

Prof. Dr. med. Frithjof Blessing, Prof. J. Blessing und Kollegen
Institut für Laboratoriumsmedizin

Virchowstr. 10c
78224 Singen
www.labor-blessing.de



Tel.: 07731 - 995 60
Fax: 07731 - 982 683 1
info@labor-blessing.de

Mikrobiologie, Infektionsepidemiologie, Virologie, Immunologie,
Molekulare Genetik, Humangenetik und Stoffwechsellanalytik
Klinische Chemie - Laborärzte Singen - Autoimmunologie



Key words: Diagnostik mittels RT-PCR • weiteres Procedere bei initial negativem Testergebnis • Probenahme und Versand • Herkunft des Virus • Übertragungswege • Klinik • Incubationszeit • Therapie • Vaccineentwicklung • Hygiene und Prävention • Meldepflicht

Neues Coronavirus SARS-CoV-2

Angesichts der im Gange befindlichen weltweiten Ausbreitung der SARS-Variante und der nun in Italien und auch in Deutschland aufgetretenen Erkrankungsfälle, übermitteln wir Ihnen eine überarbeitete Version unseres wissenschaftlichen Exposés zur Diagnostik, Epidemiologie und Erregercharakteristik von SARS-CoV-2.

RT-PCR-Nachweis für neues Coronavirus SARS-CoV-2

Zur **Diagnostik** von Infektionen mit **SARS-CoV-2** steht in unserem Labor eine **RT-PCR** aus respiratorischem Untersuchungsgut zur Verfügung. Geeignet sind **Nasen- Rachen-Abstriche** (**Trockener PCR-Tupfer ohne Transportmedium, Gel-haltige Abstrichröhrchen sind nur für bakterielle Nachweise verwendbar,**) induziertes Sputum, Trachealsekret, BAL und entsprechende Aspirate bzw. Spülwässer. (z.B. Rachenspülwasser)

Blutuntersuchungen für den Nachweis SARS-CoV-2 -spezifischer IgG- und IgM Antikörpern sind derzeit nur im Nationalen Referenzzentrum an der Charité in Berlin verfügbar Tel. 030-450525092.

Probennahme und Versand von Untersuchungsmaterial

- Die Probenahme muß unter entsprechenden Kautelen erfolgen (Schutzbrille, FFP2/FFP3-Maske, Einmalhandschuhe, Schutzkleidung)
- Probe von Verdachtspatienten immer getrennt vom Untersuchungsmaterial anderer Patienten versenden

Es sollten je Abstrichstelle (Nase-, bzw. Rachenbereich) 1 Abstrichröhrchen, insgesamt also 2 Abstriche angefertigt werden. **Mit dem 1. Tupfer** im Bereich beider Tonsillen abstreichen und wieder in's Röhrchen zurückstecken (Aufschrift: RA=Rachenabstrich). **Mit dem 2. Tupfer** beide Nasengänge abstreichen; nicht nur an der Nasenöffnung sondern weiter oben im Bereich der Nasenschleimhaut (Aufschrift NA= Nasenabstrich). **Jedes Röhrchen muß mit Name und Geburtsdatum des Patienten beschriftet werden.** (Bei Mangel an Abstrichröhrchen genügt auch 1 Tupfer, mit dem sowohl die beiden Nasengänge als auch die beiden Tonsillenbereiche abgestrichen werden können.)

Abstrichröhrchen sicher verschließen und mit Begleitschein in Versandbeutel einlegen. In einen Versandbeutel immer nur das Untersuchungsmaterial samt Überweisungsschein von 1 Patienten einbringen. Nicht mit dem Untersuchungsgut anderer Patienten in denselben Versandbeutel einlegen. Bitte **Aufschrift** oder Aufkleber auf **Versandbeutel** anbringen mit dem Vermerk „**Corona**“. Die Abstrichtupfer stellen wir Ihnen auf Anforderung zur Verfügung, ebenso einen Plastikversandbeutel mit Klebeverschluss.

Proben von Verdachtsfällen müssen im Labor angemeldet werden. (Tel. 07731-9956-0 oder 9956-115). Ansprechpartner für Beratung erreichen Sie unter 07731-9956-108 oder 9956-132.

Probe bis zum Versand möglichst gekühlt lagern. Der Versand kann mit dem Transportdienst des Labors unter Standardbedingungen erfolgen, d.h. Einbringen des Abstrich- oder Sputum-, bzw. BAL- Gebindes in verschließbaren auslaufsicheren Plastik-Versandbeutel mit Saugeinlage. Abstrichröhrchen bzw. Sputum-/BAL-Gebinde dicht (=auslaufsicher) verschließen. Bei **Postversand** sind Proben von SARS-CoV-2 Verdachtsfällen als „Biologischer Stoff, Kategorie B“ der UN-Nr. 3373 zuzuordnen und nach Maßgabe der Verpackungsanweisung P 650 zu verpacken.

Die Verpackung P650 besteht aus 3 Komponenten:

- 1.) Primärverpackung = Probengefäß (z.B. Tupferröhrchen oder Sputum- oder BAL-Gefäß)
- 2.) Sekundärverpackung= (=flüssigkeitsdichtes) Schutzgefäß (darin saugfähiges Material verschraubtes Plastikröhrchen)
- 3.) Umverpackung (=vorgeformte Versandschachtel oder kistenförmige Verpackung mit Aufschrift: Biologischer Stoff, Kategorie B, UN-Nr. 3373)

Weiteres Procedere bei initial negativem Testergebnis

Wenn ein Patient mit hochgradigem Verdacht auf SARS-CoV-2 -Infektion in der initialen PCR negativ getestet wird, sollte eine zweite Probeneinsendung erfolgen, denn ein negatives PCR-Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion mit SARS-CoV-2 nicht vollständig aus. **Falsch-negative** Ergebnisse können z. B. aufgrund schlechter Probenqualität, unsachgemäßem Transport, ungünstigem Zeitpunkt der Probenentnahme z.B. in der anfänglichen Inkubationsphase, in der noch keine Virusausscheidung erfolgt oder anderen Gründen (z. B. Virusmutation) nicht ausgeschlossen werden. **Besteht jedoch eine deutliche klinische Symptomatik** und /oder erfolgte ein **Aufenthalt in einem Endemiegebiet** oder **Kontakt** mit einer infizierten Person, dann sind trotz eines negativen Testergebnisses letztlich die **klinische Symptomatik und die anamnestischen Daten für die weitere Verfahrensweise ausschlaggebend**, d. h. daß solche Patienten weiterhin zu isolieren bzw. in Quarantäne zu beobachten sind, bis die Incubationsphase abgelaufen ist.

Außerdem wäre **differentialdiagnostisch** abzuklären ob möglicherweise andere Erreger für die klinische Symptomatik des Patienten verantwortlich sind. Grundsätzlich können Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege verursacht werden von Viren wie **Influenza A und B, RSV, Parainfluenza 1-4, Adeno-**, Masern-, Rhino-, Hanta-, Entero- und humanen Coronaviren (OC43, CoV 229E etc.) wie auch durch humanes Metapneumovirus, HSV, EBV, CMV, HHV6 und Minivirus.

Differentialdiagnostisch relevante bakterielle Erreger sind Mycoplasma- und Chlamydia pneumoniae, Hämophilus influenzae, Legionellen und Hospital erworbene Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas und Acinetobacter sowie Fungi u.a.

Kriterien zur diagnostischen Abklärung bei Verdacht auf eine Infektion

Eine spezifische Überprüfung auf das Vorliegen einer SARS-CoV-2 Infektion ist nach der Falldefinition des RKI dann durchzuführen, wenn:

- Respiratorische u. a. relevante klinische Symptome wie Fieber und radiologische Hinweise auf eine akute Infektion der unteren Atemwege bestehen UND Kontakt zu einem gesicherten SARS-CoV-2 Fall in den letzten 2-3 Wochen bestand.

Oder der Aufenthalt bzw. die Rückkehr aus einem Risikogebiet höchstens zwei Wochen vor dem Auftreten der Symptome stattgefunden hat. Für solche Fälle ist auch die Untersuchung bei ambulanten GKV-Patienten im Rahmen der Regelversorgung vorgesehen. Bei begründetem Verdacht kann daher seit 01.02.2020 der Erreger-Nachweis als Kassenleistung angefordert werden (Laborziffer GOP 32816). Für die Diagnostik kann der Veranlasser/Einsender die Kenn-Nummer 32006 angeben. Alle Fälle, bei denen ein klinischer Verdacht vorliegt oder eine Infektion mit dem SARS-CoV-2 Virus nachgewiesen wurde, sind mit der Ziffer 88240 zu kennzeichnen. Für Individuelle Gesundheitsleistungen (IGEL) und Privatpatienten gilt die GOÄ.

Erreger, Epidemiologie

Bislang waren interkontinental exportierte Epidemien meist durch Influenzaviren verursacht. In den letzten Jahren kamen jedoch Erreger mit pandemischer Potenz auch immer wieder aus der Gruppe der Coronaviren- zur Beobachtung. So im Jahr 2002/2003 das SARS- Coronavirus (Severe Acute Respiratory Syndrome), das sich von Guangdong in der Provinz Kanton über China und mehrere Länder ausbreitete und in 2012 das MERS-Coronavirus (Middle East Respiratory Syndrome) Virus, das zuerst in Saudi-Arabien auftrat.

Am 31.Dezember 2019 wurde das WHO Landesbüro in China über eine Häufung von Pneumonien unklarer Genese in der 11-Millionen Stadt Wuhan, Provinz Hubei, informiert. Am 07. Januar 2020 haben chinesische Wissenschaftler ein bislang unbekanntes, dem **SARS-**

Virus nahe verwandtes Coronavirus (siehe Abb.1 und Abb. 2) als Ursache dieser Lungenentzündungen identifiziert.

Trotz der bisher in China und den betroffenen Ländern erlassenen Quarantänemaßnahmen und Reisebeschränkungen ist es noch nicht gelungen die weitere Verbreitung des Virus völlig zu verhindern (Stand 26.02.2020). Die WHO hat nach anfänglicher Zurückhaltung am 26. Januar 2020 den internationalen Gesundheitsnotstand ausgerufen, was mit der Einleitung besonderer Maßnahmen zur Eindämmung der Epidemie verbunden ist. (www.rki.de/ncov)

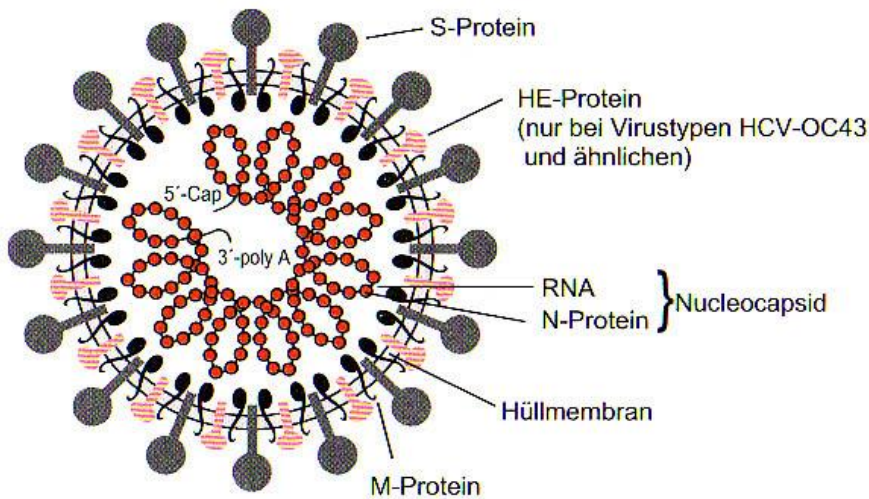


Abbildung 1:

Aufbau eines Coronaviruspartikels. Im Innern des Partikels liegt das mit N-Proteinen komplexierte RNA-Genom als helikales Nucleocapsid vor. Es ist von einer Membranhülle umgeben, in welche die Glycoproteine S und HE sowie das nichtglycosylierte M-Protein eingelagert sind.

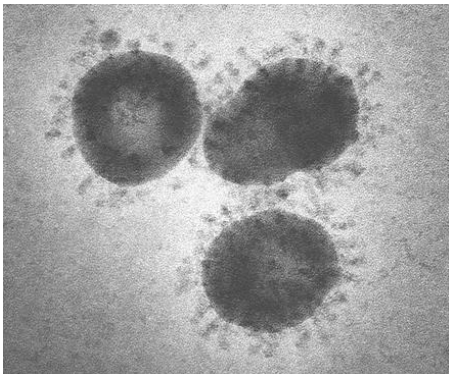


Abbildung 2: Oberflächenstruktur des SARS-CoV-2. Elektronenoptische Aufnahme durch Dr.Fred Murphy & Sylvia Whitfield/CDC

Die Viruspartikel setzen sich aus folgenden Einzelteilen zusammen

(Abbildung 1):

Envelope (membranartige Hülle), Capsid- und Nucleoprotein, in welches die circular angeordnete, einzelsträngige RNA eingebettet ist. Die Hülle enthält das S-Protein (=glykosyliertes Trimer, 180-220 kDA) mit keulenförmigen, nach außen ragenden Spikes (=Peplomeren), die dem Virus sein charakteristisches strahlenkranzartiges Aussehen verleihen. In die Hülle ist noch das **E-Protein** eingebunden sowie beim humanen Coronavirus OC 43 und den Coronaviren der Gruppe 2 das HE Protein (Hämagglutinin-Esterase Protein, 65 kDA). Auf der Innenseite der Hülle befindet sich noch das **M(=Matrix) Protein**.

Das **S (=spike)-Protein** ermöglicht den Corona Viren das **Andocken an den Rezeptor** ihrer Zielzellen (siehe Abbildung 3) und die Penetration in das Zellinnere mittels Fusion mit der Membran ihrer Wirtszellen. Das Spike Protein ist außerdem ein **effizientes Antigen** und entfaltet eine starke immunogene Wirkung. Es könnte die Grundlage für einen potenten Impfstoff sein etwa der Art, wie es bereits eine **Adenovirus basierte Vaccine** gegen das MERS-Corona Virus gibt.

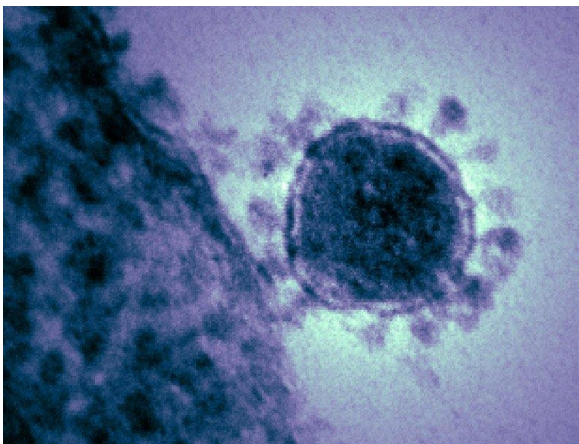


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Coronavirus, das am Rezeptor seiner Zielzelle andockt.

© NIAID

Wuhan Coronavirus: Übertragungswege, Incubationszeit, Klinik

Coronaviren wurden erstmals 1965 bei Erkältungskrankheiten identifiziert. Elektronenoptisch ließen sich Viruspartikel nachweisen, in deren **äußerer Hülle strahlenkranzartig** (lat. „corona“) keulenförmige Proteine (sog. Peplomeren) eingelagert waren (siehe Abbildung 1 und 2). Sie sind weltweit verbreitet und kommen in zahlreichen Tierarten vor, so zum Beispiel in Fischen, Sauropsiden (Vögel, Schlangen) und Säugetieren, in denen sie vielfältige Erkrankungen wie beispielsweise Hepatitiden bei Mäusen induzieren. Beim Menschen verursachen sie ein **Krankheitsspektrum**, das von grippalen Infekten beziehungsweise

gewöhnlichen Erkältungskrankheiten und Diarrhoen bis hin zu gravierend verlaufenden Pneumonien mit unter Umständen letalem Ausgang reicht.

Die **Erreger-Übertragung** erfolgt bei Coronaviren durch Tröpfcheninfektion wie auch durch Schmierinfektion. Eintrittspforten sind die Schleimhäute insbesondere die Konjunktiven, die Nasen-Rachen-Region, die oberen und unteren Luftwege sowie der Gastrointestinaltrakt. Die **Inkubationszeit** bei SARS-CoV-2 beträgt 2 bis 14 Tage, in Einzelfällen den gegenwärtigen Erfahrungswerten zufolge, bis zu 3 Wochen.

Die rasante **Ausbreitung** des Erregers erklärt sich daraus, dass er hauptsächlich in den Schleimhautzellen des oberen Atemtraktes repliziert und damit die **Tröpfcheninfektion** der Hauptübertragungsweg ist. Als Andockstelle für das Peplomerenprotein an seinen Zielzellen dient dem Virus der **ACE-2** (Angiotensin converting Enzyme 2) **Rezeptor**. Der ACE 2 Rezeptor befindet sich auf den **Schleimhautepithelien des Atem- und Gastrointestinaltraktes** sowie der entsprechenden Zellen der Tiere, die auf dem Fischmarkt von Wuhan zum Kauf angeboten wurden, und wahrscheinlich auch weiterhin werden.

Herkunft des Virus

Aufgrund von Vergleichen der Nucleotidsequenz-Homologien von Fledermaus-, Schlangen- und Pandolin-Coronaviren sowie der des SARS-CoV Coronavirus von 2003 mit der Nucleotidsequenz des derzeit pandemisch kursierenden SARS-CoV-2 (=Wuhan Coronavirus) könnte sich dieses Virus durch Zirkulation zwischen den genannten, auf dem Fischmarkt von Wuhan präsenten Tieren, entwickelt haben oder aber es ist auf einem vergleichsweise trivialen Weg entstanden, nämlich durch einen oder mehrere Lesefehler (=Punktmutationen) der RNA-Polymerase von SARS-CoV bei der Replikation der viralen RNA in einem humanen Wirt. Ablesefehler bei der Replikation des genetischen Materials von Coronaviren sind nicht selten, da die RNA-Polymerase (=RNA-Replikationsenzym) unter dem Druck des wirtseigenen Immunsystems die Vervielfältigung des Virusgenoms in Windeseile durchführen muß, so daß es angesichts der Größe der viralen RNA von ca. 30'000 Nucleotiden, die innerhalb von Millisekunden verkettet werden müssen, zwangsläufig zu fehlerhaften Verkettungen bzw zu Verwechslungen von Nucleotiden kommt. Coronaviren haben von allen RNA-Viren das größte Genom, aber die Natur hat es so eingerichtet, daß diese Fehler dem Virus letztlich zum Vorteil gereichen, denn der Einbau eines falschen Nucleotids ist gleichbedeutend mit einer (Punkt) Mutation und dies hat zur Folge, daß sich dadurch die Struktur eines Proteins des Virus verändert, was z.B. mit einer Änderung der Antigenität des Virus einher gehen kann, so daß es sich dadurch dem Zugriff durch das Immunsystem seines Wirtsorganismus entziehen kann. Ähnlich arbeitet im übrigen auch HIV!

Wirtszellbereich, Rezeptorbindungsstellen und Reservoir von SARS CoV-2

Das in Wuhan Ende Dezember erstmals beobachtete neue Corona Virus 2019-nCoV wird nun auf Grund der Ähnlichkeit bestimmter morphologischer Charakteristika wie der 3 D-Struktur der Rezeptorbindungsstellen und anderer Struktur- und Funktionsmerkmale als Variante des SARS-CoV aufgefasst und hat die neue Bezeichnung SARS-CoV-2 erhalten. Bei dem Rezeptor für das SARS-CoV und der neuen SARS-CoV-2 Variante, handelt es sich um den ACE2-(=Angiotensin Converting Enzyme 2) Rezeptor, der sich beim Menschen auf den Bronchialepithelien befindet und der auch auf den entsprechenden Zellen von Zivets (Schleichkatzen, Abb. 4), Hufeisennasen (Fledermausart, Abb. 5), Schweinen und Pandolin (Schuppentier, Abb. 6) vorhanden ist.

Bezüglich der Identifikation des Zwischenwirts, von dem aus eine Vorstufe des SARS-CoV-2 auf den Menschen überspringen konnte, ergibt sich unter Zuhilfenahme des genetischen Codes und der Nucleotidsequenzen des genetischen Materials von SARS-CoV-2 und seiner viralen Vorläufer ein weiterer interessanter Aspekt. Und zwar zeigt ein Vergleich der codon-usages von SARS-CoV-2 mit den zellulären Codon-usages verschiedener Tierarten, dass eine **signifikante Übereinstimmung zwischen den Codon-usages von SARS-CoV-2 und den zellulären Codon-usages der chinesischen Cobra** (Naja atra) und der vielgebänderten Krait-Schlange besteht. Dies lässt sich als Hinweis auf eine besonders gute Übereinstimmung des viralen und des zellulären Stoffwechsels und der Proteinbiosynthese von SARS-CoV-2 und dem der beiden Giftschlangenarten interpretieren, so dass SARS-CoV-2 in den beiden Schlangenarten sehr gute Replikationsmöglichkeiten hätte. Außerdem ließ sich eine 50% Übereinstimmung der Nucleotidsequenz zwischen SARS-CoV-2 und dem Schlangen Coronavirus ermitteln.

Da alle genannten Tiere auf dem Fischmarkt von Wuhan angeboten wurden, hätten die viralen Vorstufen von SARS-CoV-2 beste Zirkulationsmöglichkeiten, um sich aus den Vorläuferviren wie z.B. ZC45 (bat-SL-CoVZC45) und TG 13 (bat CoVRATG13) zu der reifen Form des SARS-CoV-2 zu entwickeln.

Folglich könnte das SARS-CoV-2 Virus letztlich das **Produkt einer Wechselwirkung** sein zwischen dem genetischen Material des SARS-CoV (ca. 79,5% Nucleotidsequenz-Homologie mit SARS-CoV-2), dem verschiedener **Fledermausviren (ca.90-96% Nucleotidsequenz-Homologie mit SARS-CoV-2)** und dem Schlangen-Corona Virus (ca 50% Nucleotidsequenz-Homologie mit SARS-CoV-2) sowie den **Regulationsmechanismen zur Steuerung des zellspezifischen Nucleinsäurestoffwechsels** von Krait und Kobra (Naja atra). Als zusätzliche "Mischwirte" wären auch Zivets, Hufeisennasen, Pandolin (Schuppentier) und möglicherweise Schweine, die alle auf dem Fischmarkt in Wuhan präsent waren, in Betracht

zu ziehen, von denen als Zwischenwirt die Zivets für SARS-CoV und als Beispiel das Schwein für die Influenza Viren bereits bekannt sind.

Es ist jedoch auch denkbar, dass sich die neue Variante SARS-CoV-2 gar nicht durch Zwischenwirtspassagen der Vorläuferviren in den Fischmarkt-Tieren entwickelt hat, sondern einfach auf einem vergleichsweise trivialen Wege durch einen oder mehrere Ablesefehler (=Punktmutationen) der RNA-Polymerase von SARS-CoV bei der Replikation der viralen RNA in einem humanen Wirt.

Therapie:

Derzeit steht keine kausale Behandlungsmöglichkeit bei einer Infektion mit SARS-CoV2 zur Verfügung. Es kann lediglich eine symptomatische Therapie mit fiebersenkenden und schmerzlindernden sowie ggf. intensivmedizinischen Maßnahmen zur Anwendung gebracht werden. Eine immunprophylaktische Behandlungsmöglichkeit könnte dagegen in absehbarer Zeit zur Verfügung stehen, wenn es gelingt die Genbereiche, welche die Information für das stark immunogen wirkende Peplomerenprotein enthalten in das Adenovirus-Genom hineinzu-klonieren. Eine vergleichbare Vakzine wurde bereits zur Bekämpfung des MERS-Coronavirus entwickelt, das erstmals 2013 in Saudi-Arabien auftrat.

Das derzeit in China und 24 weiteren Ländern zirkulierende SARS-CoV-2 hat eine Letalitätsrate von ca. 2,2% in China und ca.0.2% in Nordamerika und im westeuropäischen Raum. Hauptsächlich betroffen sind ältere, multimorbide Patienten. Das Virus erzeugt jedoch immer wieder auch gravierende Verläufe mit letalem Ausgang in vitalen Individuen unterschiedlichen Alters, was sein pathogenes Potential verdeutlicht, so dass die Mutierung in eine virulentere Form nicht auszuschließen ist. Die Letalitätsraten von SARS-CoV mit 9,6% und die von MERS-CoV mit 34% zeigen jedenfalls, dass derzeit weniger den humanadaptierten als vor allem den von Tieren auf den Menschen überspringenden CoV-Stämmen eine deutlich virulentere Komponente immanent ist.

Hygiene und sonstige Präventionsmaßnahmen:

Bei Patienten mit Verdacht auf eine SARS-CoV-2 Erkrankung ist sowohl eine Prävention gegen Tröpfchen- wie auch gegen Schmierinfektionen dringend zu empfehlen, da sich Coronaviren generell auf Schleimhäuten etablieren. (Conjunctiven, Nasen-, Rachen- und Atemtrakt sowie Gi-Trakt) siehe auch: Fließschema zur Vorgehensweise in Praxis und Klinik

https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/nCoV.html

- Patienten tragen außerhalb eines Isolierzimmers einen mehrlagigen Mund-Nasen-Schutz mit korrektem Sitz
- Unterbringung von Patienten erfolgt in einem Einzelzimmer (möglichst mit eigener Nasszelle), ggf. Kohortenisolierung,
- Personal verwendet FFP2 oder FFP3 Masken, Schutzkleidung, Schutzbrille und Handschuhe
- Konsequente Einhaltung der Basishygienemaßnahmen

Handelt es sich um einen wahrscheinlichen Fall oder mittels Labordiagnostik bestätigten Fall einer Infektion, werden folgende Maßnahmen empfohlen:

- Isolierung in einem Zimmer mit Vorraum/Schleusenfunktion
- Verwendung von mindestens FFP2-Masken als Atemschutz
- Sofern in den Patientenräumen eine raumluftechnische Anlage betrieben wird, über die eine Verbreitung von Luft auf andere Räume möglich ist, ist diese abzustellen.

Gegen Schmierinfektionen sind die einschlägigen Hygienemaßnahmen zu empfehlen (Händewaschen und Desinfektion auch der benutzten Einrichtungsgegenstände etc.)

Meldepflicht

Das Bundesgesundheitsministerium hat Anfang Februar eine Eilverordnung zur Meldepflicht für das neue Coronavirus erlassen. Danach müssen Ärzte alle Verdachts-, Krankheits- und Todesfälle im Zusammenhang mit dem Virus namentlich dem örtlichen Gesundheitsamt melden. Verdachtsfälle müssen abgeklärt werden.



Abbildung 4: Zivet (Schleichkatze)



Abbildung 5: Fledermaus



Abbildung 6: Chinesische Cobra (*Naja atra*)



Abbildung 7: Schuppentier (Pangolin)