Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Herr Prof. Dr. Jörg Timm

Untersuchung von minimal-invasiven Methoden der Probengewinnung zum Nachweis von SARS-CoV-2 als Alternative zum Nasenrachenabstrich

Dissertation

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

vorgelegt von
Katharina Repges
2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Timm

Zweitgutacher: Prof. Dr. med. Hans Martin Bosse

für Oma Anni.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlich:

Nadine Lübke, Katharina Repges, Christopher Menne, Andreas Walker, Björn-Erik O. Jensen, Noemi F. Freise, Smaranda Gliga, Simon B. Eickhoff, Hans Martin Bosse, Ortwin Adams, Jörg Timm (2022)

Quantitative analysis of different respiratory specimens on two automated test systems for detection of SARS-CoV-2 RNA.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 105 (2023) 115800.

Zusammenfassung

Im Rahmen der SARS-CoV-2 Pandemie wurden sowohl zum Screening als auch zum Monitoring einer SARS-CoV-2 Infektion der Nasenrachen- beziehungsweise der Rachenabstrich empfohlen. Diese Probenentnahmen sind jedoch sehr unangenehm für die PatientInnen und stellen daher gerade bei Kindern ein großes Problem dar. Um die SARS-CoV-2 Diagnostik bei Kindern zu optimieren, wurden im Rahmen dieser Studie alternative minimal-invasive Methoden der Probengewinnung, wie Speichel (SP), Rachenspülungen (RS) und Abstriche des Nasenvorhofs (NV) im Vergleich zum Nasenrachen (NR)- und Rachenabstrich (RA) untersucht. Dabei wurde sekundär die Sensitivität der SARS-CoV-2 Detektion in den unterschiedlichen respiratorischen Materialien anhand drei verschiedener quantitativer RT-qPCR Nachweismethoden verglichen.

Insgesamt wurden 40 PatientInnen mit einer bestätigten SARS-CoV-2 Infektion innerhalb der letzten 24 Stunden für die Studie rekrutiert. Der Nachweis von SARS-CoV-2 erfolgte mittels drei verschiedener RT-qPCR Verfahren, dem cobas ® 6800 (c6800, Roche), dem NMDx™ (NMDx, Qiagen) und mit der Inhouse (I) RT-qPCR nach Corman et al. 2020. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer quantitativen Bezugsprobe. Die statistische Auswertung erfolgte über GraphPad Online Calculator und GraphPad Prism 9.01. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

39/40 StudienteilnehmerInnen (w=13 (32,5%), m=27 (67,5%)) mit einem medianen Alter von 57,5 Jahren (19-90) konnten in die Studie eingeschlossen werden. Für den NR wurden zwischen den verschiedenen Nachweismethoden vergleichbare Detektionsraten beobachtet (C=92,3%, N=94,9%, I=89,7%). Während für den RA beziehungsweise den NV im Vergleich zum NR hohe Konkordanzen mit dem c6800 und NMDx beobachtet werden konnten (85% und 87%), wurden mit der Inhouse PCR nur 67% beziehungsweise 64% der positiven Proben detektiert.

Unabhängig von der RT-qPCR-Methode konnten mit dem NR signifikant höhere Viruslasten (VLs) detektiert werden als mit den anderen respiratorischen Materialien (p=0,001), wobei der NV im Durchschnitt die geringste Differenz

aufwies (C=-0,993, N=-1,024, I=-0,894). RA und NV zeigten hingegen auf allen Plattformen vergleichbare VLs (C: p=0,637, N: p=0,482, I: p=0,993).

Unter Berücksichtigung der vom RKI empfohlenen Entlassungskriterien aus der Isolierung mit einem Schwellenwert von 10^6 SARS-CoV-2 Kopien pro/ml, konnten mit dem c6800 und dem NMDx 95-100% der NR, RA und NV Proben mit einer VL>10^6 detektiert werden, wohingegen mit SP und RS nur eine Detektionsrate von 77-95% erreicht werden konnte.

Die Studie bestätigte die erwartet höchste Sensitivität des NR unabhängig von der RT-qPCR- Methode zum Nachweis von SARS-CoV-2. Der NV zeigte vergleichbare Detektionsraten zum RA und die geringste Viruslast-Differenz zum NR, sodass der NV eine minimal-invasive Alternative zum NR oder RA darstellen könnte. Hinsichtlich eines sicheren Entlassungskriteriums zeigten der c6800 und NMDx im NR, RA und ebenso NV die sensitivsten Ergebnisse.

Summary

In the context of the SARS-CoV-2 pandemic, nasopharyngeal and throat swabs are recommended for both screening and monitoring SARS-CoV-2 infection. However, taking these samples is very unpleasant for patients and therefore poses a major problem, especially for children. In order to optimize SARS-CoV-2 diagnostics in children, alternative minimally invasive methods of sample collection, such as saliva (SP), throat rinses (RS) and swabs of the nasal vestibule (NV) were investigated in comparison to nasopharyngeal (NR) and throat swabs (RA). Secondarily, the sensitivity of SARS-CoV-2 detection in the different respiratory materials was compared using three different quantitative RT-qPCR detection methods.

A total of 40 patients with a confirmed SARS-CoV-2 infection within the last 24 hours were recruited for the study. SARS-CoV-2 was detected using three different RT-qPCR methods, the cobas ® 6800 (c6800, Roche), the NMDx™ (NMDx, Qiagen) and in-house (I) RT-qPCR according to Corman et al. 2020. Quantification was carried out using a quantitative reference sample to compare the laboratory results. Statistical analysis was performed using GraphPad Online Calculator and GraphPad Prism 9.01. A p-value <0.05 was considered statistically significant.

39/40 study participants (w=13 (32.5%), m=27 (67.5%)) with a median age of 57.5 years (19-90) were included in the study. For NR, comparable detection rates were observed between the different detection methods (C=92.3%, N=94.9%, I=89.7%). While high concordances were observed with the c6800 and NMDx for RA and NV compared to NR (85% and 87%), only 67% and 64% of positive samples were detected with in-house PCR.

Regardless of the RT-qPCR method, significantly higher viral loads (VLs) were detected with the NR than with the other respiratory materials (p=0.001), with the NV showing the smallest average difference (C=-0.993, N=-1.024, I=-0.894). In contrast, RA and NV showed comparable VLs on all platforms (C: p=0.637, N: p=0.482, I: p=0.993).

Taking into account the discharge criteria from isolation recommended by the RKI with a threshold of 10^6 SARS-CoV-2 copies per/ml, 95-100% of NR, RA and NV

samples with a VL greater than 10^6 copies/ml could be detected with the Cobas and NMDx sytems, whereas only detection rates between 77% and 95% could be achieved with SP and RS.

The study confirmed the expected highest sensitivity of the NR independent of the RT-qPCR method for the detection of SARS-CoV-2. The NV showed comparable detection rates to the RA and the lowest viral load difference to the NR, so that the NV could represent a minimally invasive alternative to the NR or RA. With regard to a safe discharge criterion, the Cobas and NMDx showed the most sensitive results in the NR, RA and also NV.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
c6800	Cobas c6800
DNA	desoxyribonucleic acid
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEV	Hepatitis-E-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV	Humane Papillomviren
I	Inhouse PCR
MERS	Middle East Respiratory Syndrome
NMDx	NeuMoDx
NR	Nasenrachenabstrich
NV	Nasenvorhofabstrich
RA	Rachenabstrich
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid
RS	Rachenspülung
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SP	Speichel
VL	Viruslast
WHO	World Health Organization
WNV	West-Nil-Virus

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 SARS-CoV-2 Pandemie 1
1.2 Grundlagen zu Coronaviren 2
1.3 SARS-CoV-2 4
1.4 Diagnostik von SARS-CoV-2: Probengewinnung 5
1.5 Diagnostik von SARS-CoV-2: Molekulare und serologische Nachweisverfahren 7
2 Ziel meiner Arbeit 9
3 Material und Methoden 10
3.1 Studienpopulation 10
3.2 Probenentnahme 10
3.3 Varianten der Probengewinnung 10
3.4 PCR-Verfahren 11
3.5 NMDx™ 12
3.6 COBAS ® 6800 12
3.7 Inhouse (I) RT-qPCR nach Corman et al. 2020 13
3.8 Polymerase-Ketten-Reaktion 14
3.9 Präanalytik 14
3.9.1 NMDx 14
3.9.2 c6800 15
3.9.3 Inhouse-PCR 15
3.10 Quantifizierung der SARS-CoV-2 RNA 16
3.11 Statistik 17
4 Ergebnisse 18
4.1 Studienkohorte 18
4.2 Positivenraten 18
4.3 Konkordanzen und Detektionsrate 22
4.4 SARS-CoV-2 RNA-Konzentrationen 27
4.5 Nachweisrate im Kontext der Isolation 31
5 Diskussion 35
6 Schlussfolgerung 49
7 Zusammenfassung 50
8 Abbildungsverzeichnis 51

9 Tabellenverzeichnis.....53
10 Literatur- und Quellenverzeichnis.....54

1 Einleitung

Im Rahmen der SARS-CoV-2 Pandemie wurden sowohl zum Screening als auch zum Monitoring einer SARS-CoV-2 Infektion der tiefe Nasenrachen- beziehungsweise der Rachenabstrich oder auch Sputum vom Robert Koch Institut empfohlen.[1] Diese Probenentnahmen sind jedoch sehr unangenehm und stellen daher gerade bei Kindern ein großes Problem dar. Die Sputum Gewinnung ist im Kindesalter nicht valide zu generieren. Um die SARS-CoV-2 Diagnostik bei Kindern zu optimieren wurden im Rahmen dieser Studie alternative minimal-invasive Methoden der Probengewinnung, wie Speichel (SP), Rachenspülungen (RS) und Abstriche des Nasenvorhofs (NV) im Vergleich zum Nasenrachen (NR)- und Rachenabstrich (RA) untersucht. Dabei wurde sekundär die Sensitivität der SARS-CoV-2 Detektion in den unterschiedlichen respiratorischen Materialien anhand drei verschiedener quantitativer RT-qPCR Nachweismethoden verglichen.

1.1 SARS-CoV-2 Pandemie

Im Dezember 2019 traten in Wuhan, in der Region Hubei, erstmals 41 Fälle von Lungenerkrankungen mit unklarer Genese auf. WissenschaftlerInnen und ÄrztInnen machten für dieses Infektionsgeschehen ein neuartiges Coronavirus verantwortlich. [2] Der neuartige Erreger wurde durch die WHO zunächst als 2019-nCoV bezeichnet. [3] Im Verlauf nahm die WHO eine Umbenennung vor. Fortan bezeichnet man die Erkrankung als “COVID-19”. Dies fungiert als abgekürzte englische Form für „*coronavirus disease 2019*.” [4]

Aufgrund eines weiterhin unkontrollierten weltweiten Infektionsgeschehens wurde der Ausbruch am 11.03.2020 offiziell durch die WHO zur Pandemie erklärt. Besonders ältere Menschen sowie vorerkrankte PatientInnen galten als höher gefährdet und bedurften eines allgemeinen Schutzes. [5] Auch heute gilt nach Aussage des RKI eine höhere Wahrscheinlichkeit für schwere Verläufe bei steigendem Alter und bestehenden Vorerkrankungen. [1]

Das Durchschnittsalter intensivpflichtiger COVID-19 PatientInnen war mit 66 Jahren höher als solcher in ambulanter Behandlung mit 51 Jahren. Eine Hospitalisierung kritisch kranker Erwachsener erfolgte je nach Studie in 19,8% bis 49%. Bei Kindern belief sich der Anteil auf 2,2%. Kritische Fälle machten

einen Anteil von bis zu 14% aller bestätigten SARS-CoV-2 Nachweise im Labor aus. Als Risikofaktoren konnten einige Aspekte deklariert werden. So galten höheres Alter, männliches Geschlecht oder Vorerkrankungen wie arterielle Hypertonie, chronische Lungenerkrankungen, Herz- Leber- und Niereninsuffizienzen sowie aktive Tumorerkrankungen, Immundefekte und Schwangerschaften als Charakteristika für ernste Verläufe. Die Ethnie konnte je nach Risikoprofil der PatientInnen einen Einfluss auf das Outcome bewirken, dabei muss in nachfolgenden Analysen jedoch eine Adjustierung nach soziodemographischen Bedingungen erfolgen. Kennzeichen kritischer Verläufe stellten Dyspnoe, eine erhöhte Atemfrequenz über 30/min und eine reduzierte Sauerstoffsättigung unter 93% dar. Ein Horowitz Quotient unter 300 mmHg und neu aufgetretene Lungeninfiltrate konnten als prognostisch schlecht klassifiziert werden. [6]

Aus heutiger Datenlage geht hervor, dass beide Geschlechter in gleicher Häufigkeit betroffen sind, Männer jedoch ein höheres Risiko für einen schweren Verlauf haben. [7] Eine Hospitalisierung erfolgte in 10% aller gemeldeten Fälle. [8]

1.2 Grundlagen zu Coronaviren

Coronaviren gehören zu der Gruppe der RNA-Viren. Sie besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom und existieren in verschiedenen Spezies. [9] Die Coronaviren lassen sich gemeinsam mit den Toroviren unter der taxonomischen Ordnung der Nidovirales einordnen. Als Gemeinsamkeit kann hier unter anderem die Genexpression durch Transkription eines Satzes von mehr als 30 subgenomischen nested-RNAs genannt werden. Ursprung der Bezeichnung für die Nidoviren ist der lateinische Begriff „nido“, welcher im Deutschen als Nest übersetzt werden kann und auf diese Weise die Eigenschaft der verschachtelten RNA repräsentiert.

Die Coronaviren weisen die größten Genome aller RNA-Viren auf. Die dadurch resultierende Kodierungskapazität ist Gegenstand aktueller Forschung. [10]

Coronaviren können sowohl Menschen als auch Tiere infizieren und eine Bandbreite von Symptomen hervorrufen. Das Spektrum reicht von Erkältungssymptomen bis zu neurologischen Veränderungen. [11]

Ihre Form wird in der Literatur als kugelförmig mit einem Durchmesser von 80-120 nm beschrieben. [10] Spike Proteine an der Virusoberfläche sind ursächlich für die Namensgebung, da diese den Anschein einer Krone erwecken. [12] Jene ragen bis zu 20nm aus der Oberfläche heraus und besitzen an ihrer Basis eine geringere Größe, nehmen zur Spitze hin in ihrer Breite zu. [10]

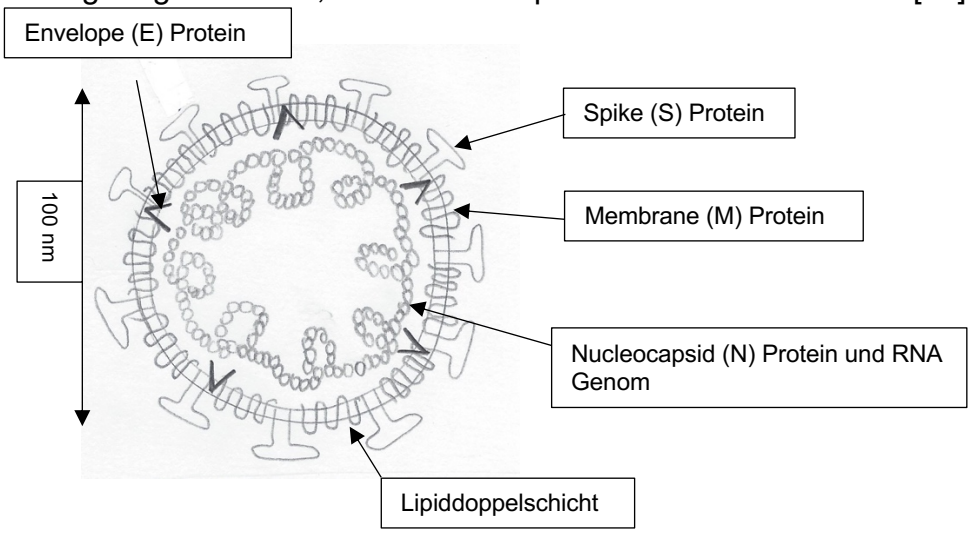

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Coronavirus-Virus mit dem minimalen Satz von Strukturproteinen

Eingeteilt werden sie in die alpha-, beta-, gamma- und delta- Form. [13] [9] Das neuartige SARS-CoV-2 weist Ähnlichkeiten zu einigen beta-Varianten auf. [2] Bisher zeigen sich nur die Alpha- und Betaform humanpathogen. [13]

In der Vergangenheit wurde das epidemische Potential von menschlichen Coronaviren unterschätzt. So brach im Jahr 2002 eine SARS-Epidemie und im Jahr 2012 eine MERS-Epidemie aus. MERS ist ein Akronym für „Middle East respiratory syndrome- CoV“. Wissenschaftler fanden heraus, dass Fledermäuse ein natürliches Reservoir für SARS und MERS-Viren darstellen. Die Art der Übertragung von der Tierwelt auf den Homo Sapiens ist unklar. Vermutet wird der direkte Kontakt mit Zwischenwirten oder der Verzehr von tierischen Produkten. Der zwischenmenschlichen Übertragung wurde in Vergangenheit eine nosokomiale Genese zugesprochen. [13]

79% des SARS-CoV-2 Genoms stimmen mit dem des SARS-CoV überein. Vier Strukturgene können analysiert werden. Diese unterscheiden sich in (S) spike, (M) membrane, (N) nucleocapsid und (E) envelope. Zu 90% besteht eine Aminosäureübereinstimmung zwischen SARS-CoV-2 und SARS-CoV. Dabei

muss das S-Gen gesondert betrachtet werden, da die Übereinstimmung bei dem S-Gen geringer ist. [11]

1.3 SARS-CoV-2

Die Namensherkunft von SARS-CoV-2 resultiert aus der englischen Bezeichnung „severe acute respiratory syndrome-CoV“ und signalisiert die medizinische Bedeutung des Virus. [13]

Das 2019 neu entdeckte SARS-CoV-2 Virus weist Besonderheiten im Vergleich zu älteren Coronaviren auf. Als nachgewiesener Ursprung des Virus gelten Fledermäuse eines Meeresfrüchtemarkts der Region Hubei in Wuhan. Die Zwischenwirte für die Übertragung auf den Menschen sind unklar. Ein exponentieller Fallanstieg zu Beginn der Pandemie und Infizierung von Menschen ohne eigenen direkten Kontakt zum oben genannten Lebensmittelmarkt, der als Ursprung für das Virus angesehen wurde, legten die Mensch-zu-Mensch Übertragung nahe. Auch asymptomatische Personen und Personen vor Symptomausbruch konnten die Virusübertagung initiieren, sodass vierzehntägige Quarantänen nach Kontakt zu Infizierten verhängt wurden. [12]

SARS-CoV-2 ist hauptsächlich über Tröpfcheninfektion mit einer Distanz von bis zu zwei Metern übertragbar und die asymptomatische Phase kann durchschnittlich zwischen zwei bis vierzehn Tagen variieren. [14] Das Virus hat einen Durchmesser von 60 - 120 nm. Auf Oberflächen ist Covid-19 für einige Tage überlebensfähig. Daher kann das Virus auch durch eine eigen händische Übertragung zur Infektion führen. Besonders Husten und Nießen sind Kardinalsymptome von Covid-19. [12] Aber auch Fieber, Müdigkeit, Sputumproduktion und Abhusten sind häufige Symptome. Ebenso sind atypische und asymptomatische Verläufe beobachtet worden. Kinder zeigten ähnliche Symptomatik, allerdings in milderer Form. [15] In einer Beobachtungsstudie in der europäischen Bevölkerung stellten WissenschaftlerInnen bei milden bis moderaten Krankheitsverläufen zu 87% Geruchs- und zu 56% Geschmacksverlust fest. [16] Zudem zeigten Studienergebnisse eine höhere Viruslast im Nasenbereich als im Rachen, hierbei war es irrelevant ob die PatientInnen Symptome haben oder asymptomatisch waren. [12]

Das Verständnis des viralen Lebenszyklus des SARS-CoV-2 Virus ist essenzieller Bestandteil der Forschung und relevant für Therapiemöglichkeiten der Erkrankung. Das Spike Protein des Coronavirus ist für die Adhäsion der Viruszelle an die Wirtszelle relevant. Es besteht aus zwei Untereinheiten, der N-terminalen S1- und C-terminalen S2- Einheit. Die S1-Einheit ist für die Adhäsion wichtig und die S2-Einheit für die Fusion des Virus mit der Wirtszelle. Daraufhin ist das Entry ermöglicht. [2] Das SARS-CoV-2 Virus bindet mit dem Spike Protein unter anderem an ACE-2 Rezeptoren der Gewebe. Diese sind auf arteriellen und venösen Endothelzellen, Muskelzellen sowie Epithelien des Dünndarms und Respirationstraktes vorhanden. [13] Auch im Herzen und in der Niere sind ACE-2 Rezeptoren zu finden. Der höchste Anteil ist jedoch im Lungengewebe zu vermerken. [16] Zum anderen nutzt das Virus die membrangebundene Zell-Transmembran-Protease Serin 2, TMPRSS2, für seinen viralen Lebenszyklus. Diese befindet sich auf menschlichen Zelloberflächen von Alveolarzellen und kapillärem Endothel. [17] ACE-2 und TMPRSS2 wurden hauptsächlich in Pneumozyten Typ II gefunden, vereinzelt ist der TMPRSS2 auch in Pneumozyten Typ I, Flimmerepithelzellen und Keulenzellen nachgewiesen worden. [18] Der gebundene Komplex aus SARS-CoV-2 und ACE-2 Rezeptor wird durch TMPRSS2 proteolytisch gespalten. Dies führt zur Spaltung von ACE-2 und Aktivierung des Spikeproteins, der virale Eintritt ist folglich möglich. [19]

Durch Fusion von Virus- und Humanzelle findet die Endozytose statt. Innerhalb des Zytoplasmas wird anschließend durch den Schritt des Uncoatings das virale Genom freigesetzt. Durch virale Polymerasen findet die Translation und nachfolgend RNA-Replikation statt. Die essenziellen viralen Gene des SARS-CoV-2 Virus sind das Nucleocapsidprotein (N), das Spikeprotein (S), das Membranprotein (M) und das Envelopeprotein (E), welches für die Virushülle codiert. [19] Im Prozess der genomischen und subgenomischen Transkription und Translation werden das S-, M-, E- und N-Gen in ein neues Virus formiert und final über eine Exozytose aus dem humanen Zytoplasma ausgeschleust. Ein erneutes Entry ist nach Bindung mit ACE-2 Rezeptoren möglich. [14] [20]

1.4 Diagnostik von SARS-CoV-2: Probengewinnung

Die korrekte Probengewinnung ist für eine zielführende und zuverlässige Diagnostik mit hoher Sensitivität und Spezifität essenziell. Zahlreiche Studien

beschäftigten sich mit dem optimalen Entnahmeort und -verfahren. Proben können durch Abstriche, Mundspülungen oder Aspirate gewonnen werden. [21]

Nachfolgend werden die unterschiedlichen Probenentnahmeverfahren vorgestellt.

Am häufigsten wird der nasopharyngeale Abstrich verwendet. [22] Dieser gilt aktuell als Goldstandard für die Diagnose von SARS-CoV-2 und kann durch eine PCR innerhalb von zwei Stunden zu einer Bestätigung der Infektion führen. [21] Unterschieden wird zwischen dem tiefen Nasenrachenabstrich und dem isolierten Rachenabstrich. Studien demonstrierten eine Sensitivität der nasopharyngealen Abstriche zwischen 73,2% und 98%.

Alternativ wird der Abstrich des Nasenvorhofs sowie der mittleren Nasenmuschel beschrieben. Hierbei besteht die Möglichkeit der Selbstentnahme durch die PatientInnen. [22]

Auch die Entnahme von Speichel oder Sputum ist eine Option. [22] Da Covid-19 eine Viruserkrankung ist, die durch zwischenmenschliche Übertragung gekennzeichnet ist, spricht dies für die Möglichkeit, eine Diagnostik aus Speichel durchzuführen. [21] Wie in Studien gezeigt wurde, kann speziell Speichel bei der Erstdiagnose von asymptomatischen und symptomatischen Kindern im Alter von 4 bis 10 Jahren sowie 11 bis 18 Jahren zum Nasenrachenabstrich kompetitive Nachweisraten erzielen. [23] Speichelproben stellen eine der minimal-invasiven Alternativen dar.

Rachenspülungen sind eine weitere weniger invasive Variante. Hierbei bestehen je nach Studienkonzept Angaben zur Verfahrensdurchführung für die PatientInnen. Eine Lösung soll durch Gurgeln für eine kurze Zeit im Rachen verweilen und anschießend in einem Behältnis aufgefangen werden. Unterschiedliche Rachenspüllösungen können verwendet werden. Kochsalzlösung, sowie alkoholhaltige und Flüssigkeiten ohne Alkohol wurden in Studien eingesetzt. [24] Hierbei bestanden wie bei der Speichelgewinnung die Vorteile der Kostenersparnis sowie Eigenentnahme durch die PatientInnen im Fokus. Zudem charakterisierten die Rachenspülung eine erhöhte Sensitivität und Sicherheit in einigen Studien. [25]

Eine weitere Option ist die Probenentnahme aus dem Nasenvorhof sowie der mittleren Nasenmuschel.

Diverse andere Abstrichvarianten wurden in Studien genannt. Diese Tatsache führt häufig zu Verwirrung hinsichtlich einer korrekten Entnahme. Weitere Optionen sind demzufolge ergänzende oropharyngeale Abstriche, orale Flüssigkeitsentnahme, Zungen- und Analabstriche. [22] Neben Nachweisen aus den oberen und unteren Atemwegen ist das SARS-CoV-2 Virus ebenfalls in Tränen und Konjunktivalflüssigkeit nachweisbar. [26]

1.5 Diagnostik von SARS-CoV-2: Molekulare und serologische Nachweisverfahren

Aufgrund der pandemischen Ausbreitung des neuartigen Coronavirus bekam die SARS-CoV-2 Diagnostik zunehmende Beachtung. Die Eindämmung der Verbreitung schien essenzieller Bestandteil zur Bekämpfung der Notlage zu sein. Professionelle und flächendeckende Diagnostikmethoden mit hoher Sensitivität und Spezifität wurden weltweit erforscht. Laut des RKI ist eine Indikationsstellung gegeben, sofern klinisch der Verdacht auf eine SARS-CoV-2 Infektion aufgrund anamnestischer oder symptomatischer Befunde gestellt werden kann. [27]

Goldstandard der Diagnostik für das SARS-CoV-2 Virus ist die Real-Time quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion, RT-qPCR. [28] Durch die RT-qPCR ist es möglich, aus humanem Abstrichmaterial geringe virale RNA nachzuweisen. [22]

Die pandemische Lage erforderte den Ausbau der Testkapazitäten. Zügige Identifizierung sowie Sequenzierung ermöglichten eine frühzeitige Erstellung von SARS-CoV-2 Nachweisprotokollen. [29] Die Entwicklung hausinterner Protokolle bürgte eine hohe Arbeitsintensität. Zudem trat durch die hoch frequentierte Durchführung RT-qPCR ein Mangel der dazugehörigen Reagenzien auf. [30-32] Vollautomatisierte Hochdurchsatztests ergänzten fortlaufend die zuvor genutzten RT-qPCR Methoden. [25] Im Jahr 2020 wurden die Assays auf den Geräten c6800 und NMDx für die SARS-CoV-2 Diagnostik zugelassen. [25, 33, 34]

Vorangegangene Infektionen waren ebenso nachweisbar, indem die PatientInnen auf virustypische Immunglobuline oder Gesamtantikörper getestet

wurden. Auch konnten Labore Neutralisationstests entwickeln, welche die Existenz von neutralisierenden Antikörpern nachwiesen. [35]

Zunehmende Relevanz bekam die Identifizierung asymptomatischer und präsymptomatischer PatientInnen, besonders im Schulbereich hinsichtlich Kohortierung oder auch Schulschließungen [36]. Ein zuverlässiges Screeningverfahren besonders für die häufige asymptomatische jüngere Bevölkerung in minimal-invasiver Durchführung wurde in Studien erforscht. Besonders die Gewinnung respiratorischer Materialien aus Speichel, vorderen Nasenabstrichen und Gurgellavage erschien als eine Option. [36-41] Die Detektionsfähigkeit minimal-invasiver respiratorischer Materialien durch die Hochdurchsatzsysteme wie den c6800 und NMDx war bisher unklar. Eine durch die beiden SARS-CoV-2 Assays angestrebte Verlaufskontrolle der Virus-RNA im Rahmen einer Hospitalisierung hatte medizinische Relevanz hinsichtlich einer Isolation und antiviralen Therapie.

2 Ziel meiner Arbeit

Das erste Ziel dieser Studie war es, die Nachweisraten und quantitativen Ergebnisse der empfohlenen Nasenrachen- und Rachenabstriche direkt mit verschiedenen minimal-invasiven Atemwegsproben zu vergleichen. Die minimal-invasiven alternativen Materialien wurden gewonnen durch die Speichelprobe, die Rachenspülung und den Nasenvorhofabstrich.

Die Proben wurden auf den vollautomatischen SARS-CoV-2-Testsystemen des c6800 und NMDx sowie der herkömmlichen Inhouse PCR analysiert. Das zweite Ziel stellte die Gegenüberstellung der drei genannten PCR-Verfahren dar.

Übergeordnet lag der Fokus auf der Suche nach einer minimal-invasiven Alternative zum Goldstandard, dem tiefen Nasenrachenabstrich, um gerade im pädiatrischen Bereich eine Entlastung in der Abstrichgewinnung zu erreichen.

3 Material und Methoden

3.1 Studienpopulation

Die Ein- und Ausschlusskriterien legen die Studienpopulation fest. Um teilzunehmen, mussten die PatientInnen einwilligungsfähig sein und in einem guten physischen Zustand und einem Karnofsky-Index von mindestens 80% sein. Ein automatischer Ausschluss aus der Studie erfolgte bei fehlender Einwilligungsfähigkeit, Ablehnung der Teilnahme oder anatomischer Fehlbildung im studienrelevanten Bereich. Sowohl stationäre als auch ambulante PatientInnen, die mit SARS-CoV-2 infiziert waren, konnten teilnehmen. Inkludiert wurden jedoch ausschließlich hospitalisierte PatientInnen. Die Aufklärung sowie Probenentnahme erfolgte nach einer Schulung durch Mitarbeitende des Instituts für Virologie, durch die zuständigen StationsärztInnen, sowie unter supervidierter Selbstgewinnung.

Ein positives Ethikvotum liegt mit der Studien-Nummer 2021-1291 vor.

Insgesamt wurden 40 PatientInnen unter diesen Voraussetzungen in die Studie aufgenommen. Die Rekrutierung erfolgte im Herbst 2020, zu dieser Zeit existierte noch keine Impfung. Im Februar 2021 wurde die erste klinisch relevante SARS-CoV-2 Variante dokumentiert. Daher ist davon auszugehen, dass die StudienpatientInnen mit dem SARS-CoV-2-Wildtyp infiziert waren.

3.2 Probenentnahme

Die Probengewinnung erfolgte durch die StationsärztInnen oder eingewiesenes medizinisches Personal, sowie durch Selbstgewinnung. Die gewonnenen Proben wurden durch den Transportdienst der Uniklinik Düsseldorf in das Institut für Virologie gebracht und dort bearbeitet.

3.3 Varianten der Probengewinnung

Bei den TeilnehmerInnen wurden fünf verschiedene Varianten der Probengewinnung durchgeführt. Da im besten Fall eine bestätigte Infektion durch einen Nasenrachenabstrich vorlag, mussten innerhalb von 24 Stunden zusätzlich ein Rachenabstrich, ein Nasenvorhofabstrich sowie eine Speichelprobe und eine Rachenspülung durchgeführt werden.

Tabelle 1: Varianten der Probengewinnung

Methode	Besonderheit
Nasenrachenabstrich	• Goldstandard • Entnahme durch geschultes Personal aus dem Nasenrachenraum
Rachenabstrich	• Entnahme durch geschultes Personal aus dem Rachen
Nasenvorhofabstrich	• Entnahme eigenständig durch PatientIn unter professioneller Anleitung • Kreisende Bewegung im Nasenvorhof
Rachenspülung	• Bereitstellung von 0,9% Natriumchlorid in 10 ml Falcon Röhrchen • Professionelle Anleitung zum Gurgeln für zehn Sekunden • Verwenden des Falcon Röhrchen als Auffangbehälter sowie Transportmedium • Kinder: Erleichterung durch Spülung des Cavum oris
Speichel	• Professionelle Anleitung • Belassen eines herkömmlichen Abstrichtupfers für zehn Sekunden im Cavum oris • Konservierung und Transport in Abstrichröhrchen

3.4 PCR-Verfahren

Der Nachweis von SARS-CoV-2 erfolgte mittels drei verschiedener RT-qPCR Verfahren, dem COBAS ® 6800 (C, Roche), dem NMDx (N, Qiagen) und mit der Inhouse (I) RT-qPCR nach Corman et al. 2020. Der NMDx und c6800 basieren auf einem Dual-Target-Assay. Sie detektieren jeweils ein strukturelles und ein nicht-strukturelles Protein.

Tabelle 2: PCR-Verfahren Übersicht

Verfahren	Besonderheit	
NMDx™	TaqMan®-Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren NSP2, N Gene	Vollautomatisierte SARS-CoV-2 Assays
COBAS ® 6800	TaqMan®-Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren ORF1, E Gene	
Inhouse-PCR nach Corman et al. 2020	Real-Time PCR kombiniert in zwei Geräten	

3.5 NMDx[!"]

Der NMDx ist als vollautomatisierter Analysator für Molekularbiologie unter anderem zur Analytik von HIV-1, HCV, HBV und SARS-CoV-2 geeignet. Er arbeitet über ein TaqMan®-Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, um eine qualitative und quantitative Bestimmung der Virus-RNA durch die im Mastermix enthaltenen Primerpaare und Sonden durchzuführen. Verwendet werden können respiratorische Materialien. Ziel ist die Nukleinsäureextraktion, Amplifikation und Detektion in einem Gerät. Der NMDx führt eine Probenaufarbeitung zur Nukleinsäureisolation durch, um parallel eine PCR-Amplifikation zu erzielen. Hinsichtlich der SARS-CoV-2 Diagnostik detektiert dieses Verfahren das Nichtstrukturprotein 2 (NSP 2) sowie das N-Gen des SARS-CoV-2 Virus.

3.6 COBAS ® 6800

Der COBAS ® 6800 hat als vollautomatisierter Analysator für Molekularbiologie unter anderem die Fähigkeit HIV, HCV, HBV, HEV, WNV, HPV und SARS-CoV-2 zu analysieren. Auch dieses Gerät arbeitet über das TaqMan®-Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren. Vergleichbar mit dem NMDx werden die Proben zunächst aufgearbeitet, um die Nukleinsäure zu isolieren und anschließend wird das Genom über eine PCR amplifiziert. Die Primer für die entsprechende Amplifikation werden über den spezifischen Mastermix supplementiert. Der c6800 SARS-CoV-2 Test ermöglicht einen qualitativen Nachweis von RNA des SARS-CoV-2 Virus aus respiratorischen Materialien. Der SARS-CoV-2 Assay

Nasenvorhofabstrich mit 89,7%. Speichel und Rachenspülung konnten eine Positivrate von 82,1% erreichen.

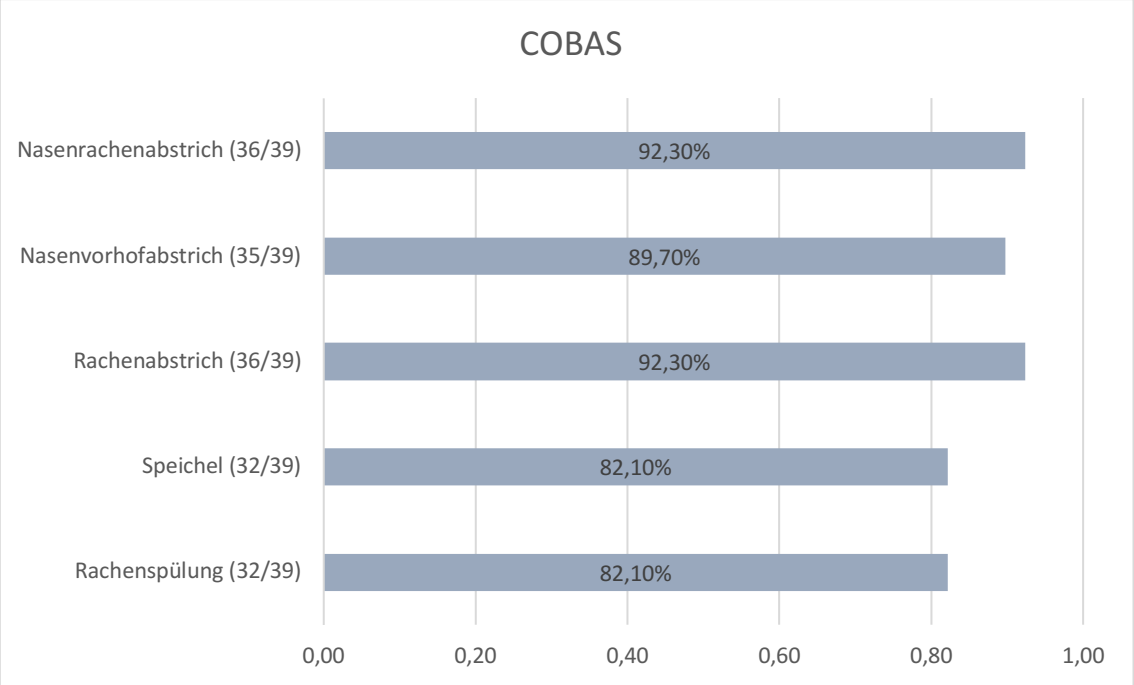

Abbildung 2: Positivrate Cobas ® 6800 SARS-CoV-2: Prozentuale Darstellung der SARS-CoV-2 Nachweise durch die verschiedenen Materialien durch den Cobas ® 6800.

Durch den SARS-Cov-2 Assay des NMDx wurden die meisten Proben mit 94,9% mit dem Nasenrachenabstrich erkannt. Die gleiche Rate erreichten Nasenvorhofabstrich und Rachenabstrich mit 92,3%. Der Speichel errang eine Rate von 76,9% und die Rachenspülung letztlich mit 27 detektierten Proben 69,2%.

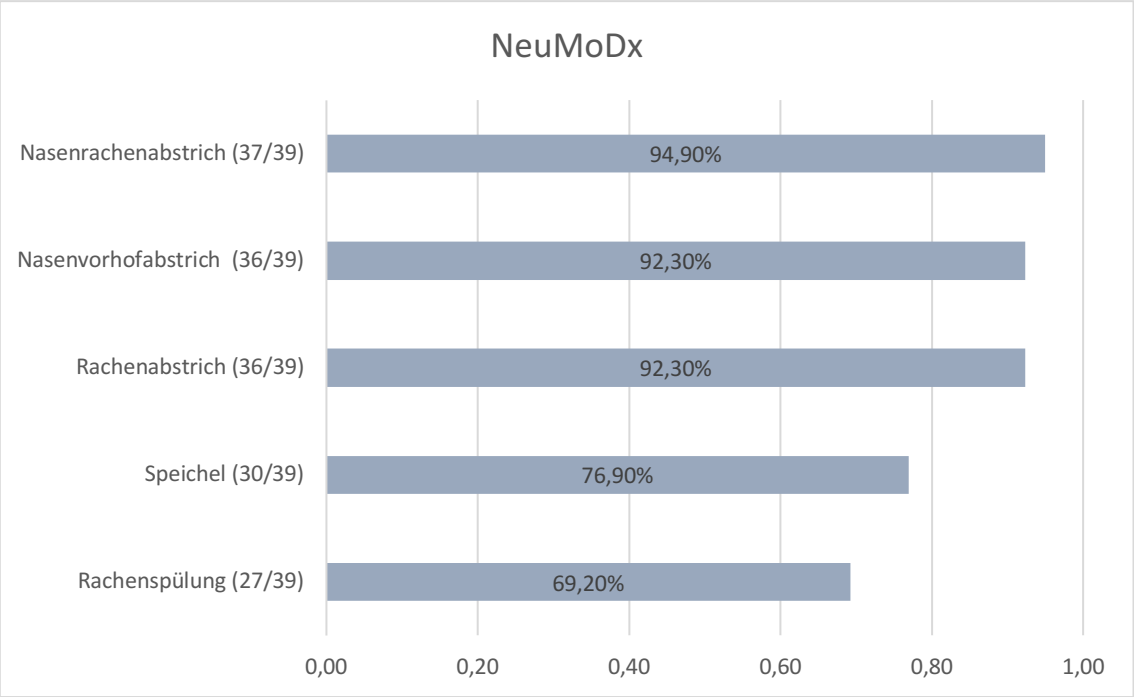

Abbildung 3: Positivrate NMDx SARS-CoV-2: Prozentuale Darstellung der SARS-CoV-2 Nachweise durch die verschiedenen Materialien durch den NMDx

Die Inhouse PCR konnte mit dem Nasenrachenabstrich 89,7% der SARS-CoV-2 Proben als richtig positiv erkennen. Absteigend wurden 69,2% durch den Rachenabstrich und 66,7% durch den Nasenvorhofabstrich detektiert. Die Rachenspülung wies eine Positivrate von 51,1% nach und der Speichel 46,2%.

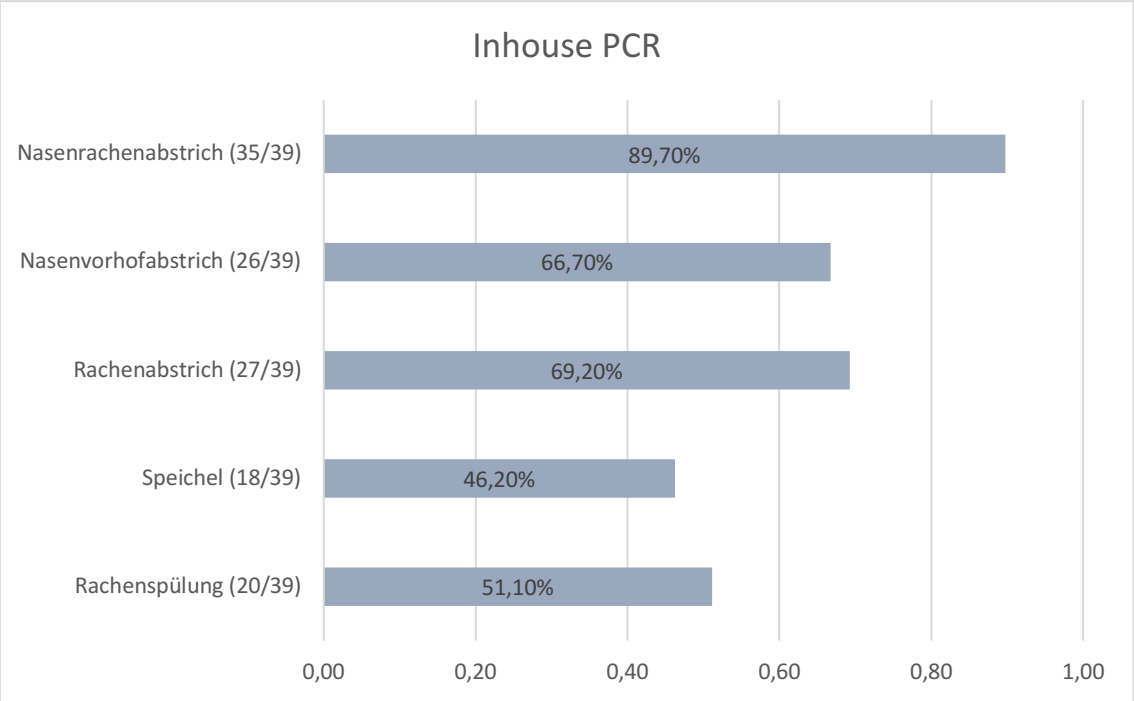

Abbildung 4: Positivrate Inhouse PCR SARS-CoV-2<. Prozentuale Darstellung der SARS-CoV-2 Nachweise durch die verschiedenen Materialien durch die Inhouse PCR

Für den Nasenrachenabstrich wurden zwischen den verschiedenen Nachweismethoden vergleichbare hohe Detektionsraten für den Nachweis von SARS-CoV-2 beobachtet. So wies der c6800 92,3% nach, der NMDx 94,9% und die Inhouse PCR konnte 89,7% als richtig positiv identifizieren. Weitgehend übereinstimmende Raten dokumentierte der Rachenabstrich mit 92,3% im c6800 und NMDx. Die Inhouse PCR detektierte beim Rachenabstrich jedoch nur 69,2% der Rachenabstriche als positiv für SARS-CoV-2. Betrachtet man den Nasenvorhofabstrich als eine minimal-invasive Alternative, erfasste der c6800 89,7% der positiven Proben und der NMDx 92,3%. In der Inhouse PCR konnten 66,7% der Nasenvorhofabstriche ein positives Ergebnis erzielen. Speichel als ein weiteres minimal-invasiv gewonnenes respiratorisches Material wies niedrigere Nachweisraten auf. 82,1% wurden durch den c6800, 76,9% durch den NMDx und 46,2% durch die Inhouse PCR detektiert. Analogie zu der Speichelprobe zeigte auch die Rachenspülung mit geringeren Positivenraten. Hier wurden 82,1% durch den c6800, 69,2% durch den NMDx und 51,1% in der Inhouse PCR als positiv erkannt.

Zur genaueren Übersicht der Stärke der einzelnen Probevarianten hinsichtlich der Detektionskraft von SARS-CoV-2 wurden die Mittelwerte der Proben betrachtet.

Die aus den jeweiligen Positivraten errechneten Mittelwerte zeigen dieselbe Tendenz der Detektionsraten (Tabelle 7). Errechnet wurden diese anhand der Raten für die einzelnen Entnahmevarianten für jedes Analyseverfahren. Der Nasenrachenabstrich konnte die höchste Positivrate mit 92,3% erzielen. Rachenabstrich und Nasenvorhofabstrich ergaben ähnlich hohe Resultate mit 84,6% im Rachenabstrich und 82,9% im Nasenvorhof. Die niedrigsten Ergebnisse wurden durch Speichel mit 68,4% und Rachenspülung mit 67,5% detektiert.

Tabelle 7: Durchschnittliche Positivraten nach Probenentnahmeverfahren:
Durchschnittliche Positivraten der SARS-CoV-2 Detektion nach Probenentnahmeverfahren durch c6800, NMDx und Inhouse PCR

Abstrichmaterial	Durchschnittliche Positivrate
Nasenrachenabstrich	92,3%
Rachenabstrich	84,6%
Nasenvorhofabstrich	82,9%
Speichel	68,4%
Rachenspülung	67,5%

4.3 Konkordanzen und Detektionsrate

Es erfolgte die Gegenüberstellung der Konkordanzen des Rachenabstrichs, des Nasenvorhofabstrichs, der Speichelprobe sowie der Rachenspülung durch den COBAS ® 6800 von Roche verglichenen Proben mit dem Goldstandard Nasenrachenabstrich (Abbildungen 5-7).

Der c6800 zeigte bei den durch Nasenvorhof- und Rachenabstriche gewonnenen respiratorischen Materialien eine Übereinstimmung von 85 %. (Abbildung 5). Mit der Speichelprobe war eine Detektionsrate von 77% zu erzielen, 15% der positiven Nasenrachenproben konnten durch die Speichelproben nicht erkannt werden. Die Rachenspülung erzielte 74% übereinstimmende positive Proben, 18% der positiven Vergleichsproben konnten nicht detektiert werden. In den

Detektionsraten auf Basis des SARS-CoV-2 Assays des c6800 zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem Nasenrachenabstrich und den vier alternativen Abstrichen.

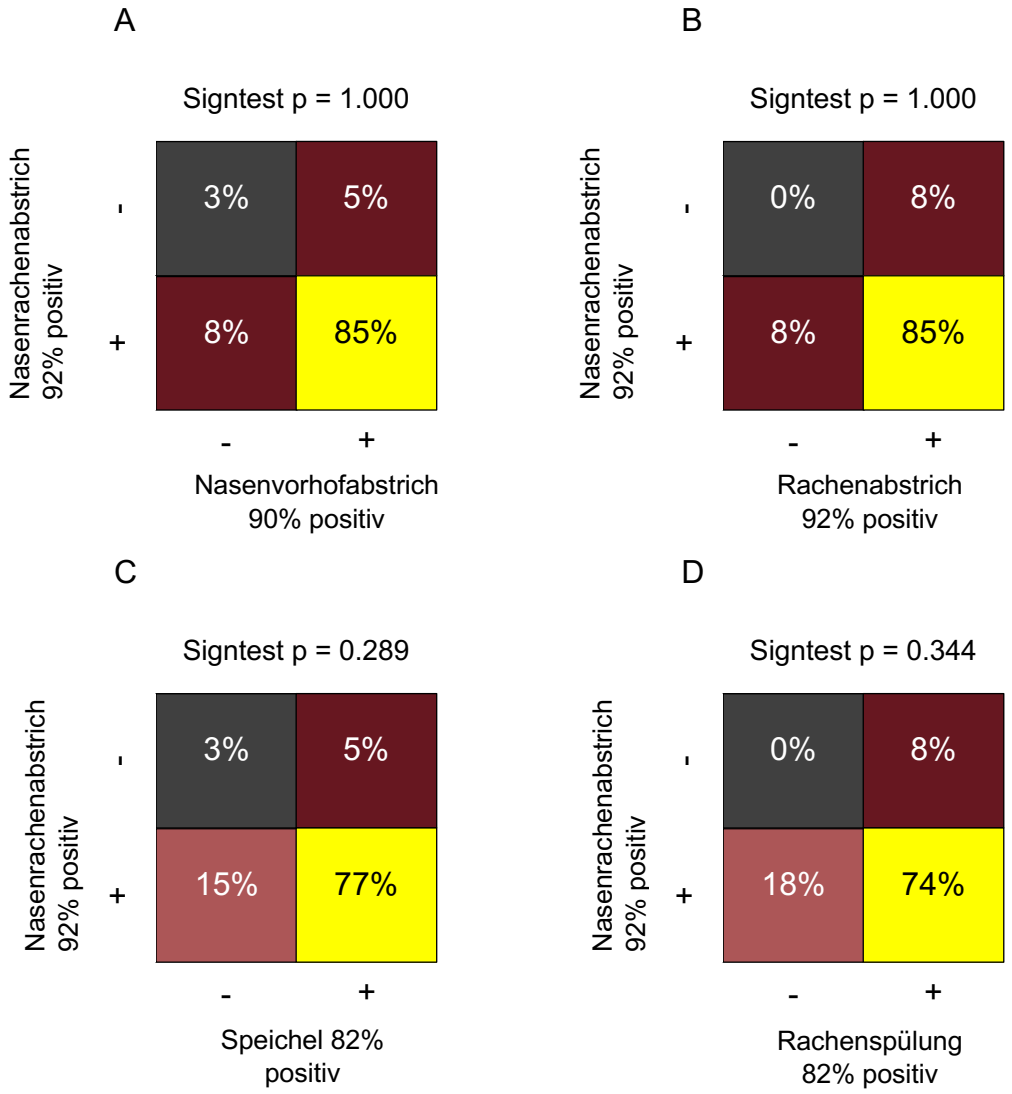

Abbildung 5: Übereinstimmung der SARS-CoV-2-Nachweisrate verschiedener Atemwegsproben im Vergleich zum Nasenrachenabstrich – c6800
A: Vergleich Nasenrachenabstrich zum Nasenvorhofabstrich;
B: Vergleich Nasenrachenabstrich zum Rachenabstrich;
C: Vergleich Nasenrachenabstrich zum Speichel;
D: Vergleich Nasenrachenabstrich zur Rachenspülun

Des Weiteren erfolgte die Gegenüberstellung der Konkordanzen in der SARS-CoV-2 Testung des Rachenabstrichs, des Nasenvorhofabstrichs, der Speichelprobe sowie der Rachenspülung mit dem Nasenrachenabstrich durch den entsprechenden Assay des NMDx™. Der Nasenvorhofabstrich und der Rachenabstrich erreichten eine Übereinstimmung von 87%. Durch die

Speichelprobe konnte lediglich eine Übereinstimmung in 74% der Fälle erreicht werden. 21% der Speichelproben ergaben einen falsch negativen Wert. In der Rachenspülung konnte sogar nur in 64% der Proben eine Übereinstimmung nachgewiesen werden und 31% der Rachenspülungen wurden als falsch negativ klassifiziert. Die Speichelproben und die Rachenspülungen zeigten signifikant schlechtere SARS-CoV-2 Detektionsraten (Speichel: p=0,039; Rachenspülung p=0,013).

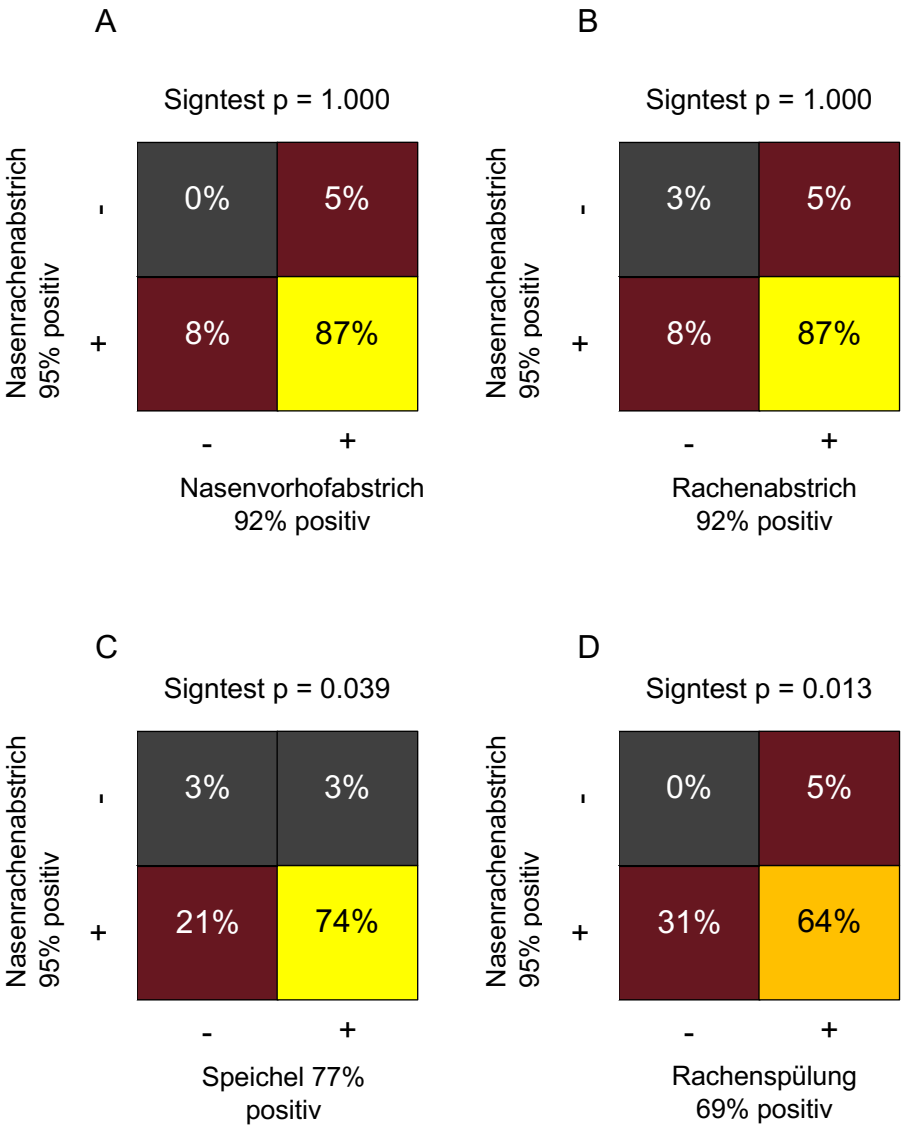

Abbildung 6: Übereinstimmung der SARS-CoV-2-Nachweisrate verschiedener Atemwegsproben im Vergleich zum Nasenrachenabstrich – NMDx
A: Vergleich Nasenrachenabstrich zum Nasenvorhofabstrich;
B: Vergleich Nasenrachenabstrich zum Rachenabstrich;
C: Vergleich Nasenrachenabstrich zum Speichel;
D: Vergleich Nasenrachenabstrich zur Rachenspülun

Zusätzlich wurden die Berechnungen für die Inhouse PCR durchgeführt. Es ergaben sich geringere Übereinstimmungen verglichen zu den SARS-CoV-2 Testen auf dem Cobas und dem NMDx. . Auch hier erfolgte die Analyse der Gegenüberstellung zum Nasenrachenabstrich. Für den Nasenvorhofabstrich betrug die Konkordanz 67%, für den Rachenabstrich 64%, für die Speichelprobe 46% und für die Rachenspülung 51%. Alle Proben der alternativen respiratorischen Materialien verzeichneten einen signifikant hohen Anteil an falsch negativen Ergebnissen. Beim Nasenvorhofabstrich betrug dieser 23%, beim Rachenabstrich 26%, beim Speichel 44% und bei der Rachenspülung 38%.

Der Anteil der falsch-negativen Ergebnisse betrug in allen minimalinvasiven Varianten mindestens 20 %. Demnach wies die Inhouse PCR in dieser Studie in allen Vergleichen einen signifikanten Unterschied zum Nasenrachenabstrich nach. In dieser Darstellung sticht ein manifester Unterschied zu den kommerziellen SARS-CoV-2 Testungen heraus.

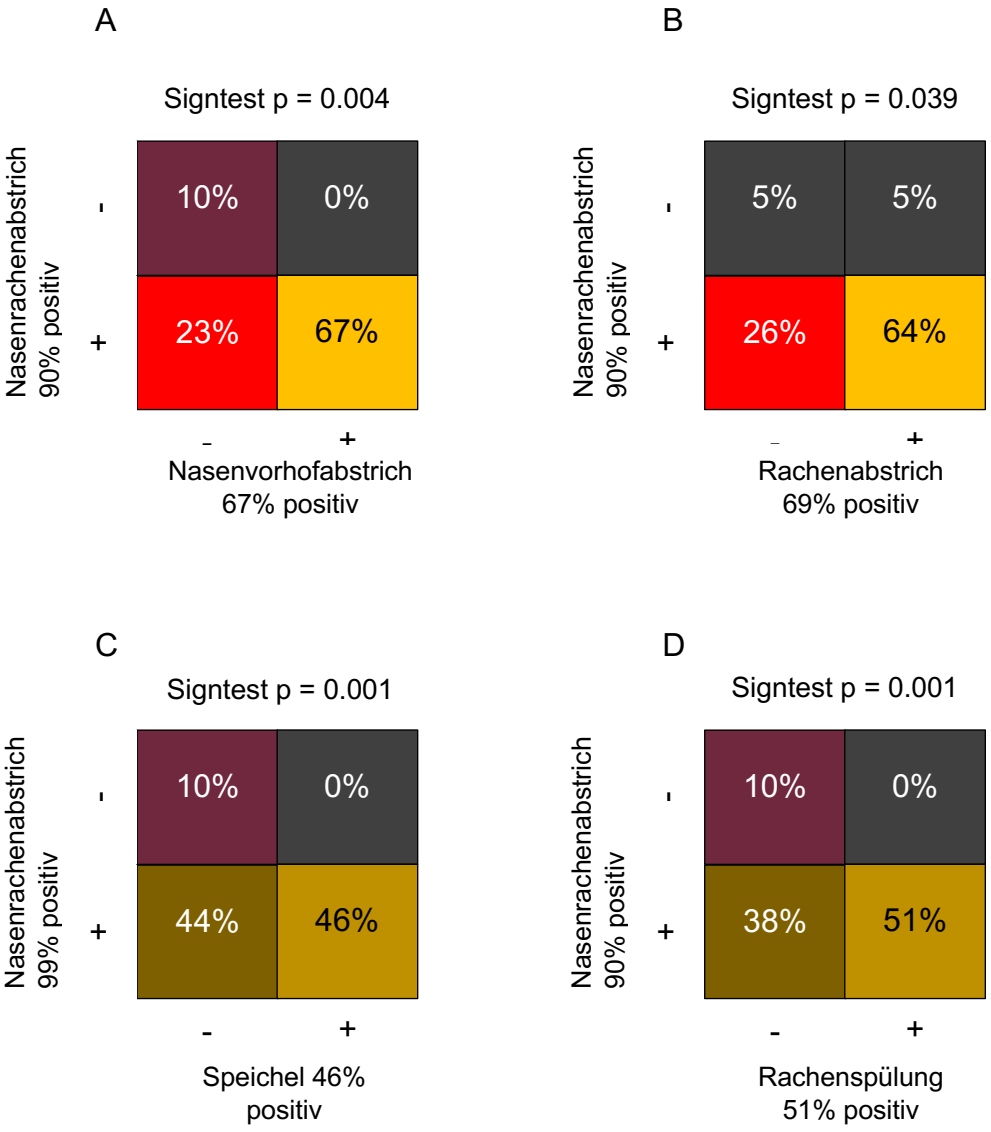

Abbildung 7: Übereinstimmung der SARS-CoV-2-Nachweisrate verschiedener Atemwegsproben im Vergleich zum Nasenrachenabstrich – Inhouse-PCR
A: Vergleich Nasenrachenabstrich zum Nasenvorhofabstrich;
B: Vergleich Nasenrachenabstrich zum Rachenabstrich;
C: Vergleich Nasenrachenabstrich zum Speichel;
D: Vergleich Nasenrachenabstrich zur Rachenspülung

Insgesamt stellten sich unterschiedliche Nachweisraten zwischen den PCR-Verfahren verglichen zum Nasenrachenabstrich heraus. Dabei zeigte der c6800 durchschnittlich die höchsten Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen

respiratorischen Materialien. Während Proben aus dem Nasenvorhof und dem Rachen eine hohe Detektionsrate in allen Analyseverfahren zeigten, waren die Raten durch Speichel und Rachenspülung niedriger. Insbesondere bei der Speichelprobe und der Rachenspülung war die Nachweisrate von SARS-CoV-2-RNA mit dem NMDx niedriger als mit dem c6800. Wiederum geringere Nachweisraten von SARS-CoV-2-RNA wurden bei den zuletzt genannten Proben durch die Inhouse PCR erreicht.

4.4 SARS-CoV-2 RNA-Konzentrationen

Neben der qualitativen Untersuchung bildet die quantitative Vergleichsanalyse eine weitere zentrale Fragestellung. Ein weiterer Schwerpunkt der Analysen lag somit auf den SARS-CoV-2-RNA-Konzentrationen in den verschiedenen Analyseverfahren und Abstrichmaterialien. (Abbildungen 8-11)

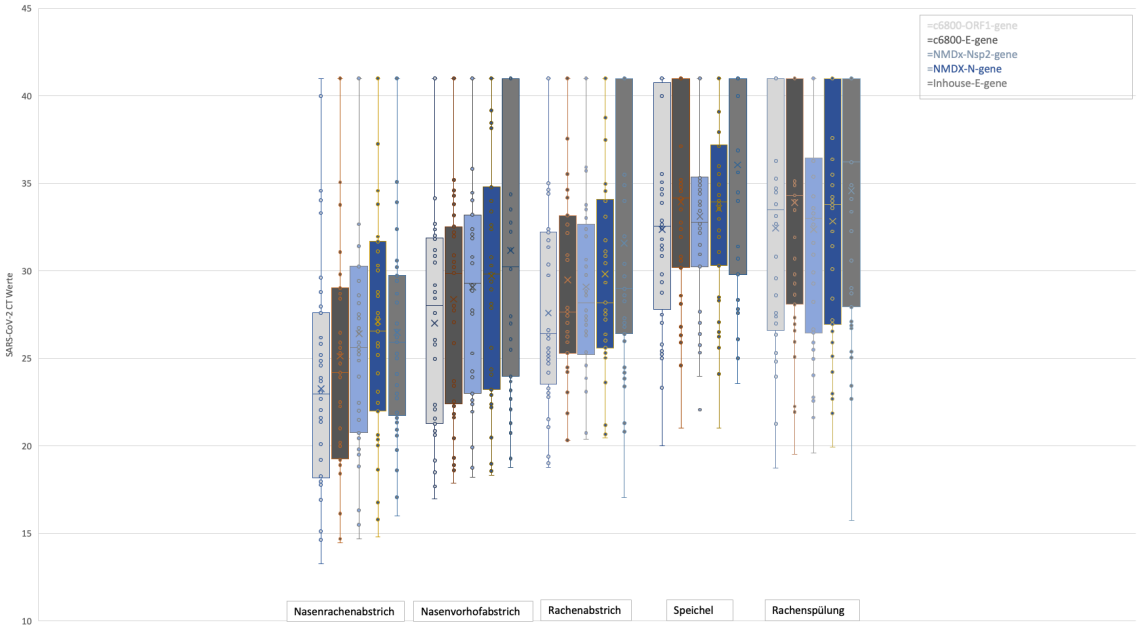

Abbildung 8: Die mit den SARS-CoV-2-Assays ermittelten Ct-Werte für das c6800 und den NMDx und die Inhouse PCR. Die Anzahl der PCR-Zyklen ist bei den Assays auf 40 begrenzt. Für nicht nachgewiesene Proben wird ein Ct-Wert von 41 angesetzt. Der Median des Ct-Wertes und der IQR (25%75%) sind in den Balken angegeben.

Die Anzahl der PCR-Zyklen ist bei den Assays auf 40 begrenzt. Für nicht nachgewiesene Proben wird ein Ct-Wert von 41 angesetzt. Der Median des Ct-Wertes und der IQR (25%75%) werden angegeben (Abbildung 8).

Die detektierten Ct-Werte der SARS-CoV-2 Analysen zeigten klare Unterschiede in Anhängigkeit von den Zielgenen der jeweiligen PCR-Untersuchung sowie der verwendeten respiratorischen Materialien (Abbildung 8). Der

Nasenrachenabstrich zeigte die niedrigsten Ct-Werte (Ct 25,02), gefolgt vom Rachenabstrich (Ct 27,8) und Nasenvorhofabstrich (Ct 29,4). Bei den Speichelproben und Rachenspülungen ergaben sich Ct-Werte >33 (Ct: 33,3, Ct 34,1).

Die kommerziellen SARS-CoV-2 Testungen c6800 und NMDx detektieren jeweils ein strukturelles und ein nicht-strukturelles Gen. Unterscheidet man diese verschiedenen Proteine, ergaben die nicht-strukturellen Proteine Nsp2 und ORF1 unabhängig vom Material geringere Ct-Werte in der Analyse. Lediglich im Rachenabstrich ergab das Nsp1-gene den gleichen medianen Ct-Wert wie das strukturelle N-Gen. Das strukturelle Inhouse-E-Gen ergab höhere Ct-Werte.

Korrelierend zu den Ct-Werten müssen die Viruslasten betrachtet werden.

Insgesamt wurden mit dem c6800 und dem NMDx SARS-CoV-2 Test ähnliche RNA-Konzentrationen gemessen. Der berechnete Median des Nasenrachenabstrich gab beim c6800 6,217 log10 Kopien/ml an und beim NMDx 6,971 log10 Kopien/ml. Die Inhouse PCR erreichte beim Goldstandard Nasenrachenabstrich einen niedrigeren medianen Wert von 6,135 log10 Kopien/ml. (Tabelle 9)

In der Berechnung der Differenz der RNA-Konzentrationen der respiratorischen Vergleichsmaterialien zum Nasenrachenabstrich zeigte der Nasenvorhofabstrich im Durchschnitt die geringste Differenz jeweils im Median mit -1,202 log10 Kopien/ml im c6800 und -0,439 log10 Kopien/ml im NMDx auf. Insofern ist die geringste Abweichung der Viruslasten zum Goldstandard durch den Nasenvorhofabstrich im NMDx zu erreichen.

Speichel und Rachenspülungen zeigten größere Abweichungen zum Goldstandard in allen PCR-Verfahren.

Tabelle 8: Vergleich der SARS-CoV-2-RNA-Konzentrationen in verschiedenen Atemwegsproben, analysiert mit dem c6800 und dem NMDx-SARS-CoV-2 Assay sowie der Inhouse SARS-CoV-2 PCR

Δ SARS-CoV-2 RNA (log10; median)					
	Nasenrachen-abstrich	**Nasenvorhof-abstrich**	**Rachenabstrich**	**Speichel**	**Rachen-spülung**
Cobas ®6800 log10 Kopien/ml (median) (ΔNR)	6,217	5,014 (-1,202)	5,453 (-0,764)	3,866 (-2,350)	3,839 (-2,378)
NMDxlog10 Kopien/ml (median) (ΔNR)	6,971	6,531 (-0,439)	5,355 (-1,616)	4,783 (-2,188)	4,606 (-2,365)
Inhouse PCR log10 Kopien/ml (median) (ΔNR)	6,135	4,910 (-1,225)	5,259 (-0,876)	0 (-6,135)	3,194 (-2,941)

Zusammenfassend konnten unabhängig von der RT-qPCR-Methode mit dem Nasenrachenabstrich höhere Viruslasten detektiert werden als mit den anderen respiratorischen Materialien (p=0,001). Dabei zeigte der Abstrich des Nasenvorhofs noch die höchste Sensitivität (Δ SARS-CoV-2 RNA (log10; median) c6800 = -1,202 log10 Kopien/ml, NMDx=-0,439 log10 Kopien/ml, I= -1,225 log10 Kopien/ml) (Tabelle 8).

Rachenabstrich und Nasenvorhofabstrich zeigten hingegen auf allen Plattformen vergleichbare Viruslasten (Abbildung 9-11). Der c6800 detektierte mit dem Nasenvorhof 5,014 log10 Kopien/ml und mit dem Rachenabstrich 5,453 log10 Kopien/ml. Der NMDx erkannte 6,531 log10 Kopien/ml mit dem Nasenvorhofabstrich und 5,355 log10 Kopien/ml mit dem Rachenabstrich. Durch die Inhouse PCR wurden mit dem Nasenvorhofabstrich 4,910 log10 Kopien/ml und mit dem Rachenabstrich 5,259 log10 Kopien/ml detektiert. Ein qualitatives Merkmal aus diesen Ergebnissen ist, dass sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den RNA-Konzentrationen zwischen dem Rachenabstrich und dem Nasenvorhofabstrich in allen drei PCR-Verfahren ergibt (c6800: 5,453 log10 Kopien/ml und 5,014 log10 Kopien/ml, p=0,637, und NMDx: 5,355 log10 Kopien/ml und 6,531 log10 Kopien/ml, p=0,482, und I: 5,259 log10 Kopien/ml und 4,910 log10 Kopien/ml, p= 0,993) (Tabelle 8, Abbildung 9 – 11).

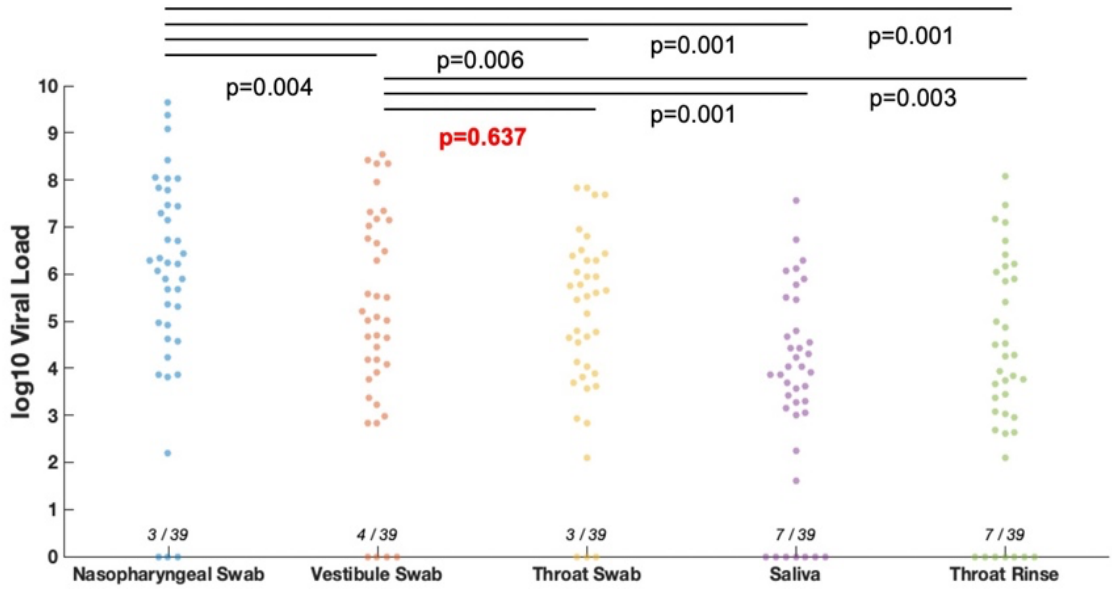

Abbildung 9: Vergleich der SARS-CoV-2-RNA-Konzentrationen verschiedener Atemwegsproben, die für das c6800-System bestimmt wurden

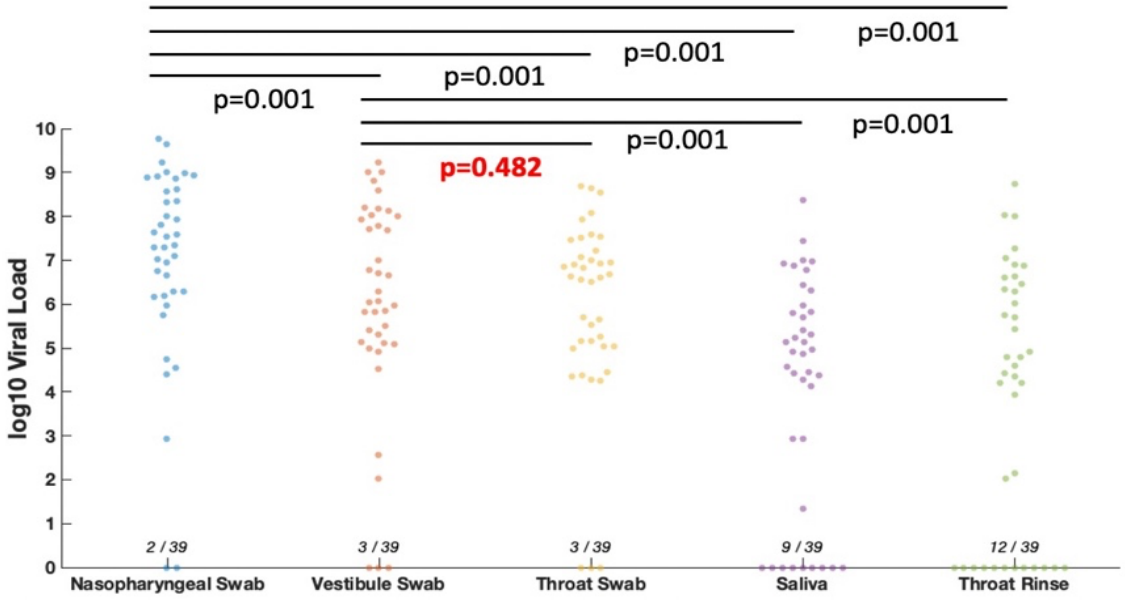

Abbildung 10: Vergleich der SARS-CoV-2-RNA-Konzentrationen verschiedener Atemwegsproben, die für das NMDx-System bestimmt wurden

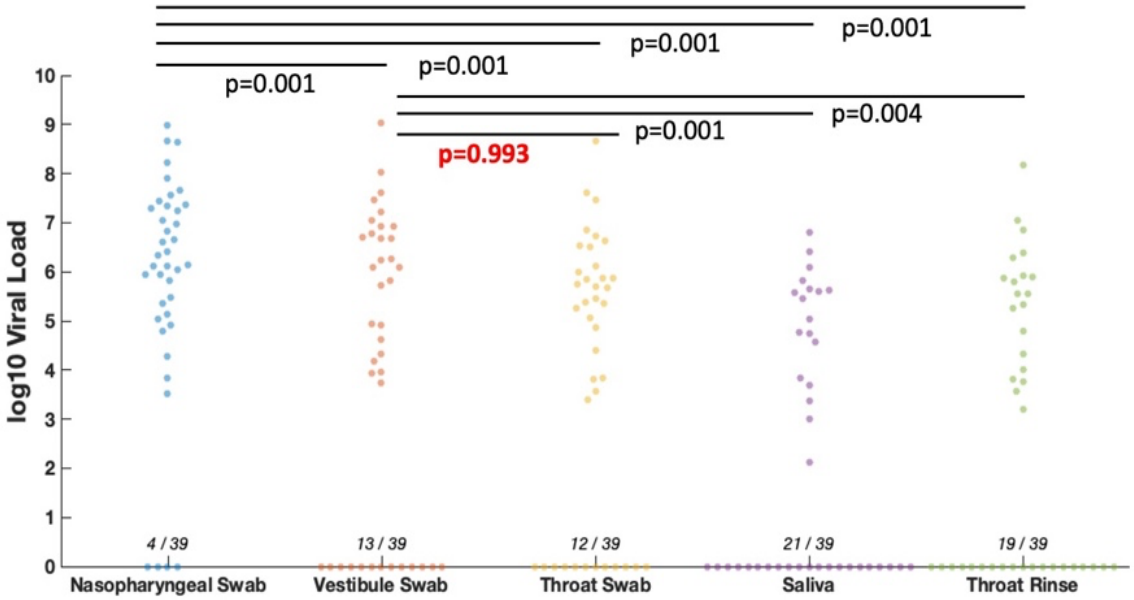

Abbildung 11: Vergleich der SARS-CoV-2-RNA-Konzentrationen verschiedener Atemwegsproben, die das Inhouse-System bestimmt wurden

4.5 Nachweisrate im Kontext der Isolation

Unter Berücksichtigung der vom Robert-Koch-Institut empfohlenen Entlassungskriterien, die einen Schwellenwert von 10^6 SARS-CoV-2-Kopien pro ml definieren, wurden die verschiedenen Analyseverfahren hinsichtlich ihrer Relevanz für das Patientenmanagement bewertet. Dabei wurden ausschließlich Proben mit Viruslasten > 10^6 berücksichtigt, da nur diese für die Entscheidungsfindung im Patientenmanagement von Bedeutung waren, da es sich bei den inkludierten PatientInnen um hospitalisierte Personen handelte. Insgesamt sieht man geringere Detektionsraten unterhalb des Schwellenwertes von 10^6 SARS-CoV-2 Kopien pro/ml. In allen drei PCR-Verfahren zeigte der Nasenrachenabstrich, sowohl oberhalb als auch unterhalb des Schwellenwerts von 10^6 Kopien pro ml die höchste Rate.

Bei einer Viruslast von über 10^6 Kopien/ml zeigte sich eine deutlich höhere Detektionsrate in allen Matrices und PCR-Verfahren. Eine 100% Detektionsrate ergaben sich durch den Nasenrachenabstrich in allen drei Analyseverfahren oberhalb des Schwellenwertes (c6800: 100%, NMDx: 100%, I: 100%). Auch der Rachenabstrich konnte in den kommerziellen Testungen mit dem c6800 und dem NMDx eine garantierte Detektion mit 100% oberhalb 10^6 SARS-CoV-2 Kopien pro/ml erzielen (c6800: 100%, NMDx: 100%).

Bei Viruslasten unter 10^6 SARS-CoV-2 Kopien pro/ml ergaben sich durch den Cobas ® 6800 geringere Werte als bei der Kohorte mit höheren Viruslasten über 10^6 Kopien/ml. Der Nasenrachenabstrich detektierte unter 10^6 SARS-CoV-2 Kopien pro/ml mit 83% die meisten Proben. Rachenabstrich und Nasenvorhofabstrich ergaben mit 67% deutlich geringere Resultate. Absteigend konnte die Speichelprobe 61% der Proben unter 10^6 Kopien/ml als positiv nachweisen und mit der Rachenspülung wurden 50% der positiven Proben erkannt. Durch die Rachenspülung erkannte der c6800 oberhalb der 10^6 SARS-CoV-2 Kopien pro/ml 95% der Proben, durch den Speichel 86%. (Abbildung 12).

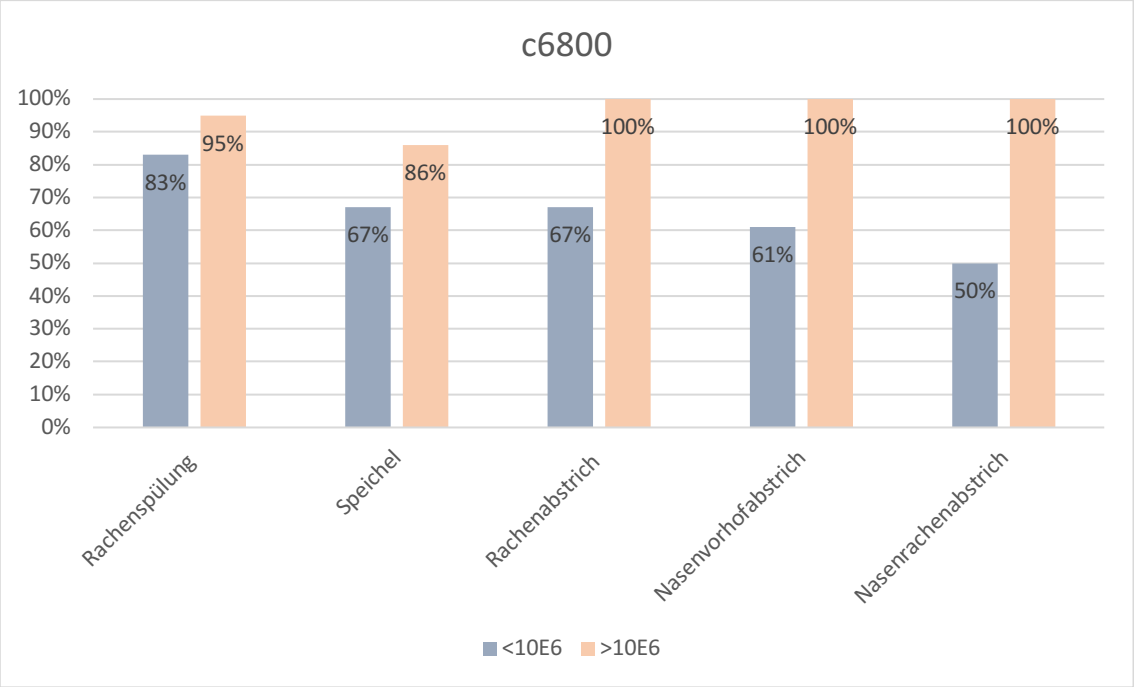

Abbildung 12: c6800_Nachweisrate bei <10E6 & >10E6; SARS-CoV-2 RNA Kopien/ml

Beim NMDx zeigten sich ähnliche Tendenzen der Raten im Kontext der Endisolation. Der Nasenrachenabstrich sowie der Nasenvorhofabstrich erbrachten Detektionen für 75% der Proben bei < 10^6 Kopien/ml. Der Rachenabstrich und die Speichelprobe detektierten jeweils 63%. Lediglich 38% der Proben unter 10^6 Kopien/ml wurden durch die Analyse der Rachenspülung als positiv erfasst. (Abbildung 13)

Oberhalb des Schwellenwertes von 10^6 Kopien/ml wurden 100% der jeweiligen Patientenproben aus Nasenrachenabstrich und Rachenabstrich durch den NMDx detektiert. Auch der Nasenvorhofabstrich ergab mit 97% eine hohe Detektionsrate. (Abbildung 13)

In der Unterscheidung der niedrigeren und höheren Viruslast beim Schwellenwert von 10^6 Kopien/ml zeigten sich durch die Analyse mit dem NMDx größere Unterschiede als mit dem c6800, da durch den c6800 mit drei Matrices (Nasenrachenabstrich, Rachenabstrich und Nasenvorhofabstrich: 100%) eine einhundertprozentige Detektion erreicht wurde. Der NMDx konnte dies in zwei Materialien (Nasenrachenabstrich und Rachenabstrich: 100%) erreichen.

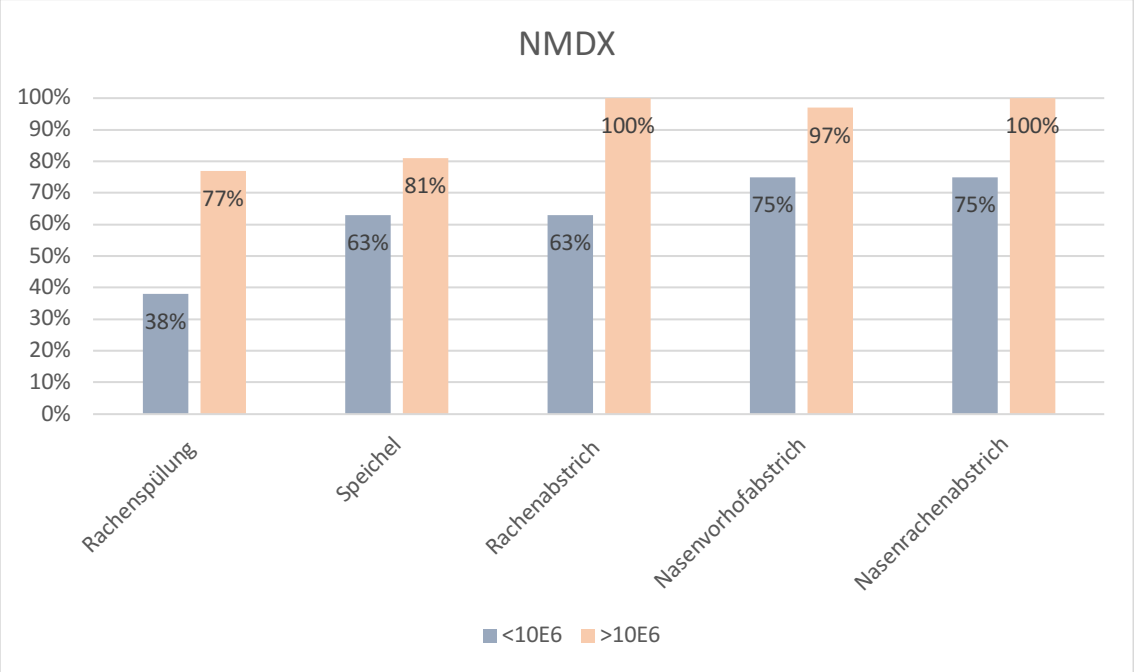

Abbildung 13: NMDx_Nachweisrate bei <10E6 & >10E6; SARS-CoV-2 RNA Kopien/ml

Die Inhouse PCR wurde hinsichtlich derselben Kriterien begutachtet. Insgesamt verzeichnete sich ein heterogeneres Bild als bei den beiden kommerziellen Assays, dem c6800 und NMDx. Für die Viruslast unter 10^6 Kopien/ml konnten durch den Goldstandard, den Nasenrachenabstrich, 75% der Proben als positiv erkannt werden. Der Rachenabstrich ergab einen Wert von 56%. Durch den Nasenvorhofabstrich und die Speichelprobe wurden Nachweisraten von 31% erzielt. Die Rachenspülung zuletzt ergab 44% (Abbildung 14).

Betrachtet man die Ergebnisse für eine Viruslast über 10^6 Kopien/ml, erreichte der Nasenrachenabstrich eine Rate von 100% durch die Inhouse-PCR. Durch den Rachenabstrich wurden in 78% der Proben das SARS-CoV-2 Virus nachgewiesen, durch den Nasenvorhofabstrich 91%. Die Speichelprobe und die Rachenspülung detektierten 57%. (Abbildung 14)

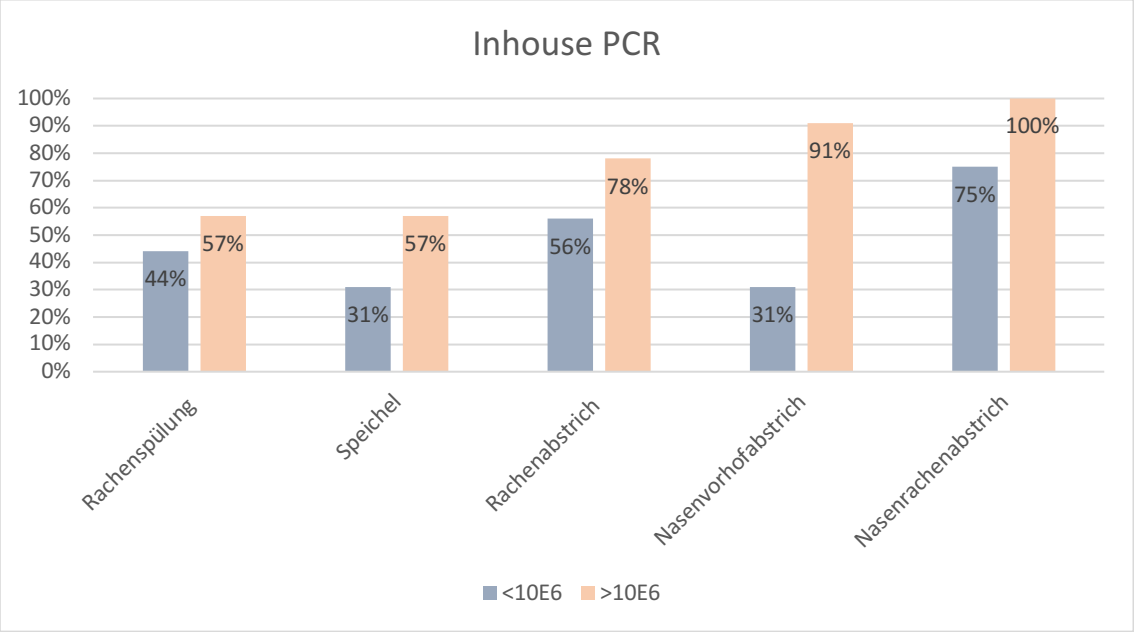

Abbildung 14: Inhouse PCR_Nachweisrate <10E6 & >10E6; SARS-CoV-2 RNA Kopien/ml

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Cobas und NMDx SARS-CoV-2 Test mit dem Nasenrachen-, Rachen- und Nasenvorhofabstrich 95-100% der Proben bei einer Viruslast > 10^6 Kopien/ml detektierten. Die Inhouse PCR ergab geringere Werte, da bei einer Viruslast > 10^6 Kopien/ml nur 78-100% detektiert werden und eine größere Distanz des Goldstandards Nasenrachenabstrich zu den alternativen Materialien besteht.

5 Diskussion

Aufgrund der weltweiten Ausbreitung des neuartigen SARS-CoV-2 Virus, entwickelten sich die diagnostischen Methoden zügig weiter. Es bestand die Notwendigkeit zuverlässiger Testverfahren zum Nachweis von SARS-CoV-2 in kürzester Zeit. Hersteller produzierten diverse kommerzielle Testverfahren. [34] Effizienz der Diagnostik rückte im Zuge der pandemischen Entwicklung zunehmend in den Fokus. Es entstanden neben den kommerziellen PCRs zusätzlich Assays für automatisierte Plattformen wie den COBAS® 6800 oder NMDx^{TM}. [52].

Die herkömmlichen Probenentnahmen sind sehr unangenehm für die PatientInnen, da sie eine invasive Entnahme aus dem oberen respiratorischen Trakt bedingen. Gerade bei Kindern stellen die Entnahmen ein großes Problem dar. Um die SARS-CoV-2 Diagnostik bei Kindern zu optimieren, wurden im Rahmen dieser Studie alternative minimal-invasive Methoden der Probengewinnung getestet. Die Eigenschaft der geringeren Invasivität kann in pädiatrischen Bereichen Erleichterung bringen, da sich die herkömmliche Probengewinnung durch den Nasenrachenabstrich invasiv und gerade bei Kindern unangenehm darstellt. [36, 53] Zum einen wurden die von Herstellern empfohlenen Abstriche des Nasenrachenraums und des Rachens verwendet, zum anderen der Nasenvorhofabstrich, die Speichelprobe und die Rachenspülung.

Als Goldstandard zur Probengewinnung gilt der tiefe Nasenrachenabstrich. [22] Der nasopharyngeale Abstrich ist nur durch geschultes Personal durchführbar und für die PatientInnen unangenehm. Komplikationen wie Epistaxis oder Schädelbasisdefekte sind in der Vergangenheit beschrieben worden. Auch reaktives Husten, Übelkeit oder Niesen während der Probenentnahme durch die PatientInnen können vermehrt auftreten. [21, 22] Dies setzte das medizinische Personal einem erhöhten Infektionsrisiko aus. Aufgrund der Notwendigkeit von geschultem Fachpersonal wurde vermehrt persönliche medizinische Schutzkleidung verwendet, welche in der Pandemie eine limitierte Ressource darstellte. [22] Die nasopharyngeale Probenentnahme führte bei vielen PatientInnen zu Übelkeit und Erbrechen, Nervosität, Angst, Husten, Bronchopasmolyse oder Dyspnoe. Es bestanden keine signifikanten

Unterschiede des Grades der Unannehmlichkeiten bei medizinischem oder nicht-medizinischem Personal, sodass ein genereller Diskomfort angenommen werden kann. Frauen hatten zudem mehr Beschwerden durch die Probenentnahme als Männer. [21] Ein weiterer Nachteil dieser Form der Entnahme ist zudem die Voraussetzung eines Mediums sowie Abstrichstäbchen, welche weltweit einer großen Nachfrage ausgesetzt waren. [22-24]

Die angestrebten Testungen wurden auf drei verschiedenen Plattformen durchgeführt, um einen Vergleich für eine optimierte und effiziente Arbeit zu erzielen. Zwei automatisierte und eine herkömmliche Real-Time PCR mit Reverser Transkription wurden miteinander verglichen. Der COBAS ® 6800 ist schon seit vielen Jahren Bestandteil in der virologischen Diagnostik. Der NMDx befindet sich seit dem Jahr 2018 in kommerzieller Nutzung und stellt das neuste der drei verwendeten Geräte dar. Die Vollautomatisierung ermöglicht einen höheren Probendurchsatz in kürzerer Zeit. Schon im Herbst 2020 war seitens der Hersteller eine automatisierte Real-time PCR möglich, da die Amplifikation durch Open-Channel-Reagenzien durchführbar wurde. Ökonomisch orientierte SARS-CoV-2 Assays wurden im Zuge der Pandemie produziert. [29] Diese beiden Plattformen arbeiten über ein duales Target-System. In Vergleichstestungen zeigten beide plausible diagnostische Ergebnisse. [54, 55] Die Inhouse-PCR nutzt im Gegenzug nur ein Zielgen, das strukturelle E-gene. [49] Diese Studie testete insgesamt 200 respiratorische Proben von 40 PatientInnen auf jeweils drei verschiedenen Plattformen.

Betrachtet man die Detektionsraten der verschiedenen respiratorischen Materialien, sind Unterschiede festzustellen. Zudem variierten die Plattformen deutlich in ihrer Detektionskraft.

In der vergleichenden Untersuchung der Atemwegsproben zwischen dem c6800 und NMDx SARS-CoV-2 Test zeigten sich in unseren Daten im Nasenrachen-, Rachen- oder Nasenvorhofabstrich keine signifikanten Unterschiede im Nachweis einer SARS-CoV-2 Infektion. Auch in anderen Studien wurden Nasenrachenabstriche sowie Sputum, bronchoalveoläre Lavage oder Bronchialaspirat verwendet, um den c6800 mit dem NMDx zu vergleichen. Die KollegInnen konnten eine Übereinstimmung in 100% der Nasenrachenabstriche

bei dem Verdacht auf eine Covid-19 Infektion nachweisen. [55] Dies erhärtet zum einen die allgemeine Annahme den Nasenrachenabstrich als Goldstandard zu werten, zum anderen zeigen auch die Ergebnisse dieser Studie die höchste Positivrenate des Nasenrachenabstrichs. Eine Detektion in allen Nasenrachenabstrichen konnte hier nicht erzielt werden. Dieser Aspekt wird in anderen Studien nicht hervorgebracht.

Der c6800 zeigte ergänzend keine statistisch signifikanten Unterschiede aller vier Abstrichvarianten im Einzelvergleich zum Nasenrachenabstrich. Auch in früheren Studien bewies der c6800 hinsichtlich des qualitativen Nachweises von SARS-CoV-2 gute Eigenschaften. [55] Die Nachweisrate durch den c6800 war in dieser Analyse durchschnittlich am verlässlichsten.

Auch das SARS-CoV-2 Assay des NMDx bewies eine überzeugende analytische Leistung, auf dem gleichen Niveau des c6800. Die Detektionsraten, die durch die Assays des NMDx bestimmt wurden, spiegelten in den Speichelproben und Rachenspülungen eine zum c6800 geringere Sensitivität wider. Nasenvorhofabstrich und Rachenabstrich lieferten ähnlich dem c6800 keine statistisch signifikante Differenz zum Nasenrachenabstrich und sogar höhere Detektionsraten als beim c6800. Im Vergleich zum c6800 wird dem NMDx der Vorteil eines permanent geladenen Geräts und einer kürzeren Laufzeit zugesprochen. [56]

Im Hinblick auf die Parallelen zwischen dem c6800 und NMDx als duale Target Systeme basierend auf vollautomatisierten Assays, fielen die hier benannten Abweichungen bei der reduzierten Detektionsleistung des Assays des NMDx bei der Speichelprobe und Rachenspülung auf. Eine Gemeinsamkeit war die vergleichbare hohe Detektionsrate des Rachen- und Nasenvorhofabstrichs. Diese beiden Varianten wiesen sich durch eine geringfügig reduzierte Sensitivität zum Nasenrachenabstrich aus. Andere Studien zeigten sogar äquivalente Detektionen des Nasenvorhofabstrichs und Nasenrachenabstrich. In den Daten von Péré et al. ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Ct-Werte zwischen dem Goldstandard und dem Nasenvorhofabstrich. [57] Folglich könnte die hier verwendete Alternative, der Nasenvorhofabstrich, eine Empfehlung für den Einsatz im klinischen Alltag finden. Dies ist besonders erwähnenswert, da

der Nasenvorhofabstrich minimalinvasiv durchführbar ist. Hingegen stellten sich die Speichelprobe und die Rachenspülung als minimalinvasive Option in dieser Studie mit geringeren Sensitivitäten im c6800 und NMDx SARS-CoV-2 Nachweis dar. Während sich die geringere Sensitivität von Speichelprobe und Rachenspülung in allen Analysesystemen gleichsam präsentierte, deuteten die Daten ebenso auf Unterschiede der Nachweisraten in Abhängigkeit vom angewendeten Assay hin, wobei der NMDx Assay eine niedrigere Sensitivität zeigte, als der c6800 Assay. Besonders auffällig wurde dies bei der Betrachtung der Übereinstimmung des SARS-CoV-2-Nachweises zwischen den beiden Dual-Target Assays. Die Konkordanz bei Speichel- und Rachenspülungen lag unter 80 %, während die Übereinstimmung bei den anderen Materialien mit dem c6800 und NMDx SARS-CoV-2 Assay über 85% lag. Ebenfalls geringere Detektionsraten in Proben wie Speichel oder Rachenspülung konnten Daten aus Lausanne bestätigen. [55] Abweichende Daten zeigten eine hohe diagnostische Sensitivität durch Speichel und Rachenspülungen. Beeinflussende Faktoren wie Zeitpunkt der Probenentnahme im Infektionsgeschehen, Abnahmeverfahren sowie Symptomlast müssen in Kontext gesetzt werden. Die Daten von Kohmer et al. wurden mit PatientInnen erhoben, die nahezu alle Symptome aufwiesen. Dies mag einen positiven Einfluss auf die Detektionskraft der Speichelproben haben. Auch die Auswahl und Qualität der Flüssigkeit für die Speichelprobe kann Variationen auslösen. Ebenso kann entscheidend sein, wie genau die ProbandInnen angeleitet werden, ob es Instruktionsvideos gibt oder ob sie beobachtet werden. Der Hawthorne Effekt, also eine Verhaltensveränderung der PatientInnen unter Observanz, ist denkbar. Eine zeitliche Verzögerung zwischen der Entnahme der alternativen Proben und dem Nasenrachenabstrich kann ebenfalls die Nachweisrate negativ beeinflussen. Eine kognitive oder physische Einschränkung hinsichtlich der Durchführbarkeit einer Selbstabnahme muss auch bedacht werden. [58]

Insgesamt zeigten der c6800 und NMDx SARS-CoV-2 Assay sowohl in dieser Studie als auch in den genannten Vergleichsarbeiten verlässliche Ergebnisse in der Diagnostik der SARS-CoV-2 Infektion. [55, 59]

Deutliche Diskrepanzen zeigten sich in Gegenüberstellung der Dual Target Assays mit dem Single Target Assay, der Inhouse-PCR. Alle vier alternativen

respiratorischen Materialien zeigten in der Inhouse PCR ein statistisch signifikant schlechteres Ergebnis im Nachweis von SARS-CoV-2 gegenüber dem Nasenrachenabstrich. Im Vergleich ergaben sich durch die Dual Target Systeme, c6800 und NMDx, kleinere Abweichungen zum Nasenrachenabstrich und somit eine größere Detektionsstärke. Die weitesten Abweichungen in dem Virusnachweis zum Goldstandard wiesen dabei ebenfalls Speichel und Rachenspülung nach. Dadurch ergab sich keine diagnostische Stärke des Single Target Systems.

Zudem verglichen wir die Ct-Werte der jeweiligen Targets, um die Empfindlichkeit der jeweiligen Zielgene zu untersuchen. Dabei stellten wir Unterschiede in der analytischen Empfindlichkeit zwischen den verschiedenen Targets fest. Es zeigten sich Differenzen zwischen den Struktur- und nicht Strukturproteinen. Ein eindeutiger Unterschied bezüglich der Sensitivität zwischen den Assays konnte nicht festgestellt werden. Bei niedrigeren Viruslasten im Vergleich zum Goldstandard, vor allem mit Speichel und Rachenspülungen, stieg die Anzahl der nicht detektierten Targets. Des Weiteren wurde festgestellt, dass durch die Inhouse-PCR weniger Targets in allen Abstrichvarianten erkannt wurden. Bis auf die reduzierte Detektion durch die Inhouse-PCR, zeigte sich keine verminderte Detektionsleistung eines Zielgens. Wir analysierten kein spezifisches Gen, welches weniger detektiert wird. Die Struktur und Nicht-Strukturproteine wurden durch die SARS-CoV-2 Assays gleich häufig erkannt. Die Detektion der beiden Zielgene bei Speichel und Rachenspülung war deckungsgleich vermindert.

In dieser Studie eigneten sich Speichelprobe und Rachenspülung nicht zum Nachweis von SARS-CoV-2, was jedoch in anderen Studien nicht beobachtet werden konnte. In Vergangenheit hat sich die Speichelprobe für die Detektion durch die Echtzeit-PCR bei anderen Viren wie dem Influenza Virus oder herkömmlichen Coronaviren bewiesen.[60-62] Studienergebnisse hinsichtlich Speicheltestungen in Bezug auf die SARS-CoV-2 Detektion divergieren. So zeigten kanadische Forscher geringere Sensitivitäten mit nur 72% durch Speichelproben im Vergleich zu naso- und oropharyngealen Abstrichen mit 89%. Im Gegensatz hierzu publizierten Wissenschaftler aus den USA höhere Sensitivitäten durch Speichel sowie höhere Kopien Nachweise des Virus. [24] Des Weiteren wurden Sensitivitäten zwischen 62,3% und 91% für Speichel und

90,3% und 99,7% für Sputum in aktuellen Publikationen beschrieben. [22] Medeiros da Silva et al. propagierten, Speichelproben zeichnen sich durch ein großes diagnostisches Potential in der SARS-CoV-2 Diagnostik aus. [63] Weniger Materialverbrauch und die Fähigkeit der Selbstentnahme definierten Speichel als eine günstige und schnelle Probenalternative. [21, 63] Es besteht jedoch die Annahme, dass Speichelproben durch die erhöhte Viskosität und hemmende Speichelproteine zu vermehrten Komplikationen im Labor führen können[24, 40]. Speichelproben ergaben im Verlauf einer Infektion abfallende Viruslastnachweise. So sank die Sensitivität der Speichelproben mit Fortschreiten der Infektion ab. Besonders Screeningverfahren mit einer hohen analytischen Fähigkeit im Rahmen einer asymptomatischen oder präsymptomatischen Infektion konnten für Speichelproben empfohlen werden. [64]

Kohmer et al. zeigten im Gegenzug den Vorteil dieser minimal-invasiven Proben für den angestrebten Nachweis. [58, 65] Grund für diese Divergenz kann der direkte Vergleich mit dem Goldstandard sein. Der Nasenrachenabstrich bietet die zuverlässigsten Ergebnisse. Auch der Zeitpunkt der Entnahme ist relevant, da der optimale Entnahmeort im Infektionsverlauf variieren kann. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme lagen keine Informationen zum zeitlichen Krankheitsverlauf der PatientInnen vor, denn die Entnahme der fünf verschiedenen respiratorischen Materialien wurde bei allen im Rahmen der Hospitalisierung innerhalb der ersten 24 Stunden durchgeführt. Die PatientInnen wurden im Universitätsklinikum Düsseldorf im symptomatischen Stadium ihrer Erkrankung behandelt. Daher ist von einem fortgeschrittenen Grad der Infektion auszugehen. Eine genaue Einordnung des individuellen Symptomstatus im zeitlichen Krankheitsverlauf erfolgte im Rahmen des Studienkonzepts nicht. Interessant wäre die Klassifizierung zwischen Detektion und Infektionsgrad gewesen. Im Zusammenhang zu den niedrigeren Detektionsraten der Speichelproben in dieser Studie kann der Zeitpunkt der Entnahme einen Einfluss haben. Die inkludierten PatientInnen befanden sich in einem symptomatischen und häufig fortgeschrittenen Stadium. Jamal et al. sowie Savela et al. demonstrierten in ihren Daten, dass eine hohe Viruslast im Speichel zu Beginn einer Covid-19 Infektion vorliegt. Statistisch waren die Viruslastdifferenzen im Krankheitsverlauf bei den

Speichelproben am größten. Im zeitlichen Verlauf überstieg die Viruslast des Nasenabstrichs die des Speichels. Savela und Kollegen zeigten, dass in präsymptomatischen Stadien und zu Beginn einer Covid-19 Infektion höhere Viruslasten im Speichel als im Vergleichsobjekt, dem Nasenabstrich, nachweisbar sind. [63, 64, 66] Simultan wiesen Yee et al. nach, dass Speichelproben in asymptomatischen Krankheitsstadien im Rahmen einer Erstdiagnostik von Kindern im Alter von 11-18 Jahren überlegene Nachweisraten erbringen können. Ihre Ergebnisse zeigten jedoch auch, dass Speichel in der erwachsenen Bevölkerung in symptomatischen Stadien zielführender war. Diese Feststellung konnten die Forscher bei Erstdiagnose und Folgetestungen von Erwachsenen beobachten. [23] Trotz der Divergenz der Daten könnte Speichel gemäß den Forschungsergebnissen eine geeignete Screening-Option für die präsymptomatische Bevölkerung darstellen. Zur Detektion im späteren Stadium muss die Aussagekraft des Speichels kritisch betrachtet werden, da Konzentrationen geringer oder nicht nachweisbar sein können. Der Nutzen der minimal-invasiven Speichelproben in Bezug auf die hospitalisierte Bevölkerung im klinischen Alltag ist daher eingeschränkt zu beurteilen. Umgekehrt muss Erwähnung finden, dass ein negatives Ergebnis der Speichelprobe kein Ausschluss für eine Infektiosität darstellt. Dieser Aspekt sollte im Entscheidungsprozess für eine Endisolation beachtet werden. Der Abfall der Viruslast im Speichel in longitudinaler Analyse ermöglicht einen theoretischen Erklärungsansatz für die hier erhobenen Daten, der in weiteren Untersuchungen geprüft werden sollte.

Ebenso liegt die Rachenspülung im Fokus der Forschungsansätze. Die Detektionsfähigkeit dieser Proben ist ebenfalls aufgrund der minimal-invasiven Entnahme von großem Interesse. Besonders das N-Gen war durch diese Proben gut zu detektieren. Betrachtet man Ct-Werte <40, zeigten Biber et al., dass 83,6% der Nasenrachenabstriche durch Rachenspülungen detektiert werden können. Hierbei war das N-Gen bis zu 97% positiv. Dabei war irrelevant, ob destilliertes Wasser oder Kochsalzlösung verwendet wurde. Kochsalzlösung erzielte eine höhere Detektionsrate als alkoholhaltige oder alkoholfreie Mundspüllösungen.[24] Auch Goldfarb et al. erreichten in ihrer Studie mit Rachenspülungen eine hohe Sensitivität von 98% bei zuvor durch einen

Naserachenabstrich positiv getesteten PatientInnen. Speichelproben legten in diesem Ansatz eine Sensitivität von maximal 79% dar. Zudem konnte ein stabiler RNA-Nachweis nach zweitägiger Lagerung unter Raumtemperatur erfolgen. Laut des Autors konnte die Rachenspülung als gute abstrichunabhängige Alternative eingeordnet werden. [40] Wie bereits erwähnt, muss auch die Möglichkeit der Selbsttestung in dieser Abstrichvariante Beachtung finden.[24] Der verringerte Gebrauch von Abstrichmaterial und Infektionsschutz des medizinischen Personals stellte einen bezeichneten Vorteil dar. [67] Die enorme Kostenreduktion verdeutlicht eine Studie aus Deutschland, in der Rachenspülungen bei medizinischem Personal angewendet wurden. Bei Testungen von 924 ProbandInnen konnten 1000 Abstrichstäbchen und 225 Materialien für die persönliche Schutzausrüstung eingespart werden. [68] Jedoch ist die Anwendbarkeit auf den pädiatrischen Bereich zu überprüfen. Gerade die Umsetzungsfähigkeit des Gurgelns durch Kinder kann eingeschränkt sein. Weitere Limitationen bei der Probenform kann es durch Pathologien wie Dysphagie oder demenzielle Entwicklungen geben.[68] Die Akzeptanz durch die PatientInnen war bei der Rachenspülung signifikant höher verglichen zu Speichelproben. [24, 40] PatientInnen beschrieben einen deutlich geringeren Diskomfort. Studien ergaben, dass 24% der PatientInnen einen leichten unangenehmen Charakter empfanden. Hingegen lag dieser Wert bei dem Nasenrachenabstrich bei 72%. Dreiviertel der ProbandInnen jener Studie nahmen keinen Diskomfort durch die Rachenspülung wahr [67]. Ferner war die Organisation der Labore, die die Rachenspülungen nach Gewinnung bearbeiten, relevant. Die Behältnisse der Gurgellösungen waren größer und verursachten dem zu Folge einen aufwendigeren Transport sowie höheren Platzverbrauch in der Bench. Vereinzelt sind Rachenspülungen in einigen Ländern nicht zugelassen. [68] In dieser Studie unterlag die Rachenspülung in allen drei PCR-Verfahren den empfohlenen respiratorischen Materialien. Obwohl die von uns verwendete Kochsalzlösung auch von anderen Forschungsgruppen eingesetzt wurde, [24] erbrachten unsere Testungen keine zuverlässigen Ergebnisse. Das erhöhte Durchschnittsalter unserer ProbandInnen könnte ergänzend auf eine reduzierte Umsetzbarkeit hindeuten, da mutmaßlich die Kognition und Umsetzungsfähigkeit reduziert sein kann. Allerdings wurden die Proben unter Aufsicht eingewiesenen Personals entnommen. Eine Verzerrung durch diesen

Faktor ist jedoch nicht auszuschließen. Auch der bekannte Hawthrone Effekt kann Einfluss genommen haben, denn eine Verhaltensveränderung bei bewusster Studienteilnahme ist nicht auszuschließen. [58] Voraussetzung für die Rachenspülung ist die Fähigkeit zu gurgeln. PatientInnen mit Dysphagie oder Demenz oder kritisch kranke PatientInnen können Schwierigkeiten in der Umsetzung haben. [58, 67] Dies verringert die annehmbare Detektionswahrscheinlichkeit. Ebenso ist eine erschwerte Durchführung bei kleineren Kindern denkbar, sodass das senile oder kindliche Alter der PatientInnen eine Rolle für die Umsetzbarkeit im Alltag spielt. Für die Wahl der optimalen Probenentnahme mit dem Ziel der höchsten Sensitivität müssen diese Faktoren berücksichtigt werden. In unserer Studie war das Gurgeln mit der salzhaltigen Lösung für 10 Sekunden vorgesehen. Bezugnehmend auf die Resultate von Goldfarb et al. kann dieses Konzept eine zu geringe Zeitdauer bedingen. Eine längere und wiederholende Spülung des Rachenraumes kann eine höhere Detektionsrate ermöglichen und auf diese Weise die schwächeren Ergebnisse hinsichtlich der Detektionsrate der Rachenspülung in unserer Studie erklären. Ein Vorteil der Rachenspülung ist die Probenentnahme aus dem Cavum oris, denn RNA aus dem gesamten Oropharynx kann so nachgewiesen werden. Goldfarb et al. konzipierten ein Schema, welches aus drei Mundspülungszyklen und nachfolgendem Gurgeln besteht. [40] Hinsichtlich einer breiteren Verfügbarkeit könnte sich Leitungswasser eignen, jedoch ist weiterhin ein steriles Behältnis erforderlich. Externe Daten zeigten eine valide Detektion durch herkömmliches Leitungswasser. [58] Bennett et al. betonten, dass sich die Rachenspülung bereits für den Nachweis anderer Viren eignete, denn [25, 40, 68] auch im Zusammenhang mit der ersten SARS-Epidemie wurden Rachenspülungen verwendet. Zudem hat sich diese Probengewinnung bei Kindern in der Vergangenheit bewährt, da die Detektionsraten in anderen Studien vergleichbare Ergebnisse mit herkömmlichen Abstrichen erreichten. [68] Weitere Daten analysierten nahezu gleiche Ct-Werte bei der Rachenspülung und den empfohlenen Abstrichen und zeigten so eine bessere Detektionsfähigkeit der Rachenspülung als unsere Studie. Eine mögliche Erklärung für geringere Viruslasten von SARS-CoV-2 sieht Mittal et al. in einer potenziellen Verdünnung durch die verabreichte Gurgellösung. [67] Grund kann auch in diesem Kontext der Entnahmezeitpunkt sein. Ähnlich dem Speichel kann die Sensitivität der

Rachenspülung im zeitlichen Verlauf variieren, denn Mittel et al, fanden heraus, dass die Ct-Werte der SARS-CoV-2 Nachweise durch die Rachenspülungen bei Patienten mit einer Krankheitsdauer von über sieben Tagen höher waren als bei Patienten, die unter sieben Tagen Symptome aufwiesen. Da die höheren Ct-Werte geringere SARS-CoV-2 Viruslasten aufzeigen, ist im Laufe einer Infektion eine geringere Detektionskraft durch Rachenspülungen anzunehmen. [67]

Besonders die Kombination aus Speichelprobe oder Rachenspülung und der Inhouse-PCR führt gemäß den Studienergebnissen zu einer hohen Wahrscheinlichkeit für falsch-negative Resultate.

Die meisten Studien untersuchten neben dem nasopharyngealen Abstrich den Abstrich der vorderen Nase und der mittleren Nasenmuschel, sowie eine Kombination aus nasopharyngealer und oropharyngealer Probe hinsichtlich der Testung von SARS-CoV-2. Die Studienergebnisse von Gadenstaetter et al. variierten hinsichtlich der Sensitivität von mittleren Nasenmuschel Abstrichen verglichen zu den nasopharyngealen Abstrichen. Jedoch stieg die Sensitivität an, sofern der mittlere Nasenmuschelabstrich mit Speichelproben oder Rachenabstrichen kombiniert wurde. Gefahr war stets die Detektion falsch-negativer Ergebnisse aufgrund mangelnder Viruslast. Der vordere Nasenabstrich wies vergleichbare Sensitivitäten auf wie der Nasenrachenabstrich. Dies konnte isoliert oder in Kombination mit oropharyngealen Abstrichen festgestellt werden. Es bestanden deutliche Konkordanzen, wenn auch nasopharyngeal eine höhere Detektion erreicht werden konnte. [22] Vorteil des vorderen Nasenabstrichs sind die einfachere Probenentnahme sowie der höhere Komfort durch eine geringere Invasivität. Durch die Möglichkeit der Selbstentnahme wurde der Verbrauch an persönlicher Schutzausrüstung auch hier reduziert. Aktuelle Forschung verdeutlicht, dass selbstgewonnene Abstriche kombiniert aus Nase und Rachen äquivalent zu fremdgewonnenen Abstrichen kombiniert aus Nasopharynx und Rachen waren. Auch hatten selbst durchgeführte Abstriche die Fähigkeit frühe Infektionen zu erkennen und können steigende Ct-Werte im zeitlichen Verlauf zeigen. [22] Limitierender Faktor im Kontext der Selbstgewinnung kann eine Ataxie oder Disdiadochokinese sein, wodurch die PatientInnen die notwendige motorische Voraussetzung für die zielgerichtete Bewegung in Richtung des Nasenvorhofs nicht aufbringen können.

Eine hohe Relevanz für den klinischen Alltag liegt in der der Viruslast. Sie ist essenziell aufgrund der Isolationspflicht von stationären PatientInnen und konsekutiv hinsichtlich der Entlassungskriterien und für den Endzeitpunkt von Isolationsmaßnahmen. Eine Endisolation ist laut dem RKI bei einer Viruslast unter 10^6 SARS-CoV-2 Kopien pro/ml möglich. [27] Auch elektive Operationen oder stationäre Aufnahmen hängen von der Höhe der SARS-CoV-2-RNA Konzentration ab. Daher ist die Verlässlichkeit der Bestimmung dieser Konzentration von großem Interesse. Die quantitative Analyse der SARS-CoV-2 RNA spielt somit eine wichtige Rolle in der virologischen Diagnostik. Unabhängig von der RT-qPCR Methode wurde, wie auch in anderen Studien [64, 69] gezeigt, mit dem Nasenrachenabstrich die höchste Viruslast detektiert. Im Vergleich zeigte sich zu jeder anderen getesteten Matrix, dem Rachenabstrich, dem Nasenvorhofabstrich, dem Speichel und der Rachenspülung, ein statistisch signifikanter Unterschied. Festzuhalten ist, dass eine 100%ige Sensitivität weder durch unsere Studie noch durch andere mit keiner Testmethode erreicht werden konnte. [66] Unsere Studie bestätigte den Nasenrachenabstrich als Goldstandard in der SARS-CoV-2-Diagnostik aufgrund seiner zuverlässigen Nachweisbarkeit der SARS-CoV-2 RNA. Im Hinblick auf die Viruslast zeigte sich durch den Nasenvorhofabstrich die geringste Differenz zum Goldstandard in den Analysen des NMDx. Im Gegenzug dazu ergab sich die geringste Differenz durch den Rachenabstrich zum Goldstandard durch den c6800. In Gegenüberstellung zu den Speichelproben und der Rachenspülung zeigten auch der Rachenabstrich und der Nasenvorhofabstrich hohe Viruslasten. Größere Abweichungen konnten bei Speichelproben und Rachenspülungen zum Nasenrachenabstrich beobachtet werden. Demnach waren die Speichelprobe und die Rachenspülung in dieser Auswertung erneut unterlegen.

Hervorzuheben ist, dass sich in der quantitativen Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen dem vom Hersteller zusätzlich zum Nasenrachenabstrich empfohlenen Rachenabstrich und dem Nasenvorhofabstrich ergab. Dieser Aspekt ist methodenübergreifend feststellbar und verleiht dem Nasenvorhofabstrich als minimal-invasive Alternative Potential für den Einsatz im klinischen Kontext zur Diagnostik von Covid-19. In der Literatur wird sogar ein

fehlender signifikanter Unterschied des Nasevorhofabstrichs zum Nasenrachenabstrich beschrieben. [57]

Unter Beachtung der vom RKI empfohlenen Entlassungskriterien aus der Isolierung mit einem Schwellenwert von 10^6 SARS-CoV-2 Kopien pro/ml erfolgte eine Analyse der Atemwegsmaterialien hinsichtlich dieses Grenzwertes. Insofern wurde eine Analyse derselben Daten oberhalb und unterhalb des Cut-Offs von 10^6 SARS-CoV-2 Kopien pro/ml erstellt. Analog zu der obigen Darlegung erreichte der Nasenrachenabstrich wie erwartet auf allen drei Plattformen sowohl mit einer Viruslast unterhalb als auch oberhalb der Schwelle von 10^6 Kopien/ml die besten Ergebnisse. Ebenfalls simultan erwiesen sich Speichel und Rachenspülung als schwächste Detektionsmaterialien ober- und unterhalb der Schwelle. Bezugnehmend auf die Isolationsfähigkeit der PatientInnen stellten sich die SARS-CoV-2 Testkits des c6800 und des NMDx als zuverlässigste Tests heraus. Im Kontext der Endisolation errechneten sich durch den c6800 und NMDx die besten Ergebnisse. Durch die Proben aus dem Nasenrachenraum, Rachen und Nasenvorhof konnten sichere Entlassungskriterien geschaffen werden. Im Hinblick auf die Verfahren war die Inhouse PCR unterlegen. Im Vergleich der Atemwegsmaterialien erbrachten Speichelprobe und Rachenspülung keine ausreichenden Nachweise und bewiesen damit keine klinische Einsatzfähigkeit im Kontext der Endisolation.

Wie jede wissenschaftliche Untersuchung unterliegt die vorliegende Studie bestimmten Limitationen aufgrund der Konzeption und Durchführung, die beachtet werden müssen. Nachfolgend wird hierzu der Aspekt des Alters der Kohorte, die Variabilität des Personals sowie der Entnahmezeitpunkt evaluiert.

Die untersuchte Kohorte hatte mit einem mittleren Alter von 57,5 Jahren im Vergleich zu anderen Untersuchungen ein hohes Alter. [58, 70] Die ambulant therapierte sowie infizierte und noch asymptomatische Bevölkerung ist in unserer Studienpopulation unterrepräsentiert, da es sich nur um hospitalisierte Menschen im Rekrutierungszeitraum im Herbst 2020 handelte, während die Sars-CoV-2 Alpha Variante dominant wurde, die primär bei älteren Menschen mit einer Hospitalisierung einherging [6]. Somit ist anzunehmen, dass die Studienpopulation auch bei der geringen Anzahl inkludierter PatientInnen nicht

der gesellschaftlich betroffenen Population entsprach, und somit ein Großteil unterrepräsentiert ist.

Die Entnahme der respiratorischen Materialien erfolgte durch eingewiesenes medizinisches Personal sowie in Form der Selbstgewinnung im Rahmen der Speichelprobe und der Rachenspülung. Hierbei wurde im Vorfeld keine spezifische Entnahmereihenfolge festgelegt. Die Abfolge konnte durch das Personal oder den Patienten individuell entschieden werden. Es muss angenommen werden, dass kein systematisches Vorgehen hinsichtlich der Invasivität gewählt wurde. Im Studienprotokoll wurden zudem keine Vorgaben bezüglich des Vestibulum nasi angegeben. Ob die Proben ausschließlich aus einem Vestibulum nasi entnommen wurden oder ob die Seiten wechselten, wurde nicht dokumentiert. Es besteht somit ein Risiko der Virusverschleppung abhängig von der Reihenfolge der Probengewinnung. Auszuschließen ist nicht, dass zunächst der tiefe Nasenrachenabstrich entnommen, dann ipsilateral der Rachenabstrich sowie anschließend an derselben Seite der vordere Nasenabstrich entnommen wurde. In Bezug auf die Ergebnisse kann ein Zusammenhang zu den reproduzierbar positiven Ergebnissen des Nasenvorhofabstrich nicht ausgeschlossen werden. Unsere Studie zeigte keinen signifikanten Unterschied der Virusnachweise zwischen dem Rachenabstrich und dem Abstrich des Nasenvorhofs. Demnach muss der Einfluss der potenziellen Virusverschleppung durch den tiefen Nasenrachenabstrich im Bereich des Nasenvorhofabstrichs diskutiert werden. Eine festgelegte Reihenfolge unter Beachtung der unterschiedlichen Invasivität der Abstrichmethoden kann einen zusätzlichen Ansatz für Folgestudien erbringen. In anderen Studien wurden die selbst entnommenen Proben ohne fachpersonelle Supervision entnommen. Es wurden klare Verfahrensanweisungen gegeben, wie die Rotation in beide Richtungen nach Einführen des Stabes für einen Zentimeter in das Nasenloch. Die Entnahme des Nasenrachenabstrich wurde im Vorfeld mit zeitlicher Latenz durchgeführt. [71] Eine exakte zeitliche Differenz zum Ausschluss einer möglichen Verschleppung muss in Zukunft untersucht werden.

Die Entnahme der Proben erfolgte durch eine/n Studienarzt/-ärztin oder eingewiesenes medizinisches Personal beziehungsweise in Form einer Selbstgewinnung. Die zuständigen Personen wechselten je nach Einsatzbereich

und Stationszugehörigkeit. Alle wurden im Vorfeld eingewiesen und erhielten zudem eine detaillierte Anleitung zur Probenentnahme. Aufgrund der fehlenden personellen Stringenz, muss dennoch von einer Variabilität hinsichtlich der Durchführung der Proben ausgegangen werden. Demnach ist ein Streuungsmaß hinsichtlich der Sensitivität in Abhängigkeit von der entnehmenden Person nicht auszuklammern. Ein höheres Maß an Vergleichbarkeit durch personelle Kontinuität ist anzunehmen. [22] Korrelierend hierzu zeigten die Studiendaten innerhalb des tiefen Nasenrachenabstrichs in den Testverfahren keine garantierte Sensitivität. Dies kann zum einen eine wahre Tatsache sein, bedingt durch beispielsweise den nicht idealen Entnahmezeitpunkt, jedoch kann auch die entnehmende Person ein Streuungsmaß beeinflussen. Instruktionsvideos könnten eine Verzerrung reduzieren. [71] Die Invasivität des empfohlenen tiefen Nasenrachenabstrichs stellt besonders im pädiatrischen Bereich eine große Herausforderung dar. [23] Ob der Transfer der in dieser Studie gewonnenen Daten auf Kinder verschiedenen Alters möglich ist, sollte in weiterführenden Studien überprüft werden.

Zusammenfassend zeigten beide Dualen Target SARS-CoV-2-Assyas vergleichbare Ergebnisse sowohl beim Nachweis als auch bei der Quantifizierung von SARS-CoV-2-RNA. Differenzen wurden nur zwischen den verschiedenen untersuchten respiratorischen Materialien festgestellt. Mögliche Gründe für die geringere Sensitivität von Speichel und Rachenspülungen sind eine geringere Virusausscheidung in diesem Kompartiment, eine geringere Stabilität der SARS-CoV-2-RNA, sowie ein höherer Verdünnungsfaktor für die SARS-CoV-2-RNA, der mit der Heterogenität der Proben zusammenhängt.

Erwähnenswert ist, dass beide in dieser Studie verwendeten dualen SARS-CoV-2-Tests nur für Nasen-, Nasopharyngeal- und Pharyngealabstriche validiert und CE-gekennzeichnet wurden.

6 Schlussfolgerung

Angesichts unserer Ergebnisse zeigten Nasenrachenabstrich, Rachenabstrich und Nasenvorhofabstrich höhere SARS-CoV-2-RNA-Konzentrationen im Vergleich zu weniger invasiven Materialien und sollten als Goldstandard für die COVID-19-Diagnostik angesehen werden. Speichel und Rachenspülung waren in unserer Studienkohorte deutlich unterlegen. Nichtsdestotrotz kann die Quantifizierung von SARS-CoV-2 aus minimal-invasiven Materialien bei bestimmten Patientengruppen eine Rolle spielen, wenn sichergestellt ist, dass dieselben Proben im Längsschnitt verglichen werden. Relevant ist der Aspekt, dass nicht alle Atemwegsproben für die Behandlung und Therapie von vor allem hospitalisierten Patienten unabhängig vom Infektionsstadium geeignet sind, besonders in fortgeschrittenen Infektionsstadien mit SARS-CoV-2.

7 Zusammenfassung

Die Studie bestätigte, die erwartet höchste Sensitivität des Nasenrachenabstrichs unabhängig von der RT-qPCR- Methode zum Nachweis von SARS-CoV-2. Der Nasenvorhofabstrich zeigte vergleichbare Detektionsraten zum Rachenabstrich und die geringste Viruslast-Differenz zum Nasenrachenabstrich, sodass der Nasenvorhof eine minimal-invasive Alternative zum Nasenrachen oder Rachen darstellen könnte. Eine hohe Zuverlässigkeit der empfohlenen Proben durch den c6800- und NMDx- SARS-CoV-2 Assay konnten bestätigt werden. Hinsichtlich eines sicheren Entlassungskriteriums zeigten der c6800 und NMDx im Nasenrachenabstrich, Rachenabstrich und ebenso Nasenvorhofabstrich die sensitivsten Ergebnisse. Die Inhouse-PCR war in allen Analysen unterlegen.

8 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES CORONAVIRUS-VIRUS MIT DEM MINIMALEN SATZ VON STRUKTURPROTEINEN 3
ABBILDUNG 2: POSITIVRATE COBAS ® 6800 SARS-COV-2: PROZENTUALE DARSTELLUNG DER SARS-COV-2 NACHWEISE DURCH DIE VERSCHIEDENEN MATERIALIEN DURCH DEN COBAS ® 6800. 19
ABBILDUNG 3: POSITIVRATE NMDX SARS-COV-2: PROZENTUALE DARSTELLUNG DER SARS-COV-2 NACHWEISE DURCH DIE VERSCHIEDENEN MATERIALIEN DURCH DEN NMDX 20
ABBILDUNG 4: POSITIVRATE INHOUSE PCR SARS-COV-2<. PROZENTUALE DARSTELLUNG DER SARS-COV-2 NACHWEISE DURCH DIE VERSCHIEDENEN MATERIALIEN DURCH DIE INHOUSE PCR 21
ABBILDUNG 5: ÜBEREINSTIMMUNG DER SARS-COV-2-NACHWEISRATE VERSCHIEDENER ATEMWEGSPROBEN IM VERGLEICH ZUM NASENRACHENABSTRICH – C6800..... 23
ABBILDUNG 6: ÜBEREINSTIMMUNG DER SARS-COV-2-NACHWEISRATE VERSCHIEDENER ATEMWEGSPROBEN IM VERGLEICH ZUM NASENRACHENABSTRICH – NMDX 24
ABBILDUNG 7: ÜBEREINSTIMMUNG DER SARS-COV-2-NACHWEISRATE VERSCHIEDENER ATEMWEGSPROBEN IM VERGLEICH ZUM NASENRACHENABSTRICH – INHOUSE-PCR 26
ABBILDUNG 8: DIE MIT DEN SARS-COV-2-ASSAYS ERMITTELTEN CT-WERTE FÜR DAS C6800 UND DEN NMDX UND DIE INHOUSE PCR. DIE ANZAHL DER PCR-ZYKLEN IST BEI DEN ASSAYS AUF 40 BEGRENZT. FÜR NICHT NACHGEWIESENE PROBEN WIRD EIN CT-WERT VON 41 ANGESETZT. DER MEDIAN DES CT-WERTES UND DER IQR (25%75%) SIND IN DEN BALKEN ANGEGEBEN. 27
ABBILDUNG 9: VERGLEICH DER SARS-COV-2-RNA-KONZENTRATIONEN VERSCHIEDENER ATEMWEGSPROBEN, DIE FÜR DAS C6800-SYSTEM BESTIMMT WURDEN 30
ABBILDUNG 10: VERGLEICH DER SARS-COV-2-RNA-KONZENTRATIONEN VERSCHIEDENER ATEMWEGSPROBEN, DIE FÜR DAS NMDX-SYSTEM BESTIMMT WURDEN..... 30
ABBILDUNG 11: VERGLEICH DER SARS-COV-2-RNA-KONZENTRATIONEN VERSCHIEDENER ATEMWEGSPROBEN, DIE DAS INHOUSE-SYSTEM BESTIMMT WURDEN..... 31
ABBILDUNG 12: C6800_NACHWEISRATE BEI <10E6 & >10E6; SARS-COV-2 RNA KOPIEN/ML..... 32
ABBILDUNG 13: NMDX_NACHWEISRATE BEI <10E6 & >10E6; SARS-COV-2 RNA KOPIEN/ML 33
ABBILDUNG 14: INHOUSE PCR_NACHWEISRATE <10E6 & >10E6; SARS-COV-2 RNA KOPIEN/ML..... 34

9 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VARIANTEN DER PROBENGEWINNUNG 11
TABELLE 2: PCR-VERFAHREN ÜBERSICHT 12
TABELLE 3: PROBENVORBEREITUNG NMDX 15
TABELLE 4: PROBENVORBEREITUNG C6800 15
TABELLE 5: MASTERMIX FÜR WUHAN N- UND G-GEN 16
TABELLE 6: ÜBERSICHT STUDIENKOHORTE 18
TABELLE 7: DURCHSCHNITTLICHE POSITIVRATEN NACH PROBENENTNAHMEVERFAHREN: DURCHSCHNITTLICHE POSITIVRATEN DER SARS-COV-2 DETEKTION NACH PROBENENTNAHMEVERFAHREN DURCH C6800, NMDX UND INHOUSE PCR 22
TABELLE 8: VERGLEICH DER SARS-COV-2-RNA-KONZENTRATIONEN IN VERSCHIEDENEN ATEMWEGSPROBEN, ANALYSIERT MIT DEM C6800 UND DEM NMDX-SARS-COV-2 ASSAY SOWIE DER INHOUSE SARS-COV-2 PCR 29

10 Literatur- und Quellenverzeichnis

References

1. Erreger, S.n.A.d.K.-u.B.f.r.K.d.h. and a.R. Koch-Institut, *Hinweise zu Erkennung, Diagnostik und Therapie von Patienten mit COVID-19.* 2023.
2. Lu, H., C.W. Stratton, and Y.W. Tang, *Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle.* J Med Virol, 2020. **92**(4): p. 401-402.
3. Organization, W.H., *Novel Coronavirus(2019-nCoV) Situation Report - 11.* 2020.
4. Organization, W.H., *Novel Coronavirus(2019-nCoV) Situation Report – 22.* 2020.
5. Organization, W.H., *Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 51.* 2020.
6. Gao, Y.D., et al., *Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review.* Allergy, 2021. **76**(2): p. 428-455.
7. Takehiro Takahashi1, Mallory K. Ellingson2,21, Patrick Wong1,21, Benjamin Israelow1,3,21, Carolina Lucas1,21, Jon Klein1,21, Julio Silva1,21, Tianyang Mao1,21, Ji Eun Oh1, Maria Tokuyama1, Peiwen Lu1, Arvind Venkataraman1, Annsea Park1, Feimei Liu1,4, Amit Meir5, Jonathan Sun6, Eric Y. Wang1, Arnau Casanovas-Massana2, Anne L. Wyllie2, Chantal B. F. Vogels2, and S.L. Rebecca Earnest2, Isabel M. Ott2,7, Adam J. Moore2, Yale IMPACT Research Team*, Albert Shaw3, John B. Fournier3, Camila D. Odio3, Shelli Farhadian3, Charles Dela Cruz8, Nathan D. Grubaugh2, Wade L. Schulz9,10, Aaron M. Ring1, Albert I. Ko2, Saad B. Omer2,3,11,12 & Akiko Iwasaki1,13 ✉, *Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes.* Nature, 2020.
8. Diercke1 · RKI COVID-19 Study Group, J.S.K.T.A.M.M.F.T.P.S.B.W.H.E.S.D.A.U.G.M., *Die verschiedenen Phasen der COVID-19-Pandemie in Deutschland: Eine deskriptive Analyse von Januar 2020 bis Februar 2021.* 2021.
9. Morgun, A.V., et al., *Molecular Mechanisms of Proteins - Targets for SARS-CoV-2 (Review).* Sovrem Tekhnologii Med, 2021. **12**(6): p. 98-108.
10. Masters, P.S., *The molecular biology of coronaviruses.* Adv Virus Res, 2006. **66**: p. 193-292.
11. Hu, B., et al., *Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19.* Nat Rev Microbiol, 2021. **19**(3): p. 141-154.
12. Singhal, T., *A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19).* Indian J Pediatr, 2020. **87**(4): p. 281-286.
13. Yin, Y. and R.G. Wunderink, *MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia.* Respirology, 2018. **23**(2): p. 130-137.
14. Elhusseiny, K.M., F.A. Abd-Elhay, and M.G. Kamel, *Possible therapeutic agents for COVID-19: a comprehensive review.* Expert Rev Anti Infect Ther, 2020. **18**(10): p. 1005-1020.
15. Majumder, J. and T. Minko, *Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19.* Aaps j, 2021. **23**(1): p. 14.

16. Khiali, S., E. Khani, and T. Entezari-Maleki, *A Comprehensive Review of Tocilizumab in COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome.* J Clin Pharmacol, 2020. **60**(9): p. 1131-1146.
17. Generali, M., et al., *Heterogeneous expression of ACE2 and TMPRRS2 in mesenchymal stromal cells.* J Cell Mol Med, 2021.
18. Ziegler, C.G.K., et al., *SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues.* Cell, 2020. **181**(5): p. 1016-1035 e19.
19. Ahmad, I., et al., *The Repurposed ACE2 Inhibitors: SARS-CoV-2 Entry Blockers of Covid-19.* Top Curr Chem (Cham), 2021. **379**(6): p. 40.
20. Ahn, D.G., et al., *Current Status of Epidemiology, Diagnosis, Therapeutics, and Vaccines for Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).* J Microbiol Biotechnol, 2020. **30**(3): p. 313-324.
21. Li, W., et al., *The Nasopharynx Swab Test for Coronavirus Disease-2019 Is Mild and Will Not Cause Significant Pain and Anxiety: A Cross-Sectional Study Based on Psychiatrists.* Front Cell Infect Microbiol, 2021. **11**: p. 592092.
22. Gadenstaetter, A.J., C.D. Mayer, and L.D. Landegger, *Nasopharyngeal versus nasal swabs for detection of SARS-CoV-2: a systematic review.* Rhinology, 2021.
23. Yee, R., et al., *Saliva Is a Promising Alternative Specimen for the Detection of SARS-CoV-2 in Children and Adults.* J Clin Microbiol, 2021. **59**(2).
24. Biber, A., et al., *The role of mouthwash sampling in SARS-CoV-2 diagnosis.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2021. **40**(10): p. 2199-2206.
25. Bennett, S., R.S. Davidson, and R.N. Gunson, *Comparison of gargle samples and throat swab samples for the detection of respiratory pathogens.* J Virol Methods, 2017. **248**: p. 83-86.
26. Rodriguez-Ares, T., et al., *SARS-CoV-2 in Conjunctiva and Tears and Ocular Symptoms of Patients with COVID-19.* Vision (Basel), 2021. **5**(4).
27. Robert-Koch-Institut. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html;jsessionid=8EA0FFD685AD58CE7D7D7213E9DD1F46.internet051?nn=13490888#doc13490982bodyText9 2020.
28. Singh, A., et al., *Comparative Evaluation of Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swab Based Rapid SARS-CoV-2 Antigen Detection and Real-Time RT-PCR for Diagnosis of COVID-19 in Tertiary Care Hospital.* Cureus, 2021. **13**(7): p. e16785.
29. Corman, V.M., et al., *Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR.* Euro Surveill, 2020. **25**(3).
30. Barra, G.B., et al., *Overcoming Supply Shortage for SARS-CoV-2 Detection by RT-qPCR.* Genes (Basel), 2021. **12**(1).
31. Organisation, W.H. *Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). https://wwwwhoint/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-reportpdf. World Health Organisation2020.* 2020; Available from: https://wwwwhoint/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-reportpdf. .

32. Lübke, N., et al., *Extraction-free SARS-CoV-2 detection by rapid RT-qPCR universal for all primary respiratory materials.* J Clin Virol, 2020. **130**: p. 104579.
33. Roche, *Roche's cobas SARS-CoV-2 Test to detect novel coronavirus receives FDA Emergency Use Authorization and is available in markets accepting the CE mark.* 2020.
34. FDA., *In Vitro Diagnostics EUAs - Molecular Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. .* 2021.
35. Seifried, J., et al., *[Recording of SARS-CoV-2 laboratory tests in Germany].* Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2021. **64**(4): p. 403-411.
36. Joachim, A., et al., *Pooled RT-qPCR testing for SARS-CoV-2 surveillance in schools - a cluster randomised trial.* EClinicalMedicine, 2021. **39**: p. 101082.
37. Hoehl, S., et al., *Longitudinal Testing for Respiratory and Gastrointestinal Shedding of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Day Care Centers in Hesse, Germany.* Clin Infect Dis, 2021. **73**(9): p. e3036-e3041.
38. Lübke N, S.A.-K., Bredahl R, Kraus U, Hauka S, Andrée M, et al, *Screening for SARS-CoV-2 infections in daycare facilities for children in a large city in Germany.* 2021.
39. Cañete, M.G., et al., *Saliva sample for the massive screening of SARS-CoV-2 infection: a systematic review.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2021. **131**(5): p. 540-548.
40. Goldfarb, D.M., et al., *Self-Collected Saline Gargle Samples as an Alternative to Health Care Worker-Collected Nasopharyngeal Swabs for COVID-19 Diagnosis in Outpatients.* J Clin Microbiol, 2021. **59**(4).
41. Saito, M., et al., *Gargle Lavage as a Safe and Sensitive Alternative to Swab Samples to Diagnose COVID-19: A Case Report in Japan.* Clin Infect Dis, 2020. **71**(15): p. 893-894.
42. Bustin, S.A., et al., *Quantitative real-time RT-PCR--a perspective.* J Mol Endocrinol, 2005. **34**(3): p. 597-601.
43. Bachman, J., *Reverse-transcription PCR (RT-PCR).* Methods Enzymol, 2013. **530**: p. 67-74.
44. Tng, D.J.H., et al., *Amplified parallel antigen rapid test for point-of-care salivary detection of SARS-CoV-2 with improved sensitivity.* Mikrochim Acta, 2021. **189**(1): p. 14.
45. Nörz, D., et al., *Clinical evaluation of a SARS-CoV-2 RT-PCR assay on a fully automated system for rapid on-demand testing in the hospital setting.* J Clin Virol, 2020. **128**: p. 104390.
46. Institut für Virologie, U.D., *Standardarbeitsanweisung, SA-078.02 Nachweis von SARS-CoV-2 RNA, HBV-DNA, HCV-RNA, HIV-RNA mittels Qiagen-NeuModX.* 2021.
47. Institut für Virologie, U.D., *Standardarbeitsanweisung, SA-VI-081.03 HIV-, HCV-
, HBV-, HEV-, WNV-, HPV-, SARS-CoV-2
qualitative NAT mittels COBAS 6800.* 2021.
48. Poljak, M., et al., *Clinical Evaluation of the cobas SARS-CoV-2 Test and a Diagnostic Platform Switch during 48 Hours in the Midst of the COVID-19 Pandemic.* J Clin Microbiol, 2020. **58**(6).

49. Victor Corman, T.B., Sebastian Brünink, Christian Drosten Charité Virology, Berlin, Germany, et al., *Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT- PCR.* 2020.
50. Institut für Virologie, U.D., *Standardanweisung Coronavirus WUHAN 2019-PCR.* 2020.
51. INSTAND, *Quantitative Bezugsproben zur Verbesserung der Vergleichbarkeit und Bewertung von Laborergebnissen zum Virusgenom-Nachweis von SARS-CoV-2.* 2021.
52. *List of SARS-CoV-2 Diagnostic test kits and equipments eligible for procurement according to Board Decision on Additional Support for Country Responses to COVID-19 (GF/B42/EDP11).* Versio 36 ed2022.
53. Parastoo Kheiroddin1†, P.S., 2†, Michael Althammer1, Ezgi Cibali1,3,, et al., *Results of WICOVIR Gargle Pool PCR Testing in German Schools Based on the First 100,000 Tests*
. 2021.
54. Mostafa, H.H., et al., *Multicenter evaluation of the NeuMoDx™ SARS-CoV-2 Test.* J Clin Virol, 2020. **130**: p. 104583.
55. Opota, O., et al., *Comparison of SARS-CoV-2 RT-PCR on a high-throughput molecular diagnostic platform and the cobas SARS-CoV-2 test for the diagnostic of COVID-19 on various clinical samples.* Pathog Dis, 2020. **78**(8).
56. Heba H. Mostafa a, et al., *Multicenter evaluation of the NeuMoDx™ SARS-CoV-2 Test.* 2020.
57. Hélène Péré, a., b,c Isabelle Podglajen,c,d Maxime Wack,e,f Edouard Flamarion,g Tristan Mirault,b,h Guillaume Goudot,b,h and i.L.L. Caroline Hauw-Berlemont, j,k Eric Caudron,j,k Sophie Carrabin,g Julien Rodary,a Tatiana Ribeyre,a Laurent Bélec,a,c,d David Veyera,c,l, *Nasal Swab Sampling for SARS-CoV-2: a Convenient Alternative in Times of Nasopharyngeal Swab Shortage.* 2020.
58. Kohmer, N., et al., *Self-Collected Samples to Detect SARS-CoV-2: Direct Comparison of Saliva, Tongue Swab, Nasal Swab, Chewed Cotton Pads and Gargle Lavage.* J Clin Med, 2021. **10**(24).
59. Onya Opota1, Rene´ Brouillet1, Gilbert Greub1,2,† and Katia Jaton1,†, *Comparison of SARS-CoV-2 RT-PCR on a high-throughput molecular diagnostic platform and the cobas SARS-CoV-2 test for the diagnostic of COVID-19 on various clinical samples.* 2020.
60. Sueki, A., et al., *Evaluation of saliva as diagnostic materials for influenza virus infection by PCR-based assays.* Clin Chim Acta, 2016. **453**: p. 71-4.
61. To, K.K.W., et al., *Saliva as a diagnostic specimen for testing respiratory virus by a point-of-care molecular assay: a diagnostic validity study.* Clin Microbiol Infect, 2019. **25**(3): p. 372-378.
62. Kim, Y.G., et al., *Comparison between Saliva and Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of Respiratory Viruses by Multiplex Reverse Transcription-PCR.* J Clin Microbiol, 2017. **55**(1): p. 226-233.
63. Medeiros da Silva, R.C., et al., *Saliva as a possible tool for the SARS-CoV-2 detection: A review.* Travel Med Infect Dis, 2020. **38**: p. 101920.
64. Savela, E.S., et al., *Quantitative SARS-CoV-2 viral-load curves in paired saliva and nasal swabs inform appropriate respiratory sampling site and*

analytical test sensitivity required for earliest viral detection. medRxiv, 2021.
65. Tutuncu, E.E., D. Ozgur, and M. Karamese, *Saliva samples for detection of SARS-CoV-2 in mildly symptomatic and asymptomatic patients.* J Med Virol, 2021. **93**(5): p. 2932-2937.
66. Jamal, A.J., et al., *Sensitivity of Nasopharyngeal Swabs and Saliva for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2.* Clin Infect Dis, 2021. **72**(6): p. 1064-1066.
67. Mittal, A., et al., *Gargle lavage as a viable alternative to swab for detection of SARS-CoV-2.* Indian J Med Res, 2020. **152**(1 & 2): p. 77-81.
68. Malecki, M., et al., *Pharynx gargle samples are suitable for SARS-CoV-2 diagnostic use and save personal protective equipment and swabs.* Infect Control Hosp Epidemiol, 2021. **42**(2): p. 248-249.
69. Justo, A.F.O., et al., *Comparison of viral load between saliva and nasopharyngeal swabs for SARS-CoV2: the role of days of symptoms onset on diagnosis.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2021. **116**: p. e210018.
70. Fang Z, Z.Y., Hang C, Ai J, Li S, Zhang W, *Comparisons of viral shedding time of SARS-CoV-2 of different samples in ICU and non-ICU patients.* 2020.
71. Niko Kohmer 1, Lisa Eckermann 1,†, Boris Böddinghaus 2, Udo Götsch 2, Annemarie Berger 1, Eva Herrmann 3, Marhild Kortenbusch 1, Peter Tinnemann 2, Rene Gottschalk 1,2 , Sebastian Hoehl 1,*,‡ and and Sandra Ciesek 1, 5,‡, *Self-Collected Samples to Detect SARS-CoV-2: Direct Comparison of Saliva, Tongue Swab, Nasal Swab, Chewed Cotton Pads and Gargle Lavage.* 2021.

Danksagung

Diese Dissertation wurde im Zeitraum 2020 bis 2025 im Institut für Virologie des Universitätsklinikum Düsseldorf unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Jörg Timm durchgeführt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die professionelle Betreuung dieser Arbeit. Frau PD Dr. Nadine Lübke danke ich für jegliche Hilfestellung, für jede Kritik, für aufbauende Worte und die Korrektur dieser Dissertationsschrift. Ihre Unterstützung hat mich stets motiviert.

Ferner danke ich Herrn PD Dr. med. Hans Martin Bosse für die kompetente Zweitbetreuung, sowie die klinische Begleitung und Lehre in den vergangenen drei Berufsjahren. Durch gemeinsame Projekte innerhalb verschiedener Gremien, Famulaturen in der Pädiatrie und Ihre Begeisterung für dieses Fachgebiet, habe ich mich 2023 entschieden meine Facharztausbildung in der Pädiatrie zu beginnen. Auch Herrn Dr. med. Carsten Döing möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken! Ebenso danke ich dem Team der virologischen Diagnostik für die Unterstützung in der Probenannahme und Analyse. In Zeiten der Pandemie war eure Geduld keinesfalls selbstverständlich.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meine Eltern Elisabeth und Peter für jegliche Unterstützung, sowie die Ermöglichung diesen Weg zu gehen. Ihr wart und seid zeitlebens aufopferungsvoll für mich da, habt mir gezeigt, dass Probleme nur Hürden sind, an deren Bewältigung man wächst und habt mir und meinen Geschwistern ermöglicht behütet aufzuwachsen. Meiner Schwester Maria danke ich für die stilistische und sprachliche Korrektur dieser Arbeit. Meinem Bruder Johann für technische Unterstützung. Meiner lieben Oma Anni und Oma Christel danke ich für Ihren Pragmatismus, der mich gelehrt hat, das Leben so zu nehmen, wie es kommt. Ihr seid mir Vorbilder und ich bin dankbar Euch zu haben.

Besonderer Dank gilt meinem Freund Felix, der mich in jeder Phase des Studiums, Berufsstarts und der Doktorarbeit unterstützt hat, sowie meinen Freunden, insbesondere Lise, Julian und Jan.