

## E. Aktivitäten in Klinischer Diagnostik Activities in Clinical Diagnostics



### Mitarbeiter(innen)/Staff

#### Ärztliche Koordination

##### Medical Coordination

- Dr. med. Klaus Korn,  
Leiter der Sektion
- PD Dr. med. Antje Knöll,  
stellvertretende Leiterin
- Dr. med. Philipp Steininger,  
Facharzt

Tel +49 (0)9131 85 3 2766

Fax: +49 (0)9131 85 3 6408

E-mail: klaus.korn@uk-erlangen.de

Homepage:

<http://www.virologie.uk-erlangen.de>

#### Weiterbildungsassistentinnen

##### Physicians in residency

- Stephanie Beileke
- Clara Maier
- Dr. med. Monika Wytopil

### Wissenschaftliche Beratung

##### Scientific Advisors

- Prof. Dr. med. Klaus Überla
- Prof. Dr. med. Armin Ensser
- Prof. Dr. rer. nat. Thomas Gramberg
- PD Dr. med. Frank Neipel

### Qualitätsmanagementbeauftragte

##### Quality Manager

- Dr. rer. physiol. Angela Nagel

### Medizinisch-technische Assistentinnen

##### Medical Technicians

- Albrecht, Jens-Christian (03/2020 -04/2023)
- Bartlime, Ariane
- Dormann, Monika
- Fey, Tanja
- Finze, Nathaly
- Holzenleuchter, Karin
- Hotter, Melanie
- Löffler, Anna-Maria
- Lorenz, Carmen
- Moestel, Regina

- Moschik, Brigitte
- Paatz, Christiane
- Peter, Corinna
- Rausch, Christina
- Schmidt, Bettina (08/2021-07/2022)
- Schmidt, Katja (09/2020-07/2023)
- Schneider, Grit
- Weigler, Vanessa

- Zank, Anke
- Ziegler, Christine

### **Verwaltung/Pforte**

#### **Administration**

- Lindenberger, Anita (bis 09/2022)
- Misir, Hülya
- Murrmann, Susanne

## **Untersuchungsspektrum/Spectrum of Laboratory Tests**

- **Indirekte Immunfluoreszenz** zum Antikörpernachweis  
*Indirect immunofluorescence for antibody detection*  
 Epstein-Barr-Virus-Capsid-Antigen IgA-Antikörper  
 Humanes Herpesvirus Typ 6 (IgG-Antikörper, IgM-Antikörper)  
 Humanes Herpesvirus Typ 7 (IgG-Antikörper, IgM-Antikörper)  
 Humanes Herpesvirus Typ 8 (IgG-Antikörper)
  
- **ELISA- (ELFA-, CLIA-, CMIA-) Tests** für den Antikörpernachweis gegen:  
*ELISA (ELFA, CLIA, CMIA) tests for the detection of antibodies against:*  
 Adenoviren (IgG- und IgA-Antikörper)  
 Cytomegalovirus (IgG- und IgM-Antikörper, IgG-Aviditätstestung)  
 Epstein-Barr-Virus (anti-VCA-IgG, anti-VCA-IgM, anti-EBNA-IgG)  
 Herpes-simplex-Virus (IgG- und IgM-Antikörper)  
 Varizella-Zoster-Virus (IgG- und IgM-Antikörper)  
 Parvovirus B19 (IgG- und IgM-Antikörper)  
 HIV-1 und HIV-2  
 HTLV-I/II (menschliche T-Zell-Leukämie-Viren)  
 Enteroviren (IgG- und IgM-Antikörper)  
 FSME-Virus (IgG- und IgM-Antikörper)  
 Mumpsvirus (IgG- und IgM-Antikörper)  
 Masernvirus (IgG- und IgM-Antikörper)  
 Rubellavirus (IgG- und IgM-Antikörper)
  
- **ELISA-/CLIA-/CMIA-Tests** in der **Hepatitis-Serologie** für folgende Parameter:  
*ELISA/CLIA/CMIA tests in hepatitis serology*  
 Hepatitis-A-Virus-Antikörper  
 Hepatitis-A-IgM-Antikörper  
 HBs-Antigen  
 HBs-Antigen (quantitativ)  
 HBe-Antigen  
 HBs-Antikörper  
 HBc-Antikörper  
 HBc-IgM-Antikörper  
 HBe-Antikörper  
 Hepatitis-C-Virus-Antikörper  
 Hepatitis-Delta-Antikörper  
 Hepatitis-E-Virus-IgG-Antikörper  
 Hepatitis-E-Virus-IgM-Antikörper

■ **Immunchromatografische Schnelltests**

**Rapid immunochromatographic tests** for the detection of antibodies/antigens für den Antikörpernachweis gegen Dengue-Virus Typ 1-4 (IgG- und IgM-Antikörper) zum Nachweis von Denguevirus-NS1-Antigen zum Nachweis (Bestätigung und Differenzierung) von Antikörpern gegen HIV-1 und HIV-2

■ **Immunoblot-Tests** zum Antikörpernachweis für folgende Viren:

**Immunoblot assays** for antibody detection against the following viruses:

Bunya-/Hantaviren (IgG, IgM für Hantaan-Virus, Puumala-Virus, Dobrava-Virus, Seoul-Viren und Sandfliegenfieber-Virus Toscana)

Hepatitis-C-Virus

Hepatitis-E-Virus (IgG- und IgM-Antikörper)

Herpes simplex-Virus Typ 1 und 2 (typspezifische Antikörper)

HTLV-1 (menschliches T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1) und HTLV-2

Parvovirus B19 (IgG- und IgM-Antikörper)

Tropische Fieber-Viren (IgG und IgM für Chikungunya-, Dengue- und Zikavirus)

■ **Nachweis viraler Nukleinsäure** mittels **PCR** oder anderen Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden für folgende Erreger:

**Detection of viral nucleic acids** using PCR or other nucleic acid amplification methods

Herpes simplex-Viren Typ 1 und 2

Varizella-Zoster-Virus

Cytomegalovirus

Epstein-Barr-Virus

Humanes Herpesvirus Typ 6 und 7

Humanes Herpesvirus Typ 8 (Kaposi-Sarkom-assoziiertes-Herpesvirus)

Adenoviren

Parvovirus B19

Humane Papillomviren

Polyomaviren BK und JC

Merkelzell-Polyomavirus

Trichodysplasia spinulosa-Virus

Orthopoxviren

Parapoxviren

Influenzaviren A und B

Spezifischer Nachweis der Hämagglutinin-Gene von Influenza A H1N1pdm2009, saisonaler Influenza A H3 sowie aviärer Influenza A H5 und H7

Parainfluenzaviren 1-4

Respiratory-Syncytial-Virus

Enteroviren

Parechoviren

Rhinoviren

Metapneumoviren

SARS-Coronavirus 2

Saisonale Coronaviren (OC43, 229E, NL63 und HKU1)

Mumpsvirus

Rubellavirus

Astroviren

Noroviren Genogruppe 1 und 2

Rotaviren  
Chikungunya-Virus  
Denguevirus  
FSME-Virus  
West-Nil-Virus  
Zikavirus  
HIV-1 und HIV-2  
HTLV-1 und HTLV-2  
Hepatitis-A-Virus  
Hepatitis-B-Virus  
Hepatitis-C-Virus  
Hepatitis-Delta-Virus  
Hepatitis-E-Virus

■ **Genotypisierungen und Tropismusbestimmungen**

**Genotyping and testing of viral tropism**

Adenovirus-Typisierung (Sequenzanalyse)  
Denguevirus-Typisierung (Sequenzanalyse)  
Enterovirus-Typisierung (Sequenzanalyse)  
Parechovirus-Typisierung (Sequenzanalyse)  
HAV-Genotypisierung (Sequenzanalyse)  
HBV-Genotypisierung (Sequenzanalyse)  
HCV-Genotypisierung (Sequenzanalyse)  
HEV-Genotypisierung (Sequenzanalyse)  
HIV-1- und HIV-2-Subtypisierung (Sequenzanalyse)  
Bestimmung des Korezeptor-Tropismus von HIV-1 durch Sequenzanalyse  
HPV-Typisierung (typespezifische PCR und Sequenzanalyse)

■ **Untersuchungen zum Nachweis von Resistenzen gegen Virostatika**

**Antiviral drug resistance testing**

Genotypische Resistenzbestimmung für HIV-1 durch Sequenzierung und Analyse des Mutationsprofils

- Proteaseinhibitoren
- Reverse Transkriptase-Inhibitoren
- Integrase-Inhibitoren

Genotypische Resistenzbestimmung für HBV durch Sequenzierung und Analyse des Mutationsprofils

Genotypische Resistenzbestimmung (Ganciclovir) für CMV durch Sequenzierung des UL97-Gens und Analyse des Mutationsprofils

Genotypische Resistenzbestimmung (Aciclovir) für HSV-1 durch Sequenzierung des Thymidinkinase-Gens und Analyse des Mutationsprofils

**Auf Anfrage stellen wir Ihnen gerne unsere „Hinweise für die Einsender“ und ein ausführliches Leistungsspektrum zur Verfügung.**

## Probenaufkommen und besondere Entwicklungen

Der Berichtszeitraum von 2019 bis 2023 war natürlich geprägt durch die SARS-CoV-2-Pandemie, die unser diagnostisches Labor vor extreme Herausforderungen stellte. Diese sollen hier in einer kurzen Chronologie dargestellt werden:

- Nachdem das Labor von Prof. Christian Drosten an der Charité in Berlin am 20. Januar 2020 ein Protokoll zum Nachweis des neuen, damals noch als **2019-nCoV** bezeichneten Virus mit verschiedenen Primer/Sonden-Sets für die real-time-PCR veröffentlicht hatte, haben wir die entsprechenden Reagenzien umgehend bestellt und konnten schon eine Woche später, am 27. Januar 2020, die ersten Proben mit den neuen real-time-PCR-Assays testen. Diese Testung ließ sich auch problemlos in unseren Arbeitsablauf integrieren und konnte zusammen mit anderen real-time-PCR-Testungen für respiratorische Viren und Gastroenteritis-Viren im gleichen Lauf durchgeführt werden. In den ersten Wochen war das Probenaufkommen noch überschaubar und die Indikationen reichten von tatsächlichen Reiserückkehrern aus China bis zu sehr vagen Verdachtsfällen („arbeitet in der Passkontrolle am Flughafen, da kommen ja auch Leute aus China vorbei“). Einen Monat nach Beginn der SARS-CoV-2-PCR-Testungen änderte sich das dann schlagartig mit dem ersten diagnostizierten Fall einer SARS-CoV-2-Infektion in Erlangen. Dieser zog zunächst umfangreiche Untersuchungen bei einer großen Zahl von Kontaktpersonen nach sich, bei denen aber keine weitere Infektion festgestellt werden konnte. Es folgten jedoch in den nächsten Tagen eine Reihe weiterer positiver Befunde bei Reiserückkehrern aus Norditalien und dann auch aus Österreich sowie eine überbordende Anzahl von Testanfragen, die wir in dieser ersten Phase mangels Reagenzien- und Gerätekapazitäten teilweise auch abschlägig bescheiden mussten. Ein großer Glücksfall war dann die

Möglichkeit, in Kooperation mit der Abteilung für Transfusionsmedizin auf deren ursprünglich für die PCR-Testung auf HIV und Hepatitisviren bei Blutspendern angeschafften Großgerät auch SARS-CoV-2-real-time-PCR-Testungen in größerem Maßstab durchführen zu können. Damit konnten wir unsere Kapazitäten schon ab dem 23. März 2020 erheblich erweitern, und wir haben im Rahmen dieser Zusammenarbeit, für die ich mich bei allen beteiligten Kolleg(inn)en in der Transfusionsmedizin nochmals ganz herzlich bedanken möchte, bis zum 30.03.2023 fast 200.000 Proben getestet, was etwa der Hälfte aller SARS-CoV-2-PCR-Tests entspricht, die wir in den Jahren 2020-2023 durchgeführt haben.

- Eine besonders schwierige Phase galt es dann zum Jahresende 2020 hin zu bewältigen, als die Fallzahlen und damit auch die Testanforderungen für die SARS-CoV-2-PCR nach einigen Monaten der Entspannung im Sommer stark anstiegen und gleichzeitig bei den Herstellern große Kapazitätsprobleme auftraten, so dass die Versorgung mit den notwendigen Testkits zu einem größeren logistischen Problem wurde. Mit der Inbetriebnahme eines zweiten Großgerätes in unserem eigenen Labor konnte dann auch diese Situation gemeistert werden, so dass im Winter 2021/2022, als durch das Auftreten der Omikron-Varianten die Testzahlen das Niveau des vorherigen Winters sogar noch übertrafen, keine vergleichbare Mangelsituation mehr auftrat.

- Als zweite Herausforderung in der SARS-CoV-2-Pandemie präsentierte sich ab Anfang des Jahres 2021 die Untersuchung auf **SARS-CoV-2-Varianten**, angefangen mit der sog. „britischen“ Variante, die später offiziell als B.1.1.7- bzw. „Alpha“-Variante bezeichnet wurde. Hier haben wir zunächst versucht, diese mit selbst entwickelten

mutationsspezifischen PCR-Tests von der ursprünglichen „Wuhan-Variante“ zu unterscheiden, konnten aber recht bald auf kommerzielle Tests zurückgreifen, die sukzessive auch den Nachweis der Beta-, Gamma-, Delta- und Omikron-Variante sowie auch die Differenzierung der beiden ersten Omikron-Subvarianten BA.1 und BA.2 ermöglichten. Mit diesen mutationsspezifischen PCR-Tests war es möglich, eine sehr schnelle Identifizierung der Varianten zu erreichen, in der Regel am Tag nach dem Vorliegen des positiven PCR-Ergebnisses, teilweise sogar schon am gleichen Tag. Ab dem Frühjahr 2022 war es dann aber so, dass die sehr starke Aufspaltung der Omikron-Variante in zahlreiche Subvarianten mit immer wieder neuen Mutationsmustern die Möglichkeiten der mutationsspezifischen PCR-Testung überstieg. Daher haben wir diese Testungen dann eingestellt und uns auf die Untersuchung einer zufälligen Auswahl der neuen positiven Proben mittels Vollgenomsequenzierung beschränkt. Diese Methode ist deutlich zeit- und kostenaufwändiger als die Varianten-Testung mit mutationsspezifischen PCRs, ermöglicht aber dafür eine zuverlässige Erkennung und Differenzierung auch von sehr komplexen Mutationsmustern.

■ Die nächste Herausforderung für unsere Diagnostik ergab sich im Jahr 2022 mit dem Auftreten von Erkrankungsfällen durch Affenpocken-Viren, die mittlerweile als **Mpox-Erkrankungen** bezeichnet werden. Nachdem im Mai 2022 erstmals über das gehäufte Auftreten von Mpox-Erkrankungen außerhalb der endemischen Regionen in Afrika berichtet wurde, wurden wir auch kurze Zeit später mit einem ersten Verdachtsfall konfrontiert. Wir konnten noch am Tag des Probeneingangs mit einer schon vor vielen Jahren etablierten konventionellen Orthopoxvirus-PCR die Diagnose einer Orthopoxvirus-Infektion stellen und hatten am nächsten Tag bereits das Resultat der Sequenzierung des entsprechenden PCR-Produkts vorliegen, da

mit dem Ergebnis „Affenpockenvirus, westafrikanische Linie“ die Diagnose endgültig sicherte. Für die weiteren Verdachtsfälle, die ab Mitte Juni zur Diagnostik kamen, konnten wir dann bereits auf neu etablierte real-time-PCRs zurückgreifen, mit denen die Diagnose noch schneller gestellt werden konnte. Insgesamt haben wir bis Mitte September 2022 21 Fälle von Affenpockenvirus-Infektionen diagnostiziert. Die Charakteristika dieser Patienten entsprachen ganz dem auch in größeren Fallserien beobachteten Muster (alle männlich, mittleres Alter ca. 40 Jahre, knapp die Hälfte mit bekannter HIV-Infektion). Als Probenmaterial war bei allen Patienten Abstrichmaterial von Läsionen vorhanden, bei einem Teil der Patienten konnten wir zusätzlich auch Rachenabstriche und/oder EDTA-Blut untersuchen. Im Gegensatz zu Covid-19 konnte diese Infektionswelle jedoch rasch eingedämmt werden. Schon ab Anfang August nahmen die Einsendezahlen bei uns deutlich ab, und nach dem 15.09.2022 haben wir keinen weiteren Fall mehr gesehen. Auch deutschlandweit gingen die Fallzahlen vom Maximum mit 424 Mpox-Fällen in der KW 28 (Mitte Juli 2022) bereits bis Mitte Oktober 2022 auf einstellige Werte zurück und blieben bis heute auf diesem sehr niedrigen Niveau. Für diesen raschen Rückgang der Fallzahlen waren sicherlich mehrere Faktoren verantwortlich. Zum einen ist für die Übertragung von Mpox-Infektionen offensichtlich ein relativ enger Kontakt erforderlich (die meisten Infektionen sind vermutlich sexuell übertragen). Außerdem wurden die Mpox-Infektionen in der hauptsächlich betroffenen Gruppe von Männern, die Sex mit Männern haben, als ein neues Risiko wahrgenommen, was auch zumindest vorübergehend zu einer Änderung von Verhaltensweisen geführt hat. Und nicht zuletzt stehen mit den gegen die echten Pocken (Variola major) entwickelten Impfstoffen auf der Basis des „Modifizierten Vacciniavirus Ankara“ (MVA) auch gegen Mpox-Viren sehr

effektive Impfstoffe mit guter Verträglichkeit zur Verfügung, die in den Haupt-Risikogruppen auch in größerem Umfang eingesetzt wurden.

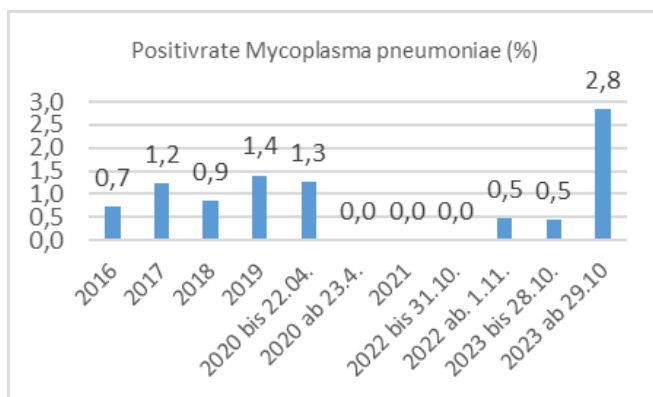
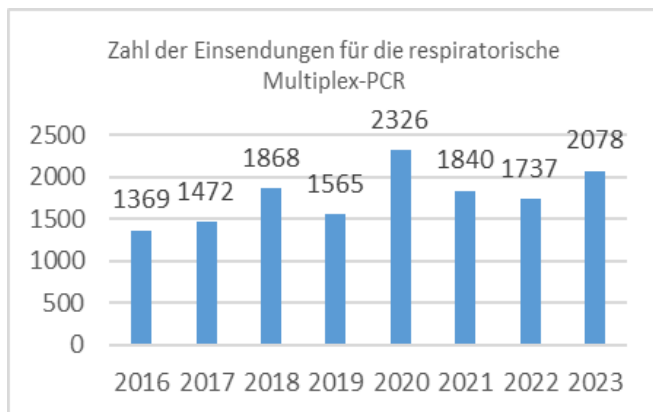
■ Was uns darüber hinaus im Berichtszeitraum immer wieder in Erstaunen versetzte, waren die vielfältigen **Auswirkungen, die die SARS-CoV-2-Pandemie bzw. die Maßnahmen zu ihrer Eindämmung auf andere Infektionskrankheiten** hatten. So führten die Maßnahmen zur Kontaktbeschränkung, die im März 2020 ergriffen wurden, zu einem abrupten Ende der Influenza-Erkrankungswelle der Saison 2019/2020. Mit weiteren Maßnahmen wie der Maskenpflicht in verschiedenen Bereichen des beruflichen und privaten Lebens und breit angelegten Kampagnen zur Propagierung verschiedener Hygiene-Maßnahmen – insbesondere auch zur Hände- und Flächendesinfektion – führte dies dazu, dass es im Winter 2020/2021 praktisch keine Fälle von Influenza- und auch Respiratory syncytial-Virus (RSV)-Infektionen gab. Aus dem Infektionsepidemiologischen Jahrbuch meldepflichtiger Infektionskrankheiten des Robert-Koch-Instituts für das Jahr 2020 lässt sich außerdem ersehen, dass in diesem Jahr praktisch alle meldepflichtigen Infektionskrankheiten im Vergleich zum Mittel der vorhergehenden 5 Jahre deutlich abgenommen haben. Besonders ausgeprägt war dies wie zu erwarten bei reiseassoziierten Infektionen wie Denguefieber, Shigellose oder Malaria, aber auch die viralen Gastroenteritiden verzeichneten starke Rückgänge von 75 % bis 80 %. Die einzige meldepflichtige Infektionskrankheit, die 2020 eine Zunahme der Inzidenz im Vergleich zu den Vorjahren zeigte, war die FSME. Auch dies überrascht nicht, da bei dieser Zeckenübertragenen Erkrankung keine relevanten Auswirkungen der Hygienemaßnahmen zu erwarten sind und zum anderen aufgrund der stark eingeschränkten Möglichkeiten für Auslands- und Fernreisen und der

Beschränkung vieler Freizeit-Aktivitäten im Innenbereich und der Absage von Großveranstaltungen von einer erhöhten Zecken-Exposition in der heimischen Umgebung auszugehen ist. Während diese Auswirkungen der SARS-CoV-2-Restriktionen im ersten Pandemie-Jahr nicht unerwartet waren, zeigten sich in den Folgejahren dann überraschende Anstiege bei verschiedenen Infektionskrankheiten, die in dieser Form doch teils sehr überraschend waren. Zunächst zeigte sich beginnend im August 2021 ein starker Anstieg von Erkrankungen durch RSV. Eine solche Häufung von RSV-Infektionen zu dieser Jahreszeit war äußerst ungewöhnlich; normalerweise fängt die RSV-Saison erst im November oder Dezember an. Auch die folgende RSV-Saison 2022/2023 begann früher als üblich bereits Anfang Oktober und führte zu besonders vielen schweren Verläufen, die stationäre Behandlung benötigten, wodurch es zu einer starken Überlastung der Kinderkliniken kam.

■ Auch eine Reihe von überwiegend respiratorisch übertragenen bakteriellen Infektionskrankheiten zeigten im Zuge der SARS-CoV-2-Pandemie zunächst deutlich niedrigere Fallzahlen, die dann von einem starken Anstieg gefolgt waren. Als erstes kam es schon im zweiten Halbjahr 2021 zu einem Wiederanstieg der Fälle von ambulant erworbener Pneumonie durch Pneumokokken. Im Winter 2022/2023 folgte dann ein sehr starker Anstieg der Fallzahlen von Erkrankungen durch *Streptococcus pyogenes* und *Haemophilus influenzae*, der auch das präpandemische Niveau noch deutlich übertraf. Zeitlich noch später, nämlich seit November 2023, fanden wir in unseren eigenen Einsendungen einen deutlichen Anstieg der Fälle einer weiteren bakteriellen respiratorischen Infektion, der Mycoplasmen-Pneumonie. Da Mycoplasma pneumoniae Teil eines Multiplex-PCR-Panels für eine große Zahl viraler respiratorischer Erreger ist, haben wir hier

über die letzten 10 Jahre umfangreiche Daten sammeln können. In den Jahren 2016 bis 2019 schwankte die Positivrate für *Mycoplasma pneumoniae* in der respiratorischen Multiplex-PCR um 1 %, bis dann in der Pandemiezeit von April 2020 bis zum Oktober 2022 kein einziger Fall von *Mycoplasma pneumoniae* mehr registriert wurde bei weiterhin ähnlich hoher Testzahl. Von November 2022 bis Oktober 2023 wurden dann wieder Fälle registriert, allerdings lag die Positivrate mit 0,5 % etwas niedriger als vor der Pandemie. Ab November 2023 zeigt sich dann ein sehr deutlicher Anstieg der Positivrate auf 2,8 %, der sich nach Ende des Berichtszeitraums auch im Jahr 2024 weiter fortsetzte.

Eine ähnliche Entwicklung zeigte sich noch für einen viralen Erreger, der zwar üblicherweise nicht zu Atemwegserkrankungen führt, aber auch über Tröpfcheninfektion und Aerosole übertragen wird, das humane Parvovirus B19.





Auch hier zeigte sich in vielen diagnostischen Laboratorien nach fast 3 Jahren nahezu ohne akute Parvovirus-B19-Infektionen eine ungewöhnlich hohe Zahl von Erkrankungen ab November 2023, die in den ersten Monaten 2024 noch weiter zunahm. In unserem Klientel mit vorwiegend stationären Patienten betraf dies vor allem Kinder mit angeborener Sphärozytose (Kugelzellanämie), die im Rahmen einer akuten Parvovirus-B19-Infektion schwere aplastische Krisen entwickeln können und auch Kinder (in Einzelfällen auch Erwachsene) nach Organtransplantation, bei denen Parvovirus B19 akute und manchmal auch chronische Anämien verursachen kann.

■ Die Ursachen dieser unerwarteten Anstiege verschiedener Infektionskrankheiten sind sicherlich vielfältig. Die größte Rolle spielt vermutlich die Tatsache, dass durch die Maßnahmen zur Eindämmung der Covid-19-Pandemie, die ja gerade auch Schulen

und Kinderbetreuungseinrichtungen besonders betrafen, einige Jahrgänge von (Klein-)kindern gegenüber verschiedenen Erregern kaum exponiert waren, so dass hier größere susceptible Populationen entstanden sind, in denen sich je nach Kontagiosität des Erregers, dem Vorhandensein noch bestehender Immunität aus vorpandemischer Zeit und anderen Faktoren mehr oder weniger schnell ein Nachholeffekt mit stark steigenden Fallzahlen ergibt. Auch dadurch, dass nun möglicherweise häufiger Mehrfachinfektionen mit verschiedenen Erregern auftraten, könnte es vermehrt zu schwereren und daher eher diagnostizierten Infektionen kommen. Ein gewisser Teil der jetzt beobachteten Anstiege geht vermutlich auch auf die durch die Pandemie erweiterten Möglichkeiten der Diagnostik und auf eine zunehmende „Awareness“ zurück und lässt die sicherlich tatsächlich vorhandene Zunahme der Fallzahlen größer erscheinen, als sie tatsächlich ist.

## Trends and particular events in viral diagnostics

The reporting period from 2019 to 2023 was of course dominated by the SARS-CoV-2 pandemic, which presented extreme challenges for our diagnostic laboratory. These are presented here in a brief chronology:

- After Prof. Christian Drosten's laboratory at the Charité in Berlin published a protocol for detecting the new virus, then still referred to as **2019-nCoV**, with various primer/probe sets for real-time PCR on January 20, 2020, we immediately ordered the corresponding reagents and were able to test the first samples with the new real-time PCR assays just one week later, on January 27, 2020. This test could also be easily integrated into our workflow and could be performed together with other real-time PCR tests for respiratory viruses and gastroenteritis viruses in the same run. In the first few weeks, the volume of samples was still manageable and the indications ranged from actual travelers returning from China to very vague suspected cases (“works in passport control at the airport, people from China also pass through there”). One month after the start of SARS-CoV-2 PCR testing, this changed abruptly with the first diagnosed case of SARS-CoV-2 infection in Erlangen. This initially led to extensive testing of a large number of contact persons, but no further infection could be detected. However, this was followed in the next few days by a series of further positive findings in travelers returning from northern Italy and then also from Austria, as well as an overflowing number of test requests, some of which we had to turn down in this first phase due to a lack of reagent and equipment capacity. A great stroke of luck was the opportunity to be able to carry out SARS-CoV-2 real-time PCR tests on a larger scale in cooperation with the Department of Transfusion Medicine on its large-scale equipment originally purchased for PCR testing for HIV and hepatitis viruses in blood donors.

This enabled us to significantly expand our capacities as early as March 23, 2020, and during this successful collaboration, for which I would like to thank all colleagues from the Department of Transfusion Medicine who were involved in this testing once again, we have tested almost 200,000 samples by March 30, 2023, which corresponds to around half of all SARS-CoV-2 PCR tests that we carried out in the years 2020-2023.

- A particularly difficult phase then had to be overcome towards the end of 2020, when the number of cases and thus also the test requirements for SARS-CoV-2 PCR rose sharply after a few months of relaxation in the summer and at the same time major capacity problems arose at the manufacturers, so that the supply of the necessary test kits became a major logistical problem. With the installation of a second large-scale device in our own laboratory, this situation could also be overcome, so that in the winter of 2021/2022, when the test numbers even exceeded the level of the previous winter due to the emergence of the Omicron variants, there was no longer a comparable shortage situation.

- The second challenge in the SARS-CoV-2 pandemic from the beginning of 2021 was testing for **SARS-CoV-2 variants**, starting with the so-called “British” variant, which was later officially referred to as the B.1.1.7 or “alpha” variant. We initially tried to distinguish this from the original “Wuhan variant” using mutation-specific PCR tests developed in-house, but were soon able to use commercial tests that successively enabled the detection of the beta, gamma, delta and omicron variants as well as the differentiation of the first two omicron sub-variants BA.1 and BA.2. With these mutation-specific PCR tests, it was possible to identify the variants very quickly, usually on the day after the positive PCR result was available, sometimes even on the same day.

From spring 2022 onwards, however, the very strong fragmentation of the Omikron variant into numerous sub-variants with constantly new mutation patterns exceeded the possibilities of mutation-specific PCR testing. We therefore discontinued these tests and restricted ourselves to testing a random selection of the new positive samples using whole genome sequencing. This method is significantly more time-consuming and costly than variant testing with mutation-specific PCRs, but enables reliable detection and differentiation of even very complex mutation patterns.

■ The next challenge for our diagnostics came in 2022 with the occurrence of cases of disease caused by monkeypox viruses, which are now referred to as **Mpox infections**. After the first report of an increased incidence of Mpox cases outside the endemic regions in Africa in May 2022, we were confronted with our first suspected case shortly afterwards. We were able to diagnose an orthopoxvirus infection on the day the sample was received using a conventional orthopoxvirus PCR established many years ago and had the result of the sequencing of the corresponding PCR product available the next day, with the result “monkeypox virus, West African lineage” definitively confirming the diagnosis. For the other suspected cases that were diagnosed from mid-June, we were then able to use newly established real-time PCRs, which allowed us to make the diagnosis even more quickly. By mid-September 2022, we had diagnosed a total of 21 cases of Mpox virus infection. The characteristics of these patients fully corresponded to the pattern also observed in larger case series (all male, mean age approx. 40 years, almost half with known HIV infection). Swab material from lesions was available as specimen in all patients, and in some of the patients we were also able to examine throat swabs and/or EDTA blood. In contrast to Covid-19, however, this wave of infection was quickly contained. From the beginning of August,

the number of cases submitted to us fell significantly and we did not see any more cases after 15.09.2022. The number of cases across Germany also fell from a peak of 424 Mpox cases in week 28 (mid-July 2022) to less than 10 cases per week by mid-October 2022 and has remained at this very low level to date. Several factors were certainly responsible for this rapid decline in case numbers. Firstly, relatively close contact is obviously required for the transmission of Mpox infections (most infections are presumably sexually transmitted). Furthermore, in the mainly affected group of men who have sex with men, Mpox infections were perceived as a new risk, which also led to a change in behavior, at least temporarily. And last but not least, the vaccines developed against smallpox (*Variola major*) based on the “modified vaccinia virus Ankara” (MVA) are also very effective against Mpox viruses with good tolerability, and they have been used to a large extent in the main risk groups.

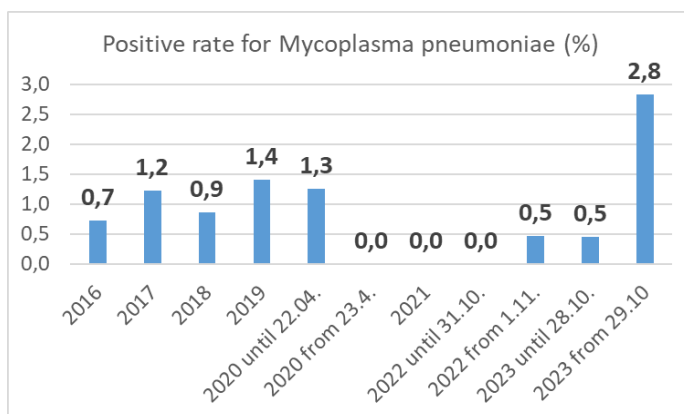
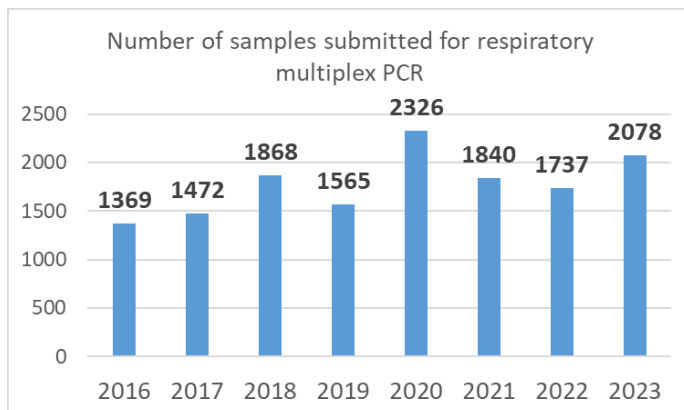
■ What also astonished us on several occasions during the reporting period was the diverse **impact that the SARS-CoV-2 pandemic and the measures taken to contain it had on other infectious diseases**. The contact restriction measures implemented in March 2020, for example, led to an abrupt end to the wave of influenza infections in the 2019/2020 season. With further measures such as the mandatory wearing of masks in various areas of professional and private life and broad-based campaigns to promote various hygiene measures - including hand and surface disinfection in particular - this led to a virtual disappearance of cases of influenza and respiratory syncytial virus (RSV) infections in the winter of 2020/2021. The Robert Koch Institute's Infection Epidemiology Yearbook of Notifiable Infectious Diseases for 2020 also shows that almost all notifiable infectious diseases decreased significantly in this year compared to the average of the previous five years. As expected, this was particularly

pronounced for travel-associated infections such as dengue fever, shigellosis or malaria, but viral gastroenteritis also recorded sharp declines of 75 % to 80 %. The only notifiable infectious disease that showed an increase in incidence in 2020 compared to previous years was tick-borne encephalitis. This is also not surprising, as no relevant effects of the hygiene measures are to be expected for this tick-borne disease and, on the other hand, increased exposure to ticks in the domestic environment can be assumed due to the severely restricted opportunities for foreign and long-distance travel and the restriction of many indoor leisure activities and the cancellation of the major events. While these effects of the SARS-CoV-2 restrictions were not unexpected in the first year of the pandemic, the following years saw surprising increases in various infectious diseases, some of which were very surprising in this form. Initially, starting in August 2021, there was a sharp rise in RSV infections. Such an accumulation of RSV infections at this time of year is very unusual; the RSV season normally starts in late November or early December. The following RSV season in 2022/2023 also started earlier than usual at the beginning of October and led to a particularly large number of severe cases requiring inpatient treatment, resulting in a severe overload of children's hospitals.

■ A number of predominantly respiratory bacterial infectious diseases also initially showed significantly lower case numbers in the course of the SARS-CoV-2 pandemic, which were then followed by a sharp increase. The first event recognized was a resurgence in cases of community-acquired pneumonia caused by pneumococci in the second half of 2021. This was followed in the winter of 2022/2023 by a very sharp rise in the number of cases of infections with *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae*, which also significantly exceeded the pre-pandemic level. Even later, namely since November 2023, we found a significant increase in cases of

another bacterial respiratory infection, *Mycoplasma pneumoniae*, in our own submissions. As *Mycoplasma pneumoniae* is part of a multiplex PCR panel for a large number of viral respiratory pathogens, we have been able to collect extensive data here over the last 10 years. In the years 2016 to 2019, the positive rate for *Mycoplasma pneumoniae* in the respiratory multiplex PCR fluctuated around 1 % until the pandemic period from April 2020 to October 2022, when not a single case of *Mycoplasma pneumoniae* was registered while the number of tests remained similarly high (see figure). From November 2022 to October 2023, cases were registered again, although the positive rate of 0.5% was slightly lower than before the pandemic. From November 2023, there was then a very significant increase in the positive rate to 2.8%, which rose to even higher levels in 2024 after the end of the reporting period.

■ A similar trend was seen for a viral pathogen that does not usually lead to respiratory diseases but is also transmitted via droplet infection and aerosols, human parvovirus B19. Here too, after almost 3 years with virtually no acute parvovirus B19 infections, many diagnostic laboratories noted an unusually high number of cases from November 2023, which increased even further in the first months of 2024. In our clientele of predominantly inpatients, this mainly affected children with congenital spherocytosis, who can develop severe aplastic crises as part of an acute parvovirus B19 infection, and also children (in a few cases also adults) after organ transplantation, in whom parvovirus B19 can cause acute and sometimes chronic anemia.



■ The reasons for these unexpected increases in various infectious diseases are certainly manifold. The biggest role is probably played by the fact that the measures to contain the Covid-19 pandemic, which particularly affected schools and childcare facilities, meant that some cohorts of (young) children were almost unexposed to various pathogens, resulting in larger susceptible populations in which, depending on the contagiousness of the pathogen, the presence of existing immunity from the pre-pandemic period and other factors, a catch-up effect with sharply rising case numbers occurred sooner or later after the gradual lifting of the containment measures. The fact that multiple infections with different pathogens may now be occurring more frequently could also lead to more severe

and therefore more frequently diagnosed infections. A certain proportion of the increases now being observed is presumably also due to the expanded diagnostic options resulting from the pandemic and increasing awareness, making the actual increase in case numbers appear greater than it actually is.

## Ausgewählte Publikationen/ Selected References

- v14061168. PMID: 35746640; PMCID: PMC9228731.
- Steininger P, Korn K, Hackstein H, Strasser EF. Validation of a Parvovirus B19 NAT Assay for Screening of Umbilical Cord Blood for Allogenic Hematopoietic Stem Cell Donation. *Transfus Med Hemother.* 2023 Aug 30;51(1):48-51. doi:10.1159/000532073. PMID: 38314242; PMCID: PMC10836944.
  - Steininger P, Ensser A, Knöll A, Korn K. Results of Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) Diagnostics in an Endemic Area in Southern Germany, 2007 to 2022. *Viruses.* 2023 Nov 30;15(12):2357. doi: 10.3390/v15122357. PMID: 38140598; PMCID: PMC10748111.
  - Cordsmeier A, Jungnickl D, Herrmann A, Korn K, Ensser A. Analysis of SARS-CoV-2 Spike Protein Variants with Recombinant Reporter Viruses Created from a Bacmid System. *Int J Mol Sci.* 2023 May 2;24(9):8156. doi:10.3390/ijms24098156. PMID: 37175863; PMCID: PMC10179725.
  - Steininger P, Herbst L, Bihlmaier K, Willam C, Körper S, Schrezenmeier H, Klüter H, Pfister F, Amann K, Weiss S, Krüger DH, Zimmermann R, Korn K, Hofmann J, Harrer T. Fatal Puumala Hantavirus Infection in a Patient with Common Variable Immunodeficiency (CVID). *Microorganisms.* 2023 Jan 21;11(2):283. doi:10.3390/microorganisms11020283. PMID: 36838248; PMCID: PMC9966676.
  - Bertram R, Grebenstein L, Gualdi S, Seibold B, Birkmann R, Korn K, Bisping J, Schabik R. Detection of asymptomatic SARS-CoV-2 infections in daycare centers, schools, and companies for regional pandemic containment by a PCR testing laboratory cooperative between July 2021 and June 2022. *GMS Hyg Infect Control.* 2022 Dec 6;17:Doc22. doi: 10.3205/dgkh000425. PMID: 36570819; PMCID: PMC9761790.
  - Einhauser S, Peterhoff D, Beileke S, Günther F, Niller HH, Steininger P, Knöll A, Korn K, Berr M, Schütz A, Wiegrebe S, Stark KJ, Gessner A, Burkhardt R, Kabesch M, Schedl H, Küchenhoff H, Pfahlberg AB, Heid IM, Gefeller O, Überla K, Wagner R. Time Trend in SARS-CoV-2 Seropositivity, Surveillance Detection- and Infection Fatality Ratio until Spring 2021 in the Tirschenreuth County-Results from a Population-Based Longitudinal Study in Germany. *Viruses.* 2022 May27;14(6): 1168. doi: 10.3390/
  - Meier H, Bauer C, Finkenzeller W, Nentwich J, Städt M, Steininger P, Korn K, Ensser A, Erbguth F. Die Borna-Virus-Enzephalitis als Differenzialdiagnose zur seronegativen Autoimmunenzeephalitis [Bornavirus encephalitis as a differential diagnosis to seronegative autoimmune encephalitis]. *Nervenarzt.* 2022 Aug;93(8):835-837. German. doi: 10.1007/s00115-021-01259-x. Epub 2022 Jan 13. Erratum in: *Nervenarzt.* 2022 Apr 22. PMID: 35024881; PMCID: PMC8756745.
  - Kremer AE, Kremer AN, Willam C, Vökl S, Verhagen J, Achenbach S, van der Meijden ED, Lang V, Aigner M, Maier C, Tenbusch M, Korn K, Lutzn-Geyer G, Spoerl S, Strauß R, Vetter M, Überla K, Neurath MF, Mackensen A, Schiffer M, Hackstein H. Successful treatment of COVID-19 infection with convalescent plasma in B-cell-depleted patients may promote cellular immunity. *Eur J Immunol.* 2021 Oct;51(10):2478-2484. doi: 10.1002/eji.202149277. Epub 2021 Sep 3. PMID: 34350584; PMCID: PMC8420096.
  - Wollschläger P, Todt D, Gerlitz N, Pfaender S, Bollinger T, Sing A, Dangel A, Ackermann N, Korn K, Ensser A, Steinmann E, Buhl M, Steinmann J. SARS-CoV-2 N gene dropout and N gene Ct value shift as indicator for the presence of B.1.1.7 lineage in a commercial multiplex PCR assay. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Sep;27(9):1353.e1-1353.e5. doi: 10.1016/j.cmi.2021.05.025. Epub 2021 May 24. PMID: 34044153; PMCID: PMC8142743.
  - Groß M, Speckmann C, May A, Gajardo-Carrasco T, Wustrau K, Maier SL, Panning M, Huzly D, Agaimy A, Bryceson YT, Choo S, Chow CW, Dückers G, Fasth A, Fraitag S, Gräwe K, Haxelmans S, Holzinger D, Hudowenz O, Hübschen JM, Khurana C, Kienle K, Klifa R, Korn K, Kutzner H, Lämmermann T, Ledig S, Lipsker D, Meeths M, Naumann-Bartsch N, Rascon J, Schänzer A, Seidl M, Tesi B, Vauloup-Fellous C, Vollmer-Kary B, Warnatz K, Wehr C, Neven B, Vargas P, Sepulveda FE, Lehmborg K, Schmitt-Graeff A, Ehl S. Rubella vaccine-induced granulomas are a novel phenotype with incomplete penetrance of genetic defects in cytotoxicity. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Jan;149(1):388-399.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2021.05.007. Epub 2021 May 24. PMID: 34033843.

- Steininger PA, Seifert F, Balk S, Kuramatsu J, Kremer AE, Coras R, Engelhorn T, Maier C, Tenbusch M, Korn K, Ensser A. Pearls & Oysters: SARS-CoV-2 Infection of the CNS in a Patient With Meningeosis Carcinomatosa. *Neurology*. 2021 Mar 9;96(10):496-499. doi: 10.1212/WNL.00000000000011357. Epub 2020 Dec 8. PMID: 33293385.
- Ziegler K, Steininger P, Ziegler R, Steinmann J, Korn K, Ensser A. SARS-CoV-2 samples may escape detection because of a single point mutation in the N gene. *Euro Surveill*. 2020 Oct;25(39): 2001650. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.39.2001650. PMID: 33006300; PMCID: PMC7531073.
- Goerig NL, Frey B, Korn K, Fleckenstein B, Überla K, Schmidt MA, Dörfler A, Engelhorn T, Eyüpoglu I, Rühle PF, Putz F, Semrau S, Gaipf US, Fietkau R. Early Mortality of Brain Cancer Patients and its Connection to Cytomegalovirus Reactivation During Radiochemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2020 Jul 1;26(13):3259-3270. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3195. Epub 2020 Feb 14. PMID:32060103.
- Nagel A, Dimitrakopoulou E, Teig N, Kern P, Lücke T, Michna D, Korn K, Steininger P, Shahada K, Neumann K, Überla K. Characterization of a universal screening approach for congenital CMV infection based on a highly-sensitive, quantitative, multiplex real-time PCR assay. *PLoS One*. 2020 Jan 9;15(1):e0227143. doi: 10.1371/journal.pone.0227143. PMID: 31917817; PMCID: PMC6952102.
- Elling R, Böttcher S, du Bois F, Müller A, Prifert C, Weissbrich B, Hofmann J, Korn K, Eis-Hübinger AM, Hufnagel M, Panning M. Epidemiology of Human Parechovirus Type 3 Upsurge in 2 Hospitals, Freiburg, Germany, 2018. *Emerg Infect Dis*. 2019 Jul;25(7):1384-1388. doi: 10.3201/eid2507.190257. PMID: 31211683; PMCID: PMC6590756.
- Kohmer N, Nagel A, Berger A, Enders M, Hamprecht K, Korn K, Kortenbusch M, Überla K, Rabenau HF. Laboratory diagnosis of congenital CMV infection in newborns: Impact of pre-analytic factors. *J Clin Virol*. 2019 Jun;115:32-36. doi: 10.1016/j.jcv.2019.03.017. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30959324.
- Coras R, Korn K, Kuerten S, Huttner HB, Ensser A. Severe bornavirus- encephalitis presenting as Guillain-Barré-syndrome. *Acta Neuropathol*. 2019 Jun;137(6):1017-1019. doi: 10.1007/s00401-019-02005-z. Epub 2019 Apr 5. PMID: 30953131.