

KLINIK UND POLIKLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE,
INTENSIVMEDIZIN UND SCHMERZTHERAPIE

**Darstellung der VOC-Profile von
SARS-CoV-2-/ Rhinovirus-infizierten Probanden
unter realen Screening-Bedingungen**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades:

Doktor der Medizin

Doktor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt von:

Rasmus Karl Jaap Remy

Geboren am 26.07.1990 in Berlin

2023

Gutachter:

Prof. Dr. med. Dipl. Chem. Jochen K. Schubert, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie

Assoz. Prof. PD Dr. Georg Singer, Universitätsklinikum Graz, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendchirurgie

Prof. Dr. rer. nat. habil. Bernd Kreikemeyer, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis.....	9
1. Einleitung.....	10
1.1. Virusinfektionen des Respirationstraktes	10
1.2. SARS-CoV-2	11
1.3. Rhinoviren	12
1.4. Viruslast und PCR-Zyklusschwelle.....	13
1.5. Volatile organische Verbindungen als Indikator für pathologische Prozesse	14
2. Fragestellung.....	17
3. Material und Methoden.....	18
3.1. Studienteilnehmer	18
3.2. Studiendesign.....	19
3.3. Studiendurchführung	22
3.4. PTR-ToF-MS Messung der volatilen organischen Komponenten	22
3.5. Verarbeitung der VOC-Daten.....	24
3.6. Selektion der VOCs zur Analyse.....	25
3.7. Statistik	25
4. Ergebnisse.....	29
4.1. RT-PCR-Screening.....	29
4.2. SARS-CoV-2	30
4.3. Rhinovirus	38
4.4. Ct-Wert	43
5. Diskussion.....	44
5.1. VOC-Profil-Erfassung im Screening-Setting	44

5.2.	SARS-CoV-2	45
5.3.	Rhinovirus	49
5.4.	Ct-Wert/Viruslast.....	51
5.5.	Limitationen der Studie	52
6.	Zusammenfassung.....	53
7.	Thesen der Arbeit.....	54
8.	Literaturverzeichnis	55
9.	Anhang.....	67
9.1.	Vortrag und Publikationen.....	67
9.2.	Lebenslauf	68
9.3.	Eidesstattliche Erklärung	69
9.4.	Einverständniserklärung und Studienaufklärung.....	70
	Danksagung.....	76

Abkürzungsverzeichnis

COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl. chronic obstruktive Pulmonary disease)
SARI	Schwere akute Atemwegsinfektion (engl.: severe acute respiratory Infection)
SARS-CoV-2	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2 (engl. Severe Acute Respiratory syndrome-coronavirus-type 2)
MERS-CoV	Engl. Middle East respiratory syndrom-related coronavirus
<i>In vitro</i>	Lateinischer Begriff; sinngemäß für „im Reagenzglas“
HIV	H umanes I mmundefizienz- V irus
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (engl. Acquired Immunodeficiency Syndrome)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic acid)
GC-MS	G aschromatographie- M assenspektrometrie
PTR –ToF- MS	P rotonen- T ransfer- R eaktions-Flugzeit (engl. Time-of-Flight)- M assenspektrometer
<i>In vivo</i>	Lateinischer Begriff; sinngemäß für „am lebenden Objekt“
VOC	V olatile organische Verbindung (engl. volatile organic compound)
ppbV	Teilchen pro Milliarde in Volumen (engl.: parts per billion by Volume)
pptV	Teilchen pro Trilliarde in Volumen (engl.: parts per trillion by Volume)
amu	Atomare Masseneinheit (engl. atomic mass unit)

RT-PCR	R everse T ranskriptase- P olymerase-Ketten (engl. chain)- r eaktion
CT-Wert	Zyklusschwelle (engl.: c ycle t hreshold)
KW	K alenderwoche
NRZ	Nationales R eferenzzentrum
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom (engl. a cute r espiratory d istress s yndrome)
IL-6	I nterleukin 6
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren (engl. s hort- c hain f atty a cid)
SD	Standardabweichung (engl. standard d eviation)

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Virus-Erfassung pro Woche, Juli 2016 bis Juni 2019 im Yale-New-Haven-Hospital (USA)
- Abbildung 2:** Experimenteller Aufbau zur kontinuierlichen Atemgas-Messung der VOCs mittels PTR-ToF-MS im CoVID-19-Test-Center unter erweiterten Anti-Infektions-Maßnahmen
- Abbildung 3:** Schematische Darstellung eines PTR-ToF-MS
- Abbildung 4:** Überblick der statistischen Vergleiche zwischen den einzelnen Unterkohorten von Kohorte 1 (Q1-Q5).
- Abbildung 5:** Überblick der statistischen Vergleiche zwischen den einzelnen Unterkohorten von Kohorte 2 (Q6-Q10).
- Abbildung 6:** Anteil identifizierter Atemwegsviren an allen im Rahmen des Sentinels eingesandten Proben
- Abbildung 7:** Virus-Erfassung pro Woche, Juli 2016 bis Juni 2019 im Yale-New-Haven-Hospital (USA)
- Abbildung 8:** Darstellung der Ergebnisse Q1
- Abbildung 9:** Darstellung der Ergebnisse Q2
- Abbildung 10:** Darstellung der Ergebnisse Q3
- Abbildung 11:** Darstellung der Ergebnisse Q4
- Abbildung 12:** Darstellung der Ergebnisse Q5
- Abbildung 13:** Darstellung der Ergebnisse Q6
- Abbildung 14:** Darstellung der Ergebnisse Q7

- Abbildung 15:** Darstellung der Ergebnisse Q8
- Abbildung 16:** Darstellung der Ergebnisse Q9
- Abbildung 17:** RT-PCR-Zyklus-Werte (Ct) und Darstellung des signifikant unterschiedlichen Dimethylsulfids basierend auf den Ct-Werten

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Demografische Daten der SARS-CoV-2-Studienteilnehmer¹

Tab. 2: Demographische Daten der Rhinovirus-Studienteilnehmer

Tab. 3: Ergebnisübersicht der unterschiedlichen statistischen Auswertungsabfragen

Q1 bis Q5

Tab. 4: Ergebnisübersicht der unterschiedlichen statistischen Auswertungsabfragen

Q6 bis Q10

¹ Das in dieser Arbeit gewählte generische Maskulinum bezieht sich zugleich auf die männliche, die weibliche und andere Geschlechteridentitäten. Zur besseren Lesbarkeit wird auf die Verwendung männlicher und weiblicher Sprachformen verzichtet. Alle Geschlechteridentitäten werden ausdrücklich mitgemeint, soweit die Aussagen dies erfordern.

1. Einleitung

1.1. Virusinfektionen des Respirationstraktes

Erkrankungen der Atemwege und der Lunge sind weltweit bedeutende Ursachen von Krankheitslast und Sterblichkeit. Hauptauslöser sind, neben chronischen Krankheiten wie Asthma, COPD und Tumorerkrankungen, respiratorische Infektionen. Jedes Jahr erkrankt ein großer Teil der Bevölkerung an einem Atemwegsinfekt, bei welchem Krankheitserreger die Schleimhäute der Atemwege befallen. Verschiedene Virenarten sind in Deutschland für über 90% dieser Atemwegsinfektionen verantwortlich und daher mit hohen gesellschaftlichen und ökonomischen Kosten assoziiert.^{1,2}

Coronaviren, Rhinoviren, Adenoviren und Enteroviren sind, je nach Jahreszeit und Klima, die häufigsten Erreger unter weit über 200 Virenstämmen.³ Ein Großteil dieser Virusinfektionen weist einen milden Verlauf auf. Auch mehrfache Erkrankungen pro Jahr sind meist unproblematisch. Jedoch kommt es bei einigen Patienten zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen. Das Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf und Exazerbation bereits vorhandener chronischer Erkrankungen steigt mit dem Alter und dem Vorliegen weiterer Grunderkrankungen stark an.⁴ Dabei weisen die verschiedenen Virenarten starke Unterschiede in Morbidität und Letalität auf. Im Jahr 2019 wurden allein in Deutschland über 665 000 Patienten auf Grund einer akuten Atemwegserkrankung im Krankenhaus behandelt.⁵ Knapp 20 000 Menschen starben an den Folgen einer schweren akuten Atemwegsinfektion (SARI = severe acute respiratory infection).⁶

Eine Diagnostik der für die Atemwegsinfektionen verantwortlichen Viren wird oftmals nicht durchgeführt. Ein Grund dafür ist, dass Virusinfektionen des Respirationstraktes häufig mit Superinfektionen durch mehrere Pathogene, vor allem Bakterien, einhergehen. Große Probleme in der Behandlung von Virusinfektionen bereiten fehlende Therapieoptionen, Verlaufsparmeter und Informationen über die Viruslast. Die verwendeten Verfahren zur Analyse der Virus-Wirt-Interaktionen und dem damit verbundenen Infektionsvorgang sind bis heute sehr aufwendig, kosten- und zeitintensiv.⁷

Im Folgenden werden nur die in der Studie beobachteten Viren vorgestellt.

1.2. SARS-CoV-2

Das SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) löst die COVID-19-Erkrankung beim Menschen aus. Es ist einer Unterklasse des Coronavirus zugehörig. Das Coronavirus ist ein großes, behülltes, einzelsträngiges RNA-Virus, das 1960 zum ersten Mal identifiziert wurde.⁸ Bekannte Coronaviren (229E, OC43, NL63, HKU1) sind für bis zu 30% der auftretenden Virusinfektion des Respirationstraktes verantwortlich.⁹ Diese Infektionen sind überwiegend harmlos für die betroffenen Patienten. 80 % der Erwachsenen weisen Antikörper gegen die aufgezählten Unterklassen der Coronaviren auf.

Andere Coronaviren waren schon in der Vergangenheit für pandemische Ausbrüche verantwortlich. So zum Beispiel das erstmals 2002 in China entdeckte SARS-CoV-1.¹⁰ Es verbreitete sich bis 2003 in 29 Ländern mit 8096 Fällen. 774 Todesfälle wurden mit dem Virus in Verbindung gebracht.¹¹ Seit 2012 werden Ausbrüche des MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome-related coronavirus) vorwiegend auf der arabischen Halbinsel beobachtet. Die hohe Letalität des Virus (~35%) führte bis 2019 zu 858 Todesopfern.¹²

SARS-CoV-1, MERS-CoV und SARS-CoV-2 weisen Spike-Proteine auf. Diese Spike-Proteine befähigen die Viren dazu, in die Wirtszelle einzudringen. Die Dipeptidylpeptidase 4 beim MERS-CoV und das Angiotensin-konvertierende Enzym (engl. Angiotensin Converting Enzyme, kurz ACE) bei SARS-CoV 1 und 2 bilden die Andockstellen der Körperzellen.^{13–15} Coronaviren nutzen neben den Menschen auch Tiere als Reservoir. Die Fledermaus gilt bei vielen Coronaviren, zu denen auch die drei genannten zählen, als tierischer Wirt.^{16–18}

Anders als bei dem SARS-CoV-1 und MERS-CoV befällt das SARS-CoV-2 überwiegend die oberen Atemwege. Auf Grund dessen weist das SARS-CoV-2 zwar eine geringere Letalität auf, ist aber gleichzeitig wesentlich infektiöser. Die Ansteckung erfolgt aerogen über Aerosole und Tröpfchen. Bis März 2022 wurden weltweit 470 Millionen Personen positiv auf das SARS-CoV-2 getestet. Die Zahl der Todesopfer im Zusammenhang mit dem Coronavirus betrug zu diesem Zeitpunkt 6,1 Millionen Fälle.¹⁹

1.3. Rhinoviren

Rhinoviren gehören zur Familie der Picornaviren. Sie sind relativ kleine (pico), unbehüllte und einzelsträngige RNA-Viren. Das Rhinovirus ist ubiquitär, auf den Menschen begrenzt, vorkommendes Virus. Dieses benutzt das Oberflächenprotein Intercellular adhesions molecule 1 (ICAM-1) als zellulären Rezeptor um in die Zelle einzudringen.²⁰

Die Rhinovirus-Infektionsrate unterliegt saisonalen Schwankungen. So können sich Erkrankungen mit Influenza-A-Viren oder Rhinoviren untereinander beeinflussen (s. Abb. 1). Grund hierfür ist einerseits die Interaktion zwischen Virus und humanem Immunsystem und andererseits eine Blockade einzelner Zellhüllproteine durch die jeweiligen Pathogene.²¹ Neueste Erkenntnisse zeigen, dass eine Rhinovirus-Infektion nicht nur mit einer Influenza-A-Infektion interferiert, sondern auch eine SARS-CoV- Infektion beeinträchtigen kann.²²

Bei der Rhinovirus-Infektion gelten Schmierinfektionen als häufigster Infektionsweg. Tröpfcheninfektionen hingegen spielen auf Grund der Sensibilität für Luftfeuchtigkeit eine untergeordnete Rolle.²³ Das Rhinovirus bleibt auf Grund seiner Hitzelabilität meist auf das Epithel der Nasenschleimhaut begrenzt. Bis zu 50% der Erkältungskrankheiten sind auf dieses Virus zurück zu führen.²⁴ Dabei gelten die Sinusitis und die Otitis media als Komplikationen der Erkrankung. Bei pulmonalen Vorerkrankungen wie COPD und Asthma Bronchiale können Infektionen mit dem Rhinovirus eine Exazerbation verursachen.²⁵

Im Allgemeinen gilt das Rhinovirus aber als harmlos einzuordnen. Die Durchseuchungsrate der Bevölkerung liegt nahe der 100 % und ein Drittel aller Infektionen laufen asymptomatisch ab.²⁶ Das Rhinovirus ist hierbei in Bezug auf volatile organische Verbindungen (VOC) *in vitro* weitgehend unerforscht. Schee *et al.* untersuchten den Einfluss des Rhinovirus auf die VOC-Profile erkrankter Kinder.²⁷

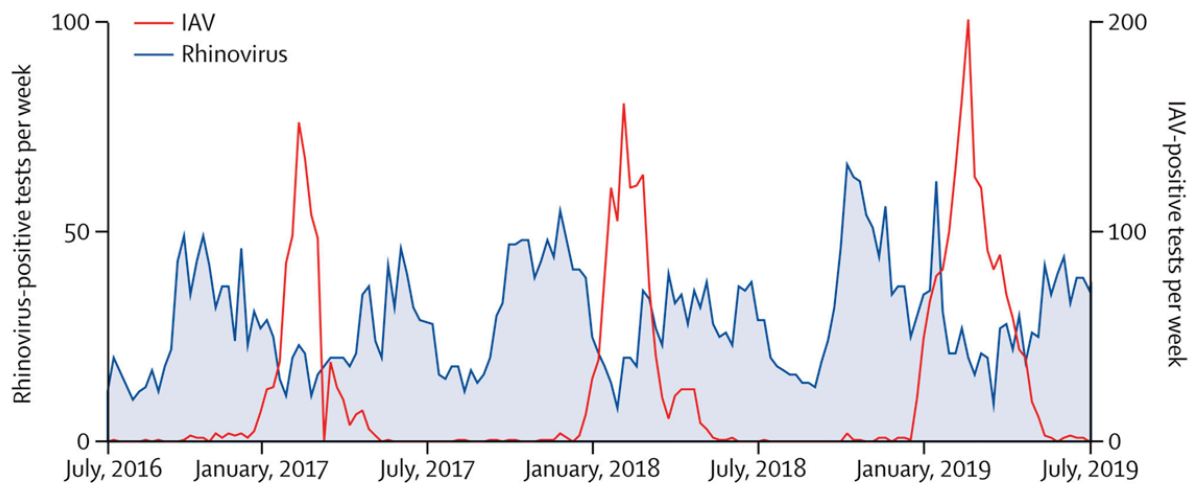


Abbildung 1: Virus Erfassung pro Woche, Juli 2016 bis Juni 2019 im Yale-New-Haven-Hospital (USA)

Absolute Anzahl von Rhinovirus und Influenza A-positiven respiratorischen Proben pro Woche vom 1. Juli, 2016 (KW 26), bis zum 30. Juni, 2019 (KW 25).

Copyright © 2020 Wu et al. Published by Elsevier Ltd.²¹

1.4. Viruslast und PCR-Zyklusschwelle

Die HIV (humanes Immundefizienz-Virus) -Infektionswelle in den 1990er Jahren brachte die Tragweite der Viruslast zum Ausdruck. Anhand ihrer wurde die Progression der AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) -Erkrankungen und Therapieerfolge abgeleitet.²⁸ Die im Blutplasma erkrankter Probanden gemessenen HIV-1-RNA-Konzentrationen erwiesen sich als sicherste Prädiktoren für den Krankheitsverlauf einer HIV-Infektion.²⁹

Daraufhin wurden auch für Hepatitis B und Hepatitis C (HBV bzw. HCV) Viruslasten im Blutserum untersucht, um Therapieschemata zu begleiten.^{30,31} Seither wurden durch die WHO für HIV, HAV (Hepatitis A), HBV, HCV, Parvovirus B19 und Plasmodium falciparum (Malaria-Erreger) standardisierte Untersuchungsmethoden erstellt.

Dabei wird die Viruslast in internationalen Einheiten pro Milliliter (IU/ml) angegeben. Die bestimmte IU/ml ist Grundlage für eine mögliche Anwendung von First- und Second-Line Therapien.³² Ein großes Problem stellen bis heute fehlende Standards und reproduzierbare Ergebnisse dar.³³

RNA- und DNA-Bestandteile sind Grundlage der Diagnostik der Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) von respiratorischen Pathogenen. Diese werden anders als bei o.g. Viruslast nicht im Blutserum, sondern im Material des Mund-Nasen-Abstriches detektiert. Der Ct-Wert (cycle- threshold- Wert) ist hierbei der ausschlaggebende Faktor für die Beurteilung der Infektionsgefahr. Dieser gibt die Anzahl an Messzyklen an, die innerhalb einer PCR-Probe durchgeführt wurden, um das Coronavirus nachzuweisen. Die Zyklusschwelle bestimmt, wann ein vorher definierter Ct-Grenzwert unterschritten wird und eine erkrankte Person als infektiös gilt. In Deutschland liegt dieser definierte Grenzwert für die SARS-CoV-2 Infektion zwischen 30 und 40 Zyklen.

Der Ct-Wert der SARS-CoV-2 Infektion gewann im Laufe der Corona-Pandemie große Aufmerksamkeit, da dieser Grundlage für Quarantänemaßnahmen ist. In nationalen sowie internationalen Fachkreisen bestehen unterschiedliche Meinungen zum Ct-Wert und seiner Aussagekraft in Bezug auf Viruslast und Erkrankungsverlauf.^{34–36} Dabei deuten Studien auf einen Zusammenhang zwischen Krankheitssymptomen und Ct-Werten hin.^{37,38}

1.5. Volatile organische Verbindungen als Indikator für pathologische Prozesse

Schon seit Jahrhunderten spielen Atemgase eine wichtige Rolle in der Medizin. Kopernikus erkannte in der Qualität der Ausatemluft wichtige Hinweise auf den Gesundheitszustand des Patienten.³⁹ So wurden im Mittelalter ein süßer Geruch Diabetes und ein fischartiger Geruch Lebersversagen zugeordnet.⁴⁰ Mit Hilfe von technischen Entwicklungen und intensiver wissenschaftlicher Arbeit gelangen in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte in der Atemgasanalytik.⁴¹ Alkoholkontrollen und Spiroergometrie werden tagtäglich und ubiquitär eingesetzt.⁴² Auch im klinischen Alltag haben Atemgas-Analysen Einzug erhalten. Ein prominentes Beispiel ist der Test mit ¹³C-gelabeltem Harnstoff für den Nachweis einer Helicobacter pylori-Infektion.⁴³

Vor allem die VOC-Analytik mittels GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) und PTR-MS (Protonen-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie) haben in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen.⁴⁴ Ein Hauptaugenmerk liegt hierbei auf den Erkrankungen des respiratorischen Traktes. Produkte des Stoffwechsels der Pathogene und der Interaktionen zwischen Virus oder Bakterium und Zellen des Wirts werden vor Ort produziert und daraufhin

abgeatmet. Folgend ist die Erfassung von Biomarkern und spezifischen VOC-Profilen von großem Interesse. Erkenntnisgewinne für die Diagnostik, Schwere der Erkrankung und Therapieverlauf wären von fundamentaler Bedeutung. *In-vitro*-Versuche mit viral infizierten Zellen weisen potentielle Biomarker auf und stellen das Potential der VOC-Analyse in den Vordergrund.^{45–47}

Jüngste Studien haben Untersuchungen, die auf der VOC-Analyse der Ausatemluft basieren, als alternative Option zur COVID-19 Erfassung vorgeschlagen.^{48,49} Auch drei Jahre nach dem Auftreten der ersten SARS-CoV2-Infektion im Januar 2020 in Deutschland sind die Coronapandemie und ihre Folgen noch immer in der Gesellschaft spürbar.⁵⁰ Die Infektionsrate, die damit verbundenen Hospitalisierungs- und Mortalitätsraten bestimmen die Berichterstattung in den Medien und sind Grundlagen des Maßnahmenkataloges der Bundesregierung.⁵¹ Weltweit arbeiten Regierungen und Gesundheitssysteme am Limit, um sowohl die gesundheitlichen als auch die wirtschaftlichen Folgen der Pandemie zu kontrollieren.⁵²

Von entscheidender Bedeutung bei der Bekämpfung des Infektionsgeschehen ist die frühzeitige Erfassung und Überwachung der Neuinfizierten. Auf Grund seiner ausgewiesenen hohen Spezifität (>99%) und Sensitivität (>99%), ist der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)- Test der aktuelle diagnostische Goldstandard für die Diagnose einer SARS-CoV-2-Infektion.^{53,54} Diese Attribute gelten eingeschränkt auch für die vom Paul-Ehrlich-Institut zugelassenen Antigen-Schnelltests.⁵⁵ Trotz der ubiquitären Verfügbarkeit der zuvor genannten Tests und deren ausgeprägter Nutzung, ist es über Jahre hinweg nur eingeschränkt gelungen, die Pandemie einzudämmen und zu kontrollieren.

Der Wissensgewinn über die Erkrankung und, im Besonderen, über den Krankheitsmechanismus ist limitiert. Informationen über Infektionsabläufe sind von großem Interesse und zusätzliche Kontrollparameter der SARS-CoV2-Infektion erstrebenswert. Im Gegensatz zu vielen anderen Biomarkern können VOCs augenblicklich physiologische, metabolische und pathologische Prozesse im ganzen Körper widerspiegeln.^{56–63} VOCs, die auf zellulärer Ebene entstehen, werden durch die Zellmembranen in die Blutgefäße transferiert. Über den Blut-Gas-Austausch der Lunge gelangen diese innerhalb von Minuten in die Alveolen und werden anschließend abgeatmet. Da sich VOC-Konzentrationen innerhalb kürzester Zeit verändern können und stark auf die zugrunde liegenden Mechanismen reagieren, könnten wiederholende Untersuchungen und Darstellungen von VOC-Profilen frühzeitig zusätzliche Informationen zum Krankheitsstadium, zu Infektionsprozessen und der Viruslast einzelner Viruserkrankungen liefern.⁶⁴

Perspektivisch könnten Therapien besser begleitet und das Risiko einer viral-bakteriellen Ko-Infektion verringert werden.

In einem erstmaligen großen Tiermodell mit H1N1 infizierten Schweinen, konnte das Potential der VOC-Analyse für ein Monitoring dieser Virus-(Ko)-Infektion demonstriert werden.^{47,65} Lange bevor klinische Symptome auftraten, zeigte sich eine Zunahme der Viruslast. Verantwortlich für die Unterschiede in den VOC-Profilen könnten der Stoffwechsel der Pathogene, Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen sowie die Immunantwort des betroffenen Wirtes sein. Da die verschiedenen Viren keinen eigenen Stoffwechsel aufweisen, müssen die Veränderungen auf zelluläre Interaktionen zwischen Wirt und Virus und/oder Reaktion des Wirtes zurück zu führen sein.

In-vitro Studien mit Rhinovirus-infizierten Epithelzellen des Lungengewebes zeigten veränderte Substanzkonzentrationen auf.⁴⁵ Ähnliche Ergebnisse wurden mit Influenza-A-infizierten B-Lymphozyten beobachtet.⁴⁶ Zudem bewiesen Studien mit *in-vitro* bakteriell infizierten Zellen (*S. pyogenes*), als auch mit ko-infizierten Zellen (Influenza-A und *S. pyogenes*), dass eine Detektion des veränderten Zellmetabolismus auf Grund von veränderten VOC-Profilen möglich ist.^{47,66,67} In allen genannten Studien wurde deutlich, dass die VOC-Profile starke dynamische Schwankungen aufweisen.

2. Fragestellung

Die vorliegende Dissertationsschrift befasst sich mit der Analyse volatiler organischer Komponenten in Bezug auf Virusinfektionen von nicht vorselektierten Probanden. Das Ziel der durchgeführten Studie war, unter realistischen Screening-Bedingungen in einem COVID-19-Test-Zentrum ein Verfahren zur Erfassung von Atemgasprofilen in Echtzeit zu etablieren und zu untersuchen, ob sich die VOC-Profile infizierter Probanden und nicht infizierten Probanden unterscheiden.

1. Erfassung der VOC-Profile im Screening Szenario:
 - a. Ist die Etablierung eines analytischen Screening-Verfahrens mit den zur Verfügung stehenden Analysemethoden unter den besonderen Umständen einer Pandemie möglich?
 - b. Welche Vergleiche zwischen den Unterkohorten mit unterschiedlichen Charakteristika sind in einem Screening-Setting sinnvoll?
 - c. Sind Einflussfaktoren der Umgebung auf die VOC-Profile zu beobachten?
2. VOC-Profile der SARS-CoV-2-positiven Kohorte:
 - a. Unterscheiden sich VOC-Profile infizierter Probanden gegenüber nicht infizierten Probanden?
 - b. Verändern sich die VOC-Profile in der Gegenüberstellung der verschiedenen Unterkohorten?
3. VOC-Profile der Rhinovirus-positiven Kohorte:
 - a. Können Unterschiede in den VOC-Profilen infizierter Probanden zu nicht infizierten Probanden dargestellt werden?
 - b. Treten Unterschiede in den VOC-Profilen bei einem Vergleich der einzelnen Unterkohorten auf?
4. Ct-Werte der SARS-CoV-2 infizierten Kohorte:
 - a. Existiert ein Zusammenhang zwischen der Viruslast und den VOC-Profilen der SARS-CoV-2-Kohorte?

3. Material und Methoden

3.1. Studienteilnehmer

Nach Bewilligung des Ethikantrages durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Rostock (Bewilligungsnummer: A 2020 0085, Datum der Zulassung: 17 April 2020), wurde das Studiendesign umgesetzt und im Warteraum des Corona-Testzentrums (Leitung Dr.med. Loebermann) der Universitätsmedizin Rostock etabliert.

Nach einer individuellen Aufklärung über die Durchführung, mögliche Risiken und das Ziel der Studie, wurden im Zeitraum von Oktober 2020 bis Januar 2021 insgesamt 708 Probanden in die Studie eingeschlossen und ihre VOC-Profile analysiert. Rekrutierungen wurden jeweils zwischen 9 Uhr und 13 Uhr durchgeführt.

SARS-CoV-2 Kohorte:

Alle Probanden wurden einem SARS-CoV-2 RT-PCR-Test unterzogen und konnten so entweder der SARS-CoV-2 positiven oder der SARS-CoV-2 negativen Kohorte zugewiesen werden. Insgesamt wurden 355 männliche Probanden und 353 weibliche Probanden getestet. Die demographischen Daten sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Demographische Daten der SARS-CoV2-Studienteilnehmer

SARS-CoV-2	Alle	Männer	Frauen
Anzahl der Probanden (%)	708	355 (50,1)	353 (49,9)
Alter [Jahre] (MW \pm SD)	39,3 \pm 14,8	40,8 \pm 14,7	37,8 \pm 14,9
Anzahl der CoV-2-positiv getesteten Probanden (%)	36	14 (38,9)	22 (61,1)
Alter der CoV-2-positiv getesteten Probanden [Jahre] (MW \pm SD)	37,8 \pm 15,1	40,3 \pm 13,6	36,2 \pm 16,1

Rhinovirus Kohorte:

Zusätzlich wurde ein standardisierter RT-PCR-Test für weitere respiratorische Pathogene bei den teilnehmenden Personen durchgeführt. Mit diesem wurden die Rhinovirus-positiven Probanden identifiziert.

Auf Grund des hohen Testaufkommens und der Beteiligung mehrerer Parteien (Testzentrumspersonal, Studiendurchführer/in, Mitarbeiter/innen des Instituts für Med. Mikrobiologie, Virologie und Hygiene) kam es bei 22 Probanden zu Missverständnissen in der Kommunikationskette. Diese 22 Probanden weisen keinen standardisierten RT-PCR-Test für weitere respiratorische Pathogene auf.

Somit konnten insgesamt 686 Probanden, darunter 346 männliche und 340 weibliche Personen, der Rhinovirus-Studie zugewiesen werden. Die demographischen Daten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Demographische Daten der Rhinovirus-Studienteilnehmer

Rhinovirus	Alle	Männer	Frauen
Anzahl der Probanden (%)	686	346 (50,4)	340 (49,6)
Alter [Jahre] (MW \pm SD)	39,4 \pm 14,9	40,8 \pm 14,7	37,9 \pm 15,0
Anzahl der Rhinovirus-positiv getesteten Probanden (%)	67	32 (47,8)	35 (52,2)
Alter der Rhinovirus-positiv getesteten Probanden [Jahre] (MW \pm SD)	35,4 \pm 10,8	34,4 \pm 9,3	36,3 \pm 12,1

Die prospektive Studie wurde nach den Richtlinien der “Deklaration von Helsinki” durchgeführt. Die Studienteilnehmer wurden vor Ort im Corona-Testzentrum der UMR (Seminarraum 2 der chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock) angesprochen, aufgeklärt und beprobt.

3.2. Studiendesign

Die Studie wurde ausgeführt ohne die Abläufe im COVID-Testzentrum einzuschränken oder zu verzögern. Um Infektionen zu verhindern, wurden die entwickelten und standardisierten Durchführungsabläufe zu jeder Zeit eingehalten. Es wurden keine Ansteckungen bei Probanden

und/oder medizinischem Personal durch die Teilnahme an der Studie nachgewiesen. Atemproben wurden prospektiv und ohne vorherige Selektion der Studienteilnehmer erfasst.

Um die hohe Infektions-Sicherheit zu gewährleisten, wurden weitreichende Maßnahmen ergriffen. Ein Raumteiler (150 cm x 225 cm) aus Plastik wurde zwischen den Probanden und der studiendurchführenden Person installiert. Zusätzlich kamen zwei unterschiedliche Virusfilter zum Einsatz. Ein HEPA-Filter (Ultipor BB25G Hydrophobic filter, CE 0088, PALL®, Pall Medical, NY, USA) zum filtern des Hauptstroms zwischen der Umgebungsluft und dem Probanden. Dieser HEPA-Filter (blau, eckig, s. Abb. 2) wurde am Ende des Mundstückes platziert, um eine Kontamination der Raumluft zu verhindern.

Weiterhin wurde ein Virusfilter (Sartorius PTFE 0.2 µm, 16596-HYK, Non-pyrogenic CE 1639, Minisart®, Göttingen, Deutschland) zum filtern des Nebenstroms zwischen dem Probanden und der Maschine verwendet. Der Virusfilter (weiß, rund, s. Abb. 2) befand sich am Ende der Transfer-Linie der PTR-ToF-MS um eine Kontamination der Maschinerie zu vermeiden.

Alle Einmal-Materialien wurden nach Gebrauch verworfen. Nach der Durchführung der Messung wurden sowohl der Stuhl des Probanden als auch die Plastiktrennwand desinfiziert. Eine regelmäßige Lüftung des Raumes wurde alle 10 Minuten durchgeführt.

Teil des standardisierten RT-PCR-Screenings, an dem die Probanden teilnahmen, waren SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, Respiratory Syncytial Virus A/B, Humanes Metapneumovirus, Rhinovirus, Adenovirus, Parainfluenza 1, 2, 3 und 4, Bocavirus, Coronavirus 229E, OC43, NL63 und HKU1.⁶⁸ Um eventuelle bakterielle Infektionserreger zu identifizieren, wurde das Probandenmaterial (Rachenabstrich) zusätzlich zu respiratorischen Virusinfektionen auch auf bakterielle Pathogene der Atemwege untersucht. Analysiert wurde der Rachenabstrich durch kommerziell verfügbare, standardisierte Multiplex PCR-Tests. Das Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock führte diese Untersuchungen durch.

Auch die PCR-cycle-threshold (Ct)-Werte der SARS-CoV-2 positiven Fälle wurden ermittelt.^{37,69} Zusätzliche Informationen zu den Probanden umfassten Alter, Geschlecht und klassische Erkältungssymptome wie Husten, Schnupfen, Fieber, Kopf- und Halsschmerzen, Geruchs- und Geschmacksverlust, Bauchschmerzen und Luftnot.

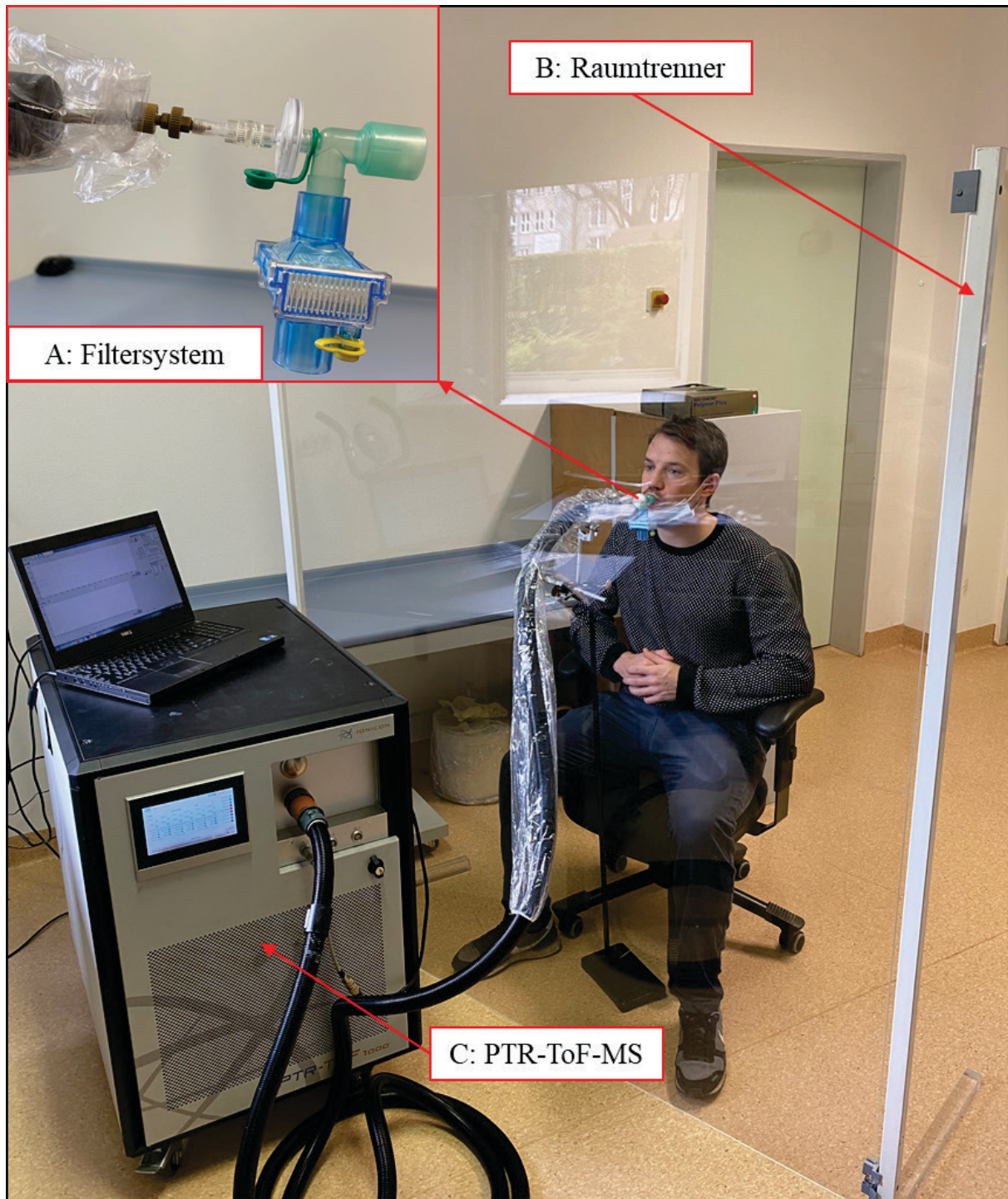


Abbildung 2: Experimenteller Aufbau zur kontinuierlichen Atemgas-Messung der volatilen organischen Komponenten mittels PTR-ToF-MS unter erweiterten Anti-Infektions-Maßnahmen. (A) Filtersystem: HEPA- Hauptstromfilter zur Vorbeugung der Raumkontamination, Spritzenfilter zur Vorbeugung viraler Kontamination der Instrumente, (B) Rauntrenner aus Plexiglas und (C) PTR-ToF-MS.

3.3. Studiendurchführung

Die Probanden wurden nach ihrer schriftlichen Einwilligung dem Studiendesign zugeführt. Zuerst wurden die Teilnehmer gebeten, auf dem dafür vorgesehenen Stuhl Platz zu nehmen. Im nächsten Schritt wurde ihnen der Ablauf und Besonderheiten, wie die Mundatmung, erklärt.⁷⁰ Dieser Vorgang nahm drei Minuten in Anspruch. Daraufhin nahmen die Studienteilnehmer ihre Masken ab und das sterile Mundstück in den Mund (T-piece, Intersurgical GmbH, Sankt Augustin, Germany). Das Mundstück wurde von den Probanden individuell auf einer geeigneten und komfortablen Höhe gehalten. Der Transferschlauch der PTR-ToF-MS war mit dem Virusfilter verbunden (s. Abb. 2) und maß kontinuierlich mit einem Fluß von 100ml/min die Ausatemluft sowie die inspiratorische Raumluft in Echtzeit. Der HEPA-Filter verursacht einen minimalen Atemwiderstand, welcher jedoch nachweislich keinen Einfluss auf die Messdaten hatte.^{71,72} Drei Minuten dauerte die Durchführung der Atemgas-Messung, wobei darauf geachtet wurde, dass die Probanden gleichmäßig und möglichst ruhig atmeten. Die Messung fand zu jeder Zeit in sitzender Position statt.⁷³ Eine gegebenenfalls auftretende nasale Atmung wurde durch manuelles Zuhalten der Nase verhindert. Nach Abschluss der Probennahme wurden alle Einmalartikel verworfen, der Studienplatz desinfiziert und das Fenster geöffnet. Je nach Testaufkommen wurde der PCR-Abstrich vor oder nach der Atemgasmessung durchgeführt.

3.4. PTR-ToF-MS Messung der volatilen organischen Komponenten

Für die Echtzeit-Messungen wurde eine PTR-ToF-MS 1000 (Icon Analytik GmbH, Innsbruck, Österreich) mit der Software (Ionitov) und prä-optimierten Einstellungen verwendet.^{74,75} Die Software ist in der Lage, online und kontinuierlich VOCs zu detektieren. Die einzelnen Substanzkonzentrationen liegen im ppbV- bis pptV-Bereich. Die Massenskala reichte von 30 bis 160 amü bei einer Zeitauflösung von ~200ms. Die PTR-ToF-MS besteht aus drei wesentlichen Bestandteilen: einer Ionenquelle, der sogenannten Drifttube (Reaktionskammer) gefolgt vom Flugzeit-Massenspektrometer (s. Abb. 3). In der Ionenquelle werden Hydroniumionen aus Wasserdampf über eine Hohlkathodenglimmentladung erzeugt (H_3O^+). In der Reaktionskammer treffen die Hydroniumionen auf die Substanzen des Atemgases. Daraufhin werden die Substanzen des Atemgases protoniert ($\text{M} + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{MH}^+ + \text{H}_2\text{O}$). Hierbei handelt es sich um eine „weiche“ Ionisation durch Protonentransfer, bei welcher die Moleküle kaum oder gar nicht

fragmentiert werden. Die Identifizierung der protonierten Addukte erfolgt über das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z), die im Massenspektrometer durchgeführt wird. Die positiv geladenen Substanzen (MH^+) werden gebündelt und beschleunigt. Ein Detektor am Ende der Flugbahn registriert die von einem Magnetfeld umgeleiteten Moleküle (Reflektion). Der Detektor kann über die unterschiedlichen Flugzeiten, die bei gleicher Ladung mit zunehmendem Molekulargewicht länger wird, das m/z -Verhältnis bestimmen. Diese kann den unterschiedlichen Substanzen zugeordnet werden. Es wurde im Nebenstrom der Ausatemluft mit einem kontinuierlichen Fluß von 100 ml/min über eine sechs Meter lange, auf 75 Grad Celsius erhitzte, Transfer-Linie (Silikon-Stahl) gemessen. Die Spannung der PTR-Drift-Tube betrug 610 Volt und der Druck 2.3 mbar. Eine Datenaufnahme wurde alle 60 Sekunden automatisch erstellt und die Massenskala kalibriert. Folgende Massen wurden für die Kalibrierung genutzt: 21.0226 (H_3O^+ -isotop), 29.998 (NO^+) und 59.049 (C_3H_6O).

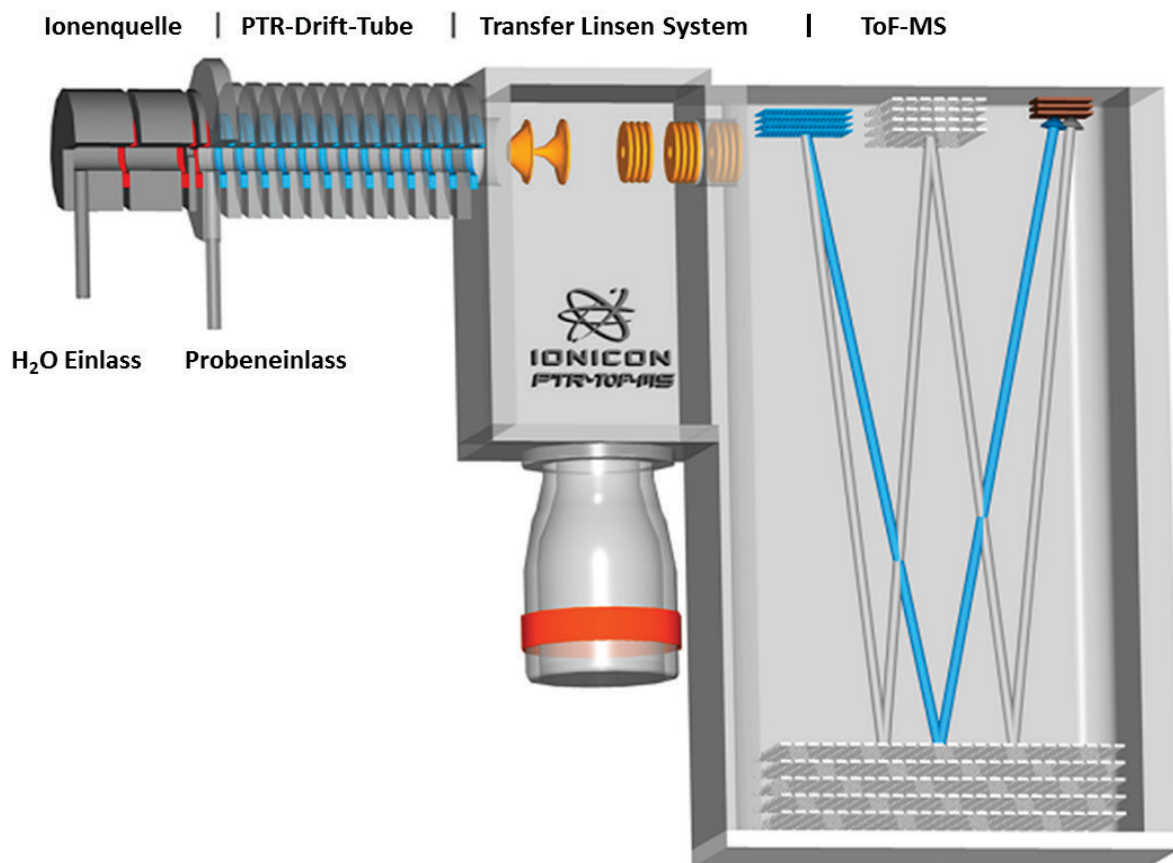


Abbildung 3: Schematische Darstellung der PTR-ToF-MS.

Quelle: www.ionicon.com

3.5. Verarbeitung der VOC-Daten

Die volatilen organischen Komponenten wurden in Counts pro Sekunden (cps) gemessen. Die Rohdaten wurden durch die PTR-MS-Viewer Software (Ionicon, Innsbruck, Österreich, Version 3.228) verarbeitet. Da eine kontinuierliche Messung durch die PTR-MS vorliegt, wurde zur automatischen Unterscheidung zwischen Expiration und Inspiration ein Matlab-Script (MathWorks, Natick, USA, Version 7.12.0.635, R2015a) benutzt.⁷⁶ Als endogene Substanz wurde hier Aceton als sogenannte „Breathtracker-Substanz“ ausgewählt. Aceton ist endogenen Ursprungs und weist folglich eine signifikant höhere Signal-Intensität in der Expiration auf. Die Raumluft wurde separat im 15-Minuten-Intervall gemessen. Die PTR-ToF-MS besitzt eine sehr hohe Massenauflösung (1000-2000 $\Delta m/m$) und kann die volatilen Komponenten ihren korrespondierenden Summenformeln mit hoher Präzision zuordnen.⁷⁰

Die in dieser Studie identifizierten Substanzen sind sowohl exogenen (z.B. Formaldehyd, Benzol, Toluol, Acetonitril, Monoterpene, etc.) als auch endogenen (z.B. Ketone, Fettsäuren, Aldehyde, Alkohole) Ursprungs. Die VOCs wurden zu einem Teil über *reaction rate coefficients* (k -Raten) und zum anderen Teil über einen Multi-Komponenten-Mix aus standardisierten Referenzsubstanzen quantifiziert.⁷⁷ Der Quantifizierungs-Prozess mit einem standardisierten VOC-Mix wurde mittels einer Flüssig-Kalibrations-Einheit (LCU, Ionicon Analytik GmbH, Innsbruck, Österreich) unter adaptierten Probebedingungen (Luftfeuchtigkeit wie in der Expirationsphase) durchgeführt.⁷⁸

Folgende Substanzen wurden mittels Referenz-VOC-Standard kalibriert: Formaldehyd, Acetaldehyd, Crotonaldehyd, Acrolein, Butanal, Pentanal, Hexanal, Methanol, Ethanol, Isopropanol, Aceton, Isopren, Dimethylsulfid, Butanon, Benzol, Toluol, Xylol und Limonen/Alpha-Pinen. Alle Probenentnahmen erfolgten in derselben kontrollierten Umgebung. Es konnten keine signifikanten Feuchtigkeitsvariationen (<5%) in der Raumluft observiert werden. Die humane Ausatemluft ist immer zu 100% H₂O-gesättigt und kann somit nicht durch inhalierte Feuchtigkeit beeinflusst werden.

3.6. Selektion der VOCs zur Analyse

Um die Substanzen zu selektieren, wurden verschiedene Kriterien angewandt. Bekannte volatile Komponenten exogenen Ursprungs und volatile Komponenten, deren Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze (Limit of Detektion, LOD: Mittelwert der jeweiligen Substanzkonzentrationen + 3 x SD) lagen, wurden nicht in die weitere statistische Auswertung inkludiert. Auf diese Weise wurden 45 Substanzen zur weiteren Auswertung identifiziert.

3.7. Statistik

Eine Poweranalyse ergab eine Stichgruppengröße von 35 SARS-CoV-2-bzw. Rhinovirus-Infizierten, um einen Alpha-Wert von 0,005 und eine statistische Power (Teststärke) von 0,99 zu erreichen. Um Differenzen von weniger als 5% in den ausgeatmeten VOCs, die sich in Konzentrationsbereichen von *parts per billion* (ppbV) oder *parts per trillion* (pptV) bewegen, zu detektieren, wurde eine minimale Nachweisgrenze für die durchschnittlichen Substanzintensitäten von 350 cps und eine Standardabweichung von 275 errechnet.

Durchschnittswerte der VOC-Konzentrationen einzelner Probanden wurden im Minutentakt erhoben. Die Daten der zweiten Minute, der drei insgesamt erfassten Minuten, wurden für die statistische Analyse herangezogen. Die statistisch signifikanten Differenzen der VOC-Konzentrationen in der Ausatemluft der einzelnen Kohorten wurden durch den *Mann-Whitney-Rank-Sum-Test* für unabhängige Proben ($p\text{-value} \leq 0.05$) in SPSS (IBM corporation, New York, USA, Version 27) beurteilt.

Für die Überprüfung der Ergebnisse und zum Erstellen der Boxplots wurde Sigma Plot (Systat Software GmbH, Erkrath Deutschland, Version 14) genutzt. Anschließend erfolgte eine Zuweisung in SARS-CoV-2-beziehungsweise Rhinovirus-positive Kohorten. Um die Ergebnisse der VOC-Analyse beider Kohorten zu qualifizieren, wurden zwei unabhängige Kohorten-Kataloge mit jeweils fünf Abfragen erstellt.

SARS-CoV-2-positive Kohorte (Kohorte 1):

Wie der Abbildung 4 zu entnehmen ist, wurden zuerst die SARS-CoV-2-positiven (36/708; 5,1%) allen SARS-CoV-2-negativen Probanden (672/708; 94,9%) gegenübergestellt (**Q1**). Auch ein möglicher Einfluss des Immunsystems und der Symptome wurde näher betrachtet. Dazu wurden nur die SARS-CoV-2-positiven Probanden, die Symptome aufwiesen (25/697; 3,6%), mit allen SARS-CoV-2-negativen Teilnehmern (672/697; 96,4%) (**Q2**) verglichen.

Im Folgenden wurde ein eventueller Einfluss der weiteren respiratorischen Pathogene auf die VOC-Profil untersucht. Hierzu kam ein Vergleich zwischen Probanden mit einem nachgewiesenen respiratorischen Pathogen und/ oder Symptomen (416/452; 92,1%) und SARS-CoV-2-positiven Probanden (36/452; 7,9%) (**Q3**) zum Einsatz. Zusätzlich wurden in **Q4** SARS-CoV-2-positive Teilnehmer (36/292; 12,3%) einer „gesunden“ Kontrollkohorte (256/292; 87,7%) gegenübergestellt. Diese Kontrollkohorte (n=256) definierte sich über einen negativen Multiplex-PCR-Test auf respiratorische Pathogene, einen negativen SARS-CoV-2-PCR-Test und nicht vorhandene Erkältungssymptome. Abschließend erfolgte ein Vergleich zwischen SARS-CoV-2-positiven Probanden mit (25/36; 69,44%) und ohne (11/36; 30,56%) Symptomen (**Q5**).

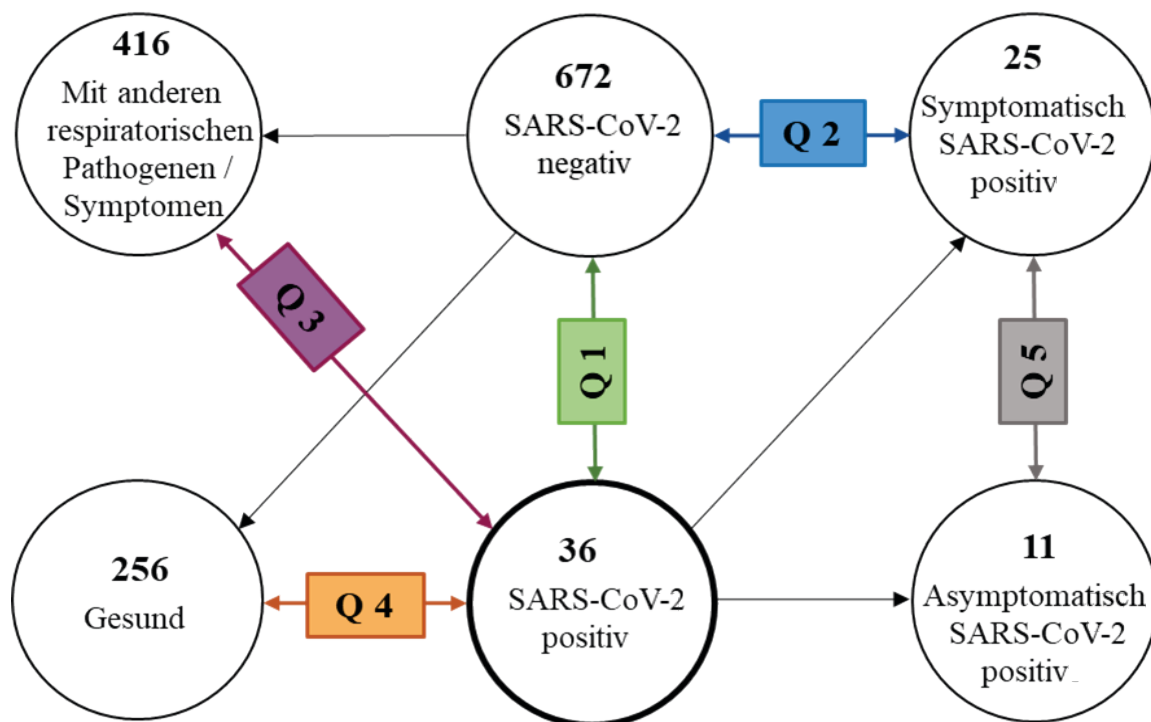


Abbildung 4: Überblick der statistischen Vergleiche zwischen den einzelnen Unterkohorten von Kohorte 1 (Q1-Q5).

Rhinovirus-positive Kohorte (Kohorte 2):

Der Abbildung 5 kann entnommen werden, dass zuerst alle Rhinovirus-positiven (67/686, 9,77%) allen Rhinovirus-negativen Probanden (619/686, 90,23%) gegenübergestellt wurde (Q6). Es erfolgte die gleiche Vorgehensweise und Gegenüberstellung wie bei der SARS-CoV-2-Kohorte. Nachstehend werden die weiteren Vergleiche aufgeführt:

- Rhinovirus-positive Probanden mit Symptomen (63/682, 9,24%) versus Rhinovirus-negativ (619/682, 90,76%) getestete Probanden (Q7)
- Rhinovirus-positiv getestete Personen (67/430, 15,58%) versus Probanden mit nachgewiesenen respiratorischen Pathogenen und/ oder Symptomen (363/430, 84,42%) (Q8)
- Rhinovirus-positive Probanden (67/323, 20,74%) versus „gesunde“ Kontrollkohorte (256/323, 79,26%) (Q9)
- Rhinovirus-positiv getestete Probanden mit Symptomen (64/67, 95,52%) versus Rhinovirus-positiv getestete Probanden ohne Symptome (4/67), 4,48%) (Q10)

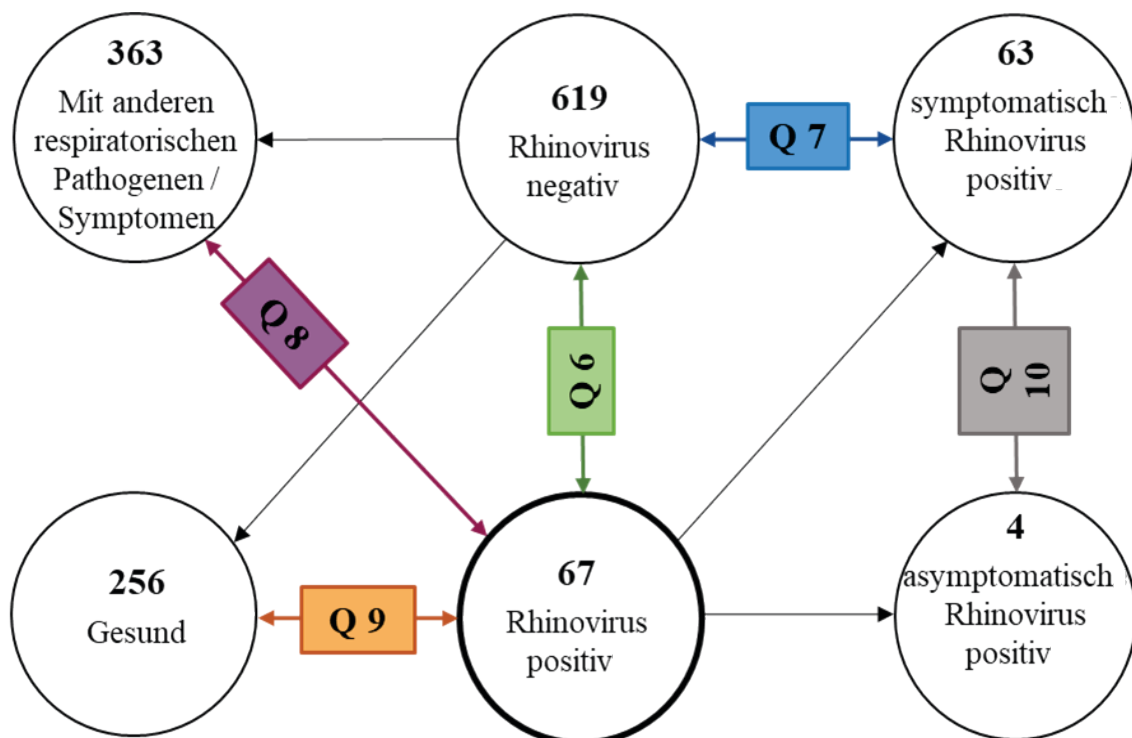


Abbildung 5: Überblick der statistischen Vergleiche zwischen den einzelnen Unterkohorten von Kohorte 2 (Q6-Q10).

Die SARS-CoV-2-sowie die Rhinovirus-infizierten Probanden wurden unabhängig voneinander gruppiert, analysiert und verglichen. Daher sind die analysierten Daten in den unterschiedlichen Patientenkohorten und ihren jeweiligen Gegenüberstellungen größtenteils aus derselben Datenmenge. Das bedeutet, dass sowohl in den Kontrollkohorten **Q1**, **Q2** und **Q3** Rhinovirus-positive als auch in den Kontrollkohorten **Q6**, **Q7** und **Q8** SARS-CoV-2-positive Teilnehmer inkludiert wurden. Das Hauptaugenmerk dieser Vergleiche bezog sich allein auf die zu untersuchenden Viren und ihre jeweiligen, zugehörigen VOC-Profile.

4. Ergebnisse

4.1. RT-PCR-Screening

Auf Grund der besonderen Umstände, unter denen diese prospektive Studie durchgeführt wurde, weichen die Ergebnisse der Virusdetektion stark von den Ergebnissen vorheriger Jahre ab.

SARS-CoV-2 und Rhinoviren sind die einzig erfassten Virusarten. Andere, normalerweise häufig vorkommende Viren, wie Adenoviren, Coronaviren, RSV, Parainfluenzaviren und Influenzaviren (s. Abb. 6), wurden nicht beobachtet.

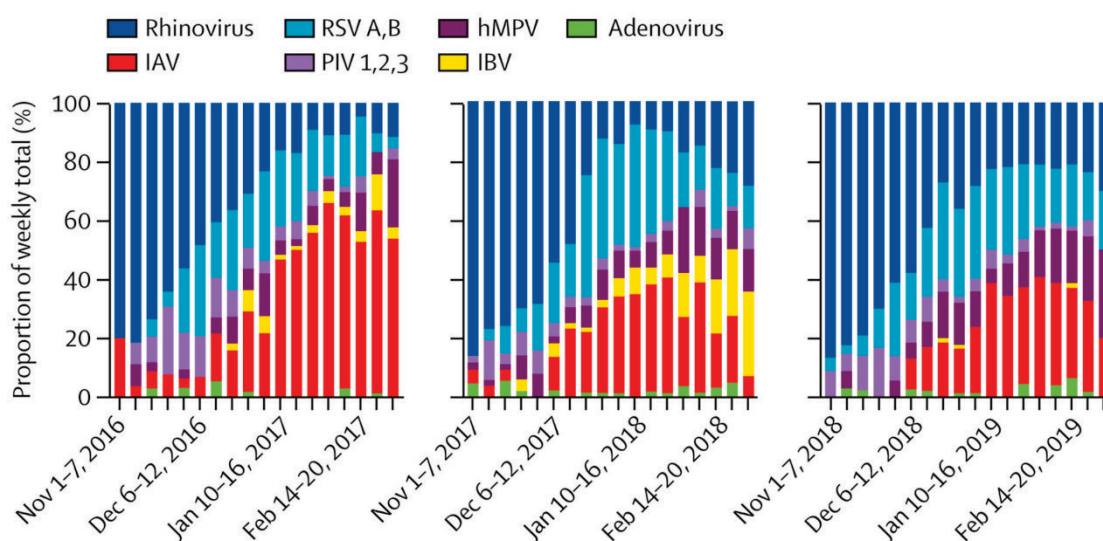


Abbildung 6: Virus Erfassung pro Woche, Juli 2016 bis Juni 2019 im Yale-New-Haven-Hospital (USA)

Relativer Beitrag von jedem Virus im Verhältnis zu allen Virus-positiven Tests pro Woche im Yale-New-Haven-Hospital. IAV=Influenza A Virus. RSV=Humanes. Respiratorisches Synzytial-Virus. IBV=Influenza B Virus. PIV=Parainfluenza Virus. hMPV=Humanes Metapneumovirus.

Copyright © 2020 Wu et al. Published by Elsevier Ltd.²¹

Dies deckt sich mit statistischen Erhebungen des RKI und den Ergebnissen anderer Studien (s. Abb. 7).⁷⁹ Die Infektionsschutzmaßnahmen der Bundesregierung, wie Maskenpflicht, Abstandseinhaltung und 3G-Regel scheinen hier ihre Wirkung gezeigt zu haben.

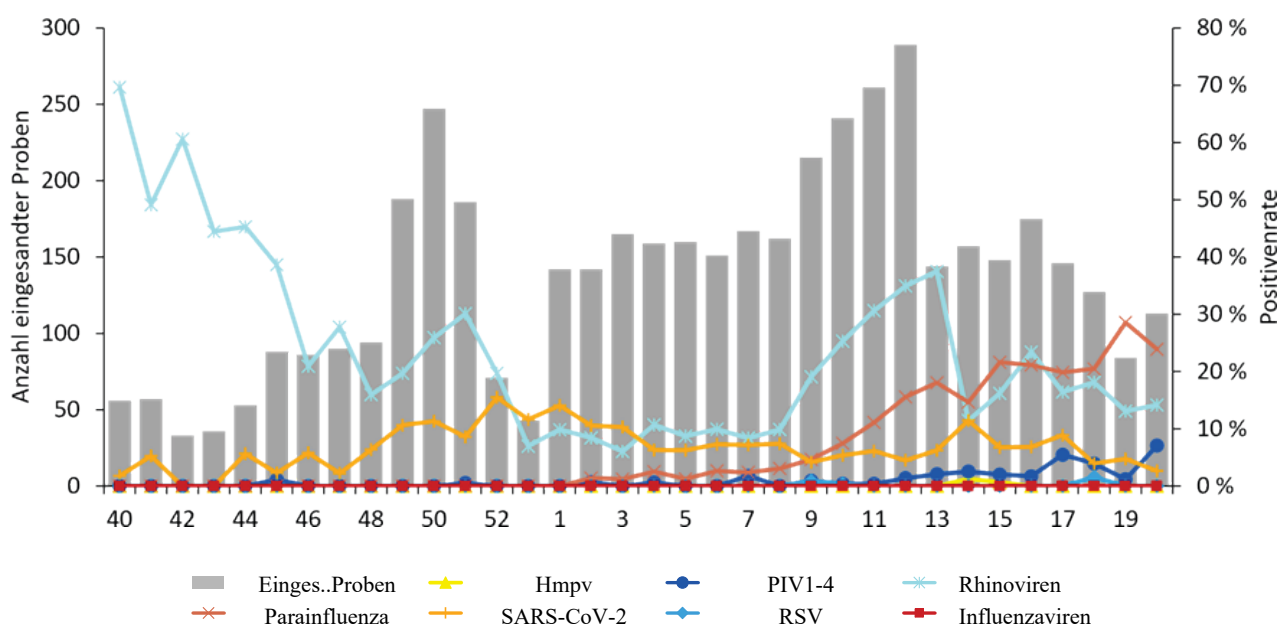


Abbildung 7: Anteil identifizierter Atemwegsviren an allen im Rahmen des Sentinels eingesandten Proben (Deutschlandweit) (Positivenrate, rechte y-Achse, Linien) sowie die Anzahl der an das NRZ für Influenzaviren eingesandten Sentinelproben (linke y-Achse, graue Balken) von der 40. KW 2020 bis zur 20. KW 2021.

Hmpv: Humanes Metapneumovirus. PIV1-4: Parainfluenzavirus 1-4. RSV: Respiratorische Synzytial-Virus. Saisonale Influenzaviren wurden in dieser Saison bisher nicht nachgewiesen, die Positivenrate liegt dort bei 0%.

Quelle: RKI, 2021, Buda et al.⁷⁹

4.2. SARS-CoV-2

Im ersten Teil dieser Studie wurden die Atemgase aller 708 Probanden analysiert. 36 Personen wiesen eine SARS-CoV-2-Infektion auf. Die Positivenrate von 5,08% (36/708) ist übereinstimmend mit der von Oktober 2020 bis Februar 2021 in Mecklenburg-Vorpommern erfassten SARS-CoV-2 Detektionsrate.⁸⁰

Um die komplexe Datenlage der VOC-Analyse der SARS-CoV-2-positiven Kohorte wiederzugeben, sind die Ergebnisse in Tabelle 3 übersichtlich dargestellt. Die o.g. Kohorten (**Q1-Q5**)

und ihre Vergleichs- bzw. Kontrollkohorten sind hier mit den zugehörigen statistischen Resultaten zu sehen.

Tabelle 3: Ergebnisübersicht der unterschiedlichen statistischen Auswertungsabfragen (Q1 bis Q5). Hierbei wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test für unabhängige Proben zwischen den definierten Kohorten angewandt. Statistisch signifikante Unterschiede in Substanzkonzentrationen (p Werte ≤ 0.05) sind **hervorgehoben** markiert.

Mann-Whitney-Rank-Sum-Test (p Wert ≤ 0.05)	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
	n=708	n=697	n=452	n=292	n=36
	36 vs. 672	25 vs. 672	36 vs. 416	36 vs. 256	25 vs. 11
Ausgeatmete VOCs	p Werte				
Formaldehyd	0,281	0,648	0,859	0,017	0,440
Methanol	0,018	0,003	0,011	0,052	0,250
Dihydrogensulfid	0,012	0,000	0,003	0,116	0,010
Aceton	0,383	0,298	0,779	0,009	0,770
Essigsäure	0,043	0,018	0,007	0,385	0,264
Isopropanol	0,442	0,458	0,925	0,043	0,744
Crotonaldehyd	0,035	0,041	0,017	0,122	0,744
Buttersäure	0,000	0,003	0,000	0,002	0,548
Butanthiol	0,082	0,061	0,049	0,204	0,481

Abfrage Q1:

Q1 ergab statistisch signifikante Unterschiede in den VOC-Konzentrationen von fünf exhalier-ten Substanzen. Dihydrogensulfid, Methanol, Essigsäure, Buttersäure und Crotonaldehyd sind hier zusammenfassend zu nennen. Alle fünf Substanzen wiesen niedrigere Konzentrationen in der SARS-CoV-2-positiven Kohorte auf. Abbildung 8 zeigt die statistisch signifikant unterschiedlichen Konzentrationen dieser fünf Substanzen in der Atemluft. Hierbei handelte es sich um den Vergleich zwischen der SARS-CoV-2-positiven und der SARS-CoV-2-negativen Kohorte.

Abfrage Q2:

Für **Q2** ergab die statistische Auswertung signifikante Konzentrations-Unterschiede bei fünf exhalier-ten Substanzen. Wieder sind Dihydrogensulfid, Methanol, Essigsäure, Buttersäure und Crotonaldehyd zu nennen. Der Charakter der Ergebnisse gleicht hier den Ergebnissen von **Q1**. Alle fünf Substanzen weisen erneut niedrigere Substanzkonzentrationen in der SARS-CoV-2-positiven Kohorte auf. Die Boxplots dieser fünf alveolären VOC-Konzentrationen der symptomatischen Corona-Probanden und aller negativen SARS-CoV-2-Individuen sind in Abbildung 9 dargestellt.

Abfrage Q3:

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse von **Q3**. Die VOC-Konzentrationen der SARS-CoV-2-positiven Kohorte wurden denen der Probanden mit anderen respiratorischen Pathogenen und/oder Symptomen gegenübergestellt. Sechs exhalierete Substanzen wiesen dabei signifikante Konzentrations-Unterschiede auf: Methanol, Crotonaldehyd, Essigsäure, Buttersäure und die schwefelhaltigen Substanzen Butanthiol und Dihydrogensulfid.

Abfrage Q4:

Q4 wird in Abbildung 11 dargestellt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in den exhalieren Substanzkonzentrationen von Buttersäure, Formaldehyd, Aceton und Isopropanol. SARS-CoV-2-positive Patienten wurden dabei mit einer Kohorte verglichen, die keinen SARS-CoV-2-positiven Befund aufwies, einen negativen Test für andere respiratorische Pathogene aufzeigte und symptomfrei war. Diese Kohorte wurde wie erwähnt als „gesund“ bezeichnet. Formaldehyd, Aceton und Isopropanol zeigten höhere Konzentrationen bei den infizierten Individuen, während die Konzentrationen der Buttersäure niedrigere Werte aufwiesen.

Abfrage Q5:

Die Ergebnisse von **Q5** sind in Abbildung 12 zu sehen. Einzig die exhalieren Dihydrogensulfid-Konzentrationen zeigten signifikante Unterschiede in dieser spezifischen Abfrage, welche symptomatische Corona-Infizierte mit asymptomatischen Corona-Infizierten verglich.

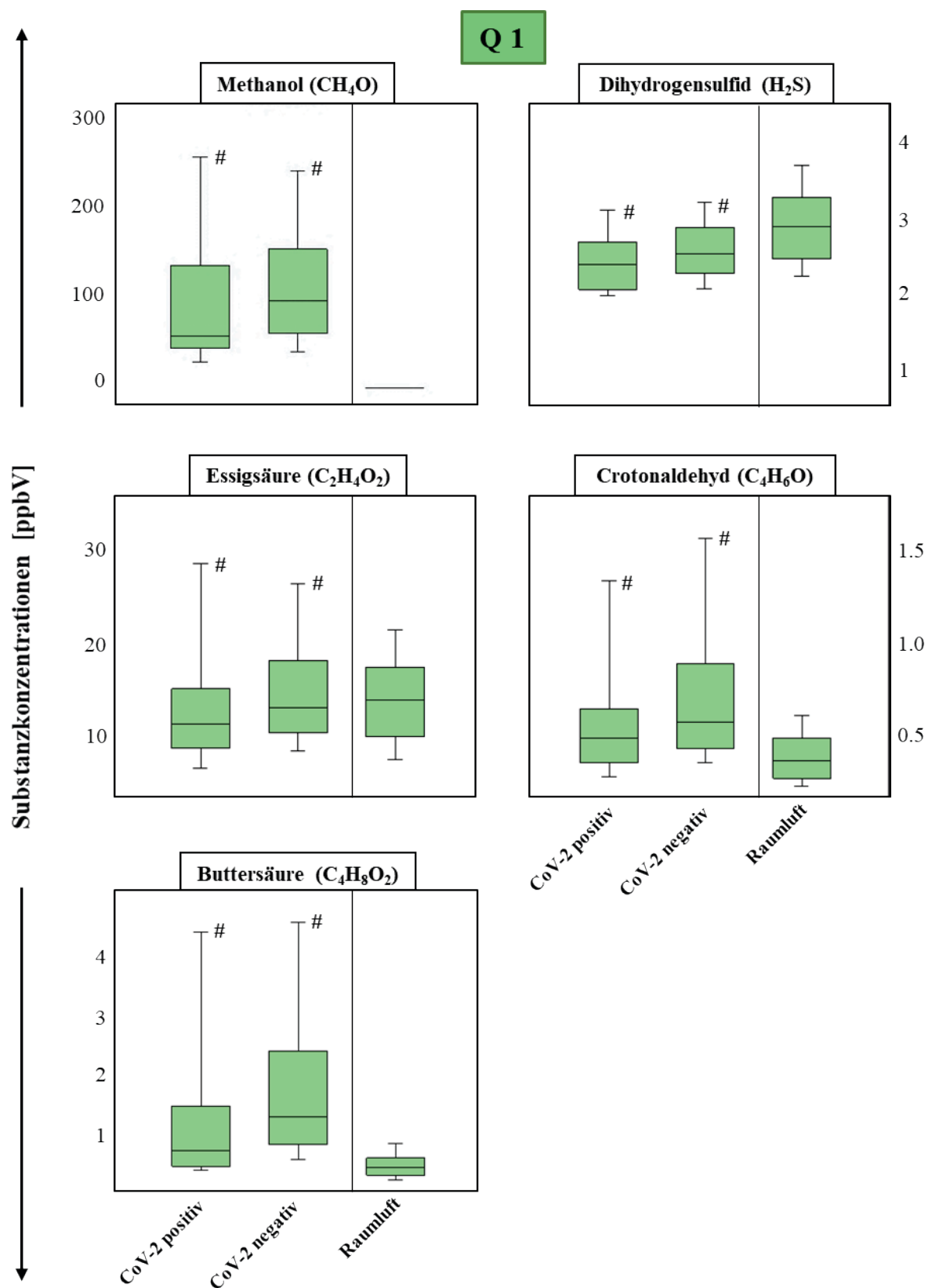


Abbildung 8: Darstellung der Ergebnisse Q1. Die Y-Achse zeigt die Substanzkonzentrationen in ppbV. Die X-Achse zeigt die unterschiedlich charakterisierten Kohorten. Hier der Vergleich zwischen der SARS-CoV-2-positiven und der SARS-CoV-2-negativen Kohorte. Statistische Signifikanzen in der Ausatemluft sind durch # angezeigt.

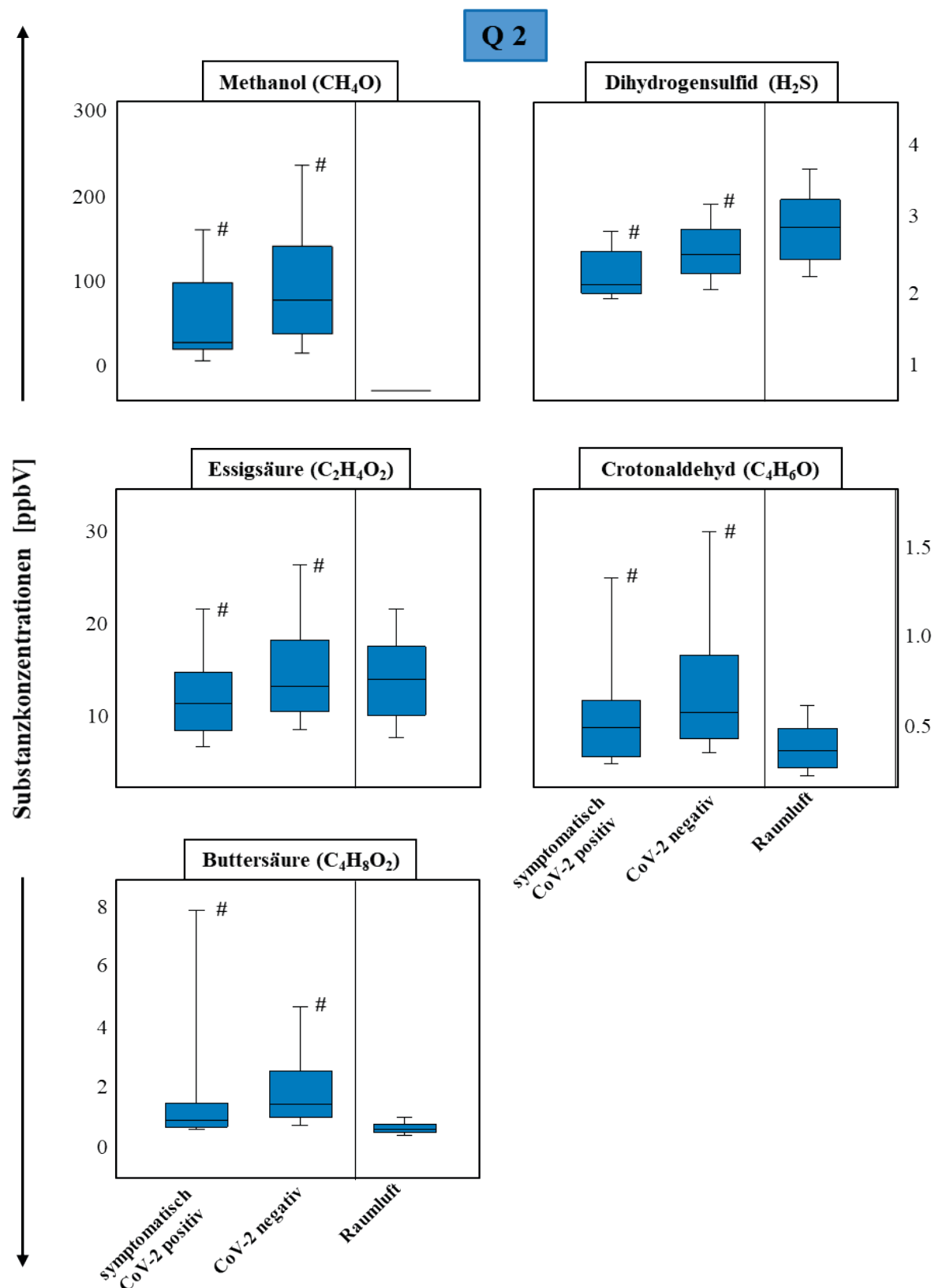


Abbildung 9: Darstellung der Ergebnisse Q2. Die Y-Achse zeigt die Substanzkonzentrationen in ppbV. Die X-Achse zeigt die unterschiedlich charakterisierten Kohorten. Hier der Vergleich zwischen der symptomatischen SARS-CoV-2-positiven und der SARS-CoV-2-negativen Kohorte. Statistische Signifikanzen in der Ausatemluft sind durch # angezeigt.

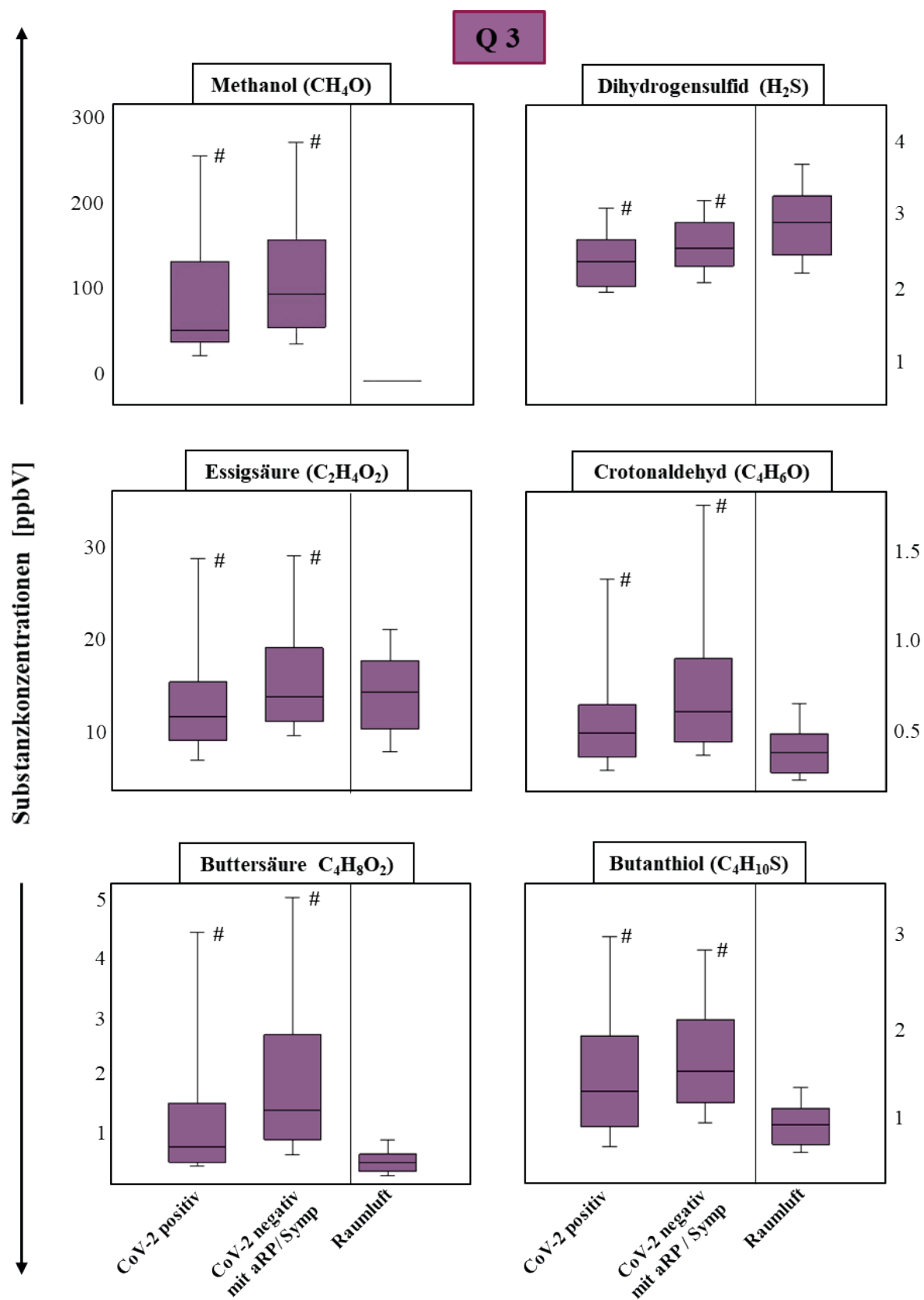


Abbildung 10: Darstellung der Ergebnisse Q3. Die Y-Achse zeigt die Substanzkonzentrationen in ppbV. Die X-Achse zeigt die unterschiedlich charakterisierten Kohorten. Hier der Vergleich zwischen der SARS-CoV-2-positiven und Probanden mit anderen respiratorischen Pathogenen und/ oder Symptomen. Statistische Signifikanzen in der Ausatemluft sind durch # angezeigt.

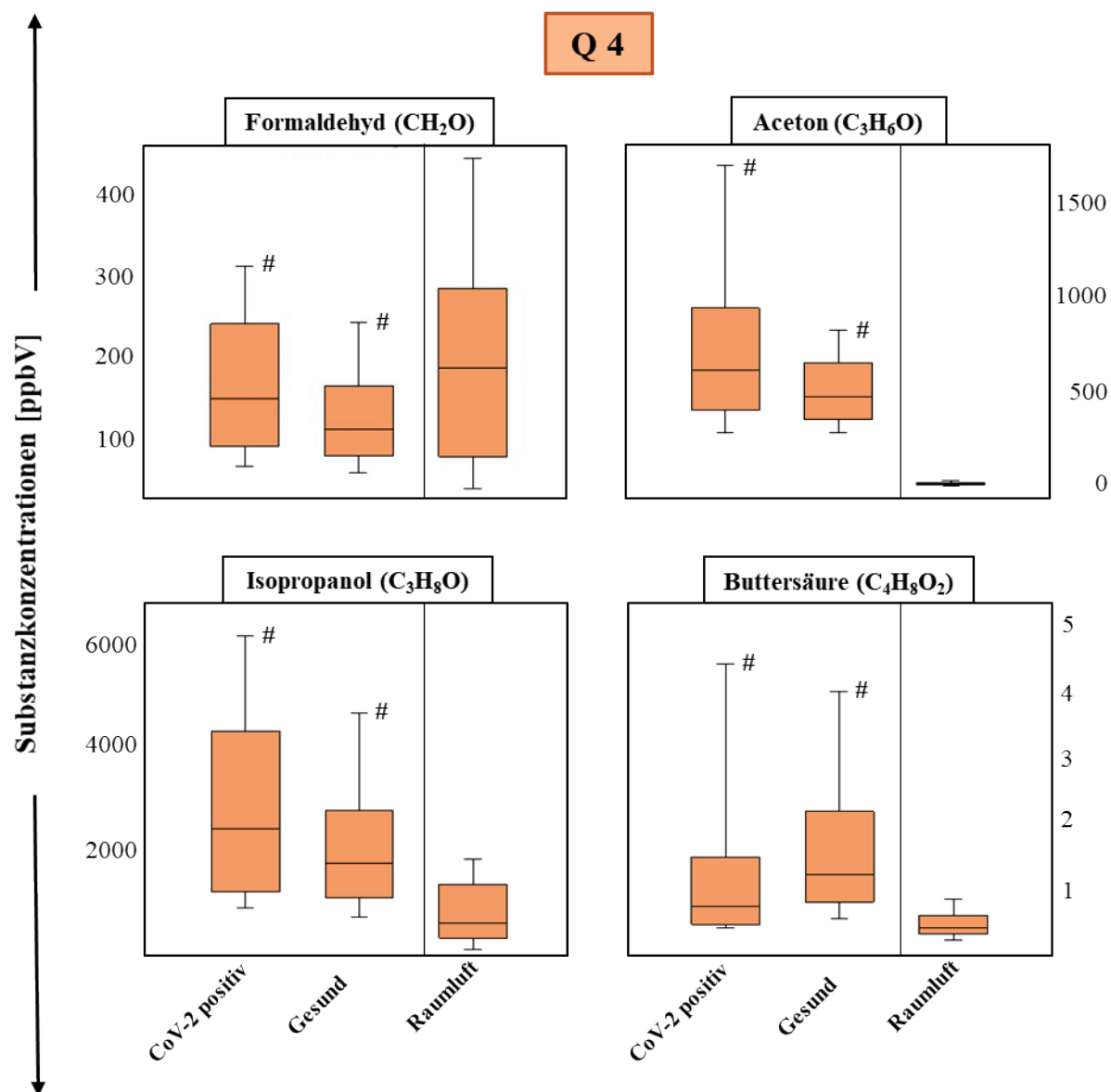


Abbildung 11: Darstellung der Ergebnisse Q4 Die Y-Achse zeigt die Substanzkonzentrationen in ppbV. Die X-Achse zeigt die unterschiedlich charakterisierten Kohorten. Hier der Vergleich zwischen der SARS-CoV-2-positiven und der „gesunden“ Kohorte. Statistische Signifikanzen in der Ausatemluft sind durch # angezeigt.

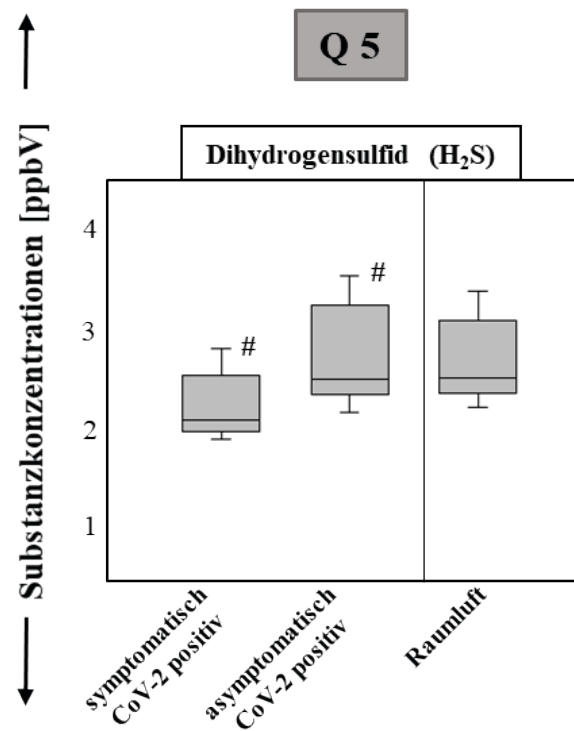


Abbildung 12: Darstellung der Ergebnisse Q5. Die Y-Achse zeigt die Substanzkonzentrationen in ppbV. Die X-Achse zeigt die unterschiedlich charakterisierten Kohorten. Hier der Vergleich zwischen der symptomatischen SARS-CoV-2-positiven und der asymptomatischen SARS-CoV-2-positiven Kohorte. Statistische Signifikanzen in der Ausatemluft sind durch # angezeigt.

4.3. Rhinovirus

Im zweiten Teil dieser Studie wurden 686 Probanden mit vorliegenden RT-PCR-Test für respiratorische Pathogene analysiert. Von diesen waren 9,77% (67/686) mit dem durch den Screening-PCR-Test für respiratorische Pathogene erfassten Rhinovirus infiziert.

Auch hier ist die Datenlage der VOC-Analyse der Rhinovirus-positiven Kohorte mit den zugehörigen Ergebnissen tabellarisch dargestellt (s. Tabelle 4). Es wurden die zuvor differenzierten Kohorten (**Q6-Q10**) und ihre jeweiligen Vergleichs- bzw. Kontrollkohorten mit den zugehörigen statistischen Resultaten erfasst.

Tabelle 4: Ergebnisübersicht der unterschiedlichen statistischen Auswertungsabfragen (Q6 bis Q10). Es wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test für unabhängige Proben zwischen den definierten Kohorten angewandt. Statistisch signifikante Unterschiede in Substanzkonzentrationen (p Werte ≤ 0.05) sind **hervorgehoben** markiert.

Mann-Whitney-Rank-Sum-Test (p Wert ≤ 0.05)	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10
	n=686	n=682	n=430	n=323	n=67
	67 vs. 619	63 vs. 619	67 vs. 363	67 vs. 256	63 vs. 4
Ausgeatmete VOCs	p Werte				
Dihydrogensulfid	0,048	0,047	0,125	0,007	0,672
Aceton	0,125	0,089	0,000	0,392	0,302
Essigsäure	0,386	0,385	0,960	0,047	0,874
Isopropanol	0,390	0,433	0,032	0,499	0,916
Cyclohexadien	0,190	0,168	0,541	0,031	0,672
Limonen	0,036	0,028	0,226	0,002	0,491

Abfrage Q6:

Der Vergleich zwischen der Rhinovirus-positiven und der Rhinovirus-negativen Kohorte ergab signifikante Konzentrations-Unterschiede in der Atemluft bei Dihydrogensulfid und einem Monoterpen. Beide Substanzen zeichnen sich durch höhere exhalierte Konzentrationen der infizierten Probanden aus. Die zugehörige visuelle Darstellung ist in Abbildung 13 zu finden.

Abfrage Q7:

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung von **Q7** ergaben signifikante Unterschiede von zwei Substanzen in der Atemluft. Hier gleichen die Resultate in Substanz (Dihydrogensulfid und einem Monoterpen) und Charakteristika (erhöhte exhalierete Konzentrationen der Rhinovirus-positiven Kohorte) dem Ausgang der Abfrage **Q6**. Die Boxplots der Rhinovirus-positiven symptomatischen Probanden versus allen Rhinovirus-negativen Probanden sind in Abbildung 14 dargestellt.

Abfrage Q8:

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Abfrage **Q8**. VOC-Konzentrationen von Aceton und Isopropanol weisen signifikante Konzentrations-Unterschiede in der Atemluft auf. Dabei sind die exhaliierten Konzentrationen der Rhinovirus-positiven Patienten jeweils niedriger als die der Kohorte mit anderen respiratorischen Pathogenen und/oder Symptomen.

Abfrage Q9:

Q9 wird in Abbildung 16 dargestellt. Es zeigen sich signifikante Unterschiede in den abgeatmeten Substanzkonzentrationen von Dihydrogensulfid, Essigsäure, Cyclohexadien und einem Monoterpen. Die Rhinovirus-positiven Probanden wurden hierbei mit der als „gesund“ charakterisierten Kohorte verglichen. Alle vier Substanzen weisen höhere Atemgas-Konzentration in der Rhinovirus-infizierten Kohorte auf.

Abfrage Q10:

Der Vergleich zwischen symptomatischen und asymptomatischen Rhinovirus-positiven Patienten ergab keine signifikanten Substanzunterschiede in der Atemluft.

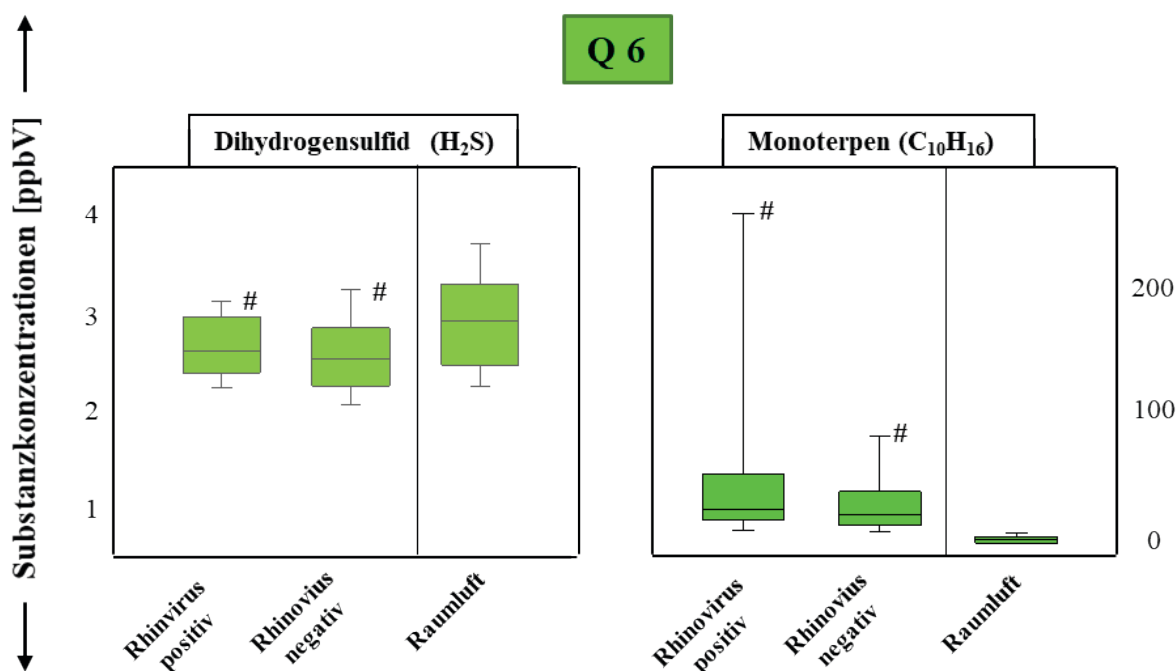


Abbildung 13: Darstellung der Ergebnisse Q6. Die Y-Achse zeigt die Substanzkonzentrationen in ppbV. Die X-Achse zeigt die unterschiedlich charakterisierten Kohorten. Hier der Vergleich zwischen der Rhinovirus-positiven und der Rhinovirus-negativen Kohorte. Statistische Signifikanzen in der Ausatemluft sind durch # angezeigt.

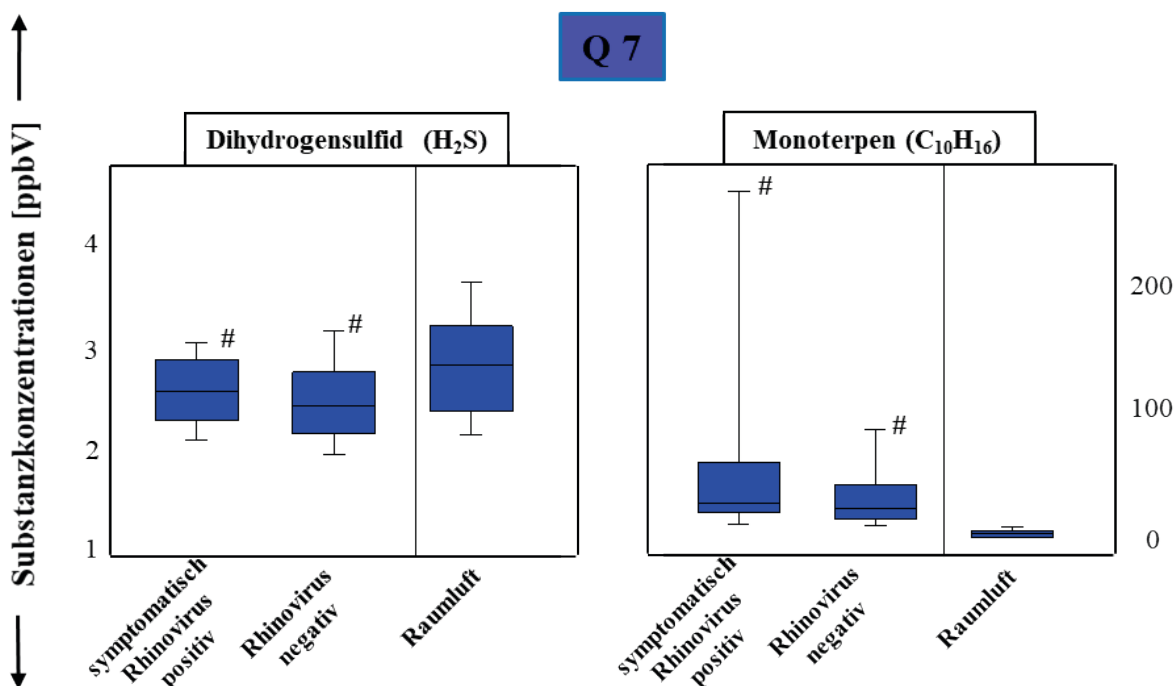


Abbildung 14: Darstellung der Ergebnisse Q7. Die Y-Achse zeigt die Substanzkonzentrationen in ppbV. Die X-Achse zeigt die unterschiedlich charakterisierten Kohorten. Hier der Vergleich zwischen der symptomatischen Rhinovirus-positiven und der Rhinovirus-negativen Kohorte. Statistische Signifikanzen in der Ausatemluft sind durch # angezeigt.

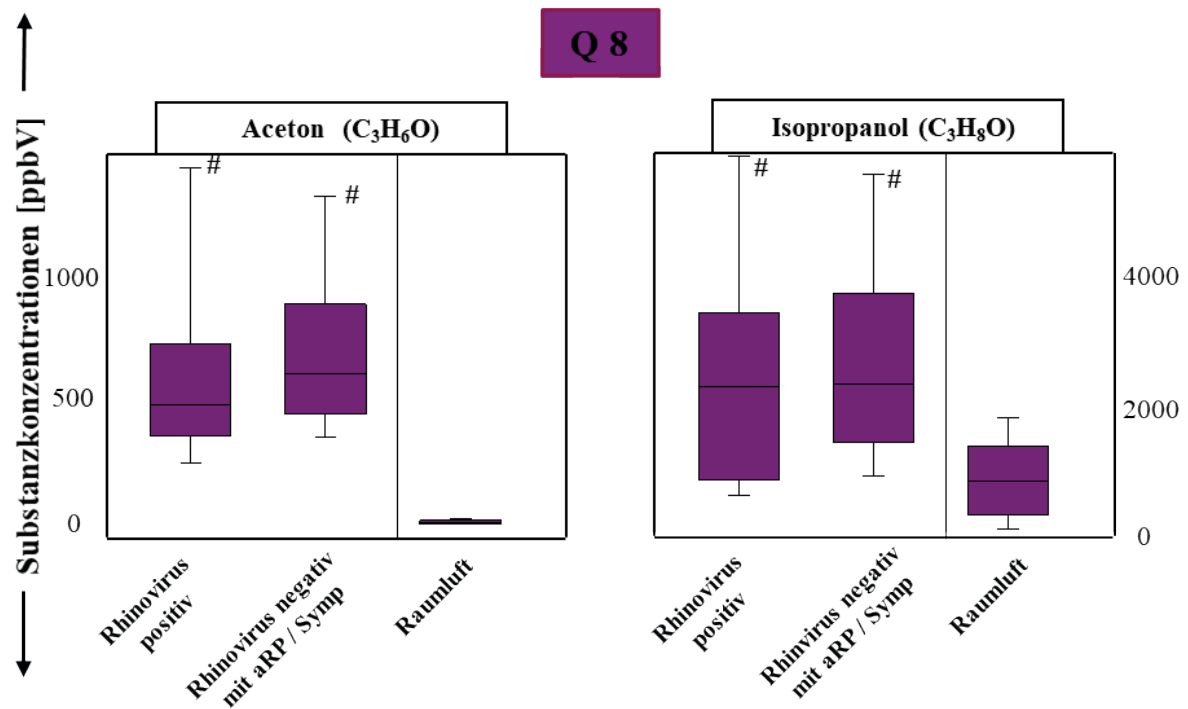


Abbildung 15: Darstellung der Ergebnisse Q8. Die Y-Achse zeigt die Substanzkonzentrationen in ppbV. Die X-Achse zeigt die unterschiedlich charakterisierten Kohorten. Hier der Vergleich zwischen den Rhinovirus-positiven und Probanden mit anderen respiratorischen Pathogen und/oder Symptomen. Statistische Signifikanzen in der Ausatemluft sind durch # angezeigt.

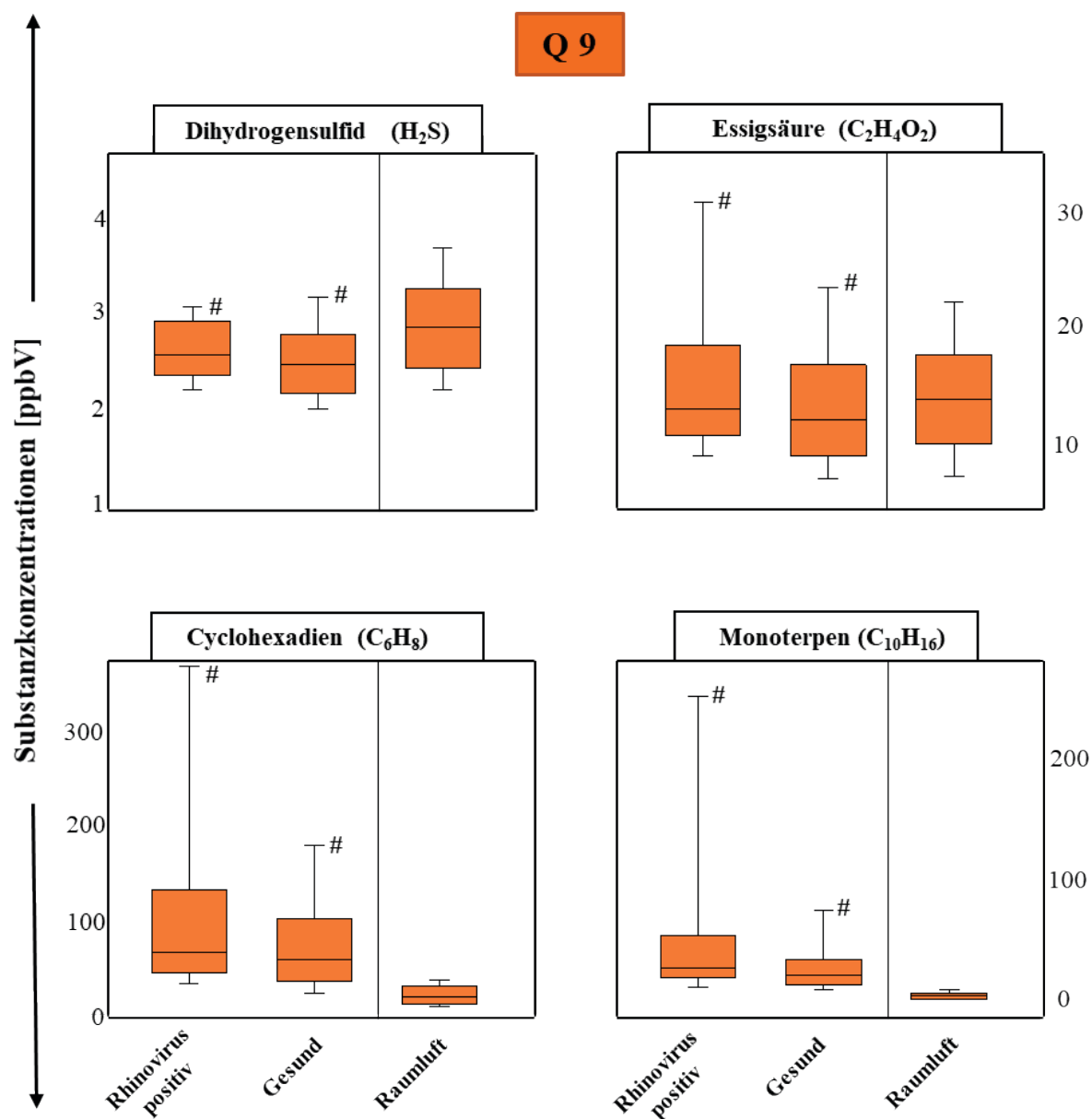


Abbildung 16: Darstellung der Ergebnisse Q9. Die Y-Achse zeigt die Substanzkonzentrationen in ppbV. Die X-Achse zeigt die unterschiedlich charakterisierten Kohorten. Hier der Vergleich zwischen der Rhinovirus-positiven und der „gesunden“ Kohorte. Statistische Signifikanzen in der Ausatemluft sind durch # angezeigt.

4.4. Ct-Wert

Die Ct-Werte für die SARS-CoV-2-positiven Probanden wurden durch das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Rostock bereitgestellt. Die erfassten Ct-Werte wurden in drei Kohorten eingeteilt: ≤ 24 (Low), 25-30 (Mid) und 31-39 (High). Im Folgenden wurden alle Substanzen, basierend auf den Ct-Werten, auf signifikante Unterschiede untersucht. Einzig Dimethylsulfid wies dabei signifikante Konzentrations-Unterschiede auf. Dies wird in Abbildung 17 dargestellt.

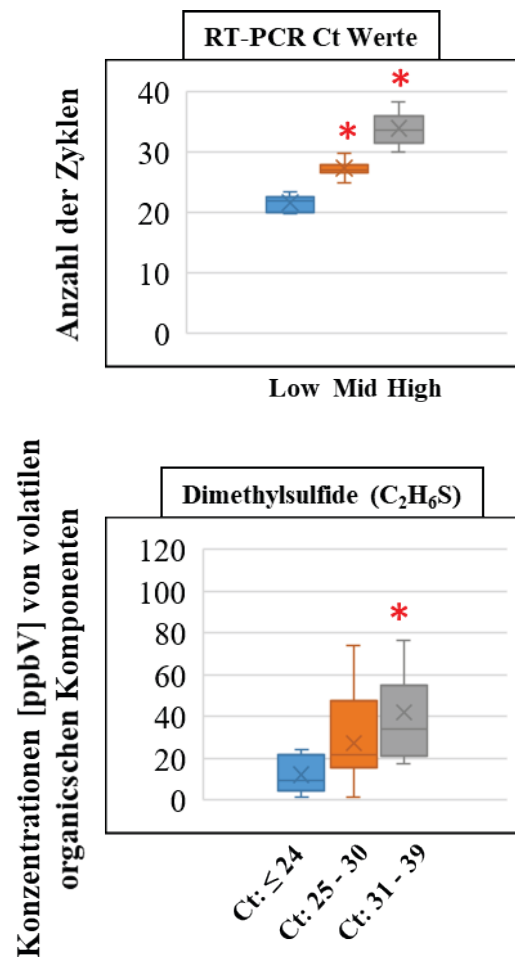


Abbildung 17 A+B: RT-PCR-Zyklus-Werte (Ct) und Darstellung des signifikant unterschiedlichen Dimethylsulfids basierend auf den Ct-Werten. Die Y-Achse zeigt hierbei (A) die Anzahl der PCR-Zyklen und (B) die Konzentration der volatilen organischen Komponenten in ppbV. Die X-Achse präsentiert jeweils die SARS-CoV-2-infizierte Kohorte mit niedrigen (Low ≤ 24), mittleren (Mid 25 – 30) und hohen (high 31 – 39) Ct-Werten. Statistische Signifikanzen wurden durch One-way ANOVA (Dunn's post-hoc method, p value ≤ 0.05) getestet und sind durch das rote * markiert.

5. Diskussion

5.1. VOC-Profil-Erfassung im Screening-Setting

Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit zwei unterschiedlichen Virus-Infektionen. Im Fokus stand die pandemische SARS-CoV-2 Infektion, zum anderen wurde die detektierte Rhinovirus-Infektion betrachtet. Im Kontrast zu ähnlichen Studien fand diese Studie prospektiv und unter realistischen Screening-Konditionen statt. So untersuchten Grassin-Deyle *et al.* Atemgase von 40 Probanden mit akutem-respiratorischen-Distress-Syndrom (ARDS). 28 dieser 40 Probanden wiesen eine SARS-CoV-2 Infektion auf. Alle Untersuchten lagen zur Zeit der Probenentnahme auf der Intensivstation und waren an eine invasive mechanische Beatmung angeschlossen. Die Analyse wies vier Substanzen (Methylpent-2-enal, 2,4-Octadiene, 1-Chloroheptane, und Nonanal) als mögliche Diskriminatoren zwischen den SARS-CoV-2 positiven und SARS-CoV-2 negativen Probanden auf.⁴⁸

Liangou *et al.* griffen bei der Auswertung ihrer Studie auf Algorithmen zurück. Zwei verschiedene Modelle wurden erstellt, um eine SARS-CoV-2-Infektion diagnostizieren zu können. Das erste Model erreichte hierbei eine Spezifität von 81,2% und eine Sensitivität von 81,1%. Das zweite Model, welches nur Teilnehmer über 55 Jahre inkludierte, wies eine Spezifität von 97.1% und eine Sensitivität von 97.7% auf. Insgesamt wurden 1137 Probanden untersucht. 70% dieser Daten wurde für ein Pre-Model Training der artifiziellen Intelligenz benutzt. 30% wurden für die Diagnostik der Virusinfektion verwendet.⁴⁹ Diese und weitere Atemgas-Studien weisen abweichende Resultate und unterschiedliche Marker-Substanzen auf.^{81,82} Zudem ist der Aufbau dieser Pilotstudien nicht mit einem realistischen Screening-Szenario zu vergleichen.⁸³ Die beschriebenen Studien analysierten die alveoläre Ausatemluft mittels Echtzeit-Massenspektrometrie vor Ort.

Bei der hier vorliegenden Studie wurde initial ein standardisiertes Verfahren zur Probenentnahme erarbeitet und angewendet. Frühere Studien haben gezeigt, dass Lagerungswechsel eine Veränderung der VOC-Profile hervorrufen können. Grund für diese Veränderungen sind vor allem hämodynamische Einflussfaktoren.⁷³ Der Studiendurchführung ist zu entnehmen, dass ein Zeitintervall von vier Minuten zwischen Lagerungswechsel, hier stehend zu sitzend, und

analysierter Ausatemluft gewählt wurde. So wurden einerseits die hämodynamischen Veränderungen und ihr möglicher Einfluss auf die Ergebnisse verhindert und andererseits, durch die geringe Zeitananspruchnahme, der Arbeitsablauf des Testzentrums nicht behindert.

Trotz der besonderen Umstände und dem damit verbundenen Aufwand zum Infektionsschutz, gelang eine zuverlässige und reibungslose Durchführung der Messungen. Es wurden keine negativen Auswirkungen durch die Studie auf die Probanden oder das medizinische Personal beobachtet. Auch die z.T. hektische und, für viele Teilnehmende, neue Umgebung hatte keine nachgewiesene Wirkung auf die Probanden und den Ablauf der Studiendurchführung.

Diese Studie beweist damit, dass eine aufeinanderfolgende, rasche und standardisierte Echtzeitmessung der Ausatemluft in einem Screening-Szenario möglich ist. Basierend auf PCR bestätigtem SARS-CoV-2- oder Rhinovirus-Infektionsstadium, detektierten respiratorischen Pathogenen und der Präsenz/Absenz von Erkältungssymptomen, wurden die rekrutierten Personen definierten Probanden-Unterkohorten zugewiesen. Ausschlusskriterien wie Raucher- und Ernährungsstatus, mögliche Diäten, eventuell vorhandene chronische Erkrankungen, Medikamenteneinnahmen etc. wurden explizit nicht angewandt, um eine Präselektion und damit verbundene Voreingenommenheit zu verhindern.

5.2. SARS-CoV-2

Verglichen mit anderen aktuellen *in vivo*- sowie *in vitro*-Studien konnten wir keine positiv exprimierten Marker für eine SARS-CoV-2-Infektion im Atemgas identifizieren.^{49,84,85} Doch unterschieden sich die VOC-Profile der SARS-CoV-2-Infizierten von den VOC-Profilen SARS-CoV-2-negativer Personen. Die beobachteten exhalierten Substanzkonzentrationen wiesen dabei eine niedrigere Konzentration auf (s. **Q1**). Diese Substanzen, die signifikant unterschiedliche Konzentrationen in der Ausatemluft aufzeigten, können mit einer Reaktion des Wirtsmikrobioms und der Immunantwort auf die Infektion in Verbindung gebracht werden. Dabei sprechen die niedrigeren Konzentrationen in der SARS-CoV-2 Kohorte für eine Unterdrückung dieser Substanzen und Suppression ihrer zugehörigen Stoffwechselwege durch das Virus. Ähnliche Resultate finden sich auch in neuesten metagenomischen und biochemischen Studien zum Wirtsmetabolismus, und/oder mikrobiellen Veränderungen während einer SARS-CoV-2 Infektion.^{86–88}

Um den Einfluss anderer Pathogene auf die Ergebnisse zu bewerten, wurden Probanden mit nachgewiesenen oder möglichen Krankheitserregern aus der Kontrollkohorte ausgeschlossen. So hatten dieser Kohorte zugeordnete Probanden einen negativen PCR-Test für die SARS-CoV-2-Infektion sowie für andere respiratorische Pathogene und waren symptomfrei. Im Vergleich mit dieser, als „gesund“ titulierten Kohorte, atmeten die SARS-CoV-2-infizierten Individuen erhöhte Konzentrationen von Formaldehyd, Aceton und Isopropanol und eine erniedrigte Konzentration von Buttersäure aus (s. **Q4**). Diese Ergebnisse unterschieden sich von den vorherigen Vergleichen (s. **Q1-Q3**) und deuten darauf hin, dass die verminderte Buttersäurekonzentration im Atemgas charakteristisch für eine SARS-CoV-2 Infektion sein könnte.

Buttersäure wies als einzige Substanz unveränderte, signifikante und verminderte Atemgaskonzentrationen in den unterschiedlichen Vergleichen auf. Während Differenzen der Methanol-, Hydrogensulfid-, Essigsäure-, Crotonaldehyd- und Butanthiol-Konzentrationen unbeständig waren und im Vergleich zwischen der SARS-CoV-2-Kohorte mit den „gesunden“ Probanden verschwanden.

Für einen beträchtlichen Anteil der ausgeatmeten volatilen Metabolite ist die große Vielfalt der Mikrobiotia, die unseren respiratorischen Trakt und den Verdauungstrakt besiedeln, verantwortlich. Schwefelhaltige Substanzen sowie aliphatische Alkohole, Thiole und kurzkettige Fettsäuren (SCFAs) werden kontinuierlich durch den Metabolismus des humanen Mikrobioms produziert. So erzeugen Bakterien der Mundflora Dihydrogensulfid.^{70,89} Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, kann eine hohe Raumlufkonzentration von Dihydrogensulfid beobachtet werden, welche auf einen gemischten endogenen und exogenen Ursprung im Atem des Probanden schließen lässt. Aktuelle Studienergebnisse deuten auf eine Veränderung und Dysbiose des oralen Mikrobioms als Immun- und/oder Infektionsreaktion auf eine SARS-CoV-2-Erkrankung hin. Die signifikant niedrigere Dihydrogensulfid-Atemgaskonzentration der SARS-CoV-2 infizierten Kohorte gegenüber allen Nicht-Infizierten (s. **Q1-Q3**), trotz des stetigen Zuflusses aus der Umgebungsluft, unterstützen diese Beobachtungen.

Methanol kann, neben einem diätetischen Ursprung, *in vivo* durch Fermentation der im Magen-Darm-Trakt residierenden Bakterien aus Pektinen und im S-Adenosylmethionin-Stoffwechselweg produziert werden.^{90,91} Hier weisen verringerte Substanzkonzentrationen der Ausatemluft der SARS-CoV-2-Kohorte im Vergleich mit allen SARS-CoV-2-negativen Probanden (s. **Q1-Q3**) auf eine Reduzierung dieser metabolischen Prozesse hin. Das unterstützt jüngste Berichte,

die über Veränderungen und Dysbiosen des Darmmikrobioms in SARS-CoV-2-positiven Patienten, sowie eine stärkere Assoziation und allosterische Aktivierung des Plasma-S-Adenosylmethionin mit IL-6 und Glutathion als Wirtsreaktion auf das Coronavirus berichten.^{86,92–94}

Kurzkettige Fettsäuren (SCFAs) wie Essig- und Buttersäure werden potentiell durch den bakteriellen Abbau von Ballaststoffen und/ oder Stärke im distalen Dünndarm produziert.^{61,95} Auch hier weisen erniedrigte Konzentrationen der SCFAs in der SARS-CoV-2-betroffenen Kohorte auf einen Einfluss des Virus auf den Metabolismus dieser Bakterien hin (s. **Q1-3**).

Aldehyde in der Atemluft können sowohl exogenen als auch endogenen Quellen entstammen. Formaldehyd ist eine im klinischen Alltag ubiquitär vorkommende Substanz und Grundlage vieler Desinfektionsmittel.⁹⁶ Die beobachteten Atemgasprofile mit hohen inspiratorischen Formaldehyd-Konzentrationen weisen auf diesen möglichen exogenen Ursprung hin (s. **Q4**). Andere Studien beschreiben erhöhte Konzentrationen von potentiell endogenen Aldehyden in SARS-CoV-2-positiven Patienten. Diese erhöhten Konzentrationen wurden dem erhöhten oxidativen Stress von Endothelzellen zugeschrieben.^{48,84} In unserer Studie wies endogen entstehendes Crotonaldehyd jedoch signifikant geringere Konzentrationen in der SARS-CoV-2-Kohorte auf (s. **Q1-3**). Diese niedrigere Expression kann auf eine komplexe Vernetzung zwischen dem intestinalen Ethanol-produzierenden Mikrobiom, der Darmpermeabilität, der intestinalen Glucose-Aufnahme und der hepatischen Glykolyse zurückzuführen sein.^{72,97} Crotonaldehyd entsteht durch die Kondensation von Acetaldehyd-Molekülen. Diese werden in der Leber als Neben- und Zwischenprodukt des Ethanol-Metabolismus produziert.⁹⁸ Die endogene Ethanol-Flussrate wird besonders durch den mikrobiellen Metabolismus der Kohlenhydrate im Dünndarm reguliert, um eine gesunde Darmpermeabilität und optimierte Glucose Aufnahme zu gewährleisten.^{99,100} Da eine SARS-CoV-2-Infektion eine Dysbiose der intestinalen Flora verursacht, wird die Darmbarriere gestört. Diese Störung hat vielfältige Folgen. Exemplarisch etwa eine erhöhte Aufnahme von Glucose, ein gestörter Ethanol-Metabolismus, geringere Acetaldehyd-Konzentrationen und eine damit zusammenhängende reduzierte Crotonaldehyd-Konzentration in der Ausatemluft der SARS-CoV-2-positiven Probanden.^{88,101}

Des Weiteren ist es denkbar, dass durch die erhöhte Glucose-Aufnahme die Konzentrationen von Nebenprodukten der hepatischen und zellulären Glykolyse, so zum Beispiel Aceton, ansteigen (s. **Q4**).¹⁰² Die Beobachtung einer erhöhten Aceton-Konzentration in der Ausatemluft SARS-CoV-2 infizierter deckt sich mit den Ergebnissen der veröffentlichten Atemgas-Studie von Ruszkiewicz *et al.*⁸²

Isopropanol wird sowohl endogen als auch exogen produziert. Endogen entstehendes Isopropanol kann mit einer hyperglykämischen Aktivierung bestimmter Stoffwechselwege zusammenhängen.^{56,103} Erhöhte Isopropanol-Konzentrationen in der Expirationsphase der SARS-CoV-2-infizierten Kohorte im Vergleich zu „gesunden“ Probanden weisen auf diese Kausalität hin. Exogen produziertes Isopropanol ist, als sekundärer Alkohol, Grundlage vieler Desinfektionsmittel. Ähnlich dem besprochenen Formaldehyd, wies auch Isopropanol erhöhte inspiratorischen Konzentrationen auf (s. **Q4**).

Schwefel-reduzierende Bakterien des Darmtraktes produzieren freie und aktive Thiole (-SH) als Gastransmitter aus anaerober Methylierung.^{89,104} Diese helfen das anaerobe Milieu des Darmes zu erhalten, regulieren die Nährstoffaufnahme, Membranpermeabilität und Immunantwort¹⁰⁵. Reduzierte Butanthiol-Konzentrationen in der Ausatemluft der SARS-CoV-2-positiven Probanden fanden sich einzig im Vergleich zu Probanden mit nachgewiesenen respiratorischen Pathogenen und/oder Symptomen (s. **Q3**). Des Weiteren verschwanden die signifikanten Unterschiede der besprochenen Substanzen Methanol, Dihydrogensulfid, Essigsäure und Crotonaldehyd, wenn die Probandenkohorte mit anderen respiratorischen Pathogen aus dem Vergleich exkludiert wurden (s. **Q4**). Augenscheinlich hatten diese anderen detektierten respiratorischen Pathogene einen Einfluss auf das humane Mikrobiom und somit auf die Ergebnisse. Die beobachtete Wirkung unterschied sich ganz offensichtlich von dem Effekt des Corona-Virus auf das humane Mikrobiom.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen den erfassten Symptomen und den Ergebnissen hergestellt werden. Der Vergleich innerhalb der SARS-CoV-2-infizierten Kohorte, zwischen symptomatischen und asymptomatischen Probanden, ergab keine neuen Ergebnisse (s. **Q2**).

5.3. Rhinovirus

Frühere *in vitro*-Studien beschrieben eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen als potentielle „Biomarker“ bei Rhinovirus-infizierten Zellreihen.^{27,106,107} Bei dieser Studie zeigte keine dieser Substanzen signifikante Konzentrations-Unterschiede. Doch unterschieden sich die VOC-Profile der Rhinovirus-Infizierten von den VOC-Profilen Rhinovirus-negativer Personen. Die signifikant unterschiedlichen Substanzen wiesen hierbei höhere Konzentrationen in der infizierten Kohorte auf (s. **Q6**). Die ausgeatmeten Substanzkonzentrationen von Dihydrogensulfid und einem Monoterpen können mit einer Reaktion des humanen Mikrobioms und exogenen Einflussfaktoren in Verbindung gebracht werden.

Auch hier wurde der Einfluss anderer Pathogene auf die Ergebnisse näher betrachtet. Dazu wurden Rhinovirus-Infizierte mit der beschriebenen „gesunden“ Kontrollkohorte verglichen. Hierbei wiesen Dihydrogensulfid, Essigsäure, Cyclohexadien und Monoterpen erhöhte Konzentrationen in der Ausatemluft der Rhinovirus-Kohorte auf (s. **Q9**). Diese Beobachtungen unterschieden sich von den vorherigen Abfragen (s. **Q6-8**). Der Metabolismus von Essigsäure und Cyclohexadien schien sowohl durch die Anwesenheit des Rhinovirus als auch durch die der anderen Pathogene positiv induziert zu werden (s. **Q9**). Die erhöhten Aceton- und Isopropanol-Konzentrationen deuten dagegen auf einen alleinigen Einfluss der anderen respiratorischen Pathogene hin (s. **Q8**). Für die signifikanten Differenzen der Dihydrogensulfid- und Monoterpenkonzentrationen, die sowohl in **Q6**, **Q7** und **Q9** beobachtet wurden, schien einerseits ein isolierter Einfluss des Rhinovirus auf den Metabolismus des Dihydrogensulfids und andererseits externe Faktoren für die veränderten Monoterpenkonzentrationen vorzuliegen.

Wie bereits diskutiert sind Mikrobiome des Respirations- sowie Verdauungstraktes verantwortlich für eine große Vielfalt der volatilen organischen Substanzen. Sulfide (Mundflora) und kurzkettige Fettsäuren (distaler Darm) werden anhaltend durch den Metabolismus dieser Bakterien produziert. Das Rhinovirus schien hierbei für einen erhöhten Stoffwechsel dieser Substanzen, wie Dihydrogensulfid und Essigsäure, verantwortlich zu sein. Schivo *et al.* beobachteten in ihrer Studie mit Rhinovirus-infizierten Zellreihen ebenfalls erhöhte Essigsäure-Konzentrationen im Headspace ihres Versuchsaufbaus.¹⁰⁷ Es zeigten sich zudem veränderte Aceton- und Alkoholkonzentrationen bei dieser *in-vitro* durchgeführten Studie, diese jedoch in erhöhter Substanzintensität.

Cyclohexadien sowie das erfasste Monoterpen sind exogenen Ursprungs. Cyclohexadien ist vor allem präsent in den Monoterpenen Safranal und Citral-Dimeren.¹⁰⁸ Diese Substanzen sind vor allem bekannt für ihre antioxidative und antiinflammatorische Aktivität. Sie sind in Ingwer und Zitronen zu finden.¹⁰⁹

Das hier benannte Monoterpen ist bewusst als solches deklariert, da es mit einer molaren Masse von 136,24 g/mol sowohl für Limonen als auch für Alpha-Pinen stehen könnte. Eine Unterscheidung ist zum jetzigen Stand nicht möglich. Beide Substanzen sind Bestandteile zahlreicher Pflanzenarten wie Lorbeer, Edeltannen, Basilikum, verschiedenen Kieferarten und Fenchel.¹¹⁰ Beide Substanzen kommen in geringen Konzentrationen in Duft- und Geschmacksstoffen, in ätherischen Ölen und Teesorten, sowie als Nebenprodukt der Orangen- und Zitronensaftherstellung vor.¹¹¹ Vor allem Alpha-Pinen ist, wie auch das erwähnte Safranal und die Citral Dimere, bekannt für seine antibakterielle und entzündungshemmende Wirkung.^{112–114}

Die erhöhten Konzentrationen dieser exogenen Substanzen in der Ausatemluft der Rhinovirus-infizierten Kohorte könnte im Zusammenhang mit der hohen Symptombelastung der Kohorte und deren Konsequenzen in Zusammenhang stehen. 63 der 67 positiven Probanden (94.03%) wiesen Symptome auf, im Vergleich zu 221 der 619 Rhinovirus-negativen Studienteilnehmer (35,7%) und 0 der 256 „gesunden“ Probanden (0%). Es ist anzunehmen, dass Menschen die an Erkältungssymptomen leiden, vermehrt auf Haushaltsmittel zur Bekämpfung der Krankheitszeichen zurückgreifen. Lutschbonbons, Inhalationen sowie verschiedene Teesorten gehören zu den Standardmitteln, welche ubiquitär gegen Erkältungserkrankungen und den zugehörigen Symptomen eingesetzt werden. Dass hierbei Stoffe verwendet werden die Ingwer, Zitrone, Eukalyptus, Meerrettich oder Orange und somit die beschriebenen Terpene enthalten, ist naheliegend. Konsequenterweise verschwinden die signifikanten Unterschiede der angesprochenen Monoterpene im Vergleich zwischen Rhinovirus-Infizierten und Probanden mit anderen respiratorischen Pathogenen und/oder Symptomen. Diese Vergleichskohorte wies ebenfalls eine erhöhte Symptombelastung von 61,5% auf.

Bei der Auswertung der beiden unterschiedlichen Virenarten fällt auf, dass diese augenscheinlich einen Einfluss auf den Stoffwechsel des humanen Mikrobioms und den damit verbundenen Substanzkonzentrationen hatten. Da Viren keinen eigenen Metabolismus haben, sind sie auf die Ressourcen der Wirtszelle oder des Wirtsmikrobioms angewiesenen. In Anbetracht dessen ist es wenig überraschend, dass sowohl das Rhinovirus als auch das SARS-CoV-2-Virus eine Wirkung auf die volatilen Produkte der Bakterien, welche im Verdauungs-und/oder Respirations-trakt residieren, hatten. Auf Grund der endogenen Herkunft dieser Substanzen, werden diese

immer in der Ausatemluft vorhanden und detektierbar sein. Die Produktion der volatilen Produkte kann dabei erwartungsgemäß durch eine Virus-Zell oder Virus-Mikrobiom Interaktion supprimiert oder induziert werden. Die Resultate suggerieren, dass unabhängig von Infektionszeitpunkt und Infektionsschwere, eine Wirtsreaktion auf das Virus die VOC-Profile beeinflusst hat. Sie sind durch Konzentrations-Unterschiede von Metaboliten des Mikrobioms und/oder der Wirtszellen charakterisiert.

Dieser Aspekt stellt einmal mehr die unzähligen Einflussfaktoren auf die VOC-Profile und die damit zusammenhängende Variabilität der Ergebnisse in den Vordergrund. Nicht nur Lage-rungswechsel, Erkrankungen, Diäten, Medikamente, Alter, Geschlecht, körperlicher Habitus et cetera üben eine Wirkung auf die volatilen Substanzen und ihren Stoffwechsel aus, sondern auch die große Vielfalt des humanen Mikrobioms.

5.4. Ct-Wert/Viruslast

Frühere Veröffentlichungen haben ein dynamisches Verhalten der VOCs während einer SARS-CoV-2-Infektion beobachtet, aber keinen Zusammenhang zwischen VOC-Konzentrationen und Viruslast oder Infektionsstatus erbracht. Die Präsenz oder Absenz von Symptomen war dabei nicht direkt mit der viralen Last verbunden.^{36,115} Auch unsere Untersuchungen wiesen keinen Zusammenhang zwischen Erkältungssymptomen und Viruslast/ Ct-Wert auf. Der vorgenommene Vergleich ergab keine signifikanten Unterschiede. Bei näherer Betrachtung wies einzig Dimethylsulfid eine negative Korrelation auf. Die erniedrigte Sulfid-Konzentration ist ein weiteres Indiz für eine Suppression der systemischen mikrobiellen Aktivität durch das SARS-CoV-2-Virus.

5.5. Limitationen der Studie

Obwohl mehr als 700 Probanden rekrutiert wurden, präsentiert die Studie nur eine limitierte Anzahl an SARS-CoV-2 infizierten Probanden. Zudem können die Beobachtungen in unterschiedlichen Populationen/Ethnien mit unterschiedlichen Ansteckungsraten, Komorbiditäten und viralen Varianten variieren.

Um eine Präselektion im realistischen Setting des Screening Szenarios zu vermeiden, wurden keine externen Faktoren wie Lebensstil, Raucherstatus und Komorbiditäten berücksichtigt. Dies führte zu einer größeren Variation in den Ergebnissen im Vergleich zu besprochenen Studien mit präselektierten Kohorten.^{116–119}

Auch die Optimierungs- und Einstellungsprozesse unter den hohen Sicherheitsbedingungen könnten einen Einfluss auf die Interpretation der Daten gehabt haben. Während eine Vielzahl an unterschiedlichen klinischen Symptomen für eine COVID-19-/Rhinovirus-Infektion existieren, wurden für diese Studie nur Erkältungssymptome berücksichtigt.

Zudem müssen die besonderen Umstände berücksichtigt werden, unter denen diese Studie durchgeführt wurde. Zur Zeit der Probandenakquirierung bekamen nur ausgewählte Personengruppen, wie zum Beispiel Kontaktpersonen und/oder symptombelastete Personen, einen kostenfreien SARS-CoV-2 RT-PCR-Test. Da nur 25 Studienteilnehmer eine SARS-CoV-2-Infektion respektive 4 Studienteilnehmer eine Rhinovirus-Infektion und Symptome aufwiesen, reichte diese Anzahl nicht für weitere Kohorten-Bildungen in Bezug auf die unterschiedlichen Symptome und ihre eventuelle Korrelation mit Atemgasprofilen aus.

6. Zusammenfassung

Im Unterschied zu anderen Studien mit präselektierten Patientenkohorten führten wir eine prospektive Beobachtungsstudie durch. Die Studie belegt, dass eine Atemgas-Analyse in einem Screening-Szenario, unter hohen Infektionsschutz-Maßnahmen, möglich ist. Es wird explizit vermerkt, dass keine spezifischen „Biomarker“ beansprucht werden, da diese eine Validierung durch eine große, unabhängige Patientenkohorte benötigen.

Unsere prospektiv gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass VOC-Profile während einer SARS-CoV-2- respektive Rhinovirus-Infektion die Interaktionen zwischen Virus und Wirtsfaktoren bezüglich Zellmetabolismus und Mikrobiom sowohl des respiratorischen Traktes als auch des Darmtraktes widerspiegeln können. Diese Veränderungen endogener Substanz-Konzentrationen wurden auch in einer Vielzahl anderer veröffentlichter Studien beobachtet. Substanzen exogen Ursprung weisen auf den klinischen Hintergrund und individuelle Alltagshandlungen der Probanden hin.

Substanzen, die in unseren früheren *in vitro*- und *in vivo*-Studien von H1N1-Virus-infizierten Zellreihen oder Schweinen signifikante Konzentrations-Unterschiede aufwiesen, fanden sich in dieser Studie nicht wieder. Berücksichtigt man die Variabilität der menschlichen Atemluftzusammensetzung und die riesige Anzahl an volatilen organischen Substanzen in der Ausatemluft, wird immer die Möglichkeit bestehen, Unterschiede zwischen zwei definierten Probandenkohorten zu finden, wenn eine große Zahl an Parametern angewendet werden. Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen diese Variabilität und die unzähligen exogenen und endogenen Einflüsse unterschiedlichster Art auf die VOC-Profile. Sie verdeutlicht, dass ein Screening bestimmter Erreger und/oder Erkrankungen durch eine einmalige Echtzeit-Atemgasmessung schwer zu realisieren ist.

Die VOC-Profile konnten im Gegensatz zu den etablierten RT-PCR-oder Antigentests nicht mit vergleichbarer Sensitivität und Spezifität der SARS-CoV-2- oder der Rhinovirus-Infektion zugewiesen werden. Gleichzeitig stellt diese Studie das große Potential der Atemgasanalytik heraus. Es ist nicht nur möglich, Veränderungen im ppb-oder ppt-Konzentrationsbereich zu detektieren, diese Veränderungen können auch endogenen Stoffwechselveränderungen und individuellen Verhaltensweisen zugeordnet werden. Es wurden wertvolle Informationen zu mikrobiellen Wirt-Virus-Interaktionen und Stoffwechselprozessen gesammelt. In Zukunft könnten die so gewonnenen Informationen sowohl bei der Einschätzung des Krankheitsverlaufes, als auch bei der Therapiekontrolle eine große Unterstützung sein.

7. Thesen der Arbeit

- I. Eine Bestimmung von VOC-Profilen aus Atemgasproben und Raumluft unter pandemischen Screening-Bedingungen ist mittels PTR-ToF-MS möglich.
- II. Die Echtzeit-Massenspektrometrie erlaubt eine schnelle Messung der Atemluftprofile einer großen Anzahl von Probanden in kurzer Zeit.
- III. Die Probenentnahme beeinflusst weder den täglichen Ablauf einer Corona-Test-Station noch erhöht es die Infektionsgefahr für das medizinische Personal.
- IV. Im Atemgas SARS-CoV-2-infizierter Probanden fanden sich Veränderungen der VOC-Profile, die auf eine Host-Virus-Interaktion schließen lassen.
- V. Die in der Atemluft in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesenen Substanzen konnten sowohl endogenen als exogenen Quellen zugeordnet werden.
- VI. Die im Atemgas in unterschiedlichen Konzentrationen auftretenden Substanzen der SARS-CoV-2-Kohorte, wie z.B. geringere Buttersäure-Konzentrationen, weisen auf eine Suppression des humanen Mikrobioms und dessen Stoffwechsels hin.
- VII. Im Atemgas Rhinovirus-infizierter Probanden fanden sich Veränderungen der VOC-Profile, die sich aber von den Änderungen der SARS-CoV-2-Kohorte unterschieden.
- VIII. Einzigartige, spezifische „Biomarker“ einer bestimmten Virus Art wurden nicht gefunden.
- IX. Ein Potential der Atemgasanalytik als Werkzeug für das Monitoring viraler Infektionen zeichnet sich aus den Ergebnissen ab.

8. Literaturverzeichnis

1. Tisch *et al.* Erreger und Pathogenese von Atemwegsinfektionen - Akute Atemwegsinfekte: Therapieoptionen bei Erwachsenen und Kindern. <https://www.arztcm.de/elearning/akute-atemwegsinfekte-therapie-bei-erwachsenen-und-kindern/index.php#!page=lernmodul/klinik> (2022).
2. Fendrick, A., Monto, A., Nightengale, B. & Sarnes, M. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Arch. Intern. Med.* 163, (2003).
3. Moriyama, M., Hugentobler, W. J. & Iwasaki, A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-012420-022445> <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-virology-012420-022445> (2020) doi:10.1146/annurev-virology-012420-022445.
4. Steppuhn, H. *et al.* Zeitliche Trends in der Inzidenz und Sterblichkeit respiratorischer Krankheiten von hoher Public-Health-Relevanz in Deutschland. (2017) doi:10.17886/RKI-GBE-2017-049.
5. Lohkamp, C. Analysen zum Leistungsgeschehen der Krankenhäuser und zur Ausgleichspauschale in der Corona-Krise.
6. Radtke, R. Atemwegserkrankungen - Todesfälle aufgrund ausgewählter Diagnosen bis 2019. *Statista* <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1043878/umfrage/todesfaelle-aufgrund-ausgewaehlter-atemwegserkrankungen-in-deutschland/>.
7. Rohde, G., Schultze-Werninghaus, G. & Bauer, T. T. Therapie viraler Atemwegsinfekte: Wirkprinzipien, Strategien und Ausblicke. *Internist* 45, 468 (2004).
8. Denison, M. R., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Eckerle, L. D. & Baric, R. S. Coronavirus: An RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol.* 8, 270 (2011).

9. Ziebuhr, J. *et al.* Coronaviren. *Med. Mikrobiol. Infekt.* 479 (2016) doi:10.1007/978-3-662-48678-8_58.
10. Shengli Bi, *et al.* Complete Genome Sequences of the SARS-CoV: the BJ Group (Isolates BJ01-BJ04). *Genomics Proteomics Bioinformatics* 1, 180–192 (2003).
11. WHO. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003> (2015).
12. WHO. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers> (2019).
13. Li, W. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450 (2003).
14. Yan, R. *et al.* Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 367, 1444 (2020).
15. Raj, V. S. *et al.* Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495, 251 (2013).
16. Memish, Z. A. *et al.* Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bats, Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1819 (2013).
17. Li, W. *et al.* Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science* (2005) doi:10.1126/science.1118391.
18. Wacharapluesadee, S. *et al.* Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. *Nat. Commun.* 12, 1–9 (2021).
19. Radtke, R. Coronavirus - Todesfälle weltweit in 2022. *Statista* <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1103240/umfrage/entwicklung-der-weltweiten-todesfaelle-aufgrund-des-coronavirus/> (2022).

20. Greve, J. M. *et al.* The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 56, 839–847 (1989).
21. Wu, A., Mihaylova, V., Landry, M. & Foxman, E. Interference between rhinovirus and influenza A virus: a clinical data analysis and experimental infection study. *Lancet Microbe* 1, (2020).
22. Dee, K. *et al.* Human Rhinovirus Infection Blocks Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication Within the Respiratory Epithelium: Implications for COVID-19 Epidemiology. *J. Infect. Dis.* 224, 31 (2021).
23. Karim, Y., Ijaz, M., Sattar, S. & Johnson-Lussenburg, C. Effect of relative humidity on the airborne survival of rhinovirus-14. *Can. J. Microbiol.* 31, (1985).
24. Jacobs, S. E., Lamson, D. M., George, K. S. & Walsh, T. J. Human Rhinoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 135 (2013).
25. Hershenson, M. B. Rhinovirus-Induced Exacerbations of Asthma and COPD. *Scientifica* 2013, (2013).
26. Falke, D. *Virologie am Krankenbett.* (Springer-Verlag, 1998).
27. Schee, M. P. van der *et al.* Altered exhaled biomarker profiles in children during and after rhinovirus-induced wheeze. *Eur. Respir. J.* 45, 440–448 (2015).
28. W. Mellors, J. *et al.* Plasma Viral Load and CD4⁺ Lymphocytes as Prognostic Markers of HIV-1 Infection. *Ann. Intern. Med.* (2000).
29. A. O'Brien, W., M. Hartigan, P., S. Daar, E., S. Simberkoff, M. & D. Hamilton, J. Changes in Plasma HIV RNA Levels and CD4⁺ Lymphocyte Counts Predict Both Response to Antiretroviral Therapy and Therapeutic Failure. *Ann. Intern. Med.* (2000).
30. Asian Pacific Association for the Study of the Liver consensus statements on the diagnosis, management and treatment of hepatitis C virus infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 615–633 (2007).

31. Martin, P. *et al.* A Treatment Algorithm for the Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection in the United States: 2015 Update. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 2071-2087.e16 (2015).
32. Bonner, K., Mezochow, A., Roberts, T., Ford, N. & Cohn, J. Viral Load Monitoring as a Tool to Reinforce Adherence: A systematic review. *LWW* https://journals.lww.com/jaids/Fulltext/2013/09010/Viral_Load_Monitoring_as_a_Tool_to_Reinforce.12.aspx (2013) doi:10.1097/QAI.0b013e31829f05ac.
33. Madej, R. M. *et al.* International Standards and Reference Materials for Quantitative Molecular Infectious Disease Testing. *J. Mol. Diagn. JMD* 12, 133 (2010).
34. LADR Laborverbund & Bialek, R. Ct-Wert Coronavirus - Wie aussagekräftig ist er? <https://ladr.de/ct-wert-sars-coronavirus-2-pcr>.
35. Liu, Y. *et al.* Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* 20, 656 (2020).
36. Abdulrahman, A., Mallah, S. I. & Alqahtani, M. COVID-19 viral load not associated with disease severity: findings from a retrospective cohort study. *BMC Infect. Dis.* 21, (2021).
37. Walker, A. S. *et al.* Ct threshold values, a proxy for viral load in community SARS-CoV-2 cases, demonstrate wide variation across populations and over time. *eLife* 10, (2021).
38. Mishra, B. *et al.* High proportion of low cycle threshold value as an early indicator of COVID-19 surge. *J. Med. Virol.* 94, 240 (2022).
39. Sigerist, H. ON HIPPOCRATES on JSTOR. <https://www.jstor.org/stable/44437788> (1934).
40. ten Haaf, R. Der Geruch unseres Atems gibt Auskunft über unseren Gesundheitszustand. *Bronkhorst* <https://bronkhorst.com/de-de/blogbeitrage/der-geruch-unseres-atemsgibt-auskunft-uber-unseren-gesundheitszustand/> (2019).

41. Seeger, W., Remy, N. E. M. & Neuhoﬀ, H. A Highly Sensitive Gas Chromatographic Method Does not Detect Exhalation of Volatile Hydrocarbons from Isolated Ventilated Lungs under Massive Peroxidative Stress. *Exp. Lung Res.* (2009)
doi:10.3109/01902148809087816.
42. Glaab, T., Schmidt, O. & Fritsch, J. (7) Spiroergometrie kompakt – Physiologie, Durchführung und Auswertung | Request PDF. *ResearchGate* https://www.researchgate.net/publication/339231102_Spiroergometrie_kompakt_-_Physiologie_Durchfuhrung_und_Auswertung (2020).
43. Kim, C. W. H. and B.-W. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. 72, 229–236 (2018).
44. Miekisch, W., Schubert, J. K. & Noeldge-Schomburg, G. F. E. Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds. *Clin. Chim. Acta* 347, 25–39 (2004).
45. Schivo, M. *et al.* Volatile emanations from in vitro airway cells infected with human rhinovirus. *J. Breath Res.* 8, 037110 (2014).
46. Aksenov, A. A. *et al.* Cellular Scent of Influenza Virus Infection. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 15, 1040 (2014).
47. Traxler, S. *et al.* Volatile scents of influenza A and *S. pyogenes* (co-)infected cells. *Sci. Rep.* 9, 18894 (2019).
48. Grassin-Delyle, S. *et al.* Metabolomics of exhaled breath in critically ill COVID-19 patients: A pilot study. *EBioMedicine* 63, 103154 (2021).
49. Liangou, A. *et al.* A method for the identification of COVID-19 biomarkers in human breath using Proton Transfer Reaction Time-of-Flight Mass Spectrometry. *EClinicalMedicine* 42, (2021).

50. Bayerisches Landesamt Für Gesundheit Und Lebensmittelsicherheit & Koch-Institut, R. Beschreibung des bisherigen Ausbruchsgeschehens mit dem neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2 in Deutschland (Stand: 12. Februar 2020). (2020) doi:10.25646/6476.
51. Bundesregierung. Maßnahmen der Bundesregierung zur Eindämmung der COVID-19-Pandemie und zur Bewältigung ihrer Folgen. 22 doi:10.15482/USDA.ADC/1239279.
52. Kenny, G. & Mallon, P. W. COVID19- clinical presentation and therapeutic considerations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 538, 125–131 (2021).
53. Y, K., Y, M., Y, O., Y, A. & K, T. Perioperative Management During the COVID-19 Pandemic: Strategies at Three General Hospitals in Japan and a Narrative Review. *Asian J. Anesthesiol.* (2022) doi:10.6859/aja.202202/PP.0004.
54. Tahamtan, A. & Ardebili, A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 20, 453–454 (2020).
55. Scheiblauer *et al.*, H. Vergleichende Evaluierung der Sensitivität von SARS-CoV-2-Antigenschnelltests. 15 (2022).
56. Trefz, P. *et al.* Non-Invasive Assessment of Metabolic Adaptation in Paediatric Patients Suffering from Type 1 Diabetes Mellitus. *J. Clin. Med.* 8, (2019).
57. Löser, B. *et al.* Changes of Exhaled Volatile Organic Compounds in Postoperative Patients Undergoing Analgesic Treatment: A Prospective Observational Study. *Metabolites* 10, (2020).
58. Trefz, P. *et al.* Exhaled volatile substances in children suffering from type 1 diabetes mellitus: results from a cross-sectional study. *Sci. Rep.* 9, 1–9 (2019).
59. Sukul, P., Schubert, J. K., Trefz, P. & Miekisch, W. Natural menstrual rhythm and oral contraception diversely affect exhaled breath compositions. *Sci. Rep.* 8, (2018).
60. Sukul *et al.*, P. Deficiency and absence of endogenous isoprene in adults, disqualified its putative origin. *Heliyon* 7, e05922 (2021).

61. Sukul, P., Grzegorzewski, S., Broderius, C., Miekisch, W. & Schubert, J. K. Physiological and metabolic effects of healthy female aging on exhaled breath biomarkers. *iScience* 25, 103739 (2022).
62. Sukul, P. *et al.* Exhaled breath compositions under varying respiratory rhythms reflects ventilatory variations: translating breathomics towards respiratory medicine. *Sci. Rep.* 10, (2020).
63. Sukul, P., Schubert, J. K., Kamysek, S., Trefz, P. & Miekisch, W. Applied upper-airway resistance instantly affects breath components: a unique insight into pulmonary medicine. *J. Breath Res.* 11, (2017).
64. Lough, F., Perry, J. D., Stanforth, S. P. & Dean, J. R. Detection of exogenous VOCs as a novel in vitro diagnostic technique for the detection of pathogenic bacteria. *TrAC Trends Anal. Chem.* 87, 71–81 (2017).
65. Traxler, S. *et al.* VOC breath profile in spontaneously breathing awake swine during Influenza A infection. *Sci. Rep.* 8, 14857 (2018).
66. Ahmed, W. M., Lawal, O., Nijsen, T. M., Goodacre, R. & Fowler, S. J. Exhaled Volatile Organic Compounds of Infection: A Systematic Review. *ACS Infect. Dis.* 3, 695–710 (2017).
67. Korpi, A., Järnberg, J. & Pasanen, A.-L. Microbial Volatile Organic Compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 39, 139–193 (2009).
68. LADR Laborverbund. Respiratorische Screening-PCR. (2018).
69. Bayat, S. A. *et al.* Can the cycle threshold (Ct) value of RT-PCR test for SARS CoV2 predict infectivity among close contacts? *J. Infect. Public Health* 14, 1201 (2021).
70. Sukul, P., Oertel, P., Kamysek, S. & Trefz, P. Oral or nasal breathing? Real-time effects of switching sampling route onto exhaled VOC concentrations. *J. Breath Res.* 11, 027101 (2017).

71. Pugliese, G. *et al.* Effects of modular ion-funnel technology onto analysis of breath VOCs by means of real-time mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 7131–7140 (2020).
72. Sukul, P. *et al.* Effects of COVID-19 protective face-masks and wearing durations onto respiratory-haemodynamic physiology and exhaled breath constituents. *Eur. Respir. J.* (2022) doi:10.1183/13993003.00009-2022.
73. Sukul, P., Trefz, P., Kamysek, S., Schubert, J. K. & Miekisch, W. Instant effects of changing body positions on compositions of exhaled breath. *J. Breath Res.* 9, (2015).
74. Sukul, P., Trefz, P., Schubert, J. K. & Miekisch, W. Immediate effects of breath holding maneuvers onto composition of exhaled breath. *J. Breath Res.* 8, 037102 (2014).
75. Herbig, J. *et al.* On-line breath analysis with PTR-TOF. *J. Breath Res.* 3, 027004 (2009).
76. Sukul, P., Trefz, P., Schubert, J. K. & Miekisch, W. Immediate effects of breath holding maneuvers onto composition of exhaled breath. *J. Breath Res.* 8, 037102 (2014).
77. Cappellin, L. *et al.* On Quantitative Determination of Volatile Organic Compound Concentrations Using Proton Transfer Reaction Time-of-Flight Mass Spectrometry. *ACS Publications* <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es203985t> (2012) doi:10.1021/es203985t.
78. Trefz, P., Schubert, J. K. & Miekisch, W. Effects of humidity, CO₂ and O₂ on real-time quantitation of breath biomarkers by means of PTR-ToF-MS. *J. Breath Res.* 12, 026016 (2018).
79. Buda *et al.*, S. Influenza-Wochenbericht. 9 (2021).
80. RKI. Corona-Pandemie (COVID-19) 2019-2021. *Statista* <https://de.statista.com/statistik/studie/id/71015/dokument/corona-pandemie-2019-20/>.
81. Chen, H. *et al.* COVID-19 screening using breath-borne volatile organic compounds. *J. Breath Res.* (2021) doi:10.1088/1752-7163/ac2e57.

82. Ruszkiewicz, D. M. *et al.* Diagnosis of COVID-19 by analysis of breath with gas chromatography-ion mobility spectrometry - a feasibility study. *EClinicalMedicine* 29, 100609 (2020).
83. Yuan, Z.-C. & Hu, B. Mass Spectrometry-Based Human Breath Analysis: Towards COVID-19 Diagnosis and Research. *J. Anal. Test.* 5, 287 (2021).
84. Berna, A. Z. *et al.* Reproducible Breath Metabolite Changes in Children with SARS-CoV-2 Infection. *ACS Infect. Dis.* (2021) doi:10.1021/acsinfecdis.1c00248.
85. Ibrahim, W. *et al.* Diagnosis of COVID-19 by exhaled breath analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *ERJ Open Res.* 7, (2021).
86. Aouadi, W. *et al.* Binding of the Methyl Donor S-Adenosyl-L-Methionine to Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus 2'-O-Methyltransferase nsp16 Promotes Recruitment of the Allosteric Activator nsp10. *J. Virol.* 91, e02217-16 (2017).
87. Enaud, R. *et al.* The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, (2020).
88. Giron, L. B. *et al.* Plasma Markers of Disrupted Gut Permeability in Severe COVID-19 Patients. *Front. Immunol.* 12, (2021).
89. Tangermann, A. Measurement and biological significance of the volatile sulfur compounds hydrogen sulfide, methanethiol and dimethyl sulfide in various biological matrices. *J. Chromatogr. B* 877, 3366–3377 (2009).
90. Dorokhov, Y. L., Shindyapina, A. V., Sheshukova, E. V. & Komarova, T. V. Metabolic Methanol: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* 95, 603–644 (2015).
91. Rj, S., Jj, C., Mm, B., Cw, B. & Fl, R. Methanol production from the degradation of pectin by human colonic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 47, (1988).
92. Kryukov, E. V. *et al.* Plasma S-Adenosylmethionine Is Associated with Lung Injury in COVID-19. *Dis. Markers* 2021, (2021).

93. Magalhães, N. S., Savino, W., Silva, P. M. R., Martins, M. A. & Carvalho, V. F. Gut Microbiota Dysbiosis Is a Crucial Player for the Poor Outcomes for COVID-19 in Elderly, Diabetic and Hypertensive Patients. *Front. Med.* 8, (2021).
94. Yk, Y. *et al.* Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut* 70, (2021).
95. Silva, Y. P., Bernardi, A. & Frozza, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front. Endocrinol.* 11, (2020).
96. Trefz, P. *et al.* Continuous Real Time Breath Gas Monitoring in the Clinical Environment by Proton-Transfer-Reaction-Time-of-Flight-Mass Spectrometry. *ACS Publications* <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ac402298v> (2013) doi:10.1021/ac402298v.
97. Dick, M. *et al.* Mechanism-based inhibition of an aldolase at high concentrations of its natural substrate acetaldehyde: structural insights and protective strategies. *Chem. Sci.* 7, 4492 (2016).
98. Van Fleet, T. R. & Philip, B. K. Acetaldehyde. 22–23 (2014) doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00994-5.
99. Elshagabee, F. M. F. *et al.* Ethanol Production by Selected Intestinal Microorganisms and Lactic Acid Bacteria Growing under Different Nutritional Conditions. *Front. Microbiol.* 7, (2016).
100. Fuhrmann. Microbial metabolism. *Princ. Appl. Soil Microbiol.* 57–87 (2021) doi:10.1016/B978-0-12-820202-9.00003-4.
101. Hussain, I., Cher, G. L. Y., Abid, M. A. & Abid, M. B. Role of Gut Microbiome in COVID-19: An Insight Into Pathogenesis and Therapeutic Potential. *Front. Immunol.* 12, (2021).
102. On the mammalian acetone metabolism: from chemistry to clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1621, 122–139 (2003).

103. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212, 167–178 (2006).
104. Linden, D. R. Hydrogen Sulfide Signaling in the Gastrointestinal Tract. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 818 (2014).
105. Singhal, R. & Shah, Y. M. Oxygen battle in the gut: Hypoxia and hypoxia-inducible factors in metabolic and inflammatory responses in the intestine. *J. Biol. Chem.* 295, 10493 (2020).
106. McCartney, M. M. *et al.* Predicting Influenza and Rhinovirus Infections in Airway Cells Utilizing Volatile Emissions. *J. Infect. Dis.* 224, 1742 (2021).
107. Schivo, M. *et al.* Volatile Emanations From In Vitro Airway Cells Infected With Human Rhinovirus. *J. Breath Res.* 8, 037110 (2014).
108. Tobal, I. E., Bautista, R., Diez, D., Garrido, N. M. & García-García, P. 1,3-Cyclohexadien-1-Als: Synthesis, Reactivity and Bioactivities. *Molecules* 26, (2021).
109. Duke, J. *Dr.Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases.* (2016).
110. Szakonyi, T. & Fulöp, F. Regio- and stereoselective synthesis of the enantiomers of monoterpene-based β -amino acid derivatives. *Tetrahedron Asymmetry* 18, 2442–2447 (2007).
111. Ciriminna, R., Lomeli-Rodriguez, M., Carà, P. D., Lopez-Sanchez, J. A. & Pagliaro, M. Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. *Chem. Commun.* 50, 15288–15296 (2014).
112. α -Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry* 190, 112857 (2021).
113. Utegenova, G. A. *et al.* Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Ferula* L. Species against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 23, 1679 (2018).
114. Karthikeyan, R. Alpha pinene modulates UVA-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in human skin epidermal keratinocytes. *Life Sci.* 212, 150–158 (2018).

115. Pawar, R. D. *et al.* Viral load and disease severity in COVID-19. *Intern. Emerg. Med.* 17, 359 (2022).
116. Grassin-Delyle, S. *et al.* Metabolomics of exhaled breath in critically ill COVID-19 patients: A pilot study. *EBioMedicine* 63, (2021).
117. Liangou, A. *et al.* A method for the identification of COVID-19 biomarkers in human breath using Proton Transfer Reaction Time-of-Flight Mass Spectrometry. *EClinicalMedicine* 42, (2021).
118. Chen, H. *et al.* COVID-19 screening using breath-borne volatile organic compounds. *J. Breath Res.* (2021) doi:10.1088/1752-7163/ac2e57.
119. Ibrahim, W. *et al.* Diagnosis of COVID-19 by exhaled breath analysis using gas chromatography–mass spectrometry. *ERJ Open Res.* 7, (2021).

9. Anhang

9.1. Vortrag und Publikationen

Publikationen: **Profiling of exhaled volatile organics in the screening scenario of a COVID-19 test center**

Remy R, Kemnitz N, Trefz P, Fuchs P, Bartels J, Klemenzen AC, Rührmund L, Sukul P, Miekisch W, Schubert JK
iScience 2022 21. Oktober, 25 (10):105195,
doi: 10.1016/j.isci.2022.105195, PMID: 36168390
(Impact Faktor 2022: 6,107)

Effects of COVID-19 protective face masks and wearing durations on respiratory haemodynamic physiology and exhaled breath constituents.

Sukul P, Bartels J, Fuchs P, Trefz P, **Remy R**, Rührmund L, Kamysek S, Schubert JK, Miekisch W.
Eur Respir J. 2022 Sep 22;60(3):2200009., doi:10.1183/13993003.00009-2022.
(Impact Faktor 2022-23: 33,8)

Effects of contagious respiratory infections on breath biomarkers.

Kemnitz N, Fuchs P, **Remy R**, Rührmund L, Bartels J, Klemenzen AC, Trefz P, Schubert JK, Miekisch W, Sukul P.
Molecular Biosciences., Status: Submitted

Kongressbeiträge: **Profiling of exhaled volatile organics in the screening scenario of a COVID-19 test center**

Remy R, Kemnitz N, Trefz P, Fuchs P, Bartels J, Klemenzen AC, Rührmund L, Sukul P, Miekisch W, Schubert JK
Vortrag, Breath Summit 2022, Pisa, Italien

Data visualization for real time mass spectrometry based breath analysis in clinical setups

Rührmund L, Trefz P, Remy R, Bartels J, Klemenzen AC, , Fuchs P, Kemnitz N, Sukul P, Miekisch W, Schubert JK
Poster, Breath Summit 2022, Pisa, Italien

9.2. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Rasmus Karl Jaap Remy

Geburtsdatum, -ort: 26.07.1990 , Berlin

Schul- und Hochschulausbildung:

2004-2010 **Teletta-Groß-Gymnasium Leer**

Allgemeine Hochschulreife

2011-2014 **Bildungsinstitut Gesundheit Leer**

Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger

Staatsexamen

2017-2023 **Universität Rostock**

Studium der Humanmedizin in Rostock

1.Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 2019

2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 2022

seit 2020 **Universitätsmedizin Rostock**

Doktorand in der AG „Atemgasanalytik“ der Klinik und Poliklinik

für Anästhesiologie und Intensivtherapie unter Leitung von

Prof. Dr. Jochen Schubert und Dr. rer. nat. Wolfram Miekisch

2022-2023 **Praktisches Jahr**

Chirurgie: Department of Surgery, Faculty of medicine

University of Ruhuna, Sri Lanka

Anästhesie: Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie

Universitätsmedizin Rostock

9.3. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Darstellung der VOC-Profile von
SARS-CoV-2-/ Rhinovirus-infizierten Probanden
unter realen Screening-Bedingungen“

selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die aus fremden Quellen direkt übernommenen Gedanken und wörtlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Dissertation wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Rasmus Karl Jaap Remy

Rostock, Mai, 2023

9.4. Einverständniserklärung und Studienaufklärung

Einverständniserklärung

Neue Verfahren zur Diagnostik von SARS-CoV-2 Infektionen mittels nicht-invasiver Atemgasanalyse

Geschäftszeichen der Ethikkommission:

Ich,, geb. am,

Name, Vorname (Proband)

wurde vom Prüfarzt Prof. Schubert, Nele Kemnitz und cand. med. Rasmus Remy vollständig über Wesen und Bedeutung der oben genannten Studie informiert. Ich habe den Aufklärungstext verstanden. Ich hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen, und habe die Antworten verstanden und akzeptiere sie. Der Prüfarzt hat mich über die mit der Teilnahme an der Studie verbundenen Risiken und den möglichen Nutzen informiert.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zur Teilnahme an dieser Studie zu entscheiden und weiß, dass die Teilnahme an dieser Studie freiwillig ist. Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann.

Einwilligungserklärung zum Datenschutz

Ich wurde darüber aufgeklärt und stimme zu, dass die in der Studie erhobenen Daten in verschlüsselter (pseudonymisierter) Form aufgezeichnet und weitergegeben werden können. Dritte erhalten jedoch keinen Einblick in Originalunterlagen. Werden die Ergebnisse der Studie in einer wissenschaftlichen Zeitschrift oder in anderer Form veröffentlicht, sind die Daten anonymisiert dargestellt und der Name wird nicht genannt.

Ich habe für meine Unterlagen eine unterschriebene Kopie der Probanden-Information und Einwilligungserklärung erhalten. Ich erkläre hiermit meine freiwillige Teilnahme an dieser klinischen Studie.

Ich bin mit einer Teilnahme an dieser Studie

- ☐ einverstanden
- ☐ nicht einverstanden

Ich bin mit einer Blutentnahme (ca. 10 ml)

- ☐ einverstanden
- ☐ nicht einverstanden

Rostock, den __.__.____

(Unterschrift des Probanden)

Rostock, den __.__.____

(Unterschrift des Prüfarztes)

Informationen zur CoVid-19 Diagnostikstudie
Neue Verfahren zur Diagnostik von SARS-CoV-2 Infektionen mittels
nicht-invasiver Atemgasanalyse
(Geschäftszeichen der Ethikkommission: A 2020-0085)

Einer der wichtigsten Aspekte bei der Bekämpfung der weltweiten SARS-CoV-2 Pandemie ist die rechtzeitige Diagnose von Infizierten/Virusträgern. Die bisher genutzten PCR-basierten Tests benötigen mehrere Stunden zur Durchführung, bis zur Übermittlung der Ergebnisse vergehen oft mehrere Tage. Aus Untersuchungen mit anderen Virusinfektionen wissen wir, dass Infektionen mit charakteristischen Veränderungen der Atemluftzusammensetzung einhergehen (können). Mit den derzeit zur Verfügung stehen Analysegeräten, könnte mittels Atemgasanalyse eine Virus(vor)diagnostik innerhalb weniger Minuten erfolgen.

Mit den nachfolgenden Informationen möchten wir Ihr Interesse wecken und ihre Bereitschaft erreichen, an einer klinisch-experimentellen Studie teilzunehmen. Diese Studie zielt darauf ab, die mit einer CoV-2 Infektion assoziierten Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Atemluft (Atemgas-Profil) zu erfassen. Die auf diese Weise identifizierten (gasförmigen) Biomarker für eine CoV-2 Infektion können dann mit speziellen Geräten, wie sie bereits heute an Flughäfen zur Detektion von Kampf- oder Sprengstoffen verwendet werden, detektiert und für ein schnelles breites Screening der Bevölkerung eingesetzt werden.

Dazu sollen Untersuchungen der Ausatemluft, Virusdiagnostik aus Rachenabstrichen und die Bestimmung entzündungsspezifischer Substanzen im Blut dienen. Alle Untersuchungen werden an dem einen Termin Ihres Ambulanzbesuches koordiniert und wir freuen uns, wenn wir Sie detailliert über unsere Studie informieren dürfen.

Selbstverständlich erläutern wir Ihnen alle Studienuntersuchungen auch in einem persönlichen Gespräch und beantworten auch die während der Untersuchung auftretenden Fragen.

Patienten-Information

Neue Verfahren zur Diagnostik von SARS-CoV-2 Infektionen mittels nicht-invasiver Atemgasanalyse

Geschäftszeichen der Ethikkommission: A 2020-0085

Sehr geehrte/r Frau/Herr,

wir möchten Sie bitten, an einer Studie zur Untersuchung der Ausatemluft von gesunden und von möglicherweise mit CoV-2 infizierten Menschen teilzunehmen und die folgenden Informationen sorgfältig durchzulesen.

Bei Unklarheiten oder Fragen können Sie sich selbstverständlich jederzeit an uns wenden.

Ziel der Studie

Sie stellen sich heute zur Durchführung eines Tests auf CoV-2 Infektion mittels Rachenabstrich in unserem Testzentrum vor. Die bisher genutzten PCR(Polymerase-Chain-Reaction = Polymerase-Kettenreaktion)-basierten Tests benötigen mehrere Stunden zur Durchführung, bis zur Übermittlung der Ergebnisse vergehen oft mehrere Tage. Aus Untersuchungen mit anderen Virusinfektionen wissen wir, dass Infektionen mit charakteristischen Veränderungen der Atemluftzusammensetzung einhergehen (können). Mit den derzeit zur Verfügung stehenden Analysegeräten, könnte mittels Atemgasanalyse eine Virusdiagnostik innerhalb weniger Minuten erfolgen.

Ziel dieser Studie ist es daher, die mit einer CoV-2 Infektion einhergehenden Veränderungen der chemischen Zusammensetzung der Atemluft (Atemgas-Profil) zu erfassen. Die auf diese Weise identifizierten (gasförmigen) Biomarker für eine CoV-2 Infektion können dann mit Geräten, wie sie bereits heute an Flughäfen zur Detektion von Kampf- oder Sprengstoffen verwendet werden, detektiert und für ein schnelles, breites Screening der Bevölkerung eingesetzt werden.

Dazu sollen Untersuchungen der Ausatemluft, Virusdiagnostik aus Rachenabstrichen und die Bestimmung entzündungsspezifischer Substanzen im Blut dienen. Alle Untersuchungen werden an diesem Termin Ihres Ambulanzbesuches koordiniert.

Dazu bitten wir Sie, uns die Analyse der chemischen Zusammensetzung ihrer Ausatemluft zu ermöglichen. Wir freuen uns, wenn Sie uns eine Blutprobe für die Erfassung

der Standard- Entzündungsparameter Leukozytenzahl, CRP, PCT überlassen, um zusätzlich vorhandene bakterielle Infektion zu erfassen. Wenn Sie damit einverstanden sind, möchten wir einen kleinen Teil der Blutprobe für spätere molekularbiologische Untersuchungen aufheben. Durch Ihre Teilnahme an dieser Studie helfen Sie uns, die rechtzeitige und breit angelegte Erkennung von CoV-2-Infektionen zu verbessern. Dies würde dazu führen, infizierte Personen sofort zu identifizieren und isolieren zu können. Die Ausbreitung der potentiell lebensbedrohlichen Corona-Virusinfektion aber auch die anderer Viren (RSV, Influenza) könnte damit wirksam bekämpft werden.

Teilnahmekriterien:

Sie können an dieser Studie teilnehmen, wenn Sie zum Zeitpunkt des Virustests mindestens 14 Jahre alt sind. Die Teilnahmekriterien werden wir im Rahmen des Einführungsgespräches im Detail mit Ihnen durchgehen.

Studiendurchführung / Untersuchungen

Sie haben sich entschlossen, an unserer Studie teilzunehmen und wurden vom Prüfarzt Prof. Schubert und N. Kemnitz sowie Herrn cand. med. Rasmus Remy (Doktorand) über die Studie informiert.

Nach der Entnahme der Rachenabstriche werden wir hier im Testzentrum der Universitätsmedizin Rostock am Campus Schillingallee nicht-invasive und schmerzfreie Untersuchungen zur Bestimmung der Atemgaszusammensetzung durchführen. Die Abnahme der Gasproben erfolgt so, dass eine Beeinträchtigung der Atmung und Ihres Allgemeinbefindens ausgeschlossen ist. Das Sammeln der Atemgasproben wird unter Spontanatmung über ein Mundstück durchgeführt (Dauer ca. 15 min). Alle Teile, die direkt mit Ihnen in Berührung kommen, sind frisch sterilisiert. Es werden keine zusätzlichen Medikamente verabreicht und keine sonstigen Veränderungen in Ihrer Behandlung vorgenommen. Grundsätzlich besteht jedoch für die Teilnehmer an einer von der Universitätsklinik durchgeführten Studie Versicherungsschutz durch die Haftpflichtversicherung des Klinikums.

Wir freuen uns, wenn Sie uns einmalig zusätzlich eine weitere, kleine Blutprobe (2 Röhrchen zur Gewinnung von Plasma und Serum, zusammen max. 10 ml Blut) überlassen.

Die geplanten Untersuchungen umfassen:

- ☐ eine Erhebung der Vor-/Krankengeschichte
- ☐ die ohnehin geplante Abnahme der Rachenabstriche. Zusätzlich zum Test auf CoV-2 werden aus denselben Proben Tests auf RSV und Influenza-Viren durchgeführt
- ☐ die Abnahme von zwei Atemgasproben, die später im Labor analysiert werden.

- ☐ die Aufzeichnung des Atemgaszusammensetzung mit zwei modernen Echtzeit-Massenspektrometern (PTR-ToF-MS, IMS)
- ☐ in den optional zur Verfügung gestellten Blutproben sollen Standard-Entzündungsparameter (CRP, PCT, Leukozytenzahl) bestimmt werden.

Selbstverständlich werden während der Untersuchung alle auftretenden Fragen beantwortet und Sie werden direkt über die Befunde informiert.

Welche Nachteile/Risiken haben Sie durch die Studienteilnahme?

Die in dieser Studie geplanten Untersuchungen sind mit keinerlei Nebenwirkungen oder Risiken verbunden. Lediglich die (optionale) Blutentnahme ist mit einem kleinen, allgemein als vernachlässigbar eingeschätzten Risiko (kleiner Bluterguss) verbunden. In sehr seltenen Fällen kann eine akute oder auch chronische Schädigung des Hautnerven im Bereich der Punktionsstelle eintreten.

Datenschutz

Alle für die Auswertung unserer Studie relevanten Daten zu Ihrer Krankengeschichte werden pseudonymisiert und ausschließlich für die Zwecke dieser Studie gespeichert. Die unverschlüsselten Informationen (Name, Geburtsdatum und das der Studie zugewiesene Pseudonym) werden separat gespeichert. Damit ist sichergestellt, dass die im Rahmen der Studie erhobenen persönlichen Daten nur von den unmittelbar an der Studie beteiligten und zur Verschwiegenheit verpflichteten Wissenschaftlern eingesehen werden können.

Eine offensichtliche Rückführbarkeit von einzelnen Studiendaten zu den individuellen Probanden ist ausgeschlossen. Die gesetzlichen Regelungen zum Umgang mit persönlichen Daten und zum Datenschutz werden eingehalten.

Freiwilligkeit der Studienteilnahme

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig.

Danksagung

Als ich Anfang 2020 mit dieser Arbeit begann, hatte ich wenig bis gar keine Vorstellung davon, was wissenschaftliches Arbeiten bedeutet. Trotzdem hatte ich nie das Gefühl alleine mit Problemen dar zustehen oder mit den Anforderungen überfordert zu sein. Das liegt vor allem an den ROMBATs. Dieser verschworene Haufen liebenswerter Menschen sind eher Familie als Arbeitsgruppe und bilden ein perfektes Konstrukt, das einen unterstützt, auffängt und motiviert.

Ein großer Dank gilt Jochen und Wolfram dafür, dass sie mir das Vertrauen gaben, diese Arbeit umzusetzen. Ihr wart stets dazu bereit mich zu leiten, Verbesserungsvorschläge zu geben und hattet grundsätzlich eine offene Tür.

Pritam möchte ich für seine Begeisterung danken, die mitreißend und manchmal auch ein wenig überfordernd sein kann. Pritam du hast diese Arbeit auf ein neues Level gehoben und dafür danke ich dir.

Leo, Julia, Anni und Nele schön das ihr mich auf diesem Weg begleitet habt. Ihr standet mir immer mit Rat und Tat zur Seite und wenn nicht damit, dann mit Kaffee, Keksen oder auch mal Kirschen.

Patricia du Gute, meine Ansprechpartnerin und Verschworene. Wie viele Excel-Tabellen haben wir zusammen erstellt und wie viele Abfrage gestellt. Es müssen hunderte ach was tausende gewesen sein. Ich danke dir sehr dafür, dass du immer da warst, immer ein offenes Ohr hattest und eigentlich immer guter Laune bist.

Mathilda Mucki mein Herz. Ich find dich toll. Danke für deine stete unabdingbare Unterstützung und dafür das du mich auch toll findest.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Sie haben zwar nicht besonders viel mit dieser Arbeit am Hut, aber ihr Dasein gibt mir Sicherheit und bekräftigt mich in meinem Weg.