

KLINIK UND POLIKLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE,  
INTENSIVMEDIZIN UND SCHMERZTHERAPIE

---

**Atemgasuntersuchungen bei Patienten  
mit respiratorischen Pathogenen**

Inauguraldissertation

---

Zur Erlangung des akademischen Grades:

Doktor der Medizin

Doctor medicinae (Dr. med.)

*Vorgelegt von:*

Nele Kemnitz

Geboren am 21.06.1992 in Neumünster

*Begutachtet durch:*

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Kreikemeyer, Institut für Mikrobiologie, Universität Rostock

Prof. Dr. Michael Lalk, Institut für Biochemie, Universität Greifswald

Eingereicht am 30. August 2024

Verteidigt am 19.02.2025



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	3
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	5
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	6
<b>Gender-Hinweis</b> .....	7
<b>1. Einleitung</b> .....	8
<b>2. Fragestellung</b> .....	11
<b>3. Methoden</b> .....	12
3.1 Studienteilnehmer.....	12
3.2 Versuchsaufbau.....	13
3.3 VOC-Probennahme und -verarbeitung.....	18
3.3.1 Versuchsaufbau.....	18
3.3.2 PTR-ToF-MS basierte Messungen von VOCs in der Atemluft.....	18
3.3.3 Datenverarbeitung.....	19
3.3.4 Quantifizierung.....	20
3.3.5 Auswahl der VOCs zur Analyse.....	20
3.3.6 Statistische Analyse.....	21
<b>4. Ergebnisse</b> .....	23
<b>5. Diskussion</b> .....	29
5.1 Klinisches Atemgas-Screening mittels PTR-ToF-MS und Studiendesign.....	29
5.2 Monoinfektionen.....	31
5.3 Koinfektionen.....	36
5.4 Limitationen der Studie.....	37
5.5 Ausblick.....	39
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	40
<b>7. Thesen der Arbeit</b> .....	41

<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>42</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>52</b>
<b>10. Publikationen und Vorträge .....</b>	<b>59</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>60</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>61</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>62</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AG ROMBAT</b>	Arbeitsgruppe Rostock Medical Breath Research Analytics and Technologies
<b>AWI</b>	Atemwegsinfekt
<b>COPD</b>	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
<b>CT</b>	Cycle Time
<b>DMS</b>	Dimethylsulfid
<b>DNS/RNS</b>	(Desoxy)ribonucleinsäure
<b>gK</b>	gesunde Kontrollgruppe
<b>HEPA</b>	High Efficiency Particulate Air
<b><i>H.i.</i></b>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<b>HZV</b>	Herzzeitvolumen, üblicherweise in l/min
<b><i>In vitro</i></b>	lateinischer Begriff; sinngemäß für „im Reagenzglas“
<b><i>In vivo</i></b>	lateinischer Begriff; sinngemäß für „im Lebenden“
<b>KKFS</b>	Kurzkettige Fettsäuren
<b>LOD</b>	Limit of Detection, Nachweisgrenze
<b>LOQ</b>	Limit of Quantification, Bestimmungsgrenze
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
<b>ppbV</b>	Teilchen pro Milliarde in Volumen (engl.: parts per billion by Volume)
<b>PTR –ToF- MS</b>	Protonen-Transfer-Reaktion-Time-of-Flight- Massenspektrometrie
<b>RKI</b>	Robert-Koch-Institut
<b>SARS-CoV-2</b>	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2

<i>S.p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>STIKO</b>	<b>Ständige Impfkommission</b>
<b>TDM</b>	<b>Therapeutic Drug Monitoring</b>
<b>UMR</b>	<b>Universitätsmedizin Rostock</b>
<b>VOC</b>	Volatile organische Verbindung, engl. volatile organic compound
<b>vs.</b>	lateinischer Begriff versus, gegenüber, gegeneinander

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Versuchsaufbau für die kontinuierliche Messung volatiler organischer Komponenten in der Atemluft in Echtzeit mittels PTR-ToF-MS unter erhöhten hygienischen Voraussetzungen
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung der PTR-ToF-MS
- Abbildung 3:** Heatmap als Veranschaulichung relativer Unterschiede der Konzentrationen von VOCs in der expiratorischen alveolaren Phase bei gesunden Probanden und in infizierten Gruppen in farblicher Kodierung
- Abbildung 4:** Darstellung der Konzentrationen von signifikant unterschiedlichen VOCs innerhalb der Studiengruppen und –subgruppen in Form von Boxplots

## **Tabellenverzeichnis**

- Tabelle 1:** Demografische Daten der Studienteilnehmer
- Tabelle 2:** Multiplex-PCR Erregernachweise
- Tabelle 3:** LOD und LOQ der signifikant abweichenden VOCs in parts per billion by volume (ppbV)
- Tabelle 4:** Statistische Vergleiche zwischen VOC-Konzentrationen der Studiengruppen und –subgruppen
- Tabelle 5:** Analyse der Inter-VOC-Korrelationen in den unterschiedlichen Studienpopulationen

## **Gender-Hinweis**

Im Sinne der besseren Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich und divers (m/w/d), Gender-Gap sowie –Sternchen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen adressieren dabei gleichermaßen alle Geschlechtsidentitäten.

## 1. Einleitung

Atemwegsinfektionen (AWI) stellen eine der häufigsten Erkrankungen des Menschen dar (1). Wenngleich einfache Verläufe meist präklinisch bleiben und von der natürlichen Immunabwehr ausreichend bekämpft werden, stellen sie besonders bei älteren und vorerkrankten sowie immunsupprimierten Patienten einen erheblichen Risikofaktor dar. AWI haben ein sehr breites Spektrum sowohl an Erregern als auch an möglichen Verläufen.

*Haemophilus influenzae* (*H.i.*), *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*) sowie Rhinovirus gehören zu den häufigsten Pathogenen im menschlichen Respirationstrakt(2). Die Erreger werden nachfolgend näher beschrieben.

*Haemophilus influenzae* gehört zur Gattung *Haemophilus* aus der Familie der Pasteurellaceae. Ursprünglich galt *H.i.* als Erreger der Grippe. Später wurde entdeckt, dass er asymptomatisch Schleimhäute besiedelt (Nasopharynx, Vaginaltrakt) und nur bei Immunsuppression Entzündungen hervorruft. Bei Patienten mit Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) ist *H.i.* ein häufiger Auslöser von Exazerbationen. Bei dem Bakterium handelt sich um ein unbewegliches, gramnegatives kokkoides Stäbchen, das nur im Menschen vorkommt. *H.i.* kann in „typisierbare“ (bekapselte) sowie „nicht typisierbare“ Stämme unterteilt werden. Bis zur Einführung der Impfung gegen den *H.i.* mit dem Kapseltyp B 1990 war dieser der Haupterreger der bakteriellen Meningitis bei Kleinkindern, danach sank die Inzidenz um 90%. Invasive Verläufe von *H.i.*-Infektionen sind heutzutage selten, können bei älteren oder vorerkrankten Patienten aber fulminant bis letal verlaufen. Verantwortlich sind in Deutschland heute vor allem unbekapselte Stämme, gegen die nicht geimpft werden kann (3,4). Antibiotisch behandelt werden Infektionen inzwischen vorrangig mit Cephalosporinen der dritten Generation da es vermehrt zum Auftreten von Penicillin (Ampicillin-)resistenten Stämmen kommt (5). Zum Nachweis stehen neben der Anzucht und Mikroskopie auch verschiedene PCR-Tests zur Verfügung sowie Antigen-Schnelltests zur Diagnostik von Liquorproben.

Eine Koinfektion mit anderen Viren- oder Bakterienstämmen, u. a. mit einigen Coronaviren sowie *Streptococcus pneumoniae* ist häufig (6), sodass eine genaue Bestimmung der Pathogene via Kulturanzucht oder PCR zur Anpassung der medikamentösen Therapie einen hohen Stellenwert besitzt (7).

*Streptococcus pneumoniae* gehört zur Gattung der Streptokokken und ist annähernd kugelförmig. Als Haupterreger der ambulant erworbenen Pneumonien (8) sind sie auch als

Pneumokokken bekannt. *S.p.* sind Diplokokken, vergrünend, grampositiv und fakultativ anaerob. Die Polysaccharidkapsel macht die Pathogenität des Erregers aus. Die Bakterien verursachen mitunter schwere Lungen-, Ohren-, Schleimhautentzündungen sowie mit dem Blutstrom verschleppte Infektionen. Im adulten Menschen ist *S.p.* der häufigste Erreger der Meningitis. In Abhängigkeit von verschiedenen Risikofaktoren (Alter unter 2 oder über 65 Jahren, Komorbiditäten, Immunstatus) wird eine Letalität der Pneumonien von bis zu 15% beschrieben. Unbekapselte Subtypen mit rauer Oberfläche sind weitgehend apathogen.

Diagnostisch steht für Hausarztpraxen ein Antigen-Schnelltest zur Verfügung, labormedizinisch kann ein Nachweis via Anzucht oder PCR erfolgen.

Antibiotisch wird vor allem die das Bakterium schützende Kapsel adressiert. Erstlinientherapie sind, sofern keine Resistenzen vorliegen, Penicilline, ggf. in Kombination mit einem Beta-Lactamasehemmer. Während in Deutschland die Resistenzrate noch niedrig ist, kommen im europäischen Ausland zunehmend resistente Stämme vor (9). Bisher ist Vancomycin das letzte Antibiotikum, gegen das keine Resistenzen beschrieben worden sind (8). Zur aktiven Immunisierung steht ein Polysaccharid-Impfstoff zur Verfügung, der nach Empfehlung der Ständigen Impfkommission (STIKO) des Robert-Koch-Institutes (RKI) drei Mal in den ersten Lebensmonaten verabreicht wird.

**Rhinoviren** sind für mehr als die Hälfte der Erkältungserkrankungen verantwortlich (10). Sie verlaufen meist selbstlimitierend, können aber auch Mittelohrentzündungen, Sinusitiden und schwere Exazerbationen von COPD oder Asthma verursachen (11). Rhinoviren gehören zur Familie der Picornaviridae, sind von einem Kapsid umhüllt und enthalten eine Einzelstrang-RNS (ssRNA). Übertragen werden sie vor allem über Schmier- und Tröpfcheninfektion. Eine Aufnahme erfolgt über die Schleimhäute, wo sie lokale Reizungen und Entzündungen hervorrufen. Die Diagnose wird meist klinisch gestellt und symptomatisch behandelt. Aufgrund der hohen Prävalenz sind Koinfektionen häufig, besonders in den kalten Monaten und in Kombination mit Influenza können schwere Krankheitsverläufe begünstigt werden.

Häufig finden sich Superinfektionen mit verschiedenen Viren und Bakterien. Die möglichen Auswirkungen der schnellen und schwer einzudämmenden Transmission über die Atemluft schon in Phasen ohne Symptome hat sich in den letzten Jahren am Beispiel der SARS-CoV-2-Pandemie gezeigt. Besonders in urbanen Räumen, in denen Menschen in großer Anzahl und Nähe leben konnte eine Verbreitung kaum begrenzt werden. Die Unterscheidung „harmloser“

AWI von hochpathogenen und potentiell letal endenden Erkrankungen wurde dabei zur zentralen Aufgabe des Gesundheitssystems. Am Nadelöhr der Diagnostik mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stieß die Versorgungskapazität dabei selbst in reichen westlichen Ländern an ihre Grenzen. Die Personal- sowie Laborkapazitäten reichten oft nicht aus um den sprunghaft gestiegenen Bedarf zu decken. Hinzu kam die Schwierigkeit der Diagnostik bei Kindern, die AWI sowohl im familiären als auch im öffentlichen Raum (Schule Kindertagesstätte) großflächig übertragen, für die eine Beprobung mit Wattetupfer aber oft als beängstigend bis schmerzhaft wahrgenommen wurde. Alternative Versuche mit „Lollipop-Testern“ gingen dabei auf Kosten der Sensitivität der Analyse (12).

In dieser Studie wurde eine Untersuchung der Ausatemluft zum Nachweis verschiedener respiratorischer Pathogene durchgeführt. Die Atemgasanalyse ist ein weltweit vertretenes Forschungsfeld, in dem mittels verschiedener Methoden volatile organische Komponenten (VOCs) erfasst und identifiziert werden (13–17). Systemische VOCs werden auf zellulärer Ebene produziert, mit dem Blutstrom zur Lunge transportiert, dort in die Alveolen emittiert und über die Luft abgeatmet. Da sie unmittelbar dem (menschlichen) Organismus entstammen, lassen sich durch ein VOC-Monitoring Einblicke in verschiedene metabolische Zustände und Prozesse zu gewinnen.

Volatile organische Komponenten machen weniger als ein Prozent des Gesamtvolumens des Expirationsatems aus. Das Spektrum der exhaliierten VOCs umfasst verschiedene Stoffwechselprodukte, darunter Kohlenwasserstoffe, Aldehyde, Ketone, aromatische Verbindungen oder Alkohole im Ultraspurenbereich (pmol/l bis nmol/l). Um exhaliierte VOCs zu messen sind daher empfindliche Methoden sowie hohe Standards bei der Probenabnahme erforderlich (18). Als Goldstandard zur Identifizierung und Quantifizierung gilt die Gaschromatografie- Massenspektrometrie (GC-MS) (19), die aber eine Präkonzentration der Proben erfordert und, als laborassistierte Methode, zeitliche Verzögerungen mit sich bringt. Neuere Ansätze beinhalten daher analytische Methoden wie die Selected-ion flow-tube Massenspektrometrie (SIFT-MS) (20), Protonen-Transfer-Massenspektrometrie (PTR-MS) oder Secondary electrospray ionization Massenspektrometrie (SESI-MS) (21,22), bei denen eine Analyse patientennah, ohne Präkonzentrationsschritte und in Echtzeit durchgeführt werden kann.

## **2. Fragestellung**

Die vorliegende Promotionsschrift fokussiert sich auf die Analyse exhalierter volatiler organischer Substanzen von Patienten mit respiratorischen Erkrankungen. Folgende Fragestellungen waren dabei von besonderem Interesse:

### **1. Klinisches Atemgas-Screening:**

- a) Eignet sich die Atemgasanalyse mittels Protonen-Transfer-Reaktions-Time-of-Flight Massenspektrometrie (PTR-ToF-MS) zur schnellen Durchführung eines Screenings an vielen Probanden, die ein potentiell Infektionsrisiko bergen?
- b) Können Konzentrationsveränderungen im VOC-Profil von Probanden mit respiratorischen Pathogenen im Vergleich zu Probanden ohne positiven Nachweis beobachtet werden?

### **2. Monoinfektionen:**

- a) Gibt es im Fall von singularär nachgewiesenen respiratorischen Pathogenen signifikante Veränderungen im VOC-Profil von Infizierten gegenüber der nicht infizierten („gesunden“) Kontrollgruppe?
- b) Unterscheiden sich die VOC-Profile monoinfizierter symptomatischer und nicht symptomatischer Probanden untereinander bzw. von der Kontrollgruppe?

### **3. Koinfektionen:**

- a) Wie verändern sich die VOC-Profile, wenn mehrere Pathogene detektiert werden?
- b) Gibt es Unterschiede der exhalieren VOCs zwischen bakterio-bakterieller und bakteriell-viraler Koinfektion?

### 3. Methoden

#### 3.1 Studienteilnehmer

Nach Bewilligung durch die Ethikkommission (Nr. A 2020 0085, Bewilligungsdatum 17.04.2020), begann im Oktober 2020 die Probenerhebung im Corona-Testzentrum der Universitätsmedizin Rostock (UMR). Nach Aufklärung über Inhalt und Ablauf des Versuchs unterzeichneten insgesamt 708 Probanden ihre Zustimmung zur Teilnahme an der Studie und zur Verwendung der erhobenen Daten durch die UMR. Die Durchführung der prospektiven Studie entsprach den aktualisierten Richtlinien der Helsinkier Deklaration. Die Messungen erfolgten parallel zum laufenden Betrieb in einem separierten Bereich im Warteraum des Testzentrums zu regulären Zeiten zwischen Oktober 2020 und Januar 2021. 36 Probanden mit einer Coronavirus SARS-CoV-2-Infektion wurden in einem separaten Studienzweig untersucht und waren daher nicht Teil dieser Studie (23).

Die Probanden stellten sich zur PCR-COVID-Diagnostik im Testzentrum der UMR vor. Hier erfolgte auch die Rekrutierung, Aufklärung und unmittelbare Probenabnahme. Zur Zeit der Probenerhebung bestand eine relativ niedrige Inzidenz viruspositiver Patienten. Neben der symptomatischen Abklärung wurde ebenfalls ein Screening für Beruf oder Reisen als Grund der Vorstellung angegeben. Es wurde keine Präselektion durchgeführt, sondern nur ein vollendetes 14. Lebensjahr vorausgesetzt.

Ergänzend wurde das Vorhandensein von subjektiven allgemeinen Erkältungssymptomen abgefragt, also Fieber, Schüttelfrost, Husten, Schnupfen, Kopf- und Gliederschmerz.

Von den 708 freiwilligen Studienteilnehmern wurden 479 Probanden in diese Studie eingeschlossen. Diese Anzahl setzt sich zusammen aus der „gesunden“ Kontrollgruppe (gK, n=256) ohne Infektionsnachweis oder Symptome sowie den Monoinfektionsgruppen von *H.i.* (n=97), *S.p.* (n=40) und Rhinovirus (n=34) und den drei Koinfektionskohorten *H.i.+S.p.* (n=24), *H.i.+Rhinovirus* (n=16) und *S.p.+Rhinovirus* (n=12). Im Folgenden wird die Bezeichnung „gesund“ für das Fehlen eines Pathogennachweises sowie subjektiv empfundener respiratorischer und allgemeiner Krankheitssymptome verwendet.

Außerdem konnten positive Pathogennachweise für SARS-CoV-2 (n=36), das humane Enterovirus (n=3), Adenovirus (n=2) und Coronavirus NL63 (n=2) gesichert werden. Ein eigener Studienzweig analysierte die VOC-Profilen in SARS-CoV-2 positiven Probanden (23), hierzu wurde auch das Testergebnis der COVID-Diagnostik erfasst. Es sei aus Gründen der

Transparenz ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die gesunde Kontrollgruppe für beide Studienzweige verwendet wurde.

Die bakteriell positiv getesteten Probanden konnten in einen jeweils symptomatischen und einen asymptomatischen Anteil weiter subgruppiert werden. Abgefragt wurde dabei das Vorhandensein von grippeähnlichen Allgemeinsymptomen wie Kopf- und Gliederschmerz, Husten, Schnupfen, Heiserkeit und Fieber. In der *H.i.* positiven Gruppe betraf das 42 Probanden (43%), in der *S.p.* positiven Gruppe 15 Probanden (38%).

Außerdem konnten koinfizierte Kohorten gebildet werden. 24 Probanden wurden ausschließlich positiv auf *H.i.* und *S.p.* getestet, 16 ausschließlich positiv auf *H.i.* und Rhinovirus und 12 ausschließlich positiv auf *S.p.* und Rhinovirus.

Die alters- und geschlechtsspezifische Demografie ist in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Demografische Daten der Studienteilnehmer**

	Alle	Männer	Frauen
Anzahl Probanden (%)	479	249 (52.0)	230 (48.0)
Alter [a] (Durchschnitt ± SD)	39.1 ± 14.2	40.3 ± 13.8	37.9 ± 14.6
Anzahl resp. Path. positiv getesteter Probanden (%)	223	115 (51.6)	108 (48.4)
Alter resp. Path. pos. getesteter Probanden [a] (Durchschnitt ± SD)	37.3 ± 12.4	38.3± 12.0	36.1 ± 12.8
Anzahl gesunder Probanden (%)	256	134 (52.3)	122 (47.7)
Alter gesunder Probanden [a] (Durchschnitt± SD)	40.7 ± 15.5	41.9± 15.0	39.5 ± 15.9

### 3.2 Versuchsaufbau

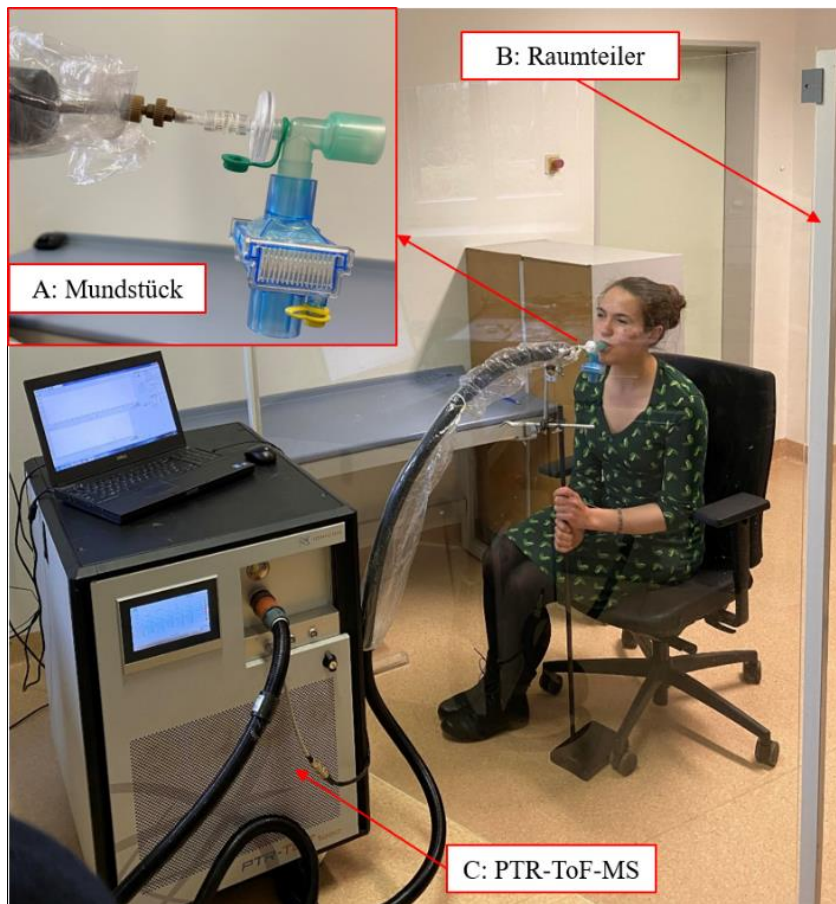
Die Probanden setzten sich zur Akklimationisierung und zur Normalisierung des Atemzyklus für eine Minute in bequemer Körperhaltung auf einen Stuhl. Die medizinische Mundbedeckung durfte erst nach Betreten des Testbereiches abgenommen und das Mundstück zwischen die Lippen gesetzt werden. Die Probanden wurden angewiesen, ausschließlich durch den Mund ein- und auszuatmen. Durch die Vorgabe der Atemfrequenz wurde ein vergleichbares Atemmuster erzeugt. Um eine nasale Atmung zu vermeiden stand eine Nasenklemme zur Verfügung, alternativ konnten die Nasenflügel manuell zusammengedrückt werden.

Zum Zeitpunkt der Messung geltende erweiterte Hygienevorschriften wurden zu jeder Zeit eingehalten. Es entstand kein zusätzliches Infektionsrisiko für Teilnehmende oder Durchführende der Studie (23).

Zum Schutz des Untersuchers und des Equipments wurde eine Trennwand aus Plexiglas angefertigt. Der zum PTR-ToF-MS führende Probenschlauch wurde von einem Schutzbezug (Tube sleeve, OMNIA<sup>®</sup>, Fidenza, Italien) bedeckt zum Probanden geführt. Der Bezug wie auch das Mundstück wurden nach dem Einmalgebrauch verworfen und ersetzt. Ein handelsüblicher Hocheffizienz- Luftpartikelfilter (High Efficiency Particulate Air-Filter, HEPA, Ultipor BB25G Hydrophobic filter, CE 0088, PALL<sup>®</sup>, Pall Medical, NY, USA) zur Vermeidung von Kontamination der Raumluft sowie ein Spritzenfilter (Sartorius PTFE 0.2 µm, 16596-HYK, Non-pyrogenic CE 1639, Minisart<sup>®</sup>, Göttingen) zum Schutz des Messinstruments bildeten das Mundstück als Verbindung zum PTR-ToF MS (Abbildung 1).

Nach jeder Messung wurde der Raum gelüftet, das Einmalmaterial gewechselt sowie die Kontaktflächen desinfiziert.

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 1 abgebildet.



**Abbildung 1: Versuchsaufbau für die kontinuierliche Messung volatiler organischer Komponenten in der Atemluft in Echtzeit mittels PTR-ToF-MS unter erhöhten hygienischen Anforderungen. (A) Mundstück kombiniert mit HEPA-Filter zur Vermeidung von Kontamination der Raumluft und Spritzenfilter zur Vermeidung der Kontamination des Messinstrumentes, (B) Trennwand aus Plexiglas (C) PTR-ToF-MS.**

Um den Infektionsstatus der Probanden zu ermitteln, wurde aus dem Abstrich im Testzentrum simultan eine SARS-CoV-2-PCR sowie eine Multiplex-RT-qPCR für respiratorische Pathogene durchgeführt. Es handelte sich dabei um ein standardisiertes Panel (Allplex™, Resp. Panel 1A,2,3,4 – Seegene), in dem die häufigsten Atemwegserreger getestet wurden. In Tabelle 2 sind sie schematisch dargestellt.

**Tabelle 2: Multiplex-PCR Erregernachweise**

RT-qPCR-Test (Multiplex) für respiratorische Pathogene, Allplex™	
Bakterielle Pathogene	Virale Pathogene
<i>Bordetella parapertussis</i>	Adenovirus
<i>Bordella pertussis</i>	Coronavirus NL63
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Coronavirus 229E
<i>Haemophilus influenzae</i>	Humanes Bocavirus 1-4
<i>Legionella pneumophila</i>	Humanes Enterovirus
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Humanes Metapneumovirus
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<b>Humanes Rhinovirus</b>
	Influenza A
	Influenza A pdm 09
	Influenza A H1
	Influenza A H3
	Influenza B
	Parainfluenza 1
	Parainfluenza 2
	Parainfluenza 3
	Parainfluenza 4
	Respiratorisches Synzytialvirus A
	Respiratorisches Synzytialvirus B

Aus den 479 für diesen Studienzeitraum ausgewerteten Probanden ergaben sich positiv getestete Gruppen für *Haemophilus influenzae* (n=97), *Streptococcus pneumoniae* (n=49) und Rhinovirus (n=34). Die relative Häufigkeit passt sowohl zu regionaler als auch saisonaler Inzidenz. Ihnen gegenüber wurde eine nicht infizierte Kontrollgruppe als ohne subjektiv empfundene Symptome oder nachgewiesenes Pathogen in der Multiplex-PCR definiert. Sie umfasste 256 Probanden. Innerhalb der größeren mit Bakterien infizierten Gruppen wurden jeweils Subgruppen nach dem Vorhandensein von Symptomen definiert. Zuletzt wurden drei Koinfektions-Kohorten gebildet, die jeweils ausschließlich *H.i.+S.p* (n=24), *H.i.+Rhinovirus* (n=16) und *S.p.+Rhinovirus* (n=12) koinfizierte Probanden umfasste.

In insgesamt 13 Vergleichen (Queries) wurde nach signifikanten Unterschieden im Atemgasprofil bei unterschiedlichen infektiologischen Zuständen gesucht.

Zunächst wurden in Q1-Q3 die Monoinfektionsgruppen der gesunden Kontrolle (gK) gegenübergestellt:

Q1= *H.i.* vs. gK

Q2= *S.p.* vs. gK

Q3= Rhinovirus vs. gK

In Q4-Q6 wurden die Monoinfektionsgruppen miteinander verglichen.

Q4= *H.i.* vs. Rhinovirus

Q5= *S.p.* vs. Rhinovirus

Q6= *H.i.* vs. *S.p.*

Q7-Q10 vergleicht jeweils die Subgruppen von asymptomatisch positiv getesteten *H.i.* und *S.p.* (Q7 und Q8) und symptomatisch positiv getesteten (Q9 und Q10) ebenfalls mit der gK.

Q7= *H.i.* asymp. vs. gK

Q8= *S.p.* asymp. vs. gK

Q9= *H.i.* symp. vs. gK

Q10= *S.p.* symp. vs. gK

In einem letzten Block wurden die drei Koinfektionsgruppen der gK gegenübergestellt (Q11-Q13).

Q11= (*H.i.*+*S.p.*) vs. gK

Q12= (*H.i.*+Rhinovirus) vs. gK

Q13= (*S.p.*+Rhinovirus) vs. gK

Die Gruppen sowie die zwischen den Gruppen durchgeführten Vergleiche sind in der Tabelle 4 dargestellt.

### 3.3 VOC-Probennahme und -verarbeitung

#### 3.3.1 Versuchsaufbau

Die Probanden trugen gemäß den geltenden Bestimmungen eine medizinische Mundbedeckung und verblieben zur Akklimatisierung in sitzender Position. Die Atemgasproben wurden in sitzender Position gesammelt (24). Nach Absetzen des Mundschutzes wurden die Probanden aufgefordert, über einen Zeitraum von drei Minuten gleichmäßig und ruhig ( $f=10-14/\text{min}$ ) durch das sterile T-Stück (Intersurgical GmbH, Sankt Augustin) zu atmen. Die Probennahme-Transferline der PTR-ToF-MS war mit dem T-Stück im Seitenstrom-Modus verbunden, sodass hinter dem Spritzenfilter sowohl Inspirations- als auch Expirationsphasen kontinuierlich und in Echtzeit gemessen werden konnten. Der HEPA-Filter stellte dabei einen geringfügigen, zu vernachlässigenden Atemwiderstand dar (18).

#### 3.3.2 PTR-ToF-MS basierte Messungen von VOCs in der Atemluft

Die kontinuierlichen Messungen der in der Atemluft der Probanden enthaltenen VOCs wurden mit einer PTR-ToF-MS 1000 (Ionicon Analytik GmbH, Innsbruck, Österreich) unter optimierten Bedingungen durchgeführt (14,25).

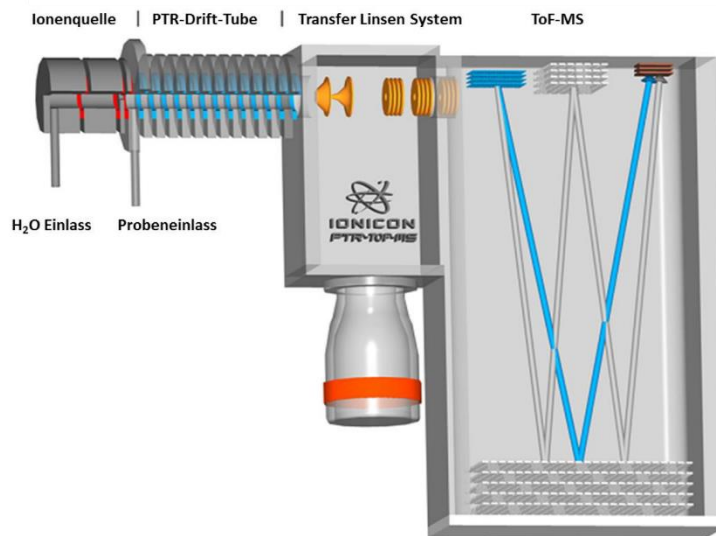
In Abbildung 2 ist die Methode schematisch dargestellt.

Das Prinzip dieser Analyseverfahren beruht auf dem Transfer eines Protons auf die in der Atemgasprobe enthaltenen VOCs in einem definierten elektromagnetischen Feld. Die Hydronium-Ionen entstehen in einer Plasmaquelle im ersten Kompartiment des Messgerätes und werden über ein Linsensystem in die Reaktionskammer (Drifttube) überführt, in der die Reaktion mit den VOCs stattfindet. Diese Protonierung wird auch als „weiche Ionisation“ bezeichnet. So können VOCs, deren Protonenaffinität größer der von Wasser ist, im Konzentrationsbereich pptV bis ppbV erfasst werden. Die ionisierten Moleküle werden durch einen positiven Impuls beschleunigt und die Dauer der Flugzeit (Time of Flight) bis zur Detektion gemessen. Aus diesen Parametern kann das Masse-zu Ladungs-Verhältnis bestimmt werden, das eine tentative Zuordnung der VOCs ermöglicht. Diese Technik erlaubt die Erfassung kompletter VOC-Profile im sub-Sekundenbereich und ermöglicht so kontinuierliche Echtzeitmessungen.

Im Seitenstrom-Modus wurde die sechs Meter lange Transfer-Line (Silikon-Stahl) des Messinstruments über ein Mundstück (kombiniert mit HEPA- und Spritzenfilter) mit dem Probanden verbunden (s. Abbildung 1). Die Messungen wurden mit einem kontinuierlichen

Fluss von 100 ml/min durch die Line durchgeführt. Die Temperatur der Transfer-Line wurde auf 75°C gehalten, die Spannung der PTR-Drift Tube betrug 610 V unter einem Druck von 2,3 mBar. Dadurch ergab sich ein E/N-Verhältnis von 139 Townsend.

Nach jeder Minute wurde ein neuer Datensatz aufgenommen. Die Massenskala wurde nach jedem Durchlauf (60s) neu kalibriert, als Referenzen zur Kalibrierung wurden dabei die Massen vom  $\text{H}_3\text{O}^+$  Isotop (21.022),  $\text{NO}^+$  (29.998) sowie protoniertem  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$  (59.049) genutzt.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung einer PTR-ToF-MS, Quelle: [www.ionicon.com](http://www.ionicon.com)**

### 3.3.3 Datenverarbeitung

Die Intensitäten der VOCs wurden in Ausschlägen pro Sekunde (engl.: counts per second, cps) gemessen, korrespondierende Substanzintensitäten wurden auf die Intensität des Primärions ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) normalisiert. Die Rohdaten wurden durch die Software der PTR-MS verarbeitet (DAQ v, Ionicon, Innsbruck, Österreich, Version 3.228). Um aus dem kontinuierlich gemessenen Zeitverlauf die Atemphasen zu identifizieren, wurde ein auf Matlab (MathWorks, Natick, USA, 7.12.0.635, R2011a) basierender „Breath Tracker“-Algorithmus genutzt (25). Dieser Algorithmus ermöglichte anhand der über mehrere Atemzüge gemessenen Intensität von Aceton als Substanz endogener Herkunft die Trennung der Atemphasen in Inspiration (kein Aceton nachweisbar) und Expiration (schnell in der Konzentration ansteigendes Aceton, Plateau in der Endexpiration).

Zudem wurde in Intervallen von 15 min die Raumluft separat gemessen. War die Substanzkonzentration höher als die Raumluftkonzentration plus drei Standardabweichungen wurde sie als endogen betrachtet.

#### *3.3.4 Quantifizierung*

Für die über das PTR-ToF-MS nachgewiesenen m/q-Verhältnisse werden im Folgenden die ermittelten tentativen Substanznamen (Komponentennamen) verwendet. Vorangehende Versuche u.a. mit Gaschromatografie-Massenspektrometrie (GC-MS) bestätigten diese Zuordnung (26). Es konnten Substanzen nachgewiesen werden, die typischerweise exogen vorkommen (u.a. Formaldehyd, Benzol, Toluol, Acetonitril, Furan, Monoterpene) bzw. endogenen Ursprungs sind (u.a. Hemiterpene, Ketone, kurzkettige Fettsäuren, Aldehyde, Alkohole und organische Schwefelverbindungen). Da die Reaktionsbedingungen im kontrollierten Feld der Drifttube als konstant angesehen werden, können die Konzentrationen der VOCs entweder über Reaktionsraten (*k*-Raten) kalkuliert (27) oder alternativ anhand von Referenzsubstanzen kalibriert werden. Die Quantifizierung studienrelevanter Substanzen erfolgte anhand standardisierter VOC-Mischungen mittels adaptierter Probenfeuchtigkeit mit einer Liquid Calibration Unit (LCU, Ionicon Analytik GmbH, Innsbruck, Österreich) (28). Anhand von Referenzsubstanzen kalibrierte Substanzen waren Formaldehyd, Acetaldehyd, Crotonaldehyd, Acrolein, Butanal, Pentanal, Hexanal, Methanol, Ethanol, Isopropanol, Aceton, Isopren, Dimethylsulfid, Butanon, Benzene, Toluol, Xylen, und Limonen.

#### *3.3.5 Auswahl der VOCs zur Analyse*

Substanzen potentiell exogener Herkunft (volatile Bestandteile der Umgebungsluft, volatile Emissionen der Virenfilter) (18), wurden von der weiteren Betrachtung ausgeschlossen, ebenso VOCs, deren gemessene Konzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. So wurden 44 Substanzen in der Atemluft der Probanden zur weiteren Auswertung identifiziert.

Neben einem Nachweis der Substanzen (LOD, Level of Detection, Nachweisgrenze als Mittelwert der jeweiligen Substanzkonzentration plus drei Standardabweichungen) musste zur Konzentrationsbestimmung auch die Bestimmungsgrenze (LOQ, Level of Quantification) erreicht werden. Die LOD und LOQ Werte für ausgewählte VOCs sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3: LOD und LOQ ausgewählter VOCs in parts per billion by volume (ppbV)**

	Aceton	Essigsäure	DMS	Pentanal	Limonen
LOD (ppbV)	0,02	2,36	3,51	9,54	1,99
LOQ (ppbV)	0,71	3,05	12,95	22,79	8,34

### 3.3.6 Statistische Analyse

Um zu ermitteln, ob sich die gemessenen Konzentrationen einzelner VOCs signifikant unterscheiden, wurde ein Kruskal-Wallis-ANOVA-on Ranks-Test für unabhängige Stichproben (paarweise multiple Vergleiche, p-Wert  $\leq 0,05$ ) mit Sigma Plot durchgeführt (Systat Software GmbH, Erkrath Deutschland, Version 14).

Die Vergleiche wurden dabei in folgenden Blöcken gestellt:

#### *Q1 – Q3 (Monoinfektionen gegenüber der gK)*

Vergleiche von der Pathogen- positiven Gruppen, also *H.i.* (n=97), *S. p.* (n=40) und Rhinovirus (n=34) mit der gK (n=256).

Q1= *H.i.* vs. gK

Q2= *S.p.* vs. gK

Q3= Rhinovirus vs. gK

#### *Q4 – Q6 (Monoinfektionen untereinander)*

Gegenüberstellung der Monoinfektionskohorten *H.i.* (n=97), *S. p.* (n=40) und Rhinovirus (n=34) untereinander.

Q4= *H.i.* vs. Rhinovirus

Q5= *S.p.* vs. Rhinovirus

Q6= *H.i.* vs. *S.p.*

#### *Q7 – Q8 (Asymptomatische Monoinfektionen):*

Vergleiche der asymptomatisch positiven Subgruppen von *H.i.* (n=55), *S. p.* (n=25) mit der gK (n=256)

Q7= *H.i.* asymp. vs. gK

Q8= *S.p.* asymp. vs. gK

*Q9 – Q10 (Symptomatische Monoinfektionen):*

Vergleiche der symptomatisch positiven Subgruppen von *H.i.* (n=42) und *S.p.* (n=15) mit der gK (n=256)

Q9= *H.i.* symp. vs. gK

Q10= *S.p.* symp. vs. gK

*Q11 – Q13 (Koinfektionen):*

Koinfektionen (bakterio-bakteriell und bakterio-viral) mit *H.i.* + *S.p.* (n=24), *H.i.* + Rhinovirus (n=16), *S.p.* + Rhinovirus (n=12) im Vergleich mit der gK (n=256).

Q11= (*H.i.* + *S.p.*) vs. gK

Q12= (*H.i.* + Rhinovirus) vs. gK

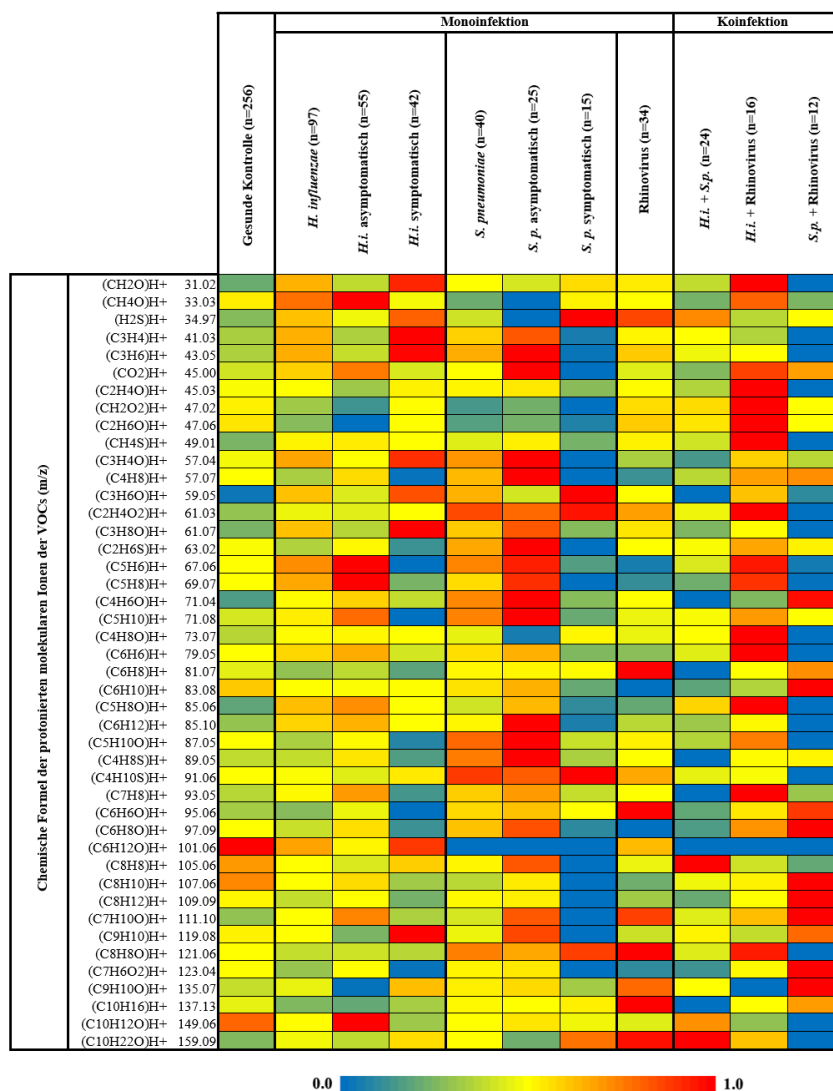
Q13= (*S.p.* + Rhinovirus) vs. gK

Zur schnellen Visualisierung und zur Überprüfung der durchgeführten Statistik wurde parallel ein mit R programmierter Algorithmus angewandt (29).

## 4. Ergebnisse

Aus 479 eingeschlossenen Probanden konnten Subgruppen für Monoinfektionen mit *H.i.* (n=97), *S.p.* (n=40) und Rhinovirus (n=34) sowie eine nicht infizierte Kontrollgruppe (n=256) gefunden werden, wobei „nicht infiziert“ durch einen fehlenden Pathogennachweis in der respiratorischen Multiplex-PCR sowie das Fehlen von subjektiven Krankheitssymptomen definiert wurde.

Abbildung 3 zeigt relative Unterschiede zwischen den Mittelwerten der VOC-Konzentrationen in den Untergruppen in Form einer Heatmap. Die Konzentrationsunterschiede sind dabei auf einer Skala von niedrig (blau) bis hoch (rot) farblich kodiert, nicht-quantitativ und normiert auf das Konzentrationsmaximum der jeweiligen Substanz. Die Gruppen umfassen die gesunde Kontrollgruppe, *H.i.* Monoinfektion sowie ihre asymptomatische und symptomatische Subgruppe, *S.p.* Monoinfektion mit asymptomatischer und symptomatischer Subgruppe, Rhinovirus Monoinfektion und die Koinfizierten-Gruppen, *H.i.+S.p.* Koinfektionen, *H.i.+Rhinovirus* Koinfektionen und *S.p.+Rhinovirus* Koinfektionen.



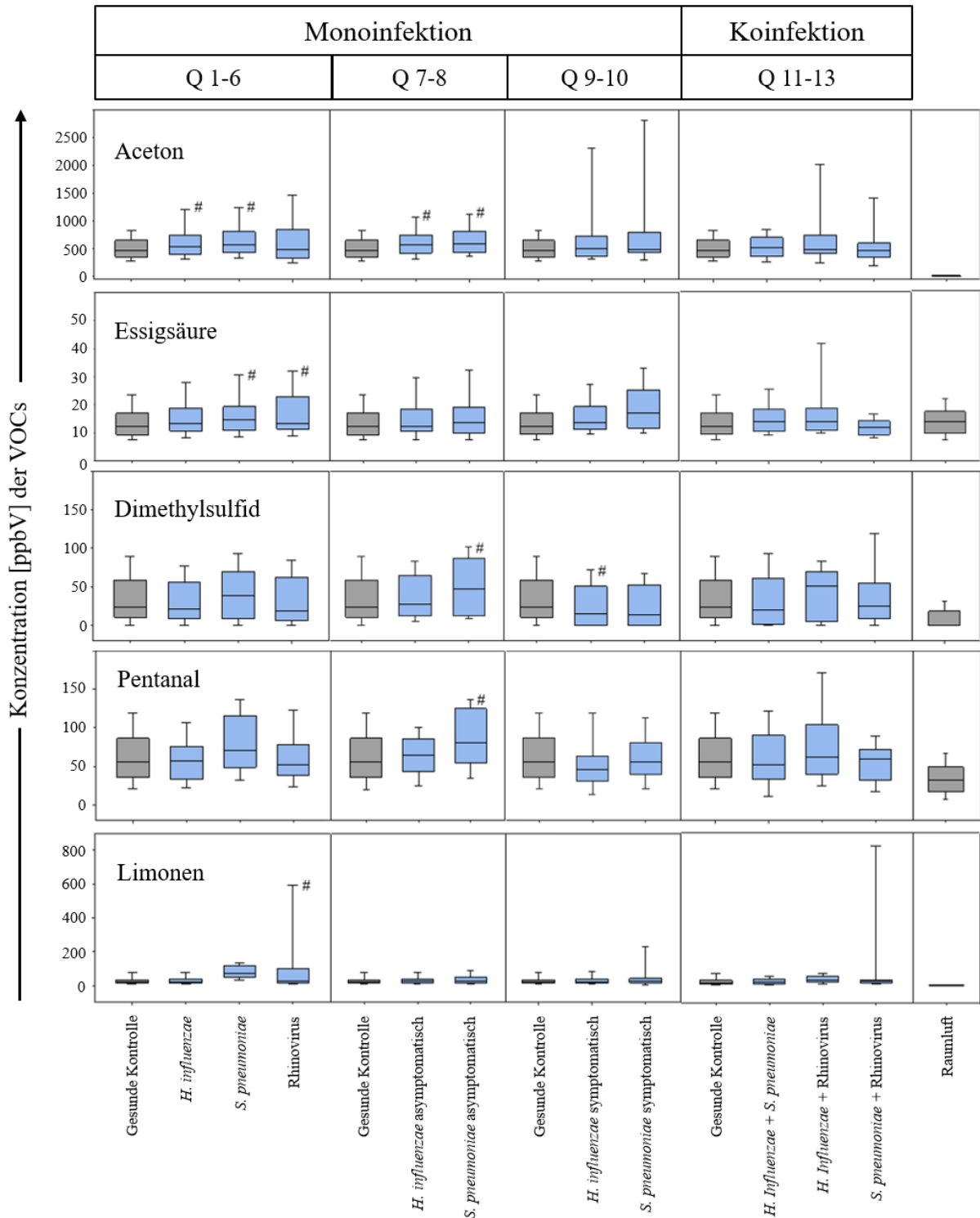
**Abbildung 3: Heatmap zur Veranschaulichung relativer Unterschiede der Konzentrationen exhalierter VOC-Profile bei nicht infizierten Probanden und in infizierten Gruppen.** Auf einer Skala zwischen 0 und 1 zeigt blau relativ niedrigere und rot relativ höhere Konzentrationen der betrachteten VOCs an. Farbkodiert ist dabei der Mittelwert der in der Spalte betrachteten Gruppe/ Subgruppe normiert auf das Konzentrationsmaximum der jeweiligen Substanz. Die x-Achse zeigt dabei die unterschiedlichen Gruppen an, auf der y-Achse sind die tentativen Summenformeln der protonierten VOCs aufgelistet.

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der statistischen Vergleiche zwischen den VOC-Konzentrationen der Studiengruppen (Q1-Q13). Fünf VOCs (Aceton, Essigsäure, Dimethylsulfid, Pentanal und Limonen) zeigten signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) im paarweisen Vergleich. Signifikante Unterschiede sind fett gedruckt hervorgehoben.

**Tabelle 4: Statistische Vergleiche der VOC-Konzentrationen zwischen den Studiengruppen**

Kurzbezeichnung Abfrage	Monoinfektionen										Koinfektionen		
	Alle						Asymptom.		Symptom.		Alle		
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12	Q13
Anzahl der Probanden (n)	97 vs. 256	40 vs. 256	34 vs. 256	97 vs. 34	40 vs. 34	97 vs. 40	55 vs. 256	25 vs. 256	42 vs. 256	15 vs. 256	24 vs. 256	16 vs. 256	12 vs. 256
Kruskal-Wallis-Test ANOVA on Ranks (paarweise multiple Vergleiche) p Wert $\leq 0.05$	H. influenzae vs. gK	S. pneumoniae vs. gK	Rhinovirus vs. gK	H. influenzae vs. Rhinovirus	S. pneumoniae vs. Rhinovirus	H. influenzae vs. S. pneumoniae	H. influenzae asymptomatic vs. gK	S. pneumoniae asymptomatic vs. gK	H. influenzae symptomatic vs. gK	S. pneumoniae symptomatic vs. gK	H. influenzae + S. pneumoniae vs. gK	H. influenzae + Rhinovirus vs. gK	S. pneumoniae + Rhinovirus vs. gK
Aceton	<b>0.009</b>	<b>0.013</b>	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	<b>0.016</b>	<b>0.027</b>	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Essigsäure	> 0.05	<b>0.040</b>	<b>0.029</b>	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Dimethylsulfid	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	<b>0.016</b>	<b>0.028</b>	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Pentanal	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	<b>0.002</b>	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Limonen	> 0.05	> 0.05	<b>0.016</b>	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Die fünf signifikant unterschiedlichen VOCs sind in Abbildung 4 in Form von Box Plots dargestellt, hier sind statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) gegenüber der nicht infizierten Kontrollgruppe mit „#“ markiert.



**Abbildung 4: Darstellung der VOC-Konzentrationen innerhalb der Studiengruppen und –subgruppen in Form von Boxplots.** Die x-Achse benennt die jeweilige Studiengruppe, die y-Achse zeigt die absolut gemessenen Konzentrationen der VOCs in parts per billion by Volume (ppbV). Es wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) zur gesunden Kontrollgruppe sind mit „#“ markiert. Die Raumlufkonzentrationen wurden nicht verglichen, sie dienen der Veranschaulichung.

*Q1-Q3: Monoinfektionen vs. gK*

Beim Vergleich der Monoinfektions- Kohorten mit der gK fielen Acetonkonzentrationen in der pathogenbesiedelten Gruppe in Q1 (*H.i.* vs. gK) signifikant erhöht auf. Der Vergleich Q2 (*S.p.* vs. gK) ergab erhöhte Konzentrationen von Aceton und Essigsäure in der positiv getesteten Gruppe. Q3 (Rh vs. gK) zeigte eine Erhöhung der Essigsäurekonzentrationen bei positivem Virusnachweis.

*Q4-Q6: Monoinfektionen untereinander*

Im Vergleich der Pathogen-positiven Gruppen untereinander konnten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede der betrachteten VOCs ermittelt werden.

*Q7 und Q8: Asymptomatische Gruppen vs. gK*

Die bakteriell infizierten Kohorten wurden nach dem Vorhandensein von Symptomen weiter unterteilt. In Q7 wurde die asymptomatische aber *H.i.* positiv getestete Kohorte der gK gegenübergestellt, es zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration von Aceton in der Pathogen positiven Gruppe. In Q8, asymptomatische *S.p.* Infektion vs. gK, konnte neben der signifikanten Erhöhung der Acetonkonzentration, auch höhere Konzentrationen von Dimethylsulfid (DMS) und Pentanal beobachtet werden.

*Q9 und Q10: Symptomatische Gruppen vs. gK*

Q9, symptomatische *H.i.* positive vs. gK, zeigte eine signifikante Reduktion des exhalierten DMS in der erkrankten Gruppe. Für Q10, in der die symptomatischen *S.p.* positiven der gK gegenübergestellt wurden, konnte keine Signifikanz ermittelt werden.

*Q11-Q13: Koinfektionen vs. gK*

Im Block Q11-Q13 wurden die koinfizierten Kohorten (*H.i.+S.p.*, *H.i.+Rh*, *S.p.+Rh*) der gK gegenübergestellt, hierbei ergaben sich keine signifikanten Abweichungen der Konzentration der betrachteten VOCs.

### *Korrelationen*

Ergänzend wurde eine Korrelationsanalyse zwischen den Konzentrationsveränderungen der VOCs mit signifikanten Konzentrationsunterschieden durchgeführt. Eine dimensionslose Faktorenanalyse (Hauptkomponentenmethode zur Faktorenextraktion, Faktorbewertung über die Regressionsmethode) in jeder Probandengruppe zur Berechnung der Korrelation zwischen den signifikanten endogenen VOCs. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse im Anhang tabellarisch dargestellt. Statistisch signifikante (p-Wert  $\leq 0,05$ ) Regressionen ( $R \geq 0,5$ ) sind dabei fett gedruckt.

## 5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung exhalierter VOC-Profile bei Infektionen mit respiratorischen Pathogenen in einem Screening-Szenario.

Mittels PTR-ToF-MS konnte unter realistischen klinischen Screening-Bedingungen eine schnelle Beprobung und eine Echtzeitmessung vieler Probanden unter Wahrung erhöhter Hygienestandards durchgeführt werden. Zwischen *H.i.*-, *S.p.*- und Rinovirus- infizierten und nicht infizierten Gruppen wurden Konzentrationsveränderungen im VOC-Profil der Expirationsluft der Probanden gefunden. Die in signifikant unterschiedlichen Konzentrationen auftretenden Substanzen umfassen ein endogenes Keton (Aceton), eine organische Schwefelverbindung (DMS), eine Carbonsäure (Essigsäure), ein gesättigtes Aldehyd (Pentanal) und ein monozyklisches Terpen (Limonen). Diese Substanzen kommen in verschiedenen Stoffwechselwegen und Kompartimenten des menschlichen Körpers vor, darunter dem Energiemetabolismus, im Darm- und Lungenmikrobiom, der Lipid-Peroxidation und der zellulären antioxidativen Abwehr. Trotz der nachgewiesenen Unterschiede in den exhalieren VOC-Profilen lässt sich kein spezifischer Atemgasmarker für bestimmte bakterielle oder virale Pathogene identifizieren.

Im Fall von singular nachgewiesenen respiratorischen Pathogenen (Monoinfektionsgruppen) konnten bei bakteriellem und viralem Infektionsstatus signifikante Konzentrationserhöhungen von Substanzen aus allen genannten Stoffwechselwegen und Kompartimenten beobachtet werden. Diese Veränderungen fanden sich größtenteils auch in der bakteriell monoinfizierten asymptomatischen Gruppe wieder, während sie im Vergleich der Gruppen mit positivem Pathogennachweis untereinander ausbleiben. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der dominierende Einfluss der Immunantwort des Wirtsorganismus auf VOC-Profil sein.

Auch das Fehlen signifikanter Veränderungen bei bakterio-bakterieller und bakteriell-viraler Koinfektion stützt diese Theorie, in der sich viele unterschiedliche Stoffwechselwege von eindringendem Pathogen und abwehrendem Organismus überlagern.

### 5.1 Klinisches Atemgas-Screening mittels PTR-ToF-MS und Studiendesign

Der große Vorteil der VOC-Analyse mittels PTR-ToF-MS ist die schnelle Echtzeitanalyse und die Möglichkeit der „bettseitigen“ oder „Point-of-Care“ Beprobung. Das mobile Instrument ließ sich gut im Testzentrum installieren, auch schnell aufeinander folgende Messungen vieler Probanden konnten problemlos durchgeführt werden, ohne den Ablauf des Screening-Zentrums

zu behindern oder eine Gefahr für die hygienischen Standards darzustellen (23). Eine große Anzahl an VOC-Profilen konnte aufgenommen und ausgewertet werden. Der Abgleich mit der etablierten PCR-Diagnostik ergab eine belastbare Aussage über den Infektionsstatus der Probanden.

Durch die große Präsenz der COVID-19-Pandemie in den Medien, die teilweise strengen Hygienemaßnahmen und -regeln sowie die Veränderungen im Sozialverhalten der Menschen gingen auch andere durch Tröpfcheninfektion verbreitete Erkrankungen zurück (30). Eine Hypothese wäre, dass unter schweren Verläufen so auch mehr durch Monoinfektionen ausgelöste Erkrankungen anzunehmen wären. Die durch das Pathogen und starke Wirtsabwehr ausgelösten Veränderungen im VOC-Profil könnten so klarer einzelnen Erregern oder Prozessen im Wirtsstoffwechsel zugeordnet werden.

Je nach Voranschreiten einer Infektion und Symptomlast, die eine medikamentöse (Eigen-) Therapie motivieren, können auch eingenommene Medikamente und Maßnahmen sowohl die empfundene Symptomschwere (ASS, Ibuprofen) als auch die Abwehrreaktion des Körpers und die Blut-Luft-Barriere (Hustenlöser wie Acetylcystein, Virustatika, Antibiotika, Inhalationstherapie) beeinflussen.

Um den Rahmen eines realistischen Screenings zu bewahren, mussten die Probanden ohne Präselektion anhand von Eigenschaften des Lebenswandels und des Gesundheitszustandes in die Studie aufgenommen werden. Wenngleich viele Faktoren Einfluss auf das individuelle Atemgasprofil haben können (25) muss eine Screening-Untersuchung über ihr Grundrauschen hinweg auftretende Veränderungen erfassen, diese Bedingung wurde in der vorliegenden Studie erfüllt. Die untersuchten Gruppengrößen gingen weit über die Probandenzahlen anderer Studien, die die gleichen Substanzen diskutieren, hinaus (31–33).

Der Vergleich von Atemgasprofilen bei Frauen in und außerhalb der Menstruation sowie unter Einnahme oraler Kontrazeptiva (34), die Beprobung von mono- und koinfizierten Schweinen (35) und die Analyse vom Gasraum über Zellkulturen (36,37) sind nur einige Beispiele, in denen sich wiederholt zeigte, dass die beobachteten Substanzen starken inter- und intraindividuellen Schwankungen unterliegen.

Trotz des kurzen Zeitfensters, in dem alle Proben untersucht wurden, kann eine gute Anwendbarkeit der Methode auch im Rahmen eines Screenings bestätigt werden. Die

Konzentrationsbereiche, in denen die betrachteten Substanzen gemessen werden konnten, entsprechen überwiegend denen anderer Studien (38–40).

In der durchgeführten prospektiven Observationsstudie konnte keine der detektierten Konzentrationsveränderungen einem einzelnen verursachenden Pathogen zugeordnet werden, daher wurde von der Benennung eines selektiven Markers oder Markersets Abstand gehalten. Die bereits veröffentlichten Ergebnisse anderer Forschungsgruppen, in denen bereits von konkreten Markern für einzelne Krankheiten und Zustände gesprochen wird (41–43), ist kritisch zu hinterfragen. Die Studiengruppen sind häufig sehr klein gewählt und sowohl Sensitivität als auch Spezifität der verwendeten Methoden niedrig (44). Die um ein Vielfaches höhere Probandenzahl in der vorliegenden Studie lässt somit eine verlässlichere Zuordnung der beobachteten Konzentrationsveränderungen zu, die im Folgenden näher betrachtet werden.

## **5.2 Monoinfektionen**

### **Effekte auf den Energiestoffwechsel des Wirtsorganismus - Aceton**

Volatile Ketone werden im humanen Energiestoffwechsel von Zellen und Organen im Katabolismus unter anaeroben Bedingungen produziert und in das Blut abgegeben. Aceton entsteht in großem Ausmaß in der Glyko- sowie Lipolyse (45,46). Es wird im Menschen also in Hungerzuständen und anderen Situationen frei, in denen Energie aus Speichern gewonnen werden muss, dazu gehört auch die Infektion mit folgender Immunreaktion.

Einige Substanzen wurden bereits als Biomarker für Erkrankungen diskutiert (41), allen voran auch Aceton (47). Konzentrationsveränderungen von Aceton unterliegen vielen metabolischen Einflussfaktoren und können nicht einer einzelnen Erkrankung zugeordnet werden (45). Vereinzelt werden Geräte kommerziell vertrieben, die über Gesundheitszustände oder Stoffwechsellage Auskunft geben sollen (38,48).

Auch Bakterien wie *H.i.* und *S.p.* nutzen vorrangig Kohlenhydrate zur Energiebereitstellung. Im Szenario einer bakteriellen Infektion wäre der Kolonisation bzw. Proliferation der pathogenen Zellen die größere Änderung im Energieaufwand zuzuschreiben, in dieser Phase wäre entsprechend auch mit einer ansteigenden Aceton-Produktion zu rechnen. Eine folgende Antwort des Immunsystems des Wirtes könnte wiederum einen späteren Anstieg des endogenen Acetons bedingen. Diese Überlegung passt zu der in der Studie beobachteten Erhöhung der exhalierten Acetonkonzentrationen bei den bakteriellen Monoinfektionen (Q1 und Q2) sowie

der mutmaßlich noch nicht symptomatischen frühen Infektionsphase, in der das Pathogen sich in der stärksten Proliferation befindet (Q7 und Q8).

Im Gegensatz dazu hat ein Virus keinen eigenen Metabolismus, es besteht aus einem Kapsid mit enthaltener DNS oder RNS, es nutzt die wirtseigenen Replikationsmechanismen zur Vermehrung (49) und induziert anabole Stoffwechselwege in der Wirtszelle, sodass es vermindert zur Glykolyse kommt (50). In einer viralen Monoinfektion wäre also mit vermehrter Glukoseaufnahme und Glukoneogenese und erst in der immunresponsiven Phase, also später, mit erhöhten Acetonkonzentrationen zu rechnen. Im Einklang mit diesen Überlegungen konnte keine signifikante Änderung der gemessenen Acetonkonzentrationen bei positivem Rhinovirusnachweis (Q3) gefunden werden.

Aceton entsteht in den verschiedensten Stoffwechselwegen und Organsystemen im Körper, sodass es als spezifischer Marker ausscheidet. Eine Korrelation zu erhöhtem Energieaufwand durch große Mengen von stoffwechselaktiven Zellen ist aber anzunehmen. Dafür spricht auch die signifikant erhöhte Konzentration des Metaboliten in beiden bakteriell monoinfizierten Gesamtgruppen sowie beiden monoinfizierten asymptomatischen Gruppen, in denen sich das Pathogen noch im akzelerierten Proliferationsprozess befinden kann.

Eine Verminderung der Acetonkonzentration in einer infizierten Kohorte konnte nicht nachgewiesen werden. Auch diese Beobachtung fügt sich in die oben beschriebenen Annahmen ein.

In vorangehenden Studien wurde Aceton mehrfach als spezifischer Marker für verschiedene Krankheiten und metabolische Zustände beschrieben (38,41). Dies kann durch die Ergebnisse dieser Studie nicht gestützt werden. Gegebenenfalls könnte die Substanz verwendet werden um Krankheitsverläufe oder Therapieerfolge zu monitoren.

### **Effekte auf systemischer Ebene: Mikrobiom, Immunmodulation und Inflammation – Essigsäure und Dimethylsulfid**

Auch Lungen- und Darmbiom sind Gegenstand der klinischen Forschung und unterliegen verschiedensten physiologischen und pathologischen Einflussfaktoren (51). Die Mikrobiome betreiben nicht nur eigenen Stoffwechsel, dessen Metabolite über den Blutstrom in die Expirationsluft gelangen. Sie spielen auch eine Rolle in der Immunantwort, tragen zur Permeabilität der Blut-Luft-Barriere und zum Milieu (pH-Wert, Proteingehalt) sowie zur

Schleimbildung in den Epithelien bei. So stellen sie nicht nur eine, sondern mehrere potentielle Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung der Expirationsluft dar.

Grundsätzlich haben viele Faktoren Einfluss auf das normale Mikrobiom in Lunge und Darm. Ernährungsweise, Immunstatus, vorangegangene Medikation (Antibiotika, Steroide usw.), sportliche Betätigung, Raucherstatus und Genetik sind nur einige davon. Gleichzeitig bieten beide aber auch Potential für die Interpretation von Konzentrationsveränderungen in der VOC-Analyse. Versuche an Zellkulturen mit Headspace-Messungen stellen dabei einen Ansatz zum besseren Verständnis von der Emission durch einzelne Zelltypen und monozelluläre Organismen dar (36,52–54). Sie zeigten wiederholt, dass selbst über einer einzelnen Kultur fast einhundert Substanzen in hoher Variabilität messbar waren (55).

Das Lungenbiom als physiologische Barriere des Körpers zwischen Luft und Blut stellt einen wichtigen Bestandteil des Immunsystems und ersten Kontaktpunkt mit respiratorischen Pathogenen dar. Interaktionen auf dieser Ebene können daher charakteristische Veränderungen im VOC-Profil hervorrufen.

Im unteren Verdauungstrakt entstehen durch bakterielle Zersetzung und Verarbeitung von Ballaststoffen und Stärke vermehrt kurzkettige Fettsäuren (KKFS) wie Essigsäure und organische Sulfide wie Dimethylsulfid (56–58). Diese beiden Substanzen unterschieden sich in ihren Konzentrationen auch zwischen den Gruppen.

Die Darmflora trägt unter anaeroben Bedingungen zur intestinalen Permeabilität, Nährstoffabsorption wie auch Immunregulation bei (59–61). Die Wechselwirkungen zwischen Darm- und pulmonalem Mikrobiom bzw. dort eintretenden Pathogenen bezeichnet man als die Darm-Lungen-Achse (62–64). In klinischen und präklinischen Modellen konnte gezeigt werden, dass von der Flora in Darm und Lunge Essigsäure produziert wird, die schädlich auf eindringende Pathogene wirkt (65–68).

In den bakteriellen und viralen Monoinfektionen wurden gegenüber der gesunden Kontrolle (Q1-3) signifikant erhöhte Essigsäurekonzentrationen in der Expirationsluft gemessen, die durch eine unspezifische Abwehrreaktion des Wirtsmikrobioms erklärt werden können.

Im Gegensatz zur Essigsäure konnten erhöhte exhalierte Dimethylsulfidkonzentrationen nur in den bakteriell monoinfizierten Gruppen gemessen werden. DMS wird als Metabolit des Darmmikrobioms betrachtet, das spezialisierte Bakterienkollektiv hat Anteil am Methionin-

Stoffwechsel und somit an der durch Makrophagen vermittelten Immunabwehr (69–71). Makrophagen wirken sowohl in der Abwehr gegenüber bakteriellen Infektionen mit als auch in der Immunantwort auf virale Infektionen, sie sind direkt an der Phagozytose von Pathogenen, Antigenpräsentation, und T-Zell-Aktivierung beteiligt.

Bei den bakteriellen Infektionen konnte gegenüber der gesunden Kontrolle nur in der asymptomatischen *S.p.* positiven Kohorte erhöhte DMS-Konzentrationen (Q8), in der symptomatischen *H.i.* positiven Gruppe dagegen signifikant reduzierte Konzentrationen gemessen werden (Q9). Ein Ansatz zur Erklärung der Beobachtung ist eine Veränderung der mikrobiellen Aktivität während des Fortschreitens einer bakteriellen Infektion. Zu Infektionsbeginn wäre zur Aktivierung von Immunprozessen wie der direkten Pathogen-Neutralisation durch das plasmatische System, Phagozytose sowie Sensibilisierung der Abwehrzellen auf das spezifische Pathogen mittels Antigenpräsentation und Antikörperproduktion eine gesteigerte metabolische Aktivität und dadurch erhöhte exhalierte DMS-Konzentrationen zu erwarten.

Eine voranschreitende Infektion verbraucht Reserven des Wirtes, die physiologische Flora leidet, eine veränderte oder verminderte Nahrungszufuhr, Fieberschübe und Proliferation des eindringenden Pathogens verändern somit auch die Aktivität des Darmbioms. So wäre auch die gegenüber der gesunden Kontrolle signifikante Verminderung des gemessenen DMS in der späteren symptomatischen Phase bei Infektion mit *H.i.* (Q9) erklärbar.

Im Fall von (monoinfizierten) Rhinovirus-positiven Probanden bleibt die Ausbreitung des Pathogens auf das Epithel von Nasopharynx sowie Lunge beschränkt, daher konnte hier keine signifikant veränderte Konzentration von organischen Schwefelverbindungen gemessen werden (Q3). Eine Beteiligung des systemischen Immunsystems des Wirtsorganismus könnte inadäquat und potentiell schädlicher für den Gesamtorganismus verlaufen, die schleimhautständigen Abwehrzellen und –Mechanismen reichen bei Immunkompetenten aus, um eine Ausbreitung der Infektion zu verhindern (72).

### **Effekte auf anti-oxidative Abwehr und oxidativer Stress – Pentanal und Limonen**

Anti-oxidative Mechanismen werden in Infektionssituationen durch das eindringende Pathogen herunterreguliert um das Eindringen zu vereinfachen (73). Somit kommt es auch zum vermehrten Entstehen von reaktiven Sauerstoffspezies und entsprechend oxidativem Stress.

Reaktive aliphatische Aldehyde – so auch Pentanal – entstehen dabei durch die Oxidation von Lipiden (74).

*S.p.* ist ein anaerobes Bakterium, es wird im belüfteten (sauerstoffreichen) Lungengewebe, das ihm zumeist als Eintrittspforte in den Wirtorganismus dient, aber mit aeroben Bedingungen konfrontiert. In der asymptomatischen Phase der Monoinfektion mit diesem Pathogen konnte eine signifikant erhöhte Pentanalkonzentration in der Expirationsluft von positiv getesteten Probanden gegenüber der gesunden Kontrolle (Q8) detektiert werden, mutmaßlich bedingt durch ein vermehrtes Auftreten von Redox-Reaktionen auf zellulärer Ebene (75). *S.p.* produziert Wasserstoffperoxid und Autolysin (76), die zu seiner Virulenz beitragen. Die im Lungengewebe auftretende Entzündungsreaktion aktiviert das wirtseigene Immunsystem sowie eine Modulation der oxidativen Stressabwehr (77). Somit wäre auch ein Verschwinden des in Q8 beobachteten Effektes im Verlauf der Infektion, also auch der symptomatischen Phase und den Fragestellungen Q2 (alle *S.p.* Monoinfektionen gegenüber gK) und Q10 (symptomatische *S.p.* Monoinfektionen) erklärbar.

Für *H.i.* konnten diese Veränderungen in dieser Studie nicht beobachtet werden. Als fakultativ anaerober Organismus kann es sich dem wechselnden Sauerstoffanteil im Gewebe des Respirationstraktes anpassen (78) und die oben beschriebenen Reaktionen bleiben aus.

Rhinoviren hemmen die mitochondriale Atmung bzw. den mitochondrialen oxidativen Metabolismus im respiratorischen Epithel des Wirtsorganismus und führen zu einem erhöhten Protonenleck, wie *in vitro* Versuche ergaben (79). Es folgt die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. Interleukin 8) (80), damit auch eine Regulation des oxidativen Stresses auf Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum, um deren Funktion zu stabilisieren (81). Auch in Q3 (Rhinovirus Monoinfektion vs. gK) konnte keine signifikante Veränderung von Pentanal beobachtet werden.

Limonen und seine Metabolite fungieren als zelluläre Antioxidantien, sie neutralisieren freie Radikale (82). Das in der Leber mikrosomal metabolisierte Limonen stärkt die antioxidative Abwehr und antientzündliche Antwort (83). Erhöhte Abatmung von Limonen in Rhinovirus-positiven Probanden gegenüber der gesunden Kontrolle (Q3) kann Ausdruck der wirtseigenen anti-inflammatorischen Reaktion auf den virusinduzierten oxidativen Stress und Mikroverletzungen im Respirationstrakt sein.

### **5.3 Koinfektionen**

#### **Effekte auf den Energiestoffwechsel des Wirtsorganismus - Aceton**

In bakteriell-viral koinfizierten Probandengruppen (*H.i.*+Rhinovirus, Q12 und *S.p.*+Rhinovirus, Q13) wurde im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe keine signifikante Änderung des exhalieren Acetons beobachtet, am ehesten ist das auf eine Hemmung der Glykolyse durch virale Einflüsse auf den Zellmetabolismus zurückzuführen.

Wenngleich eine Koinfektion mit zwei bakteriellen Stämmen eine erhöhte Emission von Aceton erwarten ließe, blieb sie in dieser Studie aus (Q11). Im Fall von bakterio-bakterieller Koinfektion zeigten vorangegangene Studien kompetitive Effekte der beiden Pathogene (84–86), dabei produzierte *S.p.* sowohl Wasserstoffperoxid als auch Neuraminidase, die beide toxisch auf *H.i.* wirken. Anzumerken ist, dass die beschriebenen Versuche in einem artifiziellen Biofilm durchgeführt wurden, ähnliche hemmende Effekte *in vivo* sind dabei anzunehmen. Andere Versuche *in vitro* ergaben wiederum einen Synergismus zwischen den beiden bakteriellen Stämmen (87), im Vergleich zur Monokultur zeigten sie ein erhöhtes Wachstum in koinfizierten Kulturen.

In dieser Studie konnte jedoch keine signifikante Änderung der Acetonkonzentration bei Koinfektion mit *H.i.* und *S.p.* gemessen werden, sodass davon auszugehen ist, dass sich verschiedene Einflüsse überlagerten.

#### **Effekte auf systemischer Ebene: Mikrobiom, Immunmodulation und Inflammation – Essigsäure und Dimethylsulfid**

In den Koinfektionsgruppen konnten keine erhöhten Level von KKFS oder organischen Schwefelverbindungen gegenüber der gesunden Kontrolle (Q11-13) detektiert werden, am ehesten ist dies durch eine kumulative Dysbiose bei Superinfektion zu erklären (88,89).

#### **Effekte auf anti-oxidative Abwehr und oxidativer Stress – Pentanal und Limonen**

In Koinfektion mit einem Bakterienstamm konnte bei Rhinovirus positiv getesteten Probanden ebenfalls keine signifikante Erhöhung von Pentanal in Gegenüberstellung mit der gesunden Kontrolle beobachtet werden (Q12 und Q13), dies könnte auf eine immunvermittelte kompetitive Interaktion der beiden Pathogene zurückzuführen sein.

Betrachtet man die Verteilung der gemessenen Limonenkonzentrationen, fällt auf, dass die gemessenen Werte nahe beieinander liegen mit wenigen Ausreißern, die die Signifikanz

bedingen. Die monoinfizierte Rhinovirus-positive Kohorte ist mit 34 Probanden dabei relativ klein. Die beiden statistischen Ausreißer mit Konzentrationen über 3000 ppbV können natürliche Varianten repräsentieren und wurden daher in der Auswertung belassen. Das gleiche gilt für einen einzelnen über 1000 ppbV erhöhten Wert in der *S.p.*+Rhinovirus koinfizierten Kohorte.

Limonen ist auch ein in vielen Pflanzen bzw. ätherischen Ölen vorkommender Stoff, der Anwendung in Lebensmitteln und als Duftstoff findet (90,91). Bedingt durch die Individuelle Lebensführung der Probanden sollte hierbei auch der potentiell exogene Ursprung von Limonen in Erwägung gezogen werden.

Es wurden im ausgeweiteten Rahmen während der Auswertung der Daten auch Korrelationen zwischen den gemessenen VOCs bzw. ihren Konzentrationen unter verschiedenen infektiologischen Voraussetzungen berechnet. Es wird kein Anspruch auf Kausalität erhoben, da die Studiengruppen zu klein für belastbare Aussagen sind. Um die Interaktion der auslösenden Stoffwechselwege ausmachen zu können, bedarf es umfangreicher weiterführender Studien (92). Um die Ergebnisse der Studie mit zukünftigen Forschungsergebnissen abgleichen zu können und sie zu unterstützen oder zu hinterfragen sind die Korrelationen zwischen den VOC-Konzentrationen jedoch geeignet.

#### **5.4 Limitationen der Studie**

Durch eine Standardisierung der Probennahme nach erprobtem und sicherheitskonformem Prinzip und einem Abgleich mit der Umgebungsluft konnten die Variabilität der Messung und mögliche externe Einflussfaktoren reduziert werden. Probanden-individuelle Informationen wie Dauer der Erkrankung, Schwere der empfundenen Symptome, Körpertemperatur, Herzzeitvolumen (HZV), Vorerkrankungen, hormoneller Status und Zeitpunkt im Menstruationszyklus, Body-Mass-Index, sportliche Aktivität sowie Ernährungsweise und Nüchternzeiten konnten jedoch nicht berücksichtigt werden, da die Studie prospektiv, ohne Vorselektion und unter realistischen Screeningbedingungen durchgeführt wurde. Die schnelle und sichere Durchführbarkeit ohne eine Behinderung des Testzentrums war führende Voraussetzung zur Bewilligung der Installation der PTR im Screening-Zentrum. Auch ist die emotionale Anspannung zu berücksichtigen, die besonders zu Beginn der Pandemie im Umgang mit dem noch weitgehend unbekanntem neuen Erreger und potentiellen Trägern herrschte. Eine ausführliche Anamnese auszufüllen oder zu beantworten hätte der Bereitwilligkeit zur Teilnahme an der Studie gegebenenfalls abträglich sein können.

Auch eine Viruslast bzw. das Ausmaß der bakteriellen Besiedlung wurde nicht bestimmt. Eine Korrelation mit Blutwerten (CRP, Interleukine, PaO<sub>2</sub>,) konnte im Setting des laufenden Betriebes des Screening-Zentrums nicht realisiert werden und hätte den Nachteil einer invasiven Probenerhebung mit sich gebracht, der die freiwillige Bereitschaft der Probanden an der Studie teilzunehmen mutmaßlich ebenfalls geschmälert hätte. Es musste somit auf den sehr subjektiven und variablen Parameter des Vorhandenseins von Krankheitssymptomen zurückgegriffen werden, um das Fortschreiten der Infektion grob einordnen zu können.

Trotz einer insgesamt erfreulich hohen Teilnehmerzahl in der Studie ist zu bemerken, dass die gefundenen Pathogen-positiven Kohorten eher klein waren. Für eine stärkere Abgrenzung und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen wären größere Gruppen wünschenswert.

Eine Wiederholung der Versuche in einer anderen Population könnte abhängig von regionalen genetischen Prädispositionen, Impfstatus, (saisonalen) Infektionsrate, Vorkommen von verschiedenen Pathogenen und viralen Varianten sowie verfügbarer medizinischer Infrastruktur und Liberalität im Umgang mit Antibiotika und anderen Medikamenten zu anderen Ergebnissen führen.

Die Abatmung von VOCs, die in ihrem Ausmaß auch von Ventilation und Perfusion abhängt, schwankt interindividuell stark (25,26,34). Das Aufspüren von reproduzierbaren Veränderungen im Profil setzt voraus, dass Stoffwechselwege durch die pathologischen Vorgänge in einem Ausmaß beeinflusst werden, dass Veränderungen entstehen, die sich mit hoher Amplitude vom Grundrauschen abheben.

Die PTR-ToF-MS detektiert Konzentrationen im ppbV-Bereich. Entsprechend können schon kleinste Schwankungen der Umgebungsluft die Ergebnisse beeinflussen. Im klinischen Setting werden immer Reinigungs- und Desinfektionsmittel und viele andere Störfaktoren (andere Patienten, Personal, Hygieneprodukte, Naturstoffe, Klimaanlage, Luftzug von außen durch regelmäßiges Lüften mit Autoabgasen, Pflanzenbestandteilen usw.) schwierige Bedingungen für die sehr sensible Messmethode schaffen.

Umso wichtiger ist die Unterscheidung endogener Substanzen, welche im Körper ablaufende Prozesse widerspiegeln können, von exogen vorkommenden VOCs. Eine Veränderung von Substanzen exogenen Ursprungs kann in Bezug auf eine vermehrte oder verminderte Absorption im Lungengewebe in Infektsituationen (u.a. durch mehr Schleimbildung, weniger

gute Belüftung, Abhängigkeit der Wasserlöslichkeit von VOCs) diskutiert werden, auch ein gleichzeitiger endo- und exogener Ursprung von VOCs ist möglich.

Grundsätzlich ist die inter- und intraindividuelle Schwankungsbreite in VOC-Profilen als immanente Eigenschaft zu berücksichtigen. Sie wurde in der durchgeführten Studie erneut eindrücklich bewiesen.

Herauszustellen ist auch die erstmalige Anwendung der Messmethode im Screening-Szenario, mit der eine Vermeidung von Präselektion einhergeht, sowie der reibungslose Ablauf der Durchführung unter erschwerten medizinischen und psychosozialen Aspekten in einer weltweiten Krisensituation.

### **5.5 Ausblick**

Ein spezifischer Marker für die Diagnose eines respiratorischen Pathogens konnte in dieser Studie nicht identifiziert werden. Eher scheint sich die Analyse des VOC-Profiles für ein Monitoring von Erkrankungsverläufen oder zur Therapiekontrolle zu eignen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Studie gewähren neue Einblicke in diverse Veränderungen bzw. Einflüsse durch Infektion mit respiratorischen Pathogenen auf metabolische Prozesse im menschlichen Körper. Die Ergründung der beobachteten Phänomene und eine Zuordnung zu konkreten Interaktionen zwischen Wirt, Mikrobiom und Pathogen kann in der Zukunft ein besseres Verständnis von verschiedenen Prozessen in Krankheits- und Gesundheitsentstehung ermöglichen.

Die Analyse des Infektionsstatus der Probanden und die gemessenen statistisch relevanten Erhöhungen von verschiedenen VOCs in infizierten Gruppen kann zu einer zukünftigen Verbesserung der Patientenversorgung durch die klinische Anwendung eines Monitorings via Atemgasanalyse beitragen.

## 6. Zusammenfassung

In der hier vorgestellten Studie konnte die PTR-ToF-MS als geeignete Methode zur Untersuchung vieler Probanden in kurzer Zeit ohne Gefährdung von Untersuchern oder Teilnehmern bestätigt werden.

Beim Nachweis von verschiedenen respiratorischen Pathogenen und in Unterscheidung von An- und Abwesenheit von Krankheitssymptomen konnten signifikante Konzentrationsveränderungen innerhalb der VOC-Profile beobachtet werden. Unter Berücksichtigung des möglichen Ursprungs der volatilen organischen Substanzen konnten die Konzentrationsveränderungen dem Energiestoffwechsel (Aceton, Essigsäure), der systemischen mikrobiellen Homöostase (DMS, Essigsäure), oxidativem Stress (Pentanal) und der antioxidativen Abwehr (Limonen) zugeordnet werden. Dies bedeutet, dass eher die Immunreaktion des Wirtsorganismus das VOC-Profil bestimmt, als das Pathogen selbst. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass endogene VOC-Konzentrationen sich nicht signifikant unterscheiden, wenn monoinfizierte Probandengruppen miteinander verglichen wurden.

Die hohe Variabilität innerhalb der symptomatischen Kohorten können auf die breiten interindividuellen Unterschiede in der Immunantwort hindeuten.

Da Viren keinen eigenen Metabolismus haben, ist zu vermuten, dass Veränderungen der exhalieren VOC-Profile überwiegend von der Wirtsreaktion auf die Virusinfektion abhängen.

Fehlende Änderungen exhalieren Substanzkonzentrationen bei bakterio-bakterieller und bakteriell-viraler Koinfektion deuten auf gegenläufige, konkurrierende Effekte der Pathogene hin.

Auch wenn sich virtuelle Sensitivitäten und Spezifitäten für die Erkennung von Infektionen aus den vorliegenden Ergebnissen berechnen lassen, ist die Belastbarkeit dieser Parameter angesichts der beobachteten Variationen, der begrenzten Gruppengröße und der deutlichen Hinweise auf eine überwiegende Wirkung der Wirtsreaktion gering. Spezifische Marker für einzelne bakterielle oder virale Infektionen lassen sich daher aus diesen Ergebnissen nicht ableiten. Die Befunde zeigen das Potential der VOC-Analyse bezüglich der Aufklärung von Wirtsreaktionen und der Verfolgung von Infektionsverläufen.

## **7. Thesen der Arbeit**

1. Mit der PTR-ToF-MS lassen sich die Atemgasprofile vieler Patienten in kurzer Zeit erfassen, hygienische Standards konnten dabei gewahrt und ein Risiko für Teilnehmer und Untersucher vermieden werden.
2. In Atemgasprofilen infizierter Probanden lassen sich wiederkehrende Substanz-Veränderungen abhängig vom Infektionsstatus erkennen.
3. Diese Veränderungen scheinen eher vom Voranschreiten einer Infektion bestimmt zu sein als vom spezifischen auslösenden Pathogen.
4. Ein dominierender Faktor scheint somit eher die Wirtsreaktion als der Pathogen-Metabolismus zu sein.
5. Das Mikrobiom des Darms scheint maßgeblichen Anteil am VOC-Profil zu haben.
6. Spezifische Biomarker für die Erkennung einzelner Pathogene konnten nicht isoliert werden.
7. Die breite interindividuelle Streuung von VOCs wurde erneut eindrucksvoll bewiesen.
8. Weiterführende Studien könnten sich zukünftig mit der VOC-Analyse im longitudinalen Verlauf auseinandersetzen.
9. Die VOC-Analyse stellt einen potenten Ansatz in Richtung nichtinvasiver Diagnostik vor allem pulmonaler Zustände dar, bis zur klinischen Anwendbarkeit bedarf es aber noch weiterführender Forschung.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Jaume F, Valls-Mateus M, Mullol J. Common Cold and Acute Rhinosinusitis: Up-to-Date Management in 2020. *Curr Allergy Asthma Rep.* 3. Juni 2020;20(7):28.
2. DeMuri GP, Gern JE, Eickhoff JC, Lynch SV, Wald ER. Dynamics of Bacterial Colonization With *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* During Symptomatic and Asymptomatic Viral Upper Respiratory Tract Infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 19. März 2018;66(7):1045–53.
3. Takla A, Schönfeld V, Claus H, Krone M, An der Heiden M, Koch J, u. a. Invasive *Haemophilus influenzae* Infections in Germany After the Introduction of Routine Childhood Immunization, 2001-2016. *Open Forum Infect Dis.* Oktober 2020;7(10):ofaa444.
4. Kalies H, Siedler A, Gröndahl B, Grote V, Milde-Busch A, von Kries R. Invasive *Haemophilus influenzae* infections in Germany: impact of non-type b serotypes in the post-vaccine era. *BMC Infect Dis.* 20. April 2009;9:45.
5. Lâm TT, Claus H, Elias J, Frosch M, Vogel U. Ampicillin resistance of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2009-2012. *Int J Med Microbiol IJMM.* Oktober 2015;305(7):748–55.
6. de Koff EM, van Houten MA, Sanders EAM, Bogaert D. Severity of Respiratory Infections With Seasonal Coronavirus Is Associated With Viral and Bacterial Coinfections. *Pediatr Infect Dis J.* Januar 2021;40(1):e36–9.
7. Flyman S, Hermansson A, Gisselsson-Solén M. Nasopharyngeal cultures in children; when, what and why? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* März 2020;130:109832.
8. ECDC. Invasive Pneumococcal Disease [Internet]. Verfügbar unter: <https://www.ecdc.europa.eu/en/invasive-pneumococcal-disease>
9. García-Irure JJ, Navascués A, Martín I, Gastesi C. [Resistance to penicillin and other antimicrobials in 103 clinical isolations of *Streptococcus pneumoniae* (2000-2001)]. *An Sist Sanit Navar.* 2003;26(1):27–33.
10. Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev.* Januar 2013;26(1):135–62.

11. Pitkäranta A, Hayden FG. Rhinoviruses: important respiratory pathogens. *Ann Med.* Dezember 1998;30(6):529–37.
12. Uddin MKM, Shirin T, Hossain ME, Alam AN, Ami JQ, Hasan R, u. a. Diagnostic Performance of Self-Collected Saliva Versus Nasopharyngeal Swab for the Molecular Detection of SARS-CoV-2 in the Clinical Setting. *Microbiol Spectr.* 22. Dezember 2021;9(3):e0046821.
13. Neerincx AH, Vijverberg SJH, Bos LDJ, Brinkman P, van der Schee MP, de Vries R, u. a. Breathomics from exhaled volatile organic compounds in pediatric asthma. *Pediatr Pulmonol.* Dezember 2017;52(12):1616–27.
14. Herbig J, Amann A. Proton transfer reaction-mass spectrometry applications in medical research. *J Breath Res.* Juni 2009;3(2):020201.
15. Amann A, Costello B de L, Miekisch W, Schubert J, Buszewski B, Pleil J, u. a. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *J Breath Res.* September 2014;8(3):034001.
16. Fuchs P, Trautner M, Saß R, Kamysek S, Miekisch W, Bier A, u. a. Spatial mapping of VOC exhalation by means of bronchoscopic sampling. *J Breath Res.* 6. Oktober 2020;14(4):046012.
17. Koziel JA, Pawliszyn J. Air sampling and analysis of volatile organic compounds with solid phase microextraction. *J Air Waste Manag Assoc* 1995. Februar 2001;51(2):173–84.
18. Sukul P, Trefz P, Schubert JK, Miekisch W. Advanced setup for safe breath sampling and patient monitoring under highly infectious conditions in the clinical environment. *Sci Rep.* 26. Oktober 2022;12(1):17926.
19. El Manouni El Hassani S, Soers RJ, Berkhout DJC, Niemarkt HJ, Weda H, Nijssen T, u. a. Optimized sample preparation for fecal volatile organic compound analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 10. Oktober 2020;16(10):112.
20. Smith D, Španěl P, Demarais N, Langford VS, McEwan MJ. Recent developments and applications of selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *Mass Spectrom Rev.* 12. Februar 2023;e21835.

21. Yu Q, Gao J, Yu X, Shi J, Lin L, Wang X. Implementing reactive secondary electrospray ionization based on gas-droplet reactions for VOC analysis. *The Analyst*. 24. Oktober 2022;147(21):4903–9.
22. Blanco FG, Vidal-de-Miguel G. Breath Analysis by Secondary Electro-Spray Ionization - Mass Spectrometry to Interrogate Biologically Significant Metabolites Non-Invasively. *Crit Rev Anal Chem*. 2023;53(4):825–37.
23. Remy R, Kemnitz N, Trefz P, Fuchs P, Bartels J, Klemenz AC, u. a. Profiling of exhaled volatile organics in the screening scenario of a COVID-19 test center. *iScience*. 21. Oktober 2022;25(10):105195.
24. Sukul P, Trefz P, Kamysek S, Schubert JK, Miekisch W. Instant effects of changing body positions on compositions of exhaled breath. *J Breath Res*. 19. November 2015;9(4):047105.
25. Sukul P, Trefz P, Schubert JK, Miekisch W. Immediate effects of breath holding maneuvers onto composition of exhaled breath. *J Breath Res*. September 2014;8(3):037102.
26. 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*. 21. März 2017;11(2):027101.
27. Cappellin L, Karl T, Probst M, Ismailova O, Winkler PM, Soukoulis C, u. a. On quantitative determination of volatile organic compound concentrations using proton transfer reaction time-of-flight mass spectrometry. *Environ Sci Technol*. 21. Februar 2012;46(4):2283–90.
28. Trefz P, Schubert JK, Miekisch W. Effects of humidity, CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> on real-time quantitation of breath biomarkers by means of PTR-ToF-MS. *J Breath Res*. 1. März 2018;12(2):026016.
29. Ruehrmund L, Fuchs P, Bartels J, Remy R, Klemenz AC, Kemnitz N, u. a. Protocol for visualizing complex volatile metabolomics data in clinical setups using EDaViS software. *STAR Protoc*. 1. Januar 2024;5(1):102808.
30. Brueggemann AB, Jansen van Rensburg MJ, Shaw D, McCarthy ND, Jolley KA, Maiden MCJ, u. a. Changes in the incidence of invasive disease due to *Streptococcus*

pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Neisseria meningitidis during the COVID-19 pandemic in 26 countries and territories in the Invasive Respiratory Infection Surveillance Initiative: a prospective analysis of surveillance data. *Lancet Digit Health*. Juni 2021;3(6):e360–70.

31. Zaim O, Diouf A, El Bari N, Lagdali N, Benelbarhdadi I, Ajana FZ, u. a. Comparative analysis of volatile organic compounds of breath and urine for distinguishing patients with liver cirrhosis from healthy controls by using electronic nose and voltammetric electronic tongue. *Anal Chim Acta*. 1. November 2021;1184:339028.

32. Dummer JF, Storer MK, Hu WP, Swanney MP, Milne GJ, Frampton CM, u. a. Accurate, reproducible measurement of acetone concentration in breath using selected ion flow tube-mass spectrometry. *J Breath Res*. Dezember 2010;4(4):046001.

33. Sinha R, Lockman KA, Homer NZM, Bower E, Brinkman P, Knobel HH, u. a. Volatonic analysis identifies compounds that can stratify non-alcoholic fatty liver disease. *JHEP Rep Innov Hepatol*. Oktober 2020;2(5):100137.

34. Sukul P, Schubert JK, Trefz P, Miekisch W. Natural menstrual rhythm and oral contraception diversely affect exhaled breath compositions. *Sci Rep*. 18. Juli 2018;8(1):10838.

35. Traxler S, Bischoff AC, Saß R, Trefz P, Gierschner P, Brock B, u. a. VOC breath profile in spontaneously breathing awake swine during Influenza A infection. *Sci Rep*. 5. Oktober 2018;8(1):14857.

36. Klemenz AC, Meyer J, Ekat K, Bartels J, Traxler S, Schubert JK, u. a. Differences in the Emission of Volatile Organic Compounds (VOCs) between Non-Differentiating and Adipogenically Differentiating Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Human Adipose Tissue. *Cells*. 10. Juli 2019;8(7):697.

37. Berna AZ, Merriman JA, Mellett L, Parchment DK, Caparon MG, Odom John AR. Volatile profiling distinguishes *Streptococcus pyogenes* from other respiratory streptococcal species. *mSphere*. 24. Oktober 2023;8(5):e0019423.

38. Bastide GMGBH, Remund AL, Oosthuizen DN, Derron N, Gerber PA, Weber IC. Handheld device quantifies breath acetone for real-life metabolic health monitoring. *Sens Diagn.* 17. Juli 2023;2(4):918–28.
39. Meurs J, Sakkoula E, Cristescu SM. Real-Time Non-Invasive Monitoring of Short-Chain Fatty Acids in Exhaled Breath. *Front Chem.* 2022;10:853541.
40. Müller-Wirtz LM, Kiefer D, Ruffing S, Brausch T, Hüppe T, Sessler DI, u. a. Quantification of Volatile Aldehydes Deriving from In Vitro Lipid Peroxidation in the Breath of Ventilated Patients. *Mol Basel Switz.* 21. Mai 2021;26(11):3089.
41. Ruzsányi V, Péter Kalapos M. Breath acetone as a potential marker in clinical practice. *J Breath Res.* 1. Juni 2017;11(2):024002.
42. Di Lena M, Porcelli F, Altomare DF. Volatile organic compounds as new biomarkers for colorectal cancer: a review. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* Juli 2016;18(7):654–63.
43. Moura PC, Raposo M, Vassilenko V. Breath volatile organic compounds (VOCs) as biomarkers for the diagnosis of pathological conditions: A review. *Biomed J.* August 2023;46(4):100623.
44. van Liere ELSA, van Dijk LJ, Bosch S, Vermeulen L, Heymans MW, Burchell GL, u. a. Urinary volatile organic compounds for colorectal cancer screening: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* Juni 2023;186:69–82.
45. Kalapos MP. On the mammalian acetone metabolism: from chemistry to clinical implications. *Biochim Biophys Acta.* 2. Mai 2003;1621(2):122–39.
46. Fan F, Ma Y, Ai R, Ding Z, Li D, Zhu Y, u. a. Glycolytic Metabolism Is Critical for the Innate Antibacterial Defense in Acute *Streptococcus pneumoniae* Otitis Media. *Front Immunol.* 2021;12:624775.
47. Filipiak W, Sponring A, Baur MM, Ager C, Filipiak A, Wiesenhofer H, u. a. Characterization of volatile metabolites taken up by or released from *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by using GC-MS. *Microbiol Read Engl.* Dezember 2012;158(Pt 12):3044–53.

48. Wilson AD, Forse LB. Potential for Early Noninvasive COVID-19 Detection Using Electronic-Nose Technologies and Disease-Specific VOC Metabolic Biomarkers. *Sensors*. 7. März 2023;23(6):2887.
49. Blaas D, Fuchs R. Mechanism of human rhinovirus infections. *Mol Cell Pediatr*. Dezember 2016;3(1):21.
50. Gualdoni GA, Mayer KA, Kapsch AM, Kreuzberg K, Puck A, Kienzl P, u. a. Rhinovirus induces an anabolic reprogramming in host cell metabolism essential for viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24. Juli 2018;115(30):E7158–65.
51. Natalini JG, Singh S, Segal LN. The dynamic lung microbiome in health and disease. *Nat Rev Microbiol*. April 2023;21(4):222–35.
52. Traxler S, Bischoff AC, Trefz P, Schubert JK, Miekisch W. Versatile set-up for non-invasive in vitro analysis of headspace VOCs. *J Breath Res*. 3. Juli 2018;12(4):041001.
53. Bischoff AC, Oertel P, Sukul P, Rimbach C, David R, Schubert J, u. a. Smell of cells: Volatile profiling of stem- and non-stem cell proliferation. *J Breath Res*. 1. März 2018;12(2):026014.
54. Timm CM, Lloyd EP, Egan A, Mariner R, Karig D. Direct Growth of Bacteria in Headspace Vials Allows for Screening of Volatiles by Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Front Microbiol*. 2018;9:491.
55. Traxler S, Barkowsky G, Saß R, Klemenz AC, Patenge N, Kreikemeyer B, u. a. Volatile scents of influenza A and *S. pyogenes* (co-)infected cells. *Sci Rep*. 11. Dezember 2019;9(1):18894.
56. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol*. 2020;11:25.
57. Tangerman A. Measurement and biological significance of the volatile sulfur compounds hydrogen sulfide, methanethiol and dimethyl sulfide in various biological matrices. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 15. Oktober 2009;877(28):3366–77.

58. Ramos-Molina B, Queipo-Ortuño MI, Lambertos A, Tinahones FJ, Peñafiel R. Dietary and Gut Microbiota Polyamines in Obesity- and Age-Related Diseases. *Front Nutr.* 2019;6:24.
59. Singhal R, Shah YM. Oxygen battle in the gut: Hypoxia and hypoxia-inducible factors in metabolic and inflammatory responses in the intestine. *J Biol Chem.* 24. Juli 2020;295(30):10493–505.
60. Cai J, Sun L, Gonzalez FJ. Gut microbiota-derived bile acids in intestinal immunity, inflammation, and tumorigenesis. *Cell Host Microbe.* 9. März 2022;30(3):289–300.
61. Li Y, Ye Z, Zhu J, Fang S, Meng L, Zhou C. Effects of Gut Microbiota on Host Adaptive Immunity Under Immune Homeostasis and Tumor Pathology State. *Front Immunol.* 2022;13:844335.
62. de Steenhuijsen Piters WAA, Binkowska J, Bogaert D. Early Life Microbiota and Respiratory Tract Infections. *Cell Host Microbe.* 12. August 2020;28(2):223–32.
63. Sencio V, Barthelemy A, Tavares LP, Machado MG, Soulard D, Cuiat C, u. a. Gut Dysbiosis during Influenza Contributes to Pulmonary Pneumococcal Superinfection through Altered Short-Chain Fatty Acid Production. *Cell Rep.* 3. März 2020;30(9):2934-2947.e6.
64. Moroishi Y, Gui J, Hoen AG, Morrison HG, Baker ER, Nadeau KC, u. a. The relationship between the gut microbiome and the risk of respiratory infections among newborns. *Commun Med.* 2022;2:87.
65. López-López N, Euba B, Hill J, Dhouib R, Caballero LA, Leiva J, u. a. Haemophilus influenzae Glucose Catabolism Leading to Production of the Immunometabolite Acetate Has a Key Contribution to the Host Airway-Pathogen Interplay. *ACS Infect Dis.* 13. März 2020;6(3):406–21.
66. Antunes KH, Stein RT, Franceschina C, da Silva EF, de Freitas DN, Silveira J, u. a. Short-chain fatty acid acetate triggers antiviral response mediated by RIG-I in cells from infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *EBioMedicine.* März 2022;77:103891.
67. Antunes KH, Singanayagam A, Williams L, Faiez TS, Farias A, Jackson MM, u. a. Airway-delivered short-chain fatty acid acetate boosts antiviral immunity during rhinovirus infection. *J Allergy Clin Immunol.* Februar 2023;151(2):447-457.e5.

68. Machado MG, Patente TA, Rouillé Y, Heumel S, Melo EM, Deruyter L, u. a. Acetate Improves the Killing of *Streptococcus pneumoniae* by Alveolar Macrophages via NLRP3 Inflammasome and Glycolysis-HIF-1 $\alpha$  Axis. *Front Immunol.* 2022;13:773261.
69. Schuijt TJ, Lankelma JM, Scicluna BP, de Sousa e Melo F, Roelofs JJTH, de Boer JD, u. a. The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut.* April 2016;65(4):575–83.
70. Ji J, Xu Y, Zheng M, Luo C, Lei H, Qu H, u. a. Methionine Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses via DNA Methylation in Macrophages. *ACS Omega.* 31. Januar 2019;4(1):2331–6.
71. Wu X, Han Z, Liu B, Yu D, Sun J, Ge L, u. a. Gut microbiota contributes to the methionine metabolism in host. *Front Microbiol.* 2022;13:1065668.
72. Kennedy JL, Turner RB, Braciale T, Heymann PW, Borish L. Pathogenesis of rhinovirus infection. *Curr Opin Virol.* Juni 2012;2(3):287–93.
73. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* Januar 2012;5(1):9–19.
74. Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem.* 8. August 2008;283(32):21837–41.
75. Bortoni ME, Terra VS, Hinds J, Andrew PW, Yesilkaya H. The pneumococcal response to oxidative stress includes a role for Rgg. *Microbiol Read Engl.* Dezember 2009;155(Pt 12):4123–34.
76. Zahlten J, Kim YJ, Doehn JM, Pribyl T, Hocke AC, García P, u. a. *Streptococcus pneumoniae*-Induced Oxidative Stress in Lung Epithelial Cells Depends on Pneumococcal Autolysis and Is Reversible by Resveratrol. *J Infect Dis.* 1. Juni 2015;211(11):1822–30.
77. Yesilkaya H, Andisi VF, Andrew PW, Bijlsma JJE. *Streptococcus pneumoniae* and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals. *Trends Microbiol.* April 2013;21(4):187–95.

78. Othman DSMP, Schirra H, McEwan AG, Kappler U. Metabolic versatility in *Haemophilus influenzae*: a metabolomic and genomic analysis. *Front Microbiol.* 2014;5:69.
79. Peter Wark, Prabuddha Pathinyake, Alan Hsu, Kristy Parsons, Lisa Wood. Effect of oxidative stress and rhinovirus infection on mitochondrial/endoplasmic reticular function in human primary bronchial epithelial cells. 2016;
80. Biagioli MC, Kaul P, Singh I, Turner RB. The role of oxidative stress in rhinovirus induced elaboration of IL-8 by respiratory epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* Februar 1999;26(3–4):454–62.
81. Kaul P, Biagioli MC, Singh I, Turner RB. Rhinovirus-induced oxidative stress and interleukin-8 elaboration involves p47-phox but is independent of attachment to intercellular adhesion molecule-1 and viral replication. *J Infect Dis.* Juni 2000;181(6):1885–90.
82. de Souza MC, Vieira AJ, Beserra FP, Pellizzon CH, Nóbrega RH, Rozza AL. Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* Februar 2019;53:37–42.
83. Santana HSR, de Carvalho FO, Silva ER, Santos NGL, Shanmugam S, Santos DN, u. a. Anti-Inflammatory Activity of Limonene in the Prevention and Control of Injuries in the Respiratory System: A Systematic Review. *Curr Pharm Des.* 2020;26(18):2182–91.
84. Tikhomirova A, Kidd SP. *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*: living together in a biofilm. *Pathog Dis.* November 2013;69(2):114–26.
85. Pericone CD, Overweg K, Hermans PW, Weiser JN. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun.* Juli 2000;68(7):3990–7.
86. Shakhnovich EA, King SJ, Weiser JN. Neuraminidase expressed by *Streptococcus pneumoniae* desialylates the lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*: a paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract. *Infect Immun.* Dezember 2002;70(12):7161–4.
87. Cope EK, Goldstein-Daruech N, Kofonow JM, Christensen L, McDermott B, Monroy F, u. a. Regulation of virulence gene expression resulting from *Streptococcus pneumoniae* and

nontypeable *Haemophilus influenzae* interactions in chronic disease. *PloS One*. 2011;6(12):e28523.

88. Hanada S, Pirzadeh M, Carver KY, Deng JC. Respiratory Viral Infection-Induced Microbiome Alterations and Secondary Bacterial Pneumonia. *Front Immunol*. 2018;9:2640.

89. Sencio V, Machado MG, Trottein F. The lung-gut axis during viral respiratory infections: the impact of gut dysbiosis on secondary disease outcomes. *Mucosal Immunol*. März 2021;14(2):296–304.

90. Marmulla R, Harder J. Microbial monoterpene transformations-a review. *Front Microbiol*. 2014;5:346.

91. Ibáñez MD, Sanchez-Ballester NM, Blázquez MA. Encapsulated Limonene: A Pleasant Lemon-Like Aroma with Promising Application in the Agri-Food Industry. A Review. *Mol Basel Switz*. 3. Juni 2020;25(11):2598.

92. Sukul P, Richter A, Junghanss C, Schubert JK, Miekisch W. Origin of breath isoprene in humans is revealed via multi-omic investigations. *Commun Biol*. 30. September 2023;6(1):999.

# 9. Anhang

9.1 Tabelle 5: Analyse der Inter-VOC-Korrelationen in den unterschiedlichen Studienpopulationen.

VOCs		Gesunde Kontrolle (n=256)		Alle <i>H.influenzae</i> (n=97)			Alle <i>S.pneumoniae</i> (n=40)			Alle Rhinovirus (n=34)		<i>H.influenzae</i> + <i>S.pneumoniae</i> (n=24)		<i>H.influenzae</i> + Rhinovirus (n=16)		<i>S.Pneumoniae</i> + Rhinovirus (n=12)	
		R value	p value														
Aceton	Essigsäure	R value	0.005	0.212	0.044	0.415	0.028	-0.134	0.191	0.363	0.163	<b>0.831</b>	0.134				
		p value	0.466	0.019	0.376	0.003	0.433	0.262	0.247	0.018	0.223	0.000	0.339				
Aceton	DMS	R value	0.293	0.138	0.147	0.190	0.225	0.309	<b>0.527</b>	<b>0.507</b>	0.139	0.283	0.137				
		p value	0.000	0.088	0.142	0.114	0.082	0.067	0.022	0.001	0.258	0.144	0.336				
Aceton	Pentanal	R value	0.282	0.421	0.473	0.453	0.289	0.279	<b>0.637</b>	0.472	0.267	0.305	0.112				
		p value	0.000	0.000	0.000	0.001	0.035	0.088	0.005	0.002	0.104	0.125	0.365				
Aceton	Limonen	R value	-0.003	-0.024	-0.069	-0.011	0.256	-0.265	0.365	-0.009	0.008	0.140	-0.047				
		p value	0.480	0.409	0.308	0.474	0.055	0.100	0.091	0.481	0.485	0.302	0.442				
Essigsäure	DMS	R value	-0.028	-0.124	-0.206	0.028	0.124	0.227	-0.172	-0.152	-0.096	0.368	<b>0.629</b>				
		p value	0.529	0.114	0.066	0.431	0.223	0.138	0.27	0.195	0.328	0.081	0.014				
Essigsäure	Pentanal	R value	0.198	0.296	0.267	0.381	0.257	0.323	0.122	0.166	0.065	<b>0.586</b>	<b>0.583</b>				
		p value	0.001	0.002	0.024	0.006	0.055	0.058	0.332	0.175	0.381	0.011	0.023				
Essigsäure	Limonen	R value	-0.005	-0.008	0.062	-0.088	0.186	0.293	0.137	-0.189	0.000	-0.114	0.474				
		p value	0.470	0.470	0.326	0.291	0.125	0.078	0.313	0.142	0.500	0.337	0.060				
DMS	Pentanal	R value	<b>0.621</b>	0.483	0.321	<b>0.632</b>	<b>0.580</b>	<b>0.580</b>	0.425	<b>0.582</b>	0.459	<b>0.776</b>	<b>0.676</b>				
		p value	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.002	0.057	0.000	0.012	0.000	0.008				
DMS	Limonen	R value	0.110	-0.028	-0.082	0.019	-0.031	-0.172	0.233	0.100	-0.122	0.189	<b>0.706</b>				
		p value	0.040	0.394	0.277	0.452	0.424	0.206	0.202	0.286	0.285	0.242	0.002				
Pentanal	Limonen	R value	0.161	-0.039	-0.087	-0.004	0.265	0.253	<b>0.506</b>	-0.027	0.095	-0.129	0.351				
		p value	0.005	0.354	0.265	0.490	0.049	0.111	0.027	0.439	0.329	0.316	0.132				

### **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 stehen 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 eine 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 Einführungsgesprächs 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 der 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.

## **Einverständniserklärung**

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

#### **Geschäftszeichen der Ethikkommission: A 2020-0085**

Ich, ....., geb. am .....,  
Name, Vorname (Proband)

wurde vom Prüfarzt Prof. Schubert, Nele Kernitz 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)

## **10. Publikationen und Vorträge**

Im Rahmen der vierjährigen Mitarbeit in der AG ROMBAT der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der Universitätsmedizin Rostock wurden folgende Kongressbeiträge und die Mitwirkung an folgenden Publikationen ermöglicht:

### **Vorträge:**

2022, Kongress der International Association of Breath Research, IABR, Pisa: VOC-Profilung in patients with pulmonary infections

2022, Norddeutsche Anästhesietage, NAT, Hamburg: VOC Profile in Patienten mit pulmonalen Infekten – Diagnose und Monitoring?

### **Publikationen:**

Remy R, Kemnitz N, Trefz P, Fuchs P, Bartels J, Klemenz AC, u. a. Profiling of exhaled volatile organics in the screening scenario of a COVID-19 test center. *iScience*. 21. Oktober 2022;25(10):105195

Ruehrmund L, Fuchs P, Bartels J, Remy R, Klemenz AC, Kemnitz N, u. a. Protocol for visualizing complex volatile metabolomics data in clinical setups using EDaViS software. *STAR Protoc*. 1. Januar 2024;5(1):102808.

Kemnitz N, Fuchs P, Remy R, Ruehrmund L, Bartels J, Klemenz AC, u. a. Effects of Contagious Respiratory Pathogens on Breath Biomarkers. *Antioxid Basel Switz*. 29. Januar 2024;13(2):172.

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Name: Nele Kemnitz

Geburtsdatum, -ort: 21. Juni 1992 in Neumünster

## **Schul- und Hochschulausbildung**

2002-2010 **Klaus-Groth-Schule**, Gymnasium der Stadt Neumünster

2011-2019 **Universität Rostock**

Studium Humanmedizin

Seit 2020 **Universitätsmedizin Rostock**

Klinik für Anästhesiologie, Intensivtherapie und Schmerzmedizin

Assistenzärztin

Doktorandin in der AG ROMBAT

(Prof. Dr. med. Dipl.-Chem. J.K. Schubert D.E.A.A. und

Dr. rer. nat. W. Miekisch)

Mitglied des Kinderanästhesie-Teams

Zusatzweiterbildung Notfallmedizin Abschluss vsl. 09/2024

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich

- a. dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe;
- b. dass die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken als solche kenntlich gemacht sind;
- c. dass ich die vorliegende Arbeit (oder Teile der Arbeit) nicht käuflich erworben habe;
- d. dass die Arbeit bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde;
- e. dass ich mich als Studierende der Universität Rostock den „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens an der Universität Rostock" verpflichtet fühle;
- f. meine Kenntnis davon, dass Plagiate eine Täuschung und ein schwerwiegender Verstoß gegen § 3 Abs. 2 Nr. 2a. der o.g. „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ sind. Unter einem Plagiat versteht man hiernach die „Verletzung geistigen Eigentums in Bezug auf ein von jemand anderen geschaffenes geschütztes Werk oder von anderen stammende wesentliche wissenschaftliche Erkenntnisse, Hypothesen, Lehren oder Forschungsansätze durch die Übernahme von Texten, Ideen oder Daten anderer ohne eine eindeutige Kenntlichmachung des Urhebers.“
- g. meine Kenntnisnahme davon, dass meine Arbeit gemäß § 12 Abs. 7 und 8 RPOBa/Ma und § 17 Abs. 9 und 10 RPO-LA einer Plagiatsprüfung unterzogen werden kann. Mir ist bekannt, dass eine Prüfungsleistung, die nachweislich ein Plagiat darstellt, prüfungsrechtlich eine Täuschung ist und mit „nicht ausreichend“ (5,0) beziehungsweise „nicht bestanden“ bewertet wird.

Rostock, 30.08.2024

## **Danksagung**

An erster Stelle danke ich Jochen, der sich trotz stellvertretender Klinikleitung und Weltreisen immer Zeit für Korrekturen und Diskussionen genommen hat. Deinen Spagat zwischen Leidenschaft für den Arztberuf und Kritik am Gesundheitssystem muss man erst einmal mit so viel Humor hinbekommen. Ich nehme aus den letzten fünf Jahren auch viel klinische Erdung und Inspiration mit. Vielen Dank.

Danke an Wolfram für Dein Wohlwollen und die Zuteilung des Themas trotz Deiner Skepsis berufsbegleitenden Promotionen gegenüber, Deine Bestärkung und die Geduld in den letzten fünf Jahren.

Danke an Euch ROMBATs, Patricia, Julia, Ann-Christin, Pritam, Rasmus, Leo und Helena, für den stets bestens begleiteten, authentischen, eindrücklichen, motivierenden, liebe- und humorvollen Ausflug und Einblick in die Welt der klinischen Forschung. Ihr seid mir nicht nur wissenschaftlich, sondern auch menschlich schnell und fest ans Herz gewachsen. Reden halten, Texte schreiben, Auto fahren hätte ich ohne Euch vielleicht nicht mehr gelernt. Die meisten Frauen sind mit ungefähr 18 Jahren ausgewachsen, mit Euch habe ich noch einen Zentimeter geschafft. Hundert Mal Danke, dass Ihr mich auf- und mitgenommen habt. Ich freue mich auf alles das noch kommt.

Danke an Mama, dafür, dass Du Deinen Urlaub freiwillig und jederzeit für Enkelbetreuung genommen hast und in einer unerschöpflichen Geduld und Liebe Arnes ersten fünf und meine ersten 32 Jahre in unvergleichlicher, urteilsfreier und vorbildhafter Mutterweise begleitet und behütet und die Hoffnung nie aufgegeben hast.

Arne, Du süße Maus, Danke dafür, dass Du alles mitmachst seit es Dich gibt, Vorlesungen, früh aufstehen, Essen gehen mit Erwachsenen und selber Nachtisch kaufen. Wenn ich eine Sternschnuppe sehe wünsche ich vor allem, dass Du immer glücklich und gesund bleibst. Aber meinerwegen auch, dass Du ein Hai bist damit Du ganz lange tauchen kannst.

Danke an Mona für Obdach, wenn ich raus muss, immer ein offenes Ohr und sehr kluge Gedanken und dafür, dass Du immer ein leuchtendes Vorbild bist.