig für Kontaminationen ist, eignet sich besonders gut für den Hochdurchsatz im Routinelabor.

Diagnostische Labors spielen gerade zu Beginn von Pandemien durch die Entwicklung und Anwendung molekularer Diagnosetechniken eine tragende Rolle im Hinblick auf den schnellen und sicheren Nachweis neu aufgetretener Mikroorganismen (Younes et al., 2020; Song et al., 2019; Parreira, 2018). Das Know-How zur eigenen Testentwicklung in den Routinelabors zu erhalten ist wesentlich, damit auf das Auftreten neuartiger Erreger rasch reagiert werden kann. Die vermehrte bis ausschließliche Anwendung kommerzieller In-Vitro-Diagnostika in medizinischen Laboren, wie vom Gesetzgeber gefordert (Europäisches Parlament und Rat der EU, 2017), könnte zu einem Verlust derartiger Expertise führen, sodass zu befürchten ist, dass zukünftigen Pandemien schlechter begegnet werden kann.

Gegebenenfalls könnte durch weitere Anpassungen, zum Beispiel durch Variationen des PCR-Temperaturprofils oder der Primer-Sonden-Konzentrationen, die N-Gen-PCR an die Leistungsfähigkeit der E-Gen-basierten Triplex-PCR weiter angenähert werden. Minimale

Unterschiede in der Leistungsfähigkeit verschiedener SARS-CoV-2-RT-RCRs sind auch von anderen Autoren beschrieben worden (Jayamohan et al., 2021; Tahamtan und Ardebili, 2020; Corman et al., 2012b), spielen aber für die Diagnostik symptomatischer Patienten mit hohen und mittleren Viruslasten keine Rolle.

Relativ früh im Verlauf der Pandemie wurde über Lieferengpässe berichtet, welche die SARS-CoV-2-Diagnostik und somit einen wichtigen Grundpfeiler in der Pandemiebekämpfung gefährdeten (Benham et al., 2020; Hagen, 2020; Sarata und Siddalingaiah, 2021). Im Hinblick hierauf bietet das *In-house*-Verfahren eine sehr hohe Flexibilität, da beispielsweise nachgewiesene Zielregionen im viralen Genom, Aufarbeitungsmethoden, die verwendete PCR-Plattform und PCR-Zusätze variabel an die vorhandenen Möglichkeiten angepasst und somit Schwierigkeiten in der Beschaffung umgangen werden können.

Rhodamine gehören zu den lumineszierenden Verbindungen (Valeur und Berberan-Santos, 2012). Rhodamin-Farbstoffe zeichnen sich durch günstige photochemische und photophysikalische Eigenschaften aus (He et al., 2003; Georgi et al., 1990). Sie eignen sich unter anderem zur Fluoreszenzmarkierung und Einzelmoleküldetektion (Uddin und Marnett, 2008; Johnson et al., 1980; Belmont et al., 1990). ROX ist ein passiver Fluoreszenzfarbstoff, der in der PCR zur Signalnormalisierung verwendet wird (SignaGen, 2019). Unterschiede im Fluoreszenzsignal, die zum Beispiel durch variierende Volumina in den einzelnen Wells der Platte aufgrund von Pipetierfehlern entstehen und das Ergebnis der PCR verfälschen können, werden durch Zugabe dieser Substanz ausgeglichen (SignaGen, 2019). Die Ergebnisse, die durch Verwendung eines Mastermixes mit bzw. ohne ROX erzielt wurden, stimmten weitgehend überein. Im Falle eines Liefermangels könnte die PCR ohne ROX zuverlässig durchgeführt werden.

Niedrige SARS-CoV-2-Prävalenzen vorausgesetzt, kann das Testen gepoolter Proben die Abläufe der Routinediagnostik verbessern, da durch diese Technik Zeit, Reagenzien und Verbrauchsmaterial gespart werden können. Die Differenz des Ct-Werts von 3,73 in einem Pool von acht Patientenproben würde ein positives Ergebnis von Proben mit einem einzelnen Ct-Wert um 36 ermöglichen. Das entspricht einer Viruslast von ungefähr 550 Kopien/ml (E-Gen) bzw. 5500 Kopien/ml (N-Gen). Pools aus 16 oder 30 Proben jedoch eignen sich nicht mehr bedenkenlos zur Routinetestung, da der Nachweis hier bereits ab einem Ct-Wert von 30 unsicher wird. Somit würden Proben mit einer Viruslast von circa 100.000 Kopien/ml (E-Gen) bzw. 1.000.000 Kopien/ml (N-Gen) nicht erfasst werden. Da sich große Anteile der getesteten Personen als SARS-CoV-2-negativ erweisen, können Pooltestungen ein probates Mittel sein, die diagnostischen Kapazitäten zu erweitern (Costa et al., 2021). Bei einer COVID-19-Prävalenz

von 10 % könnten laut einer Studie durch das Testen von Proben in 4er-Pools bis zu 42 % der Reagenzien eingespart werden (Aragón-Caqueo et al., 2020).

Zudem können durch diese Art der Testung die Kosten reduziert und auch den Bevölkerungsgruppen mit niedrigem Einkommen, die ansonsten Schwierigkeiten hätten, eine Testung zu finanzieren, Untersuchungsmöglichkeiten eröffnet werden (Hengel et al., 2021; Peeling et al., 2020). Gerade im Bereich der Kinderbetreuung konnten sich im Laufe der Pandemie sogenannte „Lolli-Tests“ etablieren. Hier lutschten die Kinder für 30 s an einem Tupfer, als wäre dieser ein „Lolli“. Diese Tupfer wurden in einem einzelnen Röhrchen gesammelt und gemeinsam mittels PCR getestet. Ein weiterer „Lolli“-Test, der im Falle eines positiven Pools neu durchgeführt und einzeln ausgewertet werden konnte, wurde dem Kind mit nach Hause gegeben (Robert-Koch-Institut, 2021). Die Grundlage dieser Teststrategie setzt voraus, dass SARS-CoV-2 auch im Speichel nachgewiesen werden kann (Wyllie et al., 2020).

Der Einfluss verschiedener Methoden der Nukleinsäure-Extraktion auf das Ergebnis der SARS-CoV-2-PCR wurde beispielhaft durch den Vergleich der manuellen Extraktion mithilfe des Qiagen Viral RNA Mini Kit mit der maschinellen Extraktion mit dem MagNA-Pure-Compact-Instrument untersucht. Des Weiteren wurde die maschinelle Aufbereitung via MagNA-Pure-Compact-Instrument mit dem KingFisher-Flex-System verglichen. Die Ergebnisse der manuellen Extraktion waren größtenteils denen der maschinellen überlegen. Allerdings kann die größere Fehleranfälligkeit zu weniger zuverlässigen Resultaten führen. Zudem werden bei der manuellen Extraktion mehr Laborpersonal und Verbrauchsmaterialien benötigt, sodass die automatisierte Nukleinsäure-Extraktion für die Routinediagnostik besser geeignet zu sein scheint. Im Vergleich der beiden maschinellen Systeme schneidet das KingFisher-Flex-System besser ab als die Extraktion durch das MagNA-Pure-Compact-Instrument. Die Ct-Werte der durch die KingFisher-Methode aufbereiteten Proben waren circa zwei Werte geringer als diejenigen der via MagNA-Pure-Compact-Instrument extrahierten Proben. In einer Studie konnte ermittelt werden, dass die Effizienz der manuellen und automatisierten Verfahren sich zwar ähnelt, die maschinelle Methode jedoch zu besser reproduzierbaren Ergebnissen führte (Barrio et al., 2021). Bei der Nukleinsäure-Extraktion mittels Silica-Beads konnte keine qualitative Verbesserung oder Verschlechterung festgestellt werden. Neben der erhöhten Effizienz zeigte sich jedoch ein zeitlicher Vorteil dieses Systems (Yamaguchi et al., 2016).

## 4.2 SARS-CoV-2-Diagnostik durch Antigen-Schnelltests

Für die Bewältigung der SARS-CoV-2-Pandemie ist eine einfache und schnelle Diagnostik, am besten unabhängig von geschultem Personal, speziellen Geräten und sowohl teuren als auch knappen Reagenzien von hohem Wert (Mina et al., 2020; Krüger et al., 2020; Liotti et al., 2021). Für diese Anforderung stellen immunchromatische Kassettentests, die durch eine sogenannte *Lateral-Flow*-Technik eine Infektion mit SARS-CoV-2 nachweisen können, eine potentielle Lösung dar. Da sie keinen Amplifikationsschritt beinhalten, können diese Verfahren SARS-CoV-2-Infektionen nur dann nachweisen, wenn die Viruslast in der Probe ausreichend hoch ist (Mina et al., 2020; Krüger et al., 2020; Liotti et al., 2021; van Beek et al., 2020; Hirotsu et al., 2020; Porte et al., 2020). In mehreren Studien wurde festgestellt, dass die Viruslast im oberen Respirationstrakt zu Beginn der Infektion hoch ist (Cevik et al., 2021; Byrne et al., 2020; He et al., 2020; Lauer et al., 2020; Walsh et al., 2020; Wölfel et al., 2020; Zou et al., 2020) und in der Regel mit dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome korreliert (He et al., 2020; Zou et al., 2020; Walsh et al., 2020). Eine Diagnostik durch einen antigenbasierten Schnelltest kann also zu diesem Zeitpunkt der Erkrankung zuverlässig angewendet und deren Verbreitung durch rasche, gezielte Isolation verhindert werden (Igloi et al., 2021; van Beek et al., 2020; Krüger et al., 2020; Corman et al., 2021; Berger et al., 2021; Mina et al., 2020). Zudem könnte das recht kleine diagnostische Fenster durch häufiges Testen ausgeglichen werden (Mina et al., 2020).

Mittlerweile ist bekannt, dass auch asymptomatische Personen hohe Viruslasten in ihrem Respirationstrakt aufweisen können, die mit denen von COVID-19-Patienten vergleichbar sind (Walsh et al., 2020; van Kampen et al., 2021). Da sich Personen ohne Krankheitsgefühl des Übertragungsrisikos nicht bewusst sind, können sie viele Mitmenschen anstecken. Durch eine engmaschige Testung könnte dieses Risiko minimiert werden (Igloi et al., 2021). Da eine hohe Infektiosität mit einer hohen Viruslast einhergeht, könnten POCTs ebenfalls helfen, nicht mehr ansteckende Personen zu identifizieren und diese aus der Isolation zu entlassen (Corman et al., 2021; Mina et al., 2020). Die Leistung dieser Tests, die mittlerweile in großer Zahl auf dem Markt erschienen sind, wurde in einigen Studien untersucht (Berger et al., 2021; Igloi et al., 2021; Krüger et al., 2020; Liotti et al., 2021; van Beek et al., 2020; Corman et al., 2021; Scheiblauer et al., 2021).

In unserer Studie wurden drei POCTs zum direkten Nachweis von SARS-CoV-2-Antigen verglichen. Alle drei Assays konnten hoch positive Proben zuverlässig nachweisen. Der NADAL® COVID-19 Ag-Test konnte alle 32 getesteten Proben mit einem Ct < 25 nachweisen, im Panbio™ COVID-19-Antigen-Schnelltest konnten acht von neun getesteten Proben mit einem Wert < 25 als positiv erkannt werden. Dieser Ct-Wert entspricht, abgeleitet von unseren

Untersuchungen zur Linearität der verschiedenen PCRs, einer Viruslast von ca.  $\geq 10^8$  Kopien/ml in der N-Gen-Triplex-RT-PCR, durch die diese Proben vorab getestet wurden (siehe Abb. 11). Der Standard Q COVID19 Ag von SD Biosensor konnte acht von neun getesteten Proben mit einem Ct-Wert  $< 25$  erkennen. Diese waren jedoch vorher durch die E-Gen-Triplex-PCR charakterisiert worden, sodass dieser Ct einer Viruslast von ca.  $\geq 10^7$  Kopien/ml entspricht.

Mit steigendem Ct-Wert sinkt die Nachweisrate der untersuchten POCTs deutlich. Der NADAL® COVID-19 Ag-Test konnte noch 47 von 76 Proben (61,8 %) mit einer Viruslast von ca.  $10^{6-8}$  Kopien/ml nachweisen (Ct-Werte 25 - 30 in der N-Gen-Triplex-PCR), der Panbio™ COVID-19-Antigen-Schnelltest konnte sechs von zwölf Proben (50 %) erkennen, der Standard Q COVID19 Ag-Test erkannte eine von zwei (50 %) in dem Bereich einer Viruslast von ca.  $10^{5-7}$  Kopien/ml liegenden Proben (CT-Werte 25 - 30 in der E-Gen PCR). Bei einem Ct  $> 30$ , also einer Viruslast  $< 10^6$  Kopien/ml in der N-Gen-Triplex-PCR, konnten der NADAL® COVID-19 Ag-Test und der Panbio™ COVID-19-Antigen-Schnelltest keine der getesteten Proben mehr nachweisen. Der Standard Q COVID19 Ag-Test konnte eine von acht getesteten Proben mit einem Ct  $> 30$ , also einer Viruslast von  $\leq 10^5$  Kopien/ml in der E-Gen-Triplex-PCR, als positiv detektieren. Daher lässt sich schlussfolgern, dass Viruslasten  $< 10^6$  Kopien/ml nicht mehr zuverlässig nachzuweisen sind. Aus der Literatur und Versuchen der Arbeitsgruppe Profs. Krumholz/Fickenscher ist bekannt, dass eine erfolgreiche Anzucht des Virus in der Zellkultur eine ausreichende Viruslast voraussetzt (Cevik et al., 2021) und eine Million Kopien/ml als ungefähre Grenze für die Anzüchtbarkeit gelten (Strömer et al., 2020a). Eine erfolgreiche Anzucht des Virus ist nach mehr als 10 d nach Symptombeginn unwahrscheinlich (Arons et al., 2020; Bullard et al., 2020; The COVID-19 Investigation Team, 2020), selbst wenn die Patienten in der RT-PCR über einen längeren Zeitraum geringere Ct-Werte, also hohe Viruslasten aufwiesen (Cevik et al., 2021). Allerdings konnte bei Patienten mit starken Symptomen bis zu 20 d nach Beginn der Symptome noch eine erfolgreiche Anzucht durchgeführt werden (van Kampen et al., 2021). Bemerkenswert ist, dass auch bei präsymptomatischen Patienten in einigen Fällen eine Virusanzucht 6 d bis in seltenen Fällen sogar 10 d vor Ausbruch der Symptome gelang (Singanayagam et al., 2020; Arons et al., 2020).

Die Aussagekraft der hier vorgelegten Ergebnisse der Evaluation des Schnelltests von SD Biosensor ist durch den vergleichsweise geringen Stichprobenumfang von 20 bzw. 21 respiratorischen Materialien eingeschränkt. In einer größer angelegten Studie mit einem Probenumfang von 330 zeigt sich eine Sensitivität von 70,6 % (Cerutti et al., 2020), die unsere Schätzung von 52 % deutlich übersteigt. Der NADAL® COVID-19 Ag-Test zeigte in unserer Studie eine Sensitivität von 73,1 %, die in einer weiteren Studie bestätigt wurde (Ifko et al., 2021). In

einer anderen Untersuchung wurde eine Sensitivität von 50 % berichtet (Kohmer et al., 2021). Die Auswertung des Panbio™ COVID-19-Antigen-Schnelltests in zwei weiteren Studien ergab eine Gesamtsensitivität von circa 48 % (Farfour et al., 2021; Torres et al., 2021), die mit unserer Schätzung von 57 % gut übereinstimmt. In einer anderen Untersuchung wurde für diesen Test eine Sensitivität von knapp 80 % festgestellt (Albert et al., 2021). Eine weitere Studie, in der 122 Tests untersucht wurden, konnte bei 79 % eine Sensitivität von > 75 % für Proben mit einem Ct-Wert  $\leq 25$  festgestellt werden. Bei Ct-Werten zwischen 20 und 30 konnten noch knapp 21 % der einbezogenen Antigen-Schnelltests die Proben als positiv erkennen (Scheiblauer et al., 2021). Als Ursachen für diese doch stark schwankenden Schätzungen der Testsensitivitäten ist u.a. die fehlende Standardisierung der Untersuchungsbedingungen zu nennen. Zudem sind Ct-Werte, die mit verschiedenen PCR-Methoden ermittelt wurden, nicht unmittelbar vergleichbar. Das zeigt sich schon am Beispiel der hier angewandten laboreigenen E- und N-Gen-basierten Verfahren, die um einen mittleren Ct-Wert von ca. 3 voneinander abweichen.

Für die Ermittlung der Sensitivitäten der POCTs sind Viruskonzentrationen heranzuziehen, von deren klinischer Relevanz ausgegangen werden kann. Eine Viruskonzentration von  $10^6$  Genomkopien/ml wird als Schwellenwert für die In-Vitro-Anzucht in der Zellkultur und daher als bedeutsam angesehen (Néant et al., 2021; van Kampen et al., 2021; Jones et al., 2021; Mollan et al., 2021). Orientierend kann zur Einschätzung der Sensitivität der POCTs auch eine laboreigene kategoriale Einteilung der untersuchten Proben in „hoch positiv“, „schwach positiv“ und „negativ“ genutzt werden. Die POCTs sind meist in der Lage „hoch positive“ Proben zuverlässig nachzuweisen (Igloi et al., 2021; Krüger et al., 2020; van Beek et al., 2020; Corman et al., 2021; Liotti et al., 2021; Berger et al., 2021; Porte et al., 2020; Hirotsu et al., 2020).

Die von uns untersuchten Tests erzielen in ihrer klinischen Anwendung mutmaßlich sogar noch etwas bessere Ergebnisse. So war für die nachträgliche Untersuchung der vorab in der PCR getesteten und im Kühlschrank zwischengelagerten Proben eine Verdünnung in Phosphat-gepufferter Salzlösung nötig. Eine direkte Testung eines parallel zum PCR-Abstrich entnommenen Zweitabstrichs für die unmittelbare Untersuchung im POCT hätte vermutlich zu besser vergleichbaren Ergebnissen geführt. So könnten auch die Diskrepanzen zwischen den von uns ermittelten Sensitivitäten und den Herstellerangaben erklärt werden, die im Bereich von 93 % (Panbio (Masuga, 2020)) über 94 % (Fa. nal von Minden, verfügbar unter <https://www.covid-selbst-testen.de/>, zuletzt aufgerufen am 03.11.2022) bis zu 97 % lagen (SD Biosensor, 2022).

Der *Rapid-Slice-Scanner* der Firma nal von Minden könnte die Diagnostik der Antigen-Tests erleichtern, da bisher nur eine subjektive Bewertung des Tests durch das menschliche Auge

möglich war (Igloi et al., 2021). Bei Untersuchungen der Empfindlichkeit der Antigen-Schnelltests für die VOC ließ sich beobachten, dass sowohl die VOC B.1.1.7 (Alpha) (Kontogianni et al., 2021; Jungnick et al., 2021) als auch die VOC B.1.351 (Beta), VOC P.1 (Gamma) und VOC B.1.617.2 (Delta) zuverlässig erkannt wurden. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass B.1.1.529-(Omkron)-positive Patientenproben im Vergleich zu B.1.617.2-(Delta)-positiven Proben eine zehnfach höhere Viruskonzentration aufweisen müssen, damit sie in Antigen-Schnelltests ausreichend sicher erkannt werden können (Osterman et al., 2022). Das liegt allerdings nicht in Unterschieden der viralen Antigene begründet (Osterman et al., 2022; Meiners et al., 2022), sondern wahrscheinlich in der Tatsache, dass bei Geimpften oder Rekonvaleszenten die Immunantwort und damit die Symptomatik früher einsetzt, sodass noch nicht ausreichend Antigen im Nasenrachenraum vorhanden ist, wenn sich die Patienten testen (Meiners et al., 2022).

Da insbesondere bei einer niedrigen Krankheitsprävalenz Fehlbestimmungen wahrscheinlicher werden, sollten positive Ergebnisse der Antigen-Schnelltests über eine RT-PCR bestätigt werden (Krüger et al., 2020). Im Labor Dr. Krause und Kollegen MVZ GmbH hatten 508 der 761 Proben (66,8 %), die in dem Zeitraum von August 2020 bis Oktober 2020 analysiert wurden, einen Ct-Wert > 24 und 193 Proben (25,4 %) einen Ct-Wert > 30 (vorwiegend N-Gen-PCR, Abb. A6, siehe Anhang). Daher ist eine Routinediagnostik mit einem Antigen-Test für ein medizinisches Labor als zu ungenau zu bewerten; zu viele Proben würden nicht als viruspositiv erkannt werden.

Da diese Tests jedoch sehr einfach durchzuführen und kostengünstig sind, können sie durchaus von Bedeutung sein. Insbesondere im Hinblick auf das Entlassmanagement sind diese Art der Tests interessant, da nicht mehr infektiöse Patienten, obwohl in der PCR möglicherweise noch positiv, in den POCTs bereits als negativ klassifiziert werden können und somit die Isolation der Betroffenen frühzeitiger beendet werden kann (Mina et al., 2020; Corman et al., 2021).

#### 4.3 Indirekter, serologischer Nachweis einer SARS-CoV-2-Infektion

Neben der Akutdiagnostik mit dem RNA- oder Antigen-Nachweis kann eine stattgehabte SARS-CoV-2-Infektion über die Anwesenheit virusspezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Dafür wurden rasch viele Tests entwickelt und auf den Markt gebracht. Diese wurden schon frühzeitig in einigen Studien analysiert (Kontou et al., 2020; Okba et al., 2020; Kohmer et al., 2020; Krüttgen et al., 2020; Lassaunière et al., 2020). In einer weiteren Untersuchung wurden die Empfindlichkeiten von sieben Antikörpertests ermittelt, die Spezifitäten jedoch nicht untersucht (Schnurra et al., 2020).

In dieser Studie wurden acht kommerziell erhältliche Tests auf ihre Eignung zur Diagnostik von SARS-CoV-2 geprüft. Zwei Versionen eines Immunblots wurden durchgeführt, wobei ebenfalls eine Aviditätsbestimmung der SARS-CoV-2-Antikörper integriert wurde. Durch die maschinelle Ausführung konnten die Assays der Firmen Abbott, DiaSorin und Roche in Bezug auf die Anwendungszeit überzeugen. Anhand von Rekonvaleszenzseren von 26 Patienten wurden die Sensitivitäten der Tests ermittelt. Alle genutzten Proben wurden durch die Durchführung einer RT-PCR auf SARS-CoV-2 schon vorher charakterisiert.

Die Leistung der Assays wurde im Vergleich zu den Ergebnissen der SARS-CoV-2-PCR bewertet, die aufgrund ihrer hohen Präzision als Referenz (Kellam und Barclay, 2020) genutzt wurde. Die Empfindlichkeiten lagen zwischen 80,0 % bei den Tests von Euroimmun und Epitope und 96,2 % bei den Tests von Abbott und Virion-Serion (Tab. 9), was auch in anderen Untersuchungen (Kohmer et al., 2020; Krüttgen et al., 2020; Lassaunière et al., 2020; Schnurra et al., 2020; Peterhoff et al., 2021) und in einer Metaanalyse (Kontou et al., 2020) berichtet wurde. Die Spezifität der Tests lag zwischen 96,0 % und 100,0 % (Tab. 9). Diese Ergebnisse stimmen mit Resultaten anderer Forschungsgruppen überein (Kohmer et al., 2020; Krüttgen et al., 2020; Lassaunière et al., 2020; Peterhoff et al., 2021).

In unserer Studie wurde wie auch von anderen Autoren (Wu et al., 2020) eine nicht regelhafte Ausbildung virusneutralisierender Antikörper bei ambulanten COVID-19-Patienten beobachtet (Strömer et al., 2020b). Ein möglicher Grund hierfür könnte u.a. ein mutmaßlich milder, ambulant zu beherrschender Krankheitsverlauf sein, in dessen Folge sich verhältnismäßig wenig Antikörper bilden.

Einige Studien zeigen, dass sich nach einer überstandenen Infektion mit COVID-19 ein stabiler Antikörperschutz für mindestens zehn Monate einstellt (Schiffner et al., 2021). Allerdings existieren einige Untersuchungen, die eine rasche Abnahme der Antikörper bei asymptomatischen Personen beschreiben (Long et al., 2020b), bei Patienten mit mildem Verlauf (Ibarrondo et al., 2020), jedoch auch bei hospitalisierten Patienten mit signifikanten Symptomen (Seow et al., 2020).

Zudem wurden Unterschiede in der Kinetik zwischen N- und S-spezifischen Antikörpern festgestellt. Die vorhandenen N-spezifischen Immunglobuline zeigten in einer Untersuchung innerhalb der Testgruppe Schwankungen und fielen rasch ab, die Reaktion auf das S-Protein und dessen Rezeptorbindungsdomäne hingegen zeigte sich als stabiler (Ripperger et al., 2020; Iyer et al., 2020). Hierbei sind jedoch die S-Protein-spezifischen IgM- und IgG-Antikörper zu unterscheiden. Während sich IgG in einer Untersuchung nach einer Rückgangsphase über sechs Monate relativ stabil hielt, konnte IgM nach zwölf Wochen bereits nicht mehr

nachgewiesen werden (Wu et al., 2021). Daher lässt sich schlussfolgern, dass eine dauerhafte Anwesenheit von SARS-CoV-2-Antikörpern in sämtlichen Patientenserien als eher selten einzustufen ist. Dies wurde ebenfalls bei der Infektion mit dem ersten SARS-CoV sowie mit MERS-CoV beobachtet (Sariol und Perlman, 2020).

Beide Versionen des von uns getesteten Immunblots konnten den Großteil der mit SARS-CoV-2 infizierten Patientenserien erkennen (Abb. 21). Sie sind also geeignet, die Reaktivität spezifischer SARS-CoV-2-IgG-Antikörper zu beurteilen. Eines der Seren, das im Winter 2018/2019 entnommen wurde und zur Bestimmung der Spezifität dienen sollte, zeigte sich im Mikrogen-Assay als positiv. Allerdings wurde dies in den Assays von Roche und Viramed sowie in der ersten Version des Immunblots nicht bestätigt. Daher kann geschlussfolgert werden, dass die Kreuzreakтивität mit bereits zirkulierenden humanen CoV kein bedeutendes Problem in der Diagnostik darstellt, obgleich die Ergebnisse der Immunblots zeigten, dass in annähernd allen getesteten Seren auch Antikörper gegen Antigene der humanen CoV 229E, HKU1, NL63, OC43 und SARS-CoV-2 nachgewiesen zu finden waren (Abb. A5, siehe Anhang).

Die Assays, die in unseren Untersuchungen die höchsten diagnostischen Genauigkeiten aufwiesen, wurden für die Analyse die Kinetik der SARS-CoV-2-Antikörper verwendet (Tab. 9). Dafür wurden aufeinanderfolgende Seren von elf SARS-CoV-2-Patienten und fünf Routineproben, von denen vier von Familienmitgliedern eines bestätigten COVID-19-Falls stammten, mit einem Abstand von bis zu 165 d im Assay von Abbott, der das N-Antigen nachweist, und im Assay von Virion-Serion, der auf die Gesamtheit der S-Antigene abzielt, wiederholt getestet. Der S-Protein-basierte Test lieferte stabilere Ergebnisse als der N-Protein-basierte Test, bei dem einige Probanden einen raschen Abfall der IgG-Antikörper zeigten (Abb. 23). Diese Beobachtung steht in Einklang mit einer anderen Studie (Ripperger, 2020). S-Protein-basierte Assays sollten daher bevorzugt für seroepidemiologische Fragestellungen verwendet werden. Diese Assays können aber nicht zwischen einer infektionsbedingten und einer impfbedingten Immunantwort unterscheiden. Diese Differenzierung ist nur durch N-Protein-basierte IgG-Assays möglich, da nur nach einer Infektion Antikörper gegen das N-Protein gebildet werden. Insofern haben diese Tests aufgrund der bereits hohen Impfquote in der Bevölkerung (76,2 % Grundimmunisierte in Deutschland (Bundesministerium für Gesundheit, 2022)) zum Nachweis einer abgelaufenen Infektion an Bedeutung gewonnen. Dies sollte dann jedoch innerhalb weniger Monate nach der Infektion geschehen. Außerdem ist der Antikörper-Nachweis nützlich zur Überprüfung, ob Impfungen bei immunkompromittierten Personen Aussicht auf Erfolg haben.

Alle in der vorgelegten Arbeit verwendeten Antikörper-Tests basieren auf Antigenen, die am ehesten dem im Jahr 2020 zirkulierenden Wuhan-Stamm entsprechen. Wünschenswert wäre

die Entwicklung und breitere Anwendung von Antikörpertests, die auch das S-Gen aktueller Virusvarianten als Antigene beinhalten.

Die Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen, die davon abhängig ist, wie gut das Antigen zu der Bindungsstelle des Antikörpers passt (Schlüssel-Schloss-Prinzip), wird als Avidität bezeichnet (Gressner und Arndt, 2007). In kommerziellen Immunassays zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen werden bevorzugt hochaffide Antikörper eingesetzt, da sie durch die hohe Stabilität des Antikörper-Antigen-Komplexes zuverlässigere Ergebnisse hervorrufen (Gressner und Arndt, 2007). Obgleich die Mehrzahl (ca. 89 %) der in unserer Studie untersuchten Seren von COVID-19-Patienten neutralisierende Antikörper gegen einen SARS-CoV-2-Stamm von 2020 aufwiesen (Strömer et al., 2020a) zeigten lediglich drei Proben (ca. 19 %) eine Erhöhung der IgG-Avidität im Verlauf (Abb. A5, siehe Anhang). Die kleine Stichprobengröße schränkt allerdings die Aussagekraft dieser Beobachtung ein.

Das Vorliegen neutralisierender Antikörper kann vor einer erneuten Infektion mit dem gleichen SARS-CoV-2-Typ schützen (Addetia et al., 2020). Da aber die Konzentration der SARS-CoV-2-spezifischen Antikörper schon nach wenigen Monaten abnimmt, ist eine Reinfektion mit dem gleichen Virustyp durchaus denkbar. Jedoch wurden Reinfektionen mit COVID-19 beobachtet, die mit deutlich milderen Symptomen einhergingen (West et al., 2021) oder sogar völlig asymptomatisch waren (Bongiovanni, 2021), was auf ein gewisses Maß an adaptiver Immunantwort hindeutet (Sewell et al., 2020) und dadurch wahrscheinlich ein schwerer Krankheitsverlauf verhindert werden kann. Zudem spielt auch die zelluläre Immunität eine sehr wichtige Rolle bei der Abwehr von Reinfektionen (Havervall et al., 2022; Fergie und Srivastava, 2021; Wheatley, et al. 2021). Diese wurde in unseren Untersuchungen nicht betrachtet. Auch nach einer Infektion durch andere hCoV sind abnehmende Antikörperkonzentrationen und Reinfektionen beobachtet worden (Sariol und Perlman, 2020; Edridge et al., 2020; Kissler et al., 2020).

Neue Daten zeigen nach einer Erstinfektion auch für SARS-CoV-2 erneute Infektionen, darunter auch asymptomatische Verläufe (To et al., 2021). Besonders bei der VOC B.1.1.529 wurde infolge zahlreicher Mutationen im S-Gen über Reinfektionen mit SARS-CoV-2 nach der Infektion mit einer anderen Variante (Kannan et al., 2021; Araf et al., 2022; Pulliam et al., 2022) und über Impfdurchbrüche berichtet (Servellita et al., 2022; Chen et al., 2022).

Generell ist die seit Ende 2020 verfügbare SARS-CoV-2-Impfung von herausragender Bedeutung für die Pandemiebekämpfung (Sariol und Perlman, 2020). Eine Untersuchung der Impfantworten aus unserer Arbeitsgruppe ergab, dass nach der ersten Impfung die IgG-Prävalenz bei den zwei mRNA-Impfstoffen der Firmen BioNTech/Pfizer und Moderna und dem Vektorimpfstoff der Firma AstraZeneca AB von 55-100 % variierte, wobei der Vektorimpfstoff am

schwächsten und der mRNA-Impfstoff der Firma BioNTech Pfizer am besten abschnitt. Nach der Auffrischungsimpfung konnte in dieser Studie jedoch in allen Fällen eine Serokonversion beobachtet werden. Bei den Geimpften waren neutralisierende Antikörper gegen VOC B.1.1.7 (Alpha) messbar, während die neutralisierenden Antikörpertiter gegen die VOC B.1.671.2 (Delta) signifikant niedriger waren (Rose et al., 2022a).

In einer Untersuchung aus Israel wurde festgestellt, dass der mRNA-Impfstoff der Firma BioNTech/Pfizer die symptomatischen Infektionen, Krankenhauseinweisungen und Todesfälle bei der VOC B.1.1.7 um über 95 % senkt (Haas et al., 2021). Zudem wurde beobachtet, dass nach der Impfung eine Hemmung der RBD-ACE2-Bindung bei 80-100 % schon nach Erstimpfung auftrat. Die Avidität des IgG steigt wenige Wochen nach der Auffrischungsimpfung auf ein hohes Niveau (Neumann et al., 2021). Nach der dritten Impfung gegen SARS-CoV-2 konnten Antikörper gegen die S1-Untereinheit und die RBD mit sehr hoher Avidität nachgewiesen werden (Rose et al., 2022a). Bei immunsupprimierten Impflingen wurde eine deutlich geringere Avidität beobachtet, weswegen solche Patienten engmaschig überwacht werden sollten, damit eine Infektion rasch erkannt werden kann. Zudem bedürfen insbesondere Immunsupprimierte weiterer Auffrischungsimpfungen (Geisen et al., 2022). Auch eine SARS-CoV-2-Infektion bei nicht geimpften Personen führt nicht regelhaft zur Entwicklung von hochavidien IgG-Antikörpern im Zeitverlauf (Bauer et al., 2020; Strömer et al., 2020a; Neumann et al., 2021; Bauer, 2021), sodass von einer rasch absinkenden humoralen Immunität nach Infektion ausgegangen wird. Diese Unterschiede in der Aviditätsreifung bei immungesunden Geimpften im Vergleich zu ausschließlich Infizierten sind ein weiterer Beleg für die hohe Immunogenität der SARS-CoV-2-Impfstoffe.

Betrachtet man die Impfeffektivität in Bezug auf die Omikron-Variante, so tritt eine deutlich höhere Anzahl an Durchbruchsinfektionen auf (Rose et al., 2022b). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass diese VOC ein eigener Serotyp ist und daher der Schutz durch Impfung und Infektion mit anderen Varianten deutlich geringer ausfällt (Simon-Loriere und Schwartz, 2022). Dem wurde durch die Entwicklung von Impfstoffen begegnet, die an verschiedene Omikron-Linien (BA.1, BA.4, BA.5) angepasst und sind seit Spätsommer/Herbst 2022 in Deutschland zur Anwendung kommen (Paul-Ehrlich-Institut, 2022; Kannan et al., 2021; European Medicines Agency, 2022).

Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass die Fähigkeit zur raschen Entwicklung und Anpassung von insbesondere molekulardiagnostischen Verfahren zum Nachweis von Krankheitserregern in Hinblick auf künftig zu erwartende Pandemien von großer Bedeutung ist. Das zeigt sich erneut auch an einem seit Frühjahr 2022 in Deutschland und weiteren Ländern zu beobachtenden

Mpox-Ausbruch (Robert-Koch-Institut, 2022), für dessen Diagnostik zunächst auf laborentwickelte Verfahren zurückgegriffen werden musste.

Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit ließen sich durch weitere Untersuchungen ergänzen, die sich beispielsweise mit der Frage beschäftigen könnten, inwiefern die vielfältigen Testmöglichkeiten standardisiert und vergleichbarer gestaltet werden könnten und wie das Know-How zur laboreigenen Entwicklung von Nachweisverfahren aufrechterhalten werden kann. Ein weiterer interessanter Forschungsansatz wäre die Untersuchung der zellulären Immunantwort gegen SARS-CoV2 sowie der möglichen Gründe der rasch sinkenden humoralen Immunantwort, die in unserer Untersuchung beobachtet wurde. Die ständige Validierung der Diagnostik in Laboren sowie der fachliche Austausch sind von großer Bedeutung in der Bekämpfung von Pandemien und muss daher ständig Gegenstand aktueller Forschung bleiben.

## 5. Zusammenfassung

In der Coronavirus-Pandemie und danach ist der schnelle und zuverlässige Nachweis von Infektionen durch das *severe-acute-respiratory syndrome coronavirus type 2* (SARS-CoV-2) wesentlich. In der vorliegenden Arbeit sollten direkte und indirekte Verfahren für den SARS-CoV-2-Nachweis validiert und auf ihre Eignung für die Routinediagnostik untersucht werden.

Die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) in Echtzeit ist der Goldstandard für die Akutdiagnostik. In dieser Arbeit wurden zwei *In-house*-RT-PCRs für den gleichzeitigen Nachweis des Nukleokapsid- und des Envelope-Protein-Gens von SARS-CoV-2, eines RNA-Bakteriophagen sowie eines Abschnitts des humanen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens unter Verwendung von Uracil-DNA-Glycosylase zur Kontaminationsprävention validiert. Beide Triplex-RT-PCR-Verfahren konnten SARS-CoV-2-RNA sensitiv und spezifisch nachweisen. Das E-Gen-basierte Verfahren erwies sich als etwas empfindlicher. Die Einbeziehung des zellulären Kontrollgens und des RNA-Phagen stellte sicher, dass die Abstriche korrekt entnommen waren und die reverse Transkription und Amplifikation ohne Inhibition abliefen. Die Verfahren eignen sich für unterschiedliche Geräte zur Extraktion und zur Amplifikation. Pools aus acht Patientenproben waren für die PCR-Diagnostik geeignet, während bei größeren Pools die Sensitivität stark abnahm.

SARS-CoV-2-Antigen-spezifische Schnelltests stellen eine wesentliche methodische Ergänzung dar. In dieser Arbeit wurden drei kommerziell erhältliche POCTs untersucht und mit der im Labor entwickelten Triplex-RT-PCR verglichen. Die Nachweisrate der POCTs lag im Bereich zwischen 100 % für eine Viruslast von  $\geq 10^7$  Kopien/ml und 73,1 % für Proben mit einer Viruslast von  $\leq 10^6$  Kopien/ml. Die untersuchten POCTs konnten COVID-19-Patienten mit einer Viruslast von  $> 10^7$  Kopien/ml gut identifizieren.

Der Nachweis SARS-CoV-2-spezifischer Antikörper erlaubt die Diagnostik einer stattgehabten Infektion. In der vorgelegten Arbeit wurden acht vorwiegend IgG-spezifische Antikörpertests verglichen. Diese zeigten Sensitivitäten von 80,8-96,3 %, Spezifitäten von 96,0-100 % und diagnostische Genauigkeiten von 93,7-99,2 % und sind daher für die Diagnostik geeignet. Nach ambulanter COVID-19-Infektion waren IgG-Antikörper gegen das S-Protein länger nachweisbar als gegen das N-Protein. COVID-19-Infizierte entwickelten nur sporadisch hochavide Antikörper, im Gegensatz zu der hohen IgG-Avidität nach vollständiger Impfung.

Diese Arbeit unterstreicht den Stellenwert direkter und indirekter Verfahren zum Nachweis von SARS-CoV-2-Infektionen. Robuste und flexibel einsetzbare, laboreigene PCR-Verfahren sind für den Direktnachweis vorteilhaft. Die Expertise zur Etablierung dieser Verfahren muss in diagnostischen Laboren erhalten werden.

## Summary

During and after the coronavirus pandemic, the rapid and reliable detection of infections caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) is essential. The aim of this study was to validate direct and indirect methods for SARS-CoV-2 detection and to investigate their suitability for routine diagnostics.

Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is the gold standard for acute diagnostics. In this work, two in-house RT-PCRs were validated for the simultaneous detection of the nucleocapsid and envelope protein genes of SARS-CoV-2, an RNA bacteriophage and a segment of the human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, using uracil DNA glycosylase for prevention of contamination. Both triplex RT-PCR methods were able to detect SARS-CoV-2 RNA in sensitive and specific way. The E-gene-based method proved to be slightly more sensitive. The inclusion of the cellular control gene and the RNA phage ensured that the swabs were taken correctly and that reverse transcription and amplification proceeded without inhibition. The methods are suitable for different instruments for extraction and amplification. Pools of eight patient samples were suitable for PCR diagnostics, while sensitivity decreased significantly with larger pools.

SARS-CoV-2 antigen-specific rapid tests represent a significant methodological addition. In this study, three commercially available POCTs were examined and compared with the triplex RT-PCR developed in the laboratory. The detection rate of the POCTs ranged between 100 % for a viral load of  $\geq 10^7$  copies/ml and 73.1 % for samples with a viral load of  $\leq 10^6$  copies/ml. The POCTs examined were able to identify COVID-19 patients with a viral load of  $> 10^7$  copies/ml.

The detection of SARS-CoV-2-specific antibodies allows the diagnosis of a past infection. In this study, eight predominantly IgG-specific antibody tests were compared. These showed sensitivities of 80.8-96.3 %, specificities of 96.0-100 % and diagnostic accuracies of 93.7-99.2 % and are, therefore, suitable for diagnostics. After outpatient COVID-19 infection, IgG antibodies against the S protein were detectable for longer than against the N protein. COVID-19 infected patients only sporadically developed high-avidity antibodies, in contrast to the high IgG avidity after complete vaccination.

This work underlines the importance of direct and indirect methods for the detection of SARS-CoV-2 infections. Robust and flexible laboratory PCR methods are advantageous for direct detection. The expertise to establish these methods must be maintained in diagnostic laboratories.

## 6. Literaturverzeichnis

Abbott (2020) News release. Abbott erweitert Möglichkeiten zur Testung auf COVID-19 und stellt in Deutschland einen einfachen, portablen Antigen-Test zur Verfügung, der in 15 Minuten Ergebnisse liefert. Online verfügbar unter <https://dam.abbott.com/de-de/documents/press-releases/2020-09-07-Abbott-gibt-verf%C3%BCgbarkeit-des-Panbio%E2%84%A2-COVID-19-Ag-Schnelltest-bekannt.pdf>, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Addetia A, Crawford KHD, Dingens A, Zhu H, Roychoudhury P, Huang ML, Jerome KR, Bloom JD, Greninger AL (2020) Neutralizing antibodies correlate with protection from SARS-CoV-2 in humans during a fishery vessel outbreak with a high attack rate. *J Clin Microbiol* 58 (11): e02107-20. DOI: 10.1128/JCM.02107-20.

Afzal A (2020) Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *J Adv Res* 26: 149-159. DOI: 10.1016/j.jare.2020.08.002.

Albert E, Torres I, Bueno F, Huntley D, Molla E, Fernández-Fuentes MÁ, Martínez M, Poujois S, Forqué L, Valdivia A, Solano de la Asunción C, Ferrer J, Colomina J, Navarro D (2021) Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clin Microbiol Infect* 27 (3): 472.e7-472.e10. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.11.004.

Alqaissi A, Alfaleh MA, Hala S, Abujamel TS, Alamri SS, Almahboub SA, Alluhaybi KA, Hobani HI, Alsulaiman RM, AlHarbi RH, ElAssouli MA, Alhabbab RY, AlSaieedi AA, Abdulaal WH, Al-Somali AA, Alofi FS, Khogeer AA, Alkayyal AA, Mahmoud AB, Almontashiri NAM, Pain A, Hashem AM (2020) SARS-CoV-2 S1 and N-based serological assays reveal rapid seroconversion and induction of specific antibody response in COVID-19 patients. *Sci Rep* 10 (1): 16561. DOI: 10.1038/s41598-020-73491-5.

Anastasiou OE, Holtkamp C, Schäfer M, Schön F, Eis-Hübinger AM, Krumbholz A (2021) Fast detection of SARS-CoV-2 RNA directly from respiratory samples using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test. *Viruses* 13 (5): 801. DOI: 10.3390/v13050801.

Anderson EJ, Weber SG (2004) Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis* 4 (2): 91-99. DOI: 10.1016/S1473-3099(04)00928-4.

Araf Y, Akter F, Tang YD, Fatemi R, Parvez MSA, Zheng C, Hossain MG (2022) Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *J Med Virol* 94 (5): 1825-1832. DOI: 10.1002/jmv.27588.

Aragón-Caqueo D, Fernández-Salinas J, Laroze D (2020) Optimization of group size in pool testing strategy for SARS-CoV-2: A simple mathematical model. *J Med Virol* 92 (10): 1988-1994. DOI: 10.1002/jmv.25929.

Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, Kimball A, James A, Jacobs JR, Taylor J, Spicer K, Bar-dossy AC, Oakley LP, Tanwar S, Dyal JW, Harney J, Chisty Z, Bell JM, Methner M, Paul P, Carlson CM, McLaughlin HP, Thornburg N, Tong S, Tamin A, Tao Y, Uehara A, Harcourt J, Clark S, Brostrom-Smith C, Page LC, Kay M, Lewis J, Montgomery P, Stone ND, Clark TA, Honein MA, Duchin JS, Jernigan JA (2020) Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N Engl J Med* 382 (22): 2081-2090. DOI: 10.1056/NEJMoa2008457.

Asadi S, Cappa CD, Barreda S, Wexler AS, Bouvier NM, Ristenpart WD (2020) Efficacy of masks and face coverings in controlling outward aerosol particle emission from expiratory activities. *Sci Rep* 10 (1): 15665. DOI: 10.1038/s41598-020-72798-7.

Assiri A, McGeer A, Perl TM, Price CS, Al Rabeeah AA, Cummings DA, Alabdullatif ZN, Assad M, Almulhim A, Makhdoom H, Madani H, Alhakeem R, Al-Tawfiq JA, Cotten M, Watson SJ, Kellam P, Zumla AI, Memish ZA (2013) Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N Engl J Med* 369 (5): 407-416. DOI: 10.1056/NEJMoa1306742.

Avanzato VA, Matson MJ, Seifert SN, Pryce R, Williamson BN, Anzick SL, Barbian K, Judson SD, Fischer ER, Martens C, Bowden TA, de Wit E, Riedo FX, Munster VJ (2020) Case study: Prolonged infectious SARS-CoV-2 shedding from an asymptomatic immunocompromised individual with cancer. *Cell* 183 (7): 1901-1912.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.049.

Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, Diemert D, Spector SA, Rouphael N, Creech CB, McGettigan J, Khetan S, Segall N, Solis J, Brosz A, Fierro C, Schwartz H, Neuzil K, Corey L, Gilbert P, Janes H, Follmann D, Marovich M, Mascola J, Polakowski L, Ledgerwood J, Graham BS, Bennett H, Pajon R, Knightly C, Leav B, Deng W, Zhou H, Han S, Ivarsson M, Miller J, Zaks T (2021) Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med* 384 (5): 403-416. DOI: 10.1056/NEJMoa2035389.

Bangaru S, Ozorowski G, Turner HL, Antanasijevic A, Huang D, Wang X, Torres JL, Diedrich JK, Tian JH, Portnoff AD, Patel N, Massare MJ, Yates JR 3rd, Nemazee D, Paulson JC, Glenn G, Smith G, Ward AB (2020) Structural analysis of full-length SARS-CoV-2 spike protein from an advanced vaccine candidate. *Science* 370 (6520): 1089-1094. DOI: 10.1126/science.abe1502.

Barnes PJ (2006) How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. Br J Pharmacol 148 (3): 245-254. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706736.

Barrio PA, Fernández-Rodríguez A, Martín P, Fernández C, Fernández L, Alonso A (2021) Forensic evaluation of two nucleic acid extraction systems and validation of a RT-qPCR protocol for identification of SARS-CoV-2 in post-mortem nasopharyngeal swabs. Forensic Sci Int 323: 110775. DOI: 10.1016/j.forsciint.2021.110775.

Bauer G (2021) The variability of the serological response to SARS-corona virus-2: Potential resolution of ambiguity through determination of avidity (functional affinity). J Med Virol 93 (1): 311-322. DOI: 10.1002/jmv.26262.

Bauer G, Struck F, Schreiner P, Staschik E, Soutschek E, Motz M (2021) The challenge of avidity determination in SARS-CoV-2 serology. J Med Virol 93 (5): 3092-3104. DOI: 10.1002/jmv.26863.

Bei Y, Gray AN, Ren G, Borgaro JG, Pan J, Xu Y, Peterson EC, Nichols NM (2021) Accurate and sensitive high-throughput multiplex RT-qPCR for SARS-CoV-2 viral RNA detection using the Luna® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit. Online verfügbar unter [https://international.neb.com/-/media/nebus/files/application-notes/technote\\_sars-cov-2\\_detection\\_us-ing\\_luna\\_sars-cov-2\\_rt-qpcr\\_multiplex\\_assay\\_kit.pdf?rev=c9f5fd17896b489baa-1626a07778c76c](https://international.neb.com/-/media/nebus/files/application-notes/technote_sars-cov-2_detection_us-ing_luna_sars-cov-2_rt-qpcr_multiplex_assay_kit.pdf?rev=c9f5fd17896b489baa-1626a07778c76c), zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, Hohmann E, Chu HY, Luetkemeyer A, Kline S, Lopez de Castilla D, Finberg RW, Dierberg K, Tapson V, Hsieh L, Patterson TF, Paredes R, Sweeney DA, Short WR, Touloumi G, Lye DC, Ohmagari N, Oh MD, Ruiz-Palacios GM, Benfield T, Fätkenheuer G, Kortepeter MG, Atmar RL, Creech CB, Lundgren J, Babiker AG, Pett S, Neaton JD, Burgess TH, Bonnett T, Green M, Makowski M, Osinusi A, Nayak S, Lane HC (2020) Remdesivir for the treatment of Covid-19 - Final report. N Engl J Med 383 (19): 1813-1826. DOI: 10.1056/NEJMoa2007764.

Belmont LD, Hyman AA, Sawin KE, Mitchison TJ (1990) Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. Cell 62 (3): 579-589. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90022-7.

Benham M, Dey A, Gambell T, Talwar V (2020): COVID-19: Overcoming supply shortages for diagnostic testing. McKinsey & Company, 15.07.2020. Online verfügbar unter <https://www.mckinsey.com/industries/life-sciences/our-insights/covid-19-overcoming-supply-shortages-for-diagnostic-testing>, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Berger A, Nsoga MTN, Perez-Rodriguez FJ, Aad YA, Sattonnet-Roche P, Gayet-Ageron A, Jaksic C, Torriani G, Boehm E, Kronig I, Sacks JA, de Vos M, Bausch FJ, Chappuis F, Renzoni A, Kaiser L, Schibler M, Eckerle I (2021) Diagnostic accuracy of two commercial SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid tests at the point of care in community-based testing centers. *PLoS One* 16 (3): e0248921. DOI: 10.1371/journal.pone.0248921.

Birmingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C, Hoschler K, Brown K, Galiano M, Myers R, Pebody RG, Green HK, Boddington NL, Gopal R, Price N, Newsholme W, Drosten C, Fouchier RA, Zambon M (2012) Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill* 17 (40): 20290. DOI: 10.2807/ese.17.40.20290-en.

Biswas A, Bhattacharjee U, Chakrabarti AK, Tewari DN, Banu H, Dutta S (2020) Emergence of Novel Coronavirus and COVID-19: whether to stay or die out? *Crit Rev Microbiol* 46 (2): 182-193. DOI: 10.1080/1040841X.2020.1739001.

Bland JM, Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1 (8476): 307-10. DOI: 10.1016/S0140-6736(86)90837-8.

Bobay LM, O'Donnell AC, Ochman H (2020) Recombination events are concentrated in the spike protein region of Betacoronaviruses. *PLoS Genet* 16 (12): e1009272. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009272.

Bolze A, Basler T, White S, Dei Rossi A, Wyman D, Dai H, Roychoudhury P, Greninger AL, Hayashibara K, Beatty M, Shah S, Stous S, McCrone JT, Kil E, Cassens T, Tsan K, Nguyen J, Ramirez J, Carter S, Cirulli ET, Schiabor Barrett K, Washington NL, Belda-Ferre P, Jacobs S, Sandoval E, Becker D, Lu JT, Isaksson M, Lee W, Luo S (2022) Evidence for SARS-CoV-2 Delta and Omicron co-infections and recombination. *Med* 3 (12): 848-859.e4. DOI: 10.1016/j.medj.2022.10.002.

Bongiovanni M (2021) COVID-19 reinfection in a healthcare worker. *J Med Virol* 93 (7): 4058-4059. DOI: 10.1002/jmv.26565.

Brunke M, Kramer A, Konrat K, Thanheiser M, Arvand M (2021) Die Händewaschung als effektive Maßnahme der Alltagshygiene. *Epid Bull* 17: 3-4. DOI: 10.25646/8372.

Buchholz U, Müller MA, Nitsche A, Sanewski A, Wevering N, Bauer-Balci T, Bonin F, Drosten C, Schweiger B, Wolff T, Muth D, Meyer B, Buda S, Krause G, Schaade L, Haas W (2013) Contact investigation of a case of human novel coronavirus infection treated in a German

hospital, October-November 2012. Euro Surveill 18 (8): 20406. DOI: 10.2807/ese.18.08.20406-en

Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, Boodman C, Bello A, Hedley A, Schiffman Z, Doan K, Bastien N, Li Y, Van Caeseele PG, Poliquin G (2020) Predicting infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from diagnostic samples. Clin Infect Dis 71 (10): 2663-2666. DOI: 10.1093/cid/ciaa638.

Bundesministerium für Gesundheit (2022): Das offizielle Dashboard zur Impfkampagne der Bundesrepublik Deutschland. Online unter <https://impfdashboard.de/>, zuletzt aktualisiert am 03.10.2022, zuletzt geprüft am 03.10.2022.

Bundesregierung (2021): Bund-Länder-Beschluss: Gemeinsam Corona-Pandemie eindämmen. Online unter <https://www.bundesregierung.de/breg-de/themen/coronavirus/mpk-corona-1792242>, zuletzt aktualisiert am 19.12.2021, zuletzt geprüft am 19.12.2021.

Byrne AW, McEvoy D, Collins AB, Hunt K, Casey M, Barber A, Butler F, Griffin J, Lane EA, McAloon C, O'Brien K, Wall P, Walsh KA, More SJ (2020). Inferred duration of infectious period of SARS-CoV-2: rapid scoping review and analysis of available evidence for asymptomatic and symptomatic COVID-19 cases. BMJ Open 10 (8): e039856. DOI: 10.1136/bmjopen-2020-039856.

Carfi A, Bernabei R, Landi F (2020) Persistent symptoms in patients after acute COVID-19. JAMA 324 (6): 603-605. DOI: 10.1001/jama.2020.12603.

Centers for Disease Control and Prevention (2012) Severe respiratory illness associated with a novel coronavirus - Saudi Arabia and Qatar, 2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 61 (40): 820.

Centers for Disease Control and Prevention (2019) Middle East Respiratory Syndrome (MERS). Online verfügbar unter <https://www.cdc.gov/coronavirus/mers/index.html>, zuletzt aktualisiert am 28.05.2024, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Cerutti F, Burdino E, Milia MG, Allice T, Gregori G, Bruzzone B, Ghisetti V (2020) Urgent need of rapid tests for SARS CoV-2 antigen detection: Evaluation of the SD-Biosensor antigen test for SARS-CoV-2. J Clin Virol 132: 104654. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104654.

Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A (2021) SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a

systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe* 2 (1): e13-e22. DOI: 10.1016/S2666-5247(20)30172-5.

Chen D, Li X, Song Q, Hu C, Su F, Dai J, Ye Y, Huang J, Zhang X (2020) Assessment of hypokalemia and clinical characteristics in patients With Coronavirus Disease 2019 in Wenzhou, China. *JAMA Netw Open* 3 (6): e2011122. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.11122.

Chen J, Wang R, Gilby NB, Wei GW (2022) Omicron variant (B.1.1.529): infectivity, vaccine breakthrough, and antibody resistance. *J Chem Inf Model* 62 (2): 412-422. DOI: 10.1021/acs.jcim.1c01451.

Chen RE, Zhang X, Case JB, Winkler ES, Liu Y, VanBlargan LA, Liu J, Errico JM, Xie X, Suryadevara N, Gilchuk P, Zost SJ, Tahan S, Droit L, Turner JS, Kim W, Schmitz AJ, Thapa M, Wang D, Boon ACM, Presti RM, O'Halloran JA, Kim AHJ, Deepak P, Pinto D, Fremont DH, Crowe JE Jr, Corti D, Virgin HW, Ellebedy AH, Shi PY, Diamond MS (2021) Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Nat Med* 27 (4): 717-726. DOI: 10.1038/s41591-021-01294-w.

Choi JY, Smith DM (2021) SARS-CoV-2 variants of concern. *Yonsei Med J* 62 (11): 961-968. DOI: 10.3349/ymj.2021.62.11.961.

Colton H, Ankcorn M, Yavuz M, Tovey L, Cope A, Raza M, Keeley AJ, State A, Poller B, Parker M, de Silva TI, Evans C (2021) Improved sensitivity using a dual target, E and RdRp assay for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection: Experience at a large NHS Foundation Trust in the UK. *J Infect* 82 (1): 159-198. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.05.061.

Corey L, Beyrer C, Cohen MS, Michael NL, Bedford T, Rolland M (2021) SARS-CoV-2 variants in patients with immunosuppression. *N Engl J Med* 385 (6): 562-566. DOI: 10.1056/NEJMsb2104756. PMID: 34347959; PMCID: PMC8494465.

Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, van Boheemen S, Gopal R, Ballhouse M, Bestebroer TM, Muth D, Müller MA, Drexler JF, Zambon M, Osterhaus AD, Fouchier RM, Drosten C (2012a) Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill* 17 (39): 20285. DOI: 10.2807/ese.17.39.20285-en.

Corman VM, Haage VC, Bleicker T, Schmidt ML, Mühlmann B, Zuchowski M, Jo WK, Tscheak P, Möncke-Buchner E, Müller MA, Krumbholz A, Drexler JF, Drosten C (2021a) Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid point-of-care antigen tests: a single-centre

laboratory evaluation study. *Lancet Microbe* 2 (7): e311-e319. DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00056-2.

Corman VM, Haage VC, Bleicker T, Schmidt ML, Mühlemann B, Zuchowski M, Jo WK, Tscheak P, Möncke-Buchner E, Müller MA, Krumbholz A, Drexler JF, Drosten C (2021b) Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid point-of-care antigen tests: a single-centre laboratory evaluation study. *Lancet Microbe* 2 (7): e311-e319. DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00056-2.

Corman VM, Müller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B, Kreher P, Lattwein E, Eschbach-Bludau M, Nitsche A, Bleicker T, Landt O, Schweiger B, Drexler JF, Osterhaus AD, Haagmans BL, Dittmer U, Bonin F, Wolff T, Drosten C (2012b) Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill* 17 (49): 20334. DOI: 10.2807/ese.17.49.20334-en.

Costa MS, Guimarães NS, Andrade AB, Vaz-Tostes LP, Oliveira RB, Simões MDS, Gelape GO, Alves CRL, Machado EL, Fonseca FGD, Teixeira SMR, Sato HI, Takahashi RHC, Tupinambás U (2021) Detection of SARS-CoV-2 through pool testing for COVID-19: an integrative review. *Rev Soc Bras Med Trop* 54: e0276. DOI: 10.1590/0037-8682-0276-2021.

COVID-19 Investigation Team (2020) Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. *Nat Med* 26 (6): 861-868. DOI: 10.1038/s41591-020-0877-5.

Cui J, Li F, Shi ZL (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 17 (3): 181-192. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9.

Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, Pearson CAB, Russell TW, Tully DC, Washburne AD, Wenseleers T, Gimma A, Waites W, Wong KLM, van Zandvoort K, Silverman JD, Diaz-Ordaz K, Keogh R, Eggo RM, Funk S, Jit M, Atkins KE, Edmunds WJ (2021) Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* 372 (6538): eabg3055. DOI: 10.1126/science.abg3055.

Diamond M, Peniston HL, Sanghavi DK, Mahapatra S, Doerr C (2023) Acute Respiratory Distress Syndrome (Nursing). in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Dianov G, Lindahl T (1994) Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. *Curr Biol* 4 (12): 1069-1076. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00245-1.

Dougan M, Nirula A, Azizad M, Mocherla B, Gottlieb RL, Chen P, Hebert C, Perry R, Boscia J, Heller B, Morris J, Crystal C, Igbinadolor A, Huhn G, Cardona J, Shawa I, Kumar P, Adams AC, Van Naarden J, Custer KL, Durante M, Oakley G, Schade AE, Holzer TR, Ebert PJ, Higgs RE, Kallewaard NL, Sabo J, Patel DR, Dabora MC, Klekotka P, Shen L, Skovronsky DM (2021) Bamlanivimab plus Etesevimab in mild or moderate Covid-19. *N Engl J Med* 385 (15): 1382-1392. DOI: 10.1056/NEJMoa2102685.

Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguière AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW (2003) Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348 (20): 1967-1976. DOI: 10.1056/NEJMoa030747.

Echeverría G, Guevara Á, Coloma J, Ruiz AM, Vasquez MM, Tejera E, de Waard JH (2021) Pre-existing T-cell immunity to SARS-CoV-2 in unexposed healthy controls in Ecuador, as detected with a COVID-19 Interferon-Gamma Release Assay. *Int J Infect Dis* 105: 21-25. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.02.034.

Edridge AWD, Kaczorowska J, Hoste ACR, Bakker M, Klein M, Loens K, Jebbink MF, Matser A, Kinsella CM, Rueda P, Ieven M, Goossens H, Prins M, Sastre P, Deijs M, van der Hoek L (2020) Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nat Med* 26 (11): 1691-1693. DOI: 10.1038/s41591-020-1083-1.

Europäisches Parlament und Rat (2017) Verordnung (EU) 2017/746 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 5. April 2017 über In-vitro-Diagnostika und zur Aufhebung der Richtlinie 98/79/EG und des Beschlusses 2010/227/EU der Kommission

European Centre for Disease Prevention and Control (2018) Rapid risk assessment: Severe respiratory disease associated with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), 22nd update. Online verfügbar unter <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-severe-respiratory-disease-associated-middle-east-11>, zuletzt aktualisiert am 29.08.2018, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

European Medicines Agency (2022): Adapted vaccine targeting BA.4 and BA.5 Omicron variants and original SARS-CoV-2 recommended for approval. Online verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/news/adapted-vaccine-targeting-ba4-ba5-omicron-variants-original-sars-cov-2-recommended-approval>, zuletzt aktualisiert am 12.10.09.2022, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Eusebi P (2013) Diagnostic accuracy measures. *Cerebrovasc Dis* 36 (4): 267-272. DOI: 10.1159/000353863.

Farfour E, Amiel C, Jolly E, Zia-Chahabi S, Mazaux L, Simonin P, Berkane I, Cornily M, Pascreau T (2021) The Panbio COVID-19 Ag Rapid Test: Which performances are for COVID-19 diagnosis? *Clin Lab* 67 (11). DOI: 10.7754/Clin.Lab.2021.210304.

Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido DDS, Mishra S, Crispim MAE, Sales FCS, Hawryluk I, McCrone JT, Hulswit RJG, Franco LAM, Ramundo MS, de Jesus JG, Andrade PS, Coletti TM, Ferreira GM, Silva CAM, Manuli ER, Pereira RHM, Peixoto PS, Kraemer MUG, Gaburo N Jr, Camilo CDC, Hoeltgebaum H, Souza WM, Rocha EC, de Souza LM, de Pinho MC, Araujo LJT, Malta FSV, de Lima AB, Silva JDP, Zauli DAG, Ferreira ACS, Schnekenberg RP, Laydon DJ, Walker PGT, Schlueter HM, Dos Santos ALP, Vidal MS, Del Caro VS, Filho RMF, Dos Santos HM, Aguiar RS, Proenca-Modena JL, Nelson B, Hay JA, Monod M, Misicuridou X, Coupland H, Sonabend R, Vollmer M, Gandy A, Prete CA Jr, Nascimento VH, Suchard MA, Bowden TA, Pond SLK, Wu CH, Ratmann O, Ferguson NM, Dye C, Loman NJ, Lemey P, Rambaut A, Fraiji NA, de PSS Carvalho M, Pybus OG, Flaxman S, Bhatt S, Sabino EC (2021) Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* 372 (6544): 815-821. DOI: 10.1126/science.abh2644.

Fehr AR, Perlman S (2015) Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* 1282: 1-23. DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7\_1.

Fergie J, Srivastava A (2021) Immunity to SARS-CoV-2: lessons learned. *Front Immunol* 12: 654165. DOI: 10.3389/fimmu.2021.654165.

Fishbane S, Hirsch JS, Nair V (2022) Special considerations for Paxlovid treatment among transplant recipients with SARS-CoV-2 infection. *Am J Kidney Dis* 79 (4): 480-482. DOI: 10.1053/j.ajkd.2022.01.001.

Focosi D, Maggi F, Mazzetti P, Pistello M (2021) Viral infection neutralization tests: A focus on severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 with implications for convalescent plasma therapy. *Rev Med Virol* 31 (2): e2170. DOI: 10.1002/rmv.2170.

Fuchs B, Zhang K, Rock MG, Bolander ME, Sarkar G (1999) High temperature cDNA synthesis by AMV reverse transcriptase improves the specificity of PCR. *Mol Biotechnol* 12 (3): 237-240. DOI: 10.1385/MB:12:3:237.

Fujino T, Nomoto H, Kutsuna S, Ujiie M, Suzuki T, Sato R, Fujimoto T, Kuroda M, Wakita T, Ohmagari N (2021) Novel SARS-CoV-2 variant in travelers from Brazil to Japan. *Emerg Infect Dis* 27 (4): 1243–1245. DOI: 10.3201/eid2704.210138.

Gao SJ, Guo H, Luo G (2021) Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2, a global urgent public health alert! *J Med Virol* 94 (4): 1255-1256. DOI: 10.1002/jmv.27491.

Geisen UM, Rose R, Neumann F, Ciripoi M, Vullriede L, Reid HM, Berner DK, Bertoglio F, Hoff P, Hust M, Longardt AC, Lorentz T, Martini GR, Saggau C, Schirmer JH, Schubert M, Sümbül M, Tran F, Voß M, Zeuner R, Morrison PJ, Bacher P, Fickenscher H, Gerdes S, Peipp M, Schreiber S, Krumbholz A, Hoyer BF (2022) The long term vaccine-induced anti-SARS-CoV-2 immune response is impaired in quantity and quality under TNF $\alpha$  blockade. *J Med Virol* 94 (12): 5780-5789. DOI: 10.1002/jmv.28063.

Georgi A, Mottola-Hartshorn C, Warner A, Fields B, Chen LB (1990) Detection of individual fluorescently labeled reovirions in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (17): 6579-6583. DOI: 10.1073/pnas.87.17.6579.

Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, Haagmans BL, Lauber C, Leontovich AM, Neuman BW, Penzar D, Perlman S, Poon LLM, Samborskiy DV, Sidorov IA, Sola I, Ziebuhr J (2020) The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 5 (4): 536-544. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.

Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, Cereda D, Coluccello A, Foti G, Fumagalli R, Iotti G, Latronico N, Lorini L, Merler S, Natalini G, Piatti A, Ranieri MV, Scandroglio AM, Storti E, Cecconi M, Pesenti A (2020) Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy region, Guery B, Poissy J, el Mansouf L, Séjourné C, Ettahir N, Lemaire X, Vuotto F, Goffard A, Behillil S, Enouf V, Caro V, Mailles A, Che D, Manuguerra JC, Mathieu D, Fontanet A, van der Werf S; MERS-CoV study group. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. *Lancet*. 2013 Jun 29;381(9885):2265-72. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60982-4. Epub 2013 May 30.

Greenbaum BD, Ghedin E (2015) Viral evolution: beyond drift and shift. *Curr Opin Microbiol* 26: 109-115 DOI: 10.1016/j.mib.2015.06.015.

Gressner AM, Arndt, T (2007) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Band 1: Klinische Chemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Guery B, Poissy J, el Mansouf L, Séjourné C, Ettahir N, Lemaire X, Vuotto F, Goffard A, Behillil S, Enouf V, Caro V, Mailles A, Che D, Manuguerra JC, Mathieu D, Fontanet A, van der Werf S (2013) Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. Lancet 381 (9885): 2265-2272. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60982-4.

Haas EJ, Angulo FJ, McLaughlin JM, Anis E, Singer SR, Khan F, Brooks N, Smaja M, Mircus G, Pan K, Southern J, Swerdlow DL, Jodar L, Levy Y, Alroy-Preis S (2021) Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. Lancet 397 (10287): 1819-1829. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00947-8.

Hagen A (2020) Laboratory supply shortages are impacting COVID-19 and non-COVID diagnostic testing. American Society for Microbiology, online verfügbar unter <https://asm.org/Articles/2020/September/Laboratory-Supply-Shortages-Are-Impacting-COVID-19>, zuletzt aktualisiert am 15.10.2020, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Hanel R, Thurner S (2020) Boosting test-efficiency by pooled testing for SARS-CoV-2, formula for optimal pool size. PLoS One 15 (11): e0240652. DOI: 10.1371/journal.pone.0240652.

Haslbeck K, Schwarz K, Hohlfeld JM, Seume JR, Koch W (2010) Submicron droplet formation in the human lung. J Aerosol Sci 41 (5): 429-438. DOI: 10.1016/j.jaerosci.2010.02.010.

Havervall S, Ng H, Jernbom Falk A, Greilert-Norin N, Månberg A, Marking U, Laurén I, Gabrielsson L, Salomonsson AC, Aguilera K, Kihlgren M, Månsson M, Rosell A, Hellström C, Andersson E, Olofsson J, Skoglund L, Yousef J, Pin E, Lord M, Åberg M, Hedhammar M, Tegel H, Dönnes P, Phillipson M, Nilsson P, Klingström J, Mangsbo S, Hober S, Thålin C (2021) Robust humoral and cellular immune responses and low risk for reinfection at least 8 months following asymptomatic to mild COVID-19. J Intern Med 291 (1): 72-80. DOI: 10.1111/joim.13387.

He J, Ritalahti KM, Yang KL, Koenigsberg SS, Löfller FE (2003) Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. Nature 424 (6944): 62-65. DOI: 10.1038/nature01717.

He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, Lau YC, Wong JY, Guan Y, Tan X, Mo X, Chen Y, Liao B, Chen W, Hu F, Zhang Q, Zhong M, Wu Y, Zhao L, Zhang F, Cowling BJ, Li F,

Leung GM (2020) Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 26 (5): 672-675. DOI: 10.1038/s41591-020-0869-5.

Health Protection Agency, UK Novel Coronavirus Investigation team collective (2013) Evidence of person-to-person transmission within a family cluster of novel coronavirus infections, United Kingdom, February 2013. *Euro Surveill* 18 (11): 20427. DOI: 10.2807/ese.18.11.20427-en

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6 (10): 986-994. DOI: 10.1101/gr.6.10.986.

Hengel B, Causer L, Matthews S, Smith K, Andrewartha K, Badman S, Spaeth B, Tangey A, Cunningham P, Saha A, Phillips E, Ward J, Watts C, King J, Applegate T, Shephard M, Guy R (2021) A decentralised point-of-care testing model to address inequities in the COVID-19 response. *Lancet Infect Dis* 21 (7): e183-e190. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30859-8.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10 (4): 413-417. DOI: 10.1038/nbt0492-413.

Hijawi B, Abdallat M, Sayaydeh A, Alqasrawi S, Haddadin A, Jaarour N, Alsheikh S, Alsanouri T (2013) Novel coronavirus infections in Jordan, April 2012: epidemiological findings from a retrospective investigation. *East Mediterr Health J* 19 Suppl 1: S12-18.

Hilti D, Wehrli F, Berchtold S, Bigler S, Bodmer T, Seth-Smith HMB, Roloff T, Kohler P, Kahlert CR, Kaiser L, Egli A, Risch L, Risch M, Wohlwend N (2024) S-Gene Target Failure as an Effective Tool for Tracking the Emergence of Dominant SARS-CoV-2 Variants in Switzerland and Liechtenstein, Including Alpha, Delta, and Omicron BA.1, BA.2, and BA.4/BA.5. *Microorganisms* 12 (2): 321. doi: 10.3390/microorganisms12020321.

Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Nagakubo Y, Hosaka K, Amemiya K, Sueki H, Hayakawa M, Mochizuki H, Tsutsui T, Kakizaki Y, Miyashita Y, Yagi S, Kojima S, Omata M (2020) Comparison of automated SARS-CoV-2 antigen test for COVID-19 infection with quantitative RT-PCR using 313 nasopharyngeal swabs, including from seven serially followed patients. *Int J Infect Dis* 99: 397-402. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.08.029.

Hirsch JS, Ng JH, Ross DW, Sharma P, Shah HH, Barnett RL, Hazzan AD, Fishbane S, Jha-veri KD (2020) Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int* 98 (1): 209-218. DOI: 10.1016/j.kint.2020.05.006.

Hoffmann M, Arora P, Groß R, Seidel A, Hörnich BF, Hahn AS, Krüger N, Graichen L, Hofmann-Winkler H, Kempf A, Winkler MS, Schulz S, Jäck HM, Jahrasdörfer B, Schrezenmeier H, Müller M, Kleger A, Münch J, Pöhlmann S (2021) SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies. *Cell* 184 (9): 2384-2393. e12. DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.036.

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181 (2): 271-280. e8. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

Hu X, Zhu L, Luo Y, Zhao Q, Tan C, Chen X, Zhang H, Hu X, Lu L, Xiao Y, Huang S, He Y, Sim JXL, Su S, Wang F, Peng Y, Wang J, Guo Y, Zhong T (2020) Evaluation of the clinical performance of single-, dual-, and triple-target SARS-CoV-2 RT-qPCR methods. *Clin Chim Acta* 511: 143-148. DOI: 10.1016/j.cca.2020.10.008.

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395 (10223): 497-506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

Iavarone C, O'hagan DT, Yu D, Delahaye NF, Ulmer JB (2017) Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Rev Vaccines* 16 (9): 871-881. DOI: 10.1080/14760584.2017.1355245.

Ibarrondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, Elliott J, Hofmann C, Hausner MA, Ferbas KG, Tobin NH, Aldrovandi GM, Yang OO (2020) Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild Covid-19. *N Engl J Med* 383 (11): 1085-1087. DOI: 10.1056/NEJMc2025179.

Ifko M, Tkalčić Švabek Ž, Friščić I, Kardum Paro MM, Prkačin I, Đerek L, Livun A, Skvarč M (2021) Diagnostic validation of two SARS-CoV-2 immunochromatographic tests in Slovenian and Croatian hospitals. *Croat Med J* 62 (5): 513-517. DOI: 10.3325/cmj.2021.62.513.

Igloi Z, Velzing J, van Beek J, van de Vijver D, Aron G, Ensing R, Benschop K, Han W, Boelsums T, Koopmans M, Geurtsvankessel C, Molenkamp R (2021) Clinical evaluation of Roche SD Biosensor Rapid Antigen Test for SARS-CoV-2 in municipal health service testing site, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 27 (5): 1323-1329. DOI: 10.3201/eid2705.204688.

Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, Mills R, Teng E, Kamruzzaman M, Garcia-Beltran WF, Astudillo M, Yang D, Miller TE, Oliver E, Fischinger S, Atyeo C, Iafrate AJ, Calderwood SB, Lauer SA, Yu J, Li Z, Feldman J, Hauser BM, Caradonna TM, Branda JA, Turbett SE, LaRocque RC, Mellon G, Barouch DH, Schmidt AG, Azman AS, Alter G, Ryan ET, Harris JB, Charles RC (2020) Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci Immunol* 5 (52): eabe0367. DOI: 10.1126/sciimmunol.abe0367.

Jayamohan H, Lambert CJ, Sant HJ, Jafek A, Patel D, Feng H, Beeman M, Mahmood T, Nze U, Gale BK (2021) SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages and limitations. *Anal Bioanal Chem* 413 (1): 49-71. DOI: 10.1007/s00216-020-02958-1.

Ji Y, Qian H, Ye J, Zheng X (2018) The impact of ambient humidity on the evaporation and dispersion of exhaled breathing droplets: A numerical investigation. *J Aerosol Sci* 115: 164-172. DOI: 10.1016/j.jaerosci.2017.10.009.

Johnson LV, Walsh ML, Chen LB (1980) Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 (2): 990-994. DOI: 10.1073/pnas.77.2.990.

Jones TC, Biele G, Mühlmann B, Veith T, Schneider J, Beheim-Schwarzbach J, Bleicker T, Tesch J, Schmidt ML, Sander LE, Kurth F, Menzel P, Schwarzer R, Zuchowski M, Hofmann J, Krumbholz A, Stein A, Edelmann A, Corman VM, Drosten C (2021) Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. *Science* 373 (6551): eabi5273. DOI: 10.1126/science.abi5273.

Jungnick S, Hobmaier B, Mautner L, Hoyos M, Haase M, Baiker A, Lahne H, Eberle U, Wimmer C, Hepner S, Sprenger A, Berger C, Dangel A, Ippisch S, Hahner S, Wildner M, Liebl B, Ackermann N, Sing A, Fingerle V (2021) In vitro rapid antigen test Performance with the SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), P.1 (Gamma), and B.1.617.2 (Delta). *Microorganisms* 9 (9): 1967. DOI: 10.3390/microorganisms9091967.

Kannan S, Shaik Syed Ali P, Sheeza A (2021) Omicron (B.1.1.529) - variant of concern - molecular profile and epidemiology: a mini review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 25 (24): 8019-8022. DOI: 10.26355/eurrev\_202112\_27653.

Karagiannidis C, Mostert C, Hentschker C, Voshaar T, Malzahn J, Schillinger G, Klauber J, Janssens U, Marx G, Weber-Carstens S, Kluge S, Pfeifer M, Grabenhenrich L, Welte T, Busse R (2020) Case characteristics, resource use, and outcomes of 10 021 patients with COVID-19

admitted to 920 German hospitals: an observational study. *Lancet Respir Med* 8 (9): 853-862. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30316-7.

Kashiwagi K, Ishii Y, Aoki K, Yagi S, Maeda T, Miyazaki T, Yoshizawa S, Aoyagi K, Tateda K (2021) Immunochromatographic test for the detection of SARS-CoV-2 in saliva. *J Infect Chemother* 27 (2): 384-386. DOI: 10.1016/j.jiac.2020.11.016.

Keech C, Albert G, Cho I, Robertson A, Reed P, Neal S, Plested JS, Zhu M, Cloney-Clark S, Zhou H, Smith G, Patel N, Frieman MB, Haupt RE, Logue J, McGrath M, Weston S, Piedra PA, Desai C, Callahan K, Lewis M, Price-Abbott P, Formica N, Shinde V, Fries L, Lickliter JD, Griffin P, Wilkinson B, Glenn GM (2020) Phase 1-2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N Engl J Med* 383 (24): 2320-2332. DOI: 10.1056/NEJMoa2026920.

Kellam P, Barclay W (2020) The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. *J Gen Virol* 101 (8): 791-797. DOI: 10.1099/jgv.0.001439.

Kemp SA, Collier DA, Datir RP, Ferreira IATM, Gayed S, Jahun A, Hosmillo M, Rees-Spear C, Mlcochova P, Lumb IU, Roberts DJ, Chandra A, Temperton N, Sharrocks K, Blane E, Modis Y, Leigh KE, Briggs JAG, van Gils MJ, Smith KGC, Bradley JR, Smith C, Doffinger R, Ceron-Gutierrez L, Barcenas-Morales G, Pollock DD, Goldstein RA, Smielewska A, Skittrall JP, Gouliouris T, Goodfellow IG, Gkrania-Klotsas E, Illingworth CJR, McCoy LE, Gupta RK (2021) SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. *Nature* 592 (7853): 277-282. DOI: 10.1038/s41586-021-03291-y.

Jancovich JK, Chinchar VG, Hyatt A, Miyazaki T, Williams T, Zhang QY (2012) Family Iridoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (Editors), Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 193-210. Elsevier, San Diego, CA. Online verfügbar unter [http://www.trevorwilliams.info/ictv\\_iridoviridae\\_2012.pdf](http://www.trevorwilliams.info/ictv_iridoviridae_2012.pdf), zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG (2020) From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol* 85: 104502. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104502.

Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, Lipsitch M (2020) Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. *Science* 368 (6493): 860-868. DOI: 10.1126/science.abb5793.

Koch J, Schneider T, Stark K, Schreier E (2006) Norovirusinfektionen in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 49 (3): 296-309. DOI: 10.1007/s00103-006-1231-x.

Kohmer N, Toptan T, Pallas C, Karaca O, Pfeiffer A, Westhaus S, Widera M, Berger A, Hoehl S, Kammler M, Ciesek S, Rabenau HF (2021) The comparative clinical performance of four SARS-CoV-2 rapid antigen tests and their correlation to infectivity in vitro. J Clin Med, 10 (2): 328. DOI: 10.3390/jcm10020328.

Kohmer N, Westhaus S, Rühl C, Ciesek S, Rabenau HF (2020) Clinical performance of different SARS-CoV-2 IgG antibody tests. J Med Virol 92 (10): 2243-2247. DOI: 10.1002/jmv.26145.

Kollias A, Kyriakoulis KG, Dimakakos E, Poulakou G, Stergiou GS, Syrigos K (2020) Thromboembolic risk and anticoagulant therapy in COVID-19 patients: emerging evidence and call for action. Br J Haematol 189 (5): 846-847. DOI: 10.1111/bjh.16727.

Kontogianni K, Cubas-Atienzar AI, Wooding D, Buist K, Thompson CR, Williams CT, Baldwin L, Escadafal C, Sacks JA, Adams ER, Edwards T (2021) Lateral flow antigen tests can sensitively detect live cultured virus of the SARS-CoV-2 B1.1.7 lineage. J Infect 83 (1): e1-e4. DOI: 10.1016/j.jinf.2021.05.033.

Kontou PI, Braliou GG, Dimou NL, Nikolopoulos G, Bagos PG (2020) Antibody tests in detecting SARS-CoV-2 infection: A meta-analysis. Diagnostics (Basel) 10 (5): 319. DOI: 10.3390/diagnostics10050319.

Krüger LJ, Gaeddert M, Köppel L, Brümmer LE, Gottschalk C, Miranda IB, Schnitzler P, Kräusslich HG, Lindner AK, Nikolai O, Mockenhaupt FP, Seybold J, Corman VM, Drosten C, Pollock NR, Cubas-Atienzar AI, Kontogianni K, Collins A, Wright AH, Knorr B, Welker A, de Vos M, Sacks JA, Adams ER, Denkinger CM (2020) Evaluation of the accuracy, ease of use and limit of detection of novel, rapid, antigen-detecting point-of-care diagnostics for SARS-CoV-2. Vorabveröffentlichung (Preprint). medRxiv 2020. DOI: 10.1101/2020.10.01. 20203836. Online verfügbar unter <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.01.20203836v1.full.pdf>

Krüttgen A, Cornelissen CG, Dreher M, Hornef M, Imöhl M, Kleines M (2020) Comparison of four new commercial serologic assays for determination of SARS-CoV-2 IgG. J Clin Virol 128: 104394. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104394.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögren B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med 27 (2-3): 95-125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007.

Kwok S, Higuchi R (1989) Avoiding false positives with PCR. Nature 339 (6221): 237-238. DOI: 10.1038/339237a0.

Lantz PG, Tjerneld F, Borch E, Hahn-Hägerdal B, Rådström P (1994) Enhanced sensitivity in PCR detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through use of an aqueous two-phase system as a sample preparation method. Appl Environ Microbiol 60 (9): 3416-3418. DOI: 10.1128/aem.60.9.3416-3418.1994.

Lassaunière R, Frische A, Harboe ZB, Nielsen ACY, Fomsgaard A, Krogfelt KA, Jørgensen CS (2020): Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays. Vorabveröffentlichung (Preprint). medRxiv 2020. DOI: 10.1101/2020.04.09.20056325.

Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, Azman AS, Reich NG, Lessler J (2020) The incubation period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. Ann Intern Med 172 (9): 577-582. DOI: 10.7326/M20-0504.

Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Santi DR, Horoi M, Le Bon SD, Rodriguez A, Dequanter D, Bleicic S, El Afia F, Distinguin L, Chekkouri-Idrissi Y, Hans S, Delgado IL, Calvo-Henriquez C, Lavigne P, Falanga C, Barillari MR, Cammaroto G, Khalife M, Leich P, Souchay C, Rossi C, Journe F, Hsieh J, Edjlali M, Carlier R, Ris L, Lovato A, De Filippis C, Coppee F, Fakhry N, Ayad T, Saussez S (2020) Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. Eur Arch Otorhinolaryngol 277 (8): 2251-2261. DOI: 10.1007/s00405-020-05965-1.

Lee J (2015) Better understanding on MERS corona virus outbreak in Korea. J Korean Med Sci 30 (7): 835-836. DOI: 10.3346/jkms.2015.30.7.835.

Lelieveld J, Helleis F, Borrmann S, Cheng Y, Drewnick F, Haug G, Klimach T, Sciaro J, Su H, Pöschl U (2020) Model calculations of aerosol transmission and infection risk of COVID-19 in indoor environments. Int J Environ Res Public Health 17 (21): 8114. DOI: 10.3390/ijerph17218114.

Li G, Wang A, Chen Y, Sun Y, Du Y, Wang X, Ding P, Jia R, Wang Y, Zhang G (2021) Development of a colloidal gold-based immunochromatographic strip for rapid detection of Severe

Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 spike protein. Front Immunol 12: 635677. DOI: 10.3389/fimmu.2021.635677.

Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. Nature 426 (6965): 450-454. DOI: 10.1038/nature02145.

Li W, Sui J, Huang IC, Kuhn JH, Radoshitzky SR, Marasco WA, Choe H, Farzan M (2007) The S proteins of human coronavirus NL63 and severe acute respiratory syndrome coronavirus bind overlapping regions of ACE2. Virology 367 (2): 367-374. DOI: 10.1016/j.virol.2007.04.035.

Liotti FM, Menchinelli G, Lalle E, Palucci I, Marchetti S, Colavita F, La Sorda M, Sberna G, Bordi L, Sanguinetti M, Cattani P, Capobianchi MR, Posteraro B (2021) Performance of a novel diagnostic assay for rapid SARS-CoV-2 antigen detection in nasopharynx samples. Clin Microbiol Infect 27 (3): 487-488. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.09.030.

Lipsitch M, Grad YH, Sette A, Crotty S (2020) Cross-reactive memory T cells and herd immunity to SARS-CoV-2. Nat Rev Immunol 20 (11): 709-713. DOI: 10.1038/s41577-020-00460-4.

Liu L, Wei J, Li Y, Ooi A (2017) Evaporation and dispersion of respiratory droplets from coughing. Indoor Air 27 (1): 179-190. DOI: 10.1111/ina.12297.

Liu P, Chen W, Chen JP (2019) Viral metagenomics revealed Sendai virus and coronavirus infection of Malayan Pangolins (*Manis javanica*). Viruses 11 (11): 979. DOI: 10.3390/v11110979.

Liu Y, Li T, Deng Y, Liu S, Zhang D, Li H, Wang X, Jia L, Han J, Bei Z, Li L, Li J (2021) Stability of SARS-CoV-2 on environmental surfaces and in human excreta. J Hosp Infect 107: 105-107. DOI: 10.1016/j.jhin.2020.10.021.

Long B, Brady WJ, Koyfman A, Gottlieb M (2020a) Cardiovascular complications in COVID-19. Am J Emerg Med 38 (7): 1504-1507. DOI: 10.1016/j.ajem.2020.04.048.

Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, Hu JL, Xu W, Zhang Y, Lv FJ, Su K, Zhang F, Gong J, Wu B, Liu XM, Li JJ, Qiu JF, Chen J, Huang AL (2020b) Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. Nat Med 26 (8): 1200-1204. DOI: 10.1038/s41591-020-0965-6.

Longo MC, Berninger MS, Hartley JL (1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93 (1): 125-128. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90145-h.

Lou B, Li TD, Zheng SF, Su YY, Li ZY, Liu W, Yu F, Ge SX, Zou QD, Yuan Q, Lin S, Hong CM, Yao XY, Zhang XJ, Wu DH, Zhou GL, Hou WH, Li TT, Zhang YL, Zhang SY, Fan J, Zhang J, Xia NS, Chen Y (2020) Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection after exposure and post-symptom onset. *Eur Respir J* 56 (2): 2000763. DOI: 10.1183/13993003.00763-2020.

Lu H, Stratton CW, Tang YW (2020a) Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J Med Virol* 92 (4): 401-402. DOI: 10.1002/jmv.25678.

Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W (2020b) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395 (10224): 565-574. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag (Thieme eRef). DOI: 10.1055/b-006-163361.

Mahase E (2021) Covid-19: Pfizer's paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports. *BMJ* 375: n2713. DOI: 10.1136/bmj.n2713.

Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, Chang J, Hong C, Zhou Y, Wang D, Miao X, Li Y, Hu B (2020a) Neurologic manifestations of hospitalized patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol* 77 (6): 683-690. DOI: 10.1001/jamaneurol.2020.1127.

Mao R, Qiu Y, He JS, Tan JY, Li XH, Liang J, Shen J, Zhu LR, Chen Y, Iacucci M, Ng SC, Ghosh S, Chen MH (2020b) Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5 (7): 667-678. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30126-6.

Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F (2010) Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol* 84 (24): 12658-12664. DOI: 10.1128/JVI.01542-10.

Medoro A, Davinelli S, Voccolla S, Cardinale G, Passarella D, Marziliano N, Intrieri M (2022) Assessment of the diagnostic performance of a novel SARS-CoV-2 antigen sealing tube test

strip (colloidal Gold) as Point-of-Care surveillance test. *Diagnostics (Basel)* 12 (5): 1279. DOI: 10.3390/diagnostics12051279.

Meiners L, Horn J, Jones TC, Mühlmann B, Schmidt ML, Walper F, Menzel P, Schwarzer R, Rose R, Krumbholz A, Corman VM, Seybold J, Drosten C (2024) SARS-CoV-2 rapid antigen test sensitivity and viral load in newly symptomatic hospital employees in Berlin, Germany, December, 2020 to February, 2022: an observational study. *Lancet Microbe* 5 (6): e538-e546. DOI: 10.1016/S2666-5247(23)00412-3.

Mina MJ, Parker R, Larremore DB (2020) Rethinking Covid-19 test sensitivity - a strategy for containment. *N Engl J Med* 383 (22): e120. DOI: 10.1056/NEJMp2025631.

Mellan KR, Eron JJ, Krajewski TJ, Painter W, Duke ER, Morse CG, Goecker EA, Premkumar L, Wolfe CR, Szewczyk LJ, Alabanza PL, Loftis AJ, Degli-Angeli EJ, Brown AJ, Dragavon JA, Won JJ, Keys J, Hudgens MG, Fang L, Wohl DA, Cohen MS, Baric RS, Coombs RW, Sheahan TP, Fischer WA (2022) Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) virus in symptomatic Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) outpatients: host, disease, and viral correlates. *Clin Infect Dis* 75 (1): e1028-e1036. DOI: 10.1093/cid/ciab968.

Morel B, Barbera P, Czech L, Bettsworth B, Hübner L, Lutteropp S, Serdari D, Kostaki EG, Mamais I, Kozlov AM, Pavlidis P, Paraskevis D, Stamatakis A (2021) Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 data is difficult. *Mol Biol Evol* 38 (5): 1777-1791. DOI: 10.1093/molbev/msaa314.

Murugesan K, Jagannathan P, Pham TD, Pandey S, Bonilla HF, Jacobson K, Parsonnet J, Andrews JR, Weiskopf D, Sette A, Pinsky BA, Singh U, Banaei N (2021) Interferon-γ release assay for accurate detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 T-cell response. *Clin Infect Dis* 73 (9): e3130-e3132. DOI: 10.1093/cid/ciaa1537.

Néant N, Lingas G, Le Hingrat Q, Ghosn J, Engelmann I, Lepiller Q, Gaymard A, Ferré V, Hartard C, Plantier JC, Thibault V, Marlet J, Montes B, Bouiller K, Lescure FX, Timsit JF, Faure E, Poissy J, Chidiac C, Raffi F, Kimmoun A, Etienne M, Richard JC, Tattevin P, Garot D, Le Moing V, Bachelet D, Tardivon C, Duval X, Yazdanpanah Y, Mentré F, Laouénan C, Visseaux B, Guedj J (2021) Modeling SARS-CoV-2 viral kinetics and association with mortality in hospitalized patients from the French COVID cohort. *Proc Natl Acad Sci USA* 118 (8): e2017962118. DOI: 10.1073/pnas.2017962118.

Neumann F, Rose R, Römpke J, Grobe O, Lorentz T, Fickenscher H, Krumbholz A (2021) Development of SARS-CoV-2 specific IgG and virus-neutralizing antibodies after infection with

variants of concern or vaccination. *Vaccines (Basel)* 9 (7): 700. DOI: 10.3390/vaccines 9070700.

Nguyen LH, Drew DA, Graham MS, Joshi AD, Guo CG, Ma W, Mehta RS, Warner ET, Sikavi DR, Lo CH, Kwon S, Song M, Mucci LA, Stampfer MJ, Willett WC, Eliassen AH, Hart JE, Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Davies R, Capdevila J, Lee KA, Lochlann MN, Varsavsky T, Sudre CH, Cardoso MJ, Wolf J, Spector TD, Ourselin S, Steves CJ, Chan AT (2020) Risk of COVID-19 among front-line health-care workers and the general community: a prospective cohort study. *Lancet Public Health* 5 (9): e475-e483. DOI: 10.1016/S2468-2667(20)30164-X.

Ni L, Ye F, Cheng ML, Feng Y, Deng YQ, Zhao H, Wei P, Ge J, Gou M, Li X, Sun L, Cao T, Wang P, Zhou C, Zhang R, Liang P, Guo H, Wang X, Qin CF, Chen F, Dong C (2020) Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity* 52 (6): 971-977. e3. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.023.

Okamaoto K, Shirato K, Nao N, Saito S, Kageyama T, Hasegawa H, Suzuki T, Matsuyama S, Takeda M (2020) Assessment of real-time RT-PCR kits for SARS-CoV-2 detection. *Jpn J Infect Dis* 73 (5): 366-368. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2020.108.

Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, Geurts van Kessel CH, Corman VM, Lamers MM, Sikkelma RS, de Bruin E, Chandler FD, Yazdanpanah Y, Le Hingrat Q, Descamps D, Houhou-Fidouh N, Reusken CBEM, Bosch BJ, Drosten C, Koopmans MPG, Haagmans BL (2020) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerg Infect Dis* 26 (7): 1478-1488. DOI: 10.3201/eid2607. 200841. Osterman A, Badell I, Basara E, Stern M, Kriesel F, Eletreby M, Öztan GN, Huber M, Autenrieth H, Knabe R, Späth PM, Muenchhoff M, Graf A, Krebs S, Blum H, Durner J, Czibere L, Dächert C, Kaderali L, Baldauf HM, Keppler OT (2022) Impaired detection of omicron by SARS-CoV-2 rapid antigen tests. *Med Microbiol Immunol* 211 (2-3): 105-117. DOI: 10.1007/s00430-022-00730-z.

Parreira R (2018) Laboratory methods in molecular epidemiology: viral infections. *Microbiol Spectr* 6 (6). DOI: 10.1128/microbiolspec.AME-0003-2018.

Parums DV (2022) Editorial: First approval of the protein-based adjuvanted Nuvaxovid (NVX-CoV2373) Novavax vaccine for SARS-CoV-2 could increase vaccine uptake and provide immune protection from viral variants. *Med Sci Monit* 28: e936523. DOI: 10.12659/MSM. 936523.

Paul-Ehrlich-Institut (2022) Die Europäische Kommission und der Ausschuss für Humanarzneimittel bei der EMA erteilen ein positives Votum, für die an die Omikron-Virusvariante

angepassten mRNA-Impfstoffe von BioNTech/Pfizer und Moderna für Auffrischimpfungen. Online verfügbar unter <https://www.pei.de/DE/newsroom/hp-meldungen/2022/220902-ema-omikron-virusvarianten-auffrischimpfungen.html>, zuletzt aktualisiert am 02.09.2022, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Payan C, Ducancelle A, Aboubaker MH, Caer J, Tapia M, Chauvin A, Peyronnet D, Le Hen E, Arab Z, Legrand MC, Tran A, Postec E, Tourmen F, Avenel M, Malbois C, De Brux MA, Descamps P, Lunel F (2007) Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *J Clin Microbiol* 45 (3): 897-901. DOI: 10.1128/JCM.02022-06.

Peacock TP, Goldhill DH, Zhou J, Baillon L, Frise R, Swann OC, Kugathasan R, Penn R, Brown JC, Sanchez-David RY, Braga L, Williamson MK, Hassard JA, Staller E, Hanley B, Osborn M, Giacca M, Davidson AD, Matthews DA, Barclay WS (2021) The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nat Microbiol* 6 (7): 899-909. DOI: 10.1038/s41564-021-00908-w.

Peeling RW, Wedderburn CJ, Garcia PJ, Boeras D, Fongwen N, Nkengasong J, Sall A, Tanuri A, Heymann DL (2020) Serology testing in the COVID-19 pandemic response. *Lancet Infect Dis* 20 (9): e245-e249. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30517-X.

Peterhoff D, Glück V, Vogel M, Schuster P, Schütz A, Neubert P, Albert V, Frisch S, Kiessling M, Pervan P, Werner M, Ritter N, Babl L, Deichner M, Hanses F, Lubnow M, Müller T, Lunz D, Hitzenbichler F, Audebert F, Hähnel V, Offner R, Müller M, Schmid S, Burkhardt R, Glück T, Koller M, Niller HH, Graf B, Salzberger B, Wenzel JJ, Jantsch J, Gessner A, Schmidt B, Wagner R (2021) A highly specific and sensitive serological assay detects SARS-CoV-2 antibody levels in COVID-19 patients that correlate with neutralization. *Infection* 49 (1): 75-82. DOI: 10.1007/s15010-020-01503-7.

Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Perez JL, Pérez Marc G, Moreira ED, Zerbini C, Bailey R, Swanson KA, Roychoudhury S, Koury K, Li P, Kalina WV, Cooper D, Frenck RW Jr, Hammitt LL, Türeci Ö, Nell H, Schaefer A, Ünal S, Tresnan DB, Mather S, Dormitzer PR, Şahin U, Jansen KU, Gruber WC; (2020) Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med* 383 (27): 2603-2615. DOI: 10.1056/NEJMoa2034577.

Poland GA, Ovsyannikova IG, Crooke SN, Kennedy RB (2020) SARS-CoV-2 vaccine development: current status. *Mayo Clin Proc* 95 (10): 2172-2188. DOI: 10.1016/j.mayocp.2020.07.021.

Pollet J, Chen WH, Strych U (2021) Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Adv Drug Deliv Rev* 170: 71-82. DOI: 10.1016/j.addr.2021. 01.001.

Porte L, Legarraga P, Vollrath V, Aguilera X, Munita JM, Araos R, Pizarro G, Vial P, Iruretagoyena M, Dittrich S, Weitzel T (2020) Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *Int J Infect Dis* 99: 328-333. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.05.098.

Prather KA, Wang CC, Schooley RT (2020) Reducing transmission of SARS-CoV-2. *Science* 368 (6498): 1422-1424. DOI: 10.1126/science.abc6197.

Public Health England (2020) Investigation of novel SARS-CoV-2 variant: Variant of Concern 202012/01. Technical briefing 3. Online verfügbar unter [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/959360/Variant\\_of\\_Concern\\_VOC\\_202012\\_01\\_Technical\\_Briefing\\_3.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/959360/Variant_of_Concern_VOC_202012_01_Technical_Briefing_3.pdf), zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Pulliam JRC, van Schalkwyk C, Govender N, von Gottberg A, Cohen C, Groome MJ, Dushoff J, Mlisana K, Moultrie H (2022) Increased risk of SARS-CoV-2 reinfection associated with emergence of Omicron in South Africa. *Science* 376 (6593): eabn4947. DOI: 10.1126/science.abn4947.

Puntmann VO, Carerj ML, Wieters I, Fahim M, Arendt C, Hoffmann J, Shchendrygina A, Escher F, Vasa-Nicotera M, Zeiher AM, Vehreschild M, Nagel E (2020) Outcomes of cardiovascular magnetic resonance imaging in patients recently recovered from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol* 5 (11): 1265-1273. DOI: 10.1001/jamacardio.2020. 3557.

Ramasamy MN, Minassian AM, Ewer KJ, Flaxman AL, Folegatti PM, Owens DR, Voysey M, Aley PK, Angus B, Babbage G, Belij-Rammerstorfer S, Berry L, Bibi S, Bittaye M, Cathie K, Chappell H, Charlton S, Cicconi P, Clutterbuck EA, Colin-Jones R, Dold C, Emary KRW, Fedosyuk S, Fuskova M, Gbesemete D, Green C, Hallis B, Hou MM, Jenkin D, Joe CCD, Kelly EJ, Kerridge S, Lawrie AM, Lelliott A, Lwin MN, Makinson R, Marchevsky NG, Mujadidi Y, Munro APS, Pacurar M, Plested E, Rand J, Rawlinson T, Rhead S, Robinson H, Ritchie AJ, Ross-Russell AL, Saich S, Singh N, Smith CC, Snape MD, Song R, Tarrant R, Themistocleous Y, Thomas KM, Villafana TL, Warren SC, Watson MEE, Douglas AD, Hill AVS, Lambe T, Gilbert SC, Faust SN, Pollard AJ (2021) Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *Lancet* 396 (10267): 1979-1993. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32466-1.

Rauch S, Jasny E, Schmidt KE, Petsch B (2018) New vaccine technologies to combat outbreak situations. *Front Immunol* 9: 1963. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01963.

Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M (2021) SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: knowns and unknowns. *Front Immunol* 12: 708264. DOI: 10.3389/fimmu.2021.708264.

Ripperger TJ, Uhrlaub JL, Watanabe M, Wong R, Castaneda Y, Pizzato HA, Thompson MR, Bradshaw C, Weinkauf CC, Bime C, Erickson HL, Knox K, Bixby B, Parthasarathy S, Chaudhary S, Natt B, Cristan E, El Aini T, Rischard F, Campion J, Chopra M, Insel M, Sam A, Knepler JL, Capaldi AP, Spier CM, Dake MD, Edwards T, Kaplan ME, Scott SJ, Hypes C, Mosier J, Harris DT, LaFleur BJ, Sprissler R, Nikolich-Žugich J, Bhattacharya D (2020) Orthogonal SARS-CoV-2 serological assays enable surveillance of low-prevalence communities and reveal durable humoral immunity. *Immunity* 53 (5): 925-933.e4. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.10.004.

Robert Koch-Institut (2022) Mpox in Deutschland. Online verfügbar unter <https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/A/Affenpocken/Ausbruch-2022-Situation-Deutschland.html>, zuletzt aktualisiert am 15.08.2024, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Rose R, Neumann F, Grobe O, Lorentz T, Fickenscher H, Krumbholz A (2022a) Humoral immune response after different SARS-CoV-2 vaccination regimens. *BMC Med* 20 (1): 31. DOI: 10.1186/s12916-021-02231-x.

Rose R, Neumann F, Müller S, Bäumler C, Schäfer M, Schön F, Römpke J, Schulze S, Weyer D, Grobe O, Lorentz T, Fickenscher H, Krumbholz A (2022b) Delta or Omicron BA.1/2-neutralizing antibody levels and T-cell reactivity after triple-vaccination or infection. *Allergy* 77 (10): 3130-3133. DOI: 10.1111/all.15395.

Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cárdenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, Goepfert PA, Truvers C, Fennema H, Spiessens B, Offergeld K, Scheper G, Taylor KL, Robb ML, Treanor J, Barouch DH, Stoddard J, Ryser MF, Marovich MA, Neuzil KM, Corey L, Cauwenberghs N, Tanner T, Hardt K, Ruiz-Guiñazú J, Le Gars M, Schuitemaker H, Van Hoof J, Struyf F, Douoguih M (2021) Safety and efficacy of single-dose Ad26.COV2.S vaccine against Covid-19. *N Engl J Med* 384 (23): 2187-2201. DOI: 10.1056/NEJMoa2101544.

Sarata AK, Siddalingaiah SV (2021) COVID-19 testing supply chain. Congressional Research Service. Online verfügbar unter <https://crsreports.congress.gov/product/pdf/IF/IF11774>, erstellt am 25.02.2021, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Sardu C, Gambardella J, Morelli MB, Wang X, Marfella R, Santulli G (2020) Hypertension, thrombosis, kidney failure, and diabetes: is COVID-19 an endothelial disease? A comprehensive evaluation of clinical and basic evidence. *J Clin Med* 9 (5): 1417. DOI: 10.3390/jcm9051417.

Sariol A, Perlman S (2020) Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. *Immunity* 53 (2): 248-263. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.07.005.

Scheiblauer H, Filomena A, Nitsche A, Puyskens A, Corman VM, Drosten C, Zwirglmaier K, Lange C, Emmerich P, Müller M, Knauer O, Nübling CM (2021) Comparative sensitivity evaluation for 122 CE-marked rapid diagnostic tests for SARS-CoV-2 antigen, Germany, September 2020 to April 2021. *Euro Surveill* 26 (44): 2100441. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.44.2100441.

Schiffner J, Backhaus I, Rimmele J, Schulz S, Möhlenkamp T, Klemens JM, Zapf D, Solbach W, Mischnik A (2021) Long-term course of humoral and cellular immune responses in outpatients after SARS-CoV-2 infection. *Front Public Health* 9: 732787. DOI: 10.3389/fpubh.2021.732787.

Schnurra C, Reiners N, Biemann R, Kaiser T, Trawinski H, Jassoy C (2020) Comparison of the diagnostic sensitivity of SARS-CoV-2 nucleoprotein and glycoprotein-based antibody tests. *J Clin Virol* 129: 104544. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104544.

Schormann N, Ricciardi R, Chattopadhyay D (2014) Uracil-DNA glycosylases-structural and functional perspectives on an essential family of DNA repair enzymes. *Protein Sci* 23 (12): 1667-1685. DOI: 10.1002/pro.2554.

SD Biosensor (2022): <https://sdbiosensor-nasaltest.de>. Online unter <https://sdbiosensor-nasaltest.de/>, zuletzt aktualisiert am 09.05.2022, zuletzt geprüft am 09.05.2022.

Seifried J, Böttcher S, Oh DY, Hauer B, Schaade L, Hamouda O, Mielke M (2021) PCR-Testkapazitäten nutzen für Personengruppen ohne Impfmöglichkeit: Serielles Screening von Kindern in KiTas und Grundschulen mittels Lolli-Pool-PCR-Testungen auf SARS-CoV-2 als Teil eines Multikomponenten-Präventionskonzepts. *Epid Bull* 26: 3-8. DOI 10.25646/8739.

Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, Hemmings O, O'Byrne A, Kouphou N, Galao RP, Betancor G, Wilson HD, Signell AW, Winstone H, Kerridge C, Huettner I, Jimenez-Guardeño JM, Lista MJ, Temperton N, Snell LB, Bisnauthsing K, Moore A, Green A, Martinez L, Stokes B, Honey J, Izquierdo-Barras A, Arbane G, Patel A, Tan MKI, O'Connell L, O'Hara G, MacMahon E, Douthwaite S, Nebbia G, Batra R, Martinez-Nunez R, Shankar-

Hari M, Edgeworth JD, Neil SJD, Malim MH, Doores KJ (2020) Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol* 5 (12): 1598-1607. DOI: 10.1038/s41564-020-00813-8.

Servellita V, Syed AM, Morris MK, Brazer N, Saldhi P, Garcia-Knight M, Sreekumar B, Khalid MM, Ciling A, Chen PY, Kumar GR, Gliwa AS, Nguyen J, Sotomayor-Gonzalez A, Zhang Y, Frias E, Prostko J, Hackett J Jr, Andino R, Wadford DA, Hanson C, Doudna J, Ott M, Chiu CY (2022) Neutralizing immunity in vaccine breakthrough infections from the SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants. *Cell* 185 (9): 1539-1548. e5. DOI: 10.1016/j.cell.2022.03.019.

Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A (2020) Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *JAMA* 323 (22): 2249-2251. DOI: 10.1001/jama.2020.8259.

Sewell HF, Agius RM, Stewart M, Kendrick D (2020) Cellular immune responses to covid-19. *BMJ* 370: m3018. DOI: 10.1136/bmj.m3018.

Sheahan TP, Sims AC, Leist SR, Schäfer A, Won J, Brown AJ, Montgomery SA, Hogg A, Babusis D, Clarke MO, Spahn JE, Bauer L, Sellers S, Porter D, Feng JY, Cihlar T, Jordan R, Denison MR, Baric R (2020) Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV. *Nat Commun* 11 (1): 222. DOI: 10.1038/s41467-019-13940-6.

Shulla A, Heald-Sargent T, Subramanya G, Zhao J, Perlman S, Gallagher T (2011) A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *J Virol* 85 (2): 873-882. DOI: 10.1128/JVI.02062-10.

SignaGen (2019): What is ROX and why use it in qPCR? SignaGen Blog. Online verfügbar unter <https://signagen.com/blog/2019/05/20/what-is-rox-and-why-use-it-in-qpcr>, zuletzt aktualisiert am 15.07.2022, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Simon-Loriere E, Schwartz O (2022) Towards SARS-CoV-2 serotypes? *Nat Rev Microbiol* 20 (4): 187-188. DOI: 10.1038/s41579-022-00708-x.

Singanayagam A, Patel M, Charlett A, Lopez Bernal J, Saliba V, Ellis J, Ladhami S, Zambon M, Gopal R (2020) Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill* 25 (32): 2001483. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483.

Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, Zhu H, Zhao W, Han Y, Qin C (2019) From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses* 11 (1): 59. DOI: 10.3390/v11010059.

Stadnytskyi V, Bax CE, Bax A, Anfinrud P (2020) The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 117 (22): 11875-11877. DOI: 10.1073/pnas.2006874117.

Ständiger Arbeitskreis der Kompetenz- und Behandlungszentren für Krankheiten durch hochpathogene Erreger (2023): Hinweise zu Erkennung, Diagnostik und Therapie von Patienten mit COVID-19. Online verfügbar unter [https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/Stakob/Stellungnahmen/Stellungnahme-Covid-19\\_Therapie\\_Diagnose.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/Stakob/Stellungnahmen/Stellungnahme-Covid-19_Therapie_Diagnose.pdf?__blob=publicationFile), zuletzt aktualisiert am 08.02.2023, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, Ellis D, Crawford KHD, Dingens AS, Navarro MJ, Bowen JE, Tortorici MA, Walls AC, King NP, Veesler D, Bloom JD (2020) Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell* 182 (5): 1295-1310. e20. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.012.

Stokes W, Berenger BM, Portnoy D, Scott B, Szelewski J, Singh T, Venner AA, Turnbull L, Pabbaraju K, Shokoples S, Wong AA, Gill K, Guttridge T, Proctor D, Hu J, Tipples G (2021) Clinical performance of the Abbott Panbio with nasopharyngeal, throat, and saliva swabs among symptomatic individuals with COVID-19. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 40 (8): 1721-1726. DOI: 10.1007/s10096-021-04202-9.

Strömer A, Rose R, Grobe O, Neumann F, Fickenscher H, Lorentz T, Krumbholz A (2020) Kinetics of nucleo- and spike protein-specific immunoglobulin G and of virus-neutralizing antibodies after SARS-CoV-2 infection. *Microorganisms* 8 (10): 1572. DOI: 10.3390/microorganisms8101572.

Strömer A, Rose R, Schäfer M, Schön F, Vollersen A, Lorentz T, Fickenscher H, Krumbholz A (2020) Performance of a Point-of-Care Test for the rapid detection of SARS-CoV-2 antigen. *Microorganisms* 9 (1): 58. DOI: 10.3390/microorganisms9010058.

Sui J, Aird DR, Tamin A, Murakami A, Yan M, Yammanuru A, Jing H, Kan B, Liu X, Zhu Q, Yuan QA, Adams GP, Bellini WJ, Xu J, Anderson LJ, Marasco WA (2008) Broadening of neutralization activity to directly block a dominant antibody-driven SARS-coronavirus evolution pathway. *PLoS Pathog* 4 (11): e1000197. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000197.

Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, Talavera-López C, Maatz H, Reichart D, Sampaziotis F, Worlock KB, Yoshida M, Barnes JL (2020) SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med* 26 (5): 681-687. DOI: 10.1038/s41591-020-0868-6.

Szekely Y, Licher Y, Taieb P, Banai A, Hochstadt A, Merdler I, Gal Oz A, Rothschild E, Baruch G, Peri Y, Arbel Y, Topilsky Y (2020) Spectrum of cardiac manifestations in COVID-19: a systematic echocardiographic study. *Circulation* 142 (4): 342-353. DOI: 10.1161/circulationaha.120.047971.

Tahamtan A, Ardebili A (2020) Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn* 20 (5): 453-454. DOI: 10.1080/14737159.2020.1757437.

Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, Doolabh D, Pillay S, San EJ, Msomi N, Mlisana K, von Gottberg A, Walaza S, Allam M, Ismail A, Mohale T, Glass AJ, Engelbrecht S, Van Zyl G, Preiser W, Petruccione F, Sigal A, Hardie D, Marais G, Hsiao NY, Korsman S, Davies MA, Tyers L, Mudau I, York D, Maslo C, Goedhals D, Abrahams S, Laguda-Akingba O, Alisoltani-Dehkordi A, Godzik A, Wibmer CK, Sewell BT, Lourenço J, Alcantara LCJ, Kosakovsky Pond SL, Weaver S, Martin D, Lessells RJ, Bhiman JN, Williamson C, de Oliveira T (2021) Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 592 (7854): 438-443. DOI: 10.1038/s41586-021-03402-9.

Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Skvarč M (2021) Clinical application of a new SARS-CoV-2 antigen detection kit (colloidal gold) in the detection of COVID-19. *Diagnostics (Basel)* 11 (6): 995. DOI: 10.3390/diagnostics11060995.

Tian JH, Patel N, Haupt R, Zhou H, Weston S, Hammond H, Logue J, Portnoff AD, Norton J, Guebre-Xabier M, Zhou B, Jacobson K, Maciejewski S, Khatoon R, Wisniewska M, Moffitt W, Kluepfel-Stahl S, Ekechukwu B, Papin J, Boddapati S, Jason Wong C, Piedra PA, Frieman MB, Massare MJ, Fries L, Bengtsson KL, Stertman L, Ellingsworth L, Glenn G, Smith G (2021) SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nat Commun* 12 (1): 372. DOI: 10.1038/s41467-020-20653-8.

To KK, Hung IF, Ip JD, Chu AW, Chan WM, Tam AR, Fong CH, Yuan S, Tsoi HW, Ng AC, Lee LL, Wan P, Tso EY, To WK, Tsang DN, Chan KH, Huang JD, Kok KH, Cheng VC, Yuen KY (2021) Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) re-infection by a phylogenetically distinct Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 strain confirmed by whole genome sequencing. *Clin Infect Dis* 73 (9): e2946-e2951. DOI: 10.1093/cid/ciaa1275.

Tong JY, Wong A, Zhu D, Fastenberg JH, Tham T (2020) The prevalence of olfactory and gustatory dysfunction in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 163 (1): 3-11. DOI: 10.1177/0194599820926473.

Torjesen I (2021) Covid-19: Omicron may be more transmissible than other variants and partly resistant to existing vaccines, scientists fear. *BMJ* 375: n2943. DOI: 10.1136/bmj.n2943.

Torres I, Poujois S, Albert E, Colomina J, Navarro D (2021) Evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag rapid test device) for SARS-CoV-2 detection in asymptomatic close contacts of COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect* 27 (4): 636.e1-636.e4. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.12.022.

Truong TT, Ryutov A, Pandey U, Yee R, Goldberg L, Bhojwani D, Aguayo-Hiraldo P, Pinsky BA, Pekosz A, Shen L, Boyd SD, Wirz OF, Röltgen K, Bootwalla M, Maglione DT, Ostrow D, Ruble D, Han JH, Biegel JA, Li M, Huang C, Sahoo MK, Pannaraj PS, O'Gorman M, Judkins AR, Gai X, Dien Bard J (2021) Increased viral variants in children and young adults with impaired humoral immunity and persistent SARS-CoV-2 infection: A consecutive case series. *EBioMedicine* 67: 103355. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103355.

Uddin MJ, Marnett LJ (2008) Synthesis of 5- and 6-carboxy-X-rhodamines. *Org Lett* 10 (21): 4799-4801. DOI: 10.1021/o1801904k.

Ueffing M, Bayyoud T, Schindler M, Ziemssen F (2020) Grundlagen der Replikation und der Immunologie von SARS-CoV-2. *Ophthalmologe* 117 (7): 609-614. DOI: 10.1007/s00347-020-01155-w.

Valeur B, Berberan-Santos MN (2012) Molecular fluorescence: principles and applications. 2. edition, Wiley-VCH Weinheim. DOI: 10.1002/9783527650002.

van Beek J, Igloi Z, Boelsums T, Fanoy E, Gotz H, Molenkamp R, van Kampen J, Geurtsvan-Kessel C, van der Eijk AA, van de Vijver D, Koopmans M (2022) From more testing to smart testing: data-guided SARS-CoV-2 testing choices, the Netherlands, May to September 2020. *Euro Surveill* 27 (8): 2100702. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.8.2100702.

van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, Tamin A, Harcourt JL, Thornburg NJ, Gerber SI, Lloyd-Smith JO, de Wit E, Munster VJ (2020) Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* 382 (16): 1564-1567. DOI: 10.1056/NEJMc2004973.

van Kampen JJA, van de Vijver DAMC, Fraaij PLA, Haagmans BL, Lamers MM, Okba N, van den Akker JPC, Endeman H, Gommers DAMPJ, Cornelissen JJ, Hoek RAS, van der Eerden MM, Hesselink DA, Metselaar HJ, Verbon A, de Steenwinkel JEM, Aron GI, van Gorp ECM, van Boheemen S, Voermans JC, Boucher CAB, Molenkamp R, Koopmans MPG, Geurtsvankessel C, van der Eijk AA (2021) Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat Commun* 12 (1): 267. DOI: 10.1038/s41467-020-20568-4.

Verreault D, Marcoux-Voiselle M, Turgeon N, Moineau S, Duchaine C (2015) Resistance of aerosolized bacterial viruses to relative humidity and temperature. *Appl Environ Microbiol* 81 (20): 7305-7311. DOI: 10.1128/AEM.02484-15.

Vitrosens (2022): How Does the SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test Kit Work? Online verfügbar unter <https://vitrosens.com/how-does-the-sars-cov-2-rapid-antigen-test-kit-work>, zuletzt aktualisiert am 05.03.2022, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V (2021) Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19 (3): 155-170. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.

Volz E, Hill V, McCrone JT, Price A, Jorgensen D, O'Toole Á, Southgate J, Johnson R, Jackson B, Nascimento FF, Rey SM, Nicholls SM, Colquhoun RM, da Silva Filipe A, Shepherd J, Pascall DJ, Shah R, Jesudason N, Li K, Jarrett R, Pacchiarini N, Bull M, Geidelberg L, Siveroni I, Goodfellow I, Loman NJ, Pybus OG, Robertson DL, Thomson EC, Rambaut A, Connor TR (2021) Evaluating the effects of SARS-CoV-2 spike mutation D614G on transmissibility and pathogenicity. *Cell* 184 (1): 64-75. e11. DOI: 10.1016/j.cell.2020.11.020.

Wacharapluesadee S, Tan CW, Maneeorn P, Duengkae P, Zhu F, Joyjinda Y, Kaewpom T, Chia WN, Ampoot W, Lim BL, Worachotsueprakun K, Chen VC, Sirichan N, Ruchisrisard C, Rodpan A, Noradechanon K, Phaichana T, Jantarad N, Thongnumchaima B, Tu C, Crameri G, Stokes MM, Hemachudha T, Wang LF (2021) Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. *Nat Commun* 12 (1): 972. DOI: 10.1038/s41467-021-21240-1.

Walsh KA, Jordan K, Clyne B, Rohde D, Drummond L, Byrne P, Ahern S, Carty PG, O'Brien KK, O'Murchu E, O'Neill M, Smith SM, Ryan M, Harrington P (2020) SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. *J Infect* 81 (3): 357-371. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.06.067.

Wang CC, Prather KA, Sznitman J, Jimenez JL, Lakdawala SS, Tufekci Z, Marr LC (2021a) Airborne transmission of respiratory viruses. *Science* 373 (6558): eabd9149. DOI: 10.1126/science.abd9149.

Wang P, Casner RG, Nair MS, Wang M, Yu J, Cerutti G, Liu L, Kwong PD, Huang Y, Shapiro L, Ho DD (2021b) Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P.1 to antibody neutralization. *Cell Host Microbe* 29 (5): 747-751. e4. DOI: 10.1016/j.chom.2021.04.007.

Wang P, Nair MS, Liu L, Iketani S, Luo Y, Guo Y, Wang M, Yu J, Zhang B, Kwong PD, Graham BS, Mascola JR, Chang JY, Yin MT, Sobieszczak M, Kyratsous CA, Shapiro L, Sheng Z, Huang Y, Ho DD (2021c) Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature* 593 (7857): 130-135. DOI: 10.1038/s41586-021-03398-2.

Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W (2020) Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA* 323 (18): 1843-1844. DOI: 10.1001/jama.2020.3786.

Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, Musser BJ, Soo Y, Rofail D, Im J, Perry C, Pan C, Hosain R, Mahmood A, Davis JD, Turner KC, Hooper AT, Hamilton JD, Baum A, Kyratsous CA, Kim Y, Cook A, Kampman W, Kohli A, Sachdeva Y, Gruber X, Kowal B, DiCioccio T, Stahl N, Lipsich L, Braunstein N, Herman G, Yancopoulos GD (2021) REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. *N Engl J Med* 384 (3): 238-251. DOI: 10.1056/NEJMoa2035002.

Weiss SR, Navas-Martin S (2005) Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 69 (4): 635-664. DOI: 10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005.

West J, Everden S, Nikitas N (2021) A case of COVID-19 reinfection in the UK. *Clin Med (Lond)* 21 (1): e52-e53. DOI: 10.7861/clinmed.2020-0912.

Wheatley AK, Juno JA, Wang JJ, Selva KJ, Reynaldi A, Tan HX, Lee WS, Wragg KM, Kelly HG, Esterbauer R, Davis SK, Kent HE, Mordant FL, Schlub TE, Gordon DL, Khouri DS, Subbarao K, Cromer D, Gordon TP, Chung AW, Davenport MP, Kent SJ (2021) Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19. *Nat Commun* 12 (1): 1162. DOI: 10.1038/s41467-021-21444-5.

Widmer AF, Tietz A (2005): Praktische Hygiene in der Arztpraxis. *Schweiz Med Forum* 5: 660-666. Online verfügbar unter <https://www.yumpu.com/de/document/read/9092412/praktische-hygiene-in-der-artzpraxis-schweiz-med-forum>

Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, Morton CE, Curtis HJ, Mehrkar A, Evans D, Inglesby P, Cockburn J, McDonald HI, MacKenna B, Tomlinson L, Douglas IJ, Rentsch CT, Mathur R, Wong AYS, Grieve R, Harrison D, Forbes H, Schultze A, Croker R, Parry J, Hester F, Harper S, Perera R, Evans SJW, Smeeth L, Goldacre B (2020) Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* 584 (7821): 430-436. DOI: 10.1038/s41586-020-2521-4.

Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmäier M, Zange S, Müller MA, Niemeyer D, Jones TC, Vollmar P, Rothe C, Hoelscher M, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Ehmann R, Zwirg-Imai K, Drosten C, Wendtner C (2020) Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 581 (7809): 465-469. DOI: 10.1038/s41586-020-2196-x.

Woloshin S, Patel N, Kesselheim AS (2020) False negative tests for SARS-CoV-2 infection, challenges and implications. *N Engl J Med* 383 (6): e38. DOI: 10.1056/NEJMmp2015897.

Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39 (1): 75-85. DOI: 10.2144/05391RV01.

World Health Organization (2020) National capacities review tool for a novel coronavirus. Interim guidance. Online verfügbar unter <https://www.who.int/publications/i/item/national-capacities-review-tool-for-a-novelcoronavirus>, zuletzt aktualisiert am 09.01.2020, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

World Health Organization (2021a) Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. Online verfügbar unter <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>, zuletzt aktualisiert am 24.07.2015, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

World Health Organization (2021b): WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. Online verfügbar unter <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>, zuletzt aktualisiert am 11.02.2020, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

World Health Organization (2021c): WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Online verfügbar unter <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>, zuletzt aktualisiert am 11.03.2020, zuletzt geprüft am 25.08.2024.

Wu F, Wang A, Liu M, Wang Q, Chen J, Xia S, Ling Y, Zhang Y, Xun J, Lu L, Jiang S, Lu H, Wen Y, Huang J (2020) Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19

recovered patient cohort and their implications. Vorabveröffentlichung (preprint), medRxiv, DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>.

Wu J, Liang B, Chen C, Wang H, Fang Y, Shen S, Yang X, Wang B, Chen L, Chen Q, Wu Y, Liu J, Yang X, Li W, Zhu B, Zhou W, Wang H, Li S, Lu S, Liu D, Li H, Krawczyk A, Lu M, Yang D, Deng F, Dittmer U, Trilling M, Zheng X (2021) SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19. *Nat Commun* 12 (1): 1813. DOI: 10.1038/s41467-021-22034-1.

Wu Z, McGoogan JM (2020) Characteristics of and important lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 323 (13): 1239-1242. DOI: 10.1001/jama.2020.2648.

Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, Warren JL, Geng B, Muenker MC, Moore AJ, Vogels CBF, Petrone ME, Ott IM, Lu P, Venkataraman A, Lu-Culligan A, Klein J, Earnest R, Simonov M, Datta R, Handoko R, Naushad N, Sewanan LR, Valdez J, White EB, Lapidus S, Kalinich CC, Jiang X, Kim DJ, Kudo E, Linehan M, Mao T, Moriyama M, Oh JE, Park A, Silva J, Song E, Takahashi T, Taura M, Weizman OE, Wong P, Yang Y, Bermejo S, Odio CD, Omer SB, Dela Cruz CS, Farhadian S, Martinello RA, Iwasaki A, Grubaugh ND, Ko AI (2020) Saliva or nasopharyngeal swab specimens for detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 383 (13): 1283-1286. DOI: 10.1056/ NEJMc2016359.

Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H (2020) Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* 158 (6): 1831-1833. e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.02. 055.

Yamaguchi A, Matsuda K, Uehara M, Honda T, Saito Y (2016) A novel automated device for rapid nucleic acid extraction utilizing a zigzag motion of magnetic silica beads. *Anal Chim Acta* 906: 1-6. DOI: 10.1016/j.aca.2015.10.011.

Yan CH, Faraji F, Prajapati DP, Ostrander BT, DeConde AS (2020) Self-reported olfactory loss associates with outpatient clinical course in COVID-19. *Int Forum Allergy Rhinol* 10 (7):8 21-831. DOI: 10.1002/alr.22592.

Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, Wu Y, Zhang L, Yu Z, Fang M, Yu T, Wang Y, Pan S, Zou X, Yuan S, Shang Y (2020) Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med* 8 (5): 475-481. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.

Yao H, Song Y, Chen Y, Wu N, Xu J, Sun C, Zhang J, Weng T, Zhang Z, Wu Z, Cheng L, Shi D, Lu X, Lei J, Crispin M, Shi Y, Li L, Li S (2020) Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell* 183 (3): 730-738. e13. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.018.

Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY (2020) Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci* 16 (10): 1686-1697. DOI: 10.7150/ijbs.45472.

Younes N, Al-Sadeq DW, Al-Jighefee H, Younes S, Al-Jamal O, Daas HI, Yassine HM, Nasrallah GK (2020) Challenges in laboratory diagnosis of the novel coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses* 12 (6): 582. DOI: 10.3390/v12060582.

Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA (2012) Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 367 (19): 1814-20. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.

Zhang C, Maruggi G, Shan H, Li J (2019) Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Front Immunol* 10: 594. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00594.

Zhang T, Wu Q, Zhang Z (2020) Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Curr Biol* 30 (7): 1346-1351. e2. DOI: 10.1016/j.cub.2020.03.022.

Zhao L, Jha BK, Wu A, Elliott R, Ziebuhr J, Gorbatenya AE, Silverman RH, Weiss SR (2012) Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell Host Microbe* 11 (6): 607-616. DOI: 10.1016/j.chom.2012.04.011.

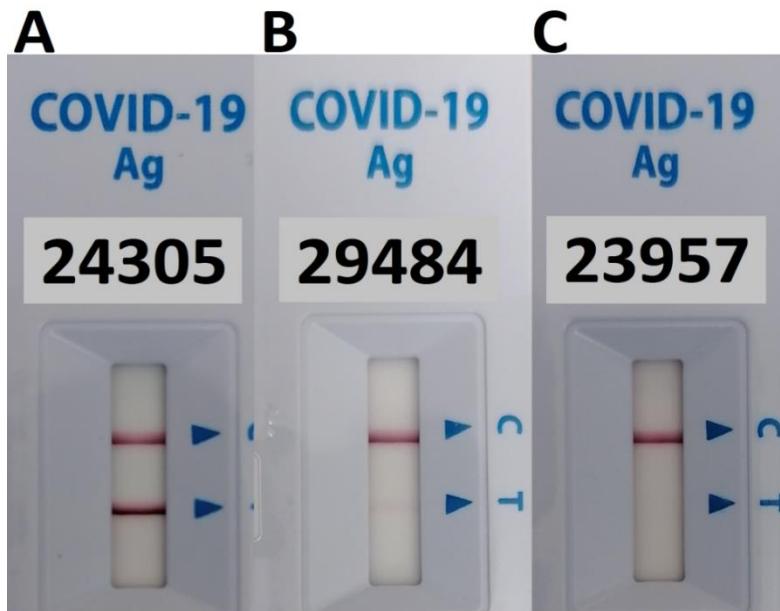
Zhou D, Dejnirattisai W, Supasa P, Liu C, Mentzer AJ, Ginn HM, Zhao Y, Duyvesteyn HME, Tuekprakhon A, Nutalai R, Wang B, Paesen GC, Lopez-Camacho C, Slon-Campos J, Hallis B, Coombes N, Bewley K, Charlton S, Walter TS, Skelly D, Lumley SF, Dold C, Levin R, Dong T, Pollard AJ, Knight JC, Crook D, Lambe T, Clutterbuck E, Bibi S, Flaxman A, Bittaye M, Belj-Rammerstorfer S, Gilbert S, James W, Carroll MW, Klenerman P, Barnes E, Dunachie SJ, Fry EE, Mongkolsapaya J, Ren J, Stuart DI, Scratton GR (2021) Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell* 184 (9): 2348-2361. e6. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.037.

Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL (2020a) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579 (7798): 270-273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.

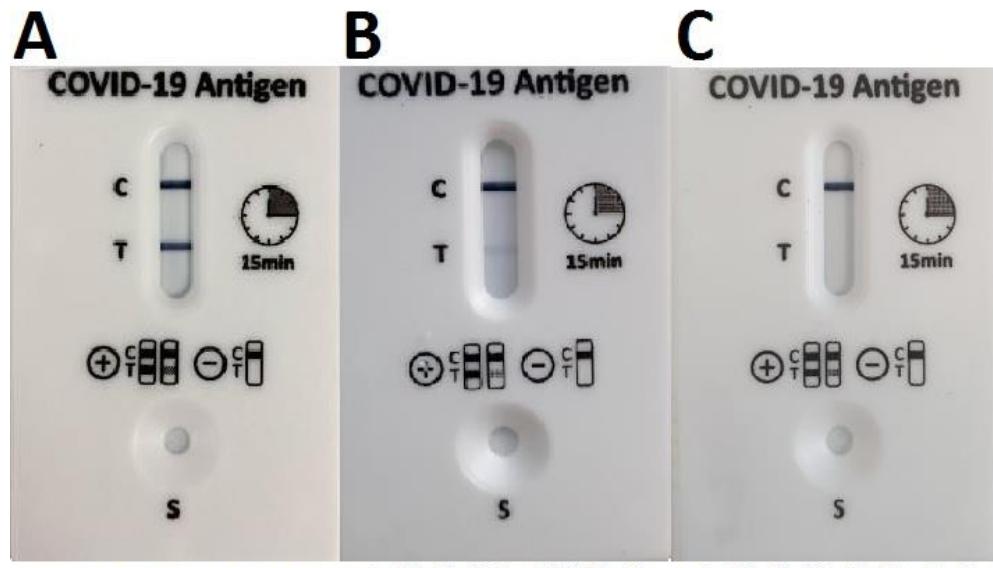
Zhou Y, Zeng Y, Tong Y, Chen C (2020b) Ophthalmologic evidence against the interpersonal transmission of 2019 novel coronavirus through conjunctiva. Vorabveröffentlichung (preprint), medRxiv. DOI: 10.1101/2020.02.11.20021956.

Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, Yu J, Kang M, Song Y, Xia J, Guo Q, Song T, He J, Yen HL, Peiris M, Wu J (2020) SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. N Engl J Med 382 (12): 1177-1179. DOI: 10.1056/NEJMc2001737.

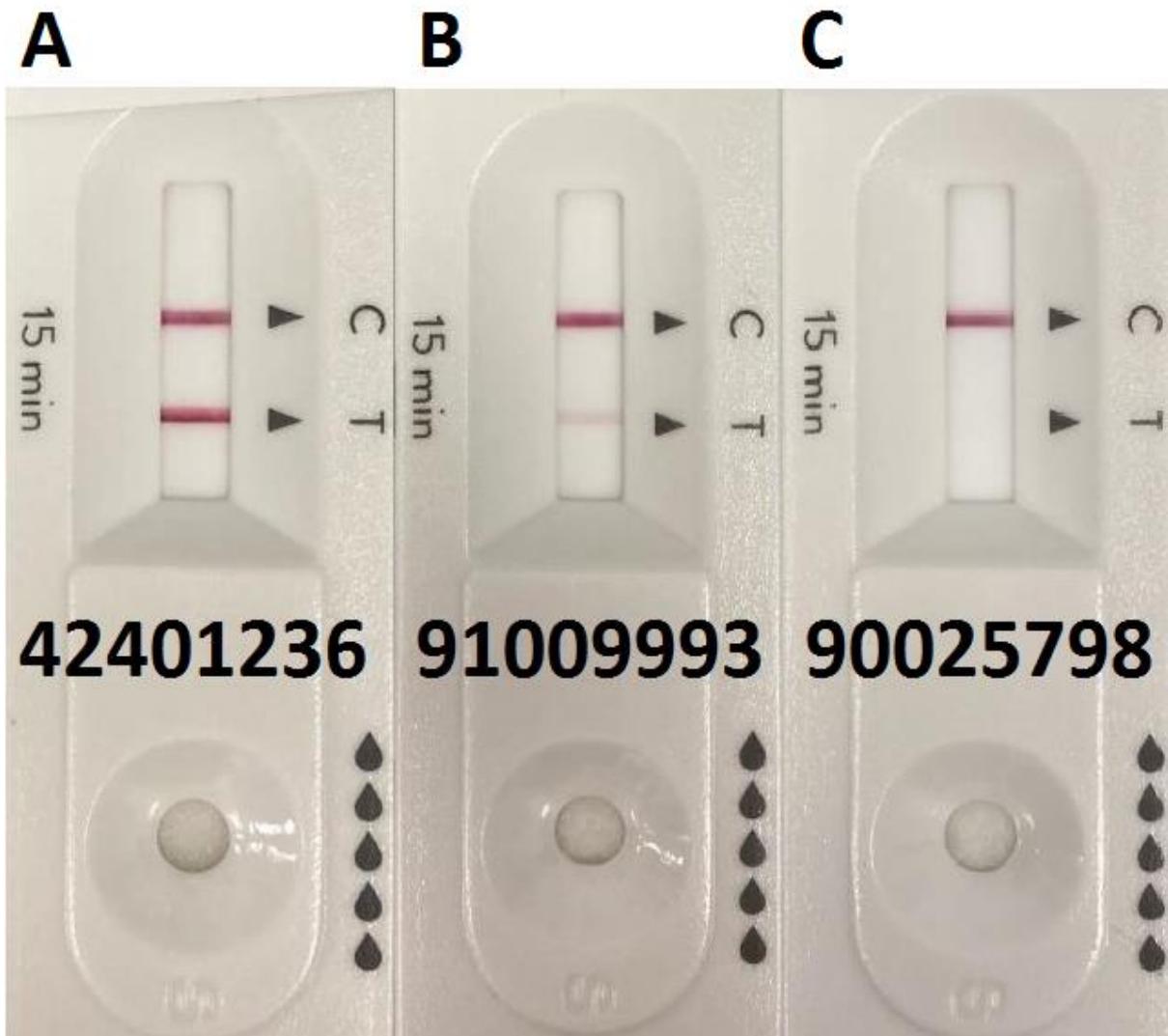
## 7. Anhang



**Abb. A1: SARS-CoV-2-Antigennachweis mit dem Schnelltest-Standard Q COVID19 Ag von SD Biosensor.** Beispielhaft gezeigt für (A) eine hochpositive Probe (Viruslast Ct 20, E-Gen, entspricht ca.  $10^9$  Kopien/ml), (B) eine schwächer positive Probe (Viruslast Ct 23, E-Gen, entspricht ca.  $10^8$  Kopien/ml) und (C) eine negative Probe.



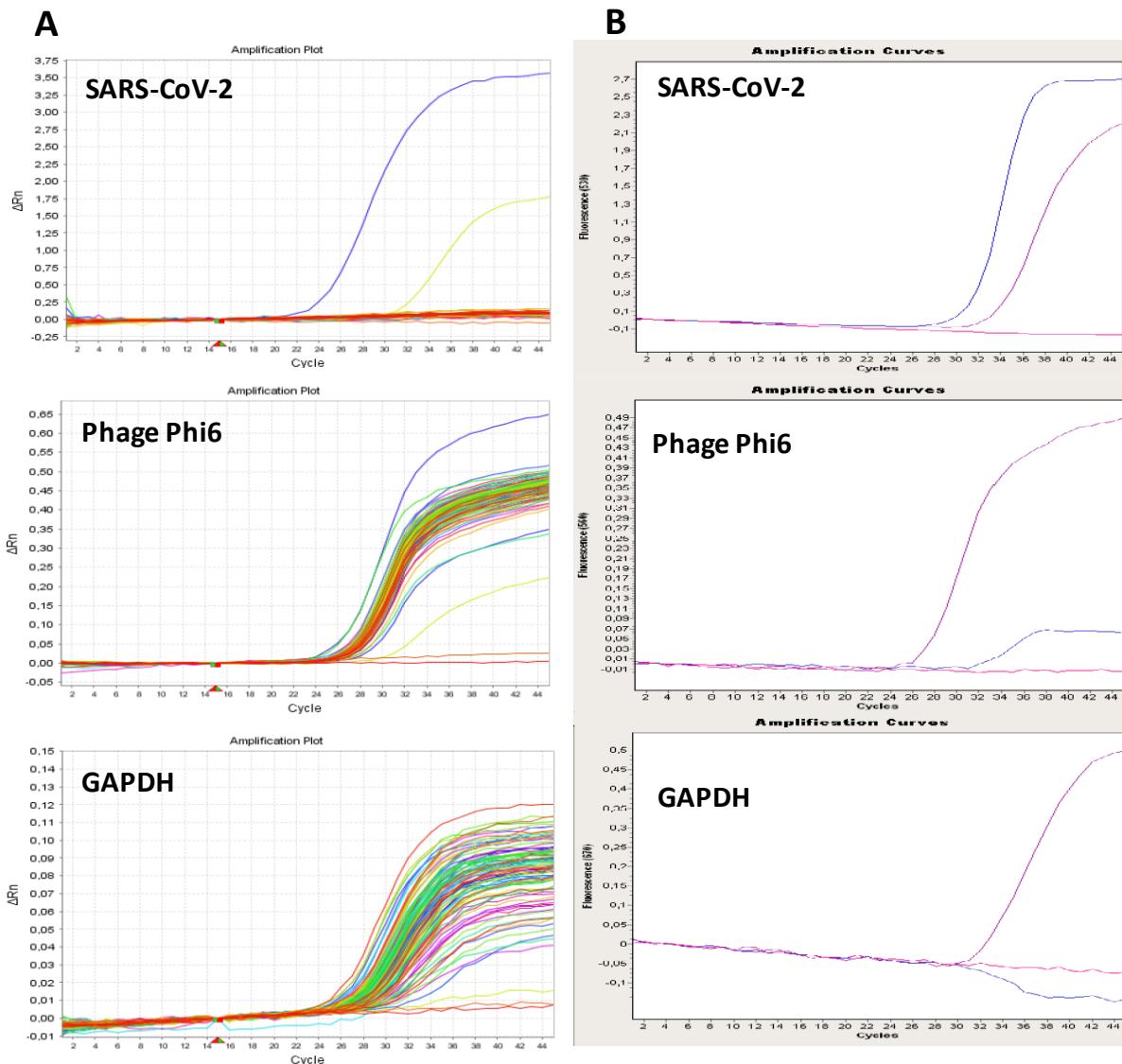
**Abb. A2: SARS-CoV-2-Antigennachweis mit dem NADAL® COVID-19.Ag-Test** (nal von Minden GmbH, Moers, Deutschland). Beispielhaft gezeigt für eine Probe mit einer (A) hohen Viruslast (Ct 17, N-Gen, entspricht ca.  $10^{11}$  Kopien/ml), (B) mit einer mittleren Viruslast (Ct 29, N-Gen, entspricht ca.  $10^6$  Kopien/ml) und (C) mit einem negativen PCR-Ergebnis.



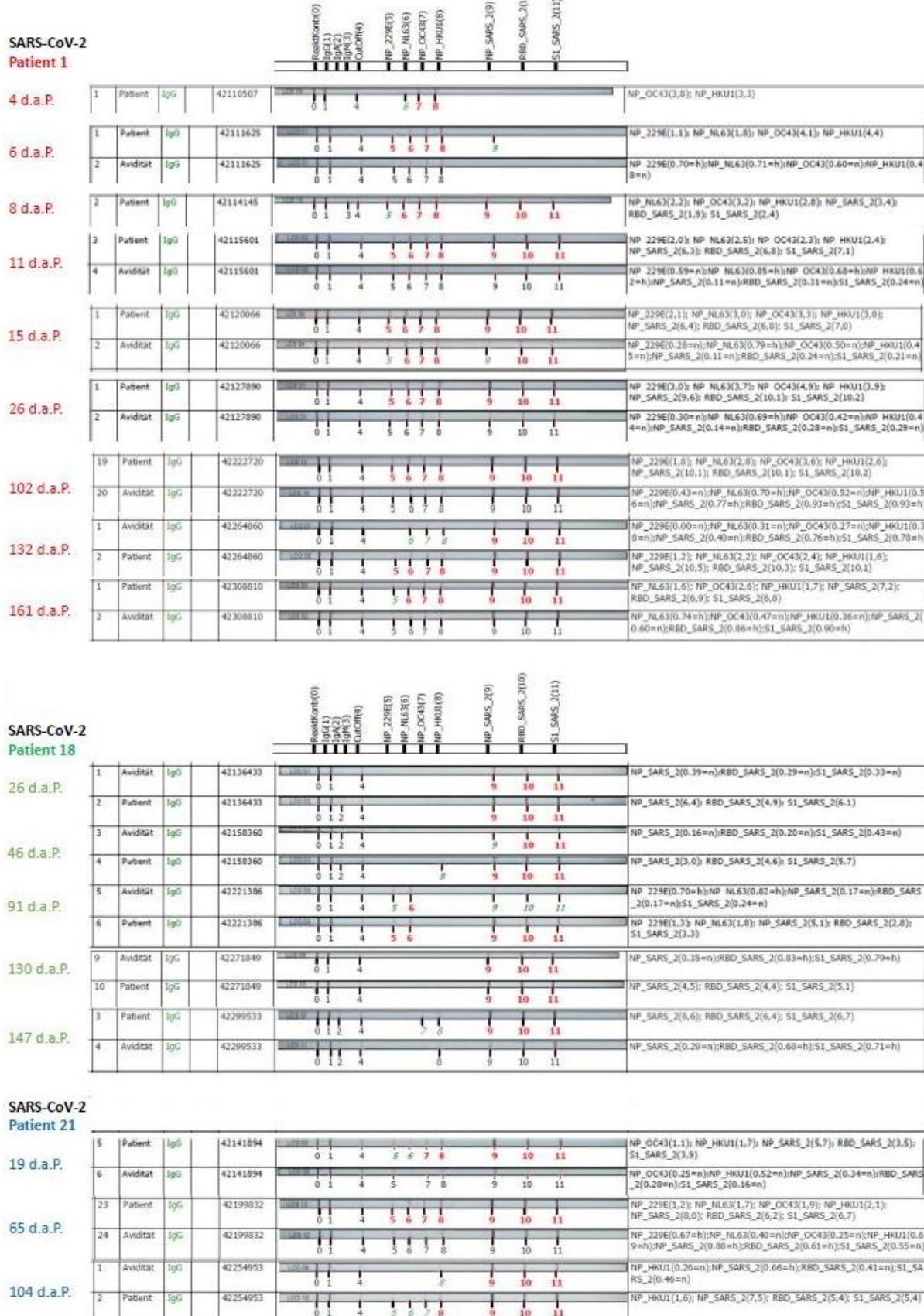
**Abb. A3: SARS-CoV-2-Antigennachweis mit dem Panbio® COVID-19-Antigen-Schnelltest** (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland). Beispielhaft dargestellt für Proben mit einer (A) hohen Viruslast (Ct 19, N-Gen, entspricht ca.  $10^{10}$  Kopien/ml), (B) einer mittleren Viruslast (Ct 22, N-Gen, entspricht ca.  $10^9$  Kopien/ml) und (C) einem negativen PCR-Ergebnis.

**Tab. A 1: Eingeschlossene Patientenproben aus der Routinediagnostik des Labors Dr. Krause und Kollegen MVZ GmbH.** Die Ct-Werte sind angegeben, die in der N-Gen-basierten Triplex-RT-PCR ermittelt wurden.

Probe/Proben-Pool	Ct-Wert (N-Gen-PCR)	Probe/Proben-Pool	Ct-Wert (N-Gen-PCR)
M025990	25,45	Pool M044220-44227	32,21
M024305	23,72	Pool M044228-44235	27,74
M024379	26,35	Pool M044236-44243	29,38
M027393	28,69	M0340066	37,07
M027398	28,16	M0340067	neg
M025745	37,67	M0340068	neg
M025841	35,33	M0340069	33,5
M025855	negativ	M0340070	neg
M027401	33,35	M0340072	neg
M030008	31,79	M0340073	36,21
M031166	negativ	M0340074	neg
M031167	negativ	M055071	30,04
M031168	negativ	M055849	34,07
M031169	negativ	M055853	33,83
M031170	negativ	M054874	34,33
M024511	21,32	M055068	31,59
M024305	18,91	M055055	31,49
M025990	20,04	M055074	29,77
M024379	20,75	M05588	25,33
M027393	23	M054920	27,65
M024993	34,98	M054918	22,34
M025745	33,28	M055981	neg
M025841	31,88	M055982	neg
M025855	32,62	M055983	neg
M027401	28,03	M055984	neg
M025526	negativ	M055985	neg
M025527	negativ	M073059	22
M025529	negativ	M074218	24
M025530	negativ	M074079	25
M025531	negativ	M070008	28
Pool M031856-31863	35,62	M070969	29
Pool M032745-32752	28,91	M074216	29
Pool M032437-32444	35,62	M063653	31
Pool M032476-32483	36,59	M073055	31
Pool M035167-35176	34,36	M072071	31
Pool M34005-34012	29,92	M073748	32
Pool M032729-32736	28,74	M072650	32
Pool M032325-32337	29,41	M072549	32
Pool M040329-40341	37,39	M072013	32
Pool M040661-40668	32,84	M072555	33
Pool M041065-41072	25,77	M067727	34
Pool M042321-42328	32,81	M068836	36
Pool M042384-42391	38,42		



**Abb. A4: Beispiele für ein N-Gen-Triplex-RT-PCR-Experiment.** Der Abbildungsteil A zeigt die Ergebnisse auf dem ABI7500-System. Neben den 93 Patientenproben in diesem Beispiel, die durch Atemwegstupfer entnommen und in Phosphat-gepufferter Salzlösung aufgenommen wurden, werden in jedem Experiment sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt. In diesem Lauf wurde ein Patient SARS-CoV-2-positiv getestet. Der mittlere Schwellenzyklus ( $C_t$ ) des RNA-Phagensignals beträgt 26,9 (Standardabweichung,  $SD = 0,5$ ) und der des GAPDH-Signals 28,1 ( $SD = 1,4$ ). Im Abbildungsteil B ist die Kurve einer SARS-CoV-2-positiven Patientenprobe auf dem LightCycler2.0 gezeigt. Die violette Kurve zeigt hier die Patientenprobe, die blaue Kurve die Positivkontrolle und die pinke die Negativkontrolle (aus Strömer et al. 2020b).



**Abb. A5: Entwicklung hoher SARS-CoV-2-IgG-Aviditäten bei drei SARS-CoV-2-Patienten.** d.a.P: Tage nach PCR (aus Strömer et al. 2020a).

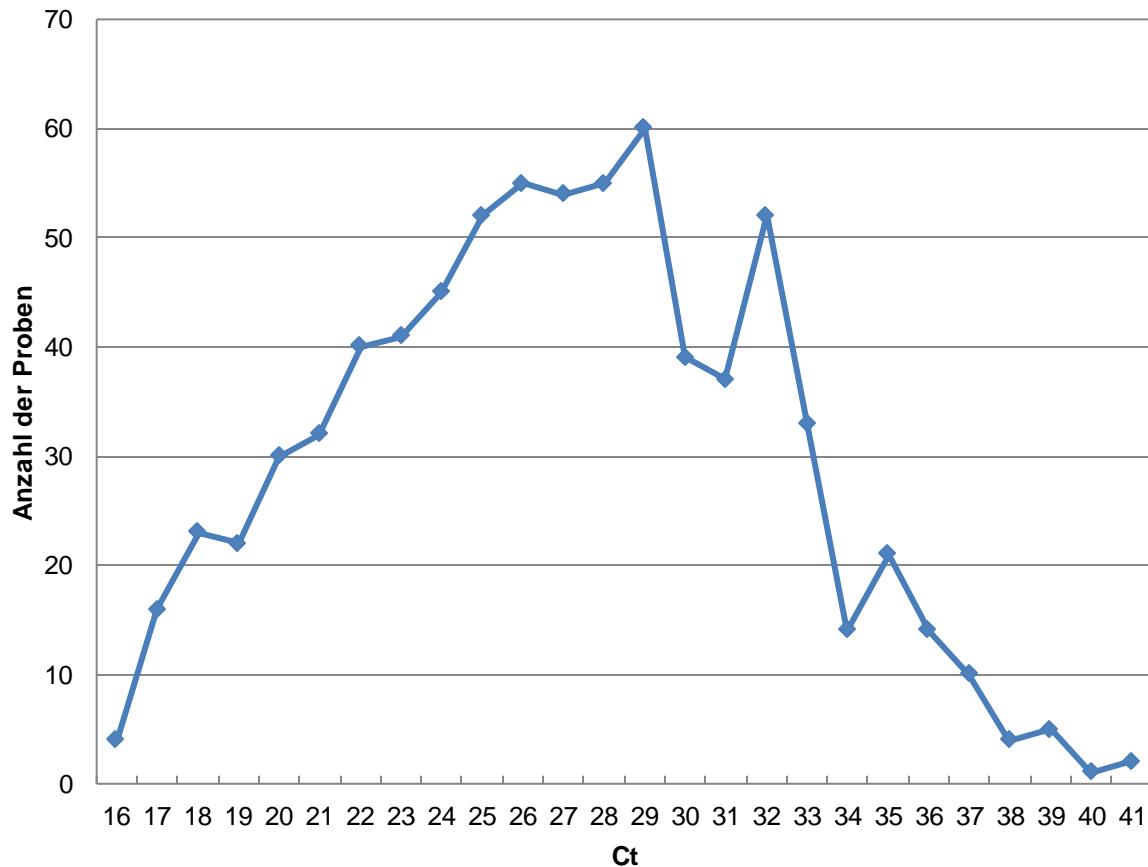


Abb. A6: Ct-Werte (vorwiegend N-Gen) der im Labor Dr. Krause und Kollegen MVZ GmbH Kiel im Zeitraum vom 30.08. bis 30.10.2020 untersuchten Patientenproben (abgeändert nach Strömer et al. 2020b).

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen großen Dank aussprechen, ohne deren Mitwirkung die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst gilt mein Dank meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Andi Krumbholz (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Labor Dr. Krause und Kollegen MVZ GmbH Kiel), für die Vergabe des Themas und die fortwährende fachliche Betreuung. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher (Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, CAU zu Kiel) für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zu verfassen.

Ein herzliches Dankeschön gilt Dr. rer. nat. Ines Heyn, M. Sc., Dr. rer. nat. Gregor Maschkowitz, M. Sc., und Ruben Rose, M. Sc., aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, die mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützten.

Des Weiteren möchte ich dem ärztlichen Leiter des Labor Dr. Krause und Kollegen MVZ GmbH, Herrn Dr. Thomas Lorentz, sowie dem gesamten Laborteam danken, die mir ermöglichten, die praktische Arbeit dort vor Ort durchzuführen. Ein besonderer Dank gilt dabei Franziska Neumann, M.Sc., Miriam Schäfer, M.Sc., Frieda Schlüter, Anna Vollersen, Sina Müller und Dr. rer. nat. Olaf Grobe.

Danken möchte ich auch Martina Ehrich, Angelika Meißner sowie der Familie Strömer, insbesondere meinem Onkel Horst, für die Überprüfung von Wort und Schrift der vorliegenden Arbeit. Ein Dankeschön auch an Lina Willms für die Unterstützung im technischen Bereich.

Darüber hinaus möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner für die Unterstützung, Geduld und aufmunternden Worte danken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit den Rücken gestärkt haben.

## **9. Veröffentlichungen**

1. Strömer A\*, Rose R\*, Grobe O, Neumann F, Fickenscher H, Lorentz T, Krumbholz A (2020) Kinetics of nucleo- and spike protein-specific immunoglobulin G and of virus-neutralizing antibodies after SARS-CoV-2 infection. *Microorganisms* 8 (10): 1572. DOI: 10.3390/microorganisms8101572.
2. Strömer A\*, Rose R\*, Schäfer M, Schön F, Vollersen A, Lorentz T, Krumbholz A (2020) Performance of a point-of-care test for the rapid detection of SARS-CoV-2 antigen. *Microorganisms* 9 (1): 58. DOI: 10.3390/microorganisms9010058.
3. Strömer A\*, Rose R\*, Schäfer M, Schön F, Vollersen A, Lorentz T, Fickenscher H, Krumbholz A (2021) Vortrag auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) 2021. ID PS 58, Workshop Reliable detection of high SARS-CoV-2 concentrations using a rapid antigen test; Vortrag am 25.03.2021 um 15:35-15:40 Uhr. Poster session 2 Clinical virology

\*geteilte Erstautorenschaft