

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Diagnostische Evaluation von POCT PCR Geräten zum
Nachweis von SARS-CoV-2**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Prodromidou, Sofia**

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Willmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Iftner

Tag der Disputation: 03.07.24

Meiner Tochter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
I. Tabellenverzeichnis	4
II. Abkürzungsverzeichnis	6
III. Übersetzungsverzeichnis	10
1. Einleitung	13
1.1 Was ist SARS-CoV-2?	13
1.1.1 Historie medizinisch bedeutsamer Coronaviren.....	13
1.1.2 Entstehung und Verbreitung	13
1.1.3 Genomik, Phylognese und Taxonomie	16
1.1.4 Tierische Wirte.....	17
1.1.5 Pathogenese von SARS-CoV-2.....	20
1.1.6 Klinische und epidemiologische Aspekte.....	23
1.1.7 Diagnose	26
1.1.8 Therapie	27
1.1.8.1 Antivirale Behandlungsansätze	27
1.1.8.2 Immunmodulatorische Behandlungsansätze.....	28
1.1.8.3 Zusammenfassende Therapie-Empfehlungen	29
1.1.9 Impfung.....	30
1.2 Wissenschaftlicher Kenntnisstand zur Labor- und Schnelldiagnostik von SARS-CoV-2:	31
1.3 Ziele (Hypothesen).....	34
2. Material und Methoden	37
2.1 Materialien.....	37

2.2	Molekulardiagnostische Methoden	37
2.2.1	RNA-Extraktion und qRT-PCR.....	38
2.2.2	Durchführung von RNA-Extraktion und PCR:	38
2.3	POCT-Geräte und Testverfahren	41
2.3.1	Beschreibung aller Testsysteme.....	42
2.3.1.1	Alveo be.well	42
2.3.1.2	BD Veritor.....	43
2.3.1.3	Bosch Vivalytic	44
2.3.1.4	Chronos Dx	45
2.3.1.5	Fluxergy	46
2.3.1.6	Lumira Dx.....	47
2.4	Statistik.....	48
3.	Ergebnisse.....	51
3.1	Geräte Ergebnisse	51
3.1.1	Alveo be.well.....	51
3.1.1.1	Betriebliche Testeigenschaften	51
3.1.1.2	Testeigenschaften des Alveo be.well Tests	51
3.1.2	BD Veritor	55
3.1.2.1	Betriebliche Testeigenschaften	55
3.1.2.2	Testeigenschaften des BD Veritor Tests	55
3.1.3	Bosch Vivalytic.....	60
3.1.3.1	Betriebliche Testeigenschaften	60
3.1.3.2	Testeigenschaften des Bosch Vivalytic Tests	60
3.1.4	Chronos Dx.....	64
3.1.4.1	Betriebliche Testeigenschaften	64

3.1.4.2	Testeigenschaften des Chronos Dx Tests.....	64
3.1.5	Fluxergy	70
3.1.5.1	Betriebliche Testeigenschaften	70
3.1.5.2	Testeigenschaften des Fluxergy Tests.....	70
3.1.6	Lumira Dx	74
3.1.6.1	Betriebliche Testeigenschaften	74
3.1.6.2	Testeigenschaften des Lumira Dx Tests	74
3.1.7	Gesamtvergleich der getesteten POCT Geräte	78
3.1.7.1	Vergleich der Betriebs- und Testeigenschaften.....	78
3.1.7.2	Erstellung eines Vergleichs-Scores zur qualitativen Bewertung der getesteten POCT-Geräte.....	80
4.	Diskussion	85
4.1	Vergleich der Testergebnisse mit dem Stand der wissenschaftlichen Literatur.....	85
4.2	Studienlimitationen.....	89
4.3	Finale Schlussfolgerungen zum Nutzen der untersuchten POCT – Geräte	90
5.	Zusammenfassung.....	93
6.	Literaturangaben.....	95
7.	Anhang.....	107
8.	Erklärung zum Eigentel der Dissertationsschrift	115
9.	Danksagung.....	117

I. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Geräteeinstellung 7500 Standard Cyclor (Novatec, Dietzenbach, Deutschland)	40
Tabelle 2. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs Alveo be.well	52
Tabelle 3. Stratifizierte Klinische Sensitivität von Alveo be.well in Abhängigkeit von der CT-Wert-Spanne	53
Tabelle 4. Betriebliche Eigenschaften Alveo be.well vs Goldstandard PCR.....	53
Tabelle 5. Testeigenschaften des Alveo be.well.....	55
Tabelle 6. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs BD Veritor.	56
Tabelle 7. Stratifizierte klinische Sensitivität von BD Veritor in Abhängigkeit von der CT-Wert-Spanne	58
Tabelle 8. Betriebliche Eigenschaften BD Veritor vs Goldstandard PCR	59
Tabelle 9. Testeigenschaften des BD Veritor	60
Tabelle 10. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs Bosch Vivalytic	61
Tabelle 11. Stratifizierte Klinische Sensitivität von Bosch Vivalytic in Abhängigkeit von der CT-Wert-Spanne	62
Tabelle 12. Betriebliche Eigenschaften Bosch Vivalytic vs Goldstandard PCR	62
Tabelle 13. Testeigenschaften des Bosch Vivalytic.....	64
Tabelle 14. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs Chronos DX mit GSD NovaPrime Reagenz	65
Tabelle 15. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs Chronos DX mit BFast Reagenzien	66
Tabelle 16. Stratifizierte Klinische Sensitivität von Chronos Dx mit NovaPrime und Bfast Reagenzien in Abhängigkeit von der CT-Wert-Spanne.....	68
Tabelle 17. Betriebliche Eigenschaften Chronos DX vs Goldstandard PCR	68
Tabelle 18. Testeigenschaften des Chronos Dx mit NovaPrime und Bfast Reagenzien	69

Tabelle 19. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs Fluxergy.....	71
Tabelle 20. Stratifizierte Klinische Sensitivität von Fluxergy in Abhängigkeit von der CT-Wert-Spanne	72
Tabelle 21. Betriebliche Eigenschaften Fluxergy vs Goldstandard PCR	72
Tabelle 22. Testeigenschaften des Fluxergy	73
Tabelle 23. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs Lumira Dx	75
Tabelle 24. Stratifizierte Klinische Sensitivität von Lumira Dx in Abhängigkeit von der CT-Wert-Spanne	76
Tabelle 25. Betriebliche Eigenschaften Lumira Dx vs Goldstandard PCR	77
Tabelle 26. Testeigenschaften des Lumira Dx	78
Tabelle 27. Betriebseigenschaften der getesteten POCT Geräte.....	78
Tabelle 28. Ergebnisse Alveo be.well vs BD Veritor vs Bosch Vivalytic vs Chronos DX vs Fluxergy vs Lumira Dx	80
Tabelle 29. Score „Nutzen der POCT-Geräte in der Praxis“	81
Tabelle 30. Bewertung des Scores anhand der gesammelten Punkte	82
Tabelle 31. Scores der getesteten POCT-Geräte.....	83
Tabelle 32. Score Alveo be.well	107
Tabelle 33. Score BD Veritor.....	108
Tabelle 34. Score Bosch Vivalytic	109
Tabelle 35. Score Chronos DX.....	110
Tabelle 36. Score Fluxergy	111
Tabelle 37. Score Lumira Dx.....	112

II. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ACE2	Angiotensin-Converting-Enzym 2
ACTT	Adaptive COVID-19 therapeutischer Versuch
Ag	Antigen
Ag-RDT	Antigen Schnelltest
App	Anwendungssoftware
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom
cDNA	Komplementäre DNA
CE	Europäische Konformitätserklärung
CE-IVD	Europäische Konformitätserklärung In-vitro-Diagnostika
CI	Konfidenzintervall
CP	PCR-Zyklus an, bei dem das Fluoreszenzsignal eine Mindestsignalschwelle überschreitet
Cq	Bosch-Äquivalente zu CT-Werten
CT	Computertomographie
CT Wert	Amplifikationszyklus
DEPC-Wasser	Mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
DSGVO	Datenschutzgrundverordnung der EU
DW	Deep Well Platten
EC-Kanal	Interne Kontrolle
E-Gen	SARS-CoV2-Envelope-Zielsequenz

eNat-Röhrchen	Medium stabilisiert und konserviert RNA/DNA über längere Zeiträume
et al.	Und andere
EUA	Notfallzulassung
FDA	US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel,
FFP2	Atenschutzmaske mit europäischen Standard
H	Stunde
hACE2	Humanem ACE2
HIPAA	Vertraulichkeit medizinischer Informationen
IC	Interne Kontrolle
ID	Identifikation
iNAT	Isothermale Nukleinsäure-Amplifikationstechnik
IT	Informationstechnik
KI	Konfidenzintervall
LIMS	Labor-Informations- und Management-System
LOS-Tagen	Krankenhausaufenthaltsdauer
LRT-Proben	Proben der unteren Atemwege
MERS	Middle east respiratory syndrome
MHS	Städtischer Gesundheitsdienst Niederlande
min	Minute
Mio	Million
MIPS	Laborinformationssystem von Clinisys
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTA	Medizinisch-technischer Assistent

NIAID	Nationales Institut für Allergien und Infektionserkrankungen
NPA	Negative Übereinstimmungsprozentsatz
NPV	Negativer prädiktiver Wert
P	Probe
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDF	Transportables Dateiformat
PED-Patienten	Pädiatrische Patienten
POCT	Patientennahe Labordiagnostik
PPA	Positive Übereinstimmungsprozentsatz
PPV	Positiver prädiktiver Wert
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
R0	Basale Reproduktionszahl
RAD	Nasopharyngeale Antigen-Schnellteste
RAT-Ergebnisse	Antigen-Schnellteste Ergebnisse
RATs	Antigen-Schnelltests
RBD	Rezeptor-Bindedomäne
RBM	Rezeptor-Bindungsmotiv
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rt-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	Real-Time-Quantitative-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SARS	Schweres akutes respiratorisches Syndrom

SARS-CoV2	Schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus 2
sec	Sekunde
SOP	Standardisiertes Vorgehen von Abläufen
Taq-Polymerase	Thermostabile DNA-Polymerase
TAT	Abfertigungszeit
TMA	Transkriptionsvermittelte Amplifikation
UI	Einheiten pro Liter
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
USB	Universeller serieller Bus, „Bus“ steht hier für ein System zur Datenübertragung
UTM	Universelles Abstrich- und Transportsystem
VS	Versus
VTM	Virustransportmedium
WDH	Wiederholung
WHO	Weltgesundheitsorganisation der Vereinten Nationen
WiFi	Kabelloses Netzwerk
WILAN	Drahtloses lokales Netzwerk

III. Übersetzungsverzeichnis

Englisches Wort	Deutsche Übersetzung
Amplikon	DNA- oder RNA- Sequenz die per Amplifikation vervielfältigt wird.
Analyzer	Analysegerät
Barcode-Scanner	Zweidimensionaler Code Leser
Bluetooth	Funkstandard um auf kurze Distanzen Daten zu übertragen
Checkliste	Kontrollliste
Chip	Ein kleines Stück Halbleiter-Trägermaterial mit einer dezidierten digitalen Funktion
Cloud	Globales Netzwerk von Remoteservern
Computer	Rechner
Cool down time	Abkühlzeit
Cycler	Thermozykler
Dashboard	Verwaltungs-Instrument für Daten
Failed	Fehlgeschlagen
Fehlercode	Fehlermeldung
Hands on time	Handhabungszeit
High Throughput	Hochdurchsatz
Immunosorbent-Assay	Immunadsorptionstest
Invalid	Ungültig
Lateral Flow Assay	Biochemische Methode zum qualitativen Nachweis von Stoffen mit Antikörpern
Plug and Play	Anschließen und Loslegen Technologie
Pooling	Zusammenlegen

Puffer	Stoffgemisch aus einer schwachen Säure und ihrer korrespondierenden Base
Quencher	Farbstoff, fängt die Strahlung des Reporter-Farbstoffs
Reporter	Reporter Farbstoff
Score	Punktwert
Screening	"Filteruntersuchung"
Software	Elektronisches Datenverarbeitungsprogramm
Target	Ziel
Test run time	Testlaufzeit
WALK-AWAY-MODUS	Analyse direkt im Gerät
Worst-Case	Schlechtester Fall-ungünstigster Fall

1. Einleitung

1.1 Was ist SARS-CoV-2?

Das Coronavirus (SARS-CoV-2) ist ein hoch ansteckendes und pathogenes Virus, das Ende 2019 erstmals auftrat und eine Pandemie akuter Atemwegserkrankung namens „Coronavirus-Krankheit 2019“ (COVID-19) verursachte, die die menschliche Gesundheit weltweit bedrohte. (Hu, B. et al. 2021)

1.1.1 Historie medizinisch bedeutsamer Coronaviren

Coronaviren sind eine vielfältige Gruppe von Viren, die viele verschiedene Tiere infizieren und beim Menschen leichte bis schwere Atemwegsinfektionen verursachen können. In den Jahren 2002 und 2012 traten beim Menschen zwei hochpathogene Coronaviren zoonotischen Ursprungs auf: das Coronavirus des schweren akuten respiratorischen Syndroms (SARS-CoV) und das Coronavirus des Nahen Ostens (MERS-CoV). Beide verursachten tödliche Atemwegserkrankungen und stellten eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit im 21. Jahrhundert dar (Cui et al. 2019). Ende 2019 tauchte in der chinesischen Stadt Wuhan ein neues Coronavirus namens SARS-CoV-2 auf und verursachte einen ungewöhnlich großen Ausbruch viral-atypischer Pneumonien. Dieses neue Coronavirus - das SARS-CoV-2 -, war hoch ansteckend und breitete sich schnell auf der ganzen Welt aus (Wu, J.T. et al. 2020, Hui et al. 2020). Es übertraf SARS und MERS sowohl in der Anzahl der Fälle als auch in der geografischen Ausdehnung des Endemiegebiets bei weitem. Der anhaltende SARS-CoV-2 Ausbruch stellte eine große Bedrohung für die globale öffentliche Gesundheit dar (Deng und Peng 2020, Han, Q. et al. 2020).

1.1.2 Entstehung und Verbreitung

Ende Dezember 2019 meldeten mehrere medizinische Einrichtungen in Wuhan, Provinz Hubei, China, eine Zunahme von Lungenentzündungsfällen unbekannter Ursache (Zhu, N. et al. 2020). Ähnlich wie Patienten mit SARS und MERS zeigten diese Patienten Symptome einer viralen Lungenentzündung wie Fieber, Husten, Brustbeschwerden und in schweren Fällen Atemnot und bilaterale interstitielle

Lungeninfiltrate (Zhu, N. et al. 2020, Gralinski und Menachery 2020). Von den ersten 27 dokumentierten Krankenhausfällen waren die meisten Fälle epidemiologisch mit dem südchinesischen Großhandelsmarkt für Meeresfrüchte verbunden. Der Huanan Seafood Wholesale Market ist ein Nassmarkt in Wuhan, auf dem nicht nur Meeresfrüchte, sondern auch lebende Tiere, einschließlich Geflügel und Wildtiere, verkauft werden (Deng und Peng 2020, Jiang, S. et al. 2020). Laut einer retrospektiven Studie stammt der erste bekannte Fall vom 8. Dezember 2019 (Wu, Z. und McGoogan 2020). Am 31. Dezember informierte die Gesundheitskommission der Stadt Wuhan die Öffentlichkeit über einen Ausbruch einer Lungenentzündung unbekannter Ursache und benachrichtigte die Weltgesundheitsorganisation (WHO).

Durch metagenomische RNA-Sequenzierung und Virusisolierung aus bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeitsproben von Patienten mit schwerer Lungenentzündung hat ein unabhängiges Team chinesischer Wissenschaftler ein neuartiges Betacoronavirus als Erreger dieser neu auftretenden Krankheit identifiziert (Zhu, N. et al. 2020, Wu, F. et al. 2020, Zhou, P. et al. 2020). Die Ergebnisse dieser Ätiologie wurden am 9. Januar 2020 veröffentlicht. Es folgte die Veröffentlichung über die GISAID-Datenbank am 11. Januar der nahezu vollständigen Genomsequenz, die von verschiedenen Forschungseinrichtungen berichtet wurde (Gralinski und Menachery 2020). Anschließend wurden weitere Krankheitsfälle identifiziert, die keinen epidemiologischen Zusammenhang zum Huanan Seafood Wholesale Market aufwiesen. Es wurde über mehrere familiäre Clusterinfektionen berichtet. Auch nosokomiale Infektionen traten in der Abfolge auf. Alle diese Fälle lieferten klare Beweise für die Übertragung des neuen Virus von Mensch zu Mensch (Deng und Peng 2020, Chan, J.F. et al. 2020a, Chen, N. et al. 2020, Wang, R. et al. 2020). Das Reisen zwischen den Städten vor dem Neujahrsfest trug dazu bei, dass sich das Virus in China weiter verbreitete. Innerhalb eines Monats hatte sich das Virus massiv über alle 34 Provinzen Chinas ausgebreitet. Die Zahl der bestätigten Fälle stieg stark an. Bis Ende Januar 2020 wurden täglich Tausende neuer Fälle diagnostiziert. Am 30. Januar erklärte die WHO den Ausbruch des neuartigen Coronavirus zu einem internationalen Gesundheitsnotstand (Eurosurveillance Editorial Team 2020).

Am 11. Februar benannte die Internationale Kommission für die Taxonomie von Viren das neuartige Coronavirus „SARS-CoV-2“ und die WHO nannte die durch SARS-CoV-2 verursachte Krankheit „COVID-19“ (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2020).

Die internationale Ausbreitung von SARS-CoV-2 beschleunigte sich ab Ende Februar, während in China ein Abwärtstrend zu verzeichnen war. Immer mehr Länder meldeten große Infektionscluster (Fisher und Heymann 2020). Am 11. März 2020 stufte die WHO die Lage um SARS-CoV-2 offiziell als Pandemie ein (World Health Organization 2020). SARS-CoV-2 wurde chinesischen Berichten zufolge in China seit März effektiv eingedämmt, aber die Zahl der COVID-19-Fälle in Europa, den Vereinigten Staaten und anderen Regionen stieg sprunghaft. Laut dem COVID-19 Dashboard des Johns Hopkins University Center for Systems Science and Engineering wurden bis zum 11. August 2020 mehr als 20 Millionen Fälle von COVID-19 in 216 Ländern und Territorien auf allen sechs Kontinenten gemeldet. Ungefähr 733.000 Patienten starben bis dahin (Dong et al. 2020). Eine hohe Sterblichkeit trat hauptsächlich auf, wenn medizinische Ressourcen überbeansprucht wurden. Die Vereinigten Staaten waren damals das Land mit den höchsten Fallzahlen. Genetische Untersuchungen deuten darauf hin, dass SARS-CoV-2 ein natürliches Virus tierischen Ursprungs ist. Andererseits ist es unklar, wann und wo das Virus einen Menschen zum ersten Mal infiziert hat. Einige der ersten gemeldeten Fälle in Wuhan konnten epidemiologisch nicht mit Fischmärkten in Verbindung gebracht werden (Li, Q. et al. 2020), was darauf hindeutet, dass Märkte möglicherweise nicht die Hauptquelle für Infektionen des Menschen mit SARS-CoV-2 sind. In einer französischen Studie wurde SARS-CoV-2 per PCR in Ende 2019 archivierten Proben eines Patienten mit Lungenentzündung nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass sich SARS-CoV-2 dort womöglich deutlich früher als zu den bekannten Ausbruchszeiten in der Allgemeinbevölkerung in Frankreich ausgebreitet hat (Deslandes et al. 2020). Dieser einzelne frühe Bericht kann jedoch keine endgültige Antwort auf den Ursprung von SARS-CoV-2 und dessen Ausbreitung geben. Ferner können falsch positive Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Um dieser höchst umstrittenen Fragestellung

nachzugehen, wurden weltweit mehrere retrospektive Studien mit weiteren Patienten-, Tier- und Umweltbankproben unter Verwendung gut validierter Tests durchgeführt (Hu, B. et al. 2021).

1.1.3 Genomik, Phylogenie und Taxonomie

Als neues Betacoronavirus teilt SARS-CoV-2 79% der genomischen Sequenzidentität mit SARS-CoV und 50% mit MERS-CoV (Lu, R. et al. 2020b). Seine Genomorganisation ist die gleiche wie bei anderen Betacoronaviren. Sechs funktionale offene Leserahmen (ORFs) sind in der Reihenfolge von 5' bis 3' angeordnet: Replikase (ORF1a/ORF1b), Spike (S), Hülle (E), Membran (M) und Nukleokapsid (N). Zusätzlich sind sieben mutmaßliche ORFs, die akzessorische Proteine codieren, zwischen den Strukturgenen verteilt. Die meisten der von SARS-CoV-2 codierten Proteine sind ähnlich lang wie ihre SARS-CoV-Gegenstücke. Von den vier Strukturgenen teilt SARS-CoV-2 mehr als 90% Aminosäure-Identität mit SARS-CoV, mit Ausnahme des divergierenden S-Gens (Zhou, P. et al. 2020, Lu, R. et al. 2020). Das Replicase-Gen nimmt zwei Drittel des 5'-Genoms ein und codiert ein großes Polyprotein (pp1ab), das proteolytisch in 16 Nichtstrukturproteine gespalten wird, die an der Transkription und Virusreplikation beteiligt sind. Die meisten dieser nichtstrukturellen SARS-CoV-2-Proteine teilen mehr als 85% Aminosäure-Sequenzidentität mit SARS-CoV (Chan, J.F. et al. 2020b).

Die genomweite phylogenetische Analyse zeigt, dass SARS-CoV-2 zur Untergattung Sarbecovirus der Gattung Betacoronavirus gehört, zusammen mit SARS-CoV und SARS-verwandten Coronaviren, die in Fledermäusen vorkommen (SARSr-CoVs). Innerhalb dieser Gruppe wird SARS-CoV-2 zusammen mit vier Coronavirus-Isolaten aus Pfeilschwanzkrebsen und einem neuartigen Coronavirus, das kürzlich in Schuppentieren identifiziert wurde, gruppiert. Es wurden die Sequenzen der fünf konservierten Replikationsdomänen von pp1ab identifiziert: (3C-ähnliche Protease (3CLpro), Nidovirus-RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp)-bezogene Nukleotidyltransferase (NiRAN), RdRp, Zinkbindungsdomäne (ZBD) und HEL1. Mithilfe der Coronavirus-Forschungsgruppe der International Committee on

Taxonomy of Viruses wurde SARS-CoV-2 mit den SARSr-CoV verglichen (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2020). Obwohl phylogenetisch verwandt, unterscheidet sich SARS-CoV-2 von allen anderen Coronaviren, die von Fledermäusen und Schuppentieren dieser Art stammen (Hu, B. et al. 2021).

1.1.4 Tierische Wirte

Fledermäuse sind wichtige natürliche Wirte für Alphacoronaviren und Betacoronaviren. Bisher ist der engste bekannte Verwandte von SARS-CoV-2 ein Fledermaus-Coronavirus namens „RaTG13“, das in *Rhinolophus affinis* in Yunnan, China, nachgewiesen wurde. Dessen Genomsequenz ist in voller Länge zu 96,2% mit der von SARS-CoV-2 identisch (Zhou, P. et al. 2020). Dieses Fledermausvirus teilt mehr als 90% Sequenzidentität mit SARS-CoV-2 in allen ORFs seines Genoms, einschließlich des hochvariablen S und ORF8 (Zhou, P. et al. 2020). Die phylogenetische Analyse bestätigte, dass SARS-CoV-2 eng mit RaTG13 verwandt ist. Die hohe genetische Ähnlichkeit zwischen SARS-CoV-2 und RaTG13 stützt die Hypothese, dass SARS-CoV-2 wahrscheinlich von Fledermäusen stammt (Paraskevis et al. 2020). Ein weiteres verwandtes Coronavirus wurde kürzlich in *Rhinolophus malayanus*-Fledermäusen in der Provinz Yunnan entdeckt. Dieses neue Fledermausvirus mit dem Namen „RmYN02“ ist genomweit zu 93,3% identisch mit SARS-CoV-2. Das lange 1ab-Gen zeigt 97,2% Identität mit SARS-CoV-2, sogar mehr als RaTG13 (Zhou, H. et al. 2020). Neben RaTG13 und RmYN02 weisen phylogenetische Analysen darauf hin, dass die Fledermaus-Coronaviren ZC45 und ZXC21, die zuvor in *Rhinolophus-pusillus*-Fledermäusen in Ostchina nachgewiesen wurden, auch in der SARS-CoV-2-Linie der Untergattung Sarbecovirus enthalten sind (Hu, D. et al. 2018). Die Entdeckung verschiedener Fledermaus-Coronaviren, die eng mit SARS-CoV-2 verwandt sind, legt nahe, dass Fledermäuse Wirte für SARS-CoV-2 sind (Lau et al. 2020). Basierend auf aktuellen Erkenntnissen entsprechen die genetischen Abweichungen zwischen SARS-CoV-2 und verwandten Fledermaus-Coronaviren jedoch wahrscheinlich mehr als 20 Jahren Sequenzentwicklung. Dies legt nahe, dass es nur

als evolutionärer Vorläufer von SARS-CoV-2 angesehen werden kann (Zhang und Holmes 2020).

Neben Fledermäusen sind Pangoline ein weiterer Wildwirt, der mit SARS-CoV-2 in Verbindung gebracht wird. Mehrere mit SARS-CoV-2 verwandte Viren wurden in Geweben malaiischer Schuppentiere identifiziert, die zwischen 2017 und 2019 aus Südostasien nach Südchina geschmuggelt wurden. Diese Pangolinviren gehören zu zwei unterschiedlichen Unterstämmen (Lam et al. 2020, Xiao et al. 2020, Liu, P. et al. 2019). Guangdong-Stämme, die von verschiedenen Forschungsgruppen aus geschmuggelten Pangolinen isoliert und sequenziert wurden, zeigen 99,8% Sequenzidentität (Liu, P. et al. 2019). Sie sind sehr eng mit SARS-CoV-2 verwandt und weisen eine Sequenzähnlichkeit von 92,4% auf. Vor allem ist die RBD des Guangdong-Pangolin-Coronavirus der von SARS-CoV-2 sehr ähnlich. Die Rezeptorbindungsmotive (RBMs; Teil der RBD) dieser Viren unterscheiden sich von SARS-CoV-2 durch eine einzige Aminosäure. Sie haben jedoch alle fünf, für die Rezeptorbindung des Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) wichtigen Aminosäuren. Diese sind mit denen von SARS-CoV-2 identisch. Im Vergleich zum Guangdong-Stamm weist das in Guangxi identifizierte Pangolin-Coronavirus mit 85,5% genomischer Sequenzidentität weniger Ähnlichkeit zu SARS-CoV-2 auf. Das Auftreten von klinischen Symptomen bei infizierten Schuppentieren, wie einer interstitiellen Lungenentzündung und einer viralen Infiltration von Entzündungszellen in verschiedenen Organen, legt nahe, dass diese Tiere Wirte für das Virus sein könnten (Hu, B. et al. 2021).

Ein Zwischenwirt spielt in der Regel eine wichtige Rolle beim Ausbruch von Coronaviren, die von Fledermäusen abstammen, z. B. Zibetkatzen für SARS-CoV und Dromedar-Kamele für MERS-CoV. Die von diesen beiden Zwischenwirten übertragenen Virusstämme sind genetisch nahezu identisch mit den entsprechenden Viren beim Menschen (mehr als 99% Genomsequenzidentität) (Cui et al. 2019). Trotz einer RBD, die mit der von SARS-CoV-2 nahezu identisch ist, weisen die bisher bekannten Pangolin-Coronaviren nur eine Genomidentität von 92% mit SARS-CoV-2 auf (Zhang, T. et al. 2020). Die verfügbaren Daten reichen nicht aus, um

Schuppentiere als Zwischenwirt für SARS-CoV-2 zu belegen. Bisher gibt es keine Hinweise darauf, dass Schuppentiere direkt am Ausbruch von SARS-CoV-2 beteiligt waren.

Derzeit ist unser Wissen über den tierischen Ursprung von SARS-CoV-2 noch weitgehend lückenhaft. Das Reservoir des Virus ist nicht eindeutig geklärt. Es ist nicht bekannt, ob SARS-CoV-2 auf den Menschen über einen Zwischenwirt übertragen wurde oder welche Tiere Zwischenwirte sein könnten. Der Nachweis von RaTG13-, RmYN02- und Pangolin-Coronaviren legt nahe, dass verschiedene SARS-CoV-2-ähnliche Coronaviren in Wildtieren zirkulieren. Da frühere Studien gezeigt haben, dass einige Sarbecoviren wie SARS-CoV möglicherweise durch Rekombination entstanden sind, beinhaltet die Evolution von SARS-CoV-2 möglicherweise eine Reihe von Interaktionen zwischen verschiedenen verwandten Coronaviren. Die Möglichkeit einer viralen RNA-Rekombination kann nicht ausgeschlossen werden. Die umfassenden Ergebnisse über SARS-CoV-2-assoziierte Viren bei Fledermäusen, wilden und in Gefangenschaft lebenden Schuppentieren und anderen Wildtierarten in China, Südostasien und anderswo legt zumindest einen zoonotischen Ursprung von SARS-CoV-2 nahe (Hu, B. et al. 2021).

Neben Wildtieren untersuchten die Forscher auch die Anfälligkeit von Haus- und Labortieren für eine SARS-CoV-2-Infektion. Eine Studie zeigte, dass sich SARS-CoV-2 effizient in den oberen Atemwegen von Katzen und Frettchen repliziert, während Hunde, Schweine, Hühner und Enten nicht von SARS-CoV-2 betroffen sind (Shi, J. et al. 2020). Die Anfälligkeit von Nerzen wurde durch einen Bericht aus den Niederlanden über einen Ausbruch einer SARS-CoV-2-Infektion bei Zuchtnerzen dokumentiert. Die meisten infizierten Nerze hatten leichte Symptome, aber einige entwickelten schwere Atemnot und starben an einer interstitiellen Lungenentzündung (Oreshkova et al. 2020). Bei zwei Hunden aus Haushalten mit COVID-19-Fällen wurden Hinweise auf eine natürliche SARS-CoV-2-Infektion gefunden, obwohl die Hunde asymptomatisch waren. In einer anderen serologischen Studie wurden neutralisierende SARS-CoV-2-Antikörper in Serumproben von Katzen nachgewiesen, die nach dem COVID-19-Ausbruch in Wuhan entnommen wurden. Dies erbrachte den Nachweis einer

SARS-CoV-2-Infektion in Katzenpopulationen in Wuhan, wobei jedoch das Potenzial einer SARS-CoV-2-Übertragung von Katzen auf Menschen ungewiss ist (Zhang, Q. et al. 2020).

1.1.5 Pathogenese von SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 verwendet denselben Rezeptor wie SARS-CoV, um an seine Zielzellen zu binden und einzudringen: den Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2) Rezeptor (Zhou, P. et al. 2020, Hoffmann et al. 2020). Neben dem humanen ACE2-Rezeptor (hACE2) bindet SARS-CoV-2 auch an ACE2-Rezeptoren in Schweinen, Frettchen, Rhesusaffen, Zibetkatzen, Katzen, Schuppentieren, Kaninchen und Hunden (Zhou, P. et al. 2020, Shi, J. et al. 2020, Chandrashekar et al. 2020, Zhao, X. et al. 2020). Die breite Rezeptorverwendung von SARS-CoV-2 bedeutet, dass es möglicherweise ein breites Wirtsspektrum hat. Die unterschiedliche Effizienz der ACE2-Rezeptor-Bindung bei verschiedenen Tieren könnte jedoch zu einer unterschiedlichen Anfälligkeit für eine SARS-CoV-2-Infektion führen. Die S1-Untereinheit des Coronavirus ist weiter in zwei funktionelle Domänen unterteilt, die N-terminale Domäne und die C-terminale Domäne. Strukturelle und biochemische Analysen ergaben, dass eine 211-Aminosäuren-lange Region (Aminosäuren 319–529) in der S1-C-terminalen Domäne von SARS-CoV-2 eine entscheidende Rolle beim Viruseintritt spielt und als Rezeptor-Bindedomäne (RBD) dient. Dies ist ein mögliches Ziel für neutralisierende Antikörper (Shang, J. et al. 2020b, Walls et al. 2020). Das Rezeptor-Bindemotiv (RBM) der RBD vermittelt den Kontakt mit dem ACE2-Rezeptor (Aminosäuren 437–507 des SARS-CoV-2-S-Proteins) und diese Region von SARS-CoV-2 unterscheidet sich von der Region von SARS-CoV an fünf für die ACE2-Bindung entscheidenden Aminosäuren, nämlich Y455L, L486F, N493Q, D494S und T501N52. Änderungen dieser Reste stabilisieren zwei virusbindende Hotspots auf der Oberfläche des hACE2-Rezeptors bei der Wechselwirkung mit SARS-CoV-2 (Wan, Y. et al. 2020). Außerdem führt ein Motiv aus vier Aminosäuren im RBM von SARS-CoV-2 (Aminosäuren 482–485: G-V-E-G) zu einer kompakteren Konformation als bei SARS-CoV, was einen besseren Kontakt mit der N-terminalen Helix vom hACE2-Rezeptor ermöglicht (Shang, J. et al. 2020b). Biochemische Daten haben bestätigt, dass

strukturelle Merkmale der SARS-CoV-2-RBD die hACE2-Bindungsaffinität im Vergleich zu SARS-CoV erhöhen (Shang, J. et al. 2020b, Wan, Y et al. 2020, Letko et al. 2020).

Ähnlich wie andere Coronaviren erfordert SARS-CoV-2 eine proteolytische Prozessierung des S-Proteins, um den endozytischen Weg zu aktivieren. Es wurde gezeigt, dass Wirtsproteasen an der Spaltung des S-Proteins und der Aktivierung des SARS-CoV-2-Eintritts beteiligt sind, einschließlich der Transmembranprotease Serinprotease 2 (TMPRSS2), Cathepsin L und Furin (Hoffmann et al. 2020, Ou et al. 2020, Shang, J. et al. 2020a). Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten zeigten, dass TMPRSS2 in mehreren Geweben und Körperstellen stark exprimiert und mit ACE2 in nasalen Epithelzellen, Lungen- und Bronchialästen koexprimiert wird, was den Gewebetropismus von SARS-CoV-2 demonstriert (Sungnak et al. 2020, Lukassen et al. 2020). Ein SARS-CoV-2-Pseudovirus-Entry-Assay zeigte, dass TMPRSS2 und Cathepsin L eine kumulative Wirkung mit Furin auf die Virus-Entry-Aktivierung haben (Shang, J. et al. 2020a). Die Analyse der kryoelektronenmikroskopischen Struktur des SARS-CoV-2-S-Proteins zeigt, dass sich seine RBD in einem überwiegend liegenden Konformationszustand befindet, während das SARS-CoV-S-Protein sowohl einen stehenden als auch einen liegenden Konformationszustand aufweist. Das S-Protein von SARS-CoV-2 begünstigt daher möglicherweise nicht die Rezeptorbindung, ist aber hilfreich bei der Immunumgehung.

Der klinische Verlauf der SARS-CoV-2-Infektion beim Menschen manifestiert sich von leichten Symptomen bis hin zu schwerem Lungenversagen. Nach der Bindung an Atemwegsepithelzellen initiiert SARS-CoV-2 die Replikation, wandert in die tieferen Atemwege und dringt in alveoläre Epithelzellen der Lunge ein. Die schnelle Vermehrung von SARS-CoV-2 in der Lunge kann eine starke Immunantwort hervorrufen. Der durch SARS-CoV-2 bedingte Zytokinsturm verursacht ein akutes Atemnotsyndrom und Atemversagen und gilt als häufigste Todesursache bei Patienten mit COVID-19 (Huang et al. 2020, Mehta et al. 2020). Ältere Patienten (60 Jahre und älter) mit erheblichen Vorerkrankungen haben ein erhöhtes Risiko, ein akutes Atemnotsyndrom zu entwickeln und daran zu sterben (Wu, C. et al. 2020, Liu, Y. et al. 2020, Tian, J. et al. 2020). In einigen

COVID-19-Fällen wurde auch über multiples Organversagen berichtet (Wu, Z. und McGoogan 2020, Chen, N. et al. 2020, Yao, X. et al. 2020).

Typische Symptome der Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) sind Fieber, trockener Husten und Müdigkeit, in schwereren Fällen Atemnot. Viele Infektionen, insbesondere bei Kindern und jungen Erwachsenen, verlaufen asymptomatisch, wohingegen ältere Menschen und/oder Menschen mit Komorbiditäten ein höheres Risiko für eine schwere Erkrankung, Atemwegsversagen und Tod haben. Die Inkubationszeit beträgt ~5 Tage, eine schwere Erkrankung entwickelt sich in der Regel ~8 Tage nach dem Auftreten der Symptome, und eine kritische Erkrankung und der Tod treten nach ~16 Tagen ein (Hu, B. et al. 2021).

Histopathologische Veränderungen bei COVID-19-Patienten treten hauptsächlich in der Lunge auf. Die histopathologische Analyse zeigt eine bilaterale diffuse Alveolarschädigung, Bildung einer hyalinen Membran, Ablösung von Lungenzellen und Fibrinablagerung in der Lunge von schweren COVID-19-Patienten. In einigen Fällen wurde auch eine exsudative Entzündung festgestellt. Die Immunhistochemie wies SARS-CoV-2-Antigen in den oberen Atemwegen, im bronchiolären Epithel, im submukösen Epithel und in den Lungenzellen vom Typ I und II, in den Alveolarmakrophagen und in den hyalinen Membranen nach (Chen, N. et al. 2020, Huang et al. 2020, Martines et al. 2020, Zeng et al. 2020).

Zu den Tiermodellen, die zur Untersuchung der Pathogenese der SARS-CoV-2-Infektion verwendet werden, gehören nichtmenschliche Primaten (Rhesusaffen, Cynomolgus-Affen, Krallenaffen, Grüne Meerkatzen), Mäuse, Frettchen und Goldhamster (Shi, J. et al. 2020, Chandrashekar et al. 2020, Sun et al. 2020, Rockx et al. 2020, Bao et al. 2020, Jiang, R.D. et al. 2020, Lu, S. et al. 2020, Speranza et al. 2020, Gu et al. 2020). In nichtmenschlichen Primatentiermodellen weisen die meisten Arten ähnliche klinische Merkmale auf wie COVID-19-Patienten. Dazu gehören Virusausscheidung, Virusreplikation und Wirtsreaktion auf eine SARS-CoV-2-Infektion (Rockx et al. 2020, Lu, S. et al. 2020, Speranza et al. 2020). So wurden im Rhesusaffenmodell hohe Viruslasten in den oberen und unteren Atemwegen nachgewiesen. Akute virale interstitielle Pneumonie und

humorale und zelluläre Immunantworten wurden beobachtet (Chandrashekar et al. 2020, Munster et al. 2020). Darüber hinaus erreichte die anhaltende Virusausscheidung bei asymptomatischen Makaken früh im Infektionsprozess ihren Höhepunkt, wobei ältere Affen eine schwerere interstitielle Pneumonie aufwiesen als jüngere Affen (Yu, P. et al. 2020). Dies ähnelt dem, was bei COVID-19-Patienten beobachtet wird. Menschliche ACE2-transgene Mäuse, die mit SARS-CoV-2 infiziert waren, entwickelten eine typische interstitielle Pneumonie, und virale Antigene wurden hauptsächlich in Bronchialepithelzellen, Makrophagen und Alveolarepithel beobachtet. Einige menschliche ACE2-transgene Mäuse starben nach der Infektion (Bao et al. 2020, Jiang, R.D. et al. 2020). Für ein breites Spektrum an verschiedenen Mäusen wurden an die Maus angepasste SARS-CoV-2-Stämme generiert, die in Passage 6 eine N501Y-Änderung in der RBD des S-Proteins aufwiesen. Interstitielle Lungenerkrankungen und Entzündungsreaktionen wurden sowohl bei jungen als auch bei älteren Mäusen nach Infektion mit Maus-adaptierten Stämmen beobachtet (Gu, et al. 2020). Auch Goldhamster zeigten typische Symptome nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 (Chan, J.F. et al. 2020d). In anderen Tiermodellen, einschließlich Katzen und Frettchen, konnte sich SARS-CoV-2 effizient in den oberen Atemwegen replizieren, allerdings ohne schwere klinische Symptome zu verursachen (Shi, J. et al. 2020, Kim, et al. 2020).

1.1.6 Klinische und epidemiologische Aspekte

Alle Altersgruppen der Bevölkerung sind anfällig für eine SARS-CoV-2-Infektion, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei etwa 50 Jahren liegt (Wu, Z. und McGoogan 2020, Chen, N. et al. 2020, Mehta et al. 2020, Wang, D. et al. 2020, Guan et al. 2020). Die klinischen Manifestationen variieren jedoch mit dem Alter. Im Allgemeinen entwickeln ältere Männer (über 60 Jahre) mit Begleiterkrankungen eher eine schwere Atemwegserkrankung, die einen Krankenhausaufenthalt erfordert oder sogar tödlich verläuft. Die meisten jungen Menschen und Kinder entwickeln dagegen eher eine leichte Erkrankung (keine Lungenentzündung oder nur eine leichte Lungenentzündung) oder sind asymptomatisch (Wu, Z. und McGoogan 2020, Guan et al. 2020, Lu, X. et al. 2020). Es ist erwähnenswert, dass schwangere Frauen kein erhöhtes Risiko für

Covid-19 haben. Es wurden jedoch Hinweise auf eine transplazentare Übertragung von SARS-CoV-2 von infizierten Müttern auf Neugeborene gefunden. Dies war jedoch ein Einzelfall (Chen, H. et al. 2020, Vivanti et al. 2020). Die häufigsten Symptome einer Infektion sind Fieber, Müdigkeit und trockener Husten (Chen, N. et al. 2020, Huang et al. 2020, Wang, D. et al. 2020, Guan et al. 2020). Weniger häufige Symptome sind Auswurf, Kopfschmerzen, Bluthusten, Durchfall, Halsschmerzen, Brustschmerzen, Schüttelfrost sowie Übelkeit und Erbrechen. Dysgeusie wurde von italienischen Patienten berichtet (Giacomelli et al. 2020). Die meisten Menschen zeigten nach einer Inkubationszeit von 1 bis 14 Tagen (am häufigsten etwa 5 Tage) Krankheitszeichen, wobei sich Kurzatmigkeit und Lungenentzündung im Durchschnitt innerhalb von 8 Tagen nach Symptombeginn entwickelten (Wu, Z. und McGoogan 2020).

In einem Bericht über 72.314 Fälle in China wurden 81% als mild eingestuft, 14% waren schwere Fälle, die eine Beatmung auf Intensivstationen erforderten, und 5% waren sehr schwer (d. h. der Patient hatte Atemstillstand, septischen Schock und/oder multiples Organversagen) (Wu, Z. und McGoogan 2020, Chen, T. et al. 2020). Bei der Aufnahme waren Milchglastrübungen der häufigste radiologische Befund in der Thorax-Computertomographie (CT) (Chen, N. et al. 2020, Huang et al. 2020, Wang, D. et al. 2020, Guan et al. 2020). Die meisten Patienten entwickelten auch eine ausgeprägte Lymphopenie, ähnlich der, die bei SARS- und MERS-Patienten beobachtet wurde, wobei Nichtüberlebende im Laufe der Zeit eine schwerere Lymphopenie entwickelten (Chen, N. et al. 2020, Huang et al. 2020, Wang, D. et al. 2020, Guan et al. 2020). Im Vergleich zu Nicht-Intensivpatienten hatten Intensivpatienten höhere Zytokinspiegel im Plasma, was auf einen immunpathologischen Prozess mit einem Zytokinsturm hindeutet (Huang et al. 2020, Chen, T. et al. 2020, Yang et al. 2020). In einer chinesischen Patientenkohorte starben 2,3 % der Patienten (1023 Todesfälle bei 44672 bestätigte Fällen) innerhalb eines Medians von 16 Tagen nach Beginn der Infektion (Wu, Z. und McGoogan 2020, Chen, T. et al. 2020). Männer ab 68 Jahren hatten ein erhöhtes Risiko einer Herzinsuffizienz, die zu Atemversagen, akuter Herzschiädigung und Tod führte, unabhängig von der Vorgeschichte einer Herz-Kreislauf-Erkrankung (Chen, T. et al. 2020). Die meisten Patienten (81%)

erholten sich so weit, dass sie innerhalb von zwei Wochen aus dem Krankenhaus entlassen werden konnten (Wu, Z. und McGoogan 2020, Wang, D. et al. 2020).

Die Bestimmung der Übertragungsrate im Sinne der Basis-Reproduktionszahl (R_0) war anfangs herausfordernd. Dies lag daran, dass viele asymptomatische Infektionen in diesem Stadium nicht identifiziert werden konnten (Li, R. et al. 2020). Es wurde für SARS-CoV-2 ein geschätzter R_0 von 2,5 (zwischen 1,8 und 3,6) vorgeschlagen, verglichen mit 2,0-3,0 für SARS-CoV (Petersen et al. 2020). Bemerkenswert ist, dass die meisten frühen Übertragungen von SARS-CoV-2 von Mensch zu Mensch in China innerhalb von Familien stattfanden, während große Ausbrüche in anderen Ländern auch außerhalb des eigenen Haushalts auftraten. Während nosokomiale Infektionen in China selten berichtet wurden (Wu, Z. und McGoogan 2020), wurden aus anderen Weltregionen eine Häufung nosokomialer Infektionen gemeldet. Eine Kohortenstudie in London zeigte zum Beispiel, dass 44 Krankenhausmitarbeiter mit SARS-CoV-2 infiziert waren (Houlihan et al. 2020).

Die Übertragung von SARS-CoV erfolgt hauptsächlich nach Ausbruch der Krankheit und erreicht ihren Höhepunkt je nach Schweregrad der Krankheit (Peiris et al. 2020). Die SARS-CoV-2-Viruslast in Proben der oberen Atemwege ist bereits in der ersten Woche der Symptome am höchsten, sodass das Risiko einer pharyngealen Virusausscheidung zu Beginn der Infektion sehr hoch ist (Zou et al. 2020, Wolfel et al. 2020). Mit SARS-CoV-2 infizierte Patienten verbreiten das Virus hauptsächlich per Tröpfcheninfektion (Stadnytskyi et al. 2020, Meselson 2020, van Doremalen et al. 2020). Darüber hinaus wurde über eine Virusübertragung durch die Augenoberfläche und das anhaltende Vorhandensein von SARS-CoV-2-Virus-RNA in Stuhlproben berichtet (Lu, C. W. et al. 2020, Wu, Y. et al. 2020). Coronaviren können mehrere Tage auf unbelebten Oberflächen existieren, was auch bei SARS-CoV-2 der Fall ist, sodass ein längeres Infektionsrisiko bestehen kann (Kampf et al. 2020). Diese Ergebnisse erklären die rasche geografische Ausbreitung von SARS-CoV-2.

1.1.7 Diagnose

Eine frühzeitige Diagnose ist entscheidend für die Eindämmung der Ausbreitung von SARS-CoV-2. Der molekulare Nachweis von SARS-CoV-2-RNA ist der Goldstandard. Viele virale Nukleinsäure-Nachweiskits, die auf ORF1b (einschließlich RdRp), N-, E- oder S-Gene abzielen, sind im Handel erhältlich (Zhou, P. et al. 2020, Chan, J. et al. 2020c, Corman et al. 2020, Konrad et al. 2020). Die Nachweiszeit liegt je nach Technologie zwischen einigen Minuten und Stunden (Bordi et al. 2020, Chan, J. et al. 2020c, Konrad et al. 2020, Lu, R. et al. 2020a, Cordes und Heim 2020). Der molekulare Nachweis kann von vielen Faktoren beeinflusst werden. Obwohl SARS-CoV-2 aus einer Vielzahl von Atemwegsquellen nachgewiesen wurde, darunter Rachenabstriche, hinterer oropharyngealer Speichel, nasopharyngeale Abstriche, Sputum und Bronchialflüssigkeit, ist die Viruslast in Proben der unteren Atemwege am höchsten (Zhou, P. et al. 2020, Zou et al. 2020, Pan et al. 2020, To, K.K. et al. 2020a, Wang, W. et al. 2020, Han, H. et al. 2020). Darüber hinaus wurde virale Nukleinsäure auch in Proben aus dem Darmtrakt oder Blut gefunden, selbst wenn die Proben aus den Atemwegen negativ waren (Zhang, W. et al. 2020). Neben molekular-diagnostischen Tests sind während der Pandemie noch weitere diagnostische Mittel eingesetzt worden, beispielweise die thorakale Computertomographie. Patienten mit COVID-19 wiesen auf der anfänglichen CT-Aufnahme typische Merkmale auf, darunter bilaterale multilobare Trübungen mit einer peripheren oder posterioren Verteilung (Xie et al. 2020, Kanne and Chest 2020). Daher wurde vorgeschlagen, dass bei Personen, bei denen ein starker klinischer Verdacht auf COVID-19 besteht, die aber beim ersten Nukleinsäure-Screening negativ getestet wurden, eine CT-Untersuchung in Kombination mit wiederholten Abstrichtests durchgeführt werden sollte (Xie et al. 2020). Ferner könnten serologische SARS-CoV-2-Tests zum Nachweis von Antikörpern gegen das N- oder S-Protein die molekulare Diagnose ergänzen, insbesondere in späten Phasen nach Ausbruch der Krankheit oder bei retrospektiven Studien (Zhang, W. et al. 2020, Guo et al. 2020, To, K.K. et al. 2020b). Das Ausmaß und die Dauer der Immunreaktionen sind jedoch weiterhin unklar und die verfügbaren serologischen Tests unterscheiden sich in ihrer

Sensitivität und Spezifität (Hu B et al 2021). Insgesamt konnten sich serologische Testverfahren zur Diagnose einer akuten Erkrankung daher nicht durchsetzen.

1.1.8 Therapie

Zur Behandlung von COVID-19 stehen antivirale und immunmodulatorische Medikamente zur Verfügung.

1.1.8.1 Antivirale Behandlungsansätze

Antivirale Therapieansätze zielen auf die direkte oder indirekte Hemmung der viralen Replikation durch Interaktion mit Schlüsselproteinen des viralen Replikationszyklus oder andere Strukturen, die für die Virusreplikation notwendig sind. Analoga von Nukleosiden und Nukleotiden werden bei der viralen Replikation als Fremdstoffe in die virale RNA eingebaut und dadurch wird durch verschiedene Mechanismen (z.B. Kettenabbruch, Akkumulation von Mutationen) eine Hemmung der Virusreplikation verursacht. Andere Substanzen hemmen gezielt Proteasen, die für die Virusreplikation essentiell sind.

Zu den antiviralen Therapieansätzen gehören Nirmatrevir/Ritonavir, Remdesivir, Molnupiravir und monoklonale Antikörper.

Nirmatrevir/Ritonavir (Handelsname Paxlovid) ist als orales Covid-19-Medikament in Europa zugelassen. Es hemmt die Virusvermehrung, indem es die virale Protease 3CL blockiert und somit die Virusreplikation bremst (Hammond, J. et al. 2022).

Remdesivir (Handelsname Veklury) ist ein Nukleotidanalogen, das intrazellulär zu einem ATP-Analogen metabolisiert wird, das die RNA-Polymerase-Aktivität hemmt und die Ausbreitung der Viren im Frühstadium der Erkrankung aufhalten kann (Ader, F. et al. 2022).

Molnupiravir (Handelsname Lagevrio) ist das Prodrug des Ribonukleosid-Analogons β -d-N4-Hydroxycytidin und wird im Plasma in die aktive 5'-Triphosphatform umgewandelt. Durch den Einbau der aktiven 5'-Triphosphatform in die virale RNA, wird die virale Replikation durch Replikationsfehler gehemmt, (Fischer, W.A. et al. 2022).

Monoklonale Antikörper (MAK) interagieren mit dem Spike-Protein von SARS-CoV-2 und können so verhindern, dass das Virus in die Zelle gelangt. Aufgrund der pathophysiologischen Dynamik akuter Atemwegsinfektionen, bei denen die Virusreplikation die ersten Tage nach der Infektion im Vordergrund steht, ist das therapeutische Fenster für antivirale Ansätze kurz und im Frühstadium der Infektion begrenzt (Malin, J.J. et al. 2022). Laut dem Paul-Ehrlich-Institut (Stand Juni 2023), des Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel, sind in Deutschland die unteren monoklonalen Antikörper zugelassen:

- Ronapreve (Casivirimab/Imdevimab)
- Regkirona (Regdanvimab)
- RoActemra (Tocilizumab)
- Xevudy (Sotrovimab)
- Evusheld (Tixagevimab/Cilgavimab)

1.1.8.2 Immunmodulatorische Behandlungsansätze

SARS-CoV-2 induziert eine starke Immunantwort, die zum Zytokin-Sturm-Syndrom führt (Huang, C. et al. 2020, Mehta et al. 2020). Daher werden immunmodulatorische Wirkstoffe in der Therapie angesetzt, die die übermäßigen Entzündungsreaktionen hemmen sollen. In diese Gruppe gehören:

- Kortikosteroide
- Baricitinib
- Tolizumab
- Anakinra

Dexamethason ist ein Kortikosteroid, das aufgrund seiner entzündungshemmenden und immunsuppressiven Eigenschaften bei einer Vielzahl von Erkrankungen zur Verringerung von Entzündungen eingesetzt wird. Eine Studie ergab schon im Jahr 2020, dass Dexamethason die Sterblichkeit bei invasiv-beatmeten, hospitalisierten COVID-19-Patienten, um etwa ein Drittel und bei nicht-invasiv-beatmeten Patienten, um ein Fünftel reduzierte. Im Gegensatz

dazu wurde bei nicht beatmeten Patienten kein Nutzen festgestellt (Edalatifard, M. et al. 2020).

Baricitinib ist ein selektiver Januskinase-1/2-Inhibitor und dadurch wirkt es als Immunsuppressivum (Ely, E.W. et al. 2022).

Tolizumab ist ein Interleukin-6 (IL-6)-Rezeptor-spezifischer Antikörper, der die Bindung von Interleukin-6 an seinem löslichen Rezeptor blockiert und so entzündungshemmend wirkt (Abani, O. et al. 2021).

Anakinra ist ein Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist der Interleukin-1 α und Interleukin-1 β blockiert und somit Entzündungsreaktionen reduziert (Tharaux, P.L. et al. 2021).

1.1.8.3 Zusammenfassende Therapie-Empfehlungen

Laut der S3-Leitlinie - Empfehlungen zur Therapie von Patienten mit COVID-19, Version März 2023, gelten folgende Therapie-Empfehlungen:

Patienten mit Risikofaktoren für schwere Verläufe können im Frühstadium von COVID-19 mit antiviralen Medikamenten behandelt werden. Derzeit verfügbar sind Nirmarelvir/Ritonavir (Therapiebeginn \leq 5 Tage nach Auftreten von Symptomen) (Hammond, J. et al. 2022) und Remdesivir (Therapiebeginn \leq 7 Tage nach Auftreten von Symptomen) (Ader, F. et al. 2022).

Molnupiravir galt als Behandlungsalternative bei Patienten mit COVID-19 und Risikofaktoren für einen schweren Verlauf. Es sollte innerhalb der ersten 5 Tage nach Symptombeginn eingesetzt werden (Fischer, W.A. et al. 2022). Bei einer Bewertung vom 24.02.2023 des Ausschusses für Humanarzneimittel der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) wurde festgestellt, dass der klinische Nutzen von Molnupiravir bei der Behandlung von Patienten mit COVID-19, die keinen zusätzlichen Sauerstoff erhalten und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer schweren COVID-19-Erkrankung haben, nicht nachgewiesen wurde. Nach Angaben des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) darf Molnupiravir in Deutschland nicht mehr verwendet werden (S3-Leitlinie - Empfehlungen zur Therapie von Patienten mit COVID-19, Version März 2023).

Monoklonale Antikörper wurden noch im Februar 2022 für die Frühtherapie (in den ersten 5 Tagen nach Beginn der Symptome) bei nicht immunisierten Patienten mit COVID-19 von der Leitliniengruppe zur Therapie von Patienten mit COVID-19 empfohlen (S3-Leitlinie - Empfehlungen zur Therapie von Patienten mit COVID-19, Version März 2023, Gupta, A. et al. 2021). Jedoch seit der Verbreitung und Dominierung der Omikron-Sublinie BA.5, werden monoklonale Antikörper zur Therapie nicht mehr empfohlen, weil diese nicht ausreichend wirksam sind (Takashita, E. et al. 2022).

Patienten mit COVID-19 und Patienten, die eine Sauerstofftherapie oder eine nicht-invasive/invasive Beatmung erhalten, sollten mit systemischen Kortikosteroiden behandelt werden. Zur Behandlung sollten 6 mg Dexamethason oral oder intravenös verabreicht werden für zehn Tage. Patienten mit leichter bis mittelschwerer Erkrankung, die keinen Sauerstoff benötigen, sollten nicht mit systemischen Kortikosteroiden behandelt werden (Edalatifard, M. et al. 2020).

Baricitinib sollte bei Patienten mit COVID-19 Pneumonie und Sauerstofftherapie oder nicht-invasiver Beatmung eingesetzt werden, aber nicht in Kombination mit Tocilizumab (Kalil, A. et al. 2022). Tocilizumab sollte bei COVID-19-Patienten mit schwerer COVID-19-Erkrankung zur Therapie gegeben werden (Abani, O. et al. 2021). Für Anakinra gibt es keine Empfehlung, die für oder gegen eine Behandlung mit dem Medikament spricht (Tharaux, P.L. et al. 2021).

In der klinischen Praxis erfolgt die Therapie im Einzelfall nach der Berücksichtigung der Verfügbarkeit, der Kontraindikationen, des Krankenhausaufenthalts und des Risikos des einzelnen Patienten. Der Einsatz des monoklonale Antikörpers (MAK) Sotovirumab wird nicht mehr empfohlen, da dieser gegen der Omicron-Varianten nicht ausreichend wirksam ist.

1.1.9 Impfung

Die Impfung ist die effektivste Methode zur Prävention und Kontrolle von COVID-19. Viele verschiedene Impfstoffe wurden gegen SARS-CoV-2 entwickelt, einschließlich rekombinanter Vektoren, DNA, mRNA in Lipidnanopartikeln, inaktivierten Viren, lebend attenuierten Viren und Peptidvakzinen (Smith, T.R.F. et al. 2020, Zhu, F. C. et al. 2020, Gao et al. 2020).

Impfstoffe sind organische Substanzen, die den Menschen vor einer Infektion durch schädliche Viren und Bakterien schützen. Für gewöhnlich dauert es etwa 10-15 Jahre, um neue Impfstoffe gegen Krankheitserreger (Viren oder Bakterien) zu entwickeln. Daher war die Entwicklung eines Impfstoffs gegen den aktuellen SARS-CoV-2-Stamm eine große Herausforderung für die Forscher. Wissenschaftler in verschiedenen Ländern haben jedoch Notfallimpfstoffe gegen SARS-CoV-2 entwickelt und Notfallgenehmigungen (EUA) erhalten, (Hillary und Ceasar 2023).

Es gibt verschiedene Arten von Impfstoffen gegen (SARS-CoV-2). A) mRNA-Impfstoffe arbeiten mit mRNA-Fragmenten, die viralen Proteinen entsprechen. Nach Erhalt eines mRNA-Impfstoffs produzieren menschliche Zellen virale Proteine. Das körpereigene Immunsystem kann diese viralen Proteine als körperfremd erkennen und damit beginnen, gegen diese Proteine Antikörper zu produzieren. Diese Antikörper schützen den Menschen vor einer schweren Covid-19 Erkrankung. B) Die Verwendung eines DNA-Impfstoffs führt zu einer veränderten Form des genetischen Materials von SARS-CoV-2 (einem viralen Vektor). Wenn dieser virale Vektor in Zellen injiziert wird, wird das genetische Material von SARS-CoV-2 freigesetzt und die Produktion von viralen Proteinen beginnt. Das Immunsystem des Körpers erkennt virale Proteine als körperfremd und beginnt, Antikörper gegen diese zu produzieren. Die Antikörper schützen Menschen vor einer schweren Covid-19 Erkrankung. C) Impfstoffe mit Proteinuntereinheiten. Dieser Impfstoff enthält nur Fragmente des Virus, die die Immunantwort stimulieren. Für gewöhnlich handelt es sich dabei um das S-Protein. Erkennt das menschliche Immunsystem das S-Protein werden spezifische Antikörper gebildet. Diese Antikörper neutralisieren SARS-CoV-2, im Falle einer Infektion (Hillary und Ceasar 2023).

1.2 Wissenschaftlicher Kenntnisstand zur Labor- und Schnell Diagnostik von SARS-CoV-2:

Die Molekulardiagnostik von SARS-CoV-2 und damit das schnelle Erkennen einer aktiven Infektion war eine der wichtigsten Maßnahmen zur Bekämpfung und Eingrenzung der COVID-19-Pandemie. Insbesondere die Reverse-

Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und die quantitative Variante (qRT-PCR) waren der Goldstandard für den Nachweis von SARS-CoV-2. Aber auch schnellere Antigentests und andere Point-of-Care (POC)-Geräte haben eine bedeutende Rolle bei der Eindämmung der Ausbreitung von SARS-CoV-2 gespielt, indem sie Massenscreenings erleichterten und Ergebnisse in kürzerer Zeit lieferten. Daher kann trotz der zumeist höheren Sensitivität und Spezifität der RT-PCR-Assays der Einfluss von POC-Tests nicht ignoriert werden. Infolgedessen bestand und besteht immer noch ein erhöhtes Interesse an der Entwicklung von miniaturisierten, hochdurchsatzfähigen und automatisierten PCR-Systemen, von denen viele als Point-of-Care verwendet werden können (Gupta, A. et al. 2021, Lee und Song 2021). Eine Studie untersuchte die Beziehung zwischen Tests, die entweder ein SARS-CoV-2-Antigen nachwiesen, die Viruslast durch (qRT-PCR bestimmten) oder SARS-CoV-2 in Viruskulturen nachwiesen. Viruskulturen bieten ein Ersatzmaß für die Infektiosität von getesteten Personen und liefern somit Informationen darüber, wie und wo diagnostische Tests auf der Grundlage von Antigen- und Nukleinsäureamplifikation am besten verwendet werden. Es wurden Antigen-Testergebnisse von drei Lateral-Flow-Assays und einem mikrofluidischen Assay mit Viruskulturnachweis und Viruslastmessungen verglichen. Alle Tests, wurden an bis zu 189 SARS-CoV-2-positiven Proben aus Nasen-Rachen-Abstrichen durchgeführt. Die Gesamtsensitivität betrug 90 % für LumiraDx und 74 % für die anderen Methoden (BD Veritor, CareStart und Oscar Corona). Die Spezifität betrug 70 % für LumiraDx und 91 % bis 92 % für die anderen Antigentestverfahren. Zusätzlich betrug die Sensitivität der Antigenteste bei Proben mit einer Viruslast $>10^7$ Genomkopien/ml 100 % und bei Proben mit einer Viruslast $<10^4$ Genomkopien/ml 0%. Diese Studie zeigte, dass Antigentests bei Proben mit einer Viruslast von $>10^6$ Genomkopien/ml gut funktionieren (Kirby et. al. 2023).

In einer anderen Untersuchung wurden vier Antigen-Schnellteste für den Nachweis von SARS-CoV-2 mit einer qRT-PCR (quantitative Echtzeit-PCR) als Referenzmethode verglichen. Dabei handelt es sich um die Tests BD Veritor, ACON LF, ACON Fluoroimmunoassay und Lumira Dx. Es wurde die analytische

Sensitivität und Spezifität der Antigen Schnellteste (Ag-RDT) an insgesamt 350 Proben (150 negativ, 200 positiv) bewertet. Alle Ag-RDTs zeigten eine nahezu 100% Spezifität. Die analytische Gesamtsensitivität lag zwischen 66,5% und 88,3%. Alle Methoden detektierten das Antigen in Proben mit Viruslasten von mehr als 1.500.000 RNA-Kopien/ml. Bei Proben mit Viruslasten zwischen 500.000 und 1.500.000 RNA-Kopien/ml lag die Sensitivität bei 75%. Der BD Veritor hatte eine Sensitivität von nur 25% bei Proben mit Viruslasten zwischen 50.000 und 500.000 Kopien/ml im Vergleich zu 75% Sensitivität bei dem ACON LF-Gerät und 80% Sensitivität bei dem LumiraDx und ACON FIA. Im Vergleich zu BD Veritor erkannte ACON FIA deutlich mehr Proben mit Viruslasten <50.000 Kopien/ml. Die Sensitivitäten reichten von 13% (BD Veritor) bis 78,3% (ACON FIA) für Proben mit nachweisbarem Antigen und Viruslast <50.000 Kopien/ml. Es kann geschlussfolgert werden, dass Ag-RDTs sehr unterschiedliche analytische Sensitivitäten haben, insbesondere für Viruslasten unter 500.000 Kopien/ml (Karon et al. 2021).

Lippi et al. führten im Jahr 2022 eine Literaturrecherche und Metaanalyse zur Genauigkeit des LumiraDX SARS-CoV-2-Antigentests für die Diagnose einer akuten SARS-CoV-2-Infektion durch. Die gepoolte diagnostische Sensitivität dieses Tests lag zwischen 60%-99% und die diagnostische Spezifität zwischen 99%-100%. Zusammenfassend schlussfolgerten die Autoren, dass die diagnostische Leistung des LumiraDX SARS-CoV-2-Antigentests als zuverlässige Alternative zu molekularen Tests für ein schnelles vorläufiges Ergebnis einer akuten SARS-CoV-2-Infektion ausreichend sei. (Lippi et al. 2022).

Nur in einer Studie wurden Abstriche mit erhöhten Amplifikationszyklus-Werten (CT- Werten) bis 33 gemessen und mit dem LumiraDx Antigentest und mit einer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) verglichen. Im Vergleich zur RT-PCR hatten die Nasenabstriche eine Sensitivität von 97,6 % und eine Spezifität von 96,6 %. Die Nasopharyngealabstriche hatten eine Sensitivität von 97,5 % und eine Spezifität von 97,7%. Diese Studie zeigte, dass alle Proben, die innerhalb der 33 RT-PCR-Zyklen positiv waren, auch vom LumiraDX Antigentest erkannt wurden (Drain, P.K. et al. 2021).

Eine andere Studie hatte zwei SARS-CoV-2-spezifischen Antigen-Schnelltests (NADAL COVID-19 Antigen Test und LumiraDx SARS-CoV-2 Antigen Test) mit der Echtzeit-PCR (qRT-PCR) als Goldstandard verglichen. Die Spezifität bei beiden Tests war 100%. Die Sensitivität war bei Proben mit hoher Viruslast (CT < 30) für den LumiraDx SARS-CoV-2 Antigen Test 100% und für der NADAL-Test 76,2%. Bei Proben mit niedriger Viruslast (CT >30), war die Sensitivität für den LumiraDx-Test 50% und für der NADAL-Test 24,3%. Proben mit niedriger Viruslast wurden demnach, häufig von beiden Antigentests übersehen (Dierks, S. et al. 2021).

1.3 Ziele (Hypothesen)

Die im letzten Kapitel beschriebenen Studien sind in der Mehrzahl industriefinanziert gewesen. Demnach besteht ein hoher Bedarf an unabhängigen wissenschaftlichen Studien, welche die diagnostische Leistungsfähigkeit dieser Geräte bewerten und den Nutzen im klinischen Alltag darlegen. Diese wissenschaftliche Arbeit befasst sich mit einem diagnostischen Vergleich einer SARS-CoV-2 qRT-PCR, wie sie im Rahmen einer Routinediagnostik an einem großen Einsenderlabor durchgeführt wurde, mit Point-of-Care (PoC) Geräten, die zur SARS-CoV-2 Bestimmung entwickelt wurden. Dabei gilt die hochsensitive und -spezifische qRT-PCR als Goldstandard. PoC-Geräte sind vor allem für den Einsatz in Krankenhäusern bestimmt. Ziel des hier vorgestellten Studienprojekts war die Durchführung der Laboranalysen und die Auswertung der erhobenen Messdaten und somit die Ermittlung der Testparameter Sensitivität und Spezifität für die neuartigen PoC-Geräte, welche eine schnellere Diagnostik ermöglichen als der PCR- Goldstandard und damit bei der SARS-CoV-2 Diagnostik einen großen Stellenwert erlangen könnten. Darüber hinaus war eine weitere Frage, ob die getesteten PoC-Geräte die qRT-PCR in der Routine ersetzen können.

Im Rahmen dieser Studie wurden folgende PoC-Instrumente untersucht: Alveo be.well, BD Veritor TM Plus, Bosch Vivalytic, Chronos DX, Fluxergy und LumiraDx.

Außer den industriell geförderten Zulassungsstudien gibt es für Alveo be.well, Chronos DX und Fluxergy keine weiteren Studien, die den diagnostischen Nutzen der Geräte in der Praxis zeigen. Es wurden nur für BD Veritor, Bosch Vivalytic und Lumira DX unabhängige Studien gefunden. In diesen Studien werden jedoch fast ausschließlich hoch positive Proben getestet. Dies ist für eine finale Bewertung der realen Leistungsmerkmale eines Testes problematisch, da im klinischen Alltag auch schwach positive Proben zuverlässig bestimmt werden müssen. Auch in Zulassungsstudien für Diagnostika werden niedrig-positive Proben in der Regel nicht verwendet. Unsere unabhängige Studie hatte zum Ziel, auch Daten von schwach-positiven Proben auszuwerten, sodass reale Leistungscharakteristika beschrieben werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Die Entnahme von Abstrichen aus dem Nasenrachenraum diente dem Nachweis einer Infektion mit dem Erreger SARS-CoV-2 aufgrund der, dort hohen Erregerdichte. Alle in dieser Studie getesteten Abstriche waren trockene Nasen-Rachen-Abstriche. Diese wurden innerhalb von 24 Stunden nach Probeneingang getestet. Die hierfür verwendeten sterilen Abstrichtupfer (Bestellnummer 80.131) stammten von der Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und hatten eine CE-IVD-Zertifizierung. Das Außenmaterial bestand aus Polypropylen, der Tupfer aus Viskose und der Stab aus Polystyrol. Letzterer hatte eine Länge von 131 mm.

Alle Proben stammten aus der Routinediagnostik des Eurofins MVZ Medizinisches Labor Gelsenkirchen. Die Einsender aus dem niedergelassenen Bereich und den Krankenhäuser wurden darauf hingewiesen, bei der Probennahme aus dem Rachen, den Tupfer tief einzuführen, ohne die Mundschleimhaut zu berühren. Bei der Abnahme aus dem Nasopharynx sollte der Tupfer vom Nasenrücken bis zum Rachen eingeführt werden. In beiden Fällen wurde darauf hingewiesen, den Tupfer bei der Abnahme leicht zu drehen, um möglichst viel humanes Material zu entnehmen.

Zunächst wurden die Proben im Rahmen der Routineuntersuchungen molekulardiagnostisch untersucht. SARS-CoV-2 positive Abstrichproben wurden hiernach bei -20°C in einer Biobank bis zur Vergleichstestung gelagert. SARS-CoV-2-negative Abstriche wurden dagegen direkt nach der Routinediagnostik für die Vergleichsmessungen genutzt. Es wurden mindestens 15 positive Proben und mindestens 10 negative Proben pro Gerät getestet und ausgewertet. Die Abstriche wurden vor der Verwendung in dieser Studie in 500 ml sterilem Wasser Ampuwa Aquadest (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verdünnt.

2.2 Molekulardiagnostische Methoden

Alle Analysen wurden gemäß der internen SOPs am Eurofins MVZ Medizinisches Labor Gelsenkirchen und der Anweisungen der Hersteller durchgeführt.

Als Goldstandard in dieser wissenschaftlichen Arbeit diente eine RNA-Extraktion mit dem GSDNovaPrime SARS-CoV-2 RNA-Extraktionskit V2 (NovaTec Immundiagnostica, Dietzenbach, Deutschland) auf dem KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und eine anschließende qRT-PCR-Analyse auf einem ABI 7500 PCR Cycler (ABI Prism 7500 SDS / Fast SDS Applied Biosystems ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mit dem GSDNovaPrime SARS-CoV-2 RT-PCR-Kit V2 (NovaTec Immundiagnostica, Dietzenbach, Deutschland).

2.2.1 RNA-Extraktion und qRT-PCR

Die verwendete Methode war eine Multiplex-Echtzeit-RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis von SARS-CoV-2-RNA aus menschlichen Atemwegsproben. Der Nachweis erfolgt in einem einstufigen Echtzeit-RT-PCR-Format. Dabei wird die reverse Transkription (RT), gefolgt von der PCR, in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Die isolierte RNA wird unter Verwendung von reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mittels Real-Time-PCR werden dann zwei spezifische Genfragmente im N-Gen von SARS-CoV-2 amplifiziert (Dual-Target-Test). Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hilfe von Hydrolysesonden nachgewiesen, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluorophor markiert sind. In Gegenwart der Zielsequenz hybridisiert die Sonde mit dem Amplikon. Während der Verlängerung trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter sendet ein Fluoreszenzsignal aus, das von der optischen Einheit des Real-Time-PCR-Geräts erfasst wird. Das Fluoreszenzsignal nimmt mit der Menge an gebildeten Amplikons zu.

Bei jedem Ansatz wird eine interne Kontrolle (EC) mitgeführt, um die Probenpräparation und eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können. Die interne Kontrolle war eine RNase P, die auch eine endogene Kontrolle ist und zeigt ob das Material Epithelzellen beinhaltet.

2.2.2 Durchführung von RNA-Extraktion und PCR:

Die Extraktion von viraler RNA aus respiratorischen Abstrichen wurde wie folgt durchgeführt:

1. Nova Prime mit Lysis 96 DW (Extraktion-Software von KingFisher-Thermo Scientific) wurde programmiert.
2. Der Tupfer wurde unter dem Abzug in ein beschriftetes Reaktionsgefäß mit 400 µl Ampuwa Aquadest (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) eingeknipst und gevortext. Damit wurde eine Probenlösung hergestellt.
3. 5 Deppwell-Platten wurden vorbereitet:
 - Waschplatte 1: Waschpuffer WB1 + Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) 25 ml, 900 µl pro Vertiefung der Waschplatte 1.
 - Waschplatte 2: Waschpuffer WB2 + 38,5 ml Ethanol, wovon 1000 µl in jede Vertiefung der Waschplatte 2 gegeben wurden.
 - Waschplatte 3: Waschpuffer WB3 + Ethanol 44 ml, 1000 µl pro Vertiefung der Waschplatte 3.
 - Elutionsplatte: 50 µl Elution Buffer wurden in jede Vertiefung der Elutionsplatte gegeben.
 - Musterplatte: 95 µl Lysis Buffer + 5 µl Carrier Molecules + 5 µl EC + 10 µl Proteinase K wurden gevortext und 115 µl in jede Vertiefung gegeben. Danach wurden 350 µl der oben hergestellten Probelösung hinzugefügt.
4. 10 Minuten wurden die Ansätze auf dem King Fisher Flex (mittlere Geschwindigkeit, 350 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysis 96 DW-Programm wurde hiernach gestartet.
5. Nach 10 Minuten stoppte das Gerät. Danach wurden 500 µl Isopropanol + 10 µl Magnetic Beads in jeder Vertiefung der Musterplatte dazugegeben.
6. Die Musterplatte wurde daraufhin erneut auf den King Fisher Flex gestellt und das Gerät erneut gestartet.
7. Nachdem die Nukleinsäuren durch Lyse freigesetzt, stabilisiert und an die Magnetic Beads gebunden wurden, folgten drei Waschrunden, um Proteine und Verunreinigungen zu entfernen. Im letzten Schritt wurden die Nukleinsäuren mit einem Elutionspuffer von den Magnetic Beads abgelöst und auf die Elutionsplatte übertragen.

8. Nach Beendigung des Programms wurde die Elutionsplatte mit der extrahierten RNA dem Gerät entnommen. Daraufhin wurde die PCR gestartet.

Die PCR-Reaktion wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde ein Mastermix hergestellt: 5 µl Primer-Probe Mix (PP) plus 3 µl RT-PCR Enzym-Mix (E-MIX), zusammen 8 µl. Die interne Kontrolle war im Enzym-Mix inkludiert. Der Mastermix wurde gemischt und für 60 sec bei 3000 rpm –bei Raumtemperatur in Zentrifuge MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Es wurden je 8 µl Mastermix auf die 7500 Standard PCR-Platte (P.Sudmann, Leopoldshöhe, Deutschland) pipettiert und 12 µl extrahierte RNA zugegeben. In die letzten Vertiefungen der PCR-Platte, wurde die Positiv- und Negativkontrolle zugegeben. Anschließend wurde die Platte mit Folie abgedeckt und 2 Minuten bei 4000 rpm -bei Raumtemperatur in Zentrifuge Sigma Typ 2-16 (Sigma, Harz, Deutschland) zentrifugiert. Die PCR-Reaktion erfolgte auf dem ABI 7500/7500 Cycler Fast (Novatec, Dietzenbach, Deutschland). Die Geräteeinstellung sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Geräteeinstellung 7500 Standard Cycler (Novatec, Dietzenbach, Deutschland)

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit	Datenerfassung
1	50 °C	10 min	
1	95 °C	3 min	
40	95 °C	10 sec	
	60 °C	30 sec	Fluoreszenzmessung am Ende jedes Zyklus

Folgende Kriterien mussten für die Freigabe der Ergebnisse erfüllt sein:

- Die Negativkontrolle wurde im CoV2-Kanal (Wellenbereich 465-510 Nanometern) nicht detektiert und hatte in der internen Kontrolle (EC-Kanal- Wellenbereich 618-660 Nanometern) einen $CT \leq 35$.
- Die Positivkontrolle hatte im CoV2-Kanal einen $CT \leq 38$. Ein Signal im EC-Kanal durfte vorkommen, war jedoch für die Bewertung nicht relevant.

Eine Probe wurde als SARS-CoV-2-positiv interpretiert, wenn der CT-Wert des CoV2-Kanals ≤ 38 war. Ein Signal im EC-Kanal durfte vorkommen, war jedoch bei Positivität im CoV2-Kanal für die Bewertung nicht relevant. Eine Probe war negativ für SARS-CoV-2, wenn sie einen $CT > 38$ im CoV2-Kanal oder keine Expression im CoV2-Kanal aufwies. In dem Fall musste für die Negativbewertung die interne Kontrolle im EC-Kanal eine Amplifikation von $CT \leq 35$ aufweisen. Wenn der CT-Wert des EC-Kanals 35 überschritt oder dort keine Amplifikation erfolgte, wurde die Probe wiederholt. Die zu wiederholende Probe wurde 1:10 verdünnt. Wurde trotz Verdünnung das ungültige Testergebnis bestätigt, wurde die Probe aufgrund der wahrscheinlichen Anwesenheit von PCR-Inhibitoren als „gehemmt“ bewertet.

2.3 POCT-Geräte und Testverfahren

Folgende Geräte wurden im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit getestet:

1. Alveo be.well der Firma ALVEO Technologies (Alameda, Vereinigte Staaten)
2. BD Veritor der Firma Becton Dickinson (Sparks, Meryland, Vereinigte Staaten)
3. Bosch Vivalytic der Firma Bosch Healthcare (Waiblingen, Germany)
4. Chronos Dx der Firma BforCure (Montreuil, France)
5. Fluxergy der Firma Fluxergy (Irvine, USA)
6. Lumira Dx der Firma LumiraDx Ltd (Alloa, United Kingdom)

2.3.1 Beschreibung aller Testsysteme

2.3.1.1 Alveo be.well

2.3.1.1.1 Beschreibung des Systems

Zu den Komponenten des Alveo be.well-Systems (Alveotechnologies, Alameda, Vereinigte Staaten) gehören ein Analysegerät, die Kartuschen, der Assay-Puffer, Nasentupfer, Transferpipetten und die mobile be.well-App. Einwegkartuschen enthalten alle Reagenzien, die für eine isotherme Amplifikationsreaktion benötigt werden.

Das Kit enthält be.well Assay-Pufferfläschchen zum Einmalgebrauch, einzeln verpackte Nasentupfer für nasale Probenahmen und Transferpipetten mit festem Volumen zum Übertragen von Proben aus den Assay-Pufferfläschchen in die Kartusche.

2.3.1.1.2 Durchführung

Der Test wurde nach Herstellerangaben wie folgt durchgeführt: Zuerst wurden Proben-Tupfer in die Reaktionsmischung (b.well Assay-Puffer) eingetaucht und eingerührt. Der Tupfer wurde dann entfernt und entsorgt. Im nächsten Schritt wurde die Pufferflasche geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit der im Kit enthaltenen Kunststoffpipette in die Kartusche überführt und die Kappe verschlossen. Diese Kartusche kam in den ALVEO be.well Analyzer. Neben den Patientendaten gab es bei jedem Auftrag die Möglichkeit, Symptome in der App zu speichern. Während der PCR-Reaktion wurde auf dem Alveo be.well Analyzer die verbleibende Zeit bis zum Abschluss des Testes angezeigt. Abschließend wurden die Ergebnisse per Bluetooth an die be.well-App übertragen.

2.3.1.1.3 Probenmaterial

Es wurden 15 positive Proben und 10 negative Proben getestet. Es wurden Rachenabstriche aus der Routine verwendet.

2.3.1.1.4 Testprinzip

Das Testsystem weist SARS-CoV-2 RNA nach. Die zugrundeliegende Technologie ist eine isothermale Amplifikation. Die isotherme Amplifikation von Nukleinsäuren ist ein Prozess, bei welchem schnell und effizient

Nukleinsäuresequenzen bei konstanter Temperatur amplifiziert werden (Zhao et al. 2015).

2.3.1.2 BD Veritor

2.3.1.2.1 Beschreibung des Systems

Die Komponenten des BD Veritor-Systems (Becton Dickinson, Sparks, Meryland, USA) sind das BD Veritor TM Plus Analysegerät, die Reagenzien „BD Veritor TM System zum schnellen Nachweis von SARS-CoV-2“, Tupfer, Teströhrchen und Teststreifen für 28 Tests und 2 Kontrollen. Das BD Veritor-System besteht aus einem speziellen optoelektronischen Bewertungsinstrument und einem immunchromatographischen Assay für den qualitativen Nachweis von Antigenen des SARS-Cov2-Virus. Dieses System wurde entwickelt, um das Vorhandensein oder Fehlen des SARS-Cov2-Nukleokapsidproteins in Atemwegsproben nachzuweisen.

Das Reagenzien-Kit enthält 30 Lateral-Flow-Streifen, 30 einzelne Fläschchen gefüllt mit 325 µl Extraktionsreagenz, eine integrierte Dosierspitze, 30 sterile Tupfer, 1 positive SARS-Cov-2-Kontrolle und 1 negative SARS-Cov-2-Kontrolle.

2.3.1.2.2 Durchführung

Reagenzien, Proben und Geräte wurden vorm Testen auf Raumtemperatur (15-30°C) temperiert. Vor dem Testen wurde ein Extraktionsreagenzröhrchen und ein BD Veritor TM Systemtest aus dem Folienbeutel entnommen. Danach wurde das Extraktionsreagenzröhrchen geöffnet und der Proben-Tupfer mindestens 15 Sekunden lang in die Flüssigkeit eingetaucht. Der Tupfer wurde dann entfernt, indem die Seite des Röhrchens gedrückt wurde, um Flüssigkeit aus dem Tupfer zu extrahieren. Zum Schluss wurde das Röhrchen geschwenkt, um es gut zu mischen. Nachdem der Tupfer mit Extraktionsreagenz verarbeitet und das Röhrchen verschlossen wurde, wurde die Probe innerhalb von 30 Minuten in die Testkassette gegeben. Der nächste Schritt bestand darin, das Röhrchen zu drücken und 5 Tropfen auf das Testfeld des BD Veritor Teststreifen zu geben.

Nach dieser Probenvorbereitung wurde jede Probe für 15-20 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde der Teststreifen in den BD Veritor TM Analyzer eingesetzt.

Das Analysegerät wurde mit der blauen Taste eingeschaltet und damit die Ablesung des Teststreifens gestartet. Der BD Veritor TM Analyzer führte einen Selbsttest durch, bevor er einsatzbereit war. Nach dem Selbsttest zeigte das Anzeigefenster „PRÜFGERÄT EINSETZEN ODER DOPPELCLICK-TASTE FÜR WALK-AWAY-MODUS“. Nach Abschluss der Analyse wurden die Testergebnisse im Anzeigefenster angezeigt. Die Ergebnisse wurden notiert, bevor der Teststreifen entfernt wurde.

2.3.1.2.3 Probenmaterial

Es wurden 39 SARS-CoV-2 positive Proben und 19 SARS-CoV-2 negative Proben getestet. Es wurden Rachenabstriche aus der Routine verwendet.

2.3.1.2.4 Testprinzip

Das Testsystem weist SARS-CoV-2 Antigen nach. Wenn Proben verarbeitet und dem Teststreifen hinzugefügt werden, binden SARS-CoV-2-Antigene, die in der Probe vorhanden sind, an Antikörper, die mit Detektorpartikeln im Teststreifen konjugiert sind. Die Antigen-Konjugat-Komplexe wandern über den Teststreifen zum Reaktionsbereich und werden von einer Reihe von Antikörpern eingefangen, die an die Membran gebunden sind. Ein positives Ergebnis wird vom BD Veritor Analyzer standardisiert bestimmt, wenn Antigen-Konjugat an der Testposition „T“ und der Kontrollposition „C“ auf dem Teststreifen in einer vorgegebenen Intensität sichtbar wird. Das Instrument analysiert und korrigiert unspezifische Bindungen und erkennt positive Ergebnisse, die mit bloßem Auge nicht erkannt werden, um ein objektives Ergebnis zu liefern. Es gibt keinen quantitativen Wert (wie einen CT-Wert) aus.

2.3.1.3 Bosch Vivalytic

2.3.1.3.1 Beschreibung des Systems

Zu den Bestandteilen des Bosch Vivalytic-Systems (Bosch Healthcare, Waiblingen, Germany) gehören der Analyser Vivalytic one, die Kartuschen und die eNat-Röhrchen.

2.3.1.3.2 Durchführung

Das Analyse-Gerät arbeitet mit Trockenabstrichen. Der Abstrichtupfer wurde in ein eNAT-Röhrchen gegeben und 10 Sekunden lang gevortext. So entstand die

Probenlösung. Die ID-Namen und die Labornummer wurden mit „edit“ in die Software des Analysegeräts eingegeben. Die leere Kartusche wurde ausgepackt und gescannt. Danach wurde die Kartuschen-Kammer geöffnet und 300 µl Probenlösung hinein pipettiert. Die Öffnung der Kartusche wurde mit einem Klick geschlossen und in Pfeilrichtung eingeschoben. Der Test startete automatisch. Die Ergebnisse wurden in einer Excel-Datei mit CT-Werten und Laufzeiten aufgezeichnet. Jedes Testergebnis wurde im PDF-Format exportiert und auf einem USB-Speichermedium gesichert. Im Anschluss wurde „Finish“ gewählt und die Kartusche wurde ausgeworfen.

2.3.1.3.3 Probenmaterial

Es wurden 15 positive Proben und 4 negative Proben getestet. Es wurden Rachenabstriche aus der Routine verwendet.

2.3.1.3.4 Testprinzip

Das Testsystem weist SARS-CoV-2 RNA nach. Die zugrundeliegende Technologie ist eine RT-PCR.

2.3.1.4 Chronos Dx

2.3.1.4.1 Beschreibung des Systems

Zu den Bestandteilen des Chronos Dx-Systems (BforCure, Montreuil, France) gehören der Analyser Chronos Dx Thermocycler, der Lyse-Puffer, das RT PCR Mix Reagenz und die Reaction Chips für 25 Tests.

2.3.1.4.2 Durchführung

Die Methode war extraktionsfrei. Nachdem die Abstriche in 600 µl DEPC-behandeltem Wasser verdünnt wurden, wurden 200 µl dieser Verdünnung in 200 µl Lysepuffer überführt. Nach 30 sec Vortexen wurden 1,2 µl dieser Verdünnung in 30 µl Mastermix überführt. 25 µl der endgültigen gemischten Verdünnung wurden auf einem Instrumentenchip übertragen. Der Chip wurde dann in den ChronosDX eingesetzt und der Test wurde gestartet. Die Ergebnisse wurden digital übertragen und schließlich in einer sicheren Cloud gespeichert.

2.3.1.4.3 Probenmaterial

Es wurden 15 positive Proben und 10 negative Proben in zwei Versuchsläufen getestet. Die Abstriche wurden für das erste Experiment in 500 µl sterilem Wasser verdünnt (GSD NovaPrime Reagenzien auf dem ChronosDx). Dieses beimpfte Wasser diente als Ausgangsmaterial für die RNA-Extraktion mit dem KingFisher. Das Eluat wurde direkt auf dem ChronosDx-Gerät verwendet. Für das zweite Experiment wurden die Abstriche in 600 µl DEPC-behandeltem Wasser verdünnt. Dieses beimpfte Wasser wurde ins Lyseröhrchen gegeben und diente als Ausgangsmaterial für das zweite Experiment und wurde wie in 2.3.1.4.2 beschrieben verarbeitet.

2.3.1.4.4 Testprinzip

Das Testsystem weist SARS-CoV-2 RNA in einer Dual-Target-RT-qPCR nach. Das Gerät hat eine CE-IVD-Kennzeichnung. Die BFAST-Reaktionsreagenzien haben keine solche Kennzeichnung.

2.3.1.5 Fluxergy

2.3.1.5.1 Beschreibung des Systems

Zu den Bestandteilen des Fluxergy-Systems (Fluxergy, Irvine, USA) gehören der Fluxergy Analyser, das Reaktion-Mix-Reagenz und die Fluxergy Testkarten.

2.3.1.5.2 Durchführung

Der Abstrichtupfer wurde in 500 µl sterilem Wasser verdünnt. Von diesem geimpften Wasser wurden 14 µl im Reaktionsgemisch dazu gegeben und anschließend auf die Fluxergy Testkarte übertragen. Als nächstes wurde die Fluxergy-Testkarte in den Fluxergy Analyser eingesteckt. Die Ergebnisse wurden digital übertragen und schließlich in einer sicheren Cloud gespeichert.

2.3.1.5.3 Probenmaterial

Es wurden 15 positive Proben und 10 negative Proben getestet. Die Abstriche wurden in 500 µl sterilem Wasser verdünnt. Dieses geimpfte Wasser diente als Ausgangsmaterial für den Test.

2.3.1.5.4 Testprinzip

Das Testsystem weist SARS-CoV-2 RNA in einer qRT-PCR nach. Das Verfahren ist CE-IVD-markiert.

2.3.1.6 Lumira Dx

2.3.1.6.1 Beschreibung des Systems

Zu den Bestandteilen des Lumira Dx-Systems (Lumira Dx Ltd, Alloa, UK): gehören der Analyser Lumira Dx, die Teststreifen, die Extraktionsröhrchen, die Pipettendeckel und die Lumira Dx Connect App.

2.3.1.6.2 Durchführung

Zuerst wurde der Abstrich in 500 ml sterilem Wasser verdünnt. Nach dem Öffnen des Deckels des Extraktionsröhrchens wurden 60µl vom geimpften Wasser dazu gegeben und durch Drücken der Wände des Extraktionsröhrchens durchgemischt. Patientendaten wurden in das Analysegerät eingegeben und die Teststreifen aus dem Beutel entnommen. Als nächstes wurde der Teststreifen so weit wie möglich in das Analysegerät eingeführt. Dann wurden der Probenotyp und der Testtyp auf dem Geräte-Bildschirm ausgewählt. Hiernach wurde ein Tropfen Probenlösung aus dem Extraktionsröhrchen auf das Feld des Teststreifens gegeben. Im Anschluss wurde die Tür geschlossen und der Test begann. Nach 12 Minuten wurde das Ergebnis auf dem Monitor angezeigt. Alle Ergebnisse wurden manuell vom Analysator abgelesen. Allerdings konnte das Gerät per Bluetooth Daten an die Lumira Dx Connect App (Cloud) senden. Die Daten wurden hier verschlüsselt, sodass nur die Messzeit und das Ergebnis angezeigt wurden. Diese Verschlüsselung konnte über die Kommentarfunktion umgangen werden.

2.3.1.6.3 Probenmaterial

Es wurden 30 positive Proben und 10 negative Proben getestet. Die Abstriche wurden in 500 ml sterilem Wasser verdünnt. Dieses geimpfte Wasser diente als Ausgangsmaterial für den Test.

2.3.1.6.4 Testprinzip

Das Testsystem weist SARS-CoV-2 Antigen nach. Grundlage ist ein mikrofluidischer Immunfluoreszenztest für den Nachweis des Nukleokapsid-Protein-Antigens.

2.4 Statistik

Um die Qualität der Forschungsergebnisse zu bewerten, wurden Metriken berechnet, die üblicherweise bei Klassifizierungs- oder Vorhersageproblemen verwendet werden. Die verwendeten Metriken waren die folgenden:

- die wahre positive Rate oder Sensitivität
- die wahre negative Rate oder Spezifität
- die Klassifizierungsrichtigkeit oder kategorische Übereinstimmung

Klinische Sensitivität ist die Wahrscheinlichkeit, dass Patienten mit der Krankheit ein positives Testergebnis haben (wahr-positive Rate).

Klinische Spezifität ist die Wahrscheinlichkeit, dass Patienten ohne die Krankheit ein negatives Testergebnis haben (wahr-negative Rate).

Kategorische Übereinstimmung ist die Richtigkeit der Vorhersagen der Ergebnisse, dass kranke Patienten als krank erkannt werden und gesunde als nicht krank.

Alle Metriken basierten auf der Berechnung wahrer positiver/negativer und falsch positiver/negativer Werte.

- Ein wahrer Positivwert (TP) ist ein Ergebnis, bei dem das Modell die positive Klasse korrekt vorhersagt.
- Ein wahres Negativ (TN) ist ein Ergebnis, bei dem das Modell die negative Klasse richtig vorhersagt.
- Ein falsches Positiv (FP) ist ein Ergebnis, bei dem das Modell die positive Klasse falsch vorhersagt.
- Ein falsches Negativ (FN) ist ein Ergebnis, bei dem das Modell fälschlicherweise die negative Klasse vorhersagt.

Es wurden eingebettete Microsoft Excel Funktionen verwendet, um die Metriken zu berechnen und die Summe von Total Positiv (TP), Total Negativ (TN), Falsch Positiv (FP) und Falsch Negativ (FN) in der Ergebnismenge zu ermitteln.

CT Wert PCR-Goldstandard	Bewertung PCR-Goldstandard	Bewertung POCT Gerät

In der verwendeten Tabelle existierten folgende Spalten:

SPALTE A: CT Wert Goldstandard (Ergebnis der Goldstandard PCR Methode)

SPALTE B: Bewertung (repräsentiert die Menge der tatsächlichen Ergebnisse - tatsächliche Daten)

SPALTE C: Resultate der getesteten POCT-Geräte (repräsentiert den Satz der vorhergesagten Daten)

Für jedes isolierte Experiment (Zeile in der Tabelle) wurde die Modelleistung wie folgt berechnet:

```
=IF(AND(AND(Bx="positiv", Cx="positiv"), "TP", IF(AND(AND(Bx="negativ", Cx="positiv"), "FP", IF(AND(AND(Bx="negativ", Cx="negativ"), "TN", IF(AND(AND(AND(Bx="positiv", Cx="negativ"), "TN", "unbekannt"))))
```

wobei IF(logical_condition, M, N) die eingebaute Funktion ist, die prüft, ob eine Bedingung erfüllt ist oder nicht. Wenn die als erster Parameter angegebene Bedingung wahr ist, gibt sie den in M angegebenen Wert zurück, andernfalls den in N angegebenen Wert. AND(X, Y) ist eine logische UND-Funktion, die nur dann wahr ist, wenn die beiden Parameter X und Y, die sie enthält, wahr sind, ansonsten ist sie falsch.

Die obige Funktion, die für jede Zeile x der Originaltabelle verwendet wurde, nutzte verschachtelte IFs (nested if), um zu berechnen, ob ein Ergebnis TP, FP, TN, FN ist. Anschließend wurden Funktionen genutzt, die die Summe der TP-, FP-, TN- und FN-Instanzen berechneten, indem mit der Funktion SUMME() so viele der Ergebnisse addiert wurden, die die entsprechenden Werte aufwiesen. Schließlich wurden in den letzten Excel-Zellen die Funktionen erstellt, die die Sensitivität, Spezifität und die Kategorische Übereinstimmung des Modells berechneten, indem die Formeln dargestellt wurden, die die Metriken definierten und die Zellen angegeben haben, aus denen die Funktion die Werte liest. Diese Formeln basierten auf:

- Sensitivität: $TP / (TP + FN)$ (Wahrer Positivwert / Wahrer Positivwert + Falsch Negativwert)
- Spezifität: $TN / (TN + FP)$ (Wahrer Negativwert / Wahrer Negativwert + Falsch Positivwert)
- Kategorische Übereinstimmung: $(TP + FP) / TP$ und $(TN + FN) / TN$ (Wahrer Positivwert + Falsch Positivwert / Wahrer Positivwert und Wahrer Negativwert + Falsch Negativwert / Wahrer Negativwert)

Durchgeführt wurden diese Berechnungen mit Microsoft Excel, Version 13 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die tabellarische und grafische Darstellung sowie die Dokumentation der Ergebnisse erfolgten ebenso mit Microsoft Excel, Version 13.

Die Sensitivität eines Testes wurde zusätzlich nach den gemessenen CT-Werten der qRT-PCR-Ergebnisse stratifiziert. Dabei wurde wie folgt klassifiziert: „Hoch positive Proben“ (CT-Zyklen < 22), „Positive Proben“ (30 > CT-Zyklen >= 22) und „Schwach positive Proben“ (CT-Zyklen >=30).

3. Ergebnisse

3.1 Geräte Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser wissenschaftlichen Arbeit werden unten pro Gerät aufgeführt.

3.1.1 Alveo be.well

3.1.1.1 Betriebliche Testeigenschaften

Die betrieblichen Testeigenschaften des Alveo be.well Tests gegenüber dem PCR-Goldstandard sind in Tabelle 4 aufgeführt. Im Gegensatz zum PCR-Goldstandard wurde für den Alveo be.well Test keine spezielle Laborausstattung oder –ausstattung benötigt. Das Testdesign war einfach und schnell durchführbar (Hands-on Time 4 Minuten / Probe beim Alveo be.well gegenüber 180 Minuten / Lauf bei der PCR). In dem Sinne benötigte die Person, die den Test durchführte, auch keine spezielle Ausbildung für die molekularmedizinische Diagnostik. Da im Alveo be.well Test jedoch nur eine Probe pro Analysegerät gemessen werden konnte, ist dieser Test nicht für den Hochdurchsatz an Proben ausgelegt. Auffällig war, dass Vibrationen am Testgerät (z.B. durch eine laufende benachbart lokalisierte Zentrifuge) die Messungen empfindlich stören konnten und demnach Testwiederholungen notwendig wurden.

3.1.1.2 Testeigenschaften des Alveo be.well Tests

Es wurden 15 positive und 10 negative Proben getestet und mit dem PCR-Goldstandard verglichen. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Testungen gegenübergestellt. Es ergab sich eine kategorische Übereinstimmung von 84%. Die klinische Sensitivität des Alveo be.well Tests lag bei 73.3%, die klinische Spezifität bei 100%. Die Inhibitionsrate betrug 0%, was bedeutet, dass keine PCR-Inhibition vorkam (Tabelle 5). Für eine noch detaillierte Analyse der klinischen Sensitivität wurden die positiven Proben gemäß ihrem CT-Wert-Messergebnis in der PCR-Goldstandard-Untersuchung in drei Kategorien stratifiziert (hoch positiv, positiv, schwach positiv). Tabelle 3 zeigt die Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von den gemessenen CT-Werten.

Bei stark positiven Proben betrug die Sensitivität 100%, bei positiven Proben 80%, und bei schwach positiven Proben nur noch 40%. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von der Proben-Viruslast hin. Im Gegensatz zum PCR-Goldstandard konnte der Alveo be.well Test schwächer positive Proben nicht mehr zuverlässig als positiv bestimmen.

Ergebnisse:

Tabelle 2. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs Alveo be.well

CT Wert PCR-Goldstandard	Bewertung PCR-Goldstandard	Bewertung Alveo be.well
15,64	positiv	positiv
17,18	positiv	positiv
19,23	positiv	positiv
20,82	positiv	positiv
21,89	positiv	positiv
23,56	positiv	positiv
25,02	positiv	positiv
26,5	positiv	positiv
28,18	positiv	positiv
29,86	positiv	negativ
30,49	positiv	positiv
32,32	positiv	positiv
34,67	positiv	negativ
35,06	positiv	negativ
37,24	positiv	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ

	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ

Tabelle 3. Stratifizierte Klinische Sensitivität von Alveo be.well in Abhängigkeit von der CT-Wert-Spanne

CT Bereich	Interpretation	Sensitivität Alveo be.well
15,64 – 22,99	Hoch positive Probe	5 / 5 = 100%
23 – 29,99	Positive Probe	4 / 5 = 80 %
> 30 ≤ 38	Schwach positive Probe	2 / 5 = 40 %

Tabelle 4. Betriebliche Eigenschaften Alveo be.well vs Goldstandard PCR

Eigenschaft	Alveo be.well	Goldstandard PCR
Installationszeit	wenige Minuten	30 min
Probenvorbereitungszeit	4 min / Probe	160 min / Lauf
Hands on time	4 min / Probe	180 min / Lauf
Analysezeit im Cycler	57 min / Probe	56 min / Lauf

Test run time	57 min / Probe	60 min / Lauf
Turnaround time	60 min / Probe	240-300 min / Lauf
Cool down time	Keine	Keine
Durchsatzkapazität	nur 1 Probe zur selben Zeit	94 Proben pro Lauf
Medizinisches Labor erforderlich	Nein	Ja
High Throughput	Nein	Ja
Durchführbarkeit	einfach, aber empfindlich für Vibrationen	MTA erforderlich
Computer erforderlich	Nein	Ja
Zusätzliche Instrumente erforderlich	Mobiltelefon	Gefrierschrank
Befund Quantitativ oder Qualitativ	Qualitativ	Quantitativ
CT Wert	Nein	Ja
Online Übertragung	Ja	Ja
CE Zertifiziert	Ja	Ja

Tabelle 5. Testeigenschaften des Alveo be.well.

Testeigenschaft	Alveo be.well
Kategorische Übereinstimmung	84%
Klinische Sensitivität	73,3%
Klinische Spezifität	100%
Hemmungsrate	0%

3.1.2 BD Veritor

3.1.2.1 Betriebliche Testeigenschaften

Die betrieblichen Testeigenschaften des BD Veritor Tests gegenüber dem PCR-Goldstandard sind in Tabelle 8 aufgeführt. Im Gegensatz zum PCR-Goldstandard wurde für den BD Veritor Test keine spezielle Laborausrüstung oder – ausstattung benötigt. Das Testdesign war einfach und schnell (Hands-on Time 4 Minuten / Probe beim BD Veritor gegenüber 180 Minuten / Lauf bei der PCR). In dem Sinne benötigte die Person, die den Test durchführte, auch keine spezielle Ausbildung für die molekularmedizinische Diagnostik. Da im BD Veritor Test jedoch nur eine Probe pro Analysegerät gemessen werden konnte, ist dieser Test nicht für den Hochdurchsatz an Proben ausgelegt. Ein besonderer Vorteil war, dass auch schwache Ergebnisse mit dem BD Veritor TM Plus Analyser gelesen werden konnten. Das Ablesen der Ergebnisse war somit hochgradig standardisiert und konnte von einer nicht medizinischen oder nicht im Labor geschulten Person durchgeführt werden. Potenziell konnte das Analysegerät an das LIMS des medizinischen Labors angeschlossen werden (wurde nicht getestet) und somit einige interessante Optionen in Bezug auf die Bestätigung von PCR-Tests bieten.

3.1.2.2 Testeigenschaften des BD Veritor Tests

Es wurden 39 positive und 19 negative Proben getestet und mit dem PCR-Goldstandard verglichen. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Testungen

gegenübergestellt. Es ergab sich eine kategorische Übereinstimmung von 65,52%. Die klinische Sensitivität des BD Veritor Tests lag bei 48,72%, die klinische Spezifität bei 100% (Tabelle 9). Für eine noch detaillierte Analyse der klinischen Sensitivität wurden die positiven Proben gemäß ihrem CT-Wert-Messergebnis in der PCR-Goldstandard-Untersuchung in drei Kategorien stratifiziert (hoch positiv, positiv, schwach positiv). Tabelle 7 zeigt die Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von den gemessenen CT-Werten. Bei stark positiven Proben betrug die Sensitivität 93,3%, bei positiven Proben 53,85%, und bei schwach positiven Proben 0%. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von der Proben-Viruslast hin. Im Gegensatz zum PCR-Goldstandard konnte der BD Veritor Test schwächer positive Proben nicht mehr zuverlässig als positiv bestimmen.

Ergebnisse:

Tabelle 6. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs BD Veritor.

CT Wert Goldstandard	Bewertung	BD Veritor
16,96	positiv	positiv
18,04	positiv	positiv
18,29	positiv	positiv
18,76	positiv	positiv
19,56	positiv	positiv
19,58	positiv	positiv
20,08	positiv	positiv
22,34	positiv	positiv
22,66	positiv	positiv
22,80	positiv	positiv
23,98	positiv	positiv
24,18	positiv	negativ
24,71	positiv	positiv
25,19	positiv	positiv

25,83	positiv	positiv
26,16	positiv	positiv
26,44	positiv	positiv
26,54	positiv	negativ
26,71	positiv	positiv
28,15	positiv	positiv
28,72	positiv	negativ
29,58	positiv	negativ
29,64	positiv	negativ
30,27	positiv	negativ
30,64	positiv	positiv
31,51	positiv	negativ
32,29	positiv	negativ
32,63	positiv	negativ
33,05	positiv	negativ
33,38	positiv	negativ
34,02	positiv	negativ
34,15	positiv	negativ
34,25	positiv	negativ
35,37	positiv	negativ
36,22	positiv	negativ
36,28	positiv	negativ
37,02	positiv	negativ
37,51	positiv	negativ
37,94	positiv	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ

Tabelle 8. Betriebliche Eigenschaften BD Veritor vs Goldstandard PCR

	BD Veritor	Goldstandard PCR
Installationszeit	Keine	30 min
Probenvorbereitungszeit	4 min / Probe	160 min / Lauf
Hands on time	4 min / Probe	180 min / Lauf
Analysezeit im Cyler	15 min / Probe	56 min / Lauf
Test run time	3 sec / Probe	60 min / Lauf
Turnaround time	19 min / Probe	240-300 min / Lauf
Cool down time	Keine	Keine
Durchsatzkapazität	nur 1 Probe zur selben Zeit, aber mehrere können inkubiert werden, mehrere in kurzer Zeit	94 Proben pro Lauf
Medizinisches Labor erforderlich	Nein	Ja
High Throughput	Nein	Ja
Durchführbarkeit	Einfach	MTA erforderlich
Computer erforderlich	Nein	Ja
Zusätzliche Instrumente erforderlich	Nein	Gefrierschrank
Befund Quantitativ oder Qualitativ	Qualitativ	Quantitativ

CT Wert	Nein	Ja
Online Übertragung	Ja	Ja
CE Zertifiziert	Ja	Ja

Tabelle 9. Testeigenschaften des BD Veritor

	BD Veritor
Kategorische Übereinstimmung	65,52%
Klinische Sensitivität	48,72%
Klinische Spezifität	100%

3.1.3 Bosch Vivalytic

3.1.3.1 Betriebliche Testeigenschaften

Die betrieblichen Testeigenschaften des Bosch Vivalytic Tests gegenüber dem PCR-Goldstandard sind in Tabelle 12 aufgeführt. Im Gegensatz zum PCR-Goldstandard wurde für den Bosch Vivalytic Test keine spezielle Laborausstattung oder –ausstattung benötigt. Das Testdesign war einfach und schnell (Hands-on Time 2 Minuten / Probe beim Bosch Vivalytic gegenüber 180 Minuten / Lauf bei der PCR). In dem Sinne benötigte die Person, die den Test durchführte, auch keine spezielle Ausbildung für die molekularmedizinische Diagnostik. Da im Bosch Vivalytic Test jedoch nur eine Probe pro Analysegerät gemessen werden konnte, ist dieser Test nicht für den Hochdurchsatz an Proben ausgelegt.

3.1.3.2 Testeigenschaften des Bosch Vivalytic Tests

Es wurden 15 positive und 4 negative Proben getestet und mit dem PCR-Goldstandard verglichen. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Testungen gegenübergestellt. Es ergab sich eine kategorische Übereinstimmung von

84,2%. Die klinische Sensitivität des Bosch Vivalytic Tests lag bei 80%, die klinische Spezifität bei 100% (Tabelle 13). Für eine noch detaillierte Analyse der klinischen Sensitivität wurden die positiven Proben gemäß ihrem CT-Wert-Messergebnis in der PCR-Goldstandard-Untersuchung in drei Kategorien stratifiziert (hoch positiv, positiv, schwach positiv). Tabelle 11 zeigt die Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von den gemessenen CT-Werten. Bei stark positiven Proben betrug die Sensitivität 80%, bei positiven Proben 100%, und bei schwach positiven Proben 60%. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von der Proben-Viruslast hin. Im Gegensatz zum PCR-Goldstandard konnte der Bosch Vivalytic Test schwächer positive Proben nicht mehr zuverlässig als positiv bestimmen.

Ergebnisse:

Tabelle 10. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs Bosch Vivalytic

CT Wert Goldstandard	Bewertung	Bosch Vivalytic	Bewertung Bosch
18,34	positiv		invalid
19,36	positiv	31,3	positiv
19,98	positiv	31,6	positiv
22,26	positiv	31	positiv
24,56	positiv	30,5	positiv
25,78	positiv	30,6	positiv
26,58	positiv	30,8	positiv
27,93	positiv	30,7	positiv
30,02	positiv	30,8	positiv
31,61	positiv	30,9	positiv
32,5	positiv	36,7	positiv
33,29	positiv	31,1	positiv
34,67	positiv		negativ
36,34	positiv		negativ
37,89	positiv	37,1	positiv

	negativ		invalid*
	negativ		negativ
	negativ		negativ
	negativ		negativ
			*negativ nach WDH

Zwei Proben (eine positive und eine negative) wurden als "ungültige" Ergebnisse gemeldet. In beiden Fällen wurde keine SARS-CoV-2-RNA nachgewiesen. Aus diesem Grund wurden die für die endgültige Analyse als negative Ergebnisse behandelt.

Tabelle 11. Stratifizierte Klinische Sensitivität von Bosch Vivalytic in Abhängigkeit von der CT-Wert-Spanne

CT Bereich	Interpretation	Sensitivität
16,49 – 24,99	Hoch positive Probe	4 / 5 = 80%
25 – 31,99	Positive Probe	5 / 5 = 100%
> 32 ≤ 38	Schwach positive Probe	3 / 5 = 60%

Tabelle 12. Betriebliche Eigenschaften Bosch Vivalytic vs Goldstandard PCR

	Bosch Vivalytic	Goldstandard PCR
Installationszeit	30 min	30 min
Probenvorbereitungszeit	1 min / Probe	160 min / Lauf
Hands on time	2 min / Probe	180 min / Lauf
Analysezeit im Cycler	40 min 20 sec	56 min / Lauf

Test run time	40 min 20 sec	60 min / Lauf
Turnaround time	45 min	240-300 min / Lauf
Cool down time	3 min	Keine
Durchsatzkapazität	nur 1 Probe, zwischen den Proben 3 min Leerlauf	94 Proben pro Lauf
Medizinisches Labor erforderlich	Nein	Ja
High Throughput	Nein	Ja
Durchführbarkeit	Einfach	MTA erforderlich
Computer erforderlich	Nein	Ja
Zusätzliche Instrumente erforderlich	Nein	Gefrierschrank
Befund Quantitativ oder Qualitativ	Quantitativ	Quantitativ
CT Wert	Ja	Ja
Online Übertragung	Ja	Ja
CE Zertifiziert	Ja	Ja

Tabelle 13. Testeigenschaften des Bosch Vivalytic

	Bosch Vivalytic
Kategorische Übereinstimmung	84,2%
Klinische Sensitivität	80%
Klinische Spezifität	100%

3.1.4 Chronos Dx

3.1.4.1 Betriebliche Testeigenschaften

Die betrieblichen Testeigenschaften des Chronos Dx Tests gegenüber dem PCR-Goldstandard sind in Tabelle 17 aufgeführt. Im Gegensatz zum PCR-Goldstandard wurde für den Chronos Dx Test keine spezielle Laborausstattung oder –ausstattung benötigt. Das Testdesign war einfach und schnell (Hands-on Time 19 Minuten / Probe beim Chronos Dx mit BFAST Reagenzien gegenüber 180 Minuten / Lauf bei der PCR). In dem Sinne benötigte die Person, die den Test durchführte, auch keine spezielle Ausbildung für die molekularmedizinische Diagnostik. Da im Chronos Dx Test jedoch nur eine Probe pro Analysegerät gemessen werden konnte, ist dieser Test nicht für den Hochdurchsatz an Proben ausgelegt.

3.1.4.2 Testeigenschaften des Chronos Dx Tests

Es wurden zwei Experimente durchgeführt, A) mit eigenen Reagenzien und B) mit Reagenzien des Herstellers. Pro Experiment wurden 15 positive und 10 negative Proben getestet und mit dem PCR-Goldstandard verglichen. In den Tabellen 15 und 18 sind die Ergebnisse der Testungen gegenübergestellt. Bei der Testung mit eigenen Reagenzien ergab sich eine kategorische Übereinstimmung von 95,8% und bei der Testung mit Reagenzien des Herstellers 80%. Die klinische Sensitivität des Chronos Dx Tests lag bei Experiment A bei 100% und bei Experiment B nur bei 67%. Die klinische Spezifität lag bei Experiment A bei 88,9% und bei Experiment B bei 100%.

Die Inhibitionsrate betrug bei beiden Experimenten 0%, was bedeutet, dass keine PCR-Inhibition vorkam (Tabelle 18).

Für eine noch detaillierte Analyse der klinischen Sensitivität wurden die positiven Proben gemäß ihrem CT-Wert-Messergebnis in der PCR-Goldstandard-Untersuchung in drei Kategorien stratifiziert (hoch positiv, positiv, schwach positiv). Tabelle 16 zeigt die Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von den gemessenen CT-Werten. Beim Experiment A betrug die Sensitivität insgesamt, bei stark positiven, positiven und schwach positiven Proben 100%. Beim Experiment B betrug die Sensitivität insgesamt 67%, bei stark positiven Proben 100%, bei positiven Proben 80%, und bei schwach positiven Proben nur noch 20%. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von der Proben-Viruslast hin. Im Gegensatz zum PCR-Goldstandard konnte der Chronos Dx Test schwächer positive Proben nicht mehr zuverlässig als positiv bestimmen.

Ergebnisse:

Experiment A: Goldstandard vs. GSD NovaPrime Reagenzien auf ChronosDx (Tabelle 14)

Tabelle 14. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs Chronos DX mit GSD NovaPrime Reagenz

CT Goldstandard (Ampuwa)	Bewertung	CT Chronos mit NovaPrime Reagenz	Bewertung
17,15	positiv	15,98	positiv
21,20	positiv	20,67	positiv
20,76	positiv	19,65	positiv
22,65	positiv	21,46	positiv
24,43	positiv	22,58	positiv
20,30	positiv	20,55	positiv
28,79	positiv	27,46	positiv
28,59	positiv	27,01	positiv
30,51	positiv	26,99	positiv

22,77	positiv	29,84	positiv
27,36	positiv	30,24	positiv
28,08	positiv	30,24	positiv
28,03	positiv	30,00	positiv
30,50	positiv		negativ
29,96	positiv	30,17	positiv
33,41	positiv		negativ
32,87	positiv		negativ
35,36	positiv		negativ
35,15	positiv		negativ
35,52	positiv	30,45	v.a.Cov-2
	negativ		negativ
	negativ		negativ
	negativ		negativ
	negativ		negativ
	negativ		negativ
	negativ		negativ
	negativ		negativ
	negativ	30,28	positiv*
	negativ	28,33	positiv*
	negativ	30,64	positiv*
			*negativ nach WDH

Tabelle 16. Stratifizierte Klinische Sensitivität von Chronos Dx mit NovaPrime und Bfast Reagenzien in Abhängigkeit von der CT-Wert-Spanne

CT Bereich	Interpretation	Sensitivität Chronos mit NovaPrime Reagenzien	Sensitivität Chronos mit Bfast Reagenzien
16,49 – 24,99	Hoch positive Probe	5 / 5 = 100%	5 / 5 = 100%
25 – 31,99	Positive Probe	5 / 5 = 100%	4 / 5 = 80%
> 32 ≤ 38	Schwach positive Probe	5 / 5 = 100%	1 / 5 = 20%

Tabelle 17. Betriebliche Eigenschaften Chronos DX vs Goldstandard PCR

	Chronos DX	Goldstandard PCR
Installationszeit	10 min	30 min
Probenvorbereitungszeit	6 min / Probe	160 min / Lauf
Hands on time	5 min / Probe	180 min / Lauf
Analysezeit im Cycler	14 min / Probe	56 min / Lauf
Test run time	14 min / Probe	60 min / Lauf
Turnaround time	19 min / Probe	240-300 min / Lauf
Cool down time	7 min	Keine
Durchsatzkapazität	Nur 1 Probe zur selben Zeit, wenn nach 10 min neue Probe, dann 7 min Aufwärmphase	94 Proben pro Lauf

Medizinisches Labor erforderlich	Nein	Ja
High Throughput	Nein	Ja
Durchführbarkeit	Schwierig wegen kleiner Volumina und schwieriger Übertragung der Flüssigkeit in Chip	MTA erforderlich
Computer erforderlich	Ja, Ubuntu-basiertes Notebook	Ja
Zusätzliche Instrumente erforderlich	Nein	Gefrierschrank
Befund Quantitativ oder Qualitativ	Quantitativ	Quantitativ
CT Wert	Ja	Ja
Online Übertragung	Ja	Ja
CE Zertifiziert	Ja	Ja

Tabelle 18. Testeigenschaften des Chronos Dx mit NovaPrime und Bfast Reagenzien

	Chronos DX mit Novaprime	Chronos DX mit Bfast
Kategorische Übereinstimmung	95,8%	68%
Klinische Sensitivität	100%	67%
Klinische Spezifität	88,9%	70%
Hemmungsrate	0 %	0%

3.1.5 Fluxergy

3.1.5.1 Betriebliche Testeigenschaften

Die betrieblichen Testeigenschaften des Fluxergy Tests gegenüber dem PCR-Goldstandard sind in der Tabelle 21 aufgeführt. Der Fluxergy benötigte zusätzliche Computer und Geräte zum Betrieb, es war kein Plug & Play. Er benötigte einen -20°C Gefrierschrank für die Reaktionsmischung. Wenn diese Voraussetzungen erfüllt waren, konnte das System auch von einem Mitarbeiter mit geringen Laborkenntnissen verwendet werden. Die Installation war recht mühsam und erforderte IT-Unterstützung. Im Vergleich zu anderen POCT-Analysengeräten mit Touchscreens war dies kompliziert. Das Testdesign war einfach und schnell durchführbar (Hands-on Time 5 Minuten / Probe beim Fluxergy gegenüber 180 Minuten / Lauf bei der PCR). In dem Sinne benötigte die Person, die den Test durchführte, auch keine spezielle Ausbildung für die molekularmedizinische Diagnostik. Es wurden aber kleine Volumina pipettiert und das Herausnehmen der Kartusche aus dem Gerät war manchmal umständlich. Da im Fluxergy Test jedoch nur eine Probe pro Analysegerät gemessen werden konnte, ist dieser Test nicht für einen Hochdurchsatz an Proben ausgelegt.

3.1.5.2 Testeigenschaften des Fluxergy Tests

Es wurden 15 positive und 10 negative Proben getestet und mit dem PCR-Goldstandard verglichen. In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Testungen gegenübergestellt. Es ergab sich eine kategorische Übereinstimmung von 80%. Die klinische Sensitivität des Fluxergy Tests lag bei 67%, die klinische Spezifität bei 100%. Die Inhibitionsrate betrug 11,4%, was bedeutet, dass mehrere PCR-Inhibitionen vorkamen (Tabelle 22). Für eine noch detaillierte Analyse der klinischen Sensitivität wurden die positiven Proben gemäß ihrem CT-Wert-Messergebnis in der PCR-Goldstandard-Untersuchung in drei Kategorien stratifiziert (hoch positiv, positiv, schwach positiv). Tabelle 20 zeigt die Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von den gemessenen CT-Werten. Bei stark positiven Proben betrug die Sensitivität 100%, bei positiven Proben

60%, und bei schwach positiven Proben nur noch 40%. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von der Proben-Viruslast hin. Im Gegensatz zum PCR-Goldstandard konnte der Fluxergy Test schwächer positive Proben nicht mehr zuverlässig als positiv bestimmen.

Ergebnisse

Tabelle 19. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs Fluxergy

CT Wert Goldstandard	Bewertung	Fluxergy
16,01	positiv	positiv
17,77	positiv	positiv
19,61	positiv	positiv
23,31	positiv	positiv
24,18	positiv	positiv
25,13	positiv	positiv
27,24	positiv	positiv
27,97	positiv	positiv
29,94	positiv	negativ
31,25	positiv	failed (626)
32,3	positiv	positiv
34,76	positiv	positiv
36,69	positiv	negativ
37,06	positiv	negativ
37,54	positiv	negativ
	negativ	failed (626)
	negativ	negativ
	negativ	failed (626)
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ

	negativ	failed (626)
		*failed nach WDH negativ

Tabelle 20. Stratifizierte Klinische Sensitivität von Fluxergy in Abhängigkeit von der CT-Wert-Spanne

CT Bereich	Interpretation	Sensitivität
16,01 – 24,99	Hoch positive Probe	5 / 5 = 100%
25 – 31,99	Positive Probe	3 / 5 = 60%
> 32 ≤ 38	Schwach positive Probe	2 / 5 = 40%

Tabelle 21. Betriebliche Eigenschaften Fluxergy vs Goldstandard PCR

	Fluxergy	Goldstandard PCR
Installationszeit	Mühsam nur mit IT-Unterstützung	30 min
Probenvorbereitungszeit	9 min / Probe	160 min / Lauf
Hands on time	5 min / Probe	180 min / Lauf
Analysezeit im Cycler	70 min / Probe	56 min / Lauf
Test run time	58 min / Probe	60 min / Lauf
Turnaround time	80 min / Probe	240-300 min / Lauf
Cool down time	Keine	Keine
Durchsatzkapazität	Nur 1 Probe zur selben Zeit	94 Proben pro Lauf

Medizinisches Labor erforderlich	Nein	Ja
High Throughput	Nein	Ja
Durchführbarkeit	Umständlich, kleine Volumina pipettieren und die Kartusche war schwer zu entfernen	MTA erforderlich
Computer erforderlich	Ja	Ja
Zusätzliche Instrumente erforderlich	Router und Gefrierschrank	Gefrierschrank
Befund Quantitativ oder Qualitativ	Qualitativ	Quantitativ
CT Wert	Nein	Ja
Online Übertragung	Ja	Ja
CE Zertifiziert	Ja	Ja

Tabelle 22. Testeigenschaften des Fluxergy

	Fluxergy
Kategorische Übereinstimmung	80%
Klinische Sensitivität	67%
Klinische Spezifität	100%
Hemmungsrate	11,4%

3.1.6 Lumira Dx

3.1.6.1 Betriebliche Testeigenschaften

Die betrieblichen Testeigenschaften des Lumira Dx Tests gegenüber dem PCR-Goldstandard sind in der Tabelle 25 aufgeführt. Im Gegensatz zum PCR-Goldstandard wurde für den Lumira Dx Test keine spezielle Laborausrüstung oder –ausstattung benötigt. Das Testdesign war einfach und schnell (Hands-on Time 2,5 Minuten / Probe beim Lumira Dx gegenüber 180 Minuten / Lauf bei der PCR). In dem Sinne benötigte die Person, die den Test durchführte, auch keine spezielle Ausbildung für die molekularmedizinische Diagnostik. Da im Lumira Dx Test jedoch nur eine Probe pro Analysegerät gemessen werden konnte, ist dieser Test nicht für den Hochdurchsatz an Proben ausgelegt. Auffällig war, dass sechsmal ein Fehlercode ausgegeben wurde, der zu einem vollständigen Testabbruch und der Notwendigkeit eines Neustarts mit einem anderen Teststreifen führte. Dies trat bei 15% der Tests auf. Gründe dafür waren technische Fehler am Teststreifen sowie zu starke Vibrationen auf dem Tisch. Das System war also nicht sehr stabil und musste in einem ruhigen Bereich aufgestellt werden.

3.1.6.2 Testeigenschaften des Lumira Dx Tests

Es wurden 30 positive und 10 negative Proben getestet und mit dem PCR-Goldstandard verglichen. In Tabelle 26 sind die Ergebnisse der Testungen gegenübergestellt. Es ergab sich eine kategorische Übereinstimmung von 77,5%. Die klinische Sensitivität des Lumira Dx Tests lag bei 70%, die klinische Spezifität bei 100% (Tabelle 26). Für eine noch detaillierte Analyse der klinischen Sensitivität wurden die positiven Proben gemäß ihrem CT-Wert-Messergebnis in der PCR-Goldstandard-Untersuchung in drei Kategorien stratifiziert (hoch positiv, positiv, schwach positiv). Tabelle 24 zeigt die Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von den gemessenen CT-Werten. Bei stark positiven Proben betrug die Sensitivität 100%, bei positiven Proben 63,6%, und bei schwach positiven Proben 50%. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der klinischen Sensitivität von der Proben-Viruslast hin. Im Gegensatz zum PCR-Goldstandard konnte

der Lumira Dx Test schwächer positive Proben nicht mehr zuverlässig als positiv bestimmen.

Ergebnisse

Tabelle 23. CT Werte Vergleiche Goldstandard vs Lumira Dx

CT Wert Goldstandard	Bewertung	Lumira Dx
16,49	positiv	positiv
17,32	positiv	positiv
17,97	positiv	positiv
19,32	positiv	positiv
19,63	positiv	positiv
20,92	positiv	positiv
22,79	positiv	positiv
23,03	positiv	positiv
23,55	positiv	positiv
26,06	positiv	positiv
26,49	positiv	positiv
27,32	positiv	positiv
27,45	positiv	positiv
28,98	positiv	positiv
29,24	positiv	negativ
30,41	positiv	positiv
30,66	positiv	negativ
30,82	positiv	positiv
31,56	positiv	negativ
31,86	positiv	negativ
34,01	positiv	positiv
34,29	positiv	positiv

34,33	positiv	negativ
34,46	positiv	negativ
35,74	positiv	positiv
35,78	positiv	negativ
36,09	positiv	negativ
36,57	positiv	positiv
36,92	positiv	positiv
37,14	positiv	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ
	negativ	negativ

Tabelle 24. Stratifizierte Klinische Sensitivität von Lumira Dx in Abhängigkeit von der CT-Wert-Spanne

CT Bereich	Interpretation	Sensitivität
16,49 – 24,99	Hoch positive Probe	9 / 9 = 100%
25 – 31,99	Positive Probe	7 / 11 = 63.6%
> 32 ≤ 38	Schwach positive Probe	5 / 10 = 50 %

Tabelle 25. Betriebliche Eigenschaften Lumira Dx vs Goldstandard PCR

	Lumira Dx	Goldstandard PCR
Installationszeit	Einfach und schnell	30 min
Probenvorbereitungszeit	2,5 min / Probe	160 min / Lauf
Hands on time	2,5 min / Probe	180 min / Lauf
Analysezeit im Cycler	11 min 30 sec	56 min / Lauf
Test run time	11 min 30 sec	60 min / Lauf
Turnaround time	15 min / Probe	240-300 min / Lauf
Cool down time	Keine	Keine
Durchsatzkapazität	Nur 1 Probe, 4 in 1 h	94 Proben pro Lauf
Medizinisches Labor erforderlich	Nein	Ja
High Throughput	Nein	Ja
Durchführbarkeit	Einfach, aber empfindlich auf Vibrationen	MTA erforderlich
Computer erforderlich	Nein	Ja
Zusätzliche Instrumente erforderlich	Nein	Gefrierschrank
Befund Quantitativ oder Qualitativ	Qualitativ	Quantitativ
CT Wert	Nein	Ja
Online Übertragung	Ja	Ja
CE Zertifiziert	Ja	Ja

Tabelle 26. Testeigenschaften des Lumira Dx

	Lumira Dx
Kategorische Übereinstimmung	77,5%
Klinische Sensitivität	70%
Klinische Spezifität	100%

3.1.7 Gesamtvergleich der getesteten POCT Geräte

3.1.7.1 Vergleich der Betriebs- und Testeigenschaften

Ein Gesamtvergleich der Betriebseigenschaften aller getesteten Geräte findet sich in Tabelle 29. Der Bosch Vivalytic zeigte die geringste Probenvorbereitungs- und Hands-on Time (1 Minute/Probe bzw. 2 Minuten/Probe), während der Lumira Dx Test die geringste Turnaround Time (TAT) von 15 Minuten/ Probe aufwies. Die höchste TAT wies der Fluxergy Test mit 80 Minuten/Probe auf. Trotz unterschiedlicher Leichtigkeit bei der Installation der Testsysteme und trotz eines unterschiedlichen Schwierigkeitsgrads der Testdurchführung wurde für keinen Test eine umfassende Laborausstattung benötigt. In dem Sinne waren alle Tests echte POCTs. Kein Testsystem war jedoch für einen Hochdurchsatz von Proben geeignet. Zwei Testsysteme (Bosch Vivalytic und Chronos DX) boten quantitative Ergebnisse. Alle Testsysteme waren CE-IVD markiert.

Tabelle 27. Betriebseigenschaften der getesteten POCT Geräte

	Alveo be.well	BD Veritor	Bosch Vivalytic	Chronos DX	Fluxergy	Lumira Dx
Installationszeit	einfach	keine	einfach, aber 30 min	10 min	mühsam - IT Hilfe	einfach+ schnell
Probenvor- bereitungszeit	4 min / P	4 min / P	1 min / P	6 min / P	9 min / P	2,5 min / P
Hands on time	4 min / P	4 min / P	2 min / P	5 min / P	5 min / P	2,5 min / P
Analysezeit im Cycler	57 min / P	15 min / P	40 min 20 sec	14 min / P	70 min / P	11 min 30 sec

Test run time	57 min / P	19 min / P	42 min 20 sec	19 min / P	74 min / P	13 min 30 sec
Turnaround time(TAT)	60 min / P	19 min / P	45 min / P	19 min / P	80 min / P	15 min / P
Cool down time	kein	keine	3 min	7 min	keine	keine
Durchsatzkapazität	1 P zur selben Zeit	1 P zur selben Zeit, aber mehrere inkubieren	1 P, zwischen den Proben 3 min Leerlauf	1 P, wenn nach 10 min, 7 min Aufwärmphase	1 P zur selben Zeit	1 P zur selben Zeit, 4 in 1 h
Medizinisches Labor erforderlich	nein	nein	nein	nein	nein	nein
High Throughput	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Durchführbarkeit	einfach, aber empfindlich auf Vibrationen	einfach	einfach	schwierig, wegen kleiner Volumina & Übertragung auf dem Chip	Umständlich, kleine Volumina und schwer Kartusche rauszuholen	einfach, aber empfindlich auf Vibrationen & Testabbruch bei 15% der Proben
Computer erforderlich	nein	nein	nein	ja	ja	nein
Zusätzliche Instrumente erforderlich	Mobiltelefon	nein	nein	nein	Router & Gefrierschrank	nein
Befund Quantitativ oder Qualitativ	qualitativ	qualitativ	quantitativ	quantitativ	qualitativ	qualitativ
CT Wert	nein	nein	ja	ja	nein	nein
Online Übertragung	ja	ja	ja	ja	ja	ja
CE-IVD markiert	ja	ja	ja	ja	ja	ja

Anmerkung. P = Probe

Tabelle 27 stellt den Vergleich der Testeigenschaften dar. Die höchste kategoriale Übereinstimmung und klinische Sensitivität wies der Bosch Vivalytic

Test auf (84,2% bzw. 80%). Alle Testsysteme, außer Chronos DX, hatten eine klinische Spezifität von 100%. Die höchste Sensitivität bei schwach positiven klinischen Proben wies ebenfalls das Bosch Vivalytic System auf (60%).

Tabelle 28. Ergebnisse Alveo be.well vs BD Veritor vs Bosch Vivalytic vs Chronos DX vs Fluxergy vs Lumira Dx

	Alveo be.well	BD Veritor	Bosch Vivalytic	Chronos DX Bfast	Fluxergy	Lumira Dx
Kategorische Übereinstimmung	84%	65,52%	84,2%	68%	80%	77,5%
Klinische Sensitivität	73,3%	48,72 %	80%	67%	67%	70%
Klinische Spezifität	100%	100%	100%	70%	100%	100%
Richtigkeit	-	-	0,26%	-	-	-
Sensitivität (CT ≥ 32)	25%	0%	60%	20%	40%	50%

3.1.7.2 Erstellung eines Vergleichs-Scores zur qualitativen Bewertung der getesteten POCT-Geräte

Um die unterschiedlichen POCT-Geräte in ihren verschiedenen Eigenschaften besser vergleichen zu können, wurde ein Score-System entwickelt. Dieses umfasst zwei Unterkategorien: die Praktikabilität und den diagnostischen Nutzen. Bei der Praktikabilität wurden die praktische Durchführbarkeit, die Schnelligkeit und weitere Betriebseigenschaften berücksichtigt. Die praktische Durchführbarkeit wurde anhand der initialen Installationszeit, der Probenvorbereitungszeit und der (Hands on Time) bewertet. Die Schnelligkeit

wurde anhand der Laufzeit auf dem POCT-Gerät, der Durchlaufzeit (turnaround-time) und der Durchsatzkapazität bewertet. Bei den weiteren Betriebseigenschaften wurde beurteilt, ob es sich um ein Gerät mit hohem Durchsatz handelte und, ob ein medizinisches Labor (Kapazität oder Personal), ein Computer oder andere Geräte erforderlich waren. Der diagnostische Nutzen wurde basierend auf den Testeigenschaften und auf dem Befundtyp bewertet. Bei den Testeigenschaften wurden die Ergebnisse der kategorischen Übereinstimmung, der klinischen Sensitivität, der Sensitivität gegenüber schwach positiven Proben und der klinischen Spezifität herangezogen. Beim Befundtyp wurde geprüft, ob die Ergebnisse quantitativ oder nur qualitativ waren und ob die Ergebnisse online verschlüsselt übermittelt werden konnten. Die Bewertung basierte auf der Summe an Punkten für die unterschiedlichen Bewertungskriterien (Tabelle 29). Je höher die Summe für ein POCT-Gerät ist, je besser wurde der praktische Nutzen gewertet (Tabelle 30).

Tabelle 29. Score „Nutzen der POCT-Geräte in der Praxis“

		Punkte
Durchführbarkeit	Installationszeit ≤ 5 min	<input type="checkbox"/> 1
	Probenvorbereitungszeit ≤ 5 min	<input type="checkbox"/> 1
	Hands on time ≤ 5 min	<input type="checkbox"/> 1
Schnelligkeit	Analysezeit im Cycler ≤ 45 min	<input type="checkbox"/> 1
	Turnaroundzeit ≤ 50 min	<input type="checkbox"/> 1
	Durchsatzkapazität > 2 Proben	<input type="checkbox"/> 1
Betriebseigenschaften	High Throughput	<input type="checkbox"/> 1

	Medizinisches Labor / geschultes Personal nicht erforderlich	<input type="checkbox"/> 1
	Computer nicht erforderlich	<input type="checkbox"/> 1
	Instrumente nicht erforderlich	<input type="checkbox"/> 1
Testeigenschaften	Kategorische Übereinstimmung $\geq 80\%$	<input type="checkbox"/> 1
	Klinische Sensitivität gesamt $\geq 70\%$	<input type="checkbox"/> 1
	Klinische Sensitivität bei niedrig positiven $\geq 50\%$	<input type="checkbox"/> 1
	Klinische Spezifität gesamt 100%	<input type="checkbox"/> 1
Befundtyp	Quantitativ mit CT Wert	<input type="checkbox"/> 1
	Online Übertragung	<input type="checkbox"/> 1

Tabelle 30. Bewertung des Scores anhand der gesammelten Punkte

	Schlecht	Mäßig	Gut
Praktikabilität	0 - 3	4 - 7	8 - 10
Medizinischer Nutzen	0 - 2	3 - 4	5 - 6
Gesamt	0 - 4	5 - 10	11 - 16

Tabelle 31. Scores der getesteten POCT-Geräte

	Alveo be.well	BD Veritor	Bosch Vivalytic	Chronos DX	Fluxergy	Lumira Dx
Praktikabilität	6	8	7	6	2	8
Diagnostischer Nutzen	4	2	6	2	3	4
Gesamt Score	10	10	13	8	5	12

Die detaillierten Score-Bewertungen für alle getesteten POCT-Geräte sind im Anhang dargestellt (Tabelle 31 - Tabelle 36). In Tabelle 37 sind die Score-Punktzahlen der getesteten POCT-Geräte zusammengefasst aufgeführt. In der Unterkategorie „Praktikabilität“ erreichten der BD Veritor und der Lumira Dx die höchste Punktzahl (je 8 Punkte). Bei der Unterkategorie „Diagnostischer Nutzen“ wurde die höchste Punktzahl vom Bosch Vivalytic System erreicht. In dieser Kategorie war es das einzige Gerät, was überzeugte. Mit 13 bzw. 12 Punkten schnitten das Bosch Vivalytic System und der Lumira Dx in der Gesamtwertung am besten ab, während Fluxergy am schlechtesten abschnitt.

4. Diskussion

4.1 Vergleich der Testergebnisse mit dem Stand der wissenschaftlichen Literatur

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden sechs POCT-Geräte zum Nachweis von SARS-CoV-2 mit einer konventionellen qRT-PCR als Goldstandard verglichen. Die Geräte wiesen im Vergleich zum Goldstandard eine klinische Sensitivität von 48.7% bis 80% auf. Die klinische Spezifität betrug in fünf von sechs Fällen 100%. Alle Testsysteme hatten eine Schwäche in der Detektion schwach positiver Proben, mit einer Sensitivität von maximal 60% im Falle des Bosch Vivalytic Systems. Ein Score-Bewertungssystem, welches durch die Zusammenfassung verschiedener Betriebs- und Testeigenschaften die Gesamtqualität der Testsysteme widerspiegelt, vergab die höchste Punktzahl dem Bosch Vivalytic POCT und die niedrigste Punktzahl dem Fluxergy Test. Im Folgenden werden zunächst die Testeigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten POCT-Geräte mit dem Stand aus der wissenschaftlichen Literatur verglichen.

In einer Studie aus den Niederlanden wurde die Sensitivität und Spezifität des BD Veritor Systems für den Schnelldiagnose von SARS-CoV-2-Antigen im Vergleich zur qRT-PCR an kombinierten Nasen-/Rachenabstrichen von symptomatischen Personen in COVID-19-Testzentren des Städtischen Gesundheitsdienstes (MHS) gezeigt (Van der Moeren et al. 2021). Die Ergebnisse zeigten für 352 Patienten eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 94,1%. Für Proben mit einem CT-Wert unter 30 (n=123) betrug die Sensitivität 93% (Van der Moeren et al. 2021). Im Vergleich zu der hier vorgestellten wissenschaftlichen Arbeit zeigte sich also eine deutlich höhere Sensitivität. Ein Grund dafür könnte die relativ hohe Anzahl an Proben mit CT-Werten unter 30 sein, die in der Studie aus der Niederlande genutzt wurden.

Kuo et al. verglichen die klinische Leistung von zwei Antigen-Schnellteste, dem BD Veritor System und der Abbott BinaxNOW COVID-19 Antigen-Karte und einem Nukleinsäureamplifikationsverfahren (Hologic Aptima SARS CoV-2 Assay). Es wurden 250 positive Proben und 50 negative Proben getestet.

Bei den beiden Antigen-Schnelltestes lag die Sensitivität mit 45,2% für den BD Veritor und 47,0% für BinaxNOW im Vergleich zu Hologic Aptima 95,6 % deutlich geringer. Falsch negative Ergebnisse traten vor allen dann auf, wenn die zuvor ermittelten CT-Werte ≥ 20 für Veritor und ≥ 25 für Binax betrug. Die Spezifität betrug 100% für alle Assay-Vergleiche. Die Autoren schlussfolgerten, dass Antigen-basierte Assays nicht ausreichen, um eine SARS-CoV-2-Infektion zu diagnostizieren, wenn geringere nur Virusmengen freigesetzt werden (Kuo et al. 2021). Diese Aussage unterstützt die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse hinsichtlich des BD Veritor Systems. In einer anderen Studie aus den Niederlanden wurden Studienteilnehmer entweder mit dem BD-Veritor-System „Becton Dickinson“, dem PanBio (Abbott) oder dem SD-Biosensor (Roche Diagnostics) getestet. Die Sensitivität betrug 69% für den BD-Veritor Test, 69% für den PanBio Test und 74% für den SD-Biosensor Test. Bei erhöhter Viruslast ($\geq 5,2 \log_{10}$ SARS-CoV-2 E-Genkopien/ml) lag die Sensitivität von BD Veritor bei 86%, bei 89% für den PanBio und bei 88% für den SD-Biosensor. Die Sensitivität der drei SARS-CoV-2-Ag-RDTs betrug 69%-74% und stieg oberhalb einer bestimmten Viruslast ($\geq 5,2 \log_{10}$ SARS-CoV-2 E-Genkopien/ml) auf über 86 % an (Venekamp et al. 2022). Im Vergleich zu den Ergebnissen dieser wissenschaftlichen Arbeit, wo die Gesamtsensitivität des BD Veritor Testes 48,72% betrug, haben Venekamp et al. eine insgesamt höhere Sensitivität des BD Veritor Systems nachgewiesen, die bei 69% lag.

Bei einer weiteren großen Studie in New York wurde an ca. 2 Millionen Proben die Leistung des BD Veritor Systems bewertet (Parikh et al. 2022). Als Goldstandard wurde (eine RT-PCR) verwendet. Die Antigentests wurden vor Ort durchgeführt, während die RT-PCR-Tests in verschiedenen Labore durchgeführt wurden. Weil der spezifische Assay je nach Labor variierte, reichte die Spezifität von 97,9% bis 99,9% und die Sensitivität von 77,2% bis 85,6%. Während die Angaben zur ermittelten Spezifität wiederum den hier vorgestellten Ergebnissen entsprachen, wurden wiederholt recht hohe Werte für die Spezifität des BD Veritor Tests ermittelt. Ein möglicher Grund könnte die Testung von nur symptomatischen Patienten sein, da symptomatische Personen in der Regel eine höhere Viruslast aufweisen (Parikh et al. 2022).

Koga et al. haben das BD Veritor-System mit einer (RT-PCR) unter Verwendung von Proben von symptomatischen Patienten verglichen. Die Proben wurden zuerst mit dem Xpert Xpress SARS-CoV-2 (GeneXpert)-Kit (RT-PCR-Methode) getestet, um SARS-CoV-2 zu identifizieren. Dieselben Proben wurden dann mit dem Veritor-Schnelltest getestet. Die ermittelten Sensitivitäten nach CT Wert waren bei CTs < 25 100%, bei CTs < 27 98,8%, bei CTs < 30 89,6%. Die Sensitivität über alle CT-Werte hinweg lag bei 82,7% (Koga et al. 2022). Dass auch hier vor allem Proben mit einem CT-Wert < 30 eingesetzt worden sind, erklärt möglicherweise die Abweichung zu den hier vorgestellten Ergebnissen.

Eine Studie untersuchte die Leistungsparameter des Bosch Vivalytic Systems (Heger et al. 2022). Es handelt sich um eine prospektive Kohortenstudie mit zwischen Januar und Mai 2021 hospitalisierten Patienten. Nasen-Rachen-Abstriche von Patienten wurden zunächst mit dem Allplex™2019-nCoV (Seegene Inc.) Real-Time (RT) PCR-Assay als Goldstandard getestet und dann mit dem Bosch Vivalytic verglichen. Das Bosch Vivalytic System hatte eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 96%. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den hier vorgestellten Ergebnissen und bestätigen, dass das Bosch Vivalytic System eine gute POCT-Alternative zu konventionellen PCR-Testsystemen ist.

Eine Studie aus Italien untersuchte weiterhin die Testeigenschaften des Bosch Vivalytic Systems an bronchoalveolären Lavagen und Bronchialaspiraten im Vergleich zu einer RT-PCR (Allplex, Seegene, Korea). Basierend auf den RT-PCR-Ergebnissen wurden die Proben als negativ, positiv bei hoher Viruslast (CT ≤ 30) und positiv bei niedriger Viruslast (CT 31-35) klassifiziert. Die Gesamtsensitivität für das Bosch Vivalytic System lag bei 96% und die Spezifität bei 100% (De Pace et al. 2021). Die Sensitivität betrug 100% für Proben mit hoher Viruslast (CT ≤ 30). Den Autoren zufolge kann das Bosch Vivalytic System nach Probenverflüssigung effektiv in Proben der unteren Atemwege eingesetzt werden. Während die Spezifität mit den Ergebnissen der hier vorgestellten Arbeit übereinstimmt, wurde bei De Pace et al. eine höhere Sensitivität bestimmt, obgleich auch in dieser Studie Proben mit CT-Werten von 31-35 zum Einsatz

kamen. Eine Erklärung könnten die im Vergleich zu dieser Arbeit unterschiedlichen Probenmaterialien und eine unterschiedliche Probenvorbereitung sein.

Zum LumiraDx Testsystem existiert eine Metaanalyse zu den diagnostischen Leistungskriterien dieses SARS-CoV-2 Antigentestes im Vergleich zu einer molekularen Referenzdiagnostik (Lippi et al. 2022). Die gepoolte diagnostische Sensitivität betrug 86% und die gepoolte Spezifität 99%. Im Vergleich zu den Daten dieser Arbeit, ist die Spezifität vergleichbar (99% vs 100%), jedoch liegt die Sensitivität etwas höher (86% vs 70%). Da keine Angaben zu CT-Wert-Spannen in den untersuchten Studien existieren, ist ein direkter Vergleich mit den hier vorgestellten Daten schwierig. Es bleibt aber zu vermuten, dass auch in diesem Fall vor allem Proben mit einer höheren Viruslast eingesetzt worden sind, als dies in der hier vorgestellten wissenschaftlichen Arbeit der Fall war.

Eine weitere Studie aus den USA untersuchte die Testeigenschaften des LumiraDx SARS-CoV-2 Ag-Tests an 800 Patientenproben (770 negativ, 30 positiv, alles respiratorische Abstriche), wobei auch hier eine RT-PCR als Referenzmethode zum Einsatz kam (Gresh et al. 2021). Zyklusschwellenwerte (CT) waren für 17 von 30 positiven Proben verfügbar, mit einem mittleren CT-Wert von 31,2. 11 von 17 Proben (64,7%) hatten CT-Werte > 30,0. Trotz einiger Proben mit hohen CT-Werten ergab sich eine Sensitivität von 96,2%, die deutlich über der Sensitivität von 70% in der hier vorliegenden Studie liegt. Im Gegensatz zu Gresh et al. fanden Eli et al. nur eine Sensitivität von 34,2% für den Lumira Dx Test und eine Spezifität von 92,3 % (Elli et al. 2022). In einer weiteren Arbeit, die verschiedene Ag-RDTs untersuchte, schnitt der Lumira Dx mit einer Sensitivität von 88,2% am besten ab (Brümmer et al. 2021). Auch in dieser Studie waren bei allen Ag-RDTs, die Sensitivitäten in Proben mit niedrigeren CT-Werten signifikant besser (CT < 20 96,5%, CT < 25 95,8%, CT ≥ 25 50,7%, CT ≥ 30 20,9%). Auch eine italienische Studie kam zu ähnlichen Ergebnissen (Cattelan et al. 2022). Im Vergleich zur RT-PCR, zeigte Lumira Dx eine Sensitivität von 76,3% und eine Spezifität von 94,4%. Die Sensitivität stieg auf 95%, wenn der CT-Wert der Proben < 25 war. Eine multivariante

Regressionsanalyse zeigte, dass falsch-negative LumiraDx-Ergebnisse signifikant mit höheren CT-Werten assoziiert waren. Weitere Untersuchungen zeigten für den Lumira Dx eine Sensitivität von 97,6% und eine Spezifität von 96,6% für Nasenabstriche und eine Sensitivität von 97,5% und eine Spezifität von 97,7% für Nasen-Rachenabstriche (Drain, P.K. et al. 2021), während Cento et al. für den Lumira Dx eine Spezifität von 97% und eine Sensitivität von 85% für Proben mit einem CT-Wert von ≤ 29 zeigten (Cento et al. 2021). Diese hier dargestellte Übersicht zu den Studienergebnissen des Lumira Dx verdeutlicht eine große Divergenz hinsichtlich der nachgewiesenen Testeigenschaften und weist darauf hin, dass bei diesem Antigen-Test in einigen Studienpopulationen möglicherweise mit schlechten Leistungskriterien gerechnet werden muss, insbesondere bei schwach positiven Proben. Dies ist wiederum kongruent zu den Ergebnissen der hier dargestellten Studie.

4.2 Studienlimitationen

Für diese wissenschaftliche Arbeit existierten drei generelle Limitationen. Zum einen waren positive Proben vor der Testung auf den POCT-Geräten bei -80°C gelagert. Dieser Lagerungs- und Aufbauprozess könnte Einfluss auf die in den Proben vorhandene Viruslast gehabt haben, sodass die zuvor im qRT-PCR Verfahren gemessenen CT-Werte nicht mehr den aktuellen Zustand der Proben widerspiegelten. Ferner waren die Abstriche vorbehandelt und in sterilem Wasser verdünnt. Auch dies könnte Einfluss auf die Viruslast der Proben gehabt haben und könnte zu deutlich niedrigeren Viruslasten geführt haben, die während der Messungen in den POCT-Geräten vorlagen. Dies könnte partiell auch die niedrigeren gemessenen Sensitivitäten im Vergleich zur Literatur erklären. Zuletzt waren auch die Goldstandardmessungen per qRT-PCR nur semiquantitative Messungen (CT-Werte). Eine Messung der SARS-CoV-2 Kopienzahlen lag nicht vor, sodass auch an dieser Stelle quantitative Ungenauigkeiten existieren könnten. Außerdem lagen noch spezifische Limitationen bei den POCT-Gerätemessungen vor. So wurden für das Alveo be.well System keine vom Hersteller empfohlenen Abstrichtupfer verwendet. Im Falle des BD Veritor Systems und des Lumira Dx Systems wurden statt die für das Testsystem validierten Nasenabstriche die in der

Routinediagnostik anfallenden (naso-)pharyngealen Abstriche verwendet. Für das Fluxergy System wurde steriles Wasser anstelle der validierten UTM's und VTMs verwendet, und 0,5 ml statt 3 ml Volumen zum Auflösen der Abstriche verwendet. Zuletzt sei erwähnt, dass der in dieser Arbeit erstellte Bewertungsscore, der eine Einordnung hinsichtlich der praktikablen Nutzung der POCT-Geräte erleichtern soll, zwar eine detaillierte Aufzählung der Stärken und Schwächen eines Testes ermöglicht, jedoch bei der Gesamtbewertung vorsichtig interpretiert werden sollte, da jedes medizinische Labor oder jedes Testzentrum, wo auf SARS-CoV-2 getestet wird, unterschiedliche Voraussetzungen inne hat, sodass auch der Test mit der höchsten Gesamtbewertung nicht zwangsweise die beste Wahl für jede Teststelle ist.

4.3 Finale Schlussfolgerungen zum Nutzen der untersuchten POCT – Geräte

Das Alveo be.well System war ein einfach durchzuführender POCT mit einfacher Installation und sehr hoher Praktikabilität (Score 6 Punkte), jedoch mit einer relativ hohen TAT von 60 Minuten. Der diagnostische Nutzen war mit einer Punktzahl von 4 Punkten den anderen POCTs nicht überlegen.

Das BD Veritor TM System war ein sehr praktikabel durchführbarer POCT (8 Punkte). Positiv, waren hier insbesondere LIMS-Anbindungsfunktionen und einer standardisierten Ergebnisinterpretation. Allerdings waren die Testeigenschaften und der damit verbundene diagnostische Nutzen eher gering (2 Punkte). Obgleich für Teststellen sehr praktikabel, sind die Schwächen insbesondere bei schwach positiven Proben signifikant. Auch bei der recht hohen Gesamtbewertung von 10 Punkte sollte man dies beachten.

Das Bosch Vivalytic Testsystem erreichte als einziger POCT eine Gesamtbewertung von 13 Punkten. Es erreichte die höchste in dieser Arbeit gemessene Sensitivität von 80% und würde womöglich bei frischen und unbehandelten Proben die Sensitivität der Hersteller Validierungsstudie (98 %) erreichen. Das System hatte etwas längere Laufzeiten im Vergleich zu den anderen POCT-Geräten. Sofern Schnelligkeit nicht das primäre Auswahlkriterium ist, wäre dieses Testsystem allen anderen vorzuziehen.

Bei dem ChronosDx-Gerät handelte es sich um einen POCT mit einigen Nachteilen in Bezug auf die Praktikabilität (6 Punkte). Bei der RNA-Extraktion und der Verwendung der GSD NovaPrime-Reagenzien war die Sensitivität sehr gut. In diesem Fall war die TAT jedoch nur 10 Minuten kürzer als beim Hochdurchsatz-Goldstandard. Außerdem war die Spezifität nicht 100%, eine negative Probe wurde falsch als positiv deklariert und nur nach der Wiederholung richtig als negativ bewertet.

Bei Verwendung der BFAST-Reagenzien war die Sensitivität mit 67% für einen qPCR-POCT zu niedrig, was wahrscheinlich auf die extraktionsfreie Methodik zurückzuführen ist. Die TAT, die mit 19 Minuten im Bereich von Antigentests lag, zeigte jedoch das Potenzial des Systems. Außerdem schien es auch hier zu falsch-positiven Ergebnissen zu kommen, 3 negative Proben wurden bei der ersten Testung als positiv deklariert und nur nach der Wiederholung richtig als negativ bewertet. Da dieses qPCR-System jedoch ähnliche Testeigenschaften wie Antigenteste hat, ergibt sich kein Vorteil bei höheren Testkosten.

Ein interessanter Ansatz wäre die Verwendung einer schnellen Hitzeextraktion und der NovaPrime-Reagenzien auf dem ChronosDX. Dadurch könnte die TAT signifikant gesenkt werden, während auf der anderen Seite potenziell bessere Testeigenschaften erzielt werden könnten.

Das Fluxergy-System war ein einfach durchzuführender POCT mit einer umständlichen Installation und einigen Nachteilen in Bezug auf die Praxistauglichkeit, weswegen hier nur 2 Punkte vergeben wurden. Die Leistungsmerkmale waren ebenfalls für einen qPCR-POCT enttäuschend (diagnostischer Nutzen 3 Punkte). Im Vergleich zu allen anderen POCT-Instrumenten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, war es generell unterlegen (Gesamt-Score 5 Punkte).

Der Lumina Dx war ein einfach und schnell durchzuführender POCT (Praktikabilität 8 Punkte) mit Sensitivitäts-Leistungsmerkmalen, die im Vergleich zu üblichen POCT-Streifentests deutlich höher waren (diagnostischer Nutzen 4 Punkte). Allerdings wurden 15% der Proben abgebrochen wegen technischer Fehler am Teststreifen sowie zu starke Vibrationen auf dem Tisch. Das System

war also nicht sehr stabil, musste in einem ruhigen Bereich aufgestellt werden, was seinen Einsatz als POCT einschränkt.

Generell war keines der Testsysteme für einen hohen Probendurchsatz ausgelegt. Der Nutzen in größeren medizinischen Laboratorien ist daher sehr begrenzt. Empfehlenswert ist der Einsatz solcher Testsysteme als POCT in Notaufnahmen oder in Teststellen, die bisweilen schnelle PCR-basierte Messungen durchführen und über keine erweiterte Laborausstattung verfügen. Final lassen sich vor allem zwei wichtige Schlussfolgerungen aus dieser wissenschaftlichen Untersuchung ziehen. Zum einen hätten die meisten der hier getesteten Geräte in der Praxis die WHO Kriterien mit den Mindestanforderungen für Antigen- und POC-Teste nicht erfüllt. Diese entsprechen eine Sensitivität von $\geq 80\%$ und eine Spezifität von $\geq 97\%$ (World Health Organization 2021).

Das Kriterium der Spezifität, hätten zwar fast alle Geräte erfüllt, den Anspruch an die Sensitivität jedoch nicht. Einzig das Bosch Vivalytic hat die Mindestanforderungen erfüllt.

Zum anderen war eine wichtige Erkenntnis, dass die Sensitivität der Geräte bei niedrig positiven Proben mit CT-Werten ≥ 32 stark abfiel. Nach dieser Stratifizierung schnitt kein Gerät gegenüber dem qRT-PCR Goldstandard gut ab, wobei das Bosch Vivalytic mit 60% und der Lumira Dx mit 50% Sensitivität am besten waren. Bemerkenswert war die 0% Sensitivität beim BD Veritor bei diesen schwach positiven Proben.

Insgesamt wäre das Bosch Vivalytic System aufgrund der hohen Praktikabilität mit dem hohen diagnostischen Nutzen das Gerät der Wahl, wobei auch das Lumira Dx System aufgrund der sogar gegenüber dem Bosch System höheren Praktikabilität ebenso eine gute Alternative wäre. Hinsichtlich der diagnostischen Leistungsfähigkeit erreichte kein POCT-Gerät den Standard des qRT-PCR Goldstandards, sodass bei einem hohen Anspruch an diagnostische Kriterien und dem Vorhandensein einer entsprechenden Laborausstattung diesen molekularbiologischen Verfahren weiterhin der Vorzug gegeben werden sollte.

5. Zusammenfassung

Die PCR-basierte Diagnostik zum Nachweis von SARS-CoV-2 war von signifikanter Bedeutung bei der weltweiten Reaktion auf die COVID-19-Pandemie. Die hohen Anforderungen an Laborausstattung und an die Ausbildung des Laborpersonals begrenzen jedoch den Einsatz dieser molekularen Standard-Diagnostik. Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war ein Vergleich der PCR-basierten Standarddiagnostik (qRT-PCR) mit Point-of-Care-Test (POCT) Geräten.

Es wurden folgende POCT-Instrumente untersucht: Alveo be.well, BD Veritor TM Plus, Bosch Vivalytic, Chronos DX, Fluxergy und Lumira Dx. Der Mangel an unabhängigen wissenschaftlichen Daten zu diesen Testsystemen und ferner an Studien, die auch schwach-positive Proben einschließen, verhindert bislang eine vollständige Bewertung der realen diagnostischen Leistungsfähigkeit. Diese wissenschaftliche Arbeit hatte daher zum Ziel, auch Daten von schwach-positiven Proben auszuwerten, sodass reale Leistungscharakteristika in einer unabhängigen Studie beschrieben werden können.

Neben den diagnostischen Testeigenschaften wurde zudem geprüft, ob eine POCT-Diagnostik schneller und praktikabler als qRT-PCR Goldstandard ist und das Potenzial hat, diese Referenzmethodik in der Routinediagnostik zu ersetzen.

SARS-CoV-2-positive- naso- und oropharyngeale Abstriche wurden zum Zweck dieser Studie aus der Biobank des Eurofins MVZ Labor Gelsenkirchen entnommen. SARS-CoV-2-negative Abstriche wurden frisch aus der Routinediagnostik entnommen. Es wurden mindestens 15 positive Proben und mindestens 10 negative Proben pro POCT-Gerät getestet und ausgewertet. Als Goldstandard galt die in der Routinediagnostik genutzte qRT-PCR unter Nutzung des NovaPrime-Workflows.

Im Vergleich zum Goldstandard betrug die klinische Sensitivität bei BD Veritor 48,7%, bei Chronos DX und Fluxergy 67%, bei Lumira Dx 70%, bei Alveo be.well 73,3% und bei Bosch Vivalytic 80%. Die Sensitivität war stark abhängig vom CT-Wert einer Probe. Bei Proben mit geringer Viruslast ($CT \geq 32$) sanken die

Sensitivitäten stratifiziert stark ab, wobei das Bosch Vivalytic System mit 60% und der Lumira Dx mit 50% Sensitivität am besten abschnitten. Die klinische Spezifität aller Testsysteme, außer die vom Chronos DX, lag bei 100%. Die Turnaround Zeiten waren bei Lumira Dx 15 min, bei Chronos DX und BD Veritor 19 min, bei Bosch Vivalytic 45 min, bei Alveo be.well 60 min und bei Fluxergy 80 min pro Probe.

Um den Nutzen der einzelnen Geräte für den Nachweis von SARS-CoV-2 noch besser bewerten zu können, wurde ein Bewertungsscore entworfen. Dieser fasste zwei Unterkategorien zusammen: die Praktikabilität des Testes und den diagnostischen Nutzen. Jedes POCT-Gerät wurde zwischen 0 und 16 Punkten bewertet, mit einem insgesamt höheren Nutzen bei höherer Punktzahl. Das Fluxergy System schnitt mit 5 Punkten am schlechtesten ab. Die höchste Punktzahl erreichte das Bosch Vivalytic System mit 13 Punkten und das Lumira Dx System mit 12 Punkten. Jedoch erfüllte nur das Bosch Vivalytic System die Mindestanforderungen der WHO an Antigen- und POC-Teste hinsichtlich Sensitivität und Spezifität.

In Bezug auf die diagnostische Leistungsfähigkeit und der Abfertigung hoher Probenvolumina kann keines der getesteten POCT-Geräte die qRT-PCR Standarddiagnostik in medizinischen Laboratorien ersetzen. In Teststellen wie Notaufnahmen und Flughäfen, wo schneller und einfach durchzuführende PCR - oder Antigen-basierte Testverfahren ohne erweiterte Laborausstattung durchgeführt werden müssen, sind die POCT-Systeme, insbesondere das Bosch Vivalytic, geeignete alternative diagnostische Verfahren.

6. Literaturangaben

Abani, O. et al. (2021): Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet*. 2021 May 1;397(10285):1637-1645. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00676-0. PMID: 33933206; PMCID: PMC8084355.

Ader, F., Bouscambert-Duchamp, M., Hites, M., Peiffer-Smadja, N., Poissy, J., Belhadi, D., Diallo, A., Lê, M.P., Peytavin, G., Staub, T., Greil, R., Guedj, J., Paiva, J.A., Costagliola, D., Yazdanpanah, Y., Burdet, C., Mentré, F.; DisCoVeRy Study Group. (2022): Remdesivir plus standard of care versus standard of care alone for the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19 (DisCoVeRy): a phase 3, randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect Dis*. 2022 Feb;22(2):209-221. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00485-0. Epub 2021 Sep 14. PMID: 34534511; PMCID: PMC8439621.

Bao, L. et al. (2020): The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature* 583, 830–833.

Bordi, L. et al. (2020): Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel coronavirus (SARS-CoV-2), Italy, February 2020. *Euro Surveill*. 25, 2000170.

Brümmer, LE., Katzenschlager, S., Gaeddert, M., Erdmann, C., Schmitz, S., Bota, M., Grilli, M., Larmann, J., Weigand, M.A., Pollock, N.R., Macé, A., Carmona, S., Ongarello, S., Sacks, J.A., Denking, C.M. (2021): Accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2021 Aug 12;18(8):e1003735. doi: 10.1371/journal.pmed.1003735. Erratum in: *PLoS Med*. 2021 Oct 13;18(10):e1003825. PMID: 34383750; PMCID: PMC8389849.

Cattelan, A.M., Sasset, L., Zabeo, F., Ferrari, A., Rossi, L., Mazzitelli, M., Cocchio, S., Baldo, V. (2022): Rapid Antigen Test LumiraDx™ vs. Real Time Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection: A Retrospective Cohort Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Mar 23;19(7):3826. doi: 10.3390/ijerph19073826. PMID: 35409513; PMCID: PMC8997977.

Cento, V., Renica, S., Matarazzo, E., Antonello, M., Colagrossi, L., Di Ruscio, F., Pani, A., Fanti, D., Vismara, C., Puoti, M., Scaglione, F., Perno, C.F., Alteri, C., (2021): On Behalf Of The S Co Va Study Group. Frontline Screening for SARS-CoV-2 Infection at Emergency Department Admission by Third Generation Rapid Antigen Test: Can We Spare RT-qPCR? *Viruses*. 2021 May 1;13(5):818. doi: 10.3390/v13050818. PMID: 34062916; PMCID: PMC8147338.

- Chan, J. F. et al. (2020): A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 395, 514–523.
- Chan, J. F. et al. (2020): Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 221–236.
- Chan, J. F. et al. (2020): Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the Novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/HeI real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 58, e00310-20.
- Chan, J. F. et al. (2020): Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* doi:10.1093/cid/ciaa325.
- Chandrashekar, A. et al. (2020): SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science* 369, 812–817.
- Chen, H. et al. (2020): Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet* 395, 809–815.
- Chen, N. et al. (2020): Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507–513.
- Chen, T. et al. (2020): Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BMJ* 368, m1091.
- Cordes, A. K. & Heim, A. (2020): Rapid random access detection of the novel SARS-coronavirus-2 (SARS-CoV-2, previously 2019-nCoV) using an open access protocol for the panther fusion. *J. Clin. Virol.* 125, 104305.
- Corman, V. M. et al. (2020): Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 25, 2000045.
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 5, 536–544 (2020).
- Cui, J., Li, F. & Shi, Z. L. (2019): Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 181–192.

De Pace, V., Caligiuri, P., Ricucci, V. *et al.* (2021): Rapid diagnosis of SARS-CoV-2 pneumonia on lower respiratory tract specimens. *BMC Infect Dis* 21, 926 (2021). doi:10.1186/s12879-021-06591-w

Deng, S. Q. & Peng, H. J. (2020): Characteristics of and public health responses to the coronavirus disease 2019 outbreak in China. *J. Clin. Med.* 9, 575.

Deslandes, A. *et al.* (2020): SARS-CoV-2 was already spreading in France in late December 2019. *Int. J. Antimicrob. Agents* 55, 106006.

Dierks, S., Bader, O., Schwanbeck, J., Groß, U., Weig, M.S., Mese, K., Lugert, R., Bohne, W., Hahn, A., Feltgen, N., Torkieh, S., Denker, F.R., Lauer mann, P., Storch, M.W., Frickmann, H., Zautner, A.E. (2021): Diagnosing SARS-CoV-2 with Antigen Testing, Transcription-Mediated Amplification and Real-Time PCR. *J Clin Med.* 2021 May 29;10(11):2404. doi: 10.3390/jcm10112404. PMID: 34072381; PMCID: PMC8199284.

Dong, E., Du, H. & Gardner, L. (2020): An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect. Dis.* 20, 533–534.

Drain, P.K., Ampajwala, M., Chappel, C., Gvozden, A.B., Hoppers, M., Wang, M., Rosen, R., Young, S., Zissman, E., Montano, M. (2021): A Rapid, High-Sensitivity SARS-CoV-2 Nucleocapsid Immunoassay to Aid Diagnosis of Acute COVID-19 at the Point of Care: A Clinical Performance Study. *Infect Dis Ther.* 2021 Jun;10(2):753-761. doi: 10.1007/s40121-021-00413-x. Epub 2021 Feb 24. PMID: 33629225; PMCID: PMC7904038.

Edalatifard, M., Akhtari, M., Salehi, M., Naderi, Z., Jamshidi, A., Mostafaei, S., Najafzadeh, S.R., Farhadi, E., Jalili, N., Esfahani, M., Rahimi, B., Kazemzadeh, H., Mahmoodi Aliabadi, M., Ghazanfari, T., Sattarian, M., Ebrahimi Louyeh, H., Raeeskarami, S.R., Jamalimoghadamsiahkali, S., Khajavirad, N., Mahmoudi, M., Rostamian, A. (2020): Intravenous methylprednisolone pulse as a treatment for hospitalised severe COVID-19 patients: results from a randomised controlled clinical trial. *Eur Respir J.* 2020 Dec 24;56(6):2002808. doi: 10.1183/13993003.02808-2020. PMID: 32943404; PMCID: PMC7758541.

Elli, S., Blasi, F., Brignolo, B., Ceriotti, F., Gori, A., Piatti, A., Solbiati, M., Costantino, G. (2022): Diagnostic accuracy of rapid antigen test for COVID-19 in an emergency department. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2022 Apr;102(4):115635. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2022.115635. Epub 2022 Jan 16. PMID: 35216863; PMCID: PMC8761115.

Ely, E.W., Ramanan, A.V., Kartman, C.E., de Bono, S., Liao, R., Piruzeli, M.L.B., Goldman, J.D., Saraiva, J.F.K., Chakladar, S., Marconi, V.C.; COV-BARRIER Study Group.(2022): Efficacy and safety of baricitinib plus standard of care for the treatment of critically ill hospitalised adults with COVID-19 on invasive mechanical ventilation or extracorporeal membrane oxygenation: an exploratory,

randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2022 Apr;10(4):327-336. doi: 10.1016/S2213-2600(22)00006-6. Epub 2022 Feb 3. Erratum in: *Lancet Respir Med.* 2022 Feb 11: PMID: 35123660; PMCID: PMC8813065.

Eurosurveillance Editorial Team. Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. *Euro. Surveill.* 25, 200131e (2020).

Fischer, W.A. 2nd, Eron, J.J. Jr, Holman, W., Cohen, M.S., Fang, L., Szewczyk, L.J., Sheahan, T.P., Baric, R., Mollan, K.R., Wolfe, C.R., Duke, E.R., Azizad, M.M., Borroto-Esoda, K., Wohl, D.A., Coombs, R.W., James Loftis, A., Alabanza, P., Lipansky, F., Painter, W.P. (2022): A phase 2a clinical trial of molnupiravir in patients with COVID-19 shows accelerated SARS-CoV-2 RNA clearance and elimination of infectious virus. *Sci Transl Med.* 2022 Jan 19;14(628):eabl7430. doi: 10.1126/scitranslmed.abl7430. Epub 2022 Jan 19. PMID: 34941423.

Fisher, D. & Heymann, D. (2020): Q&A: the novel coronavirus outbreak causing COVID-19. *BMC Med.* 18, 57.

Gao, Q. et al. (2020): Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science* 369, 77–81.

Giacomelli, A. et al. (2020): Self-reported olfactory and taste disorders in SARS-CoV-2 patients: a cross-sectional study. *Clin. Infect. Dis.* 71, 889–890.

Gralinski, L. E. & Menachery, V. D. (2020): Return of the coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* 12, 135.

Gresh J, Kisner H, DuChateau B. (2021): Urgent care study of the LumiraDx SARS-CoV-2 Ag Test for rapid diagnosis of COVID-19. *Diagn Progn Res.* 2021 Dec 24;5(1):24. doi: 10.1186/s41512-021-00113-7. PMID: 34952653; PMCID: PMC8709539.

Gu, H. et al. (2020): Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science.* doi:10.1126/science.abc4730.

Guan, W. J. et al. (2020): Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 382, 1708–1720.

Guo, L. et al. (2020): Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 71, 778–785.

Gupta, A., Gonzalez-Rojas, Y., Juarez, E., Crespo Casal, M., Moya, J., Falci, D.R., Sarkis, E., Solis, J., Zheng, H., Scott, N., Cathcart, A.L., Hebner, C.M., Sager, J., Mogalian, E., Tipple, C., Peppercorn, A., Alexander, E., Pang, P.S., Free, A., Brinson, C., Aldinger, M., Shapiro, A.E.; COMET-ICE Investigators. (2021): Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. *N Engl J Med.* 2021 Nov 18;385(21):1941-1950. doi: 10.1056/NEJMoa2107934. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34706189.

Hammond, J., Leister-Tebbe, H., Gardner, A., Abreu, P., Bao, W., Wisemandle, W., Baniecki, M., Hendrick, V.M., Damle, B., Simón-Campos, A., Pypstra, R., Rusnak, J.M. EPIC-HR Investigators. (2022): Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *N Engl J Med*. 2022 Apr 14;386(15):1397-1408. doi: 10.1056/NEJMoa2118542. Epub 2022 Feb 16. PMID: 35172054; PMCID: PMC8908851.

Han, H., Luo, Q., Mo, F., Long, L. & Zheng, W. (2020): SARS-CoV-2 RNA more readily detected in induced sputum than in throat swabs of convalescent COVID-19 patients. *Lancet Infect. Dis*. 20, 655–656.

Han, Q., Lin, Q., Jin, S. & You, L. (2020): Coronavirus 2019-nCoV: a brief perspective from the front line. *J. Infect*. 80, 373–377.

Heger, L.A., Elsen, N., Rieder, M. *et al.* (2022): Clinical analysis on diagnostic accuracy of Bosch Vivalytic SARS-CoV-2 point-of-care test and evaluation of cycle threshold at admission for COVID-19 risk assessment. *BMC Infect Dis* 22, 486 (2022). doi:10.1186/s12879-022-07447-7

Hillary, V.E., Ceasar, S.A. (2023): An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines. *Heliyon*. 2023 Mar;9(3):e13952. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13952. Epub 2023 Feb 23. PMID: 36855648; PMCID: PMC9946785.

Hoffmann, M. *et al.* (2020): SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181, 271–280.

Houlihan, C. F. *et al.* (2020): Pandemic peak SARS-CoV-2 infection and seroconversion rates in London frontline health-care workers. *Lancet* 396, e6–e7.

Hu, B., Guo, H., Zhou, P., Shi, Z.L. (2021): Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19:141–54. doi:10.1038/s41579-020-00459-7

Hu, D. *et al.* (2018): Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 154.

Huang, C. *et al.* (2020): Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506.

Hui, D. S. *et al.* (2020): The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - the latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Intl. J. Infect. Dis*. 91, 264–266.

Jiang, R. D. *et al.* (2020): Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2. *Cell* 182, 50–58.

Jiang, S., Du, L. & Shi, Z. (2020): An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 275–277.

Kalil, A.C., Patterson, T.F., Mehta, A.K., Tomashek, K.M., Wolfe, C.R., Ghazaryan, V., Marconi, V.C., Ruiz-Palacios, G.M., Hsieh, L., Kline, S., Tapson, V., Iovine, N.M., Jain, M.K., Sweeney, D.A., El Sahly, H.M., Branche, A.R., Regalado Pineda, J., Lye, D.C., Sandkovsky, U., Luetkemeyer, A.F., Cohen, S.H., Finberg, R.W., Jackson, P.E.H., Taiwo, B., Paules, C.I., Arguinchona, H., Erdmann, N., Ahuja, N., Frank, M., Oh, M.D., Kim, E.S., Tan, S.Y., Mularski, R.A., Nielsen, H., Ponce, P.O., Taylor, B.S., Larson, L., Rouphael, N.G., Saklawi, Y., Cantos, V.D., Ko, E.R., Engemann, J.J., Amin, A.N., Watanabe, M., Billings, J., Elie, M.C., Davey, R.T., Burgess, T.H., Ferreira, J., Green, M., Makowski, M., Cardoso, A., de Bono, S., Bonnett, T., Proschan, M., Deye, G.A., Dempsey, W., Nayak, S.U., Dodd, L.E., Beigel, J.H. (2020): ACTT-2 Study Group Members. Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021 Mar 4;384(9):795-807. doi: 10.1056/NEJMoa2031994. Epub 2020 Dec 11. PMID: 33306283; PMCID: PMC7745180.

Kampf, G., Todt, D., Pfaender, S. & Steinmann, E. (2020): Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J. Hosp. Infect.* 104, 246–251.

Kanne, J. P. & Chest, C. T. (2020): Findings in 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections from Wuhan, China: key points for the radiologist. *Radiology* 295, 16–17.

Karon, B.S., Donato, L.J., Bridgeman, A.R., Blommel, J.H., Kipp, B., Maus, A., Renuse, S., Kemp, J., Madugundu, A.K., Vanderboom, P.M., Chavan, S., Dasari, S., Singh, R.J., Grebe, S.K., Pandey, A. (2021): Analytical Sensitivity and Specificity of Four Point of Care Rapid Antigen Diagnostic Tests for SARS-CoV-2 Using Real-Time Quantitative PCR, Quantitative Droplet Digital PCR, and a Mass Spectrometric Antigen Assay as Comparator Methods. *Clin Chem.* 2021 Nov 1;67(11):1545-1553. doi: 10.1093/clinchem/hvab138. PMID: 34240163.

Kim, Y. I. et al. (2020): Rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe* 27, 704–709.

Kirby, J.E., Riedel, S.D., Dutta, S., Arnaout, R., Cheng, A., Ditelberg, S., Hamel, D.J., Chang, C.A., Kanki, P.J. (2022): Sars-Cov-2 antigen tests predict infectivity based on viral culture: comparison of antigen, PCR viral load, and viral culture testing on a large sample cohort. *Clin Microbiol Infect.* 2023 Jan;29(1):94-100. doi: 10.1016/j.cmi.2022.07.010. Epub 2022 Jul 19. PMID: 35863629; PMCID: PMC9293398.

- Koga, P., Maluf, M., Nunes, F., Campos, J., Gazarini, L., Borghoff, T., Libanori, G., Martino, M. (2022): Comparison of the SARS-CoV-2 BD Veritor Nasal Antigen Test with Nasopharyngeal Reverse Transcription-PCR in Symptomatic Patients. *Microbiol Spectr.* 2022 Oct 26;10(5):e0019022. doi: 10.1128/spectrum.00190-22. Epub 2022 Aug 29. PMID: 36036635; PMCID: PMC9603274.
- Konrad, R. et al. (2020): Rapid establishment of laboratory diagnostics for the novel coronavirus SARS-CoV-2 in Bavaria, Germany, February 2020. *Euro Surveill.* 25, 2000173.
- Kuo, P., Realegeno, S., Pride, D.T. (2021): Comparison of two nucleic acid amplification tests (NAATs) and two antigen tests for detection of SARS-CoV-2 from upper respiratory specimens. *J Clin Virol Plus.* 2021 Jun;1(1):100011. doi: 10.1016/j.jcvp.2021.100011. Epub 2021 Apr 3. PMID: 35261999; PMCID: PMC8019354.
- Lam, T. T. et al. (2020): Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* 583, 282–285.
- Lau, S. K. P. et al. (2020): Possible bat origin of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 1542–1547.
- Lee, J., Song, J.U. (2021): Diagnostic accuracy of the Cepheid Xpert Xpress and the Abbott ID NOW assay for rapid detection of SARS-CoV-2: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol.* 2021 Jul;93(7):4523-4531. doi: 10.1002/jmv.26994. Epub 2021 May 3. PMID: 33913533; PMCID: PMC8207078.
- Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. (2020): Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 5, 562–569.
- Li, Q. et al. (2020): Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 382, 1199–1207.
- Li, R. et al. (2020): Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science* 368, 489–493.
- Lippi, G., Henry, B.M., Plebani, M. (2022): LumiraDX SARS-CoV-2 Antigen Test for Diagnosing Acute SARS-CoV-2 Infection: Critical Literature Review and Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel).* 2022 Apr 11;12(4):947. doi: 10.3390/diagnostics12040947. PMID: 35453996; PMCID: PMC9027501.
- Liu, P., Chen, W. & Chen, J. P. (2019): Viral metagenomics revealed Sendai virus and coronavirus infection of Malayan pangolins (*Manis javanica*). *Viruses* 11, 979.
- Liu, Y. et al. (2020): Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19. *Eur. Respir. J.* 55, 2001112.

- Lu, C. W., Liu, X. F. & Jia, Z. F. (2020): 2019-nCoV transmission through the ocular surface must not be ignored. *Lancet* 395, e39.
- Lu, R. et al. (2020): Development of a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2. *Viol. Sin.* 35, 344–347.
- Lu, R. et al. (2020): Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395, 565–574.
- Lu, S. et al. (2020): Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. *Sig. Transduct. Target. Ther.* 5, 157.
- Lu, X. et al. (2020): SARS-CoV-2 infection in children. *N. Engl. J. Med.* 382, 1663–1665.
- Lukassen, S. et al. (2020): SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO. J.* 39, e105114.
- Malin, J.J., Bunse, T., Spinner, C.D. et al. (2022): Antivirale Medikamente: Potente Wirkstoffe, Hoffnungsträger bei COVID19 und therapeutische Grenzen. *Internist* 63, 118–128 (2022). doi:10.1007/s00108-021-01233-4
- Martines, R. B. et al. (2020): Pathology and pathogenesis of SARS-CoV-2 associated with fatal coronavirus disease, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 2005–2015.
- Mehta, P. et al. (2020): COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 395, 1033–1034.
- Meselson, M. (2020): Droplets and aerosols in the transmission of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* 382, 2063.
- Munster, V. J. et al. (2020): Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature* 585, 268–272.
- Oreshkova, N. et al. (2020): SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Euro Surveill.* 25, 2001005.
- Ou, X. et al. (2020): Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* 11, 1620.
- Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L. L. M. & Wang, Q. (2020): Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect. Dis.* 20, 411–412.
- Paraskevis, D. et al. (2020): Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infect. Genet. Evol.* 79, 104212.

- Parikh, A., Cooper, L., Frogel, D., Le Benger, K., Cooper, C.K., Parvu, V. (2022): Large-Scale SARS-CoV-2 Antigen Testing With Real-World Specimens. *Front Public Health*. 2022 Apr 5;10:836328. doi: 10.3389/fpubh.2022.836328. eCollection 2022. PMID: 35450121
- Peiris, J. S. et al. (2020): Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361, 1767–1772.
- Petersen, E. et al. (2020): Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect. Dis.* 20, e238–e244.
- Rockx, B. et al. (2020): Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science* 368, 1012–1015.
- S3-Leitlinie - Empfehlungen zur Therapie von Patienten mit COVID-19, Version März 2023, AWMF-Register-Nr. 113/001.
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., Li, F. (2020): Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 May 26;117(21):11727-11734. doi: 10.1073/pnas.2003138117. Epub 2020 May 6. PMID: 32376634; PMCID: PMC7260975.
- Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Auerbach, A., Li, F. (2020): Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 2020 May;581(7807):221-224. doi: 10.1038/s41586-020-2179-y. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32225175; PMCID: PMC7328981.
- Shi, J. et al. (2020): Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science* 368, 1016–1020.
- Smith, T. R. F. et al. (2020): Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nat. Commun.* 11, 2601.
- Speranza, E. et al. (2020): SARS-CoV-2 infection dynamics in lungs of African green monkeys. Preprint at *bioRxiv*. doi:10.1101/2020.08.20.258087
- Stadnytskyi, V., Bax, C. E., 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, 11875–11877.
- Sun, S. H. et al. (2020): A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host Microbe* 28, 124–133.
- Sungnak, W. et al. (2020): SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat. Med.* 26, 681–687.
- Takashita, E., Yamayoshi, S., Simon, V., van Bakel, H., Sordillo, E.M., Pekosz, A., Fukushi, S., Suzuki, T., Maeda, K., Halfmann, P., Sakai-Tagawa, Y., Ito, M.,

Watanabe, S., Imai, M, Hasegawa, H., Kawaoka, Y. (2022): Efficacy of Antibodies and Antiviral Drugs against Omicron BA.2.12.1, BA.4, and BA.5 Subvariants. *N Engl J Med.* 2022 Aug 4;387(5):468-470. doi: 10.1056/NEJMc2207519. Epub 2022 Jul 20. PMID: 35857646; PMCID: PMC9342381.

Tharaux, P.L., Pialoux, G., Pavot, A., Mariette, X., Hermine, O. et al. (2021): Effect of anakinra versus usual care in adults in hospital with COVID-19 and mild-to-moderate pneumonia (CORIMUNO-ANA-1): a randomised controlled trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2021, 9 (3), pp.295-304. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30556-7

Tian, J. et al. (2020): Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 disease severity in patients with cancer in Wuhan, China: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Oncol.* 21, 893–903.

To, K. K. et al. (2020): Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin. Infect. Dis.* 71, 841–843.

To, K. K. et al. (2020): Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 20, 565–574.

Van der Moeren, N., Zwart, V.F., Lodder, E.B., Van den Bijllaardt, W., Van Esch, H.R.J.M., Stohr, J.J.J.M., Pot, J., Welschen, I., Van Mechelen, P.M.F., Pas, S.D., Kluytmans, J.A.J.W. (2021): Evaluation of the test accuracy of a SARS-CoV-2 rapid antigen test in symptomatic community dwelling individuals in the Netherlands. *PLoS One.* 2021 May 13;16(5):e0250886. doi: 10.1371/journal.pone.0250886. PMID: 33983971; PMCID: PMC8118553.

Van Doremalen, N. et al. (2020): Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* 382, 1564–1567.

Venekamp, R.P., Veldhuijzen, I.K., Moons, K.G.M. et al. (2022): Detection of SARS-CoV-2 infection in the general population by three prevailing rapid antigen tests: cross-sectional diagnostic accuracy study. *BMC Med* 20, 97 (2022). doi:10.1186/s12916-022-02300-9

Vivanti, A. J. et al. (2020): Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* 11, 3572.

Walls, A. C. et al. (2020): Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 181, 281–292.

Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S. & Li, F. (2020): Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 94, e00127-20.

- Wang, D. et al. (2020): Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 323, 1061–1069.
- Wang, R., Zhang, X., Irwin, D. M. & Shen, Y. (2020): Emergence of SARS-like coronavirus poses new challenge in China. *J. Infect.* 80, 350–371.
- Wang, W. et al. (2020): Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA* 323, 1843–1844.
- Wolfel, R. et al. (2020): Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. doi:10.1038/s41586-020-2196-x.
- World Health Organization: Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection: *Interim guidance*, 6 October 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays> WHO Reference Number: WHO/2019-nCoV/Antigen_Detection/2021.1 [Zugriff 10.12.23]
- World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Situation report – 51*. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10 (2020). WHO Reference Number: WHO/2019-nCoV/IPC/2020.3 [Zugriff 10.12.23]
- Wu, C. et al. (2020): Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with Coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.* 180, 934–943.
- Wu, F. et al. (2020): A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, 265–269.
- Wu, J. T., Leung, K. & Leung, G. M. (2020): Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet* 395, 689–697.
- Wu, Y. et al. (2020): Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 5, 434–435.
- Wu, Z. & McGoogan, J. M. (2020): Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in china: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 323, 1239–1242.
- Xiao, K. et al. (2020): Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature* 583, 286–289.
- Xie, X. et al. (2020): Chest CT for typical 2019-nCoV pneumonia: relationship to negative RT-PCR testing. *Radiology* 296, E41–E45.

- Yang, X. et al. (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, 475–481.
- Yao, X. H. et al. (2020): [A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 49, 411–417.
- Yu, P. et al. (2020): Age-related rhesus macaque models of COVID-19. *Animal Model Exp. Med.* 3, 93–97.
- Zeng, Z. et al. (2020): Pulmonary pathology of early phase COVID-19 pneumonia in a patient with a Benign lung lesion. *Histopathology*. doi:10.1111/his.14138.
- Zhang, Q. et al. (2020): A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* doi:10.1080/22221751.2020.1817796.
- Zhang, T., Wu, Q. & Zhang, Z. (2020): Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Curr. Biol.* 30, 1346–1351.
- Zhang, W. et al. (2020): Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 386–389.
- Zhang, Y. Z. & Holmes, E. C. (2020): A genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2. *Cell* 181, 223–227.
- Zhao, Y., Chen, F., Li, Q., Wang, L., Fan, C. (2015): Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chem Rev.* 2015 Nov 25;115(22):12491-545. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00428. Epub 2015 Nov 9. PMID: 26551336.
- Zhao, X. et al. (2020): Broad and differential animal angiotensin-converting enzyme 2 receptor usage by SARS-CoV-2. *J. Virol.* 94, e00940-20.
- Zhou, H. et al. (2020): A novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein. *Curr. Biol.* 30, 2196–2203.
- Zhou, P. et al. (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273.
- Zhu, F. C. et al. (2020): Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet* 395, 1845–1854.
- Zhu, N. et al. (2020): A Novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733.
- Zou, L. et al. (2020): SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.* 382, 1177–1179.

7. Anhang

Tabelle 32. Score Alveo be.well

		Punkte
Durchführbarkeit	Installationszeit ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Probenvorbereitungszeit ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Hands on time ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Schnelligkeit	Analysezeit im Cyclor ≤ 45 min	<input type="checkbox"/> 1
	Turnaroundzeit ≤ 50 min	<input type="checkbox"/> 1
	Duchsatzkapazität > 2 Proben	<input type="checkbox"/> 1
Betriebseigenschaften	High Throughput	<input type="checkbox"/> 1
	Medizinisches Labor / Personal nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Computer nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Instrumente nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Testeigenschaften	Kategorische Übereinstimmung ≥ 80%	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Sensitivität gesamt ≥ 70%	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Sensitivität bei niedrig positiven ≥ 50%	<input type="checkbox"/> 1
	Spezifität gesamt 100%	<input checked="" type="checkbox"/> 1

Befundtyp	Quantitativ mit CT Wert	<input type="checkbox"/> 1
	Online Übertragung	<input checked="" type="checkbox"/> 1

Tabelle 33. Score BD Veritor

		Punkte
Durchführbarkeit	Installationszeit ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Probenvorbereitungszeit ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Hands on time ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Schnelligkeit	Analysezeit im Cyclor ≤ 45 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Turnaroundzeit ≤ 50 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Duchsatzkapazität > 2 Proben	<input type="checkbox"/> 1
Betriebseigenschaften	High Throughput	<input type="checkbox"/> 1
	Medizinisches Labor / Personal nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Computer nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Instrumente nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Testeigenschaften	Kategorische Übereinstimmung ≥ 80%	<input type="checkbox"/> 1

	Sensitivität gesamt $\geq 70\%$	<input type="checkbox"/> 1
	Sensitivität bei niedrig positiven $\geq 50\%$	<input type="checkbox"/> 1
	Spezifität gesamt 100%	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Befundtyp	Quantitativ mit CT Wert	<input type="checkbox"/> 1
	Online Übertragung	<input checked="" type="checkbox"/> 1

Table 34. Score Bosch Vivalytic

		Punkte
Durchführbarkeit	Installationszeit ≤ 5 min	<input type="checkbox"/> 1
	Probenvorbereitungszeit ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Hands on time ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Schnelligkeit	Analysezeit im Cyclor ≤ 45 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Turnaroundzeit ≤ 50 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Duchsatzkapazität > 2 Proben	<input type="checkbox"/> 1
Betriebseigenschaften	High Throughput	<input type="checkbox"/> 1
	Medizinisches Labor / Personal nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Computer nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1

	Instrumente nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Testeigenschaften	Kategorische Übereinstimmung $\geq 80\%$	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Sensitivität gesamt $\geq 70\%$	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Sensitivität bei niedrig positiven $\geq 50\%$	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Spezifität gesamt 100%	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Befundtyp	Quantitativ mit CT Wert	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Online Übertragung	<input checked="" type="checkbox"/> 1

Tabelle 35. Score Chronos DX

		Punkte
Durchführbarkeit	Installationszeit ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Probenvorbereitungszeit ≤ 5 min	<input type="checkbox"/> 1
	Hands on time ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Schnelligkeit	Analysezeit im Cyclor ≤ 45 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Turnaroundzeit ≤ 50 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Duchsatzkapazität > 2 Proben	<input type="checkbox"/> 1

Betriebseigenschaften	High Throughput	<input type="checkbox"/> 1
	Medizinisches Labor / Personal nicht erforderlich	<input type="checkbox"/> 1
	Computer nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Instrumente nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Testeigenschaften	Kategorische Übereinstimmung $\geq 80\%$	<input type="checkbox"/> 1
	Sensitivität gesamt $\geq 70\%$	<input type="checkbox"/> 1
	Sensitivität bei niedrig positiven $\geq 50\%$	<input type="checkbox"/> 1
	Spezifität gesamt 100%	<input type="checkbox"/> 1
Befundtyp	Quantitativ mit CT Wert	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Online Übertragung	<input checked="" type="checkbox"/> 1

Tabelle 36. Score Fluxergy

		Punkte
Durchführbarkeit	Installationszeit ≤ 5 min	<input type="checkbox"/> 1
	Probenvorbereitungszeit ≤ 5 min	<input type="checkbox"/> 1
	Hands on time ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Schnelligkeit	Analysezeit im Cyclor ≤ 45 min	<input type="checkbox"/> 1

	Turnaroundzeit ≤ 50 min	<input type="checkbox"/> 1
	Duchsatzkapazität > 2 Proben	<input type="checkbox"/> 1
Betriebseigenschaften	High Throughput	<input type="checkbox"/> 1
	Medizinisches Labor / Personal nicht erforderlich	<input type="checkbox"/> 1
	Computer nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Instrumente nicht erforderlich	<input type="checkbox"/> 1
Testeigenschaften	Kategorische Übereinstimmung ≥ 80%	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Sensitivität gesamt ≥ 70%	<input type="checkbox"/> 1
	Sensitivität bei niedrig positiven ≥ 50%	<input type="checkbox"/> 1
	Spezifität gesamt 100%	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Befundtyp	Quantitativ mit CT Wert	<input type="checkbox"/> 1
	Online Übertragung	<input checked="" type="checkbox"/> 1

Tabelle 37. Score Lumira Dx

		Punkte
Durchführbarkeit	Installationszeit ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Probenvorbereitungszeit ≤ 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1

	Hands on time \leq 5 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Schnelligkeit	Analysezeit im Cyclor \leq 45 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Turnaroundzeit \leq 50 min	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Duchsatzkapazität > 2 Proben	<input type="checkbox"/> 1
Betriebseigenschaften	High Throughput	<input type="checkbox"/> 1
	Medizinisches Labor / Personal nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Computer nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Instrumente nicht erforderlich	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Testeigenschaften	Kategorische Übereinstimmung \geq 80%	<input type="checkbox"/> 1
	Sensitivität gesamt \geq 70%	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Sensitivität bei niedrig positiven \geq 50%	<input checked="" type="checkbox"/> 1
	Spezifität gesamt 100%	<input checked="" type="checkbox"/> 1
Befundtyp	Quantitativ mit CT Wert	<input type="checkbox"/> 1
	Online Übertragung	<input checked="" type="checkbox"/> 1

8. Erklärung zum Eigenteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am MVZ Medizinisches Labor Eurofins in Gelsenkirchen unter Betreuung von Prof. Dr. med. MSc. Matthias Willmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. MSc. Matthias Willmann in Zusammenarbeit mit mir.

Die Labormessungen für diese Studie wurden von mir fachlich überwacht und hinsichtlich der Qualität geprüft.

Die statistische Auswertung der Studiendaten erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 19.01.24

Sofia Prodromidou

9. Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. med. MSc Matthias Willmann, Prof. Dr. med. Silke Peter und der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen bedanken für die Möglichkeit, eine wissenschaftliche Arbeit zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin zu verfassen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. MSc Matthias Willmann für die ausgezeichnete Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich beim ganzen Team der Molekularen Diagnostik des Eurofins MVZ Medizinischen Labors in Gelsenkirchen bedanken. Besonders bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Labormessungen bei Frau Lansing Dana und Frau Gorina Zoia.

Außerdem möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Bearbeitung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Insbesondere gilt dies für Herrn Dr. rer. nat. Vincent Alexander Benninghaus und Herrn Robin Arnold Theodor Buchholz.

Für den Zugang zu den Geräten möchte ich der Geschäftsführung des Eurofins MVZ Medizinischen Labors in Gelsenkirchen meinen Dank ausdrücken.

Meinem Ehemann, meiner Tochter und meiner Mutter danke ich für ihre Geduld und Ermutigungen während der Arbeit an dieser Dissertation.

Vielen Dank!