

Aus der Hautklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

**Nachweis von SARS-Cov-2-Infektionen durch Spürhunde anhand von
Hautabstrichen: Eine *Proof-of-Concept*-Studie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Raffaella Sofie Faulhaber
aus Stuttgart

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. Hansjörg Schild

1. Gutachter: Prof. Dr. Petra Margareta Staubach-Renz

2. Gutachter: Univ.-Prof. Bodo Plachter

Tag der Promotion: 19.11.2024

Nachnutzungslizenz: Urheberrechtsschutz (InC-1.0)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 6 |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | 8 |
| TABELLENVERZEICHNIS..... | 10 |
| 1. EINLEITUNG..... | 11 |
| 1.1 KONTEXT DER ARBEIT | 12 |
| 1.2 ZIEL DER ARBEIT | 13 |
| 1.3 STRUKTUR DER ARBEIT..... | 14 |
| 2. GRUNDLAGEN | 15 |
| 2.1 DAS SARS-COV-2-VIRUS..... | 16 |
| 2.1.1 Virologische Grundlagen | 16 |
| 2.1.2 SARS-CoV-2-Übertragung..... | 19 |
| 2.1.3 Covid-19-Erkrankung..... | 20 |
| 2.1.4 Diagnostik des SARS-CoV-2-Virus..... | 21 |
| 2.1.5 Infektionsprävention | 23 |
| 2.2 DIE COVID-19-PANDEMIE | 24 |
| 2.2.1 Epidemiologie der Covid-19-Pandemie..... | 25 |
| 2.2.2 Gesellschaftliche Implikationen der Covid-19-Pandemie..... | 27 |
| 2.3 SPÜRHUNDE..... | 29 |
| 2.3.1 Allgemeines | 29 |
| 2.3.2 Physiologische Grundlagen..... | 30 |
| 2.3.3 Ausbildung von Spürhunden..... | 33 |
| 2.3.4 Spürhunde in der Medizin | 34 |
| 2.3.5 Einsatz von Spürhunden in der Diagnostik von SARS-CoV-2 | 35 |
| 2.4 GERUCHSANALYTIK - VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS (VOC)..... | 36 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN..... | 38 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.1 | ETHIK..... | 38 |
| 3.2 | PROJEKTKONZEPT | 38 |
| 3.3 | PROBANDENEINSCHLUSS | 40 |
| 3.4 | PROBEN..... | 41 |
| 3.4.1 | <i>Nasopharyngeale Abstrichgewinnung</i> | 41 |
| 3.4.2 | <i>PCR-Analytik</i> | 43 |
| 3.4.3 | <i>Axilläre Abstrichgewinnung</i> | 45 |
| 3.4.4 | <i>Probeninaktivierung</i> | 47 |
| 3.4.5 | <i>Probenlagerung</i> | 47 |
| 3.4.6 | <i>Lagerbeständigkeit der Proben</i> | 48 |
| 3.5 | VOC-ANALYTIK..... | 50 |
| 3.5.1 | <i>Material und Hardware der DHS-TD-GC/MS</i> | 50 |
| 3.5.2 | <i>Grundlagen der Gaschromatographie/Massenspektrometrie</i> | 51 |
| 3.5.3 | <i>Dynamisches Headspace Sampling</i> | 53 |
| 3.5.4 | <i>Methodik der VOC-Analytik</i> | 54 |
| 3.6 | HUNDETRAINING..... | 55 |
| 3.6.1 | <i>Spürhunde</i> | 55 |
| 3.6.2 | <i>Line Up</i> | 56 |
| 3.6.3 | <i>Maschinelles Training</i> | 57 |
| 3.7 | AUFBAU DOPPEL-BLIND-VERSUCHE..... | 58 |
| 4. | ERGEBNISSE | 59 |
| 4.1 | DOPPEL-BLIND-VERSUCH 1 | 59 |
| 4.2 | DOPPEL-BLIND-VERSUCH 2 | 61 |
| 4.3 | VERGLEICH DOPPEL-BLIND-VERSUCH 1 UND 2 | 62 |
| 4.3.1 | <i>Zwischenauswertung VOC-Analysen</i> | 63 |
| 4.3.2 | <i>Abhängigkeit der Hunde von den Hundetrainern</i> | 68 |
| 4.4 | DOPPEL-BLIND-VERSUCH 3 | 69 |
| 4.5 | VERGLEICH DER ERGEBNISSE VOR UND NACH DEN METHODISCHEN ANPASSUNGEN..... | 71 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.6 | ALTERNATIVES UNTERSUCHUNGSMATERIAL | 72 |
| 5. | DISKUSSION | 74 |
| 5.1 | AUSWIRKUNGEN DER PANDEMIEENTWICKLUNG AUF DAS PROJEKT | 75 |
| 5.2 | HUNDETRAINING | 77 |
| 5.2.1 | <i>Auswahl der Hunde und Trainer</i> | 77 |
| 5.2.2 | <i>Wahl der Trainingsmethode</i> | 78 |
| 5.2.3 | <i>Wahl des Trainingsmaterials</i> | 80 |
| 5.2.4 | <i>Wahl der Inaktivierungsmethode</i> | 83 |
| 5.2.5 | <i>Wahl der Proband*innen</i> | 85 |
| 5.2.6 | <i>Probenlagerung</i> | 88 |
| 5.2.7 | <i>Leistungsauswertung</i> | 89 |
| 5.2.8 | <i>Kontextualisierung der Ergebnisse</i> | 91 |
| 5.3 | VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN TESTMETHODEN | 93 |
| 5.3.1 | <i>Vergleich mit PCR-Testung</i> | 94 |
| 5.3.2 | <i>Vergleich mit Schnelltests</i> | 96 |
| 5.3.3 | <i>Vergleich mit Halbleitersensoren</i> | 97 |
| 5.3.4 | <i>Früherkennungsstrategien</i> | 98 |
| 5.3.5 | <i>Feldanwendbarkeit</i> | 99 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK | 101 |
| 7. | LITERATURVERZEICHNIS..... | 104 |
| 8. | ABBILDUNGSQUELLENVERZEICHNIS | 122 |
| 9. | ANHANG..... | 124 |
| 10. | DANKSAGUNG | 126 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| ARDS | <i>acute respiratory distress syndrome</i> |
| Covid-19 | <i>coronavirus disease 2019</i> |
| CT-Wert | <i>cycle-threshold-Wert</i> |
| DDTS | <i>Detection Dog Training System</i> |
| DHS | Dynamisches Headspace-Sampling |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| FFP-2 | <i>filtering face piece-2</i> |
| GC | Gaschromatographie |
| h-ACE-2 | <i>human-angiotensin-converting-enzyme 2</i> |
| HOE | Hauptolfaktorisches Epithel |
| HRBS | Hochschule Rhein-Bonn-Sieg |

| | |
|------------|--|
| ISF | Institut für Sicherheitsforschung |
| MS | Massenspektrometrie |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> |
| R0 | Basisreproduktionszahl |
| SARS-CoV-2 | <i>severe acute respiratory syndrome - Coronavirus-2</i> |
| TBS | Tracheobronchialsekret |
| TiHo | Tierhochschule |
| VNO | Vomeronasales Organ |
| VOC | <i>volatile organic compound</i> |
| WHO | <i>world health organization</i> |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHER AUFBAU DES SARS-CoV-2-VIRUS..... | 17 |
| ABBILDUNG 2: EXPRESSION VON ACE-2-REZEPTOREN IN VERSCHIEDENEN ORGANSYSTEMEN | 18 |
| ABBILDUNG 3: COVID-19-ERKRANKUNGSWELLEN IN DEN USA UND EUROPA | 26 |
| ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GERUCHSVERARBEITUNG DES HUNDES | 32 |
| ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER NASOPHARYNGEALEN ABSTRICHENTNAHME | 42 |
| ABBILDUNG 6: VEREINFACHTE DARSTELLUNG DER PCR-TECHNOLOGIE..... | 43 |
| ABBILDUNG 7: ABSTRICHBESTECK PS 16/152MM DER FIRMA GREINER BIO-ONE | 45 |
| ABBILDUNG 8: FEINGEWINDEFLASCHEN ND18, FIRMA LABSOLUTE | 48 |
| ABBILDUNG 9: AUFBAU GC/MS-TECHNOLOGIE..... | 52 |
| ABBILDUNG 10: DARSTELLUNG DER DHS-TECHNOLOGIE..... | 53 |
| ABBILDUNG 11: AUFBAU LINE UP TRAINING | 56 |

| | |
|---|----|
| ABBILDUNG 12: DETECTION DOG TRAINING SYSTEM, FIRMA KYNOSCIENCE UG | 57 |
| ABBILDUNG 13: LAGERBESTÄNDIGKEIT DER ABSTRICHE IM PS-RÖHRCHEN DES ABSTRICHBESTECKS BEI RAUMTEMPERATUR UND IM TIEFKÜHLSCHRANK (-18 °C) | 64 |
| ABBILDUNG 14: AUSSCHNITT VON ÜBEREINANDERGELEGTEN GC-MS CHROMATOGRAMMEN BEI LAGERUNG IN PS-RÖHRCHEN UND IN HEADSPACE-VIALS VOR UND NACH DER THERMISCHEN INAKTIVIERUNG | 66 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| TABELLE 1: AUSWERTUNG DER LEISTUNG DER SPÜRHUNDE DOPPEL-BLIND-VERSUCH 1 | 59 |
| TABELLE 2: AUSWERTUNG DER LEISTUNG DER SPÜRHUNDE DOPPEL-BLIND-VERSUCH 2 | 61 |
| TABELLE 3: AUSWERTUNG DER LEISTUNG DER SPÜRHUNDE DOPPEL-BLIND-VERSUCH 3 | 69 |
| TABELLE 4: AUSWERTUNG DER LEISTUNG DER SPÜRHUNDE BEI PRÄSENTATION GEMISCHTER PROBENARTEN..... | 72 |
| TABELLE 5: STUDIENÜBERSICHT TEIL 1 | 91 |
| TABELLE 6: STUDIENÜBERSICHT TEIL 2 | 91 |
| TABELLE 7: STUDIENÜBERSICHT TEIL 3 | 92 |

1. Einleitung

Die hier vorgelegte Arbeit beschreibt eine interdisziplinäre *Proof-of-Concept*-Studie, die die Frage adressiert, ob der Nachweis von SARS-CoV-2-Infektionen durch die Präsentation von Hautabstrichen an entsprechend trainierte Spürhunde möglich ist. Parallel hierzu erfolgte die Analyse der chemischen Geruchsmuster der Hautabstriche, um infektionsspezifische Geruchsmuster zu identifizieren. Ziel der Arbeit waren neben der Testung des Verfahrens und dessen Verzahnung mit der Geruchsanalytik der Vergleich mit etablierten Covid-19-Test- und Früherkennungsstrategien sowie die Einordnung in die zeitliche Dynamik der Pandemie. Die aktive Projektphase wurde im November 2020 und somit früh im Verlauf der Pandemie begonnen und über acht Monate fortgeführt. Die Besonderheiten der Entwicklung und Durchführung eines Projekts in einer dynamischen Situation wird im Rahmen der vorgelegten Arbeit wiederholt deutlich.

1.1 Kontext der Arbeit

Die Ende 2019 ausgebrochene SARS-CoV-2-Pandemie (*Severe Acute Respiratory Syndrome Corona-Virus 2*, „Corona-Pandemie“) hat das allgemeine Leben in vielen Bereichen tiefgreifend verändert. Seit Beginn der Pandemie sind zuverlässige, effiziente Teststrategien ein wichtiger Forschungsgegenstand, um Infektionen zu vermeiden und somit sowohl Menschen vor einer Erkrankung - im schlimmsten Fall bis zum Tod - zu schützen, als auch zur Normalisierung des Lebens beizutragen. In diesem Zuge waren verschiedene internationale Forschungsgruppen bemüht, Spürhunde als Teil der breit anzuwendenden Teststrategien einer SARS-CoV-2-Infektion einzusetzen [1,2].

Spürhunde wurden in anderen medizinischen Bereichen bereits zur Erkennung von Krankheiten erfolgreich eingesetzt [3,4]. Entsprechend ausgebildete Spürhunde könnten daher auch eine effiziente, frühzeitige Identifikation SARS-CoV-2-Infizierter ermöglichen und somit zur Eindämmung von Ansteckungsgeschehen beitragen [5]. Bereits 2020 lagen erste Pilotstudien bezüglich der Identifikation SARS-CoV-2-Infizierter anhand von Speichel, Tracheobronchialsekret (TBS) und Schweiß durch entsprechend ausgebildete Spürhunde vor [1,2].

Zur weniger invasiven Probengewinnung mit geringerer Ansteckungsgefahr durch die Probenentnahme wurde die Idee entwickelt, auf Hautabstriche als Untersuchungsmaterial zurückzugreifen. Hierbei muss nicht auf potenziell hochinfektiöses Material aus dem Nasopharynx zurückgegriffen werden. Hierdurch könnte zudem der Grundstein für eine mögliche Identifikation von Infektionen durch

Spürhunde im Vorbeilaufen, analog zur Anwendung von Sprengstoffspürhunden in der Luftsicherheit, gelegt werden.

1.2 Ziel der Arbeit

Im November 2020 startete an der Hautklinik und dem Institut für Virologie der Universitätsmedizin Mainz in Kooperation mit der Firma AWIAS und der Hochschule Rhein-Bonn-Sieg (HRBS) sowie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (TiHo) das Projekt TRACKDOG.

Die primär bearbeitete Forschungsfrage war, ob eine Identifikation von SARS-CoV-2-Infizierten durch entsprechend ausgebildete Spürhunde anhand von Hautabstrichen möglich ist.

Zudem sollte durch die Zusammenarbeit mit dem Institut für Sicherheitsforschung der HRBS die Identifikation von SARS-CoV-2-spezifischen molekularen Geruchsmustern erfolgen.

Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit ist die Entwicklung des Projekts, die Auswertung der Ergebnisse sowie eine Kontextualisierung in den zeitlichen Verlauf der Pandemie und die aktuelle Literatur.

1.3 Struktur der Arbeit

Die Einleitung (Kapitel 1) umreißt die Hintergründe des Projekts, die Entwicklung der Forschungsfrage und den Aufbau der folgenden Arbeit. Der in Kapitel 2 folgende Grundlagenteil erarbeitet das notwendige Verständnis der verwendeten Konzepte und gibt einen Überblick über den Stand der Forschung. In Kapitel 3 werden die im Projekt TRACKDOG gewählten Materialien und Methoden ausführlich erläutert. Kapitel 4 zeigt die Ergebnisse der Arbeit auf. In Kapitel 5 werden die erarbeiteten Ergebnisse und Erkenntnisse mit den Arbeiten anderer Forschungsgruppen verglichen, eingeordnet und diskutiert. Anschließend folgt eine kurze Zusammenfassung.

An dieser Stelle sei bereits darauf hingewiesen, dass sich aufgrund der dynamischen Situation, in welcher das Projekt TRACKDOG zwischen November 2020 und Juli 2021 erarbeitet, durchgeführt und seitdem ausgewertet und verschriftlicht wurde, Besonderheiten für den Aufbau dieser Arbeit ergeben. So wird im Literaturteil zunächst der Stand der Forschung berichtet, welcher bei der Planung der Arbeit zur Verfügung stand. Auf während der Projektdauer gewonnene weiterführende Erkenntnisse wird mit entsprechendem Vermerk verwiesen.

2. Grundlagen

Zunächst werden die theoretischen Grundlagen für das Verständnis der folgenden Abhandlung erläutert. Relevant sind hierfür die Hintergründe zu den virologischen und epidemiologischen Gegebenheiten der SARS-CoV-2-Infektion und der resultierenden Covid-19-Pandemie. Des Weiteren werden die Gegebenheiten, aufgrund derer Hunde als zuverlässige Geruchssensoren zu betrachten sind sowie deren etablierte Einsatzmöglichkeiten dargestellt. Darüber hinaus werden die Grundlagen der chemischen Analytik von Geruchsstoffen gelegt, welche die qualitative und quantitative Analyse dessen ermöglichen soll, was die Hunde für uns verborgen mit ihrer Nase leisten.

2.1 Das SARS-CoV-2-Virus

SARS-CoV-2 ist ein behülltes Coronavirus [6], das das auslösende Pathogen der im Jahr 2019 ausgebrochenen Covid-19-Pandemie ist. Es wurde erstmals Ende 2019 in Wuhan, China, identifiziert [7-9] und hat sich seitdem weltweit verbreitet [10].

2.1.1 Virologische Grundlagen

Um die Ausbreitung und die Symptomatik der Covid-19-Infektionen zu verstehen, ist ein grundlegendes virologisches Verständnis des Virus bedeutsam.

SARS-CoV-2 ist ein behülltes Virus aus der Familie der Betacoronaviren [11]. Es besteht aus einer einzelsträngigen RNA (Ribonukleinsäure), die von einem Nukleokapsidproteinmantel umgeben ist [6].

Eingelagert in die Hüllmembran des Virus befinden sich Spike-Proteine, welche spezifisch an den hACE-2 (*human-Angiotensin-Converting-Enzyme-2*)-Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzellen [12] binden. Der hACE-2-Rezeptor wird in verschiedenen Geweben exprimiert, allen voran im Gastrointestinaltrakt, Herz-Kreislaufsystem und den Lungen [13,14]. Die Bindung des Virus an den Rezeptor ermöglicht das Eindringen in die Zielzelle und die dortige Replikation. SARS-CoV-2 verfügt hierbei über eine hohe Bindungsaffinität zu hACE-2 [13]. Die Expression des hACE-2 in verschiedenen Geweben spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Covid-19-Infektion [15,16]. Nach der Aufnahme des Virus in

die Zielzellen wird die Virus-RNA in den Wirtszellen repliziert und vermehrt sich so im Wirtsorganismus [17].

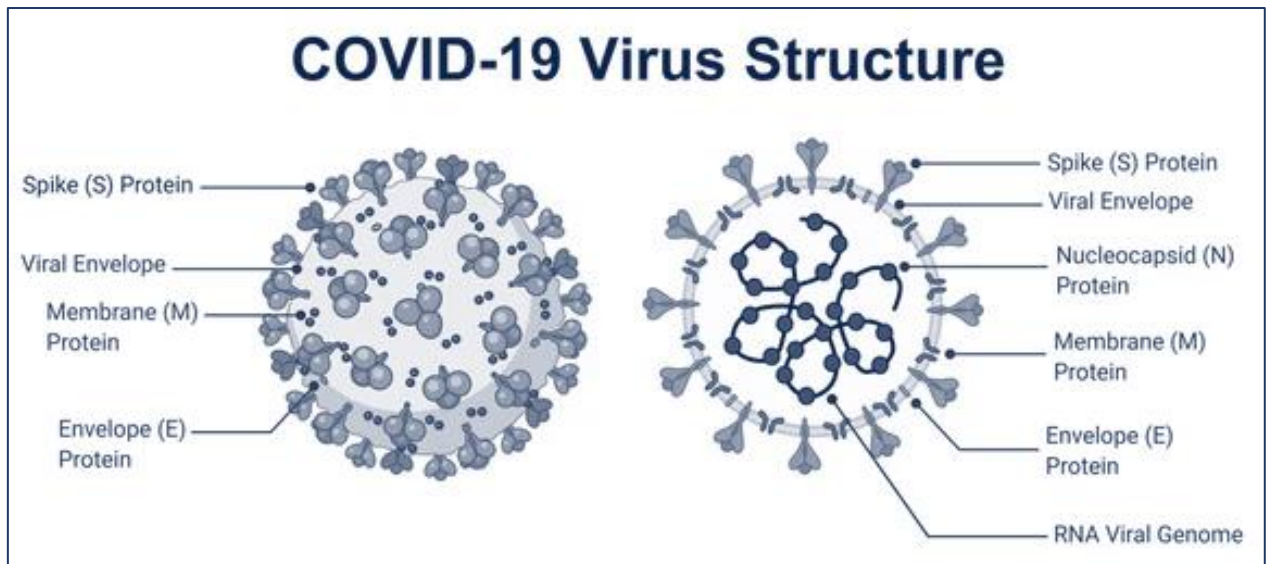


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des SARS-CoV-2-Virus

(<https://www.shutterstock.com/de/image-illustration/covid19-virus-structure-sarscov2-anatomy-pandemic-1854731590>)

Abbildung 1 stellt den Aufbau des SARS-CoV-2-Virus schematisch dar. Es wird die in der Hülle liegende als RNA verschlüsselte Erbinformation illustriert. Zudem sind die für das weitere Verständnis bedeutsamen Spike-Proteine gezeigt.

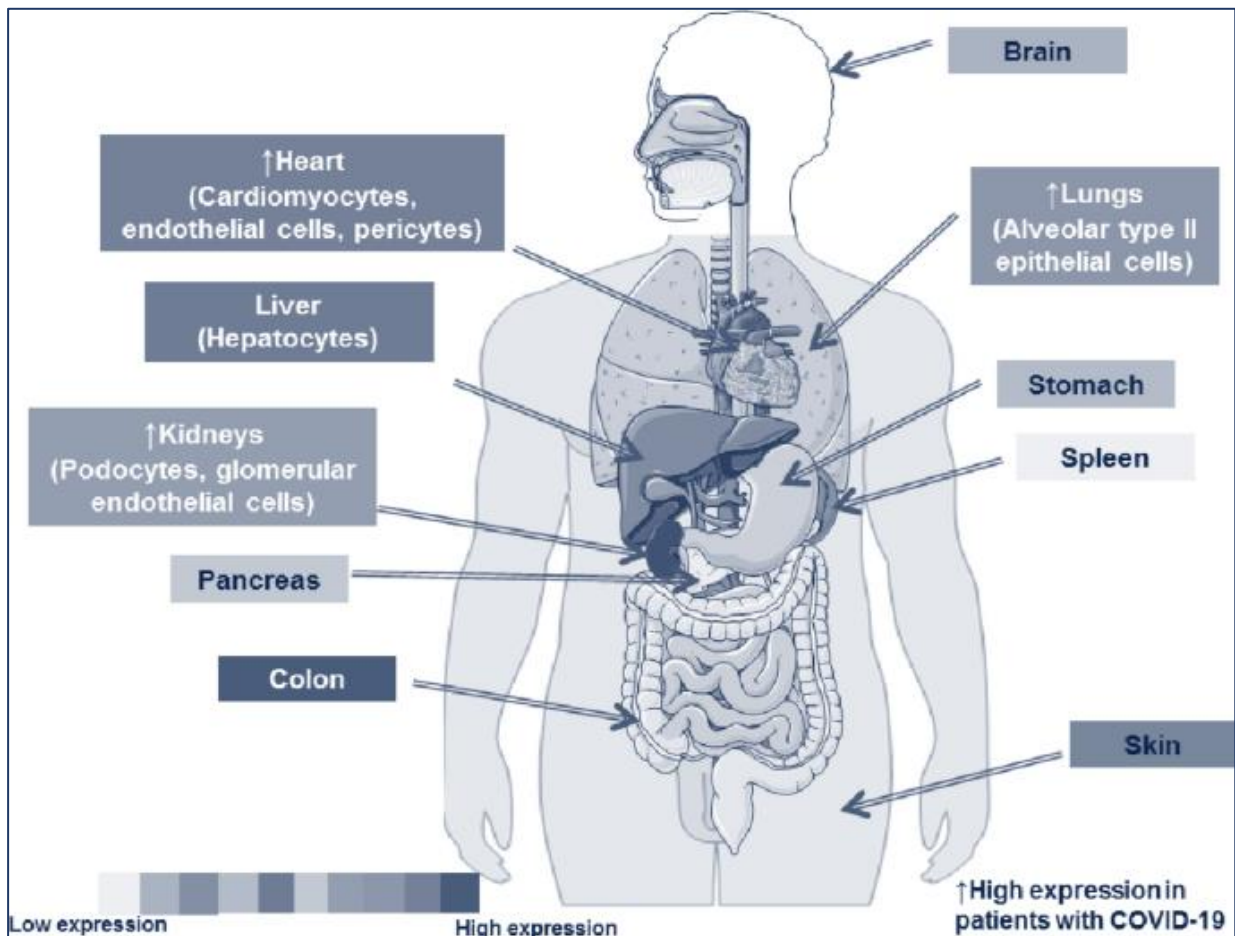


Abbildung 2: Expression von ACE-2-Rezeptoren in verschiedenen Organsystemen

(Medina-Enríquez, M.M., Lopez-León, S., Carlos-Escalante, J.A. et al. ACE2: the molecular doorway to SARS-CoV-2. Cell Biosci 10, 148 (2020).)

Abbildung 2 illustriert die Expression von hACE-2-Rezeptoren in verschiedenen Gewebetypen. Hierbei zeigt die Farbkodierung der Textfelder zudem, wie hoch die Rezeptordichte in dem jeweiligen Gewebetyp ist. Organsysteme mit dunklen Textfeldern weisen eine hohe Rezeptordichte auf, Gewebetypen mit helleren Textfeldern eine weniger dichte hACE-2-Expression.

2.1.2 SARS-CoV-2-Übertragung

Wichtig für das Verständnis der Pandemieentwicklung sind nicht nur der Aufbau des Virus und dessen Interaktion mit dem Wirtsorganismus, sondern vor allem die Übertragungsmechanismen.

Die Übertragung des SARS-CoV-2-Virus erfolgt primär von Mensch zu Mensch [18], wobei eine Transmission zwischen Spezies möglich ist [18,19]. Hauptübertragungswege sind die Inhalation von virushaltigen Tröpfchen und Aerosolen [16,20,21]. Die Zellen der Schleimhäute der oberen Atemwege exprimieren hACE-2, dies ermöglicht das Eindringen des Virus [22].

Die Wahrscheinlichkeit einer Exposition mit folgender Infektion ist erhöht, je kleiner die Distanz zu einer infizierten Person ist, da die Aerosolkonzentration mit wachsender Distanz zum Patienten abnimmt [23]. Eine Übertragung kann auch nach Kontakt mit einer asymptomatisch infizierten Person erfolgen [24,25], dies macht etwa 10-15% der Übertragungen aus [26].

Die Inkubationszeit des Virus bis zum Auftreten von Symptomen nach erfolgter Infektion wird in der Literatur mit einem Mittel von 6,38 Tagen angegeben [27].

Die maximale Viruslast ist nach 4,3 Tagen und somit vor dem Auftreten erster Symptome erreicht [28]. Eine Metaanalyse zeigt, dass Virus-RNA im Mittel für 17 Tage nachgewiesen werden kann, wobei nach zehn Tagen keine vermehrungsfähigen Viruszellen detektiert werden konnten [29]. Die Infektiosität hängt unter anderem von der Schwere der Erkrankung ab, endet jedoch zumeist innerhalb von zehn Tagen nach dem Symptombeginn [30].

2.1.3 Covid-19-Erkrankung

Aufbauend auf den unter 2.1.1 sowie 2.1.2 dargelegten virologischen Grundlagen wird im Folgenden auf die durch das Virus verursachte Erkrankung eingegangen.

Die Erkrankung, die durch eine SARS-CoV-2-Infektion ausgelöst wird, heißt Covid-19 („*coronavirus disease 2019*“) und betrifft hauptsächlich die Atemwege, mit Husten und Dyspnoe als häufigste Symptome [31]. Die Replikation des Virus in den Wirtszellen löst eine Immunantwort des Wirtes aus, die zu einer überschießenden Entzündungsreaktion und konsekutiv zu Schäden in den betroffenen Geweben führt [32]. Dies kann zum *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) führen [33,34], welches eine Mortalität von über 35% aufweist [35].

Eine SARS-CoV-2-Infektion kann sich auch an anderen Organsystemen manifestieren. Der Einfluss des Virus auf das Gefäßendothel trägt zu Komplikationen in Form von Gerinnungsstörungen und thromboembolischen Ereignissen bei [36,37].

Insgesamt ist die klinische Präsentation von Covid-19 vielfältig und variiert erheblich im Schweregrad der Symptome [38]. Die meisten Menschen, die mit SARS-CoV-2 infiziert sind, zeigen leichte bis moderate Symptome wie Fieber, Husten, Kurzatmigkeit [39,40] und passageren Verlust des Geschmacks- oder Geruchssinns [41]. Besonders Personen höheren Alters, chronisch Erkrankte und Immunsupprimierte weisen jedoch ein erhöhtes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf mit erhöhter Letalität auf [42,43].

2.1.4 Diagnostik des SARS-CoV-2-Virus

Die Diagnostik von SARS-CoV-2 spielte eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung der Pandemie. Die frühzeitige und genaue Identifizierung von SARS-CoV-2-Infektionen, unabhängig von der Ausprägung der klinischen Manifestation, war essenziell für die Isolierung von infektiösen Infizierten und somit für die Eindämmung der Virusausbreitung [40].

Goldstandard für die Diagnostik von SARS-CoV-2-Infektionen ist der direkte Nachweis des Virusgenoms mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, siehe 3.4.2) [44, 45, 46]. Die PCR hat eine hohe Sensitivität und Spezifität [47]. Hierbei bezeichnet die Spezifität die Fähigkeit eines Tests, korrekt negative Ergebnisse zu identifizieren, also falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Sensitivität hingegen bezieht sich auf die Fähigkeit eines Tests, korrekt positive Ergebnisse zu identifizieren, also falsch-negative Befunde zu vermeiden.

Neben dem Ergebnis, ob der Nachweis positiv oder negativ ist, gibt eine PCR-Analyse den CT-Wert (*Cycle Threshold*-Wert) an. Dieser Wert gibt Auskunft darüber, wie viele Zyklen des Amplifikationsprozesses stattgefunden haben, um das Signal des zu untersuchenden DNA- oder RNA-Fragments über einen a priori definierten Schwellenwert zu bringen. Ein niedriger CT-Wert deutet auf eine hohe Ausgangskonzentration des Zielmoleküls hin, während ein hoher CT-Wert auf eine niedrige Ausgangskonzentration hinweist [48].

In Bezug auf die Covid-19-Diagnostik bedeutet ein niedriger CT-Wert, dass die untersuchte Person eine höhere Viruslast aufweist und möglicherweise infektiöser ist.

Trotzdem wurde beschrieben, dass die PCR zu Erkrankungsbeginn negativ ausfallen kann [49].

Neben der PCR wurden auch serologische Tests entwickelt, die auf den Nachweis von Antikörpern gegen das Virus im Blut abzielen [50]. Diese Tests können Informationen über vergangene oder laufende Infektionen liefern [51,52]. Serologische Tests sind nicht für die Akutdiagnostik geeignet, da es einige Zeit dauert, bis Antikörper gebildet werden und die Sensitivität aus diesem Grund besonders in der ersten Woche einer Infektion niedrig ist [52]. Insgesamt spielen diese für die SARS-CoV-2-Diagnostik eine untergeordnete Rolle.

Im Laufe der Pandemie wurden Schnelltests entwickelt, die eine schnellere und einfachere Diagnose von Covid-19 ermöglichen [53]. Diese Tests liefern innerhalb von Minuten ein Ergebnis [54]. Die Sensitivität und Spezifität unterscheiden sich je nach Hersteller erheblich und hängt von der Viruslast des zu Untersuchenden ab [55]. Insgesamt ist zu beachten, dass die Zuverlässigkeit von Schnelltests nicht mit der der PCR-Testung zu vergleichen ist und die Sensitivität je nach vorherrschender Covid-Variante zwischen 33% (Omicron-Variante) und 63% (Delta-Variante) beschrieben wird [56].

2.1.5 Infektionsprävention

Aufgrund der begrenzten therapeutischen Möglichkeiten im Falle einer Covid-19-Infektion und insbesondere vor der Entwicklung der wenigen zur Verfügung stehenden spezifischen Therapien sowie wirksamen Impfstoffen lag das medizinische Hauptaugenmerk auf der Verhinderung der Ausbreitung von Infektionsgeschehen. Allgemeine Infektionsschutzmaßnahmen spielten eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Verbreitung von SARS-CoV-2 [57, 58]. Dazu gehörten das Einhalten eines Abstands von 1,5-2 Metern zu anderen Personen insbesondere in Innenräumen [59], die regelmäßige Händehygiene nach jedem Kontakt mit potenziell kontaminierten Oberflächen oder Personen sowie das Einhalten der Husten- und Nies-Etikette [60].

Es wurde empfohlen, Menschenansammlungen und Reisen in Gebiete mit einer hohen Ausbreitungsdynamik zu vermeiden [61-64]. Das Reduzieren von Aerosolen in Innenräumen durch Lüften oder den Einsatz geeigneter Lüftungs- und Luftfiltersysteme konnte ebenfalls Übertragungen verringern [65].

Das Tragen eines geeigneten Mund-Nasen-Schutzes führte zur Reduktion der Verbreitung von Atemwegssekreten [66]. Das Tragen des Mund-Nasen-Schutzes wurde in allen Situationen empfohlen, in denen die soziale Distanzierung nicht ausreichend möglich war. In Situationen, in denen von einer hohen Infektionsgefahr auszugehen war, beispielsweise im Kontext der medizinischen Versorgung von Covid-19-Patienten, war das Tragen persönlicher Schutzkleidung und einer FFP-2-Maske obligatorisch [67].

2.2 Die Covid-19-Pandemie

Die Covid-19-Pandemie, die offiziell am 11. März 2020 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ausgerufen wurde und bis in den Mai 2023 als offizieller globaler Notstand angehalten hat, hat eine beispiellose weltweite Gesundheitskrise verursacht, Millionen Opfer gefordert und die Medizin sowohl wissenschaftlich als auch in der akuten Krankenversorgung vor große Herausforderungen gestellt. Zudem kam es zu gravierenden Einschnitten in das gesellschaftliche Leben. Ihre Entwicklung, Auswirkung und Dynamik wird in den nächsten Abschnitten dargestellt.

2.2.1 Epidemiologie der Covid-19-Pandemie

Die globale Verbreitung von Covid-19 begann mit dem ersten Nachweis in Wuhan, China, im Dezember 2019 [7]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) erklärte die Situation am 11. März 2020 offiziell als Pandemie [68]. Reisebewegungen spielten eine wichtige Rolle bei der globalen Ausbreitung der Infektionserkrankung [69,70].

Die Fallzahlen von Covid-19-Erkrankungen nahmen dynamisch und exponentiell zu. Die Basisreproduktionszahl (R_0) lag ohne das Ergreifen von infektionspräventiven Maßnahmen bei 2-3 [71]. Die Fallzahlen unterlagen saisonalen sowie regionalen Schwankungen und es ließen sich sogenannte Infektionswellen beobachten.

Asymptomatische Verläufe führten zu einer hohen Dunkelziffer an nicht erkannten Infektionen und zu einer erschwerten Eindämmung der Infektionsketten.

2020 wurden in Deutschland rund 176 000 Patientinnen und Patienten mit Covid-19-Infektionen hospitalisiert. Rund 36 900 dieser Personen, also etwa ein Fünftel (20,9 %), mussten intensivmedizinisch versorgt werden [72]. Circa 31 600 Personen und somit 17,9 % der hospitalisierten Covid-19-Erkrankten sind im Krankenhaus verstorben. Ihr Durchschnittsalter lag bei 80,3 Jahren [72]. Dies geht mit einer bei zunehmendem Alter steigenden Fallsterblichkeitsrate (CFR) einher.

Insgesamt entwickelte sich die Pandemie im Zeitraum des hier behandelten Forschungsprojekts in Deutschland in sieben Phasen, welche retrospektiv eingeteilt werden konnten [73]. Diese als „Wellen“ bezeichneten Entwicklungen kennzeichnen sich durch andere treibende Virusmutationen, Dynamiken und Sterblichkeitsraten.

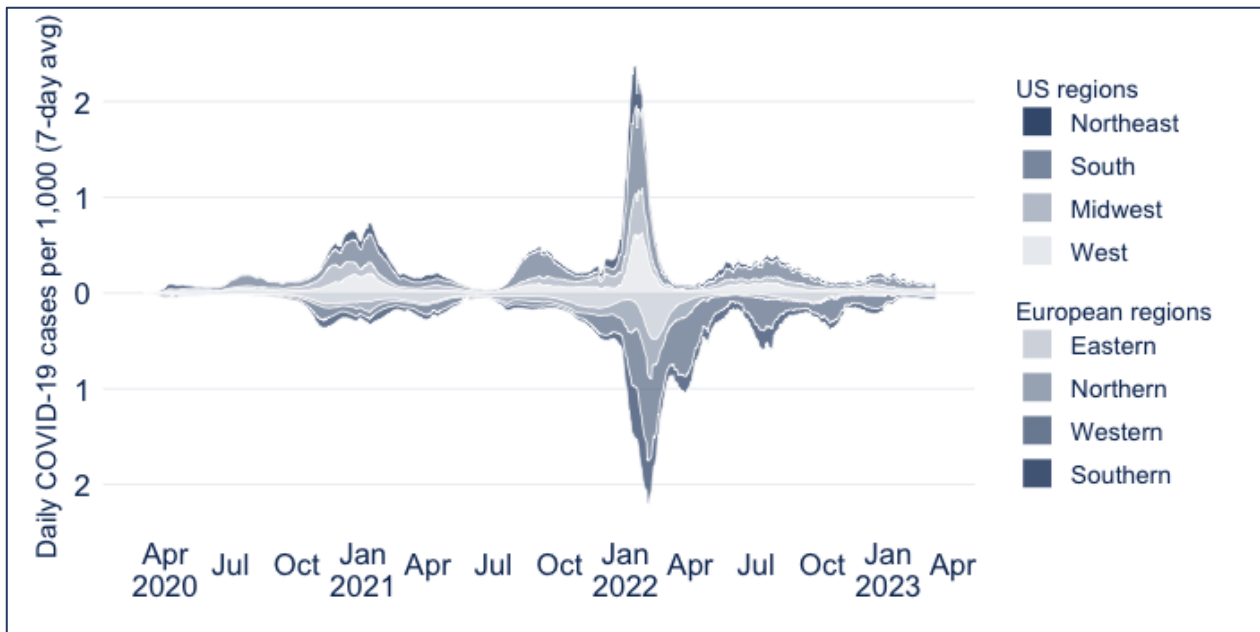


Abbildung 3: Covid-19-Erkrankungswellen in den USA und Europa

(<https://pandem-ic.com/covid-waves-europe-and-us-compared/>)

Abbildung 3 zeigt die Anzahl der COVID-19-Neuerkrankungen pro Tag im Zeitraum von April 2020 bis April 2023 zum einen in den USA (oberer Teil der Darstellung) und zum anderen in Europa (unterer Teil der Darstellung). Es werden die verschiedenen Infektionswellen mit verschieden hohen Fallzahlen deutlich.

2.2.2 Gesellschaftliche Implikationen der Covid-19-Pandemie

Die Covid-19-Pandemie hatte vielfältige Auswirkungen auf die Gesellschaft. Aufgrund der raschen Ausbreitung des SARS-CoV-2-Virus wurden umfassende Maßnahmen eingeleitet, um die Verbreitung einzudämmen, welche dynamisch an die aktuelle Situation angepasst wurden [74]. Neben den bereits genannten Hygienemaßnahmen zur Infektionsprävention wurden die Einführung von Lockdowns, sozialer Distanzierung, Quarantänemaßnahmen und das Tragen von Masken gefordert, was das tägliche Leben eindrücklich verändert hat [75]. Die Pandemie hatte nicht nur gravierende Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheit und das Gesundheitssystem [76], sondern auch auf die Wirtschaft [77], das Bildungssystem [78], soziale Interaktionen [79] und die mentale Gesundheit [80, 81] der Menschen. Die internationale Reaktion auf die Krise hat die Bedeutung der globalen Gesundheitssysteme, der Koordination von Maßnahmen und die Stärkung der Forschung und Entwicklung von Impfstoffen und Behandlungsmethoden verdeutlicht [82]. Neben diesen Eingriffen in das übergeordnete globale System (Makrosystem) hatte das Virus auch auf der Ebene des Einzelnen (Mikroebene) verheerende Folgen. Es sind in den Jahren 2020 und 2021 Schätzungen der WHO zufolge weltweit 15 000 000 Menschen an oder mit Covid-19-Infektionen verstorben [83]. Zudem sind schätzungsweise 65 000 000 Menschen von Long-Covid betroffen [84], dies entspricht ca. jeder zehnten infizierten Person. Long-Covid ähnelt einem *Chronic Fatigue Syndrome* und schränkt Betroffene in ihrer Teilhabe am Alltag über Monate nach der primären Infektion ein.

Um zur Infektionseindämmung beizutragen, entstand bereits zu Beginn der Pandemie die Idee, Spürhunde zur Detektion von Infektionen auszubilden und einzusetzen. Hintergrund ist die Tatsache, dass entsprechend ausgebildete „*medical dogs*“ bereits in anderen Feldern in der Lage sind, Krankheiten anhand ihres Geruchssinns zu erkennen. Für diese Arbeit ist also nicht nur ein Verständnis des Virus und der Pandemie von Bedeutung, sondern auch ein Überblick über Möglichkeiten und Limitationen von Spürhunden, welcher im folgenden Kapitel gegeben wird.

2.3 Spürhunde

2.3.1 Allgemeines

Unter einem Spürhund versteht man einen Hund, der zur speziellen Geruchserkennung und dem Verfolgen von Geruchsspuren ausgebildet ist [85].

Die Bedeutung von Spürhunden wurde bereits im Verlauf des 20. Jahrhunderts vermehrt erkannt, woraufhin das Abrichten entsprechender Hunde weiterentwickelt und spezialisiert wurde. Schon während des Ersten Weltkriegs wurden Hunde als Sanitätshunde eingesetzt, um Verwundete zu finden [86]. In den letzten Jahrzehnten haben sich die Anwendungsbereiche von Spürhunden diversifiziert. Inzwischen werden Spürhunde vor allem für das Aufspüren von Drogen, Lebensmitteln, Bargeld und Sprengstoffen trainiert, wobei ihr Einsatz für letzteres als sensitivste Nachweismethode gilt [87-89].

Auch für andere Applikationen, zum Beispiel die Personensuche (*Mantrailing*), in der Land- und Forstwirtschaft [90], dem Baubereich oder der Medizin kommen Spürhunde zum Einsatz.

Eine Limitation, die sämtliche Anwendungsfelder gemeinsam haben, ist, dass für den Menschen nicht klar ersichtlich ist, wie der Hund die gesuchte Information aufnimmt und verarbeitet. Es ist ebenso schwer zu fassen, auf welchen genauen Reiz die Hunde reagieren. Diese konzeptuelle Schwierigkeit bezeichnet man als „Black-Box-Phänomen“ [91]. Dahinter verbirgt sich die nicht quanti- oder qualifizierbare Geruchsinformationsverarbeitung durch den Hund.

So stellte sich für diese Studie die Frage, wie und unter welchen Rahmenbedingungen Hunde auch als Spürhunde für Covid-19-Infektionen ausgebildet und eingesetzt werden können.

2.3.2 Physiologische Grundlagen

Entscheidend für den Einsatz von Spürhunden ist der ausgeprägte Geruchssinn von Hunden, welcher durch diverse anatomische und physiologische Besonderheiten ermöglicht wird und eine hochspezifische Erkennung verschiedener Geruchssignale ermöglicht [92,93]. Der Geruchssinn von Hunden spielt eine wichtige Rolle für die Kommunikation mit der Umwelt, sowohl innerhalb der Spezies als auch zwischen verschiedenen Spezies, wie mit den Menschen. Die Fähigkeit von Hunden zur hochspezifischen Erkennung verschiedener Geruchssignale ist analytischen Methoden in Teilen überlegen [90]. Das olfaktorische System von Hunden besteht aus zwei Hauptteilen: dem hauptolfaktorischen Epithel (HOE) und dem vomeronasalen Organ (VNO). Diese sind voneinander unabhängig bei der Erfassung von Geruchssignalen und reagieren auf unterschiedliche Signale [92]. Die Signale, die vom HOE und VNO wahrgenommen werden, werden auch in den zum Gehirn führenden Bahnen getrennt. Das VNO ist nicht nur die Hauptstruktur bei der Pheromonerkennung, sondern kann auch zur Erkennung anderer gering flüchtiger Substanzen verwendet werden [92]. Während des Schnüffeln teilt sich die eingeatmete Luft in den Nasenlöchern des Hundes in zwei verschiedene Wege. Der obere Luftstrom gelangt direkt in die olfaktorische Region, wo Geruchsmoleküle

abgelagert und angesammelt werden, um zu verhindern, dass sie ausgeatmet werden. Der Rest der Luft fließt durch den Rachen in die Lunge. Dieser Weg wird auch für die Ausatmung genutzt, wodurch eine längere Exposition der Geruchsstoffe an den chemosensorischen Bereich des olfaktorischen Epithels unterstützt wird [92].

Im Vergleich zu Menschen können Hunde aufgrund einer Kombination aus olfaktorischer Neuronendichte und -anzahl, Modifikation des Nasenluftstroms und Spezifität der zentralen Verarbeitung signifikant kleinere Konzentrationen von Geruchsstoffen erkennen. Die angemessene Identifikation eines Geruchs scheint die Aktivierung einer spezifischen Kombination von olfaktorischen Rezeptoren zu involvieren. Während beim Menschen mehr als 50% des Genpools für das olfaktorische System als Pseudogen keine Expression von Rezeptoren zur Folge hat, sind bei Hunden nur etwa 20% dieser Gene funktionell inaktiv [92].

Die Prozentzahl der Pseudogene sowie die Häufigkeit spezifischer Genpolymorphismen variieren je nach Rasse, was einer der Gründe für rassespezifische olfaktorische Kapazitäten sein könnte [92].

Die Ergebnisse zur Bestimmung der riechempfindlichsten Rassen sind jedoch nicht konsistent. Dies könnte darauf hinweisen, dass neben genetischer Veranlagung auch einige Verhaltensmerkmale wie angeborene Motivation, Lernbereitschaft, Trainierbarkeit und die Fähigkeit zur Zusammenarbeit mit Menschen die allgemeine olfaktorische Leistungsfähigkeit von Hunden signifikant beeinflussen können. Im Kontext der Unterschiede in den olfaktorischen Fähigkeiten zwischen den

Geschlechtern zeigen die Ergebnisse von Wei et al. an, dass Zellen in den Riechkolben von Hündinnen aktiver sind als die von Rüden [92].

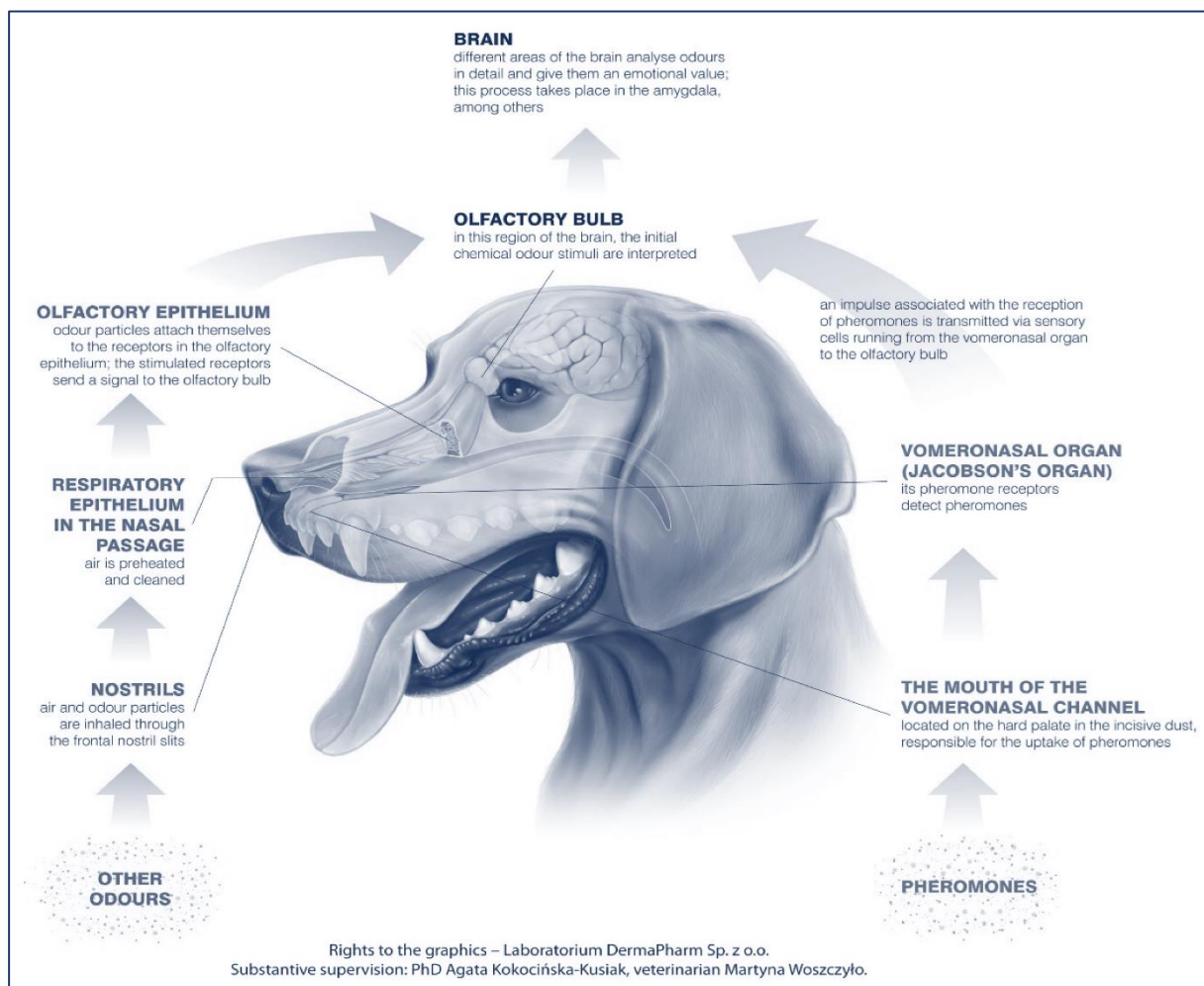


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Geruchsverarbeitung des Hundes

(Kokocińska-Kusiak A, Woszczyło M, Zybala M, Maciocha J, Barłowska K, Dziecioł M. Canine Olfaction: Physiology, Behavior, and Possibilities for Practical Applications. *Animals*. 2021; 11(8):2463.)

Abbildung 4 zeigt die parallele Geruchsverarbeitung von Hunden durch das HOE und VNO schematisch auf, welche mitverantwortlich für die besondere Eignung von Hunden zur sensiblen Erkennung von einzelnen Gerüchen ist. Zudem zeigt sie die Zwischenschritte, die zwischen Einatmen von Geruchsmolekülen und deren Verarbeitung im Gehirn des Hundes stattfinden.

2.3.3 Ausbildung von Spürhunden

Die Ausbildung von Spürhunden ist ein komplexer Prozess, der spezifisches Fachwissen, Erfahrung und Geduld erfordert. Je nach geplantem Einsatzgebiet des Hundes ist eine unterschiedliche, spezialisierte Ausbildung nötig, um den angestrebten Einsatz zu ermöglichen. Besondere Bedeutung liegt hierbei in der Auswahl der Hunde, der Hund-Trainer-Beziehung sowie dem Aufbau und der Repetition des Trainings. Die Auswahl geeigneter Hunde ist der erste wichtige Schritt. Gewisse Rassen wie Deutsche Schäferhunde und Belgische Malinois werden aufgrund ihrer natürlichen Anlagen häufig für die Ausbildung zu Spürhunden ausgewählt [94]. Die Ausbildung beginnt in der Regel bereits im Welpenalter. Ein wichtiger Aspekt der Ausbildung besteht darin, den Hunden beizubringen, wie sie das Erkennen bestimmter Gerüche anzeigen, beispielsweise durch Sitzen oder Bellen. Diese gewünschten Verhaltensweisen werden durch positive Verstärkung (Lob, Spiel oder Futterbelohnungen) verfestigt [95]. So werden Hunde klassisch nach Pawlow auf das Erkennen von bestimmten Gerüchen konditioniert [95,96].

Nachdem die Hunde die Grundlagen erlernt haben, wird die Ausbildung auf spezifische Gerüche oder Substanzen ausgeweitet, auf die sie trainiert werden sollen. Die Ausbildung von Spürhunden erfordert eine kontinuierliche Übung und Wiederholung, um die Fähigkeiten der Hunde aufrechtzuerhalten und zu verbessern. Regelmäßiges Training, welches verschiedene Umgebungen, Bedingungen und Ablenkungen umfasst, ist entscheidend, um sicherzustellen, dass die Hunde auch unter realen Einsatzbedingungen zuverlässig arbeiten können.

Die Ausbildung von Spürhunden erfordert ein enges Zusammenarbeiten zwischen Hundeführern und ihren Hunden. Die Hundeführer müssen über ein tiefes Verständnis für das Verhalten und die Bedürfnisse der Hunde verfügen und in der Lage sein, die Ausbildung an die individuellen Fähigkeiten und Eigenschaften des Hundes anzupassen.

2.3.4 Spürhunde in der Medizin

Der Einsatz von Spürhunden in der Medizin hat in den letzten Jahren zugenommen. Die artenspezifische Anlage zur sensitiven Identifikation von Geruchsmolekülen wurde zunehmend genutzt, um Gerüche zu identifizieren, die mit bestimmten medizinischen Bedingungen oder Krankheiten assoziiert sind. So gibt es bereits Anwendungsbeispiele für den erfolgreichen Einsatz von Spürhunden zur Identifikation von Krebs [97,98], Diabetes [99], epileptischen Anfällen [100] und Infektionskrankheiten, wie beispielsweise Clostridium-difficile-Infektionen [101]. Der Einsatz von Spürhunden ermöglicht eine nicht-invasive, schnelle und potenziell kostengünstige Methode zur Früherkennung und Diagnose von Krankheiten.

2.3.5 Einsatz von Spürhunden in der Diagnostik von SARS-CoV-2

Der Einsatz von Spürhunden wurde auch im Kontext der Covid-19-Diagnostik in Betracht gezogen.

Erste Arbeiten zu diesem Thema, welche mit chemisch inaktivierten Nasen-Rachen-Abstrichen von Patienten arbeiteten, zeigten vielversprechende Ergebnisse [1,2]. Die Literatur zeigt, dass Hunde teilweise Covid-19-Infektionen identifizierten, die noch PCR-negativ waren [2]. Dies deutet darauf hin, dass Spürhunde die Früherkennung von Covid-19-Infektionen verbessern könnten.

Die Forschung auf diesem Gebiet stand jedoch zum Beginn der hier dargestellten Forschungsarbeit im November 2020 noch am Anfang. Weitere Untersuchungen waren erforderlich, um die Genauigkeit und Zuverlässigkeit des Einsatzes von Spürhunden als diagnostisches Instrument für Covid-19 zu bewerten und die zugrunde liegenden biologischen Mechanismen besser zu verstehen. Auf die bis zur Veröffentlichung dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wird in der Diskussion genauer eingegangen.

2.4 Geruchsanalytik - Volatile Organic Compounds (VOC)

Zum besseren Verständnis und der angestrebten Objektivierbarkeit der Geruchsidentifizierung durch Spürhunde sollte entschlüsselt werden, welche Gerüche erkannt werden und ob es SARS-CoV-2-spezifische Geruchsmuster gibt. Hierfür ist ein Grundlagenverständnis der chemischen Verschlüsselung von Geruchsinformationen sowie deren Erfassung notwendig.

Volatile Organic Compounds (VOCs) spielen eine bedeutende Rolle als Geruchsmoleküle. Sie sind maßgeblich für die Wahrnehmung und Unterscheidung verschiedener Gerüche verantwortlich [102].

Aufgrund ihrer hohen Flüchtigkeit und chemischen Vielfalt sind VOCs schwer zu klassifizieren. Sie können verschiedene chemische Klassen umfassen. Die chemische Zusammensetzung von VOCs bestimmt wiederum ihre physikalischen Eigenschaften [103].

Sie alle zeichnen sich durch ihr leichtes Verdampfen aus, aufgrund dessen sie in die Umgebungsluft übergehen [104].

Der Geruchssinn ist eng mit der chemischen Zusammensetzung der VOCs verbunden, da die chemische Struktur der VOCs die spezifische Interaktion mit Geruchsrezeptoren in der Nase beeinflusst [105].

Analytische Methoden wie die Gaschromatographie (GC) in Verbindung mit der Massenspektrometrie (MS) werden eingesetzt, um VOCs in Proben zu identifizieren und zu quantifizieren (siehe 3.4.1 und 3.4.2) [105].

Die VOC-Analytik ermöglicht unter anderem die Untersuchung von Geruchsmustern und die Identifizierung von Geruchsquellen. Die genauen Anwendungsbedingungen werden neben den weiteren relevanten Methoden im folgenden Kapitel dargestellt.

3. Material und Methoden

3.1 Ethik

Das der Dissertationsschrift zugrunde liegende Vorhaben erfolgte nach Zustimmung der Ethikkommission Rheinland-Pfalz in dem Antrag „Gewinnung axillärer und/oder inguinaler Hautabstriche Covid-19-positiver Patienten zur Ausbildung von COVID-19-Spürhunden zur schnellen Identifikation von infizierten Personen“, Antragsnummer 2020-15508.

3.2 Projektkonzept

Das Projekt wurde als *Proof-of-Concept*-Studie geplant. Ziel des Projekts war somit primär zu prüfen, ob die Identifikation von SARS-CoV-2-Infektionen durch die Präsentation von axillären Hautabstrichen durch entsprechend ausgebildete Spürhunde möglich ist. Sekundär erfolgte die in der Literatur zuvor nicht beschriebene Verknüpfung zu der Geruchsforschung, mit dem Ziel, die von den Hunden erkannten Geruchsmuster objektivierbar zu erkennen und so das „Black-Box-Phänomen“ [2.3.1] der Spürhunde durch die begleitende VOC-Analytik zu entschlüsseln.

Um dieses multimodale Projekt zu realisieren, entstand eine projektspezifische Kooperation zwischen der Universitätsmedizin Mainz, der Firma AWIAS und der Hochschule Rhein-Bonn-Sieg.

Hierbei wurde durch die Kollegen und Kolleginnen aus der Hautklinik und dem Institut für Virologie der Universitätsmedizin Mainz die Testung von Patienten auf SARS-CoV-2-Infektionen und in Folge deren Selektion als potenzielle Projektprobanden sowie die Abstrichentnahme durchgeführt.

Durch die Firma AWIAS, welche über ausgewiesene Expertise in der Ausbildung und Führung von Spürhunden verfügt, wurde das Training der Hunde gewährleistet. Das Institut für Sicherheitsforschung der Hochschule Rhein-Bonn-Sieg übernahm die molekulare Erforschung und Entschlüsselung der Proben hinsichtlich ihrer VOC-Muster.

Es wurden an der Universitätsmedizin Mainz standardisierte axilläre Abstriche von PCR-positiven, SARS-CoV-2-infizierten Patienten entnommen, welche anschließend inaktiviert wurden, um eine Infektion des Studienpersonals zu vermeiden. Es erfolgte der gekühlte Probentransport an die Firma AWIAS zur Konditionierung der Hunde sowie an die HRBS zur VOC-Analytik der Proben.

Die Auswertung der Spürhundeleistung erfolgte durch regelmäßige Doppel-Blind-Versuche, welche die Berechnung der Sensitivität und Spezifität der Hunde als diagnostischer Test für SARS-CoV-2-Infektionen ermöglichte.

3.3 Probandeneinschluss

Es wurden Probanden eingeschlossen, die sich zum Zeitpunkt der Studienteilnahme aufgrund einer SARS-CoV-2-Infektion in stationärer Behandlung der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz befanden. Die Probanden mussten über 18 Jahre alt sein und sich mit der Teilnahme einverstanden erklären. Der PCR-Nachweis von SARS-CoV-2 im nasopharyngealen Abstrich sollte maximal 48 Stunden zurückliegen und einen CT-Wert von unter 30 ergeben haben.

Als negative Kontrollen wurden Personen eingeschlossen, die sich zum Zeitpunkt der Studienteilnahme im selben Gebäude wie die SARS-CoV-2-infizierten Probanden in stationärer Behandlung befanden. Die Probanden mussten ebenfalls über 18 Jahre alt sein, sich mit der Teilnahme einverstanden erklären und neben einem aktuellen negativen SARS-CoV-2-PCR-Testergebnis keine Symptome eines Infekts der Atemwege aufweisen.

3.4 Proben

Für den Probandeneinschluss sowie im Verlauf zur Nachbeobachtung wurden nasopharyngeale Abstriche entsprechend dem Goldstandard zur SARS-CoV-2-Diagnostik mittels PCR-Analytik untersucht.

Für die Ausbildung der Spürhunde wurden nach standardisiertem Verfahren gewonnene Hautabstriche verwendet.

Im Folgenden werden das Procedere dieser beiden entscheidenden Abstrichtechniken erläutert. Des Weiteren wird das darauffolgende Probenhandling bezüglich der Inaktivierung und Lagerung beschrieben.

3.4.1 Nasopharyngeale Abstrichgewinnung

Zur PCR-Analyse wurden nasopharyngeale Abstriche untersucht. Diese wurden durch geschultes Studien- und Pflegepersonal entnommen. Es wurde sowohl der tiefe Nasopharynx als auch der Oropharynx mit dem Virocult-Abstrichbesteck der Firma Sigma abgestrichen. Die PCR-Analyse (siehe 3.3.3) erfolgte innerhalb von 24h durch das Institut für Virologie der Universitätsmedizin Mainz.

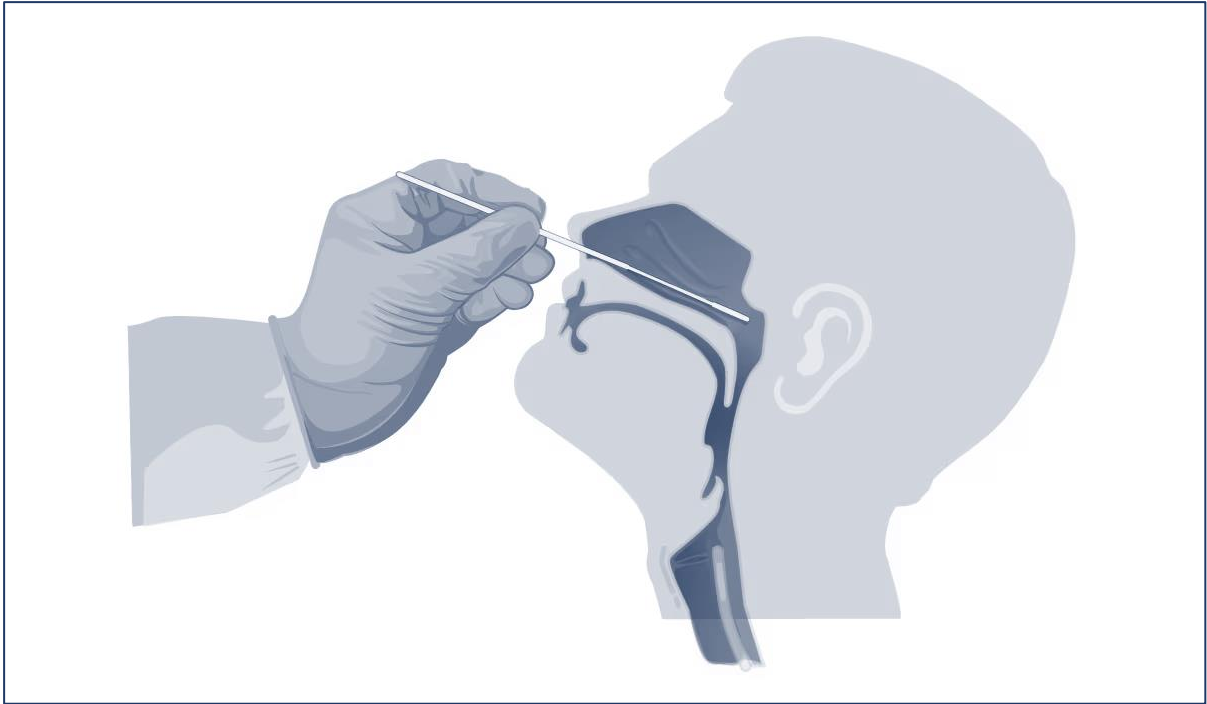


Abbildung 5: Schematische Darstellung der nasopharyngealen Abstrichentnahme

(<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>)

Abbildung 5 zeigt die korrekte Durchführung eines nasopharyngealen Abstrichs bei einem Probanden. Die hier gezeigte Methode wurde auch im Rahmen dieser Studie verwendet.

3.4.2 PCR-Analytik

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Analytik [siehe 2.1.4] der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Proben auf SARS-Cov-2 erfolgte am Institut für Virologie der Universitätsmedizin Mainz. Genutzt wurde das Gerät "NeuMoDx 288 molecular system" von der Firma Qiagen.

Für die Diagnostik von SARS-CoV-2 wird die RNA des Virus aus nasopharyngealen Abstrichen extrahiert und in DNA umgewandelt. Durch den Amplifikationsmechanismus der Technologie wird eine hohe Sensitivität ermöglicht, auch für geringe Mengen an viralen RNA-Fragmenten.

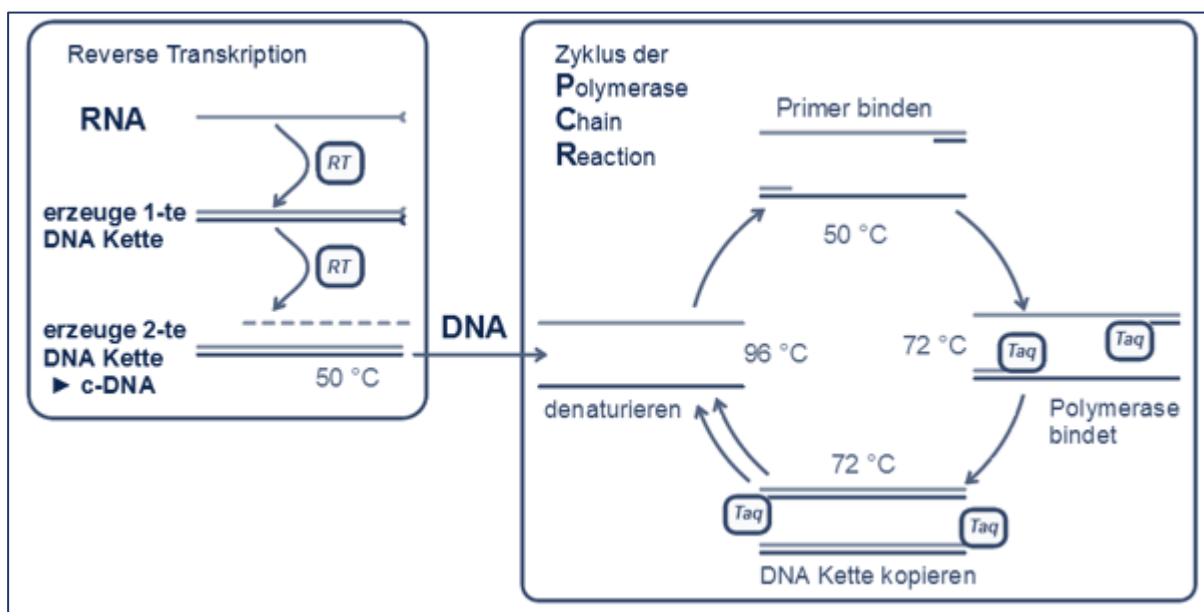


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der PCR-Technologie

(<https://www.ptb.de/cms/de/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-83/ag-832/grundlagen-der-digitalen-pcr.html>)

Abbildung 6 zeigt den Prozess der Umwandlung von RNA in komplementäre DNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (links). Im Rechten Teil der Abbildung wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) illustriert, die in Zyklen von Denaturierung, Primer-Bindung durch das Enzym Taq-Polymerase und schließlich DNA-Synthese verläuft.

3.4.3 Axilläre Abstrichgewinnung

Bei allen eingeschlossenen Probanden werden axilläre Hautabstriche mit nicht-imprägnierten geruchsneutralen Wattetupfern entnommen (Abstrichbesteck PS, 16/152mm der Firma Greiner bio-one).



Abbildung 7: Abstrichbesteck PS 16/152mm der Firma Greiner bio-one
(<https://shop.gbo.com/de/germany/products/bioscience/mikrobiologie-bakteriologie/abstrichbestecke-wattetupfer/>)

Abbildung 7 zeigt die verwendeten Abstrichbestecke.

Es wurden Abstrichtupfer verwendet, welche an einem Kunststoffröhrchen befestigt waren. Die Abstrichtupfer wurden vor Beginn der Probennahme gaschromatographisch untersucht, um sicherzustellen, dass von den Tupfern keine ausgeprägten, eigenen Emissionen in Form von VOCs ausgehen. Es sollte hierdurch

vermieden werden, dass Spürhunde anhand dieser Geruchsinformationen Erkennungsmuster ausbilden und es zu Falschanzeigen kommt.

Die Abstriche wurden durch zehnmaliges unter leichtem Druck durchgeführtes Bestreichen eines 2-3 cm² großen Hautareals der Axilla gewonnen.

Im späteren Verlauf der Studie, ab dem 3. Doppel-Blind-Versuch (siehe 4.5) wurde gesondert ein 2-3cm² großes Hautareal der Ellenbeuge abgestrichen. Dies erfolgte zum einen, da dieses Areal leichter zugänglich ist, zum anderen aufgrund der Hypothese, dass dieses Areal inhärent geruchsneutraler sei. Somit wurde eine leichtere Anwendung des Verfahrens vermutet. Es wurde geprüft, ob diese Abstriche von den Hunden gleichermaßen erkannt werden (siehe 4.7).

3.4.4 Probeninaktivierung

Nach dem Abstreichen der Haut werden die Proben bei 60 °C trockener Wärme in einem Wärmeschrank Heratherm IGS 60 der Firma ThermoScientific für 30min inkubiert, um sicherzustellen, dass die Proben im weiteren Verlauf nicht infektiös sind.

Diese Methode wurde in einem Vorversuch untersucht und etabliert (siehe Anlage 1).

3.4.5 Probenlagerung

Die Probenlagerung nach durchlaufener Inaktivierung erfolgte je nach vorgesehener Verwendung der Proben.

Ein Teil der Proben wurde direkt den Hundetrainern übergeben. Diese Proben wurden in den Entnahme-Röhrchen auf Kühlakkus für 1.5h transportiert und anschließend direkt verwendet oder bei -7°C für bis zu 48h gelagert. Die Proben für die spätere Verwendung sowie Geruchsanalytik wurden zunächst in der Universitätsmedizin Mainz bei -7°C aufbewahrt.

Im Verlauf (siehe 4.3.1) zeigte sich in der VOC-Analytik eine hohe Empfindlichkeit der Geruchsinformationen auf die Lagerungsmodalität. Daraufhin wurde die Methodik der Lagerung optimiert. Die Proben wurden fortan in dichteren

Schraubgläsern (Feingewindeflasche ND18, Klarglas, Firma Labsolute) aufbewahrt und bei -18°C gelagert.



Abbildung 8: Feingewindeflaschen ND18, Firma Labsolute

(<https://www.labc.de/feingewinde-vial-mit-optimierter-restmengenentleerung/>)

Abbildung 8 zeigt die verwendeten Feingewindeflaschen.

3.4.6 Lagerbeständigkeit der Proben

Um die optimale Lagertemperatur der Proben festzulegen, wurde die Lagerbeständigkeit bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Die mit Probenmaterial kontaminierten Baumwolltupfer wurden bei Raumtemperatur (+25 °C), im Kühlschrank (+4 °C) und im Tiefkühlschrank (-18 °C) gelagert.

Zur Untersuchung der Lagerbeständigkeit wurden von einem Probanden 20 Proben entnommen. Die Probennahmen erfolgten im Abstand von mindestens zwei Stunden durch das zeitgleiche Bestreichen beider Achseln (siehe 3.1.1).

Die Auswertung erfolgte mittels Gaschromatographie sowie Massenspektrometrie (siehe 3.2).

3.5 VOC-Analytik

Die parallel zum Hundetraining erfolgte Analyse der Abstriche auf VOCs wurde am Institut für Sicherheitsforschung (ISF) der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg (HBRS) durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Kaul durchgeführt. Ziel war die Aufschlüsselung der VOCs, die spezifisch für eine SARS-CoV-2-Infektion sind.

3.5.1 Material und Hardware der DHS-TD-GC/MS

Zur VOC-Analytik wurde das Gerät zur Dynamic Headspace-Thermodesorptions-Gaschromatographie/ Massenspektrometrie (DHS-TD-GC/MS) der Firma Gerstel verwendet. Zusätzlich wurde das Gerät zur konventionellen Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) von der Firma Agilent Technologies verwendet.

3.5.2 Grundlagen der Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Die Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) ist eine analytische Methode, die häufig in der Chemie und Biologie eingesetzt wird, um komplexe Gemische von chemischen Verbindungen zu identifizieren und zu quantifizieren.

Die Methode besteht aus zwei konsekutiven Schritten.

(1) Zunächst erfolgt die Trennung der chemischen Verbindungen durch Gaschromatographie. Dabei wird die Probe in einem Gasstrom transportiert und durch eine Säule geleitet, die mit einer stationären Phase beschichtet ist. Die Verbindungen werden basierend auf ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften wie Größe, Polarität etc. unterschiedlich stark von der stationären Phase zurückgehalten und dadurch getrennt.

(2) Nach der Trennung erfolgt die Identifikation und Quantifizierung der getrennten Verbindungen durch Massenspektrometrie. In diesem Schritt wird die getrennte Probe ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Ionen werden durch ein magnetisches Feld geleitet und nach ihrer Masse und Ladung sortiert. Das resultierende Massenspektrum zeigt dann die Masse und Häufigkeit der Ionen, was eine Identifikation der chemischen Verbindungen ermöglicht. Durch die Quantifizierung der Spektrumsintensitäten kann auch die Menge der einzelnen Verbindungen in der Probe bestimmt werden.

Die GC/MS bietet somit eine leistungsfähige Methode zur Analyse von Proben, die aus einer Vielzahl von Verbindungen bestehen. Dies ist relevant bei Mischproben, wie Abstrichmaterial, bei welchem von vielen verschiedenen Geruchsinformationen ausgegangen werden kann. Die Trennung und der Vergleich vieler Proben ermöglichen Rückschlüsse auf Gemeinsamkeiten in den chemischen Signalen und somit mutmaßlich auf SARS-CoV-2-spezifische VOC-Muster.

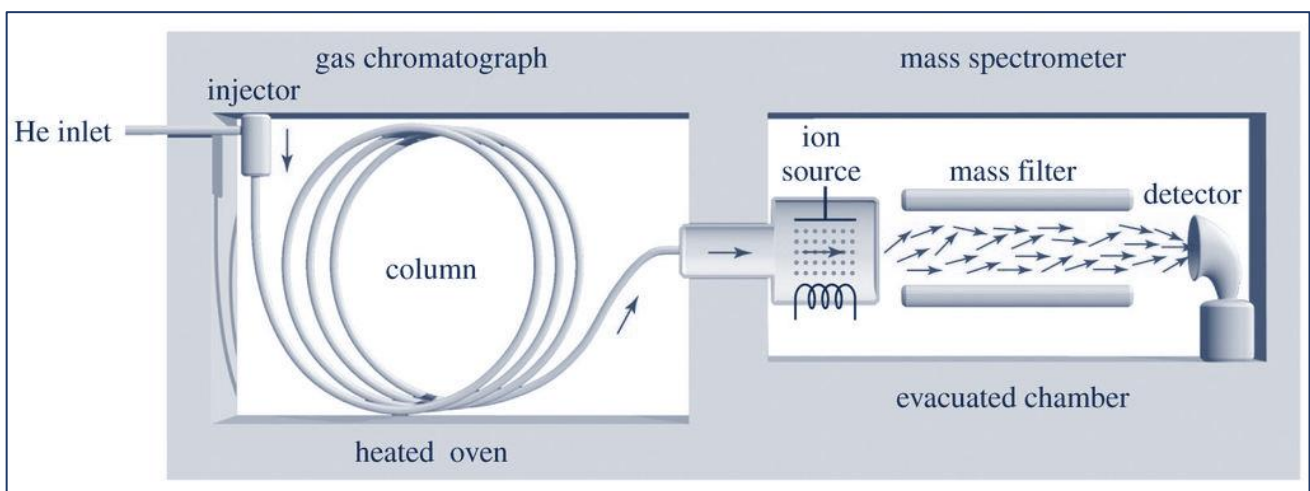


Abbildung 9: Aufbau GC/MS-Technologie

(<https://docplayer.org/167190392-Mnf-geow-b201-geochemische-analytik-kapitel-7-analytische-chromatographie-gc-hplc-mit-ms.html>)

Abbildung 9 illustriert den Aufbau und die Funktionsweise eines Gaschromatographen-Massenspektrometers (GC-MS). Es wird ein Helium-Trägergas in eine beheizte Säule injiziert. Anschließend gelangen die im Trägergas gelösten Proben in den massenspektrometrischen Teil zur Ionisierung. Im Massenspektrometer werden die Ionen durch ein Massenfilter separiert und anschließend von einem Detektor erfasst, um die Analyse der chemischen Zusammensetzung zu ermöglichen.

3.5.3 Dynamisches Headspace Sampling

Das dynamische Headspace-Sampling (DHS) ist eine analytische Methode, die häufig in der Chemie und Lebensmitteltechnologie eingesetzt wird, um flüchtige organische Verbindungen (VOCs) aus festen oder flüssigen Proben zu extrahieren und zu analysieren.

Die Methode basiert auf der Verdampfung von VOCs aus der Probe in einem geschlossenen Gefäß (Headspace), das anschließend mit einem Inertgas wie Helium oder Stickstoff durchströmt wird. Während des Durchströmens werden die VOCs in einer „Falle“ gesammelt und anschließend analysiert.

Dadurch werden die flüchtigen Verbindungen selektiv aus der Probe extrahiert und können anschließend analysiert werden.

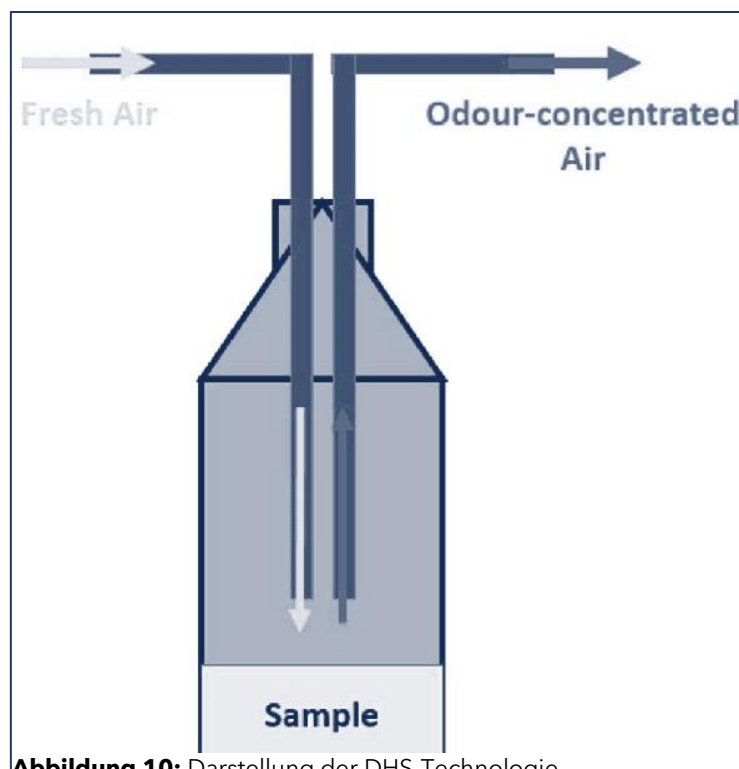


Abbildung 10: Darstellung der DHS-Technologie

(Erkoyuncu, John & Khan, Samir. (2020). Olfactory-Based Augmented Reality Support for Industrial Maintenance. IEEE Access. PP. 1-1. 10.1109/ACCESS.2020.2970220.)

Abbildung 10 zeigt die Funktionsweise der Dynamic Headspace (DHS)-Technologie, bei der Luft über eine Probe geleitet wird, um flüchtige Verbindungen in diesen Luftstrom zu extrahieren. Die angereicherte Luft, die die VOCs enthält, wird abgesaugt und zur weiteren Analyse verwendet.

3.5.4 Methodik der VOC-Analytik

Zur Bestimmung der VOCs im humanen axillaren Schweiß wurden zunächst für die Fragestellung geeignete Rahmenbedingungen und Einstellungen für die DHS-GC/MS entwickelt. Die Versuchsbedingungen wurden nach diversen Voruntersuchungen als Temperatur von 60 °C, Durchflussvolumen von 50 ml/min und einer Anreicherungsdauer von 45 min definiert. Bei diesen Bedingungen wurde eine qualitativ und quantitativ gute Reproduzierbarkeit der Analysen erzielt.

3.6 Hundetraining

Die Ausbildung der für das Projekt ausgewählten Spürhunde erfolgte durch die im Bereich der Ausbildung von Suchhunden erfahrene Firma AWIAS.

3.6.1 Spürhunde

Bei den für das Projekt ausgebildeten Hunden handelte es sich um einen drei Jahre alten Schäferhund-Malinois-Mischlingsrüden sowie einen vier Jahre alten Malinoisrüden. Beide verfügen über eine für die Nasenarbeit prädestinierte Genetik (siehe 2.3.2).

Die Hunde sind im Alter von zehn und vierzehn Monaten zugekauft worden und hatten die Ausbildung zum Sprengstoffspürhund nach den Vorgaben des Luftfahrtbundesamtes erfolgreich durchlaufen. Im Rahmen dessen wurde Anzeigeverhalten, Suchverhalten und das Erlernen neuer zu suchender Stoffe geformt.

Das Training wurde in einem simulierten Arbeitsumfeld durchgeführt. Die Hunde wurden für den Zeitraum des Projekts isoliert in diesem Bereich eingesetzt.

3.6.2 Line Up

Als primäre Trainingsmethode im Rahmen des Projekts wurde eine Line Up-Methode gewählt. Hierbei werden den Hunden sechs in einer Reihe aufgestellte Proben in identischen Gefäßen präsentiert. Die Hunde suchen diese Reihe auf Anzeige des Hundetrainers nacheinander ab. Das korrekte Anzeigen der gewünschten Proben wird vom Hundetrainer durch Lob oder Futtergabe positiv verstärkt.

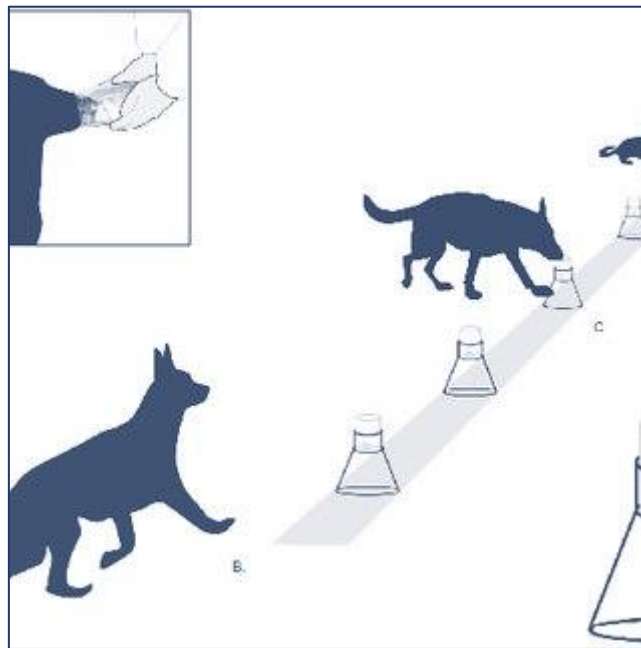


Abbildung 11: Aufbau Line Up Training

(Marchal, Sophie & Bregeras, Olivier & Puaux, Didier & Gervais, Rémi & Ferry, Barbara. (2016). Rigorous Training of Dogs Leads to High Accuracy in Human Scent Matching-To-Sample Performance. PLoS ONE. 11. 10.1371/journal.pone.0146963.)

Abbildung 11 zeigt exemplarisch den Aufbau eines Line Up Trainings durch nebeneinander plazierte, identische Gefäße, die die Hunde absuchen sowie die anschließende Bestätigung durch Futtergabe.

3.6.3 Maschinelles Training

Als Weiterentwicklung des Trainings wurde eine Maschine eingesetzt, um die Beeinflussung durch den Trainer zu minimieren. Das maschinelle Training wird mit der Maschine *Detection Dog Training System* (DDTS) der Firma Kynoscience UG durchgeführt.

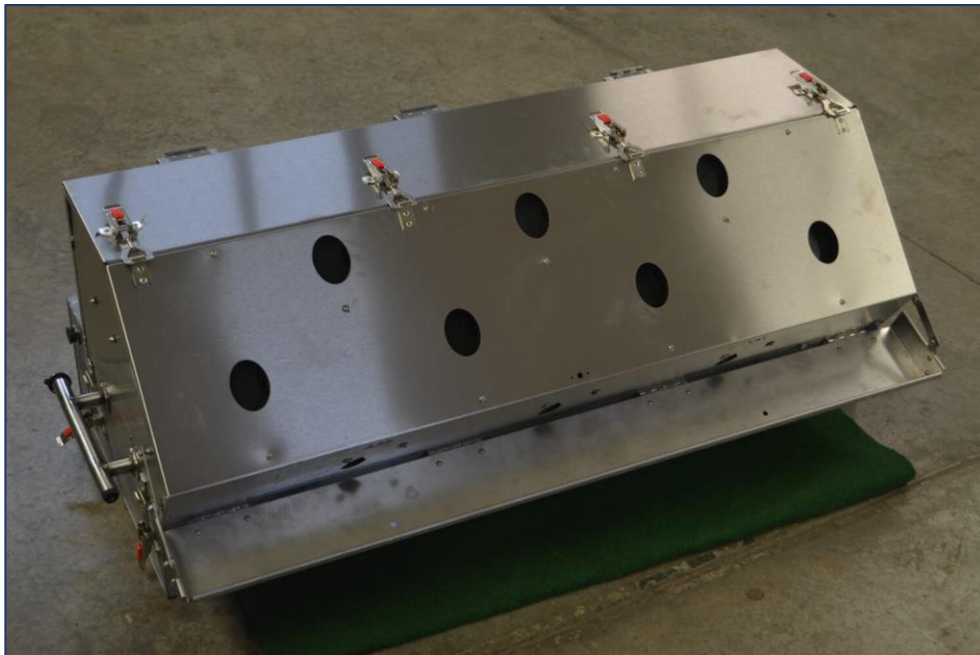


Abbildung 12: Detection Dog Training System, Firma Kynoscience UG

(<https://www.kynoscience.de/geruchsmaschine/>)

Abbildung 12 zeigt das im Rahmen der Studie verwendete maschinelle Trainingssystem. An der Vorderseite des Geräts befinden sich sieben Löcher, an denen der Hund die Suche vornimmt. Mit einem Schlitten werden in sich geschlossene Geruchseinheiten mit den Geruchsstoffen unter die Geruchslöcher gefahren. Bei korrektem Anzeigeverhalten erfolgt der automatische Auswurf der Belohnung. Während der Hund die Belohnung aufnimmt, wird automatisch ein anderes Geruchsloch aktiviert.

3.7 Aufbau Doppel-Blind-Versuche

Es wurden insgesamt pro Doppel-Blind-Versuch 20 Durchgänge von den Hunden abgesucht. Der Aufbau der Doppel-Blind-Versuche erfolgte identisch zum Training in einem Line Up. Pro Durchgang wurden insgesamt sechs Gefäße mit Proben bestückt. Die Aufteilung der Proben wurde wie folgt zusammengesetzt:

- eine positive Probe
- eine negative Probe
- vier Leerproben.

Die Bestückung erfolgte durch eine entblindete, unabhängige Person, welche bei der folgenden Absuche nicht anwesend war. Anschließend erfolgte die Absuche durch den vom Hundetrainer begleiteten Kontakt der Hunde zu den einzelnen Gefäßen. Aufgrund der Verblindung fand keine Bestätigung der Hunde für das Anzeigeverhalten statt. Es wurden 20 Durchgänge nach dem oben beschriebenen Schema durchlaufen. Die Auswertung erfolgte durch die entblindete, die Proben bestückende Person. Vor einem Doppel-Blind-Versuch wurde eine Trainingsdauer nach konstanter Methodik von sechs Wochen angestrebt.

4. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Doppel-Blind-Versuche, die die Leistung der Hunde überprüfen, beschrieben sowie die Verzahnung dieser Ergebnisse mit ersten Ergebnissen der VOC-Analytik dargelegt. Zudem wird auf Modifikationen, die aufgrund der Ergebnisse zu einem frühen Projektzeitpunkt vorgenommen wurden, eingegangen.

4.1 Doppel-Blind-Versuch 1

Der erste Doppel-Blind-Versuch findet nach sechswöchigem Training der beiden Hunde im Februar 2021 nach dem unter 3.6 erläuterten Aufbau statt.

Tabelle 1: Auswertung der Leistung der Spürhunde Doppel-Blind-Versuch 1

| | Detektion | Sars-Cov-2 | kein Sars-Cov-2 | Gesamt | Sensitivität | Spezifität |
|--------|------------------|-------------------|------------------------|---------------|---------------------|-------------------|
| Hund 1 | Ja | 4 | 8 | 72 | 0,3333 | 0,8667 |
| | Nein | 8 | 52 | | | |
| Hund 2 | Ja | 4 | 4 | 48 | 0,5 | 0,9 |
| | Nein | 4 | 36 | | | |

Im ersten Doppel-Blind-Versuch erkannte Hund 1 von den 72 Proben, die ihm präsentiert wurden, vier Proben korrekt als SARS-CoV-2-positiv, acht SARS-CoV-2-positive Proben erkannte er nicht. Von den SARS-CoV-2 negativen Proben erkannte er 52 korrekt als SARS-CoV-2-negativ, acht negative Proben zeigte er

fälschlicherweise als SARS-CoV-2-positiv an. Hieraus ergibt sich eine Sensitivität von 33,33% und eine Spezifität von 86,67%.

Hund 2 erkannte vier Proben korrekt als SARS-CoV-2-positiv, vier SARS-CoV-2-positive Proben erkannte er nicht. Von den SARS-CoV-2 negativen Proben erkannte er 36 korrekt als SARS-CoV-2-negativ, vier negative Proben zeigte er fälschlicherweise als SARS-CoV-2-positiv an. Zudem war er nach der Präsentation von 48 Proben nicht mehr in der Lage, den Versuch weiter durchzuführen. Hieraus ergibt sich eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 90%.

Gemittelt - gewichtet nach Anzahl der präsentierten Proben- ergibt sich somit im 1. Doppel-Blind-Versuch eine Sensitivität von 39,99% und eine Spezifität von 88%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass insbesondere die Sensitivität noch ungenügend ist, um das Verfahren mit etablierten Testmethoden zu vergleichen. Es folgte eine Intensivierung des Trainings nach der etablierten Methodik für weitere sechs Wochen. Dies entspricht weiteren 120 Übungsdurchgängen pro Hund.

4.2 Doppel-Blind-Versuch 2

Nach Abschluss der intensivierten Trainingsphase folgte der zweite, im Aufbau identische Doppel-Blind-Versuch im April 2021.

Tabelle 2: Auswertung der Leistung der Spürhunde Doppel-Blind-Versuch 2

| | Detektion | Sars-Cov-2 | kein Sars-Cov-2 | Gesamt | Sensitivität | Spezifität |
|--------|-----------|------------|-----------------|--------|--------------|------------|
| Hund 1 | Ja | 0 | 8 | 48 | 0 | 0,8 |
| | Nein | 8 | 32 | | | |
| Hund 2 | Ja | 1 | 11 | 72 | 0,0833 | 0,8167 |
| | Nein | 11 | 49 | | | |

Hund 1 erkannte von den 48 Proben, die ihm präsentiert wurde keine Probe korrekt als SARS-CoV-2-positiv, acht SARS-CoV-2-positive Proben erkannte er nicht. Von den SARS-CoV-2 negativen Proben erkannte er 32 korrekt als SARS-CoV-2-negativ, acht negative Proben zeigte er fälschlicherweise als SARS-CoV-2-positiv an. Hieraus ergibt sich eine Sensitivität von 0% und eine Spezifität von 80%.

Hund 2 erkannte eine Probe korrekt als SARS-CoV-2-positiv, elf SARS-CoV-2-positive Proben erkannte er nicht. Von den SARS-CoV-2 negativen Proben erkannte er 49 korrekt als SARS-CoV-2-negativ, elf negative Proben zeigte er fälschlicherweise als SARS-CoV-2-positiv an. Hieraus ergibt sich eine Sensitivität von 8,33% und eine Spezifität von 81,67%.

Gemittelt – gewichtet nach Anzahl der präsentierten Proben- ergibt sich somit im Zweiten Doppel-Blind-Versuch eine Sensitivität von 4,99% und eine Spezifität von 81%.

4.3 Vergleich Doppel-Blind-Versuch 1 und 2

Die Ergebnisse zeigten einen Rückschritt im Vergleich zum ersten Doppel-Blind-Versuch. Sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität des Nachweises von SARS-CoV-2 durch Spürhunde war im Vergleich zum ersten Doppel-Blind-Versuch niedriger.

Es erfolgte daraufhin eine tiefgreifende Fehleranalyse und resultierend eine Anpassung der Vorgehensweise.

Hierbei ergaben sich zwei Hypothesen, welche jeweils durch eine spezifische Änderung im weiteren Procedere adressiert wurden.

Als mögliche Fehlerquellen wurden vor allem die Probenlagerung, sowie die Line Up-Präsentation der Proben vermutet. Um die Hypothese zu testen, dass die Lagerung einen großen Einfluss auf die Qualität der Geruchsproben hat und diese zu quantifizieren, erfolgte eine Auswertung der bis zu diesem Zeitpunkt gewonnenen VOC-Analytik-Proben (siehe 4.3.1).

Um die Hypothese zu überprüfen, ob das Line-Up-Training nicht die optimale Trainingsmodalität ist, erfolgte zudem eine Anpassung der Trainingsmethode der Hunde auf ein maschinelles Training (siehe 4.3.2).

4.3.1 Zwischenauswertung VOC-Analysen

Nach dem zweiten Doppel-Blind-Versuch wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Lagerung der Proben und hierbei insbesondere die Variablen der Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur einen großen Einfluss auf die Qualität der Proben haben könnten.

Es erfolgten daraufhin Untersuchungen zur Probenlagerung (Dauer, Lagertemperatur), und deren Effekt auf die detektierbaren VOC-Emissionen der Proben bei Aufbewahrung und Lagerung im PS-Röhrchen des Abstrichbestecks. Zur Minimierung der biologischen Variation werden die Proben einer Versuchsreihe von einem gesunden Probanden gewonnen. In den Versuchsreihen wurden unterschiedliche Probanden abgestrichen.

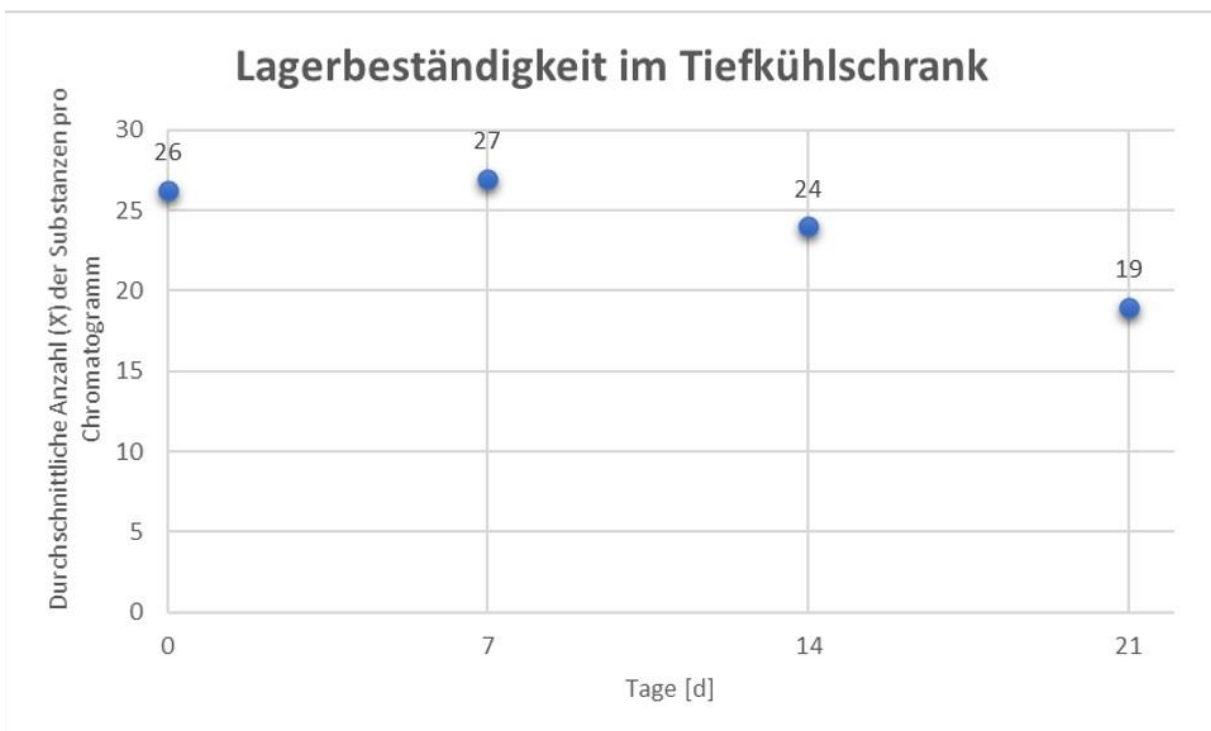
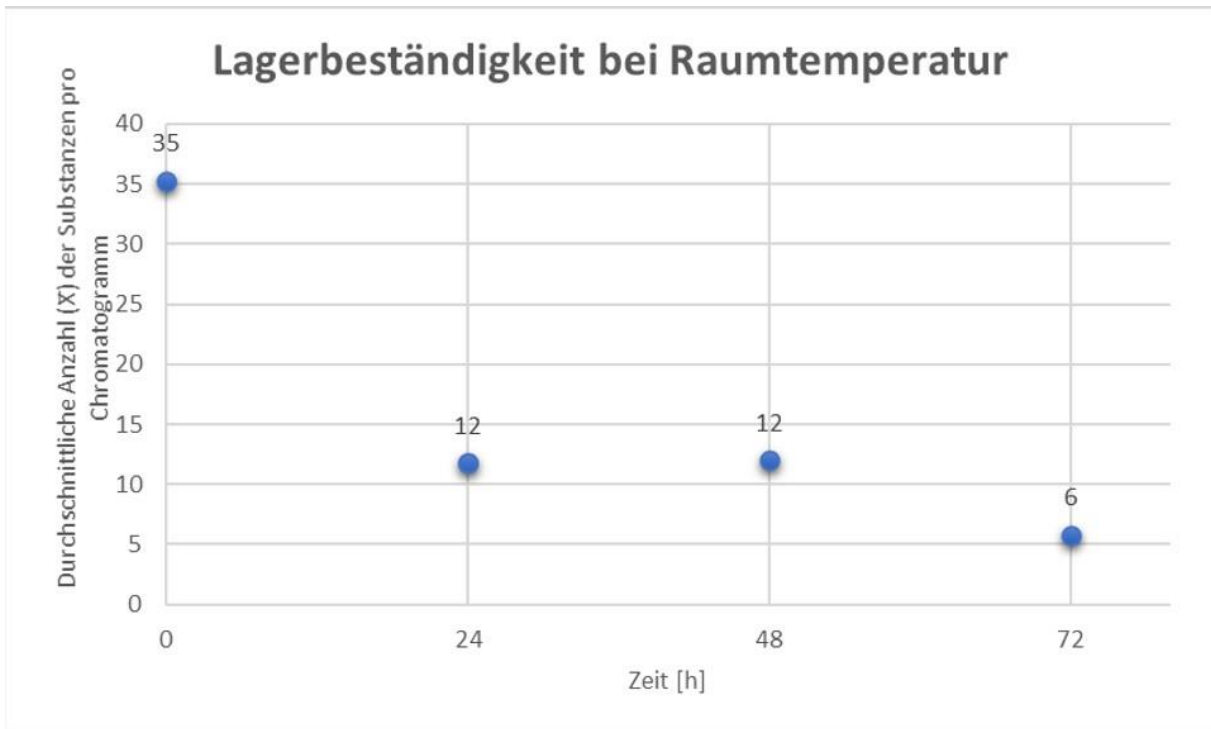


Abbildung 13: Lagerbeständigkeit der Abstriche im PS-Röhrchen des Abstrichbestecks bei Raumtemperatur und im Tiefkühlschrank (-18 °C)

Abbildung 13 zeigt die Anzahl an detektierbaren Substanzen in der VOC-Analytik nach der Lagerungsdauer der Proben im PS-Röhrchen bei Lagerung bei Raumtemperatur (oben) sowie bei -18°C (unten). Es zeigt sich, dass die Anzahl der detektierbaren Substanzen bei Raumtemperatur nach 24h um 66% abgenommen hat, während bei -18°C erst nach 21 Tagen eine deutliche Reduktion der detektierbaren Substanzen auftritt.

Der Einfluss der Kühlung auf den Verlust an nachweisbaren VOC bei Nutzung des Aufbewahrungsröhrchens des Abstrichbestecks ist in den in Abbildung 1 dargestellten Ergebnissen deutlich zu erkennen.

Des Weiteren wurden Proben untersucht, die nach der Probennahme zur weiteren Aufbewahrung und vor der Inaktivierung zunächst in mit einem Schraubverschluss versehenen Headspace-Vials (vgl. 3.4.5) überführt wurden.

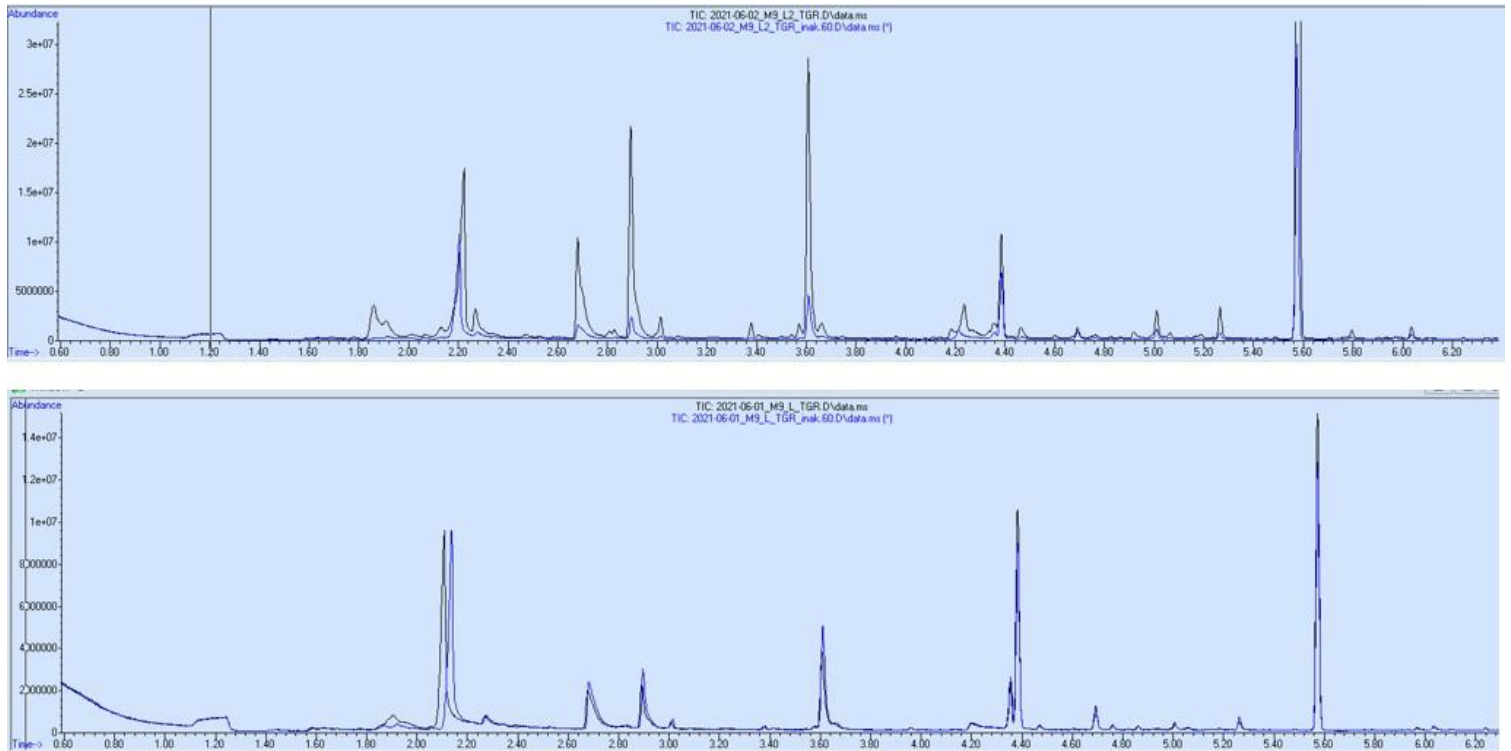


Abbildung 14: Ausschnitt von übereinandergelagerten GC-MS Chromatogrammen bei Lagerung in PS-Röhrchen und in Headspace-Vials vor und nach der thermischen Inaktivierung

Abbildung 14 zeigt die gaschromatographischen Probenprofile von Proben vor (schwarze Linie) und nach (blaue Linie) der thermischen Inaktivierung. Hierbei wird weiter unterschieden zwischen Proben, die in PS-Röhrchen gelagert und inaktiviert wurden (oberer Graph) und Proben, die in Headspace-Vials gelagert und inaktiviert wurden (unterer Graph). Vergleicht man die Graphen wird deutlich, dass die Profile vor und nach der Inaktivierung bei der Verwendung von PS-Röhrchen deutlich voneinander abweichen. Im Vergleich hiermit sind die VOC-Profile im unteren Teil der Abbildung, also bei Verwendung von Headspace-Vials zur Lagerung und Inaktivierung von Proben vor und nach der Inaktivierung, deckungsgleich.

Man erkennt also eine deutliche Verringerung der Peakhöhen bei den im PS-Röhrchen inaktivierten Proben, was auf einen erheblichen Verlust an VOCs zurückzuführen ist. Hingegen führt die Inaktivierung in Headspace-Vials zu keinem erkennbaren Verlust an VOCs. Ein Vergleich der in der Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse zeigt, dass bei Nutzung von analytischen Head-Space Vials anstelle der Transportröhrchen des Abstrichbestecks die chemische Information der Probe nach der Inaktivierung näherungsweise vollständig erhalten bleibt.

Daraus resultierende Änderung:

Die Proben wurden nach Auswertung der oben beschriebenen Untersuchungen direkt nach der Abstrichnahme in dicht zu verschließenden Headspace-Vials verpackt. Nach der Inaktivierung erfolgte die Lagerung bei -18°C, jeder Transport der Proben wurde in Kühltaschen auf Kühllakkus durchgeführt. Proben, die der VOC-Analytik zugeführt wurden, wurden in einer elektronisch betriebenen Gefrierbox bei -18° C transportiert.

4.3.2 Abhängigkeit der Hunde von den Hundetrainern

In den ersten beiden Doppel-Blind-Versuchen werden die Hunde von den Hundeführern an den Proben in einem Line Up begleitet, parallel zu dem Ablauf im Training. Diese Methode zeigt keine zufriedenstellenden Ergebnisse mit Sensitivitäten von 40% und 5% (vgl. 4.1 und 4.2). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Line-Up-Präsentation insbesondere aufgrund der engen Nähe zum Hundetrainer im Training die Ergebnisse beeinflussen könnte und somit als Trainingsmethode nicht geeignet ist.

Daraus resultierende Änderung:

Um einen Rosenthal-Effekt (Clever-Hans-Effekt) [106] auszuschließen, also zu vermeiden, dass die Erwartung des Hundeführers die Leistung des Hundes beeinflusst, wurde das Training der Hunde auf ein maschinelles Verfahren umgestellt (siehe 3.6.3). Die Maschine *Detection Dog Training System* (DDTS) der Firma Kynoscience UG wurde von dem Hundeführer bestückt. Die Maschine präsentiert die Proben anschließend verblindet, automatisiert und randomisiert. Sie belohnt den Hund bei einer Anzeige - definiert als das Verbleiben mit der Schnauze an einer Probe für mindestens 2 Sekunden - automatisch. Hierdurch konnte das Training effizienter gestaltet werden. 14 Proben konnten maschinell innerhalb von drei Minuten abgearbeitet werden. Der Lerneffekt der Hunde konnte zudem von etwaigem Bias durch den Hundeführer entkoppelt werden. Somit konnte eine Intensivierung des Trainings durch das maschinelle Verfahren erzielt werden.

4.4 Doppel-Blind-Versuch 3

Nach den oben dargestellten Anpassungen erfolgte eine weitere Trainingsphase der Hunde über vier Wochen mit insgesamt 3200 Suchdurchgängen. Es wurde im Juli 2021 ein Doppel-Blind-Versuch an der genannten Maschine angeschlossen. Die Bestückung der Maschine erfolgte durch eine unabhängige Person. Anschließend wurden die Hunde durch den Hundeführer wie im Training an die Maschine herangeführt. Eine Belohnung durch die Maschine blieb im Setting des Doppel-Blind-Versuchs aus.

Tabelle 3: Auswertung der Leistung der Spürhunde Doppel-Blind-Versuch 3

| | Detektion | Sars-Cov-2 | kein Sars-Cov-2 | Gesamt | Sensitivität | Spezifität |
|--------|-----------|------------|-----------------|--------|--------------|------------|
| Hund 1 | Ja | 10 | 0 | 39 | 0,8333 | 1 |
| | Nein | 2 | 27 | | | |
| Hund 2 | Ja | 8 | 2 | 36 | 0,6154 | 0,913 |
| | Nein | 5 | 21 | | | |

Hund 1 erkannte von den 39 Proben, die ihm präsentiert wurden, zehn Proben korrekt als SARS-CoV-2-positiv, zwei SARS-CoV-2-positive Proben erkannte er nicht. Von den SARS-CoV-2 negativen Proben erkannte er 27 korrekt als SARS-CoV-2-negativ, er zeigte keine negative Proben fälschlicherweise als SARS-CoV-2-positiv an. Hieraus ergibt sich eine Sensitivität von 83,33% und eine Spezifität von 100%.

Hund 2 erkannte acht Proben korrekt als SARS-CoV-2-positiv, fünf SARS-CoV-2-positive Proben erkannte er nicht. Von den SARS-CoV-2 negativen Proben erkannte er 21 korrekt als SARS-CoV-2-negativ, zwei negative Proben zeigte er

fälschlicherweise als SARS-CoV-2-positiv an. Hieraus ergibt sich eine Sensitivität von 61,54% und eine Spezifität von 91,3%.

Gemittelt - gewichtet nach Anzahl der präsentierten Proben- ergibt sich somit im dritten Doppel-Blind-Versuch eine Sensitivität von 72,87% und eine Spezifität von 95,82%.

Es zeigt sich somit unter den veränderten Bedingungen im Hundetraining sowie dem Probenhandling eine gesteigerte Sensitivität sowie Spezifität der SARS-CoV-2-Erkennung durch die Spürhunde.

4.5 Vergleich der Ergebnisse vor und nach den methodischen Anpassungen

Aufgrund der verbesserten Leistung der Spürhunde bezüglich der Erkennung von SARS-CoV-2-positiven Proben im Doppel-Blind-Versuch 3, konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass diese Faktoren (Lagerungsbedingungen und die Modalität des Hundetrainings) relevant für die Versuchsergebnisse sind. Des Weiteren kann die primäre Forschungsfrage positiv beantwortet werden. Es konnte gezeigt werden, dass Hunde in der Lage sind, SARS-Cov-2-Infektionen anhand von axillären Hautabstrichen zu erkennen. Der Einsatz von SARS-CoV-2-Spürhunden ist somit möglich. Darüber hinaus kann insbesondere durch die Änderungen in der Vorgehensweise zwischen Doppel-Blind-Versuch 2 und 3 gezeigt werden, dass die Analyse der VOC-Muster einen direkten Einfluss auf die Vorgehensweise hat und somit indirekt auf die Leistung der Hunde. Dies zeigt die Verzahnung der messbaren Geruchsmuster mit der nicht qualitativ messbaren Geruchsleistung der Hunde.

4.6 Alternatives Untersuchungsmaterial

In Kooperation mit der Forschungsgruppe Prof. Dr. med. vet. Volk der Tierärztlichen Hochschule Hannover wurde im Juli 2021 zusätzlich getestet, ob die Hunde das Erkennen einer SARS-CoV-2-Infektion auch auf anderes Probenmaterial übertragen können. Es wurden den Hunden neben Hautabstrichen der Axilla in diesem Zuge Urinproben, Nasen-Rachen-Abstriche, Sputum sowie Hautabstriche der Armbeuge präsentiert. Diesem weiterführenden Schritt liegt die Hypothese zugrunde, dass die SARS-CoV-2-Geruchsinformationen spezifisch sind und somit nicht nur in einer Art des Probenmaterials vorliegen.

Tabelle 4: Auswertung der Leistung der Spürhunde bei Präsentation gemischter Probenarten

| | Detektion | Sars-Cov-2 | kein Sars-Cov-2 | Gesamt | Sensitivität | Spezifität |
|--------|-----------|------------|-----------------|--------|--------------|------------|
| Hund 1 | Ja | 8 | 5 | 54 | 0,6667 | 0,881 |
| | Nein | 4 | 37 | | | |
| Hund 2 | Ja | 6 | 4 | 76 | 0,4 | 0,9344 |
| | Nein | 9 | 57 | | | |

Die Hunde konnten nach einer kurzen Konditionierungsphase unabhängig von ihrem primären Trainingsmaterial verschiedene Probenmaterialien gleichermaßen hinsichtlich einer SARS-Cov-2-Infektion identifizieren und durch das gewünschte Verhalten anzeigen. Diese Übertragbarkeit ermöglicht für zukünftige praxisnahe Applikationen eine Wahl des Probenmaterials anhand der Praktikabilität. Dies erleichtert die geplante breite Anwendung des Verfahrens. Zudem deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die VOC-Muster einer SARS-CoV-2-Infektion spezifisch

sind und in verschiedenen Probenmaterialien gleichermaßen auftreten. Dies gilt es in weiteren, größer angelegten Studien durch die entsprechende VOC-Analytik auch objektivierbar zu zeigen.

5. Diskussion

Im sich nun anschließenden Kapitel werden die Ergebnisse des Projekts unter verschiedenen Aspekten vertiefend diskutiert. Zunächst wird auf die dynamischen Bedingungen der Pandemie und deren Einfluss auf das hier vorgestellte Projekt eingegangen. Anschließend werden die Möglichkeiten und Limitationen des Hundetrainings diskutiert und zuletzt erfolgt die Kontextualisierung des Spürhundeeinsatzes mit anderen Testmöglichkeiten. Diese Darstellung erfolgt auf der Basis der zum Ende der Pandemie vorliegenden Literatur. Ziel der Diskussion soll neben der Reflektion des Projekts vor allem die Übertragbarkeit der im Rahmen des Projekts gewonnenen Erkenntnisse auf etwaige zukünftige Epidemie-Ereignisse oder andere systemische Erkrankungen sein.

5.1 Auswirkungen der Pandemieentwicklung auf das Projekt

Die Dynamik der Pandemieentwicklung hatte auf vielerlei Ebenen Einfluss auf die Planung und Umsetzung des in dieser Arbeit behandelten Projekts.

Zu Beginn des Projekts im November 2020 gab es neben vereinzelt Pilotstudien [1,2] keine publizierten Daten, die die Entwicklung des Versuchsaufbaus validiert unterstützt hätten. Dies könnte die verschiedenen im Laufe des Projekts nötigen Anpassungen erklären.

Weitere wichtige Faktoren, die sich verändert haben und somit Auswirkungen auf das Projekt hatten, sind das SARS-CoV-2-Virus in seinen Varianten, das Covid-19-Infektionsgeschehen, die Behandlungsmöglichkeiten und die dynamischen rechtlichen und gesellschaftlichen Rahmenbedingungen.

Das SARS-CoV-2-Virus hat sich genetisch im Verlauf der Pandemie stetig verändert. Zu verschiedenen Zeitpunkten traten unterschiedliche Virusvarianten auf. Inwiefern sich die verschiedenen Virusvarianten durch unterschiedliche VOCs kennzeichnen und damit durch Varianzen im Virusmaterial auch die Leistung der Spürhunde variiert, ist unklar und erfordert eine detailliertere Aufarbeitung und Aufschlüsselung der spezifischen VOC-Muster. Es sei erwähnt, dass die Verschlechterung der Spürhundeleistung im zweiten Doppel-Blind-Versuch zeitlich mit dem vermehrten Auftreten der Omicron-Variante einherging. Ob dies neben den Trainings- und Lagerungsbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die Leistung der Spürhunde hatte, lässt sich retrospektiv nicht sicher eruieren.

Einhergehend mit Modifikationen im Virusmaterial traten auch Veränderungen in den Hospitalisierungsraten sowie der Erkrankungsintensität auf, was wiederum die Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit des gewonnenen Probenmaterials beeinflusst hat.

Ein weiterer Faktor mit erheblichem Einfluss auf das Projekt waren die dynamischen rechtlichen und gesellschaftlichen Rahmenbedingungen, die das Pandemiegeschehen stetig wandelten. Dies beeinflusste nicht primär die Probengewinnung, aber die Relevanz des Projekts, was wiederum einen hohen Anpassungsdruck in der Entwicklungsphase des Projektes mit sich brachte.

Von großer Bedeutung sowohl gesellschaftlich als auch projektspezifisch war die schnelle Entwicklung und Zulassung von Impfstoffen, welche letzten Endes zur Erklärung der Beendigung der Pandemie durch die WHO im Mai 2023 führte. Auch hier ist unklar, wie die Covid-19-Impfung, die seit Dezember 2020 zur Verfügung stand, das Geruchsprofil der Infizierten verändert. Dies könnte Anknüpfungspunkt weiterer Forschungsvorhaben sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Entwicklung einer prospektiven Studie mit multiplen Variablen in einer von ebenfalls multiplen und hochdynamischen Variablen definierten gesellschaftlichen Ausnahmesituation mit besonderen Herausforderungen einhergeht. Dies erfordert ein hohes Maß an personellen und finanziellen Projektressourcen. Des Weiteren ergeben sich hieraus diverse mögliche *Confounder* und Störfaktoren in der Projektumsetzung. Auch diese Erkenntnisse sind sekundäre Gewinne der hier beschriebenen Arbeit.

5.2 Hundetraining

5.2.1 Auswahl der Hunde und Trainer

Die Auswahl der richtigen Hunde ist ein maßgeblicher Faktor zum Gelingen des Projekts. Wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, gibt es sowohl rasseabhängige als auch individuelle Faktoren, die einen Hund besonders zur Arbeit als Spürhund qualifizieren. Auffällig ist bei der Vielzahl an bekannten Hunderassen die gehäufte Ausbildung von spezifischen Rassen, vor allem Labradoren und deutschen sowie belgischen Schäferhunden in den von verschiedenen Arbeitsgruppen [1,2,107,108] durchgeführten Studien zum Training von SARS-CoV-2-Spürhunden.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob Hunde, die bereits eine Ausbildung zu einem Spürhund für ein anderes Anwendungsgebiet durchlaufen haben, aufgrund der gesicherten Verhaltensmuster besser geeignet sind, um auf einen weiteren Stoff trainiert zu werden. Alternativ könnte zutreffen, dass Hunde, die nur auf die Anzeige eines Geruchsmusters (in diesem Fall SARS-CoV-2-Geruchsmuster) trainiert werden, spezifischer reagieren. Hierzu sind weitere Studien notwendig.

Auch die Wahl des Hundetrainer und seine Trainingsphilosophie können erheblichen Einfluss auf den Trainingserfolg haben, wobei die Eignung schwierig qualifizierbar ist [109. 110]. Jeder Lernprozess ist abhängig von interindividuellen Beziehungen und diese lassen sich nicht quantifizierbar zwischen Hund und Trainer auswerten [111]. Schließlich ist vor diesem Hintergrund nicht eindeutig geklärt, ob

das Training eines Hundes durch einen Trainer erfolgen sollte oder ob durch den Einsatz mehrerer Trainer ein gewisser Handler-Bias reduziert werden kann.

5.2.2 Wahl der Trainingsmethode

Es hat sich gezeigt, dass die Art und Weise, wie die Hunde trainiert werden, ein weiterer wichtiger Faktor für den Erfolg des Trainings ist [112]. Hierbei ist zum einen zu berücksichtigen, ob der Hundetrainer den Hund aktiv an die Proben heranzuführt im Sinne eines Line-Up oder der Hund die Proben selbstständig abläuft und automatisiert belohnt wird, wie es bei dem maschinellen Training der Fall ist. Im Rahmen unserer Studie wurde das Verfahren gewechselt mit einer konsekutiven Verbesserung der Ergebnisse nach Implikation des maschinellen Trainings.

Jedoch zeigt die Literatur, dass auch Arbeitsgruppen mit einem reinen Line-Up Aufbau vielversprechende Ergebnisse vorweisen konnten [1, 107, 113]. Hierbei ist allerdings unklar, ob alle erhobenen Daten von Seiten des Hundetrainers verblindet waren. Ist dies nicht der Fall, könnte eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Beeinflussung der Hunde durch den Hundetrainer vorliegen.

Ein weiterer bedeutsamer Faktor ist die Wahl des Vergleichsmaterials und der Aufbau der einzelnen Trainingsschritte. Hierbei sollte das Ziel sein, möglichst viele andere olfaktorische Reize auszuschließen, um spezifisch auf die Covid-inhärenten Geruchsmuster zu trainieren. Dies wird in der Regel durch mehrstufige Trainingsprozesse erreicht. Hierbei zeigen weitere Studien [1,2] mit weitestgehend analogem Vorgehen zum hier beschriebenen Projekt gute Ergebnisse. Ein

interessanter, von der in dieser Arbeit angewandte Herangehensweise abweichender Ansatz wird unter Essler et. al. beschrieben. Hier wurden bereits in einer frühen Trainingsphase starke unabhängige Geruchsreize als negative Proben verwendet. So wurden keine nicht-riechenden „Proben“ präsentiert, sondern ablenkende Geruchsinformationen als Teil des Trainings einbezogen. In den Endresultaten des Hundetrainings wurden hierdurch Ergebnisse erzielt, die konkordant mit denen anderer Forschungsgruppen sind. Eine deutliche Verbesserung des Trainingsergebnisses oder Beschleunigung des Trainingsprozesses zeigte sich hingegen nicht.

Auch die Dauer des Hundetrainings, das vor der Testung der Hundeleistung in den verschiedenen Forschungsarbeiten durchlaufen wurde, unterscheiden sich zwischen einer Woche [1,2] und 15 Wochen [114].

Die Trainingsfaktoren, insbesondere Dauer, Methodik, Phasenaufbau, der Einsatz von Negativproben müssten für eine breit etablierbare, validierte Methodik standardisiert sein.

5.2.3 Wahl des Trainingsmaterials

Ein wichtiger Faktor für den Erfolg des Hundetrainings und die Vorbereitung eines breiten Einsatzes von Spürhunden als diagnostische Methode ist die Wahl des geeigneten Materials, mit dem die Hunde trainiert werden.

Die in dieser Arbeit dargestellte Studie greift auf axilläre Hautabstriche als Material zurück. Diese Entscheidung wurde unter Berücksichtigung der möglichen Infektiosität des Materials, der einfachen Materialgewinnung und der potenziell hohen Geruchsdichte in Körperbereichen mit vielen ekkrinen Schweißdrüsen gefällt.

Auch andere Forschungsgruppen greifen auf axilläre Schweißproben als Trainingsmaterial für Covid-Spürhunde zurück. Unterschiede gibt es in der Art der Probengewinnung. Hierbei wird bei Grandjean et. al. auf einen längeren Kontakt des zu entnehmenden Probenmaterials in der Axilla gesetzt. Dies kann ein möglicher Grund für die besseren Ergebnisse dieser Arbeitsgruppen sein, es wurden Erfolgsquoten von 76%-100% erzielt.

Gerade die Nutzung von axillärem Material wirft auch die Frage auf, wie standardisiert die vor der Abstrichnahme durchgeführte Basiskörperhygiene der Probanden sein sollte. Hier gilt es abzuwägen zwischen möglichst genauen Versuchsbedingungen und möglichst realitätsnahen Bedingungen.

Andere Forschungsgruppen verwenden für das Training Material aus dem Respirationstrakt [2,108,114]. Während hier aufgrund der größeren Betroffenheit dieses Organsystems eine größere Dichte an virusspezifischem Material vermutet

werden kann, muss auch von einer höheren inhärenten Infektiosität des Untersuchungsmaterials ausgegangen werden.

Auch Urin wurde als mögliches Trainingsmaterial erprobt [113]. Ähnlich wie bei der Verwendung von Hautabstrichen liegt hier die Hypothese zugrunde, dass SARS-CoV-2-spezifische VOC-Muster auch in nicht primär durch die Infektion betroffenen Organsystemen zu finden sind. Vorteile bei der Verwendung von Urin ist die Verfügbarkeit von viel Probenmaterial. Dies zeigt sich auch in der Analyse von Abwässern, welche schnell und zuverlässig Daten zur aktuellen SARS-CoV-2-Viruslast in definierten Gebieten anzeigten [115].

Für eine zukünftige Feldanwendung könnte jedoch die Verwendung von Urinproben im Vergleich zu Hautabstrichen oder respiratorischem Material nachteilig sein, da für die Probennahme zum einen mehr Zeit benötigt wird und diese Form der Probennahme zum anderen aufgrund der Verwendung von Ausscheidungen potenziell als unangenehmer durch den Probanden wahrgenommen werden könnte.

Unsere Ergebnisse zeigen wie auch Jendry et. al. [116], dass Hunde nach entsprechendem Training unabhängig von dem primären Trainingsmaterial auch andere Probenarten als Covid-positiv identifizieren können. Diese Erkenntnis bringt zum einen die Möglichkeit mit sich, zum Training möglichst skalierbares Probenmaterial zu verwenden und trotzdem in der Anwendung auf möglichst einfach verfügbares Material zurückzugreifen. Zum anderen lässt sich vermuten, dass eine Covid-Infektion mit spezifischen, ubiquitär auffindbaren Veränderungen

in der Geruchsinformation einhergeht. Die detaillierte Aufarbeitung dieser Hypothese könnte Gegenstand weiterer Forschungsvorhaben sein.

Insgesamt ist für eine Weiterentwicklung des Einsatzes von Covid-Spürhunden von der Anzeige spezifischer Proben zum Direktkontakt an Menschen mit entsprechendem Anzeigeverhalten von mehr nötigen Zwischenschritten auszugehen. Hierbei könnte man vermuten, dass die Verwendung von Hautabstrichen als Trainingsmaterial dem Geruch eines Menschen im Vorbeigehen am ähnlichsten ist.

An dieser Stelle sei auch erneut auf die VOC-Analytik verwiesen. Ein interessantes weiteres Forschungsgebiet könnte der Nutzen möglicher synthetisch hergestellter Geruchsproben als Trainingsmaterial sein. Zunächst wäre hierfür zu ergründen, ob bei erfolgreichem Nachweis spezifischer VOC-Muster auch die Herstellung dieser möglich sei. Dies hätte eine große Skalierbarkeit zum Vorteil, zudem wären weniger nicht-kontrollierbare Nebengerüche enthalten, die womöglich bessere und schnellere Trainingsergebnisse herbeiführen könnten.

5.2.4 Wahl der Inaktivierungsmethode

Eine wichtige Frage, die sich im Umgang mit Infektionskrankheiten stellt, ist die Gewährleistung eines hinreichenden Schutzes vor Ansteckung aller an der Arbeit Beteiligten. Bei der Planung einer Studie muss somit von Beginn an ein Konzept zur Reduktion des Infektionsrisikos erarbeitet und eingehalten werden. Dies ist wie unter 3.4.4 bereits beschrieben ein Aspekt, der bei der Wahl des geeigneten Untersuchungsmaterials zu berücksichtigen ist, da gerade bei respiratorischem Material von einer höheren Infektionsgefahr ausgegangen werden kann. Des Weiteren muss definiert werden, ob durch eine inaktivierende Behandlung des Probenmaterials die Infektiosität nach der Probenentnahme reduziert werden soll. Hierfür stehen thermische und chemische Methoden zur Verfügung.

Durch eine Inaktivierung trägt man zu erhöhter Sicherheit für das Studienpersonal bei, läuft jedoch Gefahr, die zu untersuchenden Geruchsinformationen zu verändern und damit deren Erkennbarkeit durch Spürhunde zu erschweren.

Einige Studien [1, 107, 108, 114] haben sich gegen eine Inaktivierung entschieden und dafür engmaschige Teststrategien des Studienpersonals sowie der Hunde etabliert. Dies hat zum Vorteil, dass diese Strategie eine einfache Übertragbarkeit auf eine Feldanwendung ermöglicht, in der das Material auch nativ gewonnen und nicht weiter behandelt wird. Über Infektionen des Studienpersonals wurde in den oben erwähnten Publikationen keine Aussage getroffen.

Die von uns angewandte thermische Inaktivierung wurde an wenigen Zentren gewählt, häufiger kamen chemische Inaktivierungen zum Einsatz. Hierbei kann die

Hypothese aufgestellt werden, dass chemische Inaktivierungsmethoden stärker auf die VOCs einwirken könnten als eine thermische Inaktivierung. Ob dies tatsächlich der Fall ist, könnte das Ziel weiterer Forschungsaktivitäten sein. Auch wären Untersuchungen interessant, die betrachten, ob Hunde nach dem Training mit spezifisch inaktiviertem Material auch auf anders inaktiviertes oder nicht inaktiviertes Material reagieren.

5.2.5 Wahl der Proband*innen

Bei der Frage nach der Herkunft der für das Hundetraining sowie für die VOC-Analytik zu verwendenden Proben gilt es einige Faktoren zu berücksichtigen.

Zum einen muss festgelegt werden, welches Klientel für die Gewinnung von positiven Proben herangezogen werden soll. Das Spektrum reicht von asymptomatischen Patienten bis zu intensivmedizinisch versorgten hospitalisierten Patienten.

Die Wahl von asymptomatischen Patienten kann bedeuten, dass Hunde spezifisch als frühdiagnostisches Tool trainiert werden, was eine besondere Bedeutung in der Teststrategie haben könnte. Es kann allerdings auch zur Folge haben, dass das Training anhand von Material erfolgt, dass keine ausreichende Dichte an Covid-spezifischen VOCs aufweist und die Hunde somit nicht spezifisch genug trainiert werden. Am anderen Ende des Spektrums bei der Inklusion von besonders schwer betroffenen Infizierten werfen sich entgegengesetzte Vor- und Nachteile auf. Hier ist zwar von einer hohen Dichte an virusspezifischen Geruchsmustern auszugehen, allerdings ist damit das Trainingsmaterial mutmaßlich aufgrund der krankenhausspezifischen Geruchsumgebung deutlich anders als das bei Massentestungen im Feldversuch zu erwartende Material. Die Ergründung dieser Problematik bedarf ebenfalls weiterer interdisziplinärer Grundlagenforschung.

Zu bedenken ist zudem der Ursprung des negativen Vergleichsmaterials. Dieses sollte so gewählt werden, dass möglichst viele Geruchsinformationen, die zwar spezifisch für das Covid-positive Probandenklientel, aber nicht virusspezifisch sind,

heraus trainiert werden. Idealerweise kommen die negativen Proben also ebenfalls aus einer Krankenhausumgebung, wenn auch die positiven Proben aus dem Krankenhaus stammen. Es ist äußerst schwierig in diesem Zusammenhang alle möglichen *Confounding*-Variablen zu berücksichtigen. Diesem Problem könnte über einen großen Pool an Proben begegnet werden. Allerdings gestaltete sich dies besonders zu Beginn der Pandemie und damit zu Beginn der Forschungsbemühungen zum Einsatz von Spürhunden zur Covid-Identifikation als schwierig, da die Fallzahlen an hospitalisierten Patienten pro Krankenhaus initial niedrig waren.

Bei wenigen verschiedenen Probanden in der Trainingsphase läuft man Gefahr, dass die Hunde nicht lernen, auf die mutmaßlich spezifischen VOCs von Covid zu generalisieren, sondern die individuellen präsentierten Proben zu identifizieren. Allerdings wird nicht in jeder publizierten Studie spezifiziert, ob die für die Spezifitäts- und Sensitivitätskalkulationen verwendeten Proben für die Hunde neu waren oder aus den auch für das Training verwendeten Proben gewählt wurden.

In unserer Studie wurden für die Blindversuche den Hunden unbekannte Proben vorgelegt. Die unter den publizierten Werten liegenden Ergebnisse unserer Studie könnten durch eine zu gering ausgeprägte beziehungsweise zu wenig trainierte Generalisierungsfähigkeit der Hunde in Bezug auf die Erkennung SARS-CoV-2-spezifischer VOCs zu erklären sein.

Zudem ist unklar, inwieweit die gewählte Trainingsmethode spezifisch für SARS-CoV-2 gegenüber anderen respiratorischen Viruserkrankungen ist. Hier ergibt sich das Problem, das aufgrund der gesamtgesellschaftlich etablierten Schutz- und

Hygienemaßnahmen zum Zeitpunkt der Studiendurchführung kaum andere virale Atemwegsinfektionen kursierten, sodass sich kein geeignetes Negativprobenmaterial zur Differenzierung zwischen SARS-CoV-2 und anderen respiratorischen Virusinfektionen gewinnen ließ. Dies könnte Gegenstand weiterer Forschungsbemühungen sein, ebenfalls auch mit Blick auf die VOC-Analytik.

5.2.6 Probenlagerung

Im Verlauf des Projekts hat sich gezeigt, dass eine angemessene Probenlagerung relevant für das Ergebnis der Spürhundeleistung ist. Diese Erkenntnis war eine wichtige Weiterentwicklung. Hieraus ergibt sich die Frage nach der Vielseitigkeit der Einsatzmöglichkeiten korrekt trainierter Hunde, wenn einzelne Variablen einen großen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit als diagnostisches Tool haben. Weitere Untersuchungen sind notwendig, die im Idealfall anhand von chemischen VOC-Peak-Auswertungen etablieren, welche Lagerungsbedingungen über welchen Zeitraum eine ausreichend hohe VOC-Informationsdichte gewährleisten, um eine zuverlässige Auswertung von Proben durch ausgebildete Spürhunde bestmöglich zu gewährleisten.

Die Probenlagerung wird in den verschiedenen Studien [1,2,107,108,113,114,116,117] unterschiedlich gehandhabt. Teilweise wird dieser Einflussfaktor nicht hinreichend genau erwähnt, so dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt ist.

5.2.7 Leistungsauswertung

Auch die Leistungsauswertung der Hunde und die damit einhergehende Bestätigung des gewünschten Verhaltens birgt gewisse Herausforderungen. Wie vereinzelt in den Arbeiten von Greandjean et al. gezeigt wurde, haben auf die SARS-CoV-2-Erkennung trainierte Hunde teilweise auf Material reagiert, das als Negativprobe gewertet wurde, aber in engem zeitlichem Zusammenhang zu einer Covid-19-Infektion des Probanden stand. Somit ist zu diskutieren, ob die Hunde bereits frühzeitig die entsprechenden Geruchsmuster erkannt haben, für das Verhalten aber nicht bestätigt wurden, was zum einen die mathematische Auswertung verfälschen und zum anderen das Hundetraining negativ beeinflussen könnte.

Ein weiteres großes Hindernis ist die mangelnde Auswertbarkeit der spezifischen Prozesse im Gehirn des Hundes, welche zu einer Anzeige bzw. Nicht-Anzeige von Proben führt. Es ist nicht dezidiert zu ermitteln, welche Kombinationen von vorliegenden VOCs zur Reaktion oder Nicht-Reaktion des Hundes führen, ob es eine gewisse Schwellenkonzentration an VOCs gibt und welche genauen Rahmenbedingungen aus den Trainings im Hund als Teil der Geruchserkennung konzeptualisiert wurden. Um dies genauer zu untersuchen, braucht es eine größer angelegte und genauere VOC-Analytik. Auch hier haben sich in der Zeit seit Projektstart durch die rasante Entwicklung von *Machine Learning* neue technische Möglichkeiten aufgetan, die zur akkuraten Beantwortung der hier entstandenen Fragen beitragen könnten.

Es hat sich im Laufe des Projekts gezeigt, dass das parallele Testen von Proben durch die Hunde und durch die VOC-Analytik viele Vorteile mit sich bringt und eine Kontrollebene für die Projektqualität schafft, die so in keiner anderen vorliegenden Publikation berücksichtigt wurde. Entsprechende Kooperationen frühzeitig zu schaffen und eine möglichst große Anzahl an Proben auch für diesen Zweig der Testung zur Verfügung zu stellen, kann also klar empfohlen werden.

5.2.8 Kontextualisierung der Ergebnisse

Tabelle 5: Studienübersicht Teil 1

| | Autor | Fragestellung | Zeitraum | Anzahl Hunde | Trainingsmethode | Trainingszeitraum |
|----------|--------------|------------------------------------|-----------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|
| 1 | Jendry | Pilotstudie TBS | Jul 20 | 8 | maschinell | 1 Woche |
| 2 | Greandjean | Pilotstudie Schweiß | Dez 20 | 6 | Line up | 1-3 Wochen |
| 3 | Eskandari | Proof of concept | Mrz 21 | 6 | nicht beschrieben | 7 Wochen |
| 4 | Essler | Proof of concept | Apr 21 | 9 | Line up | nicht beschrieben |
| 5 | Angeletti | Proof of concept | Jun 21 | 3 | Line up | 4 Wochen |
| 6 | Jendry | Differenzierung vers. Materialien | Jul 21 | 10 | maschinell | 8 Wochen |
| 7 | Vesga | Proof of concept / Feldversuch | Sep 21 | 6 | nicht beschrieben | 15 Wochen |
| 8 | Ten Hagen | Unterscheidung Atemwegsinfektionen | Nov 21 | 12 | machinell | 3 Tage |

Tabelle 5 listet die bis zum Ende des Jahres 2021 vorliegenden bedeutsamen Studien mit deren Fragestellung/ Projektkonzeptualisierung auf. Zudem wird der Veröffentlichungsmonat und die Hundetrainingsmodalitäten dargestellt. Es wird deutlich, dass etwa die Hälfte der Arbeitsgruppen eine Line Up Trainingsmethode wählten, während die andere Hälfte auf das maschinelle Training zurückgriff.

Tabelle 6: Studienübersicht Teil 2

| | Material | Inaktivierung | Probanden Covid | Probanden Non-Covid |
|----------|--|----------------------|------------------------|----------------------------|
| 1 | Bronchialsekret | BPL | 7 | 7 |
| 2 | Axillärer Schweiß | nein | 95 | 82 |
| 3 | Nasen-Rachen (3 Hunde) Kleidung und Masken (3 Hunde) | nein | 26 / 50 | 54 / 70 |
| 4 | Urin und Speichel | chemisch und Hitze | 16 | 18 |
| 5 | Axillärer Schweiß | nein | 20 | 15 |
| 6 | Speichel, Urin, Schweiß | BPL / nein | nicht beschrieben | nicht beschrieben |
| 7 | Atemwegssekrete | nein | 92 | 756 |
| 8 | Zellculturen und Nasen-Rachen | BPL / nein | nicht beschrieben | nicht beschrieben |

Tabelle 6 bezieht sich auf dieselben Studien wie Tabelle 5 und 7. Hier wird nun das verwendete Trainingsmaterial genauer charakterisiert. Insbesondere auf die Wahl der Inaktivierung und den Verzicht auf eine solche sei hier hingewiesen.

Tabelle 7: Studienübersicht Teil 3

| | Spezifität | Sensitivität |
|----------|-------------------|---------------------|
| 1 | 96,35% | 82,63% |
| 2 | nicht beschrieben | nicht beschrieben |
| 3 | 89% / 92,9 % | 65% / 86% |
| 4 | 99% | 71% |
| 5 | nicht beschrieben | nicht beschrieben |
| 6 | nicht beschrieben | nicht beschrieben |
| 7 | 95,10% | 95,90% |
| 8 | nicht beschrieben | nicht beschrieben |

Tabelle 7 zeigt die verschiedenen Spezifitäten und Sensitivitäten der Forschungsgruppen. Hierbei wurden diese nicht in jeder Publikation gesondert angegeben.

5.3 Vergleich der verschiedenen Testmethoden

Während einer Pandemie ist das schnelle Identifizieren von Infektionen und eine breite Anwendbarkeit von Teststrategien essenziell für die Eindämmung des Infektionsgeschehens [118, 119]. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus der Testung einer Covid-Infektion mittels ausgebildetem Spürhund mit verschiedenen anderen diagnostischen Möglichkeiten verglichen und Vor- und Nachteile sowie Einsatzgebiete der verschiedenen Tests beleuchtet.

5.3.1 Vergleich mit PCR-Testung

Die PCR-Analytik ist der Test, mit dem die Ergebnisse der Studie zum Einsatz von Spürhunden in der Covid-Diagnostik primär verglichen wurden. Besonders zu Beginn der Pandemie bestanden trotz der hohen Spezifität und Sensitivität der PCR-Analytik gewisse Limitationen [119, 120]. Zum einen war das Aufkommen an Testungen so hoch, dass es einen erheblichen maschinellen und personellen Engpass der entsprechend ausgestatteten Zentren zur PCR-Analytik gab, was Auswirkungen auf die Dauer bis zu einem Testergebnis hatte. Aus diesem Grund war in dieser Phase der Bedarf für eine schnelle, zuverlässige Diagnosemethode hoch, die die Verarbeitung vieler Proben gleichzeitig bewerkstelligen kann. Die ausgebildeten Spürhunde hätten in dieser Phase bei hinreichend guten Ergebnissen eine sinnvolle Ergänzung zur Detektion von Infektionsfällen darstellen können. Das primäre Problem für die Umsetzung sind die zeitintensive Trainingsphase, die nicht vorab definierten spezifischen Geruchsmuster und die ungeklärte Frage, wie ein Spürhund als diagnostisches Tool zu validieren und zu zertifizieren ist. Die rechtlichen Rahmenbedingungen sind nicht definiert, so dass derzeit der Einsatz von diagnostischen Spürhunden primär im Rahmen von Studien erfolgt.

Um diese Studienerkenntnisse in die Anwendung zu bringen, ist das Definieren von rechtlichen Rahmenbedingungen sowie das Standardisieren von Trainingsmethoden essenziell. Es müssen klare Anforderungen an die Mindestanforderungen für Spezifität und Sensitivität einer Testmethode definiert werden. Des Weiteren müssten weitere Bemühungen unternommen werden, da

diese Fragen sich nicht auf die Covid-spezifische Anwendung beschränken, sondern für alle potenziellen medizinischen Anwendungen von Spürhunden gelten. Dies gilt insbesondere für mögliche weitere pandemische Geschehen, für welche die hier gewonnenen Erkenntnisse angewendet werden könnten.

5.3.2 Vergleich mit Schnelltests

Durch die Entwicklung von Schnelltests wurde das Bedürfnis nach unmittelbaren Testergebnissen in breiter Anwendung erfüllt. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass die CT-Werte, die nötig sind, um einen positiven Schnelltest auszulösen und somit eine Infektion zu bestätigen, von Hersteller zu Hersteller erheblich variieren. Zudem ist die Sensitivität nicht mit der der PCR-Analytik zu vergleichen. Somit gibt es einige Schnelltests, die zwar formal die Anforderungen des Paul-Ehrlich-Instituts, welches bis Juni 2022 für die Testzulassung zuständig war, erfüllen, unter realen Bedingungen jedoch weit hinter diesen Leistungen zurückbleiben. Hierbei spielen auch neu auftretende Virusvarianten eine wichtige Rolle, so war die Sensitivität für die Erkennung von Omicron durch Schnelltests beispielsweise deutlich reduziert [121,122].

Spürhunde können hier eine adäquate Alternative darstellen.

Ein weiterer zu beachtender Faktor ist die Objektivität der Hunde. Ein Schnelltest kann bei der Durchführung durch die zu testende Person durch Ungenauigkeiten in der Handhabung bewusst oder unbewusst beeinflusst werden. Der Hund als externes diagnostisches Tool reagiert auf das als anzeigewürdig gelernte Geruchsmuster ohne eigenes Motiv und hypothetisch ohne Beeinflussbarkeit durch die Probanden.

5.3.3 Vergleich mit Halbleitersensoren

Die Studie von Guest et. al. geht auf die Anwendung von VOC-detektierenden Halbleitersensoren und somit chemische Sensoren ein. Diese Publikation ist im Laufe des hier beschriebenen Projekts (Mai 2022) erschienen, kann jedoch als interessante Alternative oder Ergänzung zu den Spürhunden, die in diesem Kontext als biologische Sensoren aufgefasst werden können, gewertet werden. Sie fußt auf derselben Theorie der Erkennung von Covid-Infektionen aufgrund von spezifischen Geruchsmustern, eliminiert jedoch die „Black Box“-Problematik [91] der Hundeauswertung. Eine technische Methode kann qualitativ und quantitativ ausgewertet werden und ist somit potenziell objektiver. Dem gegenüberstehend bleiben Hunde trotz intensivem Training Individuen, die nur bis zu einem gewissen Grad von extern steuerbar sind. Auf der anderen Seite hängt die Technik von der Programmierung ab, welche wiederum auf dem zu dem Zeitpunkt vorliegenden Kenntnisstand beruht, da eben keine Reizverarbeitung durch ein dem Menschen überlegenes Verarbeitungssystem stattfindet. Auch hier sei wieder auf die Einsetzbarkeit von Künstlicher Intelligenz und *Machine Learning* verwiesen, die weitere Erkenntnisse und elaborierte Modelle ermöglichen könnten. Dies könnte ein Fokus weiterer Forschungsvorhaben sein.

Eine mögliche Applikation solcher Sensoren im Rahmen einer Teststrategie zur Erkennung von Infektionen besteht in der Testung in geschlossenen Räumen, wie beispielsweise in Flugzeugen oder Klassenzimmern, in denen sich eine Gruppe von Menschen befindet. Der Einsatz und die Etablierung eines solchen Systems müsste ebenfalls in weiteren Studien ergründet werden. Auch für die Testung von Räumen

könnte ein direkter Vergleich mit der Leistung von Spürhunden interessant sein. Ob diese Infektionen anhand von Raumluft erkennen können, ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht veröffentlicht worden.

5.3.4 Früherkennungsstrategien

Eine bemerkenswerte Erkenntnis der aktuellen Literatur, wenn auch episodisch berichtet, besteht in der möglichen Früherkennung von Covid-Infektionen durch Spürhunde.

Bereits die Erfahrungen zum Einsatz von Spürhunden bei anderen Erkrankungen, insbesondere Epilepsie oder Diabetes, zeigen, dass Spürhunde Krankheitsanzeichen oder klinische Verschlechterungen frühzeitig anzeigen können. Dies ist im Kontext von Viruserkrankungen wie Covid-19 besonders bedeutsam, um Infektionsausbreitungen möglichst frühzeitig zu verhindern. Die beschriebene Eignung von Spürhunden zur Früherkennung von Covid-19 Infektionen bedeutet ein erheblicher Vorteil gegenüber etablierten Testmethoden, die erst die tatsächlich stattgefundenen Infektion detektieren. Es wären weitere Untersuchungen und deren Validierung notwendig. Dies ist vor allem bemerkenswert, da die Hunde auf PCR-negatives Material reagieren können, welches nie als Trainingsgegenstand geboten wurde. Es liegt nahe, dass sie Covid-spezifische Geruchsmuster sehr früh erkennen, die ein Infizierter aufweist – potenziell bereits vor dem Auftreten von Symptomen oder einem positiven PCR-Testergebnis. Dieses Phänomen stellt heraus, dass ein richtig ausgebildeter

Spürhund ein sehr sensibles Testtool sein kann und somit etablierte Teststrategien ergänzen kann. Um dies objektivierbar zu messen könnte die Entwicklung der VOC-Geruchsmuster über den zeitlichen Verlauf einer Covid-Infektion interessant sein. Gegebenenfalls ließe sich hierüber im Kontext mit der Spürhundeleistung ein Schwellenwert an Geruchsdichte definieren, welcher für die Identifikation notwendig ist.

5.3.5 Feldanwendbarkeit

Die Frage, die sich nun stellt und die den Bogen zur Entwicklung dieser Forschungsarbeit schließt, ist die nach der Anwendbarkeit der Methoden im Feld.

Der Charme des Einsatzes von Spürhunden als Infektions-Identifikationstool liegt vor allem in der Feldapplikation und der Diagnostik „im Vorbeilaufen“, analog zu Sprengstoffhunden an Flughäfen. Diese Anwendungsstrategie gewährleistet nicht nur eine schnelle, unauffällige Absuche von großen Personenkollektiven, sondern könnte auch für Teile der Gesellschaft, die für Abstriche schwierig zugänglich oder fraglich *compliant* sind, wie beispielsweise Kinder oder Menschen mit Einschränkungen genutzt werden.

Erste Ergebnisse der Feldanwendung zeigen jedoch, dass der Schritt vom Einsatz bei kontrollierten Studienbedingungen zu dem Testen im Feld ein großer ist.

Es liegen in der Feldanwendung viele zusätzliche Geruchsinformationen und Umweltbedingungen vor, die die Effektivität und Zuverlässigkeit der Spürhundearbeit erschweren. Dennoch ergeben sich aus den besonderen Fähigkeiten der Spürhunde zukünftig interessante Anwendungsbereiche.

Weitere Forschung und Gestaltung der Rahmenbedingungen sind als Grundlage für effektives Training der Spürhunde, die stetige Verbesserung von deren Fähigkeiten und die Vorbereitung weiterer Einsatzgebiete notwendig.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die interdisziplinäre *Proof-of-Concept*-Studie TRACKDOG zeigt, dass die Identifikation von SARS-CoV-2-Infektionen durch die Präsentation von axillären Hautabstrichen durch entsprechend trainierte Spürhunde möglich ist.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Übertragbarkeit des Trainings der Hunde auf anderes Probenmaterial möglich ist, was die Hypothese unterstützt, dass es SARS-CoV-2-spezifische Geruchsmuster gibt.

Die Verzahnung des Hundetrainings mit der VOC-Analytik und deren herausragende Bedeutung wurden im Rahmen des hier beschriebenen Projekts erstmalig untersucht. Die dem Projekt zugrunde gelegte Interdisziplinarität ermöglicht die Objektivierbarkeit der Hundespürleistung und könnte der Schlüssel zu weiteren grundlegenden Forschungsfragen sowie im Verlauf zu vielen weiteren Einsatzgebieten der Spürhunde sein. Die Vertiefung dieses Themas mit seinen multiplen Facetten könnte das Entschlüsseln der Geruchsinformationen einer Infektionskrankheit (oder anderer Pathologien) und darauf basierend deren Identifizierbarkeit ermöglichen.

Viele weitere Fragen und Anwendungsmöglichkeiten resultieren daraus im Kontext der besonderen Leistungsfähigkeit von Spürhunden, Geruchsinformationen zuverlässig anzuzeigen. Eine schnelle Identifikation von Geruchsspuren, z.B. durch eine immer bessere und genauere VOC-Analytik, könnte das Training der Hunde deutlich schneller und effektiver gestalten. Womöglich wären dadurch die vielen Faktoren und Schwierigkeiten im Zusammenhang mit der Entnahme, Lagerung und dem Transport von Proben für das Training der Hunde einfacher und schneller zu

bewältigen. Im Kontext von Infektionskrankheiten und etwaigen zukünftigen Pandemien könnte dies die Anwendung der hier etablierten Konzepte erheblich erleichtern und somit zur Begrenzung von Infektionsketten, dem Auftreten von Todesfällen und gesellschaftlichen Krisen beitragen.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass der Einsatz von *medical dogs* noch am Anfang steht und viel größere Beachtung und intensive Forschung erfahren sollte, auch vor dem Hintergrund einer komplexen Hochleistungsmedizin.

Die Dynamik des Projekts TRACKDOG hat eindrücklich die vielfältigen Herausforderungen von Forschungsprojekten in einer sich unvorhersehbar und äußerst schnell entwickelnden Zeit deutlich gemacht. Dies wirft die Frage auf, wie das Gleichgewicht zwischen a priori definierten Versuchsbedingungen und der Reaktion auf veränderte Rahmenbedingungen gefunden und umgesetzt werden kann. Die dynamischen Veränderungen betrafen in dieser Studie auch den Kern des Projekts und erforderten eine stetige Reflexion der Grundannahmen mit der Notwendigkeit einer Anpassung. Trotz dieser Herausforderungen konnte das Projekt erfolgreich zu Ende geführt werden und es wurde dargelegt, dass die Erkenntnisse daraus auch für zukünftige Forschungen und Arbeiten relevant sein können.

Es konnten spannende Ansatzpunkte für weitere interdisziplinäre Forschungsvorhaben erarbeitet werden, die auch in nicht-pandemischen Zeiten vorangebracht werden sollten, um die gewonnenen Erkenntnisse im Fall einer erneuten Pandemie oder in Bezug auf andere Krankheitsentitäten schnell anwenden zu können.

Allen voran wäre das Definieren von Vorgaben bezüglich der Zertifizierung von Spürhunden zu nennen. Aktuell fehlende Vorgaben hierzu erschweren erheblich die Etablierung dieser Methode als validiertes Testinstrument und den Vergleich mit anderen Testmethoden.

Wie bereits dargestellt, sollte zukünftig ein weiterer Fokus auf der Verbesserung und Vertiefung der VOC-Analytik und deren Auswertung liegen, um besser zu verstehen, ob und welche spezifischen Geruchsinformationen mit Krankheiten zusammenhängen. Dieses Verständnis könnte das Training und den Einsatz von Spürhunden als *medical dogs* voranbringen, mit entsprechenden positiven Auswirkungen auch zur Prävention von zukünftigen Infektionsgeschehen.

Die hier vorgelegte Dissertation stellt die Bedeutung von interdisziplinärer, multizentrischer Zusammenarbeit heraus und zeigt auf, wie durch das Beschreiten neuer Wege und die kreative Verzahnung verschiedener Forschungsgebiete eine sinnvolle Ergänzung etablierter Strategien erfolgen kann.

7. Literaturverzeichnis

1 Grandjean D, Sarkis R, Lecoq-Julien C, Benard A, Roger V, Levesque E, u. a. Can the detection dog alert on COVID-19 positive persons by sniffing axillary sweat samples? A proof-of-concept study. *PLoS One*. 10. Dezember 2020;15(12):e0243122–e0243122.

2 Jendry P, Schulz C, Twele F, Meller S, von Köckritz-Blickwede M, Osterhaus ADME, u. a. Scent dog identification of samples from COVID-19 patients - a pilot study. *BMC Infect Dis*. 23. Juli 2020;20(1):536–536.

3 Angle TC, Passler T, Waggoner PL, Fischer TD, Rogers B, Galik PK, u. a. Real-Time Detection of a Virus Using Detection Dogs. *Front Vet Sci*. 8. Januar 2016;2:79–79.

4 Sonoda H, Kohnoe S, Yamazato T, Satoh Y, Morizono G, Shikata K, u. a. Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection. *Gut*. 2011/01/31 Aufl. Juni 2011;60(6):814–9.

5 Maughan MN, Best EM, Gadberry JD, Sharpes CE, Evans KL, Chue CC, u. a. The Use and Potential of Biomedical Detection Dogs During a Disease Outbreak. *Front Med (Lausanne)*. 4. April 2022;9:848090–848090.

6 Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Nov 25;10:587269. doi: 10.3389/fcimb.2020.587269. PMID: 33324574; PMCID: PMC7723891.

7 Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):727–733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017. Epub 2020 Jan 24. PMID: 31978945; PMCID: PMC7092803.

8 Lvov DK, Alkhovsky SV, Kolobukhina LV, Burtseva EI. [Etiology of epidemic outbreaks COVID-19 on Wuhan, Hubei province, Chinese People Republic associated with 2019-nCoV (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, Subgenus Sarbecovirus): lessons of SARS-CoV outbreak.]. *Vopr Virusol*. 2020;65(1):6–15. Russian. doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15. PMID: 32496715.

9 Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J Med Virol.* 2020 Apr;92(4):401-402. doi: 10.1002/jmv.25678. Epub 2020 Feb 12. PMID: 31950516; PMCID: PMC7166628.

10 Li X, Sridhar S, Chan JF. The Coronavirus Disease 2019 pandemic: how does it spread and how do we stop it? *Curr Opin HIV AIDS.* 2020 Nov;15(6):328-335. doi: 10.1097/COH.0000000000000650. PMID: 32969975.

11 Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KK, Yuan S, Yuen KY. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Jan 28;9(1):221-236. doi: 10.1080/22221751.2020.1719902. Erratum in: *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):540. PMID: 31987001; PMCID: PMC7067204.

12 Kumavath R, Barh D, Andrade BS, Imchen M, Aburjaile FF, Ch A, Rodrigues DLN, Tiwari S, Alzahrani KJ, Góes-Neto A, Weener ME, Ghosh P, Azevedo V. The Spike of SARS-CoV-2: Uniqueness and Applications. *Front Immunol.* 2021 Jul 8;12:663912. doi: 10.3389/fimmu.2021.663912. PMID: 34305894; PMCID: PMC8297464.

13 Shirbhate E, Pandey J, Patel VK, Kamal M, Jawaid T, Gorain B, Kesharwani P, Rajak H. Understanding the role of ACE-2 receptor in pathogenesis of COVID-19 disease: a potential approach for therapeutic intervention. *Pharmacol Rep.* 2021 Dec;73(6):1539-1550. doi: 10.1007/s43440-021-00303-6. Epub 2021 Jun 27. PMID: 34176080; PMCID: PMC8236094.

14 Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, Cao Y, Yousif AS, Bals J, Hauser BM, Feldman J, Muus C, Wadsworth MH 2nd, Kazer SW, Hughes TK, Doran B, Gatter GJ, Vukovic M, Taliaferro F, Mead BE, Guo Z, Wang JP, Gras D, Plaisant M, Ansari M, Angelidis I, Adler H, Sucre JMS, Taylor CJ, Lin B, Waghray A, Mitsialis V, Dwyer DF, Buchheit KM, Boyce JA, Barrett NA, Laidlaw TM, Carroll SL, Colonna L, Tkachev V, Peterson CW, Yu A, Zheng HB, Gideon HP, Winchell CG, Lin PL, Bingle CD, Snapper SB, Kropski JA, Theis FJ, Schiller HB, Zaragosi LE, Barbry P, Leslie A, Kiem HP, Flynn JL, Fortune SM, Berger B, Finberg RW, Kean LS, Garber M, Schmidt AG, Lingwood D, Shalek AK, Ordovas-Montanes J; HCA Lung Biological Network. Electronic address: lung-network@humancellatlas.org; HCA Lung Biological Network. SARS-CoV-2 Receptor

ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell*. 2020 May 28;181(5):1016-1035.e19. doi: 10.1016/j.cell

15 Bourgonje AR, Abdulle AE, Timens W, Hillebrands JL, Navis GJ, Gordijn SJ, Bolling MC, Dijkstra G, Voors AA, Osterhaus AD, van der Voort PH, Mulder DJ, van Goor H. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Pathol*. 2020 Jul;251(3):228-248. doi: 10.1002/path.5471. Epub 2020 Jun 10. PMID: 32418199; PMCID: PMC7276767.

16 Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol*. 2020 Dec;41(12):1100-1115. doi: 10.1016/j.it.2020.10.004. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33132005; PMCID: PMC7556779.

17 Prydz K, Saraste J. The life cycle and enigmatic egress of coronaviruses. *Mol Microbiol*. 2022 Jun;117(6):1308-1316. doi: 10.1111/mmi.14907. Epub 2022 May 4. PMID: 35434857; PMCID: PMC9321882.

18 Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*. 2021 Jan 29;13(2):202. doi: 10.3390/v13020202. PMID: 33572857; PMCID: PMC7911532.

19 Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol*. 2020 Apr 6;30(7):1346-1351.e2. doi: 10.1016/j.cub.2020.03.022. Epub 2020 Mar 19. Erratum in: *Curr Biol*. 2020 Apr 20;30(8):1578. PMID: 32197085; PMCID: PMC7156161.

20 Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, Yu J, Kang M, Song Y, Xia J, Guo Q, Song T, He J, Yen HL, Peiris M, Wu J. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*. 2020 Mar 19;382(12):1177-1179. doi: 10.1056/NEJMc2001737. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32074444; PMCID: PMC7121626.

21 Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Al-Malkey M, Alsubki R, Ezzikouri S, Al-Hababi FH, Sah R, Al Mutair A, Alhumaid S, Al-Tawfiq JA, Al-Omari A, Al-Qaaneh AM, Al-Qahtani M, Tirupathi R, Al Hamad MA, Al-Baghli NA, Sulaiman T, Alsubait A, Mehta R, Abass E, Alawi M, Alshahrani F, Shrestha DB, Karobari MI, Pecho-Silva S, Arteaga-Livias

K, Bonilla-Aldana DK, Rodriguez-Morales AJ. Airborne transmission of SARS-CoV-2 is the dominant route of transmission: droplets and aerosols. *Infez Med*. 2021 Mar 1;29(1):10-19. PMID: 33664169.

22 Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, Talavera-López C, Maatz H, Reichart D, Sampaziotis F, Worlock KB, Yoshida M, Barnes JL; HCA Lung Biological Network. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med*. 2020 May;26(5):681-687. doi: 10.1038/s41591-020-0868-6. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32327758; PMCID: PMC8637938.

23 Poydenot F, Abdourahamane I, Caplain E, Der S, Haiech J, Jallon A, Khoutami I, Loucif A, Marinov E, Andreotti B. Risk assessment for long- and short-range airborne transmission of SARS-CoV-2, indoors and outdoors. *PNAS Nexus*. 2022 Oct 6;1(5):pgac223. doi: 10.1093/pnasnexus/pgac223. PMID: 36712338; PMCID: PMC9802175.

24 Rothe C, Schunk M, Sothmann P, Bretzel G, Froeschl G, Wallrauch C, Zimmer T, Thiel V, Janke C, Guggemos W, Seilmaier M, Drosten C, Vollmar P, Zwirgmaier K, Zange S, Wölfel R, Hoelscher M. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *N Engl J Med*. 2020 Mar 5;382(10):970-971. doi: 10.1056/NEJMc2001468. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32003551; PMCID: PMC7120970.

25 Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, Prasad PV, Steele M, Brooks JT, Slayton RB, Biggerstaff M, Butler JC. SARS-CoV-2 Transmission From People Without COVID-19 Symptoms. *JAMA Netw Open*. 2021 Jan 4;4(1):e2035057. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.35057. Erratum in: *JAMA Netw Open*. 2021 Feb 1;4(2):e211383. PMID: 33410879; PMCID: PMC7791354.

26 Tan J, Ge Y, Martinez L, Sun J, Li C, Westbrook A, Chen E, Pan J, Li Y, Cheng W, Ling F, Chen Z, Shen Y, Huang H. Transmission roles of symptomatic and asymptomatic COVID-19 cases: a modelling study. *Epidemiol Infect*. 2022 Sep 27;150:e171. doi: 10.1017/S0950268822001467. PMID: 36263615; PMCID: PMC9588416.

27 Elias C, Sekri A, Leblanc P, Cucherat M, Vanhems P. The incubation period of COVID-19: A meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2021 Mar;104:708-710. doi: 10.1016/j.ijid.2021.01.069. Epub 2021 Feb 3. PMID: 33548553; PMCID: PMC7857041.

28 Jones TC, Biele G, Mühlemann B, Veith T, Schneider J, Beheim-Schwarzbach J, Bleicker T, Tesch J, Schmidt ML, Sander LE, Kurth F, Menzel P, Schwarzer R, Zuchowski M, Hofmann J, Krumbholz A, Stein A, Edelmann A, Corman VM, Drosten C. Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. *Science*. 2021 Jul 9;373(6551):eabi5273. doi: 10.1126/science.abi5273. Epub 2021 May 25. PMID: 34035154; PMCID: PMC9267347.

29 Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2021 Jan;2(1):e13-e22. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30172-5. Epub 2020 Nov 19. PMID: 33521734; PMCID: PMC7837230.

30 Walsh KA, Spillane S, Comber L, Cardwell K, Harrington P, Connell J, Teljeur C, Broderick N, de Gascun CF, Smith SM, Ryan M, O'Neill M. The duration of infectiousness of individuals infected with SARS-CoV-2. *J Infect*. 2020 Dec;81(6):847-856. doi: 10.1016/j.jinf.2020.10.009. Epub 2020 Oct 10. PMID: 33049331; PMCID: PMC7547320.

31 Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, Alvarado-Arnez LE, Bonilla-Aldana DK, Franco-Paredes C, Henao-Martinez AF, Paniz-Mondolfi A, Lagos-Grisales GJ, Ramírez-Vallejo E, Suárez JA, Zambrano LI, Villamil-Gómez WE, Balbin-Ramon GJ, Rabaan AA, Harapan H, Dhama K, Nishiura H, Kataoka H, Ahmad T, Sah R; Latin American Network of Coronavirus Disease 2019-COVID-19 Research (LANCOVID-19). Electronic address: <https://www.lanccovid.org>. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis*. 2020 Mar-Apr;34:101623. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101623. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32179124; PMCID: PMC7102608.

32 Kopańska M, Barnaś E, Błajda J, Kuduk B, Łagowska A, Banaś-Ząbczyk A. Effects of SARS-CoV-2 Inflammation on Selected Organ Systems of the Human Body. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 10;23(8):4178. doi: 10.3390/ijms23084178. PMID: 35456997; PMCID: PMC9025828.

33 Batah SS, Fabro AT. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians. *Respir Med*. 2021 Jan;176:106239. doi: 10.1016/j.rmed.2020.106239. Epub 2020 Nov 19. PMID: 33246294; PMCID: PMC7674971.

34 Meyer NJ, Gattinoni L, Calfee CS. Acute respiratory distress syndrome. *Lancet*. 2021 Aug 14;398(10300):622-637. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00439-6. Epub 2021 Jul 1. PMID: 34217425; PMCID: PMC8248927.

35 Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, Gattinoni L, van Haren F, Larsson A, McAuley DF, Ranieri M, Rubenfeld G, Thompson BT, Wrigge H, Slutsky AS, Pesenti A; LUNG SAFE Investigators; ESICM Trials Group. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):788-800. doi: 10.1001/jama.2016.0291. Erratum in: *JAMA*. 2016 Jul 19;316(3):350. Erratum in: *JAMA*. 2016 Jul 19;316(3):350. PMID: 26903337.

36 Gómez-Mesa JE, Galindo-Coral S, Montes MC, Muñoz Martin AJ. Thrombosis and Coagulopathy in COVID-19. *Curr Probl Cardiol*. 2021 Mar;46(3):100742. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2020.100742. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33243440; PMCID: PMC7605852.

37 Miesbach W, Makris M. COVID-19: Coagulopathy, Risk of Thrombosis, and the Rationale for Anticoagulation. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2020 Jan-Dec;26:1076029620938149. doi: 10.1177/1076029620938149. PMID: 32677459; PMCID: PMC7370334.

38 Chavez S, Long B, Koyfman A, Liang SY. Coronavirus Disease (COVID-19): A primer for emergency physicians. *Am J Emerg Med*. 2021 Jun;44:220-229. doi: 10.1016/j.ajem.2020.03.036. Epub 2020 Mar 24. PMID: 32265065; PMCID: PMC7102516. Long B, Carius BM, Chavez S, Liang SY, Brady WJ, Koyfman A, Gottlieb M. Clinical update on COVID-19 for the emergency clinician: Presentation and evaluation. *Am J Emerg Med*. 2022 Apr;54:46-57. doi: 10.1016/j.ajem.2022.01.028. Epub 2022 Jan 21. PMID: 35121478; PMCID: PMC8779861.

39 Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. Epub 2020 Jan 24. Erratum in: *Lancet*. 2020 Jan 30;: PMID: 31986264; PMCID: PMC7159299.

40 Zhao Y, Cui C, Zhang K, Liu J, Xu J, Nisenbaum E, Huang Y, Qin G, Chen B, Hoffer M, Blanton SH, Telischi F, Hare JM, Daunert S, Shukla B, Pahwa SG, Jayaweera DT, Farmer PE, Del Rio C, Liu X, Shu Y. COVID-19: A Systematic Approach to Early Identification and Healthcare Worker Protection. *Front Public Health*. 2020 May 19;8:205. doi: 10.3389/fpubh.2020.00205. PMID: 32574296; PMCID: PMC7248242.

41 Mullol J, Alobid I, Mariño-Sánchez F, Izquierdo-Domínguez A, Marin C, Klimek L, Wang DY, Liu Z. The Loss of Smell and Taste in the COVID-19 Outbreak: a Tale of Many Countries. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2020 Aug 3;20(10):61. doi: 10.1007/s11882-020-00961-1. PMID: 32748211; PMCID: PMC7397453.

42 Dadras O, SeyedAlinaghi S, Karimi A, Shamsabadi A, Qaderi K, Ramezani M, Mirghaderi SP, Mahdiabadi S, Vahedi F, Saeidi S, Shojaei A, Mehrtak M, Azar SA, Mehraeen E, Voltarelli FA. COVID-19 mortality and its predictors in the elderly: A systematic review. *Health Sci Rep*. 2022 May 23;5(3):e657. doi: 10.1002/hsr2.657. Erratum in: *Health Sci Rep*. 2022 Jul 21;5(4):e723. PMID: 35620541; PMCID: PMC9125886.

43 Seyed Alinaghi S, Karimi A, Barzegary A, Mojdeganlou H, Vahedi F, Mirghaderi SP, Shobeiri P, Ramezani M, Yousefi Konjdar P, Mirzapour P, Tantuoyir MM, Mehraeen E, Dadras O, Voltarelli F. COVID-19 mortality in patients with immunodeficiency and its predictors: a systematic review. *Eur J Med Res*. 2022 Oct 8;27(1):195. doi: 10.1186/s40001-022-00824-7. PMID: 36209202; PMCID: PMC9547631.

44 Dramé M, Tabue Teguo M, Proye E, Hequet F, Hentzien M, Kanagaratnam L, Godaert L. Should RT-PCR be considered a gold standard in the diagnosis of COVID-19? *J Med Virol*. 2020 Nov;92(11):2312-2313. doi: 10.1002/jmv.25996. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32383182; PMCID: PMC7267274.

45 Gao J, Quan L. Current Status of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2 Infection and Future Developments: A Review. *Med Sci Monit*. 2020 Dec 17;26:e928552. doi: 10.12659/MSM.928552. PMID: 33332288; PMCID: PMC7754691.

46 Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, Sasso JM, Gregg AC, Soares DJ, Beskid TR, Jervey SR, Liu C. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci*. 2020 May 27;6(5):591-605. doi: 10.1021/acscentsci.0c00501. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32382657; PMCID: PMC7197457.

- 47 Böger B, Fachi MM, Vilhena RO, Cobre AF, Tonin FS, Pontarolo R. Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *Am J Infect Control*. 2021 Jan;49(1):21-29. doi: 10.1016/j.ajic.2020.07.011. Epub 2020 Jul 10. PMID: 32659413; PMCID: PMC7350782.
- 48 Stang A, Robers J, Schonert B, Jöckel KH, Spelsberg A, Keil U, Cullen P. The performance of the SARS-CoV-2 RT-PCR test as a tool for detecting SARS-CoV-2 infection in the population. *J Infect*. 2021 Aug;83(2):237-279. doi: 10.1016/j.jinf.2021.05.022. Epub 2021 Jun 1. PMID: 34081958; PMCID: PMC8166461.
- 49 Pecoraro V, Negro A, Pirotti T, Trenti T. Estimate false-negative RT-PCR rates for SARS-CoV-2. A systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest*. 2022 Feb;52(2):e13706. doi: 10.1111/eci.13706. Epub 2021 Dec 5. PMID: 34741305; PMCID: PMC8646643.
- 50 Mekonnen D, Mengist HM, Derbie A, Nibret E, Munshea A, He H, Li B, Jin T. Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2021 May;31(3):e2181. doi: 10.1002/rmv.2181. Epub 2020 Nov 5. PMID: 33152146.
- 51 Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, Adriano A, Beese S, Dretzke J, Ferrante di Ruffano L, Harris IM, Price MJ, Ditttrich S, Emperador D, Hooft L, Leeflang MM, Van den Bruel A; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Jun 25;6(6):CD013652. doi: 10.1002/14651858.CD013652. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2022 Nov 17;11:CD013652. PMID: 32584464; PMCID: PMC7387103.
- 52 Fox T, Geppert J, Dinnes J, Scandrett K, Bigio J, Sulis G, Hettiarachchi D, Mathangasinghe Y, Weeratunga P, Wickramasinghe D, Bergman H, Buckley BS, Probyn K, Sguassero Y, Davenport C, Cunningham J, Ditttrich S, Emperador D, Hooft L, Leeflang MM, McInnes MD, Spijker R, Struyf T, Van den Bruel A, Verbakel JY, Takwoingi Y, Taylor-Phillips S, Deeks JJ; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev*. 2022 Nov 17;11(11):CD013652. doi: 10.1002/14651858.CD013652.pub2. PMID: 36394900; PMCID: PMC9671206.

53 Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, Berhane S, Davenport C, Dittrich S, Emperador D, Takwoingi Y, Cunningham J, Beese S, Dretzke J, Ferrante di Ruffano L, Harris IM, Price MJ, Taylor-Phillips S, Hooft L, Leeflang MM, Spijker R, Van den Bruel A; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Aug 26;8(8):CD013705. doi: 10.1002/14651858.CD013705. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Mar 24;3:CD013705. PMID: 32845525; PMCID: PMC8078202.

54 Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, Taylor M, Adriano A, Davenport C, Dittrich S, Emperador D, Takwoingi Y, Cunningham J, Beese S, Domen J, Dretzke J, Ferrante di Ruffano L, Harris IM, Price MJ, Taylor-Phillips S, Hooft L, Leeflang MM, McInnes MD, Spijker R, Van den Bruel A; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Mar 24;3(3):CD013705. doi: 10.1002/14651858.CD013705.pub2. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2022 Jul 22;7:CD013705. PMID: 33760236; PMCID: PMC8078597.

55 Dinnes J, Sharma P, Berhane S, van Wyk SS, Nyaaba N, Domen J, Taylor M, Cunningham J, Davenport C, Dittrich S, Emperador D, Hooft L, Leeflang MM, McInnes MD, Spijker R, Verbakel JY, Takwoingi Y, Taylor-Phillips S, Van den Bruel A, Deeks JJ; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Rapid, point-of-care antigen tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2022 Jul 22;7(7):CD013705. doi: 10.1002/14651858.CD013705.pub3. PMID: 35866452; PMCID: PMC9305720.

56 Piubelli C, Treggiari D, Lavezzari D, Deiana M, Dishnica K, Tosato EMS, Mazzi C, Cattaneo P, Mori A, Pomari E, Nicolini L, Leonardi M, Perandin F, Formenti F, Giorgetti A, Conti A, Capobianchi MR, Gobbi FG, Castilletti C. Wide Real-Life Data Support Reduced Sensitivity of Antigen Tests for Omicron SARS-CoV-2 Infections. *Viruses*. 2024 Apr 23;16(5):657. doi: 10.3390/v16050657. PMID: 38793539; PMCID: PMC11125898.

57 Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun*. 2020 May;109:102433. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102433. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32113704; PMCID: PMC7127067.

58 Jin YH, Cai L, Cheng ZS, Cheng H, Deng T, Fan YP, Fang C, Huang D, Huang LQ, Huang Q, Han Y, Hu B, Hu F, Li BH, Li YR, Liang K, Lin LK, Luo LS, Ma J, Ma LL, Peng ZY, Pan YB, Pan ZY, Ren XQ, Sun HM, Wang Y, Wang YY, Weng H, Wei CJ, Wu DF, Xia J, Xiong Y, Xu HB, Yao XM, Yuan YF, Ye TS, Zhang XC, Zhang YW, Zhang YG,

Zhang HM, Zhao Y, Zhao MJ, Zi H, Zeng XT, Wang YY, Wang XH; , for the Zhongnan Hospital of Wuhan University Novel Coronavirus Management and Research Team, Evidence-Based Medicine Chapter of China International Exchange and Promotive Association for Medical and Health Care (CPAM). A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). *Mil Med Res.* 2020 Feb 6;7(1):4. doi: 10.1186/s40779-020-0233-6. PMID: 32029004; PMCID: PMC7003341.

59 Nishiura, H., Oshitani, H., Kobayashi, T., Saito, T., Sunagawa, T., Matsui, T., et al., 2020. Closed environments facilitate secondary transmission of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *medRxiv*

60 Stadnytskyi V, Anfinrud P, Bax A. Breathing, speaking, coughing or sneezing: What drives transmission of SARS-CoV-2? *J Intern Med.* 2021 Nov;290(5):1010-1027. doi: 10.1111/joim.13326. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34105202; PMCID: PMC8242678.

61 McCloskey B, Zumla A, Lim PL, Endericks T, Arbon P, Cicero A, Borodina M. A risk-based approach is best for decision making on holding mass gathering events. *Lancet.* 2020 Apr 18;395(10232):1256-1257. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30794-7. Epub 2020 Apr 2. PMID: 32247321; PMCID: PMC7195068.

62 Ebrahim SH, Memish ZA. COVID-19 - the role of mass gatherings. *Travel Med Infect Dis.* 2020 Mar-Apr;34:101617. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101617. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32165283; PMCID: PMC7102534.

63 Bielecki M, Patel D, Hinkelbein J, Komorowski M, Kester J, Ebrahim S, Rodriguez-Morales AJ, Memish ZA, Schlagenhauf P. Air travel and COVID-19 prevention in the pandemic and peri-pandemic period: A narrative review. *Travel Med Infect Dis.* 2021 Jan-Feb;39:101915. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101915. Epub 2020 Nov 10. PMID: 33186687; PMCID: PMC7655026.

64 Biscayart C, Angeleri P, Lloveras S, Chaves TDSS, Schlagenhauf P, Rodríguez-Morales AJ. The next big threat to global health? 2019 novel coronavirus (2019-nCoV): What advice can we give to travellers? - Interim recommendations January 2020, from the Latin-American society for Travel Medicine (SLAMVI). *Travel Med Infect Dis.* 2020 Jan-Feb;33:101567. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101567. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32006657; PMCID: PMC7128745.

65 Morawska L, Tang JW, Bahnfleth W, Bluyssen PM, Boerstra A, Buonanno G, Cao J, Dancer S, Floto A, Franchimon F, Haworth C, Hogeling J, Isaxon C, Jimenez JL, Kurnitski J, Li Y, Loomans M, Marks G, Marr LC, Mazzeo L, Melikov AK, Miller S, Milton DK, Nazaroff W, Nielsen PV, Noakes C, Peccia J, Querol X, Sekhar C, Seppänen O, Tanabe SI, Tellier R, Tham KW, Wargocki P, Wierzbicka A, Yao M. How can airborne transmission of COVID-19 indoors be minimised? *Environ Int.* 2020 Sep;142:105832. doi: 10.1016/j.envint.2020.105832. Epub 2020 May 27. PMID: 32521345; PMCID: PMC7250761.

66 Jones RM, Bleasdale SC, Maita D, Brosseau LM; CDC Prevention Epicenters Program. A systematic risk-based strategy to select personal protective equipment for infectious diseases. *Am J Infect Control.* 2020 Jan;48(1):46-51. doi: 10.1016/j.ajic.2019.06.023. Epub 2019 Jul 27. PMID: 31358421; PMCID: PMC7132808.

67 Verbeek JH, Rajamaki B, Ijaz S, Tikka C, Ruotsalainen JH, Edmond MB, Sauni R, Kilinc Balci FS. Personal protective equipment for preventing highly infectious diseases due to exposure to contaminated body fluids in healthcare staff. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Jul 1;7(7):CD011621. doi: 10.1002/14651858.CD011621.pub3. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Apr 15;4:CD011621. PMID: 31259389; PMCID: PMC6601138.

68 <https://www.who.int/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19> Stand: 27.07.2023

69 Bogoch II, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MUG, Khan K. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *J Travel Med.* 2020 Mar 13;27(2):taaa008. doi: 10.1093/jtm/taaa008. PMID: 31943059; PMCID: PMC7107534.

70 Wilson ME, Chen LH. Travellers give wings to novel coronavirus (2019-nCoV). *J Travel Med.* 2020 Mar 13;27(2):taaa015. doi: 10.1093/jtm/taaa015. PMID: 32010938; PMCID: PMC7107561.

71 RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - Epidemiologischer Steckbrief zu SARS-CoV-2 und COVID-19 Stand: 18.09.2023

72 Corona-Pandemie führt zu Übersterblichkeit in Deutschland - Statistisches Bundesamt (destatis.de) Stand: 18.09.2023

73 Epidemiologisches Bulletin 38/2022 (rki.de) Stand: 18.09.2023

74 RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - Empfehlungen des RKI zu Hygienemaßnahmen im Rahmen der Behandlung und Pflege von Patienten mit einer Infektion durch SARS-CoV-2 Stand: 18.09.2023

75 Chronik zum Coronavirus SARS-CoV-2 | Maßnahmen (bundesgesundheitsministerium.de) Stand: 18.09.2023

76 Roy CM, Bollman EB, Carson LM, Northrop AJ, Jackson EF, Moresky RT. Assessing the indirect effects of COVID-19 on healthcare delivery, utilization and health outcomes: a scoping review. *Eur J Public Health*. 2021 Jul 13;31(3):634-640. doi: 10.1093/eurpub/ckab047. PMID: 33755130; PMCID: PMC8083627.

77 Grömling, Michael / Hentze, Tobias / Schäfer, Holger, 2022, Wirtschaftliche Auswirkungen der Corona-Pandemie in Deutschland. Eine ökonomische Bilanz nach zwei Jahren, in: *IW-Trends*, 49. Jg., Nr. 1, S. 41-72

78 Betthäuser BA, Bach-Mortensen AM, Engzell P. A systematic review and meta-analysis of the evidence on learning during the COVID-19 pandemic. *Nat Hum Behav*. 2023 Mar;7(3):375-385. doi: 10.1038/s41562-022-01506-4. Epub 2023 Jan 30. PMID: 36717609.

79 Schmidt-Petri C, Schröder C, Okubo T, Graeber D, Rieger T. Social Norms and Preventive Behaviors in Japan and Germany During the COVID-19 Pandemic. *Front Public Health*. 2022 Apr 1;10:842177. doi: 10.3389/fpubh.2022.842177. PMID: 35433575; PMCID: PMC9010522.

80 Fountoulakis KN, Karakatsoulis G, Abraham S, Adorjan K, Ahmed HU, Alarcón RD, Arai K, Auwal SS, Berk M, Bjedov S, Bobes J, Bobes-Bascaran T, Bourgin-Duchesnay J, Bredicean CA, Bukelskis L, Burkadze A, Abud IIC, Castilla-Puentes R, Cetkovich M, Colon-Rivera H, Corral R, Cortez-Vergara C, Crepin P, De Berardis D, Zamora Delgado S, De Lucena D, De Sousa A, Stefano RD, Dodd S, Elek LP, Elissa A, Erdelyi-Hamza B, Erzin G, Etchevers MJ, Falkai P, Farcas A, Fedotov I, Filatova V, Fountoulakis NK, Frankova I, Franza F, Frias P, Galako T, Garay CJ, Garcia-Álvarez L, García-Portilla MP, Gonda X, Gondek TM, González DM, Gould H, Grandinetti P, Grau A, Groudeva V, Hagin M, Harada T, Hasan MT, Hashim NA, Hilbig J, Hossain S, Iakimova R, Ibrahim M, Iftene F, Ignatenko Y, Irarrazaval M, Ismail Z, Ismayilova J, Jacobs A, Jakovljević M, Jakšić N, Javed A, Kafali HY,

Karia S, Kazakova O, Khalifa D, Khaustova O, Koh S, Kopishinskaia S, Kosenko K, Koupidis SA, Kovacs I, Kulig B, Lalljee A, Liewig J, Majid A, Malashonkova E, Malik K, Malik NI, Mammadzada G, Mandalia B, Marazziti D, Marčinko D, Martinez S, Matiekus E, Mejia G, Memon RS, Martínez XEM, Mickevičiūtė D, Milev R, Mohammed M, Molina-López A, Morozov P, Muhammad NS, Mustač F, Naor MS, Nassieb A, Navickas A, Okasha T, Pandova M, Panfil AL, Panteleeva L, Papava I, Patsali ME, Pavlichenko A, Pejuskovic B, Pinto Da Costa M, Popkov M, Popovic D, Raduan NJN, Ramírez FV, Rancans E, Razali S, Rebok F, Rewekant A, Flores ENR, Rivera-Encinas MT, Saiz P, de Carmona MS, Martínez DS, Saw JA, Saygili G, Schneidereit P, Shah B, Shirasaka T, Silagadze K, Sitanggang S, Skugarevsky O, Spikina A, Mahalingappa SS, Stoyanova M, Szczegielniak A, Tamasan SC, Tavormina G, Tavormina MGM, Theodorakis PN, Tohen M, Tsapakis EM, Tukhvatullina D, Ullah I, Vaidya R, Vega-Dienstmaier JM, Vrublevska J, Vukovic O, Vysotska O, Widiasih N, Yashikhina A, Prezerakos PE, Smirnova D. Results of the COVID-19 mental health international for the general population (COMET-G) study. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2022 Jan;54:21-40. doi: 10.1016/j.euroneuro.2021.10.004. Epub 2021 Oct 15. PMID: 34758422; PMCID: PMC8609892.

81 Ravens-Sieberer U, Kaman A, Erhart M, Devine J, Schlack R, Otto C. Impact of the COVID-19 pandemic on quality of life and mental health in children and adolescents in Germany. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2022 Jun;31(6):879-889. doi: 10.1007/s00787-021-01726-5. Epub 2021 Jan 25. PMID: 33492480; PMCID: PMC7829493.

82 Sachs JD, Karim SSA, Akinin L, Allen J, Brosbøl K, Colombo F, Barron GC, Espinosa MF, Gaspar V, Gaviria A, Haines A, Hotez PJ, Koundouri P, Bascuñán FL, Lee JK, Pate MA, Ramos G, Reddy KS, Serageldin I, Thwaites J, Vike-Freiberga V, Wang C, Were MK, Xue L, Bahadur C, Bottazzi ME, Bullen C, Laryea-Adjei G, Ben Amor Y, Karadag O, Lafortune G, Torres E, Barredo L, Bartels JGE, Joshi N, Hellard M, Huynh UK, Khandelwal S, Lazarus JV, Michie S. The Lancet Commission on lessons for the future from the COVID-19 pandemic. *Lancet.* 2022 Oct 8;400(10359):1224-1280. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01585-9. Epub 2022 Sep 14. PMID: 36115368; PMCID: PMC9539542.

83 <https://www.who.int/news/item/05-05-2022-14.9-million-excess-deaths-were-associated-with-the-covid-19-pandemic-in-2020-and-2021> Stand: 18.02.2024

84 Davis, H.E., McCorkell, L., Vogel, J.M. et al. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol* 21, 133-146 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00846-2>

85 <https://www.duden.de/rechtschreibung/Spuerhund> Stand: 18.09.2023

86 Kelly, Tristan J., "Military Working Dogs in the United States Armed Forces from World War I to Vietnam" (2018). Boise State University Theses and Dissertations. 1482.

87 J.C. Oxley, L.P. Waggoner, Chapter 3 - Detection of Explosives by Dogs, Editor(s): Maurice Marshall, Jimmie C. Oxley, Aspects of Explosives Detection, Elsevier, 2009, Pages 27-40, ISBN 9780123745330

88 https://www.researchgate.net/profile/Clare-Browne/publication/261663456_The_use_of_scent-detection_dogs/links/00b7d534f1bf649291000000/The-use-of-scent-detection-dogs.pdf Stand: 21.09.2023

89 https://www.researchgate.net/profile/Le-Papet/publication/260841118_Efficacy_of_drug_detection_by_fully-trained_police_dogs_varies_by_breed_training_level_type_of_drug_and_search_environment/links/5c96615792851cf0ae93e6da/Efficacy-of-drug-detection-by-fu Stand: 21.09.2023

90 Kate M. Richards, Stephen J. Cotton, Richard M. Sandeman, The use of detector dogs in the diagnosis of nematode infections in sheep feces, *Journal of Veterinary Behavior*, Volume 3, Issue 1, 2008, Pages 25-31, ISSN 1558-7878.

91 J.E. Hayes, P.D. McGreevy, S.L. Forbes, G. Laing, R.M. Stuetz, Critical review of dog detection and the influences of physiology, training, and analytical methodologies, *Talanta*, Volume 185, 2018, Pages 499-512.

92 Kokocińska-Kusiak A, Woszczyło M, Zybala M, Maciocha J, Barłowska K, Dzieciół M. Canine Olfaction: Physiology, Behavior, and Possibilities for Practical Applications. *Animals (Basel)*. 2021 Aug 21;11(8):2463. doi: 10.3390/ani11082463. PMID: 34438920; PMCID: PMC8388720.

93 <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-021-06523-8> Stand: 21.09.2023

94 Jezierski T, Adamkiewicz E, Walczak M, Sobczyńska M, Górecka-Bruzda A, Ensminger J, Papet E. Efficacy of drug detection by fully-trained police dogs varies by breed, training level, type of drug and search

environment. *Forensic Sci Int.* 2014 Apr;237:112-8. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.01.013. Epub 2014 Feb 7. PMID: 24631776.

95 Hall NJ, Johnston AM, Bray EE, Otto CM, MacLean EL, Udell MAR. Working Dog Training for the Twenty-First Century. *Front Vet Sci.* 2021 Jul 27;8:646022. doi: 10.3389/fvets.2021.646022. PMID: 34386536; PMCID: PMC8353195.

96 Hall NJ, Wynne CDL. The effect of Pavlovian conditioning on an operant odor-detection task in dogs. *PsycEXTRA Dataset.* (2013) 10.1037/e598032013-033

97 Feil C, Staib F, Berger MR, Stein T, Schmidtmann I, Forster A, Schimanski CC. Sniffer dogs can identify lung cancer patients from breath and urine samples. *BMC Cancer.* 2021 Aug 13;21(1):917. doi: 10.1186/s12885-021-08651-5. PMID: 34388977; PMCID: PMC8362224.

98 Taverna G, Tidu L, Grizzi F, Torri V, Mandressi A, Sardella P, La Torre G, Cocciolone G, Seveso M, Giusti G, Hurle R, Santoro A, Graziotti P. Olfactory system of highly trained dogs detects prostate cancer in urine samples. *J Urol.* 2015 Apr;193(4):1382-7. doi: 10.1016/j.juro.2014.09.099. Epub 2014 Sep 28. PMID: 25264338.

99 Wilson C, Morant S, Kane S, Pesterfield C, Guest C, Rooney NJ. An Owner-Independent Investigation of Diabetes Alert Dog Performance. *Front Vet Sci.* 2019 Mar 27;6:91. doi: 10.3389/fvets.2019.00091. PMID: 30972346; PMCID: PMC6445953.

100 Catala A, Cousillas H, Hausberger M, Grandgeorge M. Dog alerting and/or responding to epileptic seizures: A scoping review. *PLoS One.* 2018 Dec 4;13(12):e0208280. doi: 10.1371/journal.pone.0208280. PMID: 30513112; PMCID: PMC6279040.

101 Bomers MK, van Agtmael MA, Luik H, Vandenbroucke-Grauls CM, Smulders YM. A detection dog to identify patients with *Clostridium difficile* infection during a hospital outbreak. *J Infect.* 2014 Nov;69(5):456-61. doi: 10.1016/j.jinf.2014.05.017. Epub 2014 Jun 25. PMID: 24973552.

102 Curran, Allison M.; Rabin, Scott I.; Prada, Paola A.; Furton, Kenneth G. (2005): Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using SPME-GC/MS. In: *Journal of chemical ecology* 31 (7), S. 1607-1619. DOI: 10.1007/s10886-005-5801-4.

103 Bagawan, K., Roshni, M. & Jagadeesan, D. An Overview of Volatile Organic Compounds (VOCs). *Reson* 27, 2183-2211 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12045-022-1513-0>

104 Buljubasic, Fanis; Buchbauer, Gerhard (2015): The scent of human diseases: a re-view on specific volatile organic compounds as diagnostic biomarkers. In: *Flavour Fragr. J.* 30 (1), S. 5-25. DOI: 10.1002/ffj.3219.

105 Cammann, Karl (Hg.) (2011): *Instrumentelle analytische Chemie. Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung*. Nachdruck der 1. Aufl. 2001. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (Spektrum Lehrbuch).

106 Miklösi A, Polgárdi R, Topál J, Csányi V. Use of experimenter-given cues in dogs. *Anim Cogn.* 1998 Oct;1(2):113-21. doi: 10.1007/s100710050016. Epub 2014 Jan 5. PMID: 24399275.

107 Angeletti S, Travaglino F, Spoto S, Pascarella MC, Mansi G, De Cesaris M, Sartea S, Giovanetti M, Fogolari M, Plescia D, Macera M, Incalzi RA, Ciccozzi M. COVID-19 sniffer dog experimental training: Which protocol and which implications for reliable identification? *J Med Virol.* 2021 Oct;93(10):5924-5930. doi: 10.1002/jmv.27147. Epub 2021 Jun 26. PMID: 34152634; PMCID: PMC8426906.

108 Eskandari E, Ahmadi Marzaleh M, Roudgari H, Hamidi Farahani R, Nezami-Asl A, Laripour R, Aliyazdi H, Dabbagh Moghaddam A, Zibaseresht R, Akbarialiabad H, Yousefi Zoshk M, Shiri H, Shiri M. Sniffer dogs as a screening/diagnostic tool for COVID-19: a proof of concept study. *BMC Infect Dis.* 2021 Mar 5;21(1):243. doi: 10.1186/s12879-021-05939-6. PMID: 33673823; PMCID: PMC7934999.

109 Johnson, Anamarie & Wynne, Clive. (2022). Training Dogs with Science or with Nature? An Exploration of Trainers' Word Use, Gender, and Certification Across Dog-Training Methods. *Anthrozoös.* 36. 1-17. 10.1080/08927936.2022.2062869.

110 Hiby, Elly & Rooney, Nicola & Bradshaw, J. (2004). Dog training methods: Their use, effectiveness and interaction with behaviour and welfare. *Animal Welfare*. 13. 63-69.. 10.1017/S0962728600026683.

111 Roorda, Debora & Koomen, Helma & Spilt, Jantine & Oort, Frans. (2011). The Influence of Affective Teacher-Student Relationships on Students' School Engagement and Achievement: A Meta-Analytic Approach. *Review of Educational Research*. 81. 493-529. 10.3102/0034654311421793.

112 Simon A, Lazarowski L, Singletary M, Barrow J, Van Arsdale K, Angle T, Waggoner P, Giles K. A Review of the Types of Training Aids Used for Canine Detection Training. *Front Vet Sci*. 2020 Jun 5;7:313. doi: 10.3389/fvets.2020.00313. PMID: 32596267; PMCID: PMC7301692.

113 Essler JL, Kane SA, Nolan P, Akaho EH, Berna AZ, DeAngelo A, Berk RA, Kaynaroglu P, Plymouth VL, Frank ID, Weiss SR, Odom John AR, Otto CM. Discrimination of SARS-CoV-2 infected patient samples by detection dogs: A proof of concept study. *PLoS One*. 2021 Apr 14;16(4):e0250158. doi: 10.1371/journal.pone.0250158. PMID: 33852639; PMCID: PMC8046346.

114 Vesga O, Agudelo M, Valencia-Jaramillo AF, Mira-Montoya A, Ossa-Ospina F, Ocampo E, Čiuoderis K, Pérez L, Cardona A, Aguilar Y, Agudelo Y, Hernández-Ortiz JP, Osorio JE. Highly sensitive scent-detection of COVID-19 patients in vivo by trained dogs. *PLoS One*. 2021 Sep 29;16(9):e0257474. doi: 10.1371/journal.pone.0257474. PMID: 34587181; PMCID: PMC8480816.

115 Michael-Kordatou I, Karaolia P, Fatta-Kassinou D. Sewage analysis as a tool for the COVID-19 pandemic response and management: the urgent need for optimised protocols for SARS-CoV-2 detection and quantification. *J Environ Chem Eng*. 2020 Oct;8(5):104306. doi: 10.1016/j.jece.2020.104306. Epub 2020 Jul 27. PMID: 32834990; PMCID: PMC7384408.

116 Jendry P, Twele F, Meller S, Schulz C, von Köckritz-Blickwede M, Osterhaus ADME, Ebbers H, Ebbers J, Pilchová V, Pink I, Welte T, Manns MP, Fathi A, Addo MM, Ernst C, Schäfer W, Engels M, Petrov A, Marquart K, Schotte U, Schalke E, Volk HA. Scent dog identification of SARS-CoV-2 infections in different body fluids. *BMC Infect Dis*. 2021 Jul 27;21(1):707. doi: 10.1186/s12879-021-06411-1. PMID: 34315418; PMCID: PMC8313882.

117 Ten Hagen NA, Twele F, Meller S, Jendry P, Schulz C, von Köckritz-Blickwede M, Osterhaus A, Ebbers H, Pink I, Welte T, Manns MP, Illig T, Fathi A, Addo MM, Nitsche A, Puyskens A, Michel J, Krause E, Ehmann R, von Brunn A, Ernst C, Zwirgmaier K, Wölfel R, Nau A, Philipp E, Engels M, Schalke E, Volk HA. Discrimination of SARS-CoV-2 Infections From Other Viral Respiratory Infections by Scent Detection Dogs. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Nov 18;8:749588. doi: 10.3389/fmed.2021.749588. PMID: 34869443; PMCID: PMC8636992.

118 Koo JR, Cook AR, Lim JT, Tan KW, Dickens BL. Modelling the Impact of Mass Testing to Transition from Pandemic Mitigation to Endemic COVID-19. *Viruses*. 2022 May 5;14(5):967. doi: 10.3390/v14050967. PMID: 35632707; PMCID: PMC9145947.

119 da Silva SJR, do Nascimento JCF, Germano Mendes RP, Guarines KM, Targino Alves da Silva C, da Silva PG, de Magalhães JJF, Vigar JRJ, Silva-Júnior A, Kohl A, Pardee K, Pena L. Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned. *ACS Infect Dis*. 2022 Sep 9;8(9):1758-1814. doi: 10.1021/acsinfecdis.2c00204. Epub 2022 Aug 8. PMID: 35940589; PMCID: PMC9380879.

120 Filchakova O, Dossym D, Ilyas A, Kuanysheva T, Abdizhamil A, Bukasov R. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta*. 2022 Jul 1;244:123409. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123409. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35390680; PMCID: PMC8970625.

121 Piubelli C, Treggiari D, Lavezzari D, Deiana M, Dishnica K, Tosato EMS, Mazzi C, Cattaneo P, Mori A, Pomari E, Nicolini L, Leonardi M, Perandin F, Formenti F, Giorgetti A, Conti A, Capobianchi MR, Gobbi FG, Castilletti C. Wide Real-Life Data Support Reduced Sensitivity of Antigen Tests for Omicron SARS-CoV-2 Infections. *Viruses*. 2024 Apr 23;16(5):657. doi: 10.3390/v16050657. PMID: 38793539; PMCID: PMC11125898.

122 Fourati S, Langendorf C, Audureau E, Challine D, Michel J, Soulier A, Ahnou N, Désveaux I, Picard O, Ortonne V, Gourgeon A, Mills C, Hémerly F, Rieux C, Pawlotsky JM, Malou N, Chevaliez S. Performance of six rapid diagnostic tests for SARS-CoV-2 antigen detection and implications for practical use. *J Clin Virol*. 2021 Sep;142:104930. doi: 10.1016/j.jcv.2021.104930. Epub 2021 Jul 25. PMID: 34390929; PMCID: PMC8310570.

8. Abbildungsquellenverzeichnis

Abbildung 1: <https://www.shutterstock.com/de/image-illustration/covid19-virus-structure-sarscov2-anatomy-pandemic-1854731590>

Abbildung 2: Medina-Enríquez, M.M., Lopez-León, S., Carlos-Escalante, J.A. et al. ACE2: the molecular doorway to SARS-CoV-2. Cell Biosci 10, 148 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00519-8>

Abbildung 3: <https://pandem-ic.com/covid-waves-europe-and-us-compared/>

Abbildung 4: Kokocińska-Kusiak A, Woszczyło M, Zybala M, Maciocha J, Barłowska K, Dzięcioł M. Canine Olfaction: Physiology, Behavior, and Possibilities for Practical Applications. Animals. 2021; 11(8):2463. <https://doi.org/10.3390/ani11082463>

Abbildung 5: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>

Abbildung 6: <https://www.ptb.de/cms/de/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-83/ag-832/grundlagen-der-digitalen-pcr.html>

Abbildung 7: <https://shop.gbo.com/de/germany/products/bioscience/mikrobiologie-bakteriologie/abstrichbestecke-wattetupfer/>

Abbildung 8: <https://www.labc.de/feingewinde-vial-mit-optimierter-restmengenentleerung/>

Abbildung 9: <https://docplayer.org/167190392-Mnf-geow-b201-geochemische-analytik-kapitel-7-analytische-chromatographie-gc-hplc-mit-ms.html>

Abbildung 10: Erkoyuncu, John & Khan, Samir. (2020). Olfactory-Based Augmented Reality Support for Industrial Maintenance. IEEE Access. PP. 1-1. 10.1109/ACCESS.2020.2970220.

Abbildung 11: Marchal, Sophie & Bregeras, Olivier & Puaux, Didier & Gervais, Rémi & Ferry, Barbara. (2016). Rigorous Training of Dogs Leads to High Accuracy in Human Scent Matching-To-Sample Performance. PLoS ONE. 11. 10.1371/journal.pone.0146963.

Abbildung 12: <https://www.kynoscience.de/geruchsmaschine/>

9. Anhang

Anlage 1: Protokoll der Hitzeinaktivierung

SARS-CoV-2 heat inactivation (Corona-Spürhunde)

Test parameter:

Virus stock: SARS-CoV-2 (isolates FFM1 and FFM7)

Titer: 1×10^7 TCID₅₀/mL

Cell line: Caco-2

Conditions: virus control (stored for 30 min at room temperature)

60°C – 10 min, 20 min, 30 min

70°C – 10 min, 20 min, 30 min

90°C – 10 min, 20 min, 30 min

Test procedure:

Virus stock was pre-diluted 1:10 with culture medium (MEM suppl. w/ 1% FCS). 50 µL of diluted virus suspension was added to the swab and the swab was placed into a 1.5 mL reaction tube. The upper part (wooden handle) was removed to allow closing of the reaction tube lid. Tubes were placed according to the defined condition onto a thermo-shaker. After incubation time 500 µL culture medium were added to each tube and virus was brought back in solution by mixing/vortexing. Virus suspension was titrated to determine viral titer. Titer was calculated by the Spearman and Kaerber methods.

Results:

| Temperature | Incubation time | TCID ₅₀ /mL (± SD) | Log Reduction |
|-------------|-----------------|---|---------------|
| RT | 30 min | 3.26×10^5 (2.31×10^5) | - |
| 60°C | 10 min | 5.94×10^4 (1.03×10^5) | 0,74 |
| | 20 min | 5.93×10^5 (1.02×10^6) | -0,26 |
| | 30 min | 3.16×10^0 (0) | 4,01 |
| 70°C | 10 min | 3.16×10^0 (0) | 4,01 |
| | 20 min | 3.16×10^0 (0) | 4,01 |
| | 30 min | 3.16×10^0 (0) | 4,01 |
| 90°C | 10 min | 3.16×10^0 (0) | 4,01 |
| | 20 min | 3.16×10^0 (0) | 4,01 |
| | 30 min | 3.16×10^0 (0) | 4,01 |

Detection limit: 3.16×10^0

Conclusion:

Sufficient inactivation of SARS-CoV-2 (99.99%) was observed after treatment at 60°C for at least 30 minutes. Higher temperatures allowed shorter incubation times to completely inactivate virus suspension.

Limitation: test was performed in 1.5 mL reaction tubes. Inactivation in the original swab tubes might need longer incubation time at a certain temperature to ensure complete inactivation of SARS-CoV-2 since more air in the tube has to be heated up.

10. Danksagung

An erster und bedeutendster Stelle möchte ich Prof. Dr. Petra Staubach-Renz meinen tiefsten Dank aussprechen, nicht nur für die Betreuung dieser Arbeit sondern für die Begleitung meines Weges, der an vielen Stellen durch ihre Unterstützung und Vorbildfunktion gebahnt wurde. Ohne ihre Expertise, Unterstützung und Motivation wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Ebenso möchte ich dem gesamten TRACKDOG-Team für die lehrreiche, interessante, fachübergreifend kollegiale Zusammenarbeit und eine spannende Zeit danken. Hierbei sei insbesondere der Zweitgutachter dieser Arbeit, Prof. Dr. Bodo Plachter herausgestellt. Ihm danke ich besonders für seine konstruktiven Rückmeldungen, seinen Einsatz für dieses Projekt in einer gerade für ihn fachlich besonders fordernden Zeit und die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit so kurz vor dem wohlverdienten Ruhestand.

Besonderer Dank gebührt auch meiner Familie für ihre Ermutigung und Unterstützung. Über die Maßen ist hierbei meiner Tante Dr. Angelika Pflüger-Demann zu danken, die sich für die Abrundung und Vollendung dieser Arbeit mit einem Engagement und Esprit eingesetzt hat, die ihresgleichen suchen.

Und zu guter Letzt danke ich all den lieben Menschen und guten Freunden in meinem Leben, die zu verschiedenen Zeiten ein offenes Ohr bezüglich dieser Arbeit hatten, jeder von euch hat einen Teil zur Finalisierung dieses Schriftstücks beigetragen.