

Koordinierte Etablierung eines H5-Influenza-A-Virus-Tests in akademischen Versorgungslaboren im deutschsprachigen Raum

Zusammenfassung

Das aviäre Influenza-A-Virus (IAV) vom Subtyp H5N1 kann auch Säugetiere einschließlich Menschen infizieren. Bemerkenswert ist die Verbreitung bei Milchkühen in den USA seit Frühjahr 2024, von der ein neues zoonotisches Übertragungsrisiko ausgeht. Die frühzeitige Erkennung von H5N1-Infektionsfällen beim Menschen ist eine entscheidende Komponente in Konzepten der Reaktionsfähigkeit auf Pandemien (*pandemic preparedness*). Standard für die Humandiagnostik ist die Proben- testung aus dem Respirationstrakt per real-time- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Kommerzielle Labortestsysteme sind für neu aufgetretene zoonotische Erreger oft noch nicht verfügbar, da die Entwicklung und Validierung Jahre in Anspruch nehmen können. Für solche Erreger liegt die Testentwicklung klassischerweise bei den zuständigen Referenzlaboren, die auch experimentelle Testsysteme vorhalten.

In Zusammenarbeit dreier Nationaler Referenzzentren (NRZ für Influenza, NRZ für Coronaviren und NRZ für aviäre Influenza) wurde ein spezifischer H5-RT-PCR-Assay zusammen mit positiven Kontrollproben an 30 diagnostische Labore in Deutschland und Österreich verteilt, die in der deutschsprachigen Gesellschaft für Virologie (GfV) organisiert sind. Ziel der durchgeführten Aktivität ist die Verteilung eines neuen Assays in einem Netzwerk von Laboren sowie dessen Etablierung und Performance zu untersuchen. Formalisierte Rückmeldungen belegen eine zeitnahe Etablierung in allen Laboren des Netzwerks.

Dieser Beitrag stellt die Möglichkeiten und Herausforderungen einer solchen Implementierung für die H5-Subtypisierung von IAV dar und unterstreicht die Bedeutung organisierter Labornetzwerke und Ressourcen in diesen, um auf neu auftretende Krankheitserreger zu reagieren.

Einleitung

Influenzaviren werden in die Typen A, B und C eingeteilt, wobei die saisonalen IAV und Influenza-B-Viren (IBV) für den Menschen von besonderer Bedeutung sind, da sie saisonale Epidemien auslösen können.¹ IAV besitzen auf ihrer Hülle die Glycoproteine Hämaggglutinin (HA) und Neuraminidase (NA),¹ auf Grundlage derer die spezifischen Subtypen bzw. HN-Kombinationen benannt werden. Der IAV-Subtyp H5N1, der bei Vögeln zumeist eine hochansteckende Erkrankung auslöst, kann nachweislich auch Säugetiere einschließlich Menschen infizieren. Seit 2003 wurden fast 900 humane Infektionsfälle weltweit dokumentiert, von denen mehr als die Hälfte tödlich verliefen.¹ Seit 2021 ist mit der Verbreitung des H5N1-Subtyps der phylogenetischen Klade 2.3.4.4b ein deutlicher Anstieg gemeldeter Infektionen bei zahlreichen Vogelarten sowie bei Land- und Meeressäugetieren zu beobachten.² Solche *Spill-Over*-Infektionen von wilden Wasservögeln auf Geflügelpopulationen und Säugetieren oder vice versa vergrößern die betroffenen Tierpopulationen und schaffen eine breitere Replikationsbasis für diese Viren.³ In Verbindung mit der hohen Mutationsrate und der Fähigkeit des Virus zur Reassortierung, die *per se* die genetische Variabilität erhöht, entstehen kontinuierlich neue Stämme mit dem Potenzial, auf bessere Vermehrung in Säugetieren angepasst zu sein. Mutierte Viren stellen auch eine Herausforderung für die Labordiagnostik dar. RT-quantitative PCR (RT-qPCR) sind derzeit die Standardmethode für die IAV-Diagnostik. Das NRZ für aviäre Influenza setzt zur Diagnose und Typisierung aviärer IAV bei Tieren den „Riems Influenza A Typing Array“ (RITA) ein, welcher grundsätzlich auch für humane Proben geeignet ist. Dazu gehören eine generische, intern kontrollierte Duplex-RT-qPCR, die eine Region im Matrix-(M-)Gen nachweist und zusätzliche 31 separate TaqMan®-basierte RT-qPCR zur Unterscheidung von 14 HA- und neun NA-Subtypen.⁴

Die Diagnostik humaner IAV-Fälle basiert auf kommerziell verfügbaren Systemen, die häufig ebenfalls das virale M-Gen nachweisen. Eine weitere Differenzierung der Typen (d. h. der saisonal zirkulierenden Stämme H₃N₂ und H₁N₁pdm09) erfolgt oft nicht, da dies ohne größere klinische Konsequenz bleibt. Auch ein möglicher Eintrag des H₅-Subtyps wird daher nicht automatisch erkannt. Um neben der Detektion von IAV auch eine zweifelsfreie Labordiagnose von humanen IAV-H₅-Infektionen zu ermöglichen, haben die NRZ für Influenza, aviäre Influenza und Coronaviren eine gemeinsame Testimplementierung in humanmedizinischen Diagnostiklaboren durchgeführt.

Wir berichten hier über die Verteilung und rasche Etablierung des RITA H₅-Subtypen-Assays zusammen mit positivem Kontrollmaterial (*in-vitro*-Transkripte: IVT-1, IVT-2) an Diagnostiklaboren in Deutschland und Österreich sowie dessen Evaluierung.

Material und Methoden

Teilnehmende Labore

Die Auswahl der Labore basierte auf Freiwilligkeit innerhalb des Arbeitskreises „Klinische Virologie“ der GfV, welche vor allem die Universitätskliniken mit virologischer Diagnostik versorgen.

Assay

Der hier verwendete IAV-H₅-Assay wurde vom NRZ für aviäre Influenza entwickelt.^{4,5} Zwei Primer-/Sondensets, die jeweils am Anfang und Ende des IAV-H₅-Genomsegments binden, gewährleisten die Detektion aller H₅-Varianten. Das Einfügen von degenerierten Basen im PCR-Primer hilft dabei, die gesamte Diversität der H₅-Sequenzen abzudecken. Abbildung 1 zeigt eine Alinierung verschiedener, zufällig ausgewählter, IAV-H₅-Varianten sowie die Primer- und Sondenbindungsstellen von Set 1 und 2. Das etablierte Protokoll nennt die Verwendung des Roche LC Multiplex RNA Virus Master Mix Kits,

A

Genbank accession numbers	Primer sense	Sonde (antisense)	Primer antisense
OP597612.1 H5N1	GATTTAAAGGATTGTAGTAGC	GGCTCCTCGAAACCCAATGTGCG	TGGTCTTACATAGTGGAGG
AY518362.1 H5N1	GATTTAA <u>G</u> AGATTGTAGTAGC	GGCTCCTCGAAACCCAATGT <u>G</u>	TGGTCTTACATAGTGGAGA
AF194991.1 H5N2	<u>C</u> ATTT <u>A</u> GGATTGTAGTAGC	GGCTCCTTGAAATCC <u>T</u> ATGT <u>G</u>	TGGTCTTACATAGTGGAGA
OL369954.1 H5N3	<u>C</u> ATTT <u>A</u> GGATTGTAGTAGC	GGCTCCTTGAAATCC <u>T</u> ATGT <u>G</u>	TGGTCTTACATAGTAGAGA
MT025068.1 H5N5	<u>C</u> ATTCT <u>A</u> GGATT <u>G</u> AGTAGC	GGCT <u>T</u> TTGAAACCCAATGT <u>G</u>	TGGTCATACAT <u>G</u> TGGAA
KT762446.1 H5N6	GATTTAAAGGATTGTAGTAGC	GGCT <u>T</u> TTGAAACCCAATGTGCG	TGGTCTTACATAGTGGAGAG
Vergleich Bindeseq. (5'→3')	<u>G</u> ATT <u>T</u> AA <u>A</u> RGATTGTAG <u>G</u> TAGC	GGCTCCT <u>Y</u> GG <u>R</u> AA <u>Y</u> CCAATGTGCG	TGGTC <u>Y</u> TACATGG <u>T</u> RGAGAG
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	***

B

Genbank accession numbers	Primer sense	Sonde (sense)	Primer antisense
OP597612.1 H5N1	GTTCCCTAGCACTGGCAATCAT	CTGGTCTATCTTATGGATGTGCTCC	CAGTGCAGAATTGCATTAGA
AY518362.1 H5N1	GTTCCCTAGCACTGGCAATCAT	CTGGTCTATCTTATGGATGTGCTCC	CAATGCAGAATTGCATTAA
AF194991.1 H5N2	GTTCCCTAGCACTGGCAATCAT	CTGGTCTATCTT <u>T</u> GGATGT <u>G</u> TCC	CAGTGCAGAATTGCATTAA
OL369954.1 H5N3	GTTCCCT <u>G</u> ACTGGCAATCAT	CTGGTCTATCTT <u>T</u> GGATGTGCTCC	CAGTGCAGAATTGCATTAA
MT025068.1 H5N5	GTTCCCTAGCACTGGCAATCAT	CTGGTCTATCTT <u>T</u> GGATGTGCTCC	CAGTGCAGAATTGCATCTAGAG
KT762446.1 H5N6	GTTCCCTAGCACTGGCAATCAT	CTGGTCTATCTTATGGATGTGCTCC	CAATGCAGAATTGCATTAA
Vergleich Bindeseq. (5'→3')	<u>G</u> TTC <u>C</u> CT <u>A</u> GG <u>Y</u> ATGGCAATCAT	CTGGTCTAT <u>Y</u> TT <u>T</u> GGATGTGCTCC	C <u>A</u> RTGCAGAATTGCAT <u>Y</u> AGAAATT
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	*
	*	*	***

Abb. 1 | Alinierung verschiedener Influenza-A-Virus-(IAV)-H₅-Varianten und Primer- sowie Sondenbindungsstellen von Set 1 (A) und Set 2 (B). Genbank accession numbers verschiedener IAV-H₅-Varianten sind genannt. Degenerierte Basen in den Sequenzen sind typographisch betont und unterstrichen; Sterne (*) weisen zusätzlich auf Diskrepanzen zwischen Virussequenz und Primer-/Sondenbindungsstellen hin.

PCR-Reaktion		PCR-Thermocyclerprofil		
Komponente	Volumen	Temperatur	Zeit	Zyklen
RNase-freies Wasser	9,9 µL	45°C	20 min	45 x
Roche 5x Reaktionspuffer	4,0 µL	95°C	5 min	
Primer-/Sondenmix	1 µL	95°C	15 sek	
Roche RT Enzym	0,1 µL	56°C*	20 sek	
Probe	5,0 µL	72°C	30 sek	

Tab. 1 | Zusammensetzung der PCR-Reaktion sowie Thermocyclerprofil.

Pro PCR-Reaktion werden 15 µL Mastermix verwendet; * = Messung der Fluoreszenz bei jedem 56°C Schritt

Kat. Nr. 06754155001 als PCR-Reagenz (s. Tab.1). Den teilnehmenden Laboren stand jedoch frei, dieses oder andere Kits zu verwenden. Letzteres bedingt möglicherweise die Anpassung der Mastermix-Zusammensetzung. Auch die Wahl des Cyclers zur PCR-Durchführung stand den teilnehmenden Laboren frei. Lediglich die Verwendung der zur Verfügung gestellten Primer und Sonden war vorgeschrieben.

Primerdesign und Assay-Durchführung

Die Primer und Sonden wurden wie publiziert verwendet.⁴ Alle Primer und Sonden wurden zentral synthetisiert und in ungeöffneten lyophilisierten Aliquots an die Labore verteilt.

Der Primer-/Sondenmix wird wie publiziert zusammengestellt und beinhaltet 7,5 pmol/µL für alle anti-sense Primer, 10 pmol/µL für alle sense Primer sowie 3 pmol/µL für alle Sonden.⁴ Die Konzentration des H5-HA1 sense Primers wurde auf 30 pmol/µL eingestellt.

Kontrollmaterial

Als Kontrollmaterial wurden IVT des IAV-H5-Segments hergestellt. Dazu wurden synthetisch hergestellte DNA-Fragmente (*gBlocks*) bei Thermo Fisher Scientific bestellt. IVT-1 stellt hierbei einen Sequenzabschnitt am 5' Ende des H5-Segments dar und enthält die Bindungsstellen für die Primer und Sonden des Sets 1. IVT-2 ist äquivalent zu einem Sequenzabschnitt am 3' Ende des H5-Segments und enthält die Bindungsstellen für die Primer und Sonden des Sets 2. Für die *in-vitro*-Transkription wurde das MEGAscript® T7-Kit verwendet und entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die IVT wurden unter Verwendung des Qiagen RNeasy Kit – RNA CleanUp Protokolls gemäß den Anwei-

sungen des Herstellers gereinigt und abschließend mit dem Qubit RNA HS Kit photometrisch quantifiziert.

Ergebnisse

Primer und Sonden für die Detektion von IAV des Subtyps H5 wurden im Juli 2024 in Deutschland und Österreich verteilt. Es nahmen insgesamt 30 Labore (Deutschland: 28, Österreich: 2) an dieser Studie teil (s. Abb. 2). Einige Labore testeten mehrere Kits, Cybler- und/oder Thermocycle-Profile. Für die Analyse der Daten wurde jedem Datensatz eine



Abb. 2 | Anzahl teilnehmender Labore (n = 30) nach Land und Bundesländern. Als Vorlage diente eine Karte von VectorStock.com.

spezifische Identifikationsnummer (ID) zugewiesen. Insgesamt wurden 38 Datensätze zurückgemeldet. Für die Rückmeldung war eine Frist von 30 Tagen vorgegeben. Die Rückmeldung der teilnehmenden Labore erfolgte innerhalb von fünf bis 56 Tagen (Median: 22 Tage), mit einer Nachreicherung eines einzelnen Labors nach 180 Tagen. Technische Rückfragen während des Implementierungsprozesses wurden von zwei Laboren gestellt.

Zehn von 30 Laboren verwendeten das in dem Standard Operating Procedure (SOP) spezifizierte PCR-Kit (Roche LC Multiplex RNA Virus Master Mix Kit), andere adaptierten die Methodik auf äquivalente Reagenzien. Tabelle 2 im Anhang zeigt eine Übersicht aller verwendeten Kits und Cyler sowie die damit detektierten Cycle-threshold-(Ct)-Werte der unverdünnten IVT.

Neben der Testung der unverdünnten IVT-1 und IVT-2 haben die teilnehmenden Labore beide IVT seriell verdünnt und eine Endpunktbestimmung durchgeführt. In 34 Datensätzen wurde das unverdünnte IVT-1 und IVT-2 getestet. In vier Datensätzen wurden die unverdünnten IVT nicht getestet. Die Ct-Werte des unverdünnten IVT-1 lagen zwischen 18,2 und 34 (Mittelwert = $23,6 \pm 2,9$, s. Abb. 3A). Die Ct-Werte für das unverdünnte IVT-2 schwankten zwischen 16,3 und 25 (Mittelwert = $20,5 \pm 2,1$) (s. Abb. 3B). Ein Labor konnte das IVT-1 in keiner der Verdünnungen nachweisen. Alle teilnehmenden Laboratorien konnten IVT-2 in den Verdünnungen 1:10 bis 1:1.000 nachweisen. IVT-1 und IVT-2 wurden in einer Verdünnung von 1:100.000 von sechs bzw. 19 Laboren nachgewiesen (s. Tab. 3).

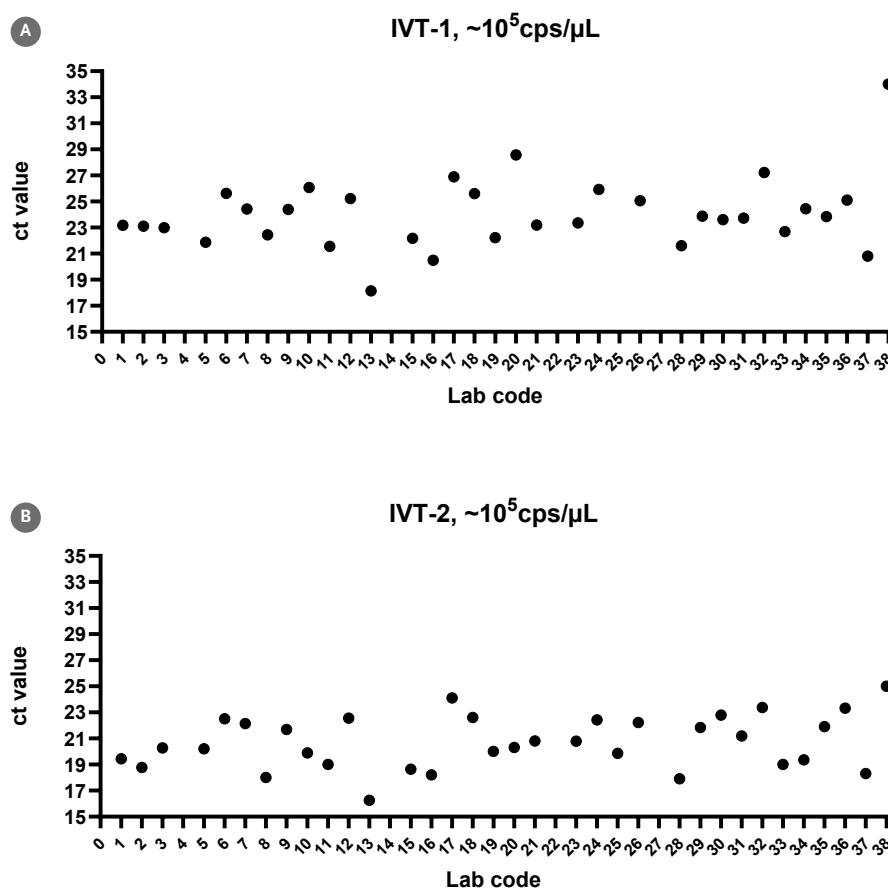


Abb. 3 | Detektionsgrenze der teilnehmenden Labore. Detektierte Cycle-threshold-(Ct)-Werte von unverdünntem *in-vitro*-Transkript (IVT)-1 (A) und IVT-2 (B).

cps/µL = Transkriptkopien pro Mikroliter

IVT-1			IVT-2			Gesamtanzahl der Datensätze	
Verdünnungsstufe	Detektiert		Verdünnungsstufe	Detektiert			
	Anzahl/Gesamt	%		Anzahl/Gesamt	%		
unverdünnt	33/34	97,1	unverdünnt	34/34	100	38	
1: 10	37/38	97,4	1: 10	38/38	100	38	
1: 100	36/38	94,7	1: 100	38/38	100	38	
1: 1.000	32/38	84,2	1: 1.000	38/38	100	38	
1: 10.000	18/38	47,4	1: 10.000	35/38	92,1	38	
1: 100.000	6/38	15,8	1: 100.000	19/38	50	38	

Tab. 3 | Anzahl der Datensätze, in denen das positive Kontrollmaterial (*in-vitro*-Transkripte IVT-1 oder IVT-2) in verschiedenen Verdünnungsstufen nachgewiesen wurde.

Diskussion

Die hier beschriebene veterinär- und human-diagnostisch übergreifende, flächendeckende Implementierung eines H5-IAV-Tests belegt die Reaktionsfähigkeit der drei beteiligten deutschen NRZ und dem Netzwerk akademischer Versorgungslabore im deutschsprachigen Raum. Insgesamt verlief die Implementierung reibungslos und war mit wenigen Rückfragen verbunden. Diese betrafen v.a. technische Details wie Anpassung auf andere PCR-Cycler und technische Charakteristika wie Fluoreszenzfarbstoffe und Quencher, der zur Verfügung gestellten Sonden. Rückfragen z.B. zur SOP gab es nicht. Die von den Laboren zurückgemeldeten Ct-Werte der Kontrollmaterialien wiesen nennenswerte Unterschiede auf, was unter anderem auf den Einsatz unterschiedlicher PCR-Kits und Thermocycler zurückzuführen sein dürfte. Der direkte Vergleich technisch identischer Kontrollproben zeigt, dass Ct-Werte bei laborbasiert formulierten Tests kein direkt vergleichbares quantitatives Maß darstellen. Während der COVID-19-Pandemie stellte das NRZ für Coronaviren daher quantifizierte Standardpräparationen über INSTAND bereit, die es Laboren ermöglichen, ihre Ct-Referenzbereiche anhand vorgegebener Proben zu kalibrieren, die die Bewertungsgrenzen einer Empfehlung des Robert Koch-Instituts zur PCR-basierten Bewertung der Infektiosität abbildeten.⁶

Um die Ergebnisse verschiedener Labore vergleichbar zu machen, sind daher Maße wie die Konzentration viraler RNA auf der Grundlage der Kalibration mit standardisierten Positivkontrollen unerlässlich. Dies unterstreicht den dringenden Bedarf

an Referenzmaterialien, die quantitative Aussagen ermöglichen und den Interlaborvergleich erlauben.⁷

Die beobachteten Schwankungen der Ct-Werte sowie die unterschiedlichen Verdünnungsstufen, bei denen noch ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde, deuten auf eine variable Nachweisgrenze in den beteiligten Laboren hin. Ziel der durchgeführten Aktivität war jedoch nicht die Bestimmung eines laborübergreifenden formalen Detektionslimits für den H5-Nachweis. Da der Assay nicht für ein initiales Screening auf IAV vorgesehen ist, sondern für die Subtypisierung von H5-Varianten bereits getesteter IAV-positiver Proben, ist eine besonders hohe Sensitivität hier auch von nachgeordneter Bedeutung. Dennoch lassen sich aus der Aktivität einige relevante Beobachtungen ableiten: Auffällig war, dass die Kontrollprobe IVT-1 trotz vergleichbarer Konzentration gegenüber IVT-2 von den Laboren deutlich schlechter detektiert wurde. Mögliche Ursachen hierfür sind Unterschiede in der Performance der beiden Primer-/Sondensets. Auch charakteristische Qualitätsunterschiede bei der Primer-Synthese könnten dies erklären. Fehlerhafte Oligonukleotid-Synthesen und sogar Kontaminationen mit positivem Material wurden zu Beginn der COVID-19-Pandemie beschrieben⁸ und stellten Hindernisse in der flächendeckenden Etablierung von Testsystemen für SARS-CoV-2 dar.⁹

Um derartige Faktoren zu minimieren, wurden im Rahmen unserer Aktivität Primer und Sonden zentral lyophilisiert bestellt und aus einer einzigen Synthese an alle Labore verteilt. Dadurch wurde sichergestellt, dass alle teilnehmenden Labore identisches

Ausgangsmaterial für die Oligonukleotide erhielten. Die Stärke einer solchen koordinierten Implementierung ist die Robustheit gegenüber solchen Störfaktoren, sodass Prozesse innerhalb der Labore im Teilnehmerkreis besser verglichen werden können.

Eine vergleichbare Aktivität wurde zwischen Mai und Juli 2024 von den NRZ für aviäre Influenza und Coronaviren im europäischen Kontext durchgeführt. Hier wurde neben dem H5-Assay auch ein Assay für das Screening auf IAV, mittels eines generischen IAV-Nachweises verteilt.^{4,5,10} An dieser Aktivität beteiligten sich 14 Expertenlabore aus 12 europäischen Ländern. Als Standard für den H5-Assay wurde hier nur IVT-2 verteilt. Eine Beurteilung der Daten aus beiden Aktivitäten zeigt eine vergleichbare Performance auf breiter europäischer Ebene sowie ähnliche Herausforderungen im Hinblick auf die Diversität der eingesetzten PCR-Reagenzien. Diese Beobachtung deckt sich mit Erfahrungen aus anderen Ringversuchen und Vergleichsstudien zur Verteilung von PCR-Tests.¹¹

Diese und vergleichbare Aktivitäten¹¹⁻¹⁴ testen und demonstrieren die schnelle Verteilung und Etablierung eines neuen PCR-Assays im deutschen und europäischen Kontext. Der hier dargestellte Ansatz zeigt eine Strategie für die Versorgung von Diagnostiklaboren mit Tests und auch Kontrollmaterial auf, welche für die Detektion von neu auftretenden Pathogenen notwendig sind. Dies ist insbesondere dann von großer Bedeutung, wenn es sich um Pathogene handelt, für die noch keine kommerziell erhältlichen Tests verfügbar sind. Bei einem H5N1-Eintrag oder dem Auftreten neuer Pathogene können die Assays durch Aktivitäten wie die hier beschriebenen zur Verfügung gestellt und schnell eingesetzt werden. Hierdurch kann zum einen ein Viruseintrag zuverlässig identifiziert werden und zum anderen die Zeit, die für die Entwicklung eines neuen, standardisierten Tests notwendig ist, überbrückt werden.

Literatur

- WHO, Influenza: A(H5N1). <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/influenza-h5n1>. Last review 27th Nov. 2024.
- Plaza PI, Gamarra-Toledo V, Euguí JR, Lambertucci SA. Recent Changes in Patterns of Mammal Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Worldwide. *Emerg Infect Dis*. 2024 Mar;30(3):444-452. doi: 10.3201/eid3003.231098.
- Richard J Webby, Timothy M Uyeki, An Update on Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus, Clade 2.3.4.4b, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 230, Issue 3, 15 September 2024, Pages 533–542, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae379>.
- Hassan, K.E.; Ahrens, A.K.; Ali, A.; El-Kady, M.F.; Hafez, H.M.; Mettenleiter, T.C.; Beer, M.; Harder, T. Improved Subtyping of Avian Influenza Viruses Using an RT-qPCR-Based Low Density Array: 'Riems Influenza a Typing Array', Version 2 (RITA-2). *Viruses* 2022, 14, 415. <https://doi.org/10.3390/v14020415>.
- Hoffmann B, Hoffmann D, Henritzi D, Beer M, Harder TC. Riems influenza a typing array (RITA): An RT-qPCR-based low density array for subtyping avian and mammalian influenza a viruses. *Sci Rep*. 2016 Jun 3;6:27211. doi: 10.1038/srep27211.
- RKI 2023. Hinweise zur Testung von Patientinnen und Patienten auf SARS-CoV-2. <https://www.rki.de/DE/Themen/Infektionskrankheiten/Infektionskrankheiten-A-Z/C/COVID-19/Diagnostik-Hinweise.html>.
- Kammel M, Grunert HP, Zimmermann A, Martin A, Lindig V, Samuleit S, Dühring U, Adams-Bagusche M, Sander D, Zeichhardt H, Drosten C, Corman VM, Ciesek S, Rabenau HF, Obermeier M, Ehret R, Kaiser R, Huggett J, O'Sullivan D, Vallone PM, Cleveland MH, Falak S, Kummrow A, Valiente E, Macdonald R, Milavec M, Goseberg S, Kappler S, Weiss N, Vierbaum L, Kaiser P, Schellenberg I, Zeichhardt H. From crisis to routine – Standardization of SARS-CoV-2 genome detection by enhanced EQA schemes in a scientific pandemic network. *Int*

- J Med Microbiol. 2025 Jun;319:151656. doi: 10.1016/j.ijmm.2025.151656.
- 8 Lee JS, Goldstein JM, Moon JL, Herzegh O, Bagarozzi DA Jr, Oberste MS, Hughes H, Bedi K, Gerard D, Cameron B, Benton C, Chida A, Ahmad A, Petway DJ Jr, Tang X, Sulaiman N, Teklu D, Batra D, Howard D, Sheth M, Kuhnert W, Bialek SR, Hutson CL, Pohl J, Carroll DS. Analysis of the initial lot of the CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel. PLoS One. 2021 Dec 15;16(12):e0260487. doi: 10.1371/journal.pone.0260487.
- 9 Wernike K, Keller M, Conraths FJ, Mettenleiter TC, Groschup MH, Beer M. Pitfalls in SARS-CoV-2 PCR diagnostics. Transbound Emerg Dis. 2021 Mar;68(2):253-257. doi: 10.1111/tbed.13684. Epub 2020 Jul 5. PMID: 32536002; PMCID: PMC7323359.
- 10 Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. J Clin Microbiol. 2002 Sep;40(9):3256-60. doi: 10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002.
- 11 Heimsch KC, Bleicker T, Best TD, Presser LD, Molenkamp R, Jääskeläinen AJ, Milewska A, Šmahelová J, Baronti C, Pappa S, Tabain I, Cordeiro R, Marsili G, Huik K, Pinho Dos Reis V, Barzon L, Maes P, Drosten C, Corman VM. Coordinated implementation of a conventional PCR assay to detect all Ebola and Marburg virus species in a European laboratory network. J Clin Virol. 2025 May 28;178:105808. doi: 10.1016/j.jcv.2025.105808.
- 12 Heimsch KC, Stanoeva KR, Mögling R, Kraus A, Broberg EK, Drexler JF, Reusken CBEM, Meijer A, Drosten C, Corman VM. External quality assessment of molecular detection and variant typing of SARS-CoV-2 in European expert laboratories in 2023. J Clin Microbiol. 2025 Apr 9;63(4):e0153824. doi: 10.1128/jcm.01538-24.
- 13 Mögling R, Fischer C, Stanoeva KR, Melidou A, Almeida Campos AC, Drosten C, Biere B, Meijer A, Kraus A, Reusken CBEM, Drexler JF. Sensitivity of Detection and Variant Typing of SARS-CoV-2 in European Laboratories. J Clin Microbiol. 2022 Dec 21;60(12):e0126122. doi: 10.1128/jcm.01261-22.
- 14 Fischer C, Mögling R, Melidou A, Kühne A, Oliveira-Filho EF, Wolff T, Reiche J, Broberg E, Drosten C, Meijer A, Leitmeyer K, Drexler JF, Reusken CBEM. Variable Sensitivity of SARS-CoV-2 Molecular Detection in European Expert Laboratories: External Quality Assessment, June and July 2020. J Clin Microbiol. 2021 Feb 18;59(3):e02676-20. doi: 10.1128/JCM.02676-20.

Autoren

- ^a Dr. Kim Christin Heimsch | ^a Tobias Bleicker |
^b GfV Laborleiter-Arbeitsgruppe | ^{c,d} Dr. Ralf Dürrwald |
^{c,d} PD Dr. Thorsten Wolff | ^e Prof. Dr. Martin Beer |
^e Prof. Dr. Timm Harder | ^{a,f,g} Dr. Victor Max Corman |
^{a,f,g,h} Prof. Dr. Christian Drosten

^a Institut für Virologie, Nationales Referenzzentrum für Coronaviren und DZIF-assoziierter Partnerstandort Charité, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland

^b Mitglieder der GfV-Laborleiter-Arbeitsgruppe: Uni Leipzig – Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Uniklinik Aachen – Labordiagnostisches Zentrum Uniklinik RWTH Aachen, Universitätsklinikum Regensburg – Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene, Uni Marburg -Institut für Virologie, Uni Innsbruck – Institut für Virologie, Universitätsklinikum Münster – Institut für Virologie, Universitätsklinikum Tübingen – Institut für Medizinische Virologie, Universität Würzburg – Institut für Virologie und Immunbiologie, Universitätsmedizin Frankfurt – Institut für Medizinische Virologie, Medizinische Hochschule Hannover – Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn – Institut für Virologie, Universitätsklinikum Erlangen – Virologisches Institut, Universitätsklinikum des Saarlandes – Institut für Virologie, Universitätsklinikum Freiburg – Institut für Virologie, Labor Krause MVZ GmbH Kiel, Medizinische Universität Wien – Zentrum für Virologie, Universitätsmedizin Mainz – Institut für Virologie, Medizinisches Infektiologiezentrum Berlin – Medizinisches Labor MVZmb AG, Uniklinikum Ulm – Institut für Virologie, Max von Pettenkofer-Institut – Klinische Virologie, Uniklinikum Köln – Institut für Virologie, TU München – Institut für Virologie, Städtisches Klinikum Karlsruhe gGmbH – ZLMT, Abt. für Mikrobiologie, Universitätsklinikum Heidelberg – Zentrum für Infektiologie, Virologie, Universitätsmedizin Oldenburg – Universitätsinstitut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz – Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf – Institut für Virologie, LADR Zentrallabor Dr. Kramer und Kollegen – Molekularbiologie

^c Unit 17, Influenzaviren und weitere Viren des Respirationstraktes, Nationales Referenzzentrum für Influenzaviren, Robert Koch Institut, Berlin, Deutschland

^d Unit 17, Influenzaviren und weitere Viren des Respirationstraktes, Konsiliarlabor für RSV, PIV und HMPV, Robert Koch Institut, Berlin, Germany

^e Institut für Virusdiagnostik, Friedrich-Loeffler-Institut, Suedufer 10, 17493, Greifswald-Insel Riems, Germany

^f German Center for Infection Research, associated partner Charité, Berlin, Germany

^g Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH, Berlin, Germany

^h Nationales Netzwerk Universitätsmedizin, Infrastruktur NUM-SAR

Korrespondenz: Victor.Corman@charite.de,
Christian.Drosten@charite.de

Autorenbeiträge

KCH: Formale Analyse, Methodik, Projektadministration, Validierung, Visualisierung, Schreiben – Originalentwurf, Schreiben – Überarbeitung & Redaktion;
TB: Methodik, Validierung; Laborleiter-Arbeitsgruppe: Methodik, Validierung; RD: Schreiben – Überarbeitung & Redaktion; TW: Schreiben – Überarbeitung & Redaktion; MB: Schreiben – Überarbeitung & Redaktion; TH: Schreiben – Überarbeitung & Redaktion; CD & VC: Konzeptualisierung, Fördermittelakquise, Projektadministration, Ressourcen, Supervision, Schreiben – Überarbeitung & Redaktion

Interessenkonflikt

Die Autorinnen und Autoren erklären, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Vorgeschlagene Zitierweise

Heimsch KC, Bleicker T, GfV Laborleiter-Arbeitsgruppe, Dürrwald R, Wolff T, Beer M, Harder T, Corman VM, Drosten C: Koordinierte Etablierung eines H5-Influenza-A-Virus-Tests in akademischen Versorgungslaboren im deutschsprachigen Raum

Epid Bull 2025;49:8-15 | DOI 10.25646/13577

Finanzierung

Die Arbeiten der Referenzlabore und diese Studie wurde gefördert durch das Bundesministerium für Gesundheit und das Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat sowie durch das europäische Programm DURABLE (Health Emergency Preparedness and Response) (101102733).

Open access



Creative Commons Namensnennung 4.0
International