

Aus dem
Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. H. Hengel

**NACHWEIS VIRALER RESPIRATORISCHER INFEKTIONEN
MITTELS
POLYMERASEKETTENREAKTION**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Linda Bonzel

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan**

Referent: PD. Dr. med. Ortwin Adams

Koreferentin: Prof. Dr. med. Antje Schuster

Inhaltsverzeichnis:

1 EINLEITUNG.....	8
1.1 Virale Erreger von Respirationstraktinfektionen	8
1.1.1 Aufbau und Einteilung der Respirationstraktviren	8
1.1.1.1 Subtypen und Serovare.....	8
1.1.1.2 Besonderheiten des Genoms.....	9
1.1.1.3 Virusproteine.....	10
1.1.1.3.1 Strukturproteine	10
1.1.1.3.1.1 Das virale Capsid.....	10
1.1.1.3.1.2 Glykoproteine.....	11
1.1.1.3.2 Nichtstrukturproteine.....	13
1.1.2 Die Infektion der Zielzellen durch Respirationstraktviren.....	14
1.1.2.1 Anheftung des Virus an die Wirtszelle.....	14
1.1.2.2 Aufnahme des Virus in die Wirtszelle.....	15
1.1.2.2.1 Aufnahme von unbehüllten Viren in die Wirtszelle.....	15
1.1.2.2.2 Aufnahme von behüllten Viren in die Wirtszelle	15
1.2 Grundlagen der Pathogenese von viralen Respirationstraktinfektionen	17
1.2.1 Die pulmonale Immunantwort.....	17
1.2.1.1 Physikalisch-chemische Mechanismen der Pathogenabwehr.....	17
1.2.1.2 Unspezifische Immunantwort.....	18
1.2.1.3 Die adaptive pulmonale Immunantwort.....	19
1.2.1.3.1 T-Zellen und ihre Rolle bei pulmonalen Virusinfektionen.....	19
1.2.1.3.2 B-Zellen und ihre Rolle bei pulmonalen Virusinfektionen.....	20
1.2.2 Immunologische und virale Faktoren der schwer verlaufenden RSV-Infektion	22
1.3 Neu entdeckte virale Erreger von Respirationstraktinfektionen	23
1.3.1 Die Coronavirussubtypen NL 63 und HKU- 1.....	23
1.3.2 Humanes Metapneumovirus.....	24
1.3.3 Humanes Bocavirus.....	25
1.4 Methoden zum Nachweis von Respirationstraktviren	26
1.4.1 Direkter Antigenachweis über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper.....	27
1.4.2 Indirekter Antikörpernachweis über serologische Methoden.....	28
1.4.3 Direkter Virusnachweis über die Zellkultur	30
1.4.4 Molekulare Nachweismethoden.....	31
1.4.4.1 Funktionsprinzip der Polymerasekettenreaktion.....	31
1.4.4.2 Funktionsprinzip der Real-Time PCR unter Verwendung von TaqMan™ Sonden.....	33
1.4.4.3 Die One-Step Real-Time PCR.....	34
1.4.4.4 Funktionsprinzip der Du-/und Triplex Real-Time PCR.....	34

1.4.4.5 Grundlagen des quantitativen Real-Time PCR-Nachweises.....	35
1.5 Klinische Aspekte von viralen Respirationstraktinfektionen	36
1.5.1 Infekte des oberen Respirationstrakts.....	36
1.5.1.1 Rhinitis.....	36
1.5.1.2 Pharyngitis.....	38
1.5.2 Infektionen des unteren Respirationstrakts.....	39
1.5.2.1 Akute Laryngotracheobronchitis (Krupp).....	39
1.5.2.2 Bronchitis.....	41
1.5.2.3 Bronchiolitis.....	42
1.5.2.4 Pneumonie.....	44
1.6 Zielsetzung der Arbeit	45
2 MATERIAL UND METHODEN.....	46
2.1 Liste der verwendeten Materialien	46
2.1.1.1 Materialien, arbeitsplatzübergreifend.....	46
2.1.1.2 Zellkultur und Virusisolierung.....	46
2.1.1.3 Zellkulturgefäße/-geräte.....	46
2.1.1.4 Zellkulturmedien.....	47
2.1.1.5 Immunfluoreszenz.....	47
2.1.2 Molekulare Techniken (Nukleinsäureextraktion, PCR, Klonierung).....	47
2.1.2.1 Oligonukleotide.....	47
2.1.2.2 Enzyme.....	47
2.1.2.3 Vektor.....	47
2.1.2.4 Kompetente Zellen.....	47
2.1.2.5 Chemikalien/Medien.....	48
2.1.2.6 Kits.....	48
2.1.2.7 Geräte.....	48
2.1.2.8 Software.....	49
2.1.3 Virusisolierung mittels Zellkultur.....	50
2.1.3.1 Zellkultivierung.....	50
2.1.3.2 Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer.....	50
2.1.3.3 Einfrieren von Zellen.....	51
2.1.3.4 Auftauen von Zellen	51
2.1.3.5 Aussäen von Zelllinien auf 24-well-Mikrotiterplatten zur Virusisolierung aus klinischen Materialien.....	51
2.1.3.6 Aussaat von Zellen auf 96-well-Mikrotiterplatten zur Quantifizierung virushaltiger Zellkulturüberstände mittels TCID 50- Assay.....	52
2.1.4 Virusinfektion von Zelllinien	53
2.1.4.1 Virusinfektion	53
2.1.4.2 Cytopathischer Effekt und Virusernte.....	54

2.1.4.3 Verimpfung klinischer Materialien auf 24-well-Zellkulturplatten.....	54
2.1.4.4 Quantifizierung virushaltiger Zellkulturüberstände mittels TCID50- Assay.....	55
2.2 Nachweis von RSV-, Influenza- und Parainfluenza-Antigen (Schnelltest)	56
2.3 Auswahl geeigneter Primer und Sonden für die Real-Time-PCR	57
2.3.1 Suche nach konservierten Regionen im viralen Genom	57
2.3.2 Vortestung der Primer und Sonden mittels Sybr green® und TaqMan™ PCR.....	58
2.3.2.1 Reverse Transkription.....	58
2.3.2.2 Sybr green® und TaqMan™ PCR.....	59
2.4 Herstellung von Virusgen-kodierenden Plasmiden	61
2.4.1 Amplifikation.....	61
2.4.2 DNA-Extraktion	62
2.4.3 Restriktionsenzymverdau.....	62
2.4.4 Ligation.....	63
2.4.5 Transfektion.....	63
2.4.6 Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA	63
2.4.7 Herstellung von Plasmidstandards als Grundlage für den quantitativen PCR-Nachweis.....	64
2.5 Untersuchung von Respirationstraktmaterialien in der One-Step Real-Time RT-PCR („Respiratorische Viren PCR“)	65
2.5.1 Aufarbeitung klinischer Materialien.....	65
2.5.2 Automatisierte RNA-und DNA-Extraktion.....	66
2.5.3 Qualitativer Virusnachweis mittels One-Step Du-/Triplex Real-Time PCR	66
2.5.4 Amplifikation und Auswertung der Multiplex-PCR.....	67
2.5.5 Quantitativer Virusnachweis mittels One-Step Monoplex Real-Time PCR.....	68
2.6 Evaluation der One-Step Multiplex Real-Time PCR	68
2.6.1 Spezifität.....	68
2.6.2 Bestimmung und Vergleich der unteren Nachweisgrenzen (Du/Triplexassay versus Monoplex)	69
2.7 Untersuchung respiratorischer Materialien im Rahmen zweier klinischer Studien	69
2.7.1 Klinische Studie I: Dezember 2005 bis Oktober 2006.....	70
2.7.2 Klinische Studie II : seit November 2006 (Stand Dezember 2007).....	70
2.7.3 Statistische Analysen.....	70
3 RESULTATE.....	72
3.1 Vortestung der Primer und Sonden in der Sybr green® sowie in der TaqMan™ Real-Time PCR	72
3.1.1 Sybr green® PCR.....	72
3.1.2 TaqMan™ Real-Time PCR.....	74

3.2 Herstellung von Viren-kodierenden rekombinanten Plasmiden	75
3.2.1 Klonierungs-PCR und Darstellung im Agarosegel.....	75
3.2.2 Restriktionsverdau nach Minipräparation.....	75
3.2.3 Austestung der Plasmidstandards in der Real-Time PCR.....	76
3.3 Evaluation der One-Step Du-/Triplex Real-Time PCR	77
3.3.1 Spezifität.....	77
3.3.2 Sensitivität.....	78
3.3.3 Vergleich des RSV-Schnelltests mit der RSV-PCR.....	80
3.3.4 Vergleich Virusisolierung mit Du/Triplex-PCR.....	80
3.4 Auswertung der Ergebnisse der ersten klinischen Studie	81
3.4.1 Die 1. klinische Studie : Gesamtübersicht.....	81
3.4.2 1. klinische Studie : Erregernachweis und Altersverteilung.....	82
3.4.3 1. klinische Studie: Analyse viraler Koinfektionen.....	82
3.4.4 1. klinische Studie : Virale Koinfektion und klinische Manifestation.....	83
3.5 Auswertung der Ergebnisse der zweiten klinischen Studie	84
3.5.1 Die 2. klinische Studie, Gesamtübersicht	84
3.5.2 PCR-Nachweisraten und Viruslasten.....	85
3.5.3 2. Klinische Studie, Altersverteilung.....	86
3.5.4 2.Klinische Studie, Diagnosen	86
3.5.5 Vergleich der Erregerhäufigkeiten 1. Studie versus 2. Studie.....	86
3.5.6 Jahreszeitliche Verteilung der häufigsten Infektionen.....	87
3.5.7 2. Klinische Studie, Analyse viraler Koinfektionen.....	89
4 DISKUSSION.....	90
4.1 Evaluation der Respiratorische-Viren PCR	90
4.1.1 Spezifität.....	90
4.1.2 Sensitivität	90
4.1.3 Vergleich des RSV-Schnelltests mit der RSV-PCR.....	91
4.1.4 Vergleich der Virusisolierung mit der one-step real-time PCR.....	91
4.2 Die erste klinische Studie	92
4.2.1 Erregerspektrum der mittels PCR nachgewiesenen Viren.....	92
4.2.2 Die klinische Manifestation und die Frequenz von viralen Koinfektionen.....	93
4.3 Die zweite klinische Studie	93
4.3.1 Altersverteilung.....	93
4.3.2 Saisonale und jährliche Schwankungen der Inzidenzraten einzelner Viren.....	94
4.3.2.1 Respiratory Syncytial Virus	94
4.3.2.2 Humanes Bocavirus.....	95

4.3.3 Quantifizierung von respiratorischen Viren	95
4.3.4 Kombinationsmuster von viralen Koinfektionen.....	96
 5 LITERATUR.....	97
 6 DANKSAGUNG.....	102
 7 LEBENSLAUF.....	103
 8 ZUSAMMENFASSUNG.....	104

1 Einleitung

1.1 Virale Erreger von Respirationstraktinfektionen

Viren, die Infektionen des Respirationstrakts verursachen, werden als „Respirationstraktviren“ bezeichnet. Diesen Viren gemeinsam ist, daß sie Zellen des Respirationstrakts infizieren, sich in ihnen replizieren und schließlich in Abhängigkeit von der Immunantwort des Wirts unterschiedlich schwere Erkrankungen verursachen. Die hierfür eingesetzten viralen Strategien sind vielfältig aufgrund der Vielzahl der unter dem Begriff „Respirationstraktviren“ zusammengefaßten Pathogene. Im folgenden werden die humanmedizinisch relevanten Respirationstraktviren vorgestellt und erläutert anhand von Charakteristika bezüglich ihrer Struktur, ihres Genoms sowie anhand ihrer Infektions- und Replikationsstrategien mit der daraus resultierenden Pathogenese von Infektionen des Respirationstrakts.

1.1.1 Aufbau und Einteilung der Respirationstraktviren

1.1.1.1 Subtypen und Serovare

Viren werden anhand ihres Genomaufbaus, der Symmetrieform ihrer Capside sowie dem Fehlen bzw. Vorhandensein einer Membranhülle in Virusfamilien mit ihren Unterfamilien eingeteilt ⁴². Desweiteren werden Viren anhand serologischer Kriterien klassifiziert in sogenannte Serovare. Diese Einteilung basiert auf der spezifischen Antigen-Antikörperreaktion einzelner Viruskomponenten (Antigene) mit neutralisierenden Antikörpern und erfolgt mittels serologischer Untersuchungsverfahren. Anhand dieser Einteilungskriterien umfasst die Gruppe der Viren, die Infektionen des Respirationstrakts auslösen, Pathogene aus der Familie der Orthomyxoviren, der Paramyxoviren - mit den beiden Unterfamilien Paramyxovirinae und Pneumovirinae - sowie die Coronaviren, Picornaviren, Adenoviren und Parvoviren. Diese Virusfamilien umfassen sowohl tier - als auch humanpathogene Vertreter. Die humanpathogenen Vertreter aus der Familie der Orthomyxoviren, d.h. Influenzavirus Subtyp A, B und C verfügen alle über das Potential, akute Infektionen des Respirationstrakts zu verursachen. Dies trifft ebenfalls zu auf die Familie der Coronaviren mit ihren Subtypen 229 E, OC 43, NL 63 und HKU-1, wohingegen andere Virusfamilien dadurch gekennzeichnet sind, daß einzelne ihrer Vertreter stärker mit Respirationstraktinfektionen assoziiert sind als andere. So sind aus der Gruppe der Paramyxoviren besonders die Parainfluenzaviren hervorzuheben mit den Subtypen 1 bis 4 sowie das Respiratory Syncytial Virus und das Humane Metapneumovirus mit ihren

jeweiligen Subtypen A und B. Bei den Virusfamilien der Picorna- und Adenoviren sind einzelne Serovare besonders stark assoziiert mit akuten Respirationstraktinfektionen (Tabelle 1).

Tabelle 1 : Humanmedizinisch relevante Respirationstraktviren

Virusfamilie	Unterfamilie	Für resp. Infekte relevante Subtypen bzw. Serovare
Picornaviren	<u>Humane Enteroviren</u>	A-D, - Serovare 68 und 69 (Enteroviren) 103 Serovare (Rhinoviren)
Coronaviren	<u>Coronaviren</u>	229 E OC 43 NL 63 HKU-1
Paramyxoviren	<u>Respirovirus:</u> Parainfluenzavirus	1, 3
	<u>Rubulavirus:</u> Parainfluenzavirus	2, 4
	<u>Pneumovirus:</u> Respiratory Syncytial Virus	A, B
	<u>Metapneumovirus:</u> Humanes Metapneumovirus	A, B
Orthomyxoviridae	<u>Influenzavirus</u>	A, B, C
Adenoviridae	<u>Adenovirus</u>	A-F, Serovare 1-51
Parvoviridae	<u>Humanes Bocavirus</u>	

1.1.1.2 Besonderheiten des Genoms

Mit Ausnahme der DNA-haltigen Adeno- und Parvoviren handelt es sich bei den Respirationstraktviren um Viren mit RNA-Genom. Das Genom liegt als Einzelstrang vor, einzig die Adenoviren verfügen über ein doppelsträngiges Genom (Tabelle 2). Eine Besonderheit der Orthomyxoviren ist das in acht Einzelsegmenten vorliegende RNA-Genom. Voraussetzung für die zelluläre ribosomale Translation des viralen RNA-Genoms ist die Anordnung der viralen Basentriplets in 5'→3'-Richtung („Leserichtung“). Sind bei einem einzelsträngigen RNA-Genom die Basentriplets bereits in Leserichtung angeordnet so wird dies als eine positivsträngige RNA bezeichnet, z.B. bei den Picornaviren und Coronaviren. Bei einem viralen Genom, dessen Basentriplets in 3'→5'-Richtung angeordnet sind, handelt es sich um ein negativsträngiges RNA-Virus (Paramyxo- und Orthomyxoviren), aus dessen RNA enzymatisch mit Hilfe der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase eine komplementäre RNA im Sinne einer messenger-RNA synthetisiert werden muß, um die Translation mittels zellulärer Ribosomen zu ermöglichen.

Tabelle 2 : Genomaufbau der Respirationstraktviren

Virusfamilie	Für resp. Infekte relevante Subtypen bzw. Serovare	Genom
Picornaviridae	Enteroviren, Rhinoviren	RNA, Einzelstrang, positivsträngig
Coronaviridae	Coronavirus 229E, OC43, NL63, HKU-1	RNA, Einzelstrang, positivsträngig
Paramyxoviridae	Parainfluenzaviren, RSV, HMPV	RNA, Einzelstrang, negativsträngig
Orthomyxoviridae	Influenzavirus A, B und C	RNA, segmentiertes Genom, negativsträngig
Adenoviridae	humane Adenoviren A-F	DNA, Doppelstrang
Parvoviridae	Humanes Bocavirus	DNA, Einzelstrang

1.1.1.3 Virusproteine

Proteine sind entscheidend für die Morphologie und Funktionalität von Viren. Im folgenden werden verschiedene virale Proteinstrukturen der Respirationstraktviren exemplarisch beschrieben.

1.1.1.3.1 Strukturproteine

Als Strukturproteine werden die viralen Proteine bezeichnet, welche im Virion vorkommen. Diese Proteine bilden das Gerüst des Virions, sie sind mit der viralen Nukleinsäure assoziiert oder finden sich als sog. Glykoproteine in der Hüllmembran des Virus (Kap.1.1.1.3.1.2).

1.1.1.3.1.1 Das virale Capsid

Die virale Nukleinsäure wird von einer als Capsid bezeichneten komplexen regelmäßigen Proteinstruktur umhüllt, welche die Form eines Ikosaeders (Picorna-, Adeno- und Parvoviren) oder einer Helix (Paramyxo-, Orthomyxo- und Coronaviren) ausbildet. Bei den Respirationstraktviren, die keine Hülle besitzen (Picornaviren, Adenoviren und Parvoviren) stellt das Kapsid die äußerste Struktur des Virus dar und spielt eine wesentliche Rolle bei der Anheftung und Aufnahme des Virus in die Wirtszelle. So setzt sich das Capsid der Enteroviren aus insgesamt 60 regelmäßig angeordneten Proteinstrukturen zusammen, welche wiederum aufgebaut sind aus vier unterschiedlichen Proteinen VP 1, 2, 3 sowie dem innenliegenden VP 4, welches mit der viralen Nukleinsäure assoziiert ist (Kap. 1.1.1.3.1.2). Grabenartige Vertiefungen auf der Oberfläche des Capsids werden als „canyons“ bezeichnet, die jeweils durch eine Fettsäure okkupiert sind („pocket factor“). Die canyon-Struktur ist für die Anheftung des Virus

an den zellulären Rezeptor verantwortlich (s. 1.1.2.1)

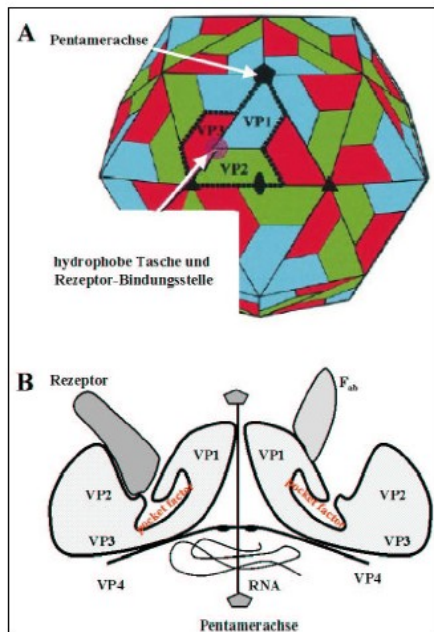


Abb. 1 : Die Capsidstruktur der Picornaviren, VP1-VP4 bezeichnet die viralen Proteine 1 bis 4, Quelle : www.g-f-v.org

1.1.1.3.1.2 Glykoproteine

Im Falle der Orthomyxo-, Paramyxo- und Coronaviren ist das Capsid von einer Hülle umgeben. Letzere setzt sich zusammen aus Bestandteilen der Wirtszellmembran, welche im Rahmen der Virusreplikation d.h. bei Verlassen der Wirtszelle („budding“) von dieser „erworben“ wurden. Auf der Oberfläche der Virushülle ragen elektronenmikroskopisch sichtbare Proteinstrukturen, sog. „spikes“ heraus. Diese sind viruscodiert und liegen in glykosylierter Form vor, weswegen sie als Glykoproteine bezeichnet werden. So verfügen Influenzaviren vom Subtyp A und B über jeweils zwei Glykoproteine: das Hämagglutinin und die Neuraminidase (Abb. 2). Beide Glykoproteine kommen in verschiedenen Varianten vor. Es existieren in der Gruppe der Influenza-A-Viren vom Hämagglutinin insgesamt 15 Varianten (HA 1 bis 15) und von der Neuraminidase insgesamt 9 (NA 1 bis 9). Die Varianten dieser Glykoproteine unterscheiden sich sowohl in ihrer Aminosäuresequenz als auch in ihrer Erkennbarkeit durch Antikörper (Antigenität) sowie im Falle der Hämagglutinine in ihrer Spaltbarkeit durch zelluläre Proteasen.

Die Kombination der beiden Glykoproteine auf der Virushülle bestimmt die antigenen Eigenschaften des jeweiligen Subtyps. Humanmedizinisch relevante Influenzavirus-A-Subtypen setzen sich in den letzten 30 Jahren zusammen aus den Kombinationen H1N1 sowie H3N2. Bei den Paramyxoviren finden sich vergleichbar zu den Influenzaviren die Glykoproteine HN (Parainfluenzaviren), bzw. F und G (RSV, HMPV) sowie SH (RSV, HMPV), wobei die Funktion des letzteren noch weitgehend unbekannt ist (Abb. 3).

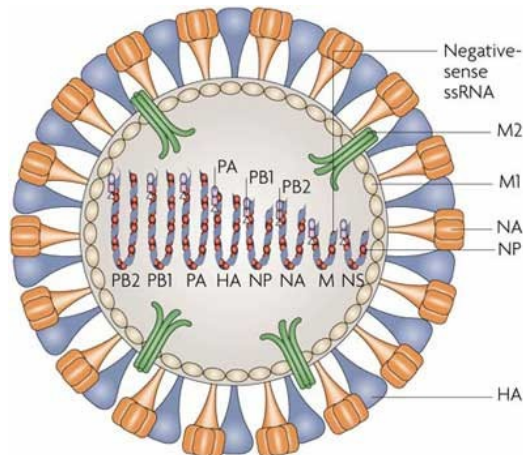


Abb. 2 : Aufbau des Influenzavirus, Quelle : www.nature.com , HA= Hämagglutinin, NA= Neuraminidase, NP= Nucleoprotein, M1/M2= Matrixprotein

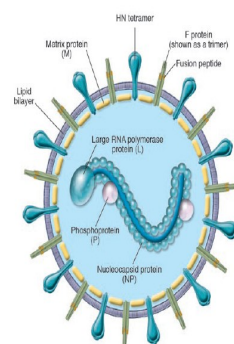


Figure 1
A schematic diagram of the paramyxovirus. L, large RNA polymerase protein; M, matrix protein; NP, nucleocapsid protein; P, phosphoprotein. Modified with permission from *New England Journal of Medicine* (91).

Abb. 3 : Aufbau der Paramyxoviren, Quelle: ⁴⁴, HN= Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein, F= Fusionsprotein

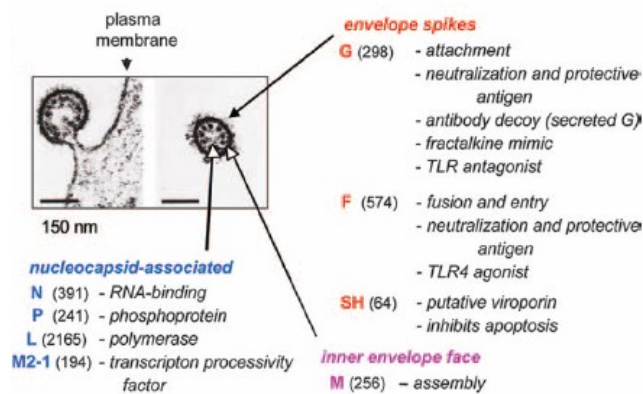


Abb. 4 Funktion der RSV-Glykoproteine, adaptiert aus ¹¹

1.1.1.3.2 Nichtstrukturproteine

Als Nichtstrukturproteine werden die viralen Proteine bezeichnet, die im Rahmen der Virusreplikation exprimiert werden, jedoch nicht im neu gebildeten Viruspartikel (Virion) vorhanden sind. Während bei einigen Familien von Respirationstraktviren die Funktion der Nichtstrukturproteine noch unklar ist (z.B. Coronaviren), ist beispielsweise im Falle von RSV bereits einiges im Hinblick auf die Funktionalität dieser bekannt ³⁴. So verfügt RSV über zwei Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 (Abb. 5), welche in der Lage sind, die Synthese der zur Virusabwehr essentiellen α/β Interferone zu inhibieren. Entscheidend ist hierbei die NS1- und NS2- bedingte Blockade der intrazellulären Signalkaskade, welche die verstärkte Expression von Interferongen und in der Folge die Entfaltung einer interferonassoziierten antiviralen Wirkung induziert ⁵⁷.

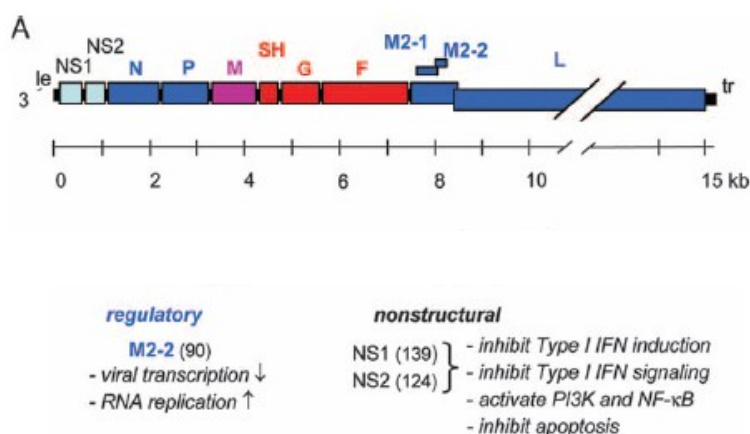


Abb. 5 : Genomaufbau des Respiratory Syncytial Virus, Funktion der Nichtstrukturproteine NS1 und NS 2, adaptiert aus ¹¹

1.1.2 Die Infektion der Zielzellen durch Respirationstraktviren

1.1.2.1 Anheftung des Virus an die Wirtszelle

Voraussetzung für die Aufnahme eines Virus in die Wirtszelle ist die Interaktion von viralen Oberflächenstrukturen mit Komponenten der Zellmembran. Bei letzteren handelt es sich um Protein-, seltener um Kohlenhydrat- oder gar Lipidstrukturen, welche aufgrund ihrer Schlüsselfunktion bei der zellulären Aufnahme von Botenstoffen wie Hormonen oder Neurotransmittern als Rezeptoren bezeichnet werden. Die Interaktion von viralen Strukturen mit zellulären Rezeptoren ist spezifisch, was wiederum (in manchen Fällen) die gezielte therapeutische Beeinflussung dieser Virus-Rezeptor-Interaktion ermöglicht. So konkurriert der Wirkstoff Pleconaril mit dem in den canyons des viralen Enterocapsids vorliegenden pocket factor (Kap.1.1.1.3.1.1) und verdrängt diesen. Dies führt zu einer Konformationsänderung des viralen Capsids, so daß in der Folge die Adsorption des Virus an die Wirtszelle unmöglich wird⁵³. Desweiteren können neutralisierende Antikörper durch Abblocken der für die Adsorption essentiellen viralen Oberflächenstrukturen die Aufnahme des Virus in die Zelle und somit die Infektion dieser verhindern. Ein solcher Therapieansatz wird für die Prophylaxe von RSV-gefährdeten Kindern eingesetzt. Frühgeborene oder Kinder unter 2 Jahren mit einer bronchopulmonalen Dysplasie bzw. mit angeborenem Herzfehler können vor einer Infektion mit RSV und den dadurch drohenden schweren Erkrankungen der unteren Atemwege geschützt werden durch die Verabreichung eines gegen das Glykoprotein-F-gerichteten monoklonalen Antikörpers: Palivazumab. In Tabelle 3 ist eine Auswahl von viralen und zellulären Komponenten, welche an der Adsorption des Virus an die Zielzellrezeptoren beteiligt sind aufgeführt.

Tabelle 3 : Adsorption von Viren an zelluläre Rezeptoren, Auswahl beteiligter Strukturen

Virus/ Subtyp	Beteiligte virale Struktur	Zellulärer Rezeptor/Funktion
Picornaviren/Rhinoviren	Canyonstruktur	<u>ICAM-1</u> (Intracellular-Adhesion-Molecule) Adhäsionsmolekül, Bindung von Zellen an andere Zellen oder Moleküle. Bsp : Bindung von Leukozyten an beschädigte Strukturen im Rahmen der Immunabwehr
Parainfluenzaviren 1 bis 4	HN	kein eigenständiger Rezeptor; <u>N-Acetylneuraminsäure</u> , Bestandteil von zellulären Membranstrukturen (Glykoproteine und Glykolipide)
RSV und HMPV	Glykoprotein G	kein eigenständiger Rezeptor, sondern Bestandteil der Extrazellulärmatrix, <u>Glykosaminoglykan</u> (nichtverzweigte Polysaccharidketten), kurz : Gag
Influenzaviren A und B	Hämagglutinin HA	s. Parainfluenzaviren
Adenoviren	Fiberprotein	<u>CAR</u> (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor), Funktion unbekannt

1.1.2.2 Aufnahme des Virus in die Wirtszelle

Die Aufnahme von Viren in die Wirtszelle erfolgt nach Bindung des Virus an den zellulären Rezeptor bei unbehüllten Viren über die rezeptorvermittelte Endocytose und bei behüllten Viren über die Verschmelzung von Virusmembran mit der Wirtszellmembran.

1.1.2.2.1 Aufnahme von unbehüllten Viren in die Wirtszelle

Da es sich sowohl bei Picorna- als auch bei Adenoviren um nackte, also unbehüllte Viren handelt, werden diese nach Bindung an den zellulären Rezeptor über den Vorgang der Endocytose in die Wirtszelle eingeschleust (Abb. 6). Die Freisetzung des viralen Genoms und somit der Beginn der Virusreplikation erfolgt bei den Picornaviren im Zytoplasma. Adenoviren hingegen schleusen ihr Genom in den Zellkern ein über den Kern-Poren-Komplex, einen zellulären Ionenkanal (nicht dargestellt).

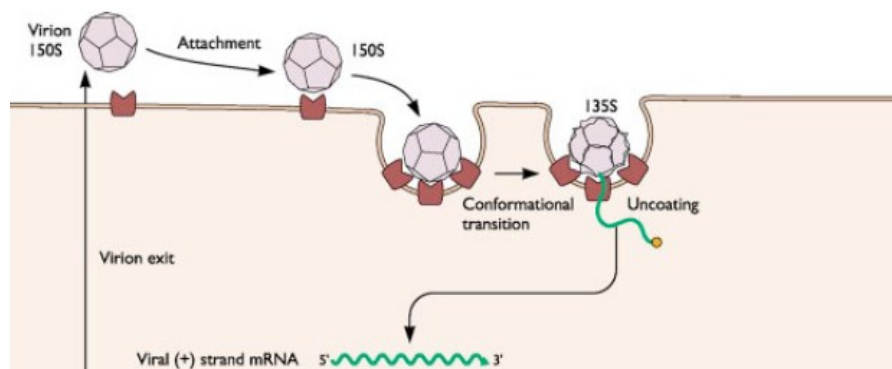


Abb. 6 : Viruseintritt der Picornaviren in die Wirtszelle über rezeptorvermittelte Endocytose, die Anbindung des Virus erfolgt an zelluläre Rezeptoren in der Wirtszellmembran (braun), Quelle : Flint et al, Principles of Virology, 2nd Edition 2005

1.1.2.2.2 Aufnahme von behüllten Viren in die Wirtszelle

Bei umhüllten Viren erfolgt zunächst die Verschmelzung der Virusmembran mit der zellulären Membran („Fusion“). Die Fusion wird durch virale Glykoproteine vermittelt: bei den Paramyxoviren handelt es sich um das F-Protein (RSV, HMPV), bei den Orthomyxoviren verfügt das Hämagglutinin über eine Fusionsaktivität. Die Fusion erfolgt bei den Paramyxoviren an der Zellmembran, bei den Orthomyxoviren wird das Virus zunächst über rezeptorvermittelte Endocytose internalisiert (Abb. 7 und Abb. 8). Die Aktivierung der Fusionsdomäne des Hämagglutinins wird über einen pH-Wertabfall im Endosom initiiert. Die pH-Wertänderung wird herbeigeführt über das virale M2-Protein, welches als Ionenkanal fungiert. Nach Verschmelzung von Virus- und Endosomenmembran wird das Genom der Orthomyxoviren ins Zytoplasma ausgeschleust, von wo aus die Replikation beginnt. Der Wirkstoff Amantadin ist ein

Inhibitor dieses M2-Ionenkanals und verhindert auf diese Weise die Ausschleusung des viralen Genoms ins Zytoplasma („uncoating Hemmer“).

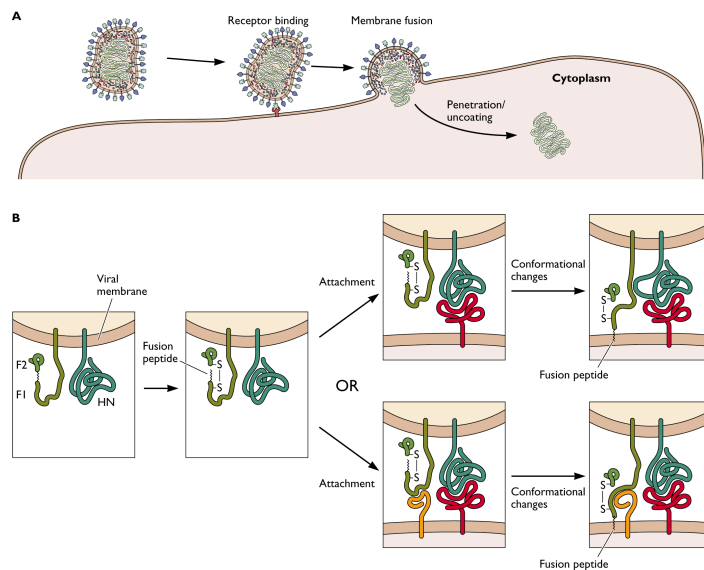


Abb. 7 : Viruseintritt der Paramyxoviren: die Verschmelzung von Virus- und Zellmembran findet an der äußeren Zellmembran statt, Quelle : Flint et al :Principles of Virology, die 2nd Edition 2005

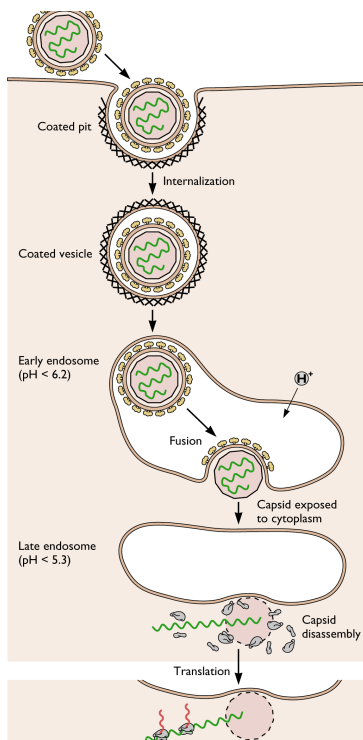


Abb. 8 : Viruseintritt der Orthomyxoviren: die Verschmelzung von Virus- und Zellmembran findet erst im Zytoplasma, in den frühen Endosomen statt, Quelle : Flint et al ,Principles of Virology, 2nd Edition 2005

1.2 Grundlagen der Pathogenese von viralen Respirationstraktinfektionen

Das Ausmaß der klinischen Manifestation einer akuten viralen Respirationstraktinfektion wird maßgeblich von zwei Faktoren bestimmt ¹¹: 1) die direkte Schädigung infizierter Zellen im Rahmen der Virusreplikation sowie 2) die Art und das Ausmaß der pulmonalen Immunantwort. Die virale Replikation in den Epithelzellen des Respirationstrakts kann zur Schädigung der Kinozilien (1.2.1.1) mit entsprechendem Funktionsverlust und sogar zur Destruktion der infizierten Zellen führen. Abgestorbene Epithelzellen werden ins Lumen der Atemwege abgestoßen und können zu deren Verlegung führen ⁷. Die Art und das Ausmaß der pulmonalen Immunantwort spielen insofern eine maßgebliche Rolle hinsichtlich der Pathogenese von schweren Infektionen des Respirationstrakts, als daß virusinfizierte Zellen zahlreiche Zytokine ausschütten, welche die Viruselimination über die Aktivierung von Komponenten des unspezifischen und spezifischen Immunsystems induzieren ⁸. Im Rahmen dieses Geschehens kommt es zur Schädigung des betroffenen Gewebes. Günstig im Hinblick auf den Verlauf einer akuten Infektion mit Respirationstraktviren ist demnach die rasche Viruselimination mit einer möglichst geringen Gewebeschädigung ⁸. Bei Patienten mit einer bestehenden genetischen Prädisposition im Sinne einer Atopie, d.h. erhöhter Bereitschaft zur Überempfindlichkeitsreaktion im Sinne einer allergischen Reaktion vom Soforttyp (Typ I) und einer daraus resultierenden chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankung, wie z.B. Asthma bronchiale, kann eine akute Infektion mit Respirationstraktviren zur Exacerbation dieser Grunderkrankung führen durch eine pathologisch gesteigerte Immunantwort im Rahmen der Virusabwehr ²¹. Im folgenden werden zunächst Mechanismen der pulmonalen Immunantwort bei viralen Infektionen beschrieben. Anschließend wird auf die Bedeutung sowohl von viralen als auch von immunologischen Faktoren in der Pathogenese einer schwer verlaufenden viralen Respirationstraktinfektion anhand der RSV-Bronchiolitis eingegangen.

1.2.1 Die pulmonale Immunantwort

1.2.1.1 Physikalisch-chemische Mechanismen der Pathogenabwehr

Ein wesentlicher Bestandteil der Pathogenabwehr des oberen Respirationstrakts (Abschnitte von der Nase bis zum Kehlkopf) wird durch sog. physikochemische Barrieren gewährleistet: so herrscht in diesen luftleitenden Abschnitten des Respirationstrakts eine turbulente Luftströmung, welche dazu führt, daß eingeatmete, größere Partikel in Kontakt kommen mit der Schleimhautmukosa, von wo aus sie mit Hilfe der gerichteten Kontraktion der auf den Epithelzellen vorliegenden Flimmerhärchen (Kinocilien) in Richtung des Mund-und

Rachenraums transportiert werden. Die Haftung von Partikeln an die Schleimhautmukosa wird über deren Anfeuchtung und einer dadurch bedingten Vergrößerung der Partikeloberfläche verstärkt. Die Kontraktionen der Kinocilien in Verbindung mit dem Hustenreflex bewirken eine effiziente Elimination einer Vielzahl von Partikeln: 90% der in der Mukosa abgelagerten Materialien werden auf diesem Wege in weniger als einer Stunde aus der Lunge heraustransportiert ³⁶. In den oberen Atemwegen herrscht eine im Vergleich zu anderen Körperbereichen niedrige Temperatur, welche die Replikation von Respirationstraktviren beeinträchtigt ²⁹. Desweiteren tragen spezialisierte Zellen zur Pathogenabwehr bei: Becherzellen durch ihre Schleimproduktion sowie die in den unteren Atemwegen vorliegenden Typ-II-Alveolarepithelzellen. Letztere produzieren surfactant, ein Protein aus der Familie der Collectine, welches direkt an virale Oberflächenstrukturen bindet und die Rekrutierung immunkompetenter Zellen ebenso wie die Opsonisierung der Pathogene triggert. In den unteren Atemwegen sind physikochemische Mechanismen der Pathogenabwehr weniger entscheidend als im oberen Respirationstrakt. Hier spielen immunkompetente Zellen eine bedeutende Rolle (s.u.). Im Folgenden wird auf wesentliche Komponenten der unspezifischen sowie der spezifischen Immunantwort speziell gegen Respirationstraktviren eingegangen.

1.2.1.2 Unspezifische Immunantwort

Eine wesentliche Zellpopulation für die Immunabwehr in den terminalen Abschnitten der Atemwege (Bronchioli terminales, Alveolen) ist die der Makrophagen. In der Lunge existieren vier verschiedene Klassen von Makrophagen ³⁵, die abhängig von ihrer Lokalisation sowie ihrer Funktion eingeteilt werden in 1) Alveolarmakrophagen, 2) Intravaskuläre Makrophagen (luminale Seite der Lungengefäße) 3) Interstitielle Makrophagen sowie 4) Dendritische Zellen. Die am besten untersuchte pulmonale Makrophagenklasse ist die der Alveolarmakrophagen. Diese befinden sich auf der luminalen Oberfläche der Alveolen und stellen die erste Barriere gegen inhalierte und in diesen Lungenbereich gelangte Partikel dar („first line defence“). Alveolarmakrophagen sind in der Lage, Pathogene zu phagozytieren und diese über die Produktion von O₂-Metaboliten (O₂-Radikale, H₂O₂ u.a.) unschädlich zu machen. Alveolarmakrophagen verfügen über Rezeptoren (CD16, CD32, CD64) die die Bindung des Fc-Fragments von verschiedenen Antikörperklassen (IgG, IgA und IgE) ermöglichen. Auf diese Weise werden der „Kontakt“ zum an den Antikörper gebundenen Antigen und die Phagozytose des Antigen-Antikörperkomplexes ermöglicht. Eine Fc-unabhängige Phagozytose durch Alveolarmakrophagen ist ebenfalls möglich. Desweiteren produzieren Alveolarmakrophagen Cytokine, welche bedeutsam sind für die Elimination von bakteriellen und viralen Pathogenen:

IL-1, IL-6, TNF, TGF- β . Alveolarmakrophagen können von Respirationstraktviren infiziert werden, was ihre Fähigkeit zur Keimelimination einschränkt: die Vernichtung von Bakterien oder Pilzen ist weniger effizient. Dies könnte eine Ursache sein für die erhöhte Vulnerabilität von Patienten mit akuter Respirationstraktinfektion gegenüber bakteriellen Superinfektionen³⁵. Neben ihrer Funktion als phagozytierende und cytokinproduzierende Zellen spielen Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation und somit bei der Initiation der spezifischen (adaptiven) Immunantwort. Dies wird gewährleistet durch die im Lungengewebe vorhandenen interstitiellen Makrophagen v.a. aber durch die dendritischen Zellen, welche im Epithel der luftleitenden Atemwege, der Alveolarsepten sowie in der viszerale Pleura und in den Pulmonalgefäßen zu finden sind. Über Zellfortsätze, welche bis ins Lumen der Atemwege hineinreichen, sind dendritische Zellen in der Lage, Schleimhautoberflächen zu monitorieren und Antigene aufzunehmen. Nach Antigenaufnahme wandern die dendritischen Zellen in lymphatisches Gewebe (BALT, bronchus-associated-lymphatic tissue), wo sie über die Antigenpräsentation an T-Zellen die adaptive Immunantwort einleiten. Zusammengefasst verfügen pulmonale Makrophagen über die Fähigkeit zur Phagozytose und Unschädlichmachung von eingedrungenen Pathogenen, zur Anlockung weiterer phagozytierender Zellen (neutrophile Granulozyten) sowie über die Fähigkeit zur Initiation der adaptiven Immunantwort über Antigenpräsentation. Während Alveolarmakrophagen und intravaskuläre Makrophagen v.a. zur Phagozytose befähigt sind, verfügen die interstitiellen Makrophagen und die dendritischen Zellen v.a. über die Fähigkeit zur Antigenpräsentation.

1.2.1.3 Die adaptive pulmonale Immunantwort

1.2.1.3.1 T-Zellen und ihre Rolle bei pulmonalen Virusinfektionen

T-Zellen, die im Rahmen der spezifischen Immunantwort über die Ausschüttung spezieller Zytokine die Lyse von virusinfizierten Zielzellen induzieren, werden als cytotoxische T-Zellen (Oberflächenantigen CD8) bezeichnet. Ihre Effektorfunktion besteht im wesentlichen in der Termination einer Virusinfektion („viral clearance“)⁵⁵. CD4-positive T-Zellen werden als T-Helferzellen (Th-Zellen) bezeichnet, da sie die Induktion der spezifischen Immunantwort verstärken u.a. indem sie B-Zellen und somit die Antikörpersynthese stimulieren. T-Helferzellen werden in zwei Subpopulationen unterteilt anhand der von ihnen sezernierten Cytokine sowie ihrer Effektorfunktionen (Abb. 9)⁵⁵. Th-1-Zellen sezernieren u.a. Interferon γ und TNF- α . Die Effektorfunktionen von Th-1-Zellen sind zum einen die Stimulation von B-Zellen zur Produktion von IgG-2 sowie die Aktivierung cytotoxischer T-Zellen und die Anlockung von Makrophagen

und Monozyten. Th-2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5 und IL-10 und bewirken über die entsprechende Stimulation der B-Zellen die Synthese von IgG-1, IgE und IgA. IgE bindet sich an Mastzellen und führt zur Degranulation dieser mit der Ausschüttung von Histamin und Leukotrien, was wiederum über die Aktivierung neuraler, vaskulärer und glattmuskulärer Funktionen u.a. zu Rhinorrhoe, Husten sowie Bronchoobstruktion führen kann. Desweiteren wird Th-2- vermittelt die Rekrutierung von basophilen und eosinophilen Granulozyten in die Lunge verstärkt. Eosinophile sezernieren cytotoxische Proteine sowie antivirale Substanzen (RNase). Die Art der Immunantwort, d.h. eher Th-1 oder Th-2- gewichtet ist, abhängig von einer Vielzahl von Faktoren (Pathogen, Art des Antigens sowie genetische Prädisposition im Sinne einer Atopie). Der zeitliche Ablauf der pulmonalen Immunantwort ist am Beispiel einer akuten Rhinovirusinfektion schematisch in Abb. 10 dargestellt.

1.2.1.3.2 B-Zellen und ihre Rolle bei pulmonalen Virusinfektionen

Spezifische Antikörper zur Abwehr einer pulmonalen Virusinfektion spielen eine Rolle bei der Virusneutralisation, d.h. bei der Inhibition des Viruseintritts in die Zelle durch Abblocken entsprechend funktioneller Antigenstrukturen sowie beim Schutz vor Reinfektion ²⁹. In der Lunge sind sowohl Antikörper vom IgA-Typ vorhanden als auch aus dem Serum stammendes IgG. Für den Schutz des oberen Respirationstrakts sind hierbei die IgA-Antikörper bedeutsam, da die IgG-Konzentration in diesem Abschnitt der Atemwege sehr viel niedriger ist als in den distalen Lungenabschnitten ¹¹. Spezifische IgA-Antikörper sind bereits in der Frühphase der Virusinfektion nachweisbar (Abb. 10), jedoch werden sie im Vergleich zu IgG-Antikörpern rascher eliminiert. Der IgG-Konzentrationsgradient vom oberen zum unteren Respirationstrakt sowie das zahlenmäßige Überwiegen der kurzlebigen IgA-Antikörper ist eine mögliche Ursache der besonderen Vulnerabilität des oberen Respirationstrakts für akute virale Infektionen ¹¹.

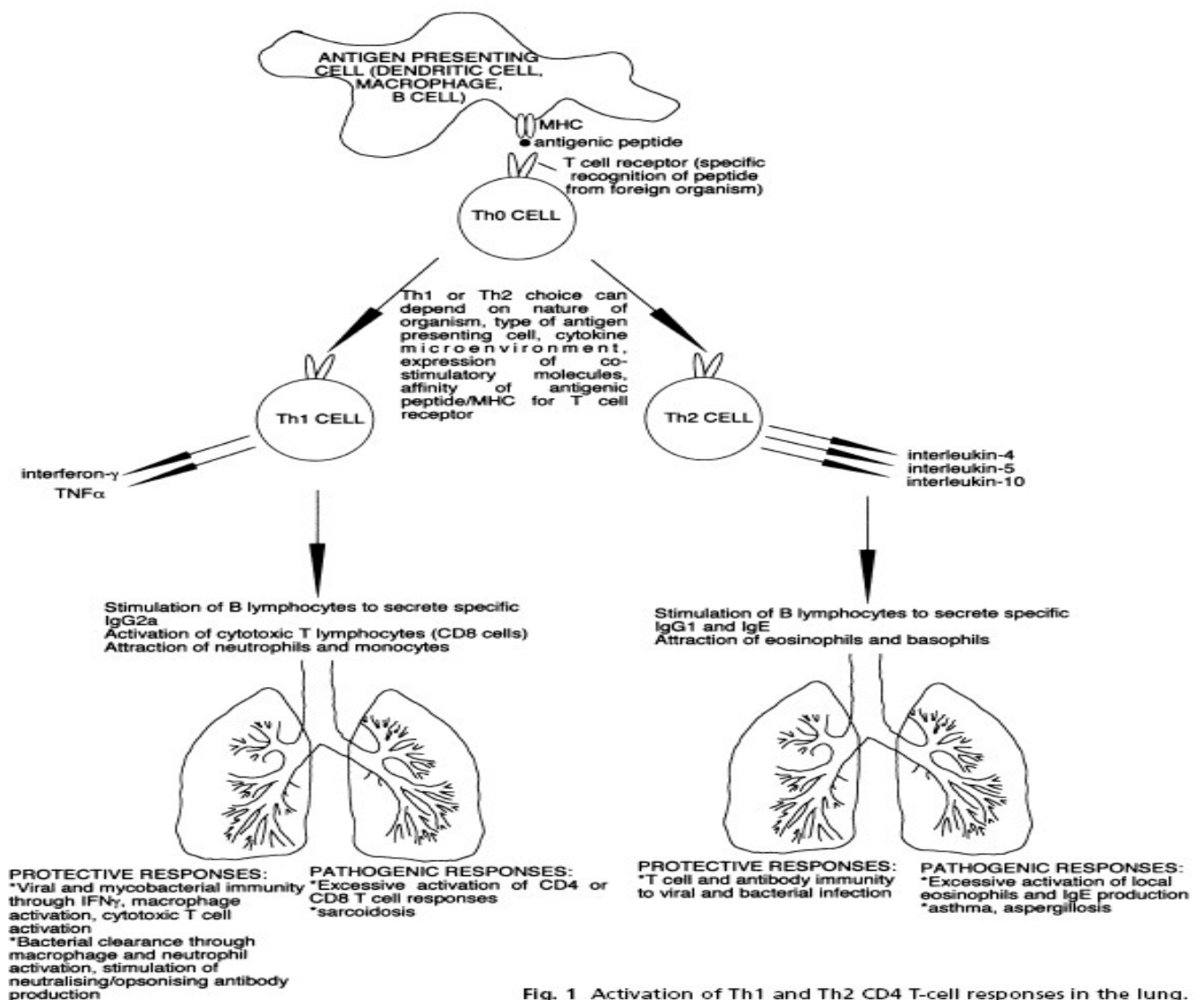


Fig. 1 Activation of Th1 and Th2 CD4 T-cell responses in the lung.

Abb. 9 : Übersicht über die Th-1- und Th-2-Immunantworten der Lunge, Quelle: ⁸

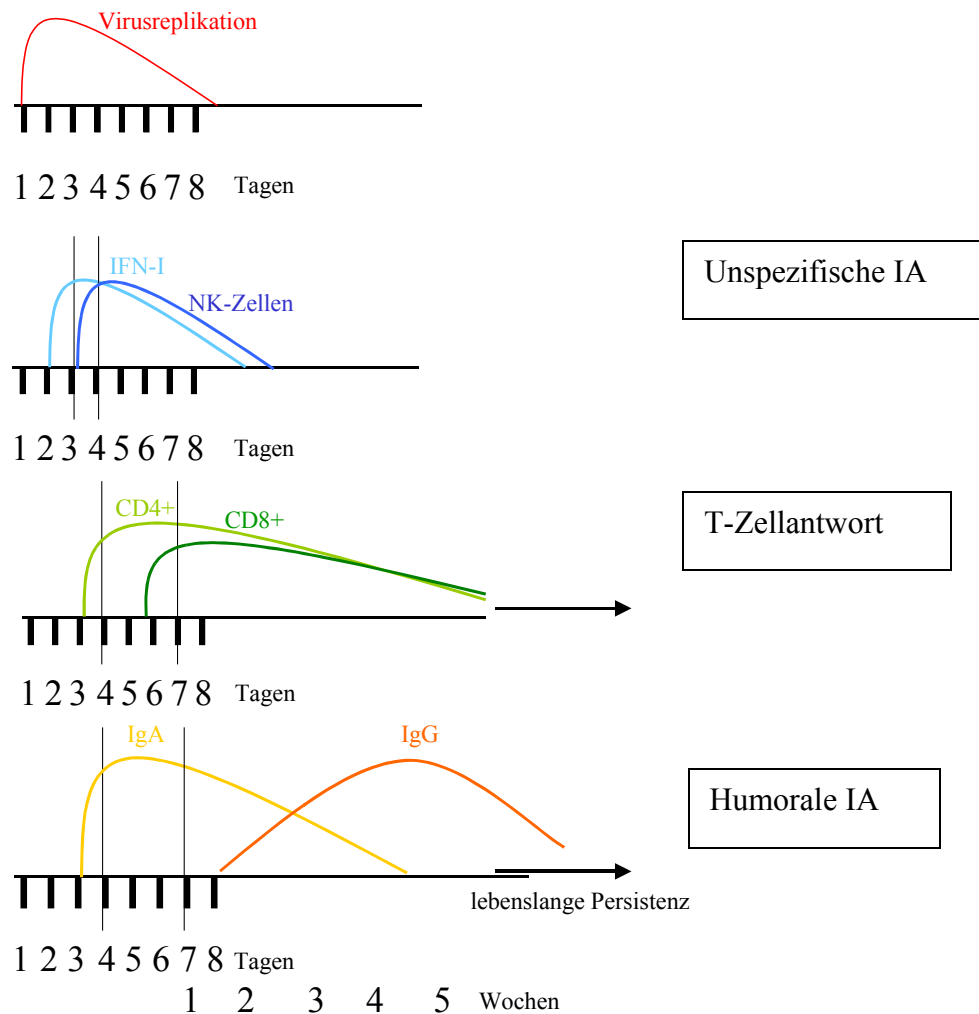


Abb. 10 : Überblick über den zeitlichen Ablauf der pulmonalen Immunantwort (IA) bei Primärinfektion mit Rhinoviren, adaptiert nach : ⁴⁰

1.2.2 Immunologische und virale Faktoren der schwer verlaufenden RSV-Infektion

Die Beobachtung, daß in Kindern mit RSV-Bronchiolitis das Maximum der klinischen Symptomatik zeitlich zusammentrifft mit der Ausbildung der spezifischen B- und T-Zellantworten und nicht mit dem Gipfel der Virusreplikation in Verbindung mit der Tatsache, daß RSV keine ausgeprägte Zerstörung verursacht, bestärkt die Hypothese einer pathologischen Immunantwort gegen das Virus als wesentlichen Faktor der schweren RSV-Erkrankung ⁴⁶. In der Regel induzieren Virusinfektionen eine Th1-vermittelte Immunantwort mit einer Termination der Virusreplikation und einem raschen Abklingen der Erkrankung. Im Gegensatz hierzu zeigen Kinder mit einem schweren Verlauf einer RSV-Infektion eine eher Th2-geleitete Immunantwort ³¹. Eine Ursache hierfür könnte darin begründet sein, daß RSV besonders bei jungen Kindern (< 6 Monate) zu Respirationstraktinfektionen führt mit einem

Gipfel der Hospitalisierungsrate bei 2 (!) Monate alten Kindern ¹¹. Kinder dieser Altersgruppe reagieren aufgrund der Unreife ihres Immunsystems physiologischer Weise mit einer Th-2-gewichteten Immunantwort, zumal dies während der Embryonalentwicklung protektiv wirkt und den Embryo vor einer Th-1-assoziierten Abstoßung schützt ¹. Der Zeitpunkt der RSV-Infektion könnte bedeutsam sein für den Schweregrad einer Reinfektion. Im Mausmodell ist gezeigt worden, daß neugeborene, mit RSV-infizierte Mäuse bei Reinfektion im adulten Alter einen schweren Krankheitsverlauf aufweisen mit vermehrter Neutrophilenrekrutierung in die Lunge sowie excessiver IL-4 Produktion ¹². Der frühe Zeitpunkt der RSV-Infektion führt demnach möglicherweise zu einer Prägung des Immunsystems („imprinting“) in Richtung Th-2-Antwort und mündet in einer entsprechend ungünstigen (Th2-gewichteten) Immunantwort bei Reinfektion. Die Pathogenese von schwer verlaufenden RSV-Infektionen ist jedoch nicht ausschließlich über eine pathologische Immunantwort und deren Folgen zu erklären. Das Virus verfügt über Strategien zur Immunevasion. Neben dem Interferonantagonismus der Nichtstrukturproteine NS 1 und NS 2 (Kap. 1.1.1.3.2) ist das Glykoprotein G in der Lage, Mechanismen der Wirtsantwort zu unterlaufen. Das Glykoprotein G ist ein Glykoprotein der Virushülle, wird aber darüberhinaus als verkürztes Protein ohne Transmembrandomäne auch in löslicher, virusungebundener Form von der Wirtszelle sezerniert. Es ist sehr stark glykosyliert und verfügt über eine große antigene Variabilität, was die effiziente Bindung von neutralisierenden Antikörpern erschwert ⁴¹. Die während der Frühphase der Infektion im Überfluß sezernierten löslichen G-Proteine dienen möglicherweise als sog. immunologische Attrape, da sie Antikörper binden und somit die Neutralisation des RSV-Virions verhindern ¹¹. Die Produktion einer Reihe von Cytokinen, welche über die Aktivierung der sog. Toll-Like-Rezeptoren induziert wird, kann über einen noch ungeklärten Mechanismus durch das Glykoprotein G des RSV inhibiert werden ⁴⁹. Zusammenfassend verfügt das G-Protein sowohl über ein immunevasives als auch immuninhibierendes Potential.

1.3 Neu entdeckte virale Erreger von Respirationstraktinfektionen

1.3.1 Die Coronavirussubtypen NL 63 und HKU- 1

Das Spektrum der bislang bekannten Coronaviren Subtyp 229 E und OC 43 wurde durch zwei weitere Subtypen NL 63 (Niederlande, 2004) ⁶¹ und HKU-1 (Hong Kong 2005) ⁶⁴ erweitert. Auf das im Jahre 2003 identifizierte SARS-Virus wird mangels Relevanz für die Thematik dieser Dissertation nicht weiter eingegangen. Im Jahr 2004 hat eine niederländische Arbeitsgruppe um van der Hoek einen neuen Subtyp eines Coronavirus, welches als Coronavirus NL 63 (CoV NL

63) bezeichnet wurde, von einem 7-monatigen Kind mit Bronchiolitis isoliert. Coronavirus NL 63 kommt weltweit vor und ist in der Regel mit mildverlaufenden Infektionen des oberen Respirationstrakts assoziiert. Schwer verlaufende Formen mit Pneumonie sind jedoch ebenfalls beschrieben worden. Zwischen 1-10 % aller Respirationstraktinfektionen können durch CoV NL 63 bedingt sein²³. Darüberhinaus sind Fälle von CoV NL 63 assoziiertem Krupp beschrieben²³. Im Jahr 2005 wurde ein weiteres Coronavirus, das CoV HKU-1 in Hong Kong entdeckt. Erstmals nachgewiesen wurde es im Untersuchungsmaterial eines 71 Jahre alten Patienten, der aufgrund eines chronischen respiratorischen Infekts in Verbindung mit Fieber, Husten und röntgenologisch sichtbaren Lungeninfiltraten hospitalisiert war. Verschiedene klinische Studien haben das Vorkommen dieses Virus in einem geringen Prozentsatz der Respirationstraktmaterialien von Patienten sämtlicher Altersgruppen gezeigt: im Rahmen einer amerikanischen Studie wurde in 9 (1%) von 851 Kinder unter 5 Jahren das Virus gefunden. Desweiteren wurde in einer Studie in Hong Kong CoV HKU-1 in 13 (0,3%) von 4181 Patienten mit akuter Respirationstraktinfektion detektiert. Die klinische Relevanz von CoV HKU-1 ist noch nicht abschließend geklärt und sein Nachweis bisher nicht in unser Untersuchungspanel aufgenommen.

1.3.2 Humanes Metapneumovirus

Das Humane Metapneumovirus wurde 2001 in den Niederlanden erstmalig beschrieben⁶⁰. Nach morphologischen, biochemischen und molekularen Analysen (Sequenzierung) wurde das Virus der Familie der Paramyxoviridae und hierin der Unterfamilie der Pneumovirinae zugeordnet. Es sind zwei Subtypen, das HMPV A und das HMPV B, mit den jeweiligen Genotypen A 1 und A 2 sowie B 1 und B 2 beschrieben. Das weltweite Vorkommen von HMPV wurde durch Studien belegt, in welchen die durchschnittliche Inzidenz von HMPV Infektionen zwischen 1,5% und 25% rangierte⁵¹. Die HMPV Erstinfektion erfolgt in der Regel im Kleinkindesalter, so daß annähernd alle Kinder bis zum fünften Lebensjahr seropositiv sind für HMPV. Die Entdeckung von HMPV wurde erst im Rahmen der Entwicklung von molekularen Nachweismethoden wie z.B. der PCR möglich, da dieses Virus sehr schwer anzüchtbar ist und nur selten durch Auftreten eines cytopathischen Effekts imponiert. Retrospektive serologische Untersuchungen von Seren aus den 50 er Jahren des letzten Jahrhunderts zeigen jedoch, daß es sich bei HMPV nicht um ein neues Virus handelt, sondern dass dieses Virus mindestens bereits schon seit der Mitte des letzten Jahrhunderts in der Bevölkerung zirkuliert. Wie andere Respirationstraktviren zeigt auch das HMPV eine saisonale Verteilung und tritt hauptsächlich in den späten Wintermonaten bzw. am Anfang des Frühjahrs in Erscheinung. In aller Regel verlaufen HMPV Infektionen milde und

werden klinisch durch eine Rhinopharyngitis im Sinne eines Infektes des oberen Respirationstrakts manifest (Tabelle 4). Allerdings sind Beteiligungen des unteren Respirationstrakts mit Bronchiolitis bis hin zur lebensbedrohlichen Pneumonie des Neugeborenen beschrieben. Besonders vulnerabel hierfür sind kleine Kinder im Rahmen der HMPV Erstinfektion sowie Patienten mit schweren Grunderkrankungen wie Leukämie. Inwieweit HMPV als pathogenetischer Faktor bei der Entstehung eines Asthma bronchiale eingeordnet werden muß, ist noch nicht abschließend geklärt. Bislang existiert weder eine kausale Therapie noch eine spezifische Immunoprophylaxe gegen HMPV. An der Entwicklung einer HMPV Schutzimpfung wird gearbeitet.

Tabelle 4 : Klinisches Bild und Verlauf akuter Respirationstraktinfektionen bei Kindern in der Notaufnahme, Mailand, Italien, November 2002- März 2003, Virusnachweis über PCR, Quelle : ⁵¹

Klinisches Bild/Verlauf Anzahl n (%)	HMPV-positiv n=41	RSV-positiv n=117	Influenza-positiv n=209
“Common Cold”	3 (7,3)	20 (17,1)	43 (20,6)
Pharyngitis	11 (26,8)	20 (17,1)	73 (34,9)
Akute Otitis media	5 (12,2)	10 (8,5)	34 (16,3)
Krupp	3 (7,3)	4 (3,4)	7 (3,3)
Akute Bronchitis	4 (9,8)	15 (12,8)	20 (9,6)
Giemen und Brummen	10 (24,4)	30 (25,7)	14 (6,7)
Pneumonie	5 (12,2)	18 (15,4)	18 (8,6)
Hospitalisierung	2 (4,8)	16 (13,7)	11 (5,3)
Schulfehltag (range)	10 (3-15)	10 (3-12)	12 (5-15)

1.3.3 Humanes Bocavirus

Die schwedische Arbeitsgruppe um Allander et al. hat im Jahre 2005 erstmalig das humane Bocavirus (huBoV) beschrieben ³. Auf Grundlage von molekulargenetischen Analysen wurde das humane Bocavirus zur Familie der Parvoviridae zugeordnet. Mittlerweile ist mittels klinischer Studien die weltweite Distribution des Virus gesichert ²². Ob das Virus saisonal gehäuft oder doch eher ganzjährig auftritt, ist noch nicht abschließend geklärt. Die klinische Bedeutung des humanen Bocavirus wurde kontrovers diskutiert, was der Tatsache zugeschrieben werden kann, daß dieses Virus in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle in Form einer Koinfektion und seltener als Monoinfektion detektiert wurde. Unter Anbetracht der Tatsache, daß Parvoviren persistieren, stellt sich die Frage, ob das humane Bocavirus als persistierendes Virus in Untersuchungsproben nachgewiesen werden kann, jedoch nicht als ätiologische Ursache für eine akute Infektion des Respirationstrakts in Frage kommt („innocent bystander“). Hierfür sprechen die Ergebnisse einer thailändischen Studie, in der 4,5% der Patienten mit Pneumonie positiv waren für das humane Bocavirus, allerdings in der überwiegenden Mehrzahl (80%) in Kombination mit einem weiteren Virus. Insgesamt waren 1% der asymptomatischen

Kontrollpatienten positiv für huBoV ¹⁶. In einer anderen klinischen Studie hingegen, die pädiatrische Patienten mit akuter Respirationstraktinfektion untersuchte, waren 22 (5%) von 426 Untersuchungsmaterialien von Kleinkindern allein für huBoV positiv, so daß dies wiederum für eine Bedeutung von huBoV als Verursacher von Respirationstraktinfektionen zumindest bei Kindern unter 2 Jahren spricht ²⁷. Bei quantitativer Viruslastbestimmung von huBoV in Respirationstraktmaterialien zeigte sich bei Bocavirusmonoinfektion eine höhere Viruslast als bei Koinfektion mit einem weiteren Virus ². Für die weitere Beurteilung der klinischen Relevanz dieses neu entdeckten Virus sind prospektive klinische Studien mit quantitativer Bestimmung der huBoV Viruslast in den untersuchten Materialien notwendig. Neben dem Nachweis von Bocavirus in Respirationstraktmaterialien ist es darüberhinaus auch in Stuhlproben von Kindern mit akuter Gastroenteritis detektiert worden ³⁰. Da es es jedoch auch in Stuhlproben in der Regel mit anderen Pathogenen detektiert wurde, ist die Relevanz des Bocavirus als Erreger von akuten Gastroenteritiden noch nicht gesichert.

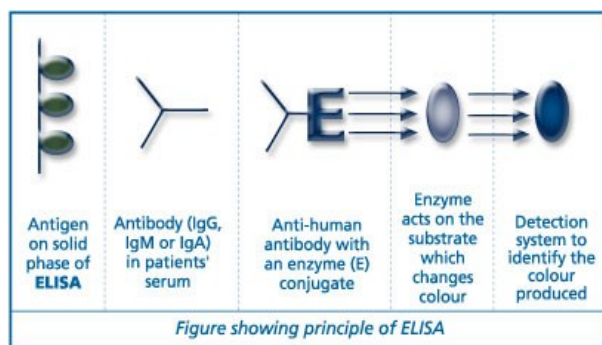
1.4 Methoden zum Nachweis von Respirationstraktviren

Im Folgenden werden unterschiedliche methodische Verfahren zum Nachweis von Respirationstraktviren anhand ihres Funktionsprinzips, ihrer Anwendungsgebiete sowie anhand analytischer Kriterien wie Sensitivität und Spezifität vorgestellt. Testverfahren zum Nachweis von Respirationstraktviren sind: 1) antigenbasiert, d.h. über die Bindung im Patientenmaterial vorhandener viraler Antigene an eine mit spezifischen Antikörpern beschichtete Festphase oder 2) antikörperbasiert, d.h. über die Bindung spezifischer im Patientenmaterial -typischerweise Serum- vorhandener Antikörper an eine antigenbeschichtete Festphase. Darüberhinaus ist der Virusnachweis möglich über 3) die Virusanzucht auf suszeptiblen Zelllinien mittels Zellkultur und schließlich 4) über den molekularen Virusgenomnachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Den Verfahren liegen unterschiedliche Funktionsprinzipien zugrunde: Bildung und Nachweis von Antigen-Antikörperkomplexen bei Verfahren 1) und 2) versus Amplifikation von Virusgenomsequenzen bei Verfahren 4). Darüberhinaus bestehen grundlegende Unterschiede in der Detektion der gebildeten Nachweisprodukte. So können Antigen - Antikörperkomplexe über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden, wohingegen im Rahmen der sogenannten Real-Time PCR generierte Amplifikate über die kameragestützte Messung von Fluoreszenz einer definierten Wellenlänge erfolgt, die über den Einbau und die Zerstörung markierter Sonden erzeugt wird.

1.4.1 Direkter Antigenachweis über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper

Funktionsprinzip: Inkubation einer mit spezifischen Antikörpern beschichteten Festphase mit Patientenmaterial. Enthält die Untersuchungsprobe Virusantigen, so entstehen Antigen-Antikörperkomplexe, welche nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten in einem anschließenden Detektionsschritt nachgewiesen werden können. Die Detektion der Antigen-Antikörperkomplexe erfolgt entweder über die Zugabe fluoreszenz- oder enzymgekoppelter Antikörper an das gebundene Antigen.

a)



b)

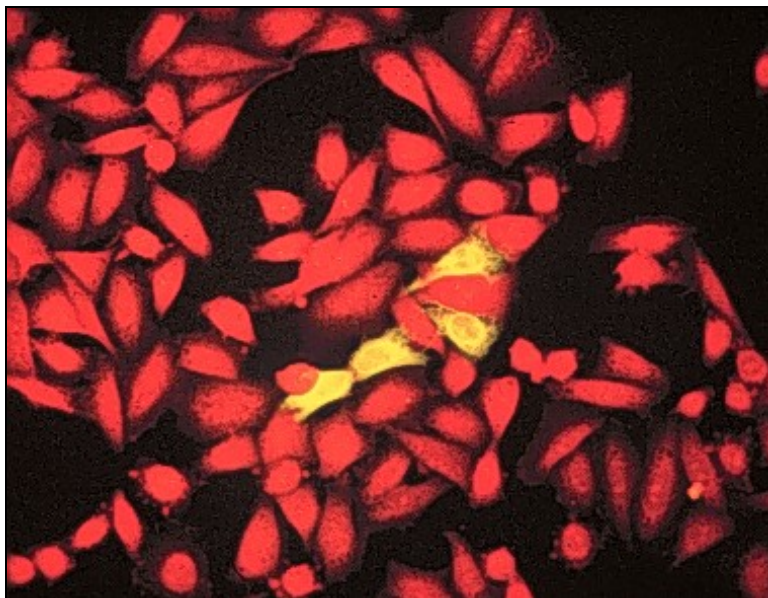


Abb. 11 : Funktionsprinzip antigenbasierter Testverfahren zum Nachweis von Respirationstraktviren sowie Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie, a) Antigen-ELISA, b) indirekte Immunfluoreszenz, Quelle : a) www.clinical-virology.org b) Adams,O., Institut für Virologie, Düsseldorf

Auswertung: Die Auswertung des Tests erfolgt bei Einsatz von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern lichtmikroskopisch sowie bei enzymatisch-gekoppelten Antikörpern photometrisch.

Analytische Kriterien: Ein Nachteil von Testverfahren, die auf dem Prinzip des direkten Antigennachweises zur Diagnose von akuten Respirationstraktinfektionen basieren, ist ihre unzureichende Spezifität und Sensitivität ¹⁸.

Indikationen: Der Vorteil dieses Testverfahrens ist die schnelle und vergleichsweise unkomplizierte Durchführung. So existieren sog. „bed side tests“ für den RSV-Schnellnachweis. Aufwendige Laborausrüstung sowie entsprechend geschultes Laborpersonal sind nicht notwendig. Diese Tests finden ihre Verwendung in Einrichtungen, in denen keine Möglichkeit zur PCR-Diagnostik von Respirationstraktinfektionen vorhanden ist.

1.4.2 Indirekter Antikörpernachweis über serologische Methoden

Funktionsprinzip: Inkubation virusantigenbeschichteter Mikrotiterplatten mit Patientenserum. Bei Vorhandensein spezifischer Antikörper im Patientenserum binden diese an das Antigen. Nach Entfernen ungebundener Komponenten durch einen Waschschrift werden an das Antigen gebundene spezifische Patientenantikörper nachgewiesen über das Hinzufügen eines enzymmarkierten (z.B. Peroxidase) gegen humanes IgG bzw. IgM gerichteten Sekundärantikörpers. Nach einem erneuten Waschschrift wird Substrat hinzugefügt (z.B. Orthophenyldiamin; OPD), welches von der an den Zweitantikörper gekoppelten Peroxidase umgesetzt und in Form eines Farbumschlags optisch sichtbar wird. Zur Beendigung der Enzym-Substratreaktion wird schließlich Stopplösung (z.B. H₂SO₄) hinzugefügt.

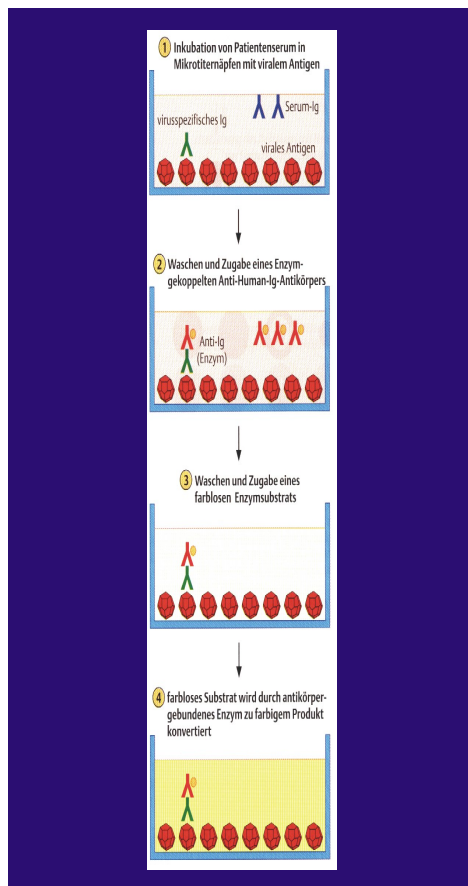


Abb. 12 : Funktionsprinzip eines ELISA-Tests, Quelle: Hof et al. Mikrobiologie, Duale Reihe, Thieme Verlag, 2000

Auswertung: Der Farbumschlag ist mit dem bloßen Auge sichtbar, was eine optische Beurteilung des Tests ermöglicht. Üblich ist heutzutage die photometrische Auswertung mit Hilfe eines Photometers zur Messung der Extinktion des Farbumschlags.

Analytische Kriterien: Die Bestimmung von Antikörpern im Serum eines akut erkrankten Patienten zum Nachweis von Antikörpern gegen Respirationstraktviren ist nicht ausreichend sensitiv, da zwischen 10% und 30% der Patienten trotz akuter Infektion keine ausreichend hohen Antikörperserumspiegel erreichen und dies die serologische Detektion der Infektion erschwert ¹³. Zum Beweis einer frischen Infektion ist in der Regel ein zweites Serum des Patienten notwendig, welches ca. 7-14 Tage nach dem ersten Serum entnommen wird. Beweisend für eine frische Infektion ist dann ein signifikanter Titeranstieg. Da IgM-Antikörper im Rahmen einer akuten Infektion nicht zuverlässig produziert werden ist deren diagnostischer Nachweis nur von untergeordnetem Wert.

Indikationen: Serologische Verfahren ermöglichen die Bestimmung und Klassifizierung von spezifischen Antikörpern gegen Respirationstraktviren. Dies ist besonders für epidemiologische

Fragestellungen (Seroprävalenz eines bestimmten Virus in der Bevölkerung, saisonale Zirkulation bestimmter Serovare u.a.) relevant.

1.4.3 Direkter Virusnachweis über die Zellkultur

Funktionsprinzip: Empfängliche Zelllinien werden mit virushaltigem Material infiziert. Die virusinfizierte Zelle wird hierdurch geschädigt, was lichtmikroskopisch als sog. cytopathischer Effekt sichtbar wird.

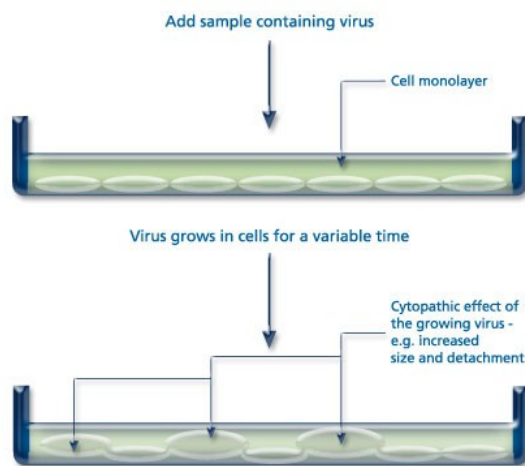


Abb. 13 : Funktionsprinzip der Virusisolierung mittels Zellkultur, Quelle : www.clinical-virology.org

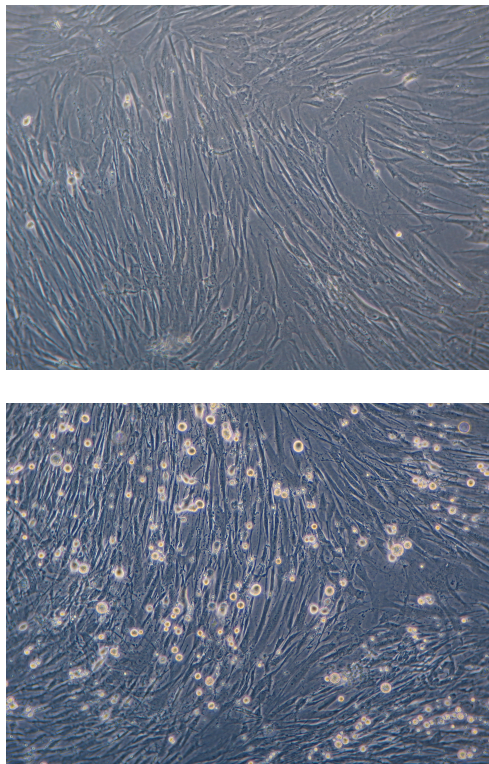


Abb. 14 : Cytopathischer Effekt bei einer Rhinovirus infizierten Zellkultur (MRC-5-Zellen) (unteres Bild) im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrolle (oberes Bild), Quelle : Adams,O., Institut für Virologie, Düsseldorf

Analytische Kriterien: Die Virusisolierung in der Zellkultur ist ein spezifisches Verfahren, das jedoch in Abhängigkeit vom vorhandenen Virus eine unterschiedliche Sensitivität aufweist. Einige Viren des Respirationstrakts, z.B. Bocaviren sind nicht anzüchtbar.

Indikationen: Die Virusisolierung mittels Zellkultur war lange Zeit mangels besserer Verfahren der Goldstandard zum Nachweis von Respirationstraktviren ¹⁹. Dies hat sich in den letzten Jahren mit dem Aufkommen molekularbiologischer Verfahren, insbesondere der PCR verändert, da diese zum einen über eine bessere Sensitivität verfügen und zum anderen ein Ergebnis wesentlich schneller generiert wird. Die Virusisolierung mittels Zellkultur bleibt jedoch ein unverzichtbares Verfahren zur Gewinnung von Virusisolaten, welche wiederum die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen ermöglichen (Tabelle 5).

Tabelle 5 : Übersicht über die Vor-und Nachteile der Zellkultur, adaptiert aus : ¹⁸

Vorteile	Nachteile
Breite Palette an Viren nachweisbar, hohe Spezifität	Dauer bis zum Erhalt eines Befundes: 2-12 Tage (PCR: 3-5 Stunden)
Bearbeitung wissenschaftlicher/epidemiologischer Fragestellungen möglich	Sensitivität geringer im Vergleich zum PCR-Nachweis: - RSV (75%) - Influenza (80%) - Parainfluenza Subtyp 1 und 3 (95%) - Parainfluenza Subtyp 2 (75%)

1.4.4 Molekulare Nachweismethoden

1.4.4.1 Funktionsprinzip der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung (Amplifizierung) von kleinsten Virusgenommengen. Dies wird ermöglicht durch ein Enzym, die Polymerase, welche in der Lage ist, von der Ausgangs-DNA („template“) eine neue zur Ausgangs-DNA komplementäre DNA durch die enzymatische Verknüpfung von Nukleotiden (dNTP) herzustellen. Kurze Oligonukleotide, sog. Primer, deren Sequenz komplementär sein muß zu einem ausgewählten Genombereich der zu amplifizierenden Virus-DNA, binden an diese und dienen als Startpunkt für die Polymerase. Die Polymerasekettenreaktion besteht aus 3 temperaturabhängigen Schritten (Abb. 15): 1) Denaturierung der zu amplifizierenden DNA in Einzelstränge bei 93°C-95°C sowie 2) Anlagerung oder annealing der Primer bei ca. 55°C und 3) Synthese des komplementären Strangs bei 72°C durch das Wirken der Polymerase. Dieser Schritt wird auch als Extensionsschritt bezeichnet. Entscheidend ist der Einsatz einer thermostabilen Polymerase, welche bei höheren Temperaturen (72°C) aktiv ist. Aus diesem Grund wird die sogenannte Thermophilus aquatus- oder kurz Taq-Polymerase verwendet. Die oben beschriebenen 3 Schritte einer Polymerasekettenreaktion werden als Zyklus

zusammengefaßt und resultieren (bei optimalen Reaktionsbedingungen) in der Verdopplung der DNA-Ausgangsmenge pro Zyklus. In der Regel läuft eine PCR über 30 bis 45 Zyklen, was in der logarithmischen Vervielfältigung der Ausgangs-DNA resultiert. Die aufeinanderfolgenden temperaturabhängigen Reaktionsschritte werden automatisiert mit Hilfe eines sog. Thermocyclers ermöglicht. Dieses Gerät enthält einen kombinierten Kühl- und Heizblock, welcher computergestützt für definierte Zeiteinheiten auf die für die Denaturierung, Anlagerung und Extension notwendigen Temperaturen hochheizt bzw. runterkühlt. Dies wird in Form eines sogenannten Thermalprotokolls definiert. Ein herkömmliches Thermalprotokoll beinhaltet einen initialen Denaturierungsschritt gefolgt von einem kurzen Denaturierungsschritt sowie der Anlagerung der Primer und dem Extensionsschritt. In neueren PCR-Thermalprotokollen werden der Annealing- und der Extensionsschritt zusammengefaßt (Abb. 16). Der Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente (Amplifikate) muß bei der klassischen PCR über einen sich anschließenden Detektionsschritt -in der Regel eine Auftrennung der Amplifikate mittels Gelelektrophorese- erfolgen.

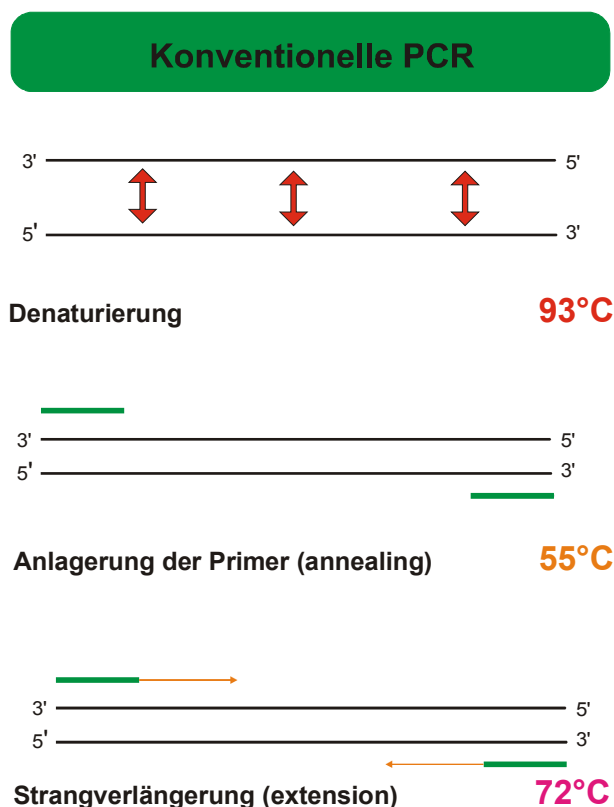


Abb. 15 : Funktionsprinzip der Polymerasekettenreaktion, Quelle : Adams,O./Bonzel,L., Praktikum der Virologie für Medizinstudenten,

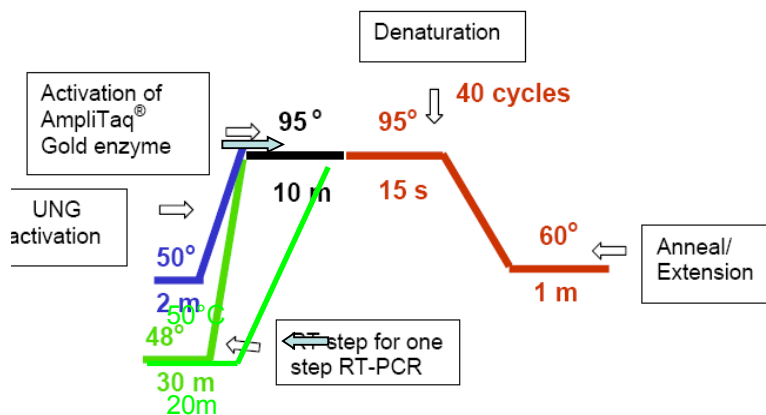


Abb. 16 : Beispiel eines PCR-Thermalprotokolls mit Reverse-Transkriptase-Schritte sowie zusammengefaßtem Anneal-/Extensionsschritt, Quelle : www.appliedbiosystems.com

1.4.4.2 Funktionsprinzip der Real-Time PCR unter Verwendung von TaqMan™ Sonden

Im Gegensatz zur konventionellen PCR ermöglicht die real-time-PCR-Technologie die simultane Durchführung der Amplifikation sowie der Detektion in einem Reaktionsgefäß. Dem Verfahren liegt der Anfang der 90'er Jahre beschriebene 5' Nuklease assay zugrunde, bei dem man sich die 5' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zunutze macht. Der 1993 von der Firma Applied Biosystems TaqMan™ PCR Assay verwendet als Sonde ein Oligonukleotid, dessen 5' Ende mit dem Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat, zumeist 6-Carboxy-Fluorescein, FAM) und das 3' Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat, zumeist 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, TAMRA) markiert ist. Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher auf der intakten Sonde bewirkt, daß bei Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm kein Signal entstehen kann. Während der Annealing-Phase hybridisiert die Sonde zusammen mit den Primern an der Matrize. In der Extensionsphase verdrängt die Taq-Polymerase die Sonde, die dabei hydrolysiert wird. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal wird von der CCD Kamera gemessen. Da dies bei jedem der normalerweise 40-45 Zyklen geschieht, erhält man quasi online ein Meßsignal, das proportional zum entstandenen PCR-Produkt ist. Da die Sonde exakt auf ein Primer-Paar abgestimmt sein muß und die spezielle Synthese damit recht teuer ist, gibt es als Alternative für die Erzeugung von Fluoreszenzsignalen die Verwendung von DNA-Farbstoffen, die sich sequenz-unspezifisch an jede Form von doppelsträngiger DNA anlagern. Statt des klassischen DNA-Farbstoffs Ethidiumbromid verwendet man dabei zumeist das Sybr-Green, das sich in die kleine Grube der DNA-Doppelhelix ("minor-groove Farbstoff") interkaliert.

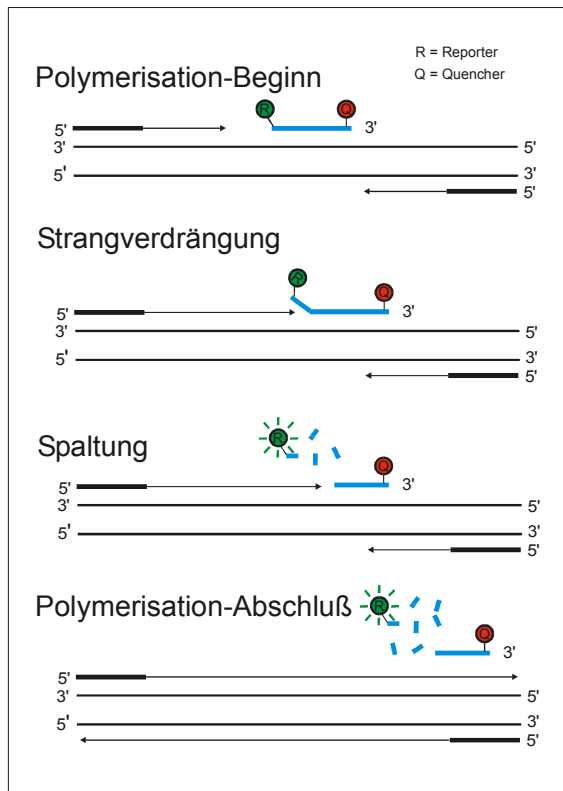


Abb. 17 : Funktionsprinzip der TaqMan Real-Time PCR, : Quelle: O.Adams/L.Bonzel, Pratikum der Virologie für Medizinstudenten

1.4.4.3 Die One-Step Real-Time PCR

Voraussetzung für die Amplifikation eines viralen templates mittels PCR ist das Vorliegen dieser in Form einer DNA-Matrize. Aus diesem Grund muß die virale RNA in cDNA („copy DNA“) umgeschrieben werden. Dies ist möglich durch das Enzym Reverse Transkriptase, die ihre optimale Aktivität bei 42°C entfaltet. Entsprechend wird bei einer PCR im one-step Format ein Reverse-Transkriptase-Schritt dem Amplifikationszyklus vorgeschaltet.

1.4.4.4 Funktionsprinzip der Du-/und Triplex Real-Time PCR

Bei einem Du- bzw. Triplexansatz einer real-time PCR werden zwei (Duplex) oder drei (Triplex) TaqMan Sonden mit ihren entsprechenden Primerpaaren zur Detektion mehrerer Viren bzw. Virussubtypen in einem Reaktionsansatz zusammengefaßt. Grundlage der Du-und Triplex-PCR ist zum einen die Verwendung von Sonden, welche an ihrem 3'-Ende mit einem nichtfluoreszierenden Farbstoff mit entsprechend wenig Hintergrundfluoreszenz, sog. „black hole quencher“, gekoppelt sind. Darüberhinaus muß für jede Sondenart ein unterschiedlicher Farbstoff mit entsprechend distinktem Emissionsspektrum eingesetzt werden. Moderne

Thermocycler sind in der Lage, die farbstoffspezifische Fluoreszenz über verschiedene Detektionskanäle zu erkennen und zu messen.

Tabelle 6 : Messkanäle zur Detektion unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe beim Thermocycler 7500 von Applied Biosystems, Quelle : www.appliedbiosystems.com

Dektetionskanal/Wellenlänge	Farbstoff, der über diesen Detektionskanal erkannt wird
A 535 nm	Sybr Green I, FAM
B 559 nm	VIC, HEX , JOE
C 586 nm	NED, TAMRA, CY3
D 615 nm	ROX, Texas Red
E 620 nm	Cy 5

1.4.4.5 Grundlagen des quantitativen Real-Time PCR-Nachweises

Entscheidend für die Quantifizierung ist nicht die Stärke des Signals, das in den meisten Fällen vor den letzten Zyklen ein Plateau erreicht, sondern die Kinetik des Anstiegs. Dabei geht als Meßgröße ein, bei welchem Zyklus das Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt (CT = cycle threshold). In Abhängigkeit von der Menge an Matrize, die zu Beginn der Amplifikation vorlag, verschiebt sich dieser Wert mit steigender Menge zu einem früheren Zyklus (niedriger CT-Wert) und umgekehrt. Bei einer optimal verlaufenden Reaktion sollte sich die Menge an Amplifikaten mit jedem Zyklus verdoppeln, d.h. mathematisch kann die PCR beschrieben werden mit der Gleichung:

$$Y = X(1+E)^n$$

wobei **Y** die Menge an Amplicons, **X** die Startkopienzahl zu Beginn der PCR, **E** die Effizienz der Reaktion (im Idealfall 1.0) und **n** die Anzahl der PCR-Zyklen ist. Da die Effizienz von den Reaktionsbedingungen (Primerauswahl, Ampliconlänge, Qualität der Polymerase etc.) abhängt, ist es zur Quantifizierung von großem Vorteil, wenn bei jedem Experiment eine definierte Menge an sequenzspezifischem DNA-Standard in mehreren Verdünnungsstufen mitgetestet und eine Standardkurve erstellt wird.

1.5 Klinische Aspekte von viralen Respirationstraktinfektionen

Im Folgenden werden die klinisch relevanten Aspekte von akuten viralen Respirationstraktinfektionen bei pädiatrischen Patienten beschrieben im Hinblick auf ihre Ätiologie, Epidemiologie und Pathogenese sowie auf das mit ihnen assoziierte Krankheitsbild.

1.5.1 Infekte des oberen Respirationstrakts

Der Begriff der Erkältungskrankheit „Common Cold“ umfaßt eine Reihe von akuten viralen Infektionen des oberen Respirationstrakts. Hierzu zählen: Rhinitis, Pharyngitis, Laryngitis, Tracheitis und Bronchitis sowie deren mögliche Kombinationen ⁵⁴.

1.5.1.1 Rhinitis

Synonyme:

Schnupfen, Nasenkatarrh, Koryza (griech. Erkältung)

Ätiologie:

Eine Vielzahl von Respirationstraktviren sind mit einer akuten Rhinitis im Rahmen des „Common Cold“ assoziiert (Tabelle 7). Rhinoviren, die in bis zu 50% der Fälle für eine akute Erkältung verantwortlich sind, spielen hierbei eine herausragende Rolle ⁴.

Tabelle 7 : Ätiologie der akuten viralen Rhinitis, Quelle : ³⁶

Virusgruppe	% der verursachten Rhinitisfälle
Rhinoviren	30-40
Coronaviren	10-15
Parainfluenzaviren	5
RSV	5
Influenzaviren	25-30
Adenoviren	5-10

Pathogenese:

Die akute virale Rhinitis ist in der Regel eine selbstlimitierende Erkrankung von kurzer Dauer. Die vermehrte Abschilferung infizierter Epithelzellen in Verbindung mit der durch die lokale Immunantwort bedingte submukosale Schleimhautschwellung führt zu einer Verstopfung der Nase und Schnupfen. Für Rhinoviren wurde gezeigt, daß deren Replikation in den Epithelzellen des Nasenrachenraums zu einer Veränderung der residenten bakteriellen Flora führt mit der Gefahr einer bakteriellen Superinfektion ³⁶. Hierbei ist eine Mitbeteiligung der Sinusiden bzw. des Mittelohrs möglich.

Krankheitsbild:

Die Inkubationszeit einer akuten Erkältung beträgt 12 bis 72 Stunden. Die Symptomatik dauert ca. 1 Woche und ist ca. am 3. Tag am stärksten ausgeprägt. Hauptsymptome der akuten Erkältungskrankheit sind Schnupfen, Nasenkatarrh, Halsschmerzen und meist nur geringgradig erhöhte Temperaturen.

Infektionswege:

Die Ausbreitung von Erkältungsviren findet besonders in Kindergärten und Schulen statt. Die Kinder infizieren sich an ihren Klassenkameraden und bringen die Infektion mit nach Hause, wo sie ihre Familienangehörigen infizieren. Respirationstraktviren werden über respiratorische Sekrete übertragen, wobei verschiedene Übertragungswege möglich sind: 1) direkter Kontakt mit infektiösen Sekreten, z.B. über kontaminierte Hände oder Objektoberflächen 2) aerogene Übertragung von Viruspartikeln über sehr kurze Strecken 3) virushaltige Aerosole 4) eine Kombination aus diesen Mechanismen. Bei akut an Rhinovirus erkrankten Patienten wurden größere Virus Mengen an ihren Händen nachgewiesen, so daß aus diesem Grunde die hygienische Händedesinfektion wesentlich ist für die Unterbrechung der Infektionskette.

Therapie:

Mit Ausnahme der Influenza (1.5.2.4) steht bislang noch kein kausales, d.h. antivirales Therapeutikum gegen akute Respirationstraktinfektionen zur Verfügung. Die Therapie erfolgt symptomatisch (abschwellende Nasentropfen, Analgetika/Antipyretika). Eine gegen Rhinoviren wirksame Substanz (Pleconaril®, 1.1.2.1) ist noch in Erprobung.

Saisonalität:

Die Inzidenz von akuten viralen Respirationstraktinfektionen ist in den Wintermonaten sowie im Frühjahr am höchsten, um während der wärmeren Monate des Sommers auf ein Minimum abzusinken (Abb. 18).

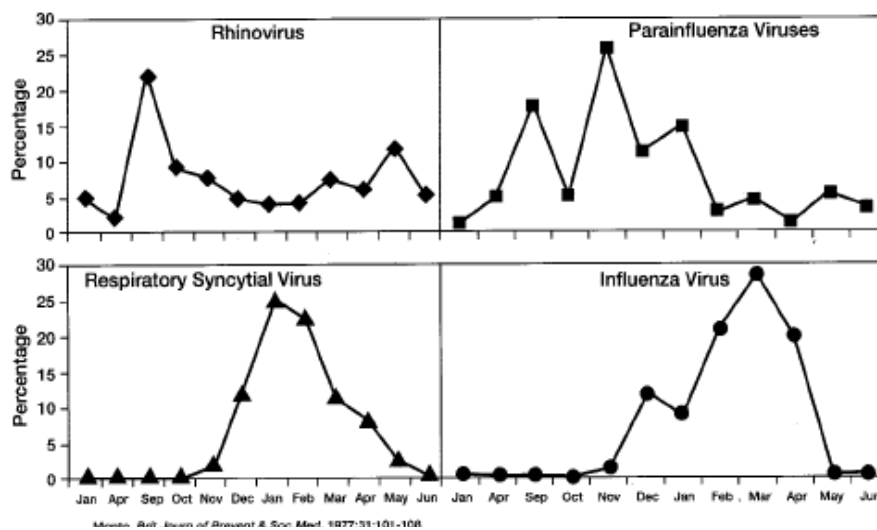


Abb. 18 : Saisonalität ausgewählter Respirationstraktviren über 18 Monate, Michigan, USA Quelle : ⁴³

1.5.1.2 Pharyngitis

Synonyme/Kurzbeschreibung:

Akute Entzündung des Rachens ausgelöst durch eine Vielzahl möglicher Erreger; in der Regel jedoch viral bedingt.

Ätiologie:

Tabelle 8 : Ätiologie der akuten viralen Pharyngitis, Quelle : ³⁶

Virusgruppe	% der verursachten Pharyngitisfälle
Rhinoviren	20
Coronaviren	>5
Herpes simplex Virus	5
Parainfluenzavirus	5
Influenzavirus	25-30
Coxsackievirus	5-10

Pathogenese:

Die akute virale Pharyngitis tritt am häufigsten im Rahmen einer akuten Erkältung (1.5.1.1) auf. So sind bis zu 20% der akuten Pharyngitiden mit Rhinoviren assoziiert (Tabelle 8). Die Pathogenese resultiert ähnlich wie bei einer akuten Infektion des Nasenepithels aus einer Schädigung der virusinfizierten Epithelzellen des Rachenraums in Verbindung mit einer submukosalen Schwellung und Ödembildung der betroffenen Gewebeabschnitte.

Krankheitsbild:

Die akute Pharyngitis ist gekennzeichnet durch Halsschmerzen und einem „Kratzen im Hals“, meist begleitet von Schnupfen und Husten. Systemische Symptome wie Fieber oder Myalgie sind selten.

Infektionswege/Therapie:

s. „die akute Rhinitis“ (Kapitel 1.5.1.1)

1.5.2 Infektionen des unteren Respirationstrakts**1.5.2.1 Akute Laryngotracheobronchitis (Krupp)**Synonyme/Kurzbeschreibung:

Akute Entzündung im Bereich des Kehlkopfs und der Trachea. Die Erkrankung trifft vornehmlich Kleinkinder im Alter von 3 Monaten bis 3 Jahren.

Ätiologie:

Parainfluenzaviren sind die häufigsten Verursacher von Krupp. An erster Stelle steht hierbei das Parainfluenzavirus Subtyp 1 gefolgt vom Subtyp 3 und schließlich von Subtyp 2. Während Parainfluenzavirus 3 bei Säuglingen eher mit Bronchiolitis und Pneumonie assoziiert ist, manifestiert sich die Infektion in der Altersgruppe der 2 bis 3 jährigen Kinder vorwiegend in Form von Krupp.

Tabelle 9 : Ätiologie der Pharyngitis, Quelle : ³⁶

Erreger	Auslösender Erreger in %
Parainfluenzaviren Subtyp :	
1	18
2	3
3	6,6
Influenza A	1,4
Influenza B	1,2
RSV	3,8
Andere Viren	2

Pathogenese:

Die Erkrankung beginnt als Infektion des Epithels des oberen Respirationstrakts und greift dann auf weiter distal liegende Strukturen im Bereich des Kehlkopfes (Glottis und subglottischer Raum) sowie im Bereich der Trachea über. Die akute Schwellung und Entzündung führen zu einer Verengung der Atemwege, was sich in Form eines Stridors (pathologisches Atemgeräusch durch Verengung der Atemwege) bemerkbar macht. Besonders betroffen sind die Abschnitte im

Bereich des sog. Krikoids (ringförmige Knorpelstruktur, welche zusammen mit den beiden Schildknorpeln und der Epiglottis das Kehlkopfskelett bildet), da dieser Bereich nur sehr wenig dehnbar ist (Abb. 19). Die Ursache dafür, daß hauptsächlich Kleinkinder von dieser Erkrankung betroffen sind, liegt möglicherweise zum einen in der Tatsache, daß sie im Rahmen einer Erstinfektion mit dem Krupp-auslösenden Virus noch nicht ausreichend über neutralisierende Antikörper verfügen, um eine Ausbreitung der Viren auf distal liegende Strukturen zu verhindern. Zum anderen sind bei Kleinkindern altersgemäß die luftleitenden Abschnitte im Bereich des Kehlkopfs von relativ geringem Durchmesser, so daß eine virusbedingte Inflammation und Schwellung dieser Strukturen sich gravierender im Hinblick auf eine Verengung der Atemwege auswirkt als bei einem Erwachsenen.



H: Hyoid (Zungenbein), S: Schildknorpel, K: Krikoid, T: Trachea

Abb. 19: Knorpelskelett des Kehlkopfs, Quelle: www.logopaediewiki.de

Krankheitsbild:

In der Regel geht dem Krupp eine Atemwegsinfektion mit Rhinitis oder Pharyngitis voraus. Die Krupp-Symptomatik setzt meist abrupt oft nachts ein mit Heiserkeit, bellendem Husten, inspiratorischem Stridor und Atemnot. Der Übergang in ein lebensbedrohliches Krankheitsbild mit Zyanose, Blässe und Tachykardie ist möglich und nicht voraussehbar⁵⁴.

Therapie:

Eine stationäre Einweisung ist zu erwägen bei Vorliegen einer ausgeprägten Dyspnoe und/oder eines trotz Therapie persistierenden inspiratorischen Stridors. Wichtig ist die Beruhigung des Kindes. Darüberhinaus ist die Steroidgabe z.B. Dexamethason indiziert sowie die Verabreichung von Epinephrin (Tabelle 10).

Tabelle 10 : Therapie des Krupp, Quelle : ⁵⁴

Maßnahme	Bemerkung
Beruhigung des Kindes, evtl. Sedierung	--
Fiebersenkung mit Paracetamol	--
Zufuhr von Frischluft	Wirksamkeit noch nicht wissenschaftlich evaluiert
Steroidgabe	Mögliche Applikationen: Prednisolon: 1-2mg/kgKG per os oder rektal Desamethason: 0,15-0,6mg/kgKG i.m. oder per os Budesonid-Inhalationen (2mg)
Epinephringabe	per Inhalationem
stationäre Einweisung	bei ausgeprägter Dyspnoe oder rascher Progredienz

Saisonalität:

Das jahreszeitlich d.h. besonders in den Winter-und Frühjahrsmonaten gehäufte Auftreten von Krupp hängt mit der Saisonalität der auslösenden Viren zusammen (Abb. 18).

1.5.2.2 BronchitisÄtiologie:

Die akute Bronchitis wird fast ausschließlich viral verursacht. Etwa 10% der akuten Bronchitiden sind primär und weitere 15% sekundär bakteriell bedingt.

Tabelle 11 : Ätiologie der Bronchitis, Quelle: ³⁶

Erreger	Schwere der Tracheobronchitis
Adenoviren	+ bis +++
Rhinoviren	+ bis +++
Enteroviren	+
Influenzaviren	+ bis +++
Parainfluenzaviren	++
RSV	+ bis +++

Pathogenese:

Die akute Bronchitis entsteht oft im Rahmen einer akuten Virusinfektion des oberen Respirationstrakts, welche auf die Schleimhäute der Trachea und der Bronchien übergreift. Die Virusreplikation in den respiratorischen Epithelzellen führt zu einer Schädigung dieser sowie zu einer Beeinträchtigung der Kinocilienfunktion und in der Folge zu einer Verminderung der mukociliären Clearance (Kap. 1.2.1.1).

Krankheitsbild:

Die Symptomatik der akuten banalen Bronchitis beginnt in der Regel mit einem trockenen, nichtproduktiven Husten und einem retrosternalen Schmerz. Der Husten wird in den folgenden Tagen produktiv. Begleitend können subfebrile Temperaturen und Erbrechen auftreten. Die Erkrankung ist selbstlimitierend und heilt in der Regel nach 7 bis 10 Tagen aus. Die komplizierte

Bronchitis zeigt meist einen protrahierten Verlauf (>7 Tage) und ist in der Regel bedingt durch eine bakterielle Superinfektion einer primär viralen Bronchitis. Die obstruktive Bronchitis ist eine Sonderform der akuten Bronchitis, welche bei Säuglingen und Kleinkindern vorkommt. Sie ist gekennzeichnet durch einen expiratorischen Stridor, Einsatz der Atemhilfsmuskulatur, einen hypersonoren Klopfschall der Lunge, tiefstehendes Zwerchfell, Giemen, Brummen sowie grob- und mittelblasige Rasselgeräusche. Die obstruktive Bronchitis kann in einer respiratorischen Insuffizienz mit Blässe, Unruhe und Zyanose münden. Als chronische Bronchitis wird eine länger als drei Monate anhaltende Bronchitis bezeichnet, welche häufig rezidiert.

Therapie:

Da die Bronchitis in der Regel viral bedingt ist, ist eine Antibiotikatherapie nicht indiziert. Bei einer komplizierten Bronchitis, einer Bronchitis bei Vorliegen einer schweren Grunderkrankung und einer Bronchitis mit Fieber länger als 3 Tage oder Hinweisen auf eine bakterielle Infektion sollte mit Antibiotika behandelt werden. Bezüglich der Therapie der obstruktiven Bronchitis gibt es keine einheitlichen Empfehlungen. Mögliche Therapien bestehen in der topischen Gabe von kurzwirksamen β -Mimetika sowie in der systemischen Steroidgabe. Letztere ist jedoch ausschließlich bei schwerem klinischen Verlauf indiziert.

1.5.2.3 Bronchiolitis

Synonyme/Kurzbeschreibung:

Die Bronchiolitis ist eine hochgradig obstruktive Ventilationsstörung und Entzündung der peripheren Bronchien und Bronchiolen und trifft besonders Kinder in den ersten beiden Lebensjahren.

Ätiologie:

Respiratory Syncytial Virus ist der häufigste Auslöser von Bronchiolitis in 43%-90% der Fälle ⁶. An zweiter Stelle folgen die Parainfluenzaviren mit den Subtypen 3, 2 und 1. Eine Übersicht über die Ätiologie der Bronchiolitis ist in Tabelle 12.

Tabelle 12 : Die häufigsten Erreger der Bronchiolitis, Quelle : ³⁶

Virus	Anzahl der Fälle (%)
RSV	43-90
Parainfluenza Subtyp 1	5-12
Parainfluenza Subtyp 2	1-6
Parainfluenza Subtyp 3	8-15
Rhinoviren	3-8
Adenoviren	3-10

Pathogenese:

Die Pathogenese ist am gründlichsten erforscht anhand der akuten RSV-Bronchiolitis. Die Virusreplikation in den Bronchiolen führt zur Abschilferung der infizierten Zellen in die Lumina der Bronchiolen. Dies in Verbindung mit einer vermehrten Schleimproduktion mitunter mit der Bildung von Schleimpropfen („mucus plugs“) führt zur Verlegung der kleinlumigen Bronchiolen. Desweiteren ist die Immunantwort des Patienten von entscheidender Bedeutung im Hinblick auf das Ausmaß der lokalen immunologisch vermittelten Entzündungsreaktion. Näheres hierzu ist beschrieben in Kapitel 1.2.2 (Immunologische Faktoren in der Pathogenese der RSV-Bronchiolitis). Risikofaktoren für den schweren Verlauf einer RSV-Bronchiolitis sind: junges Alter (< 6 Monate), Frühgeburtlichkeit, bronchopulmonale Dysplasie, das Vorliegen eines kongenitalen Herzfehlers, angeborener Immundefekt bzw. erworbene Immunsuppression, primäre RSV-Infektion, enge Atemwege (anatomisch oder funktionell), niedriges Geburtsgewicht, männliches Geschlecht, niedrige Serumantikörperspiegel gegen RSV ¹¹.

Krankheitsbild:

Der Bronchiolitis geht für gewöhnlich eine Infektion des oberen Respirationstrakts voraus, in ca. 1/3 der Fälle entwickeln die betroffenen Kinder eine akute Otitis media ³⁹. Bei zunehmender Beteiligung des unteren Respirationstrakts verschlechtert sich die klinische Verfassung des Kindes und es kommt zu Husten, in- und expiratorischer Dyspnoe und Tachypnoe. Die Körpertemperatur ist meist nur geringgradig erhöht. Die erschwerte Atemarbeit wird sichtbar durch das Nasenflügelatmen des Kindes sowie durch thorakale Einziehungen und ggf. Zyanose. Auskultatorisch fallen die Kinder in der Regel auf durch ein leises Atemgeräusch, und inspiratorisches Knistern.

Therapie/Prophylaxe:

Die Therapie der akuten Bronchiolitis besteht in einer supportiven Therapie (Sauerstoffgabe, Flüssigkeitszufuhr) sowie in der Gabe von Bronchodilatoren. Die Wirksamkeit einer systemischen Kortikoidgabe ist ebenso nicht erwiesen wie die Gabe eines antiviralen Therapeutikums (Ribavirin) ⁶². Prophylaktisch kann bei gefährdeten Kindern ein monoklonaler Antikörper (Palivazumab, Synagis®) bei RSV appliziert werden (Kap.1.1.2.1).

1.5.2.4 Pneumonie

Synonyme/Kurzbeschreibung:

Die Lungenentzündung ist weltweit die am häufigsten tödliche Infektionskrankheit. Jährlich sterben weltweit geschätzte 4 Millionen Kinder unter 5 Jahren an den Folgen einer Pneumonie ⁵⁶. Global betrachtet stehen bakterielle Erreger als Ursache der Pneumonie an erster Stelle, in industrialisierten Ländern jedoch sind die meisten Pneumonien bei Kindern viralen Ursprungs ⁵⁶.

Krankheitsbild:

Die klinischen Symptome einer Pneumonie können in Abhängigkeit vom Alter des Kindes variieren: bei Neugeborenen und Säuglingen kann die Pneumonie blande oder foudroyant verlaufen. Die Kinder können Zeichen einer Apnoe aufweisen zusammen mit Blässe, Zyanose und interkostalen Einziehungen. Darüberhinaus sind Fieber, Trinkschwäche und Husten typisch. Bei älteren Kindern sind hohes Fieber, Husten und Brust- oder Bauchschmerzen Symptome einer Pneumonie. Auskultatorisch finden sich ein abgeschwächtes Atemgeräusch sowie Bronchialatmen und feinblasige Rasselgeräusche. Darüberhinaus können die Kinder tachypnoeisch und dyspnoeisch sein und juguläre und interkostale Einziehungen zeigen.

Therapie/Prophylaxe:

Die virale Pneumonie kann in den meisten Fällen nur symptomatisch behandelt werden (Flüssigkeitszufuhr, Antipyretika, ggf. Sauerstoffgabe). Ausnahme bildet die Influenzavirus assoziierte Pneumonie. Hier werden sog. Neuraminidaseinhibitoren (Zanamivir, Handelsname: Relenza®, Oseltamivir, Handelsname: Tamiflu®) eingesetzt, welche die enzymatische Funktion des Virus-Glykoproteins Neuraminidase hemmen und in der Folge ein Ablösen neu gebildeter Viruspartikel von der infizierten Wirtszellmembran und eine Infektion weiterer Zellen verhindern. Entscheidend für eine optimale Wirksamkeit des Medikaments ist die frühzeitige Gabe innerhalb von 24 Stunden (Zanamivir) bzw. 36 Stunden (Oseltamivir) nach Auftreten der Symptome. Oseltamivir ist für Kinder ab 1 Jahr zugelassen während Zanamivir bei Kindern unter 12 Jahren kontraindiziert ist ⁵². Die jährliche Influenzaprophylaxe mittels Schutzimpfung sollte idealerweise in den Monaten Oktober und November durchgeführt werden. Zu der Zielgruppe, für die die Impfung empfohlen wird, gehören neben älteren Personen (über 60 Jahre) medizinisches Personal sowie Personen mit erhöhtem „Publikumsverkehr“, Kinder, Jugendliche und Erwachsene mit „erhöhter gesundheitlicher Gefährdung infolge eines Grundleidens“, z.B. chronische Erkrankungen der Atemwege wie Asthma bronchiale und COPD ⁵².

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Etablierung und Evaluation einer quantitativen one-step real-time PCR zur Detektion von insgesamt 10 RNA- und 2 DNA-Viren, die als Auslöser einer akuten Respirationstraktinfektion in Frage kommen. Durch einen möglichst raschen Untersuchungsablauf soll eine zeitnahe sowie durch die Erfassung eines breiten Erregerspektrums eine umfassende Differentialdiagnose von Respirationstraktinfektionen in klinischen Materialien möglich werden. Trotz der Vielzahl von respiratorischen Viren soll das Protokoll derart gestaltet werden, daß es sämtliche für den Virusnachweis erforderlichen Komponenten inklusive Primer und Sonden in einem praktikablen und ökonomischen Untersuchungsansatz beinhaltet. Die Nachweismethode soll anhand analytischer Qualitätskriterien wie Spezifität, Sensitivität und Präzision sowie anhand des Vergleichs mit herkömmlichen Nachweismethoden evaluiert werden. Plasmide, die virale Genabschnitte enthalten, sollen hergestellt werden und als Standards dienen. Auf diese Weise soll ein quantitativer Virusnachweis mittels real-time PCR ermöglicht werden. Die Viruslasten sollen bei Kindern im Rahmen einer akuten Respirationstraktinfektion gemessen und für die verschiedenen Erreger verglichen werden. Im Rahmen prospektiver klinischer Studien mit Untersuchungsmaterialien von pädiatrischen Patienten mit akuter Respirationstraktinfektion soll die Häufigkeit, das Erregerspektrum sowie die saisonale Verteilung der nachgewiesenen Viren bestimmt werden. Die Häufigkeit und Erregerkonstellation von viralen Koinfektionen in Respirationstraktmaterialien soll erfasst werden. Die klinischen Daten sollen mit dem Erregernachweis korreliert und die Rolle viraler Koinfektionen bei der Ausprägung des klinischen Krankheitsverlaufs bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Liste der verwendeten Materialien

2.1.1.1 Materialien, arbeitsplatzübergreifend

- Sterile Einmalpipetten Costar, Corning, USA
5 ml, 10 ml und 25 ml Pipettiervolumen
- Einkanalpipetten Eppendorff, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen Starlab, Ahrensburg, Deutschland
- 1.5 ml-Reaktionsgefäße Eppendorff, Hamburg, Deutschland
- Kryoröhrchen Nunc, Wiesbaden, Deutschland

2.1.1.2 Zellkultur und Virusisolierung

2.1.1.3 Zellkulturgefäße/-geräte

- Zellkulturflaschen Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Nunclon™ 25 cm², 75 cm² und 175 cm²
Bodenfläche
- 96-well-Mikrotiterplatten TPP, Trasadingen, Schweiz
- 24-well-Zellkulturplatten TPP, Trasadingen, Schweiz
- Zentrifugenröhrchen Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
15 ml Gefäß
- Zentrifugenröhrchen Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
50 ml Gefäß
- Sterile Einmalösen Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
- Sterile Zellschaber Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
- Sterilfilter Whatman, Kent, UK
- Einmalspritzen Braun, Melsungen, Deutschland
- Pasteurpipetten Brand, Wertheim, Deutschland
- Mehrkanalpipette Eppendorff, Hamburg, Deutschland
- Multipette Eppendorff, Hamburg, Deutschland
- Combotips für Multipette Eppendorff, Hamburg, Deutschland
- Neubauerzählkammer Welabo, Düsseldorf, Deutschland
- Megafuge 1.0 Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Vakuumpumpsystem Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
- Mikroskop Leitz, Wetzlar, Deutschland
Diavert
- Inkubator Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
BBD-6220
- Werkbank Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
HERAsafe
- Einfriercontainer Nalgene Labware, Rochester, NY, USA
- Vortexer VWR, Darmstadt, Deutschland
VV3

2.1.1.4 Zellkulturmedien

- DMEM GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- FCS GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- Penicillin/Streptomycin GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
10.000 U/ml
- Gentamycin GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
10 mg/ml
- Moronal-Nystatin Wyeth-Lederle Phama, Wien, Österreich
- Fungizone GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- L-Glutamine GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- PBS-Puffer pH 7,3 GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- 0,5% Trypsine-EDTA GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- Dimethylsulfoxid (DMSO) GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
- Trypsin acetyliert Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
- Sputasol Oxoid, Hampshire, UK

2.1.1.5 Immunfluoreszenz

- SimulFluor RSV/Flu A Institute Virion, Rüschlikon, Schweiz
- SimulFluor Flu A/Flu B Institute Virion, Rüschlikon, Schweiz
- SimulFluor Para 1/2/3/Adeno Institute Virion, Rüschlikon, Schweiz
- Objektträger BioMérieux, Mercy l'Etoile, Frankreich
- Deckgläser Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
24x60 mm
- Mounting fluid Difco, Heidelberg, Deutschland

2.1.2 Molekulare Techniken (Nukleinsäureextraktion, PCR, Klonierung)

2.1.2.1 Oligonukleotide

- Primer Operon Biotechnologies, Köln, Deutschland
100µM
- Sonden Operon Biotechnologies, Köln, Deutschland
100µM

2.1.2.2 Enzyme

- EcoRI New England Biolabs, Frankfurt, Germany
- BamHI New England Biolabs, Frankfurt, Germany
- T4-DNA-Ligase New England Biolabs, Frankfurt, Germany

2.1.2.3 Vektor

- pSG Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.1.2.4 Kompetente Zellen

- DH5αF'IQ™ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2.5 Chemikalien/Medien

- Ampicillin Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
- MetaPhor® Agarose Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
- NuSieve® Agarose Cambrex, Charles City, IA, USA
low melting agarose
- MgCl₂ Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
- Glucose Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
- Ethidiumbromid (EtBr) Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
- Ethanol Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100%
- Isopropanol Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glycerin Merck, Darmstadt, Deutschland
- SuRE Buffer B (10x) New England Biolabs, Frankfurt, Germany
für Restriktionsendonukleasen
- T4-DNA-Ligase Buffer New England Biolabs, Frankfurt, Germany
- Loading Buffer (6x) Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- KB-Leiter Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- TBE-Puffer Maniatis: „Molecular Cloning“
A laboratory manual, Second Edition, J. Sambrook;
E.F.Fritsch; T.Maniatis, Cold Spring Harbour
Laboratory Press, 1989, Band 1-3
- Minimal-TE Maniatis, s.o.
- LB-Agarplatten Maniatis, s.o.
- SOB-Medium Maniatis, s.o.
- LB-Medium Maniatis, s.o.

2.1.2.6 Kits

- EZ-1-Virus Mini Kit Qiagen, Hilden, Germany
- Sensiscript RT Kit Qiagen, Hilden, Germany
- Ampli Taq® DNA-Polymerase, with 10x PCR-buffer und Nukleotidmix (10µM) Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- Sybr® Green PCR Master Mix Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- TaqMan® Universal PCR Master Mix Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- QuantiTect-Multiplex RT-PCR Kit Qiagen, Hilden, Germany
- QIAquick PCR Purification Kit Qiagen, Hilden, Germany

2.1.2.7 Geräte

- Gelkammer Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Rotator Stuart, Asbach, Deutschland
- Kolbenschüttler Stuart, Asbach, Deutschland
- Thermocycler Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan-Real-Time-Thermocycler 7500 SDS
- Thermocycler Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan-Real-Time-Thermocycler 5700 SDS
- Extraktor Qiagen, Hilden, Germany
EZ-1-BioRobot DSP Workstation

-
- Photometer Pharmacia, Biotech, Freiburg, Deutschland
GeneQuant II
 - Ultrazentrifuge Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
J2-21
 - Rotor JA-10 Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
 - Rotor JA-20 Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
 - Rotor JS-13.1 Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA
 - Lumi Imager Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
 - Zentrifuge Eppendorff, Hamburg, Deutschland
5417-R
 - Thermomixer Eppendorff, Hamburg, Deutschland
Comfort

2.1.2.8 Software

- BioEdit Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA
Sequence Alignment Editor
- Primer Express® Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Version 2.0
- Vektor NTI Advance™ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Lumi-Imager F1 Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- 5700 Real Time PCR System Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- 7500 Real Time PCR System Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- ID₅₀ NCBI, Bethesda, MD, USA
Version 5.0
- GraphPad Software San Diego, CA, USA
Statistisches Auswerteprogramm

2.1.3 Virusisolierung mittels Zellkultur

2.1.3.1 Zellkultivierung

Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen der Größe T-75 im Inkubator bei Standardbedingungen (37°C und 5% CO₂) kultiviert. Alle Zelllinien (Tabelle 12) wurden mit 2%FKS (fetales Kälberserum) in DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) mit 1% Penicillin/Streptomycinzusatz als Erhaltungsmedium versorgt. Es erfolgte eine tägliche lichtmikroskopische Kontrolle des Zellrasens hinsichtlich Konfluenz und Zellmorphologie. Sämtliche Zelllinien wurden im 4- bis 5-tägigen Rhythmus passagiert. Hierzu wurde das Medium aus der Zellkulturflasche dekantiert, der Zellrasen mit PBS gewaschen und im Anschluß mit 1ml 0,5%-Trypsin-EDTA für 5 min bei 37°C beschichtet, um den Zellrasen abzulösen. Der abgelöste Zellrasen wurde im definierten Verhältnis (Tabelle 13) gesplittet, in Wachstumsmedium (10%FKS/DMEM) aufgenommen und auf neue T-75-Zellkulturgefäße verteilt.

Tabelle 13 : Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle	Passagierung konfluenter Kulturen
MRC-5	Organismus: human Organ: Lunge (embryonal) Zellart: Fibroblasten	ATCC; Nr.: CCL-171™	1:2-1:5
A- 549	Organismus: human Organ: Lunge Zellart: Karzinomzellen	ATCC; Nr.: CCL-185™	1:5-1:7
Vero	Organismus: Affe (grüne Meerkatzen) Organ: Niere Zellart: Fibroblasten	ATCC; Nr.: CCL-81™L	1:10
HEp-2	Organismus: human Organ: Lunge Zellart: epidermoidales Karzinom	ATCC; Nr.: CCL-23™	1:10
MDCK	Organismus: Hund Organ: Niere Zellart: epitheloid	ATCC; Nr.: CCL-34™	1:10
LLC-MK2	Organismus: Rhesusaffe Organ: Niere Zellart: epitheloid	ATCC; Nr.: CCL-7™	1:10

2.1.3.2 Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer

Nach Abtrypsinieren des Zellrasens wurde dieser in 10 ml PBS aufgenommen, resuspendiert und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Es wurden 20µl Zellsuspension entnommen und die Neubauerzählkammer hiermit beschickt. Die Gesamtzellzahl wurde durch Auszählung aller vier Großquadrate und Bildung des Mittelwerts bestimmt. Anschließend wurden Zellsuspension und

Medium gemischt und auf das Zellkulturgefäß ausgesät. Die Einsaat erfolgte in Abhängigkeit vom Zelltyp in einer Dichte von ca. 3×10^4 Zellen/cm².

2.1.3.3 Einfrieren von Zellen

Der Zellrasen wurde vor dem Einfrieren auf Konfluenz sowie Zellmorphologie lichtmikroskopisch untersucht. Ausschließlich Zellen mit einem 100% konfluenten Zellrasen sowie einer einwandfreien Morphologie wurden eingefroren. Hierzu wurde der Zellrasen mit 0,5% Trypsin-EDTA abgelöst und in 10ml DMEM mit 10% FKS aufgenommen. Nach 10 min. Zentrifugation bei 600 rpm (Megafuge 1.0) wurde das Zellpellet in Einfriermedium überführt (DMEM/10%FKS/10%DMSO) und in die auf 4°C vorgekühlten Einfrierampullen mit jeweils 1ml Zellsuspension pro Ampulle verteilt. Die Einfrierampullen wurden im Einfriercontainer platziert und zunächst für 24 h bei -80°C gelagert und danach in flüssigem Stickstoff bei -180° C archiviert.

2.1.3.4 Auftauen von Zellen

Vor Entnahme des tiefgefrorenen Kryoröhrchens aus dem flüssigen Stickstoff wurden 10 ml Medium (DMEM/10%FKS) in einem 50-ml-Falcongefäß bei 37°C vorgewärmt. Das Kryoröhrchen wurde aus dem Stickstofftank entnommen und rasch in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 600 rpm (Megafuge 1.0). Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Zellpellet in 20 ml 37°C warmen Medium (DMEM/10%FKS) resuspendiert und in eine 75 cm² –Zellkulturflasche überführt. Diese wurde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.1.3.5 Aussäen von Zelllinien auf 24-well-Mikrotiterplatten zur Virusisolierung aus klinischen Materialien

Respiratorische Materialien (Nasenaspirat, Rachenspülwasser, Trachealsekret, Bronchoalveoläre Lavage) wurden neben der Untersuchung auf respiratorische Viren mittels real-time-PCR auf susceptible Zelllinien inokuliert. Um ein möglichst breites Spektrum an geeigneten Zelllinien zum Nachweis respiratorischer Viren zu gewährleisten, wurde jedes klinische Material auf jeweils 6 verschiedene Zelllinien (Tabelle 13) inokuliert. Hierzu wurden diese Zelllinien auf 24-well-Zellkulturplatten nach folgendem Schema ausgesät:

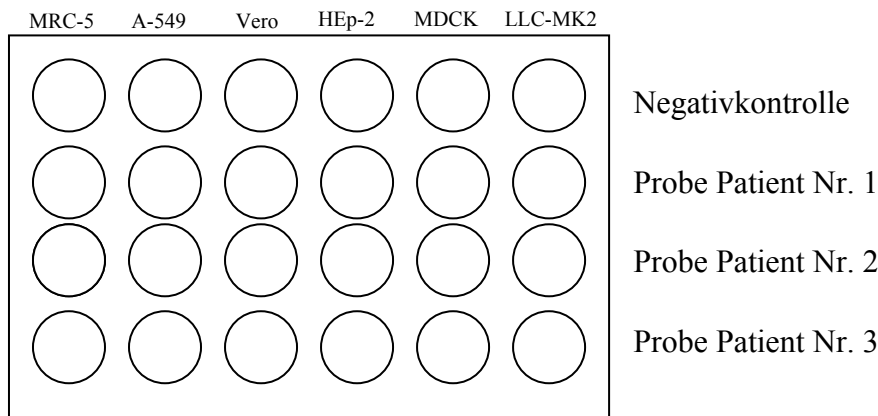


Abb. 20 : 24-well-Zellkulturplatte

Für die Aussaat auf 24-well-Zellkulturplatten wurden die obigen Zelllinien in Zellkulturflaschen der Größe T-75 kultiviert bis zum Erhalt eines konfluenten Zellrasens. Der Zellrasen wurde abtrypsiniert und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Auf Grundlage der in Tabelle 14 aufgeführten Richtwerte wurde unter Verwendung der in einer laborinternen Übersicht aufgelisteten Zellzahl-Mediumvolumenverhältnisse zu den abgelösten Zellen das erforderliche Mediumvolumen hinzugegeben und auf die 24-well-Platte wie unter Abb. 20 ausgesät. Die Aussaat auf 24-well-Zellkulturplatten erfolgte dreimal wöchentlich (montags, mittwochs und freitags), wobei eine für die Virusinfektion optimale Konfluenz des Zellrasens unter Einhaltung der in Tabelle 14 angegebenen Richtwerte zwei Tage nach Aussaat der Zellen erreicht wurde.

Tabelle 14 : Richtwerte für die Zelldichte im 24-well-Plattenformat

Zelllinie	Richtwert (Zellzahl pro well = 1,91 cm ²)
MRC-5	1,20E+04
A549	2,20E+04
Vero	1,00E+04
HEp-2	7,50E+03
MDCK	7,50E+03
LLC-MK2	5,00E+03

2.1.3.6 Aussaat von Zellen auf 96-well-Mikrotiterplatten zur Quantifizierung virushaltiger Zellkulturüberstände mittels TCID₅₀-Assay

Eine 96-well-Mikrotiterplatte wurde mit einer definierten Zellmenge einer für die Virusinfektion geeigneten Zelllinie beschickt. Hierzu wurde der Zellrasen einer T-75-Zellkulturflasche abtrypsiniert, die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer ermittelt und mit einer Zellzahl von

0,5x10⁵ Zellen/ml (1x10³ Zellen/well) ausgesät. Die Platte wurde bei 37°C im Brutschrank inkubiert bis zum Erreichen eines subkonfluenten Zellrasens.

2.1.4 Virusinfektion von Zelllinien

Tabelle 15 : Verwendete Referenzviren

Virus	Abkürzung	Stamm	Herkunft	Susceptible Zelllinie
Influenza A	Inf A	H1N1	Virologie, Düsseldorf	MDCK
Influenza A	Inf B	B/R75	ATCC; Nr: VR-789™	MDCK
Parainfluenza Subtyp 1	PIV 1	nicht näher bezeichnet	ATCC; Nr: VR-1380™	Vero
Parainfluenza Subtyp 2	PIV 2	nicht näher bezeichnet	Virologie, Düsseldorf	Vero
Parainfluenza Subtyp 3	PIV 3	HA.-1	NIH V323-002-520	Vero
Respiratory Syncytial Virus Subtyp A	RSV A	Long strain	M.A. Bioproducts; Nr.: 30-875 J	HEp-2
Respiratory Syncytial Virus Subtyp B	RSV B	RSV B Wash/ 18537/62	ATCC; Nr: VR-1580™	HEp-2
Coronavirus Subtyp 229 E	CoV 229E	nicht näher bezeichnet	ATCC; Nr: VR-740™	MRC-5
Coronavirus Subtyp OC 43	CoV OC43	nicht näher bezeichnet	ATCC; Nr: VR-759™	MRC-5
Rhinovirus Subtyp 89	Rhi	MRH V-128-001-021	ATCC; Nr: VR-1118™	MRC-5
Enterovirus Subtyp 70	Ent	J670/71	ATCC; Nr: VR-836™	MRC-5
Adenovirus Subtyp 4	AdV	nicht näher bezeichnet	Virologie Hannover	A-549

2.1.4.1 Virusinfektion

Der subkonfluente Zellrasen eines T-75-Zellkulturgefäßes wurde mit virushaltigem Zellkulturüberstand infiziert. Hierzu wurde das Virusinokulum (1-ml-Aliquots, Lagerung bei -80°C) bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 4 ml PBS auf ein Inokulationsvolumen von 5 ml aufgefüllt. Anschließend wurde zum 5 ml Gesamtvolumen 50µl Trypsin-Stocklösung (Endkonzentration 2,5 µg/ml) hinzupipettiert. Das Medium der zu inokulierenden suszeptiblen Zelllinie wurde dekantiert und der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde in die T-75 Zellkulturflasche 5 ml Virusinokulum pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C auf dem Kippschüttler inokuliert. Danach wurde die Virussuspension durch Waschen des Zellrasens mit PBS entfernt. Es wurden 25 ml Erhaltungsmedium mit 1% Trypsin (250µl) hinzugegeben und die Zellkulturflasche bis zum Erhalt eines cytopathischen Effekts bei 33°C in einem eigens auf diese Temperatur fixierten Brutschrank bei 5% CO₂ inkubiert.

2.1.4.2 Cytopathischer Effekt und Virusernte

Es erfolgte eine tägliche lichtmikroskopische Begutachtung des inokulierten Zellrasens hinsichtlich morphologischer Veränderungen im Sinne eines für das verimpfte Virus charakteristischen cytopathischen Effekts (CPE) (Tabelle 16). Bei Erhalt eines typischen CPE wurde der virushaltige Zellkulturüberstand in ein 50 ml Falcongefäß überführt und mittels steriler Einmalpipette auf 1-ml-Aliquots portioniert. Diese wurden bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung archiviert.

Tabelle 16 : Typischer cytopathischer Effekt sowie Dauer bis zum Auftreten bei den eingesetzten Viren

Virus	CPE	Dauer bis zum Auftreten (Tage)
Influenzaviren	Zellyse	3-4
Parainfluenzaviren	Fusionen	4-5
Respiratory Syncytial Virus	Fusionen	2-4
Coronavirus (Subtyp 229E)	Zellyse	3-5
Rhinovirus	Zellyse	1-2
Enterovirus	Zellyse	1-2
Adenovirus	Abrundung	2-3

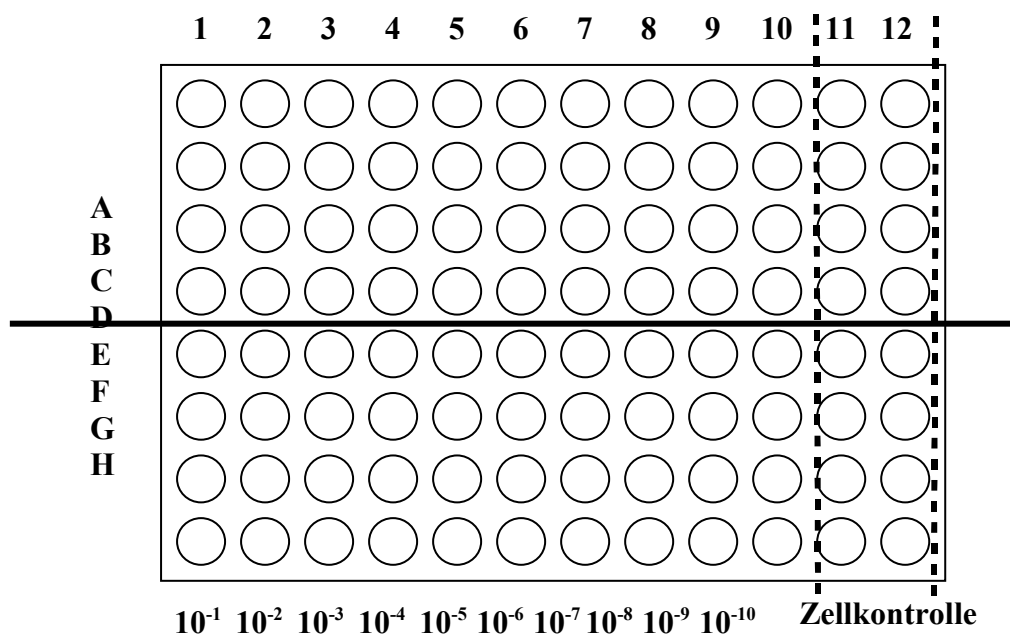
2.1.4.3 Verimpfung klinischer Materialien auf 24-well-Zellkulturplatten

Vom Patienten gewonnenes respiratorisches Material wurde zunächst in ein 15-ml-Falconröhrchen überführt und für 15 min bei 1000 rpm (1.0 Megafuge) zentrifugiert. Besonders zähe Sekrete wurden vor Zentrifugation mit Sputasol im Verhältnis 1:1 verflüssigt. Proben mit sehr geringem Ausgangsvolumen (z.B. Nasenaspirate von Säuglingen) wurden initial mit PBS auf ein Mindestvolumen von 2 ml vor Zentrifugation aufgefüllt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand durch einen Sterilfilter geschickt, welcher aufgrund seiner Porengröße (0,2 µm) ein Passagieren größerer Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) verhinderte. Das Filtrat wurde im Anschluß auf die sechs verschiedenen Zelllinien der 24-well-Zellkulturplatte mit einem Inokulationsvolumen von 300 µl pro well verimpft. Die Zellkulturplatte wurde anschließend für 2 x 15 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach Ablauf der ersten 15 Minuten wurde die Platte um 180° gedreht, um über eine gleichmäßige Zentrifugation aller wells der Zellkulturplatte eine optimale Aufnahme von Viruspartikeln in die Zellen zu ermöglichen. Im Anschluß wurde die Platte für 1 Stunde bei 37°C auf einem Kippschüttler im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der einstündigen Inkubation wurde das Inokulationsmedium vorsichtig abgesaugt, der Zellrasen mit jeweils 1ml PBS pro well gewaschen und in jedes well 1ml Erhaltungsmedium mit 1% igem Trypsin, 1% Gentamicin, 1% Fungisone und 0,3% Moronal pipettiert. Die Platten wurden im Brutschrank bei 33°C inkubiert und täglich im Hinblick auf das Auftreten eines CPE begutachtet.

2.1.4.4 Quantifizierung virushaltiger Zellkulturüberstände mittels TCID₅₀- Assay

Für die Evaluation der real-time PCR wurden virushaltige Zellkulturüberstände mittels TCID₅₀- Assay quantifiziert und die Sensitivität der PCR über die Ct-Wert Messung austitrierter virushaltiger Zellkulturüberstände bestimmt (2.6.2). Für den TCID₅₀-Assay wurde ein auf -80°C lagerndes Aliquot des zu inokulierenden Virus bei Raumtemperatur aufgetaut. Es wurde eine Verdünnungsreihe des Inokulums mit den Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-10} hergestellt. Hierzu wurden 10 Glasröhrchen vorbereitet, wobei in das erste Glasröhrchen 1,8 ml Erhaltungsmedium und in die 9 weiteren Röhrchen jeweils 1,8 ml Medium vorgelegt wurden. 200µl der aufgetauten Virussuspension wurden in das erste Glasröhrchen pipettiert und so 1:10 vorverdünnt (10^{-1}). Aus dem ersten Glasröhrchen wurden 200 µl Virus-Mediumgemisch in das zweite Glasröhrchen überführt und auf diese Weise eine 1:100 Verdünnung (10^{-2}) erzielt. Die Verdünnung des Virusinokulums wurde auf diese Weise bis in Röhrchen 10 (10^{-10}) weitergeführt. Für die Virusinfektion wurde das Medium aus den cups der 96-well-Mikrotiterplatte abgesaugt und jedes cup mit PBS gewaschen. Das Virusmediumgemisch einer jeden Verdünnungsstufe wurde mittels Mehrkanalpipette in die entsprechende Spalte der 96-well Mikrotiterplatte pipettiert (Abb. 21). Die Mikrotiterplatte wurde bei 33°C im Brutschrank inkubiert und täglich auf das Auftreten eines cytopathischen Effekts untersucht.

Abb. 21: Pipettierschema TCID₅₀-Assay



2.2 Nachweis von RSV-, Influenza- und Parainfluenza-Antigen (Schnelltest)

Jeweils zwei cups der für den Schnelltest verwendeten Objektträger wurden im Vorfeld mit einer Positivkontrolle, bestehend aus virusinfizierten Zellen beschichtet, acetonfixiert und bis zu ihrem Einsatz bei -20° C gelagert. Untersuchungsproben mit respiratorischem Material wurden aus ihrem Originaltransportgefäß in ein 15-ml-Falconröhrchen überpipettiert und für 10 min bei 900 rpm (1.0 Megafuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet nach mehrmaliger Resuspension mittels steriler Pipette mit einem Volumen von jeweils 20µl pro cup im Zweifachansatz auf den Objektträger aufgetragen. Der Objektträger wurde vor Fixierung mit eiskaltem Aceton unter der laufenden Werkbank luftgetrocknet und anschließend für die Inkubation mit dem FITC-markierten Antikörper in eine feuchte Kammer gelegt und in jedes mit Patientenmaterial belegte cup sowie in die Positiv- und Negativkontrolle wurde 1 Tropfen des Antikörpers pipettiert. Die anschließende Inkubation fand bei 37°C für 15 min bzw. 30 min für den Influenzavirus B-Nachweis statt. Nach Waschen des Objektträgers mit PBS und anschließender Lufttrocknung wurden die zu untersuchenden cups mit jeweils einem Tropfen mounting fluid beladen und der Objektträger mit einem Deckglas abgedeckt. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop zum Nachweis einer spezifischen Fluoreszenz im Falle der mit Virus infizierten Zellen sowie der mitgeführten Positivkontrolle. Nicht infizierte Zellen sowie die Negativkontrolle zeigten keine spezifische Fluoreszenz, sondern lediglich die Gegenfärbung mit Evans Blue als dunkelrote Färbung. In Abhängigkeit von den eingesetzten Fluoreszenzantikörpern zeigte sich bei den als positiv befundenen Untersuchungsmaterialien folgendes Fluoreszenzmuster:

SimulFluor **RSV/Flu A**:

- RSV-infizierte Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz
- Influenza A- infizierte Zellen zeigen eine gelbe Fluoreszenz

SimulFluor **Flu A/Flu B**:

- Influenza A-infizierte Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz
- Influenza B-infizierte Zellen zeigen eine gelbe Fluoreszenz

SimulFluor **Para1,2,3/Adeno**:

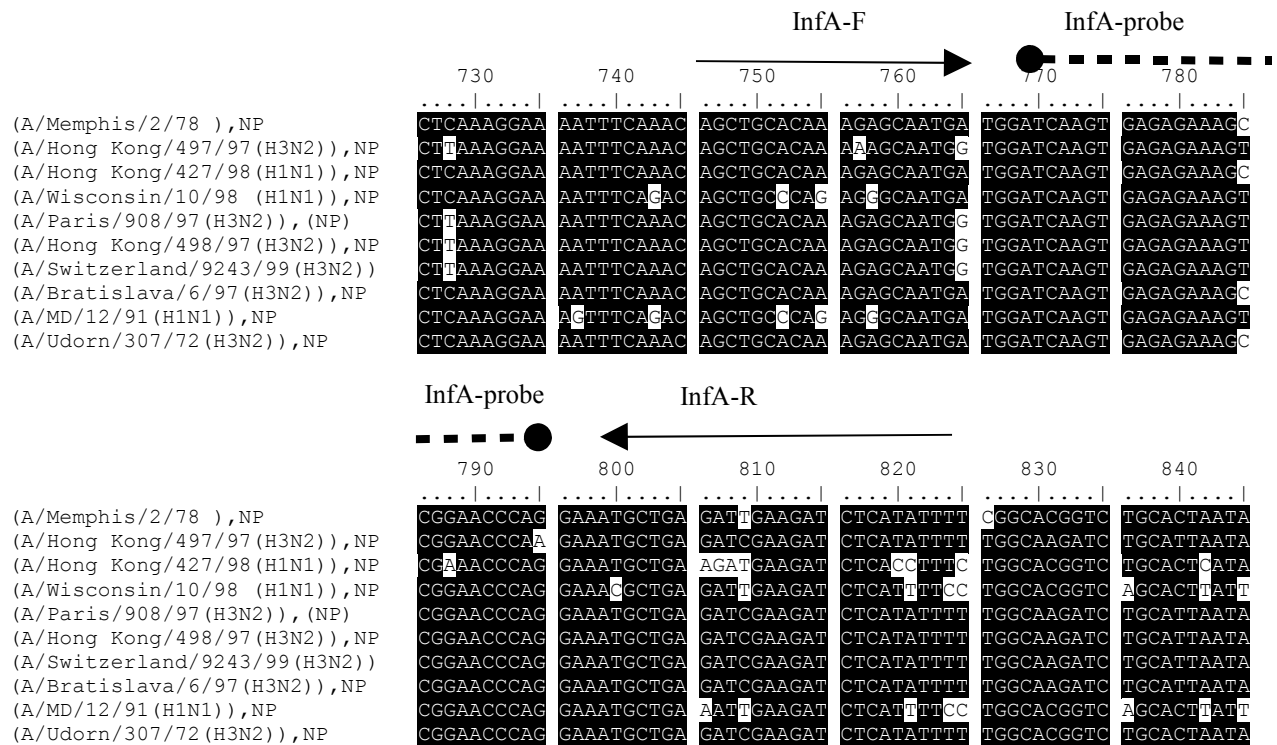
- Parainfluenza 1,2,3 -infizierte Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz
- Adenovirus- infizierte Zellen zeigen eine gelbe Fluoreszenz

2.3 Auswahl geeigneter Primer und Sonden für die Real-Time-PCR

2.3.1 Suche nach konservierten Regionen im viralen Genom

Für Influenzavirus A und B, Respiratory Syncytial Virus A und B, Parainfluenzaviren 1, 2 und 3 sowie für das humane Bocavirus wurden in der NCBI-Genbank publizierte Referenzsequenzen auf das Vorliegen ausreichend konservierter Genomregionen für einen PCR-Nachweis ausgewertet. Dies erfolgte über die Durchführung von Alignments in einer spezialisierten Software (BioEdit). Sowohl geographische Herkunft als auch Zeitraum der Sequenzierung wurden bei Zusammenstellung der für das Alignment ausgewählten Referenzsequenzen berücksichtigt, um die Detektion hochkonservierter Genomregionen als Grundlage für den PCR-Nachweis sicherzustellen. Nach Auswahl einer geeigneten Genomregion wurde die Nukleotidsequenz dieses Genomabschnitts ins Primer-Express-Programm importiert. Unter Anwendung definierter Algorithmen u.a. hinsichtlich der maximalen Amplikonlänge, des G-C-Gehalts und der Schmelztemperatur wurden über diese Software geeignete Primer- und Sondensequenzen für die Amplifikation im real-time TaqMan-PCR-Format ermittelt. Primer und Sonden wurden kommerziell synthetisiert. Um eine Amplifikation im Du- und Triplexformat zu ermöglichen, wurden die Sonden am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden Farbstoff („black hole quencher“, BHQ) sowie am 5'-Ende mit einem von drei Reporterfarbstoffen (FAM, HEX oder Cy-5) versehen. Die sich aus dem Alignment ergebenden Sequenzen lauten z.B. für das Influenza A-Virus: Inf A-F AGC TGC **MCA RAG RGC** AAT GG, Inf A-R **RAA DAT** GAG ATC TTC **RAT YTC** AGC **RT** und Inf A-pr: *FAM*-ATC AAG TGA GAG AAA GYC GGA ACC CAG G-*BHQ* (Abb. 22). Die in Fett gedruckten Buchstaben bezeichnen Positionen in den Primern bzw. der Sonde, die mit 2 oder mehr verschiedenen Basen besetzt sind („wobbles“), um die gefundenen natürlichen Mutationen abzudecken. Eine vollständige Übersicht der ausgewählten Genomregionen sowie der eingesetzten Primer- und Sondensequenzen ist in Tabelle 21 .

Abb. 22: Alignment NP-Gen, Influenza A, BioEdit –Software. Mit Pfeilen gekennzeichnet: Forward primer Inf-A-F und Reverse Primer Inf-A-R. Gepunktete Linie: TaqMan™-Sonde Inf A-probe



2.3.2 Vortestung der Primer und Sonden mittels Sybr green® und TaqMan™ PCR

2.3.2.1 Reverse Transkription

Mit Ausnahme von Adeno- und Bocaviren handelte es sich bei allen auszutestenden Viren um RNA-Viren in Negativ (Influenza-, Parainfluenzaviren, RSV und HMPV) bzw. Positivstrangorientierung (Rhino, Entero, Coronaviren), deren Genom vor Amplifikation in der Sybr green®- bzw. TaqMan™-PCR unter Verwendung des forward-primers (-RNA-Viren) bzw. reverse-primers (+RNA-Viren) sowie einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden mußte. Hierzu wurde das virale Genom extrahiert und 2,5 µl der viralen RNA für 5 min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurde die Probe mit 18µl des Reverse-Transkriptionsgemisches (Tabelle 17) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde der Reaktionsansatz im Anschluß für 5 min auf 95°C erhitzt.

Tabelle 17: Reaktionsgemisch Reverse Transkription

	1x-Ansatz (μl)	Konzentration
10 x RT buffer	2	--
dNTP-Mix	2	5 μ M
Sensiscript RT	1	4u/ μ l
Primer-F	3,33	3 μ M
Aqua dest.	9,67	--
Gesamtvolumen	18	--

2.3.2.2 Sybr green® und TaqMan™ PCR

Die Austestung der für den Virus-Nukleinsäurenachweis ausgewählten Primer sowie der dazugehörigen Sonde erfolgte in zwei Stufen: zunächst wurde die Funktionalität der Primer mittels Sybr green® Assay überprüft und anschließend der PCR-Nachweis über Austestung der Sonde im real-time PCR-Format ergänzt. Die Auswertung der PCR-Untersuchungen erfolgte über die thermocyclerspezifische Software, wobei für beide Assays das Auftreten von sigmoiden Wachstumskurven als Nachweis einer erfolgreichen Amplifikation maßgeblich war. Darüberhinaus diente die Schmelzkurvenanalyse beim Sybr green® Assay mit Nachweis einer hohen Schmelztemperatur bis zur Trennung des DNA-Doppelstrangs und der damit einhergehenden Freisetzung des Farbstoffs als Kriterium für die Generierung von spezifischen PCR-Produkten. Mittels Sybr green® PCR generierte Amplifikate wurden über die Auftrennung im 1,5% Agarosegel abschließend analysiert.

Tabelle 18: Reaktionsschema und Thermal Protokoll für den Sybr Green® Assay

Komponente	1x Ansatz (μl)	Endkonzentration
Sybr Green PCR Master Mix	5	--
F-primer	5	300nM
R-primer	5	300nM
Aqua dest	10	300nM
Gesamtvolumen	45	--

Einsatzvolumen der Probe: 5 μ l

Die Amplifikation erfolgte auf Grundlage des real-time PCR Thermalprotokolls von Applied Biosystems (Tabelle 20).

Tabelle 19: Reaktionsschema und Thermal Protokoll für den real-time-PCR Assay

Komponente	1x Ansatz (μl)	Endkonzentration
Universal Master Mix	5	--
F-primer	5	300nM
R-primer	5	300nM
Sonde	5	300nM
Aqua dest	5	--
Gesamtvolumen	45	

Einsatzvolumen der Probe: 5µl

Tabelle 20: Thermal Protokoll

	Initiale Denaturierung	Ein-Schritt Annealing/Extension		nach Ende der 45 Zyklen, Kühlung bis zur Weiterverarbeitung
Temperatur	95°C	95°C	60°C	4°C
Zeit	10 min	15 s	1 min	unendlich
Zyklenzahl	1	45		--

Tabelle 21: Verwendete Primer und Sonden für den Nachweis von Respirationstraktviren

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Zielgen	Amplikonlänge
Inf A-F	AGCTGCMCARAGRCAATGG	NP (719-738)	
Inf A-R	RAADATGAGATCTTCRATYTCAGCRT	NP (772-797)	
Inf A-pr	FAM-ATCAAGTGAGAGAAAGYCGGAACCCAGG-BHQ	NP (742-769)	79 bp
Inf B-F	CCCTGCTTGCTCGWAGYATGG	NP (987-1007)	
Inf B-R	TGCTTATGGGAAGMACYACTTTG	NP (1033-1055)	69 bp
Inf B-pr	HEX-CGTTGTTAGGCCCTCTGTGGCGA-BHQ	NP (1009-1031)	
PIV1-F	TGATTTAAACCCGGTAATTTCTCA	HN (7619-7642)	
PIV 1-R	GGCAAGGAGCATAACTGATAACC	HN (7701-7723)	
PIV 1-pr	FAM-ACAGGARATCATGTTCTGTAATAGCTGCAGGA-BHQ	HN (7663-7694)	105 bp
PIV 2-F	CTGGAGTCATGCCATGCAAT	HN(8159-8178)	
PIV 2-R	GGCCACACATCTGCGTACAC	HN(8215-8234)	
PIV 2-pr	HEX-CAACAAGTTTTTGCCCTGCTA ATTGCATC-BHQ	HN(8180-8208)	76 bp
PIV 3-F	AAAGGCAAATAATATTTCTCGGG TAT	HN(7790-7816)	
PIV 3-R	CCCGGGACACCCAGTTGT	HN (7859-7876)	
PIV 3-pr	Cy-5-TGAACATCCAATAAATGAGAATGYAATCTG-BHQ	HN (7825-7854)	87 bp
RSV A-F	TCTTAAATCTRTAGCACAAATCACATTATC	G (4788-4817)	
RSV A-R	TGATGGCTGCAATTATAAGTGAAGTT	G (4839-4864)	
RSV A-pr	FAM-TGGCAATGATAATCTC-MGB	G (4823-4838)	77 bp
RSV B-F	TTTAAATCTATAGCACAAATAGCACTATC	G (4789-4818)	
RSV B-R	TTATGGCTGCAATTATGAGAGAGGTT	G (4840-4865)	
RSV B-pr	FAM-TGGCAATGATAATCTC-MGB	G (4824-4839)	77 bp
HMPVA-F	GGGTCAGAGAGAGTACAGCAGATTC	N (277-301)	
HMPVA-R	CCCCAAAGAGTACGTTCTGGTT	N (336-357)	
HMPVA-pr	HEX-AACTCAGGCAGTGAAGTCCAAGYGGTYT-BHQ	N (307-334)	81 bp
HMPV B-F	AAACAATGGTGACTTTGCTAA AGGA	N (452-476)	
HMPV B -R	TTGGTGTGTCTGGTGCTGAAG	N (509-529)	
HMPV B -pr	FAM-TCATCAGGTAACATCCCACAAAACCAGAGG-BHQ	N (478-507)	78 bp
Adeno-F	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT	Hexon (157-181)	
Adeno -R	GCCCCAGTGGTCTTACAT GCACATC	Hexon (267-281)	
Adeno -pr	HEX-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-BHQ	Hexon (197-225)	111 bp

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Zielgen	Amplikonlänge
<i>CoV229E -F</i>	CAGTCA AATGGGCTGATGCA	N (25693-25712)	
<i>CoV229E -R</i>	AAAGGGCTATAAAGAGAATAAGGTAT TCT	N (25740-25768)	
<i>CoV229E -pr</i>	FAM-CCCTGACGACCACGTTGTGGTTCA-BHQ	N (25715-25738)	76 bp
<i>CoVOC43-F</i>	CGATGAGGCTATTCCGACTAGGT	N (29607-29629)	
<i>CoVOC43-R</i>	CCTTCCTGAGCCTTCAATATAGTA ACC	N (29656-29682)	
<i>CoVOC43-pr</i>	HEX-TCCGCCTGGCAGGTACTCCCT-BHQ	N (29631-29652)	76 bp
<i>CoVNL63-F</i>	ACGTACTTCTATTATGAAGCATGATATTAA	R (6055-6084)	
<i>CoVNL63-R</i>	AGCAGATCTAATGTTATACTTAAA ACTACG	R (6128-6157)	
<i>CoVNL63-pr</i>	Cy-5-ATTGCCAAGGCTCCTAAACGTACAGGTGTT-BHQ	R (6089-6118)	103 bp
Ent-F	GACATGGTGYGAAGAGTCTAT TGA	5'NCR (409-432)	
Ent-R	GCTCCGCAAGTTAGGATTA GCC	5'NCR (464-484)	
Ent-pr	HEX-GTAGTCCTCCGGCCCCCTGAATGC-BHQ	5'NCR (441-463)	76 bp
<i>Rhi-F</i>	TGGACAGGGTGTGAAGAGC	5'NCR (396-414)	
<i>Rhi-R</i>	CAAAGTAGTCGGTCCCATCC	5'NCR (520-539)	
<i>Rhi-pr</i>	FAM-TCCTCCGGCCCCCTGA ATG-BHQ	5'NCR (434-451)	144 bp
Boc-F	TCGGGCTCATATCATCAGGAA	NP-1 (2554-2574)	
Boc-R	CACTTGGTCTGAGGTCTTCGAA	NP-1 (2607-2628)	
Boca-pr	Cy-5-CCCAATCAGCCACCTATCGTCTTGC-BHQ	NP-1 (2577-2601)	75 bp

In Kursiv dargestellt: aus Publikationen stammende Primer- und Sondensequenzen ¹⁷

2.4 Herstellung von Viren-kodierenden Plasmiden

Die Herstellung von Plasmidstandards als Grundlage eines quantitativen PCR-Nachweises erfolgte über die Insertion von PCR-Amplifikaten, welche mit den Restriktionssites EcoRI und BamHI versehen waren in einen Standardvektor, welcher nach Transfektion in kompetente Zellen die Vervielfältigung des PCR-Amplikats ermöglichte. Die Plasmide wurden anschließend von der genomischen *E.coli*-DNA abgetrennt, gereinigt und über eine photometrische Messung (OD₂₆₀) quantifiziert.

2.4.1 Amplifikation

Die Amplifikation der Zielregion des zu klonierenden Virus erfolgte unter Einsatz von Klonierungsprimern, welche im Falle des F-primers mit einer EcoRI- (GAATTC) sowie im Falle des R-primers mit einer BamHI-site (GGATCC) am 5'Ende versehen waren. Es wurden die in Tabelle 21 aufgelisteten Sequenzen der F- und R-primer unter Hinzufügen der jeweiligen Restriktionssite verwendet. Vor der Klonierungs-PCR mußte im Fall der Viren mit RNA-Genom die virale Nukleinsäure durch einen reverse Transcriptase-Schritt in cDNA umgeschrieben werden (2.3.2.1). Für die Klonierungs-PCR wurde die Pwo-Polymerase eingesetzt, welche über eine intrinsische proof-reading-Aktivität eine Transkription mit einer Fehlerrate von nur 3,2 pro 10⁶ Basen ermöglicht. Im Vergleich dazu hat die vielbenutzte Taq-Polymerase eine Fehlerrate von 26 pro 10⁶ Basen. Amplifikationsbedingungen der Klonierungs-PCR sind in Tabelle 22 beschrieben.

Tabelle 22: Reaktionsschema für die Klonierungs-PCR von Respirationstraktviren

	1 x Ansatz (μl)	Endkonzentration
10x Buffer	10	--
dNTP-Mix	2	200 μ M
Pwo- Polymerase	0,5	--
Klonierungsprimer F	10	500nM
Klonierungsprimer R	10	500nM
Aqua dest.	62,5	--
Gesamtvolumen	95	--

Einsatzvolumen der Probe: 5 μ l

Standard Thermal-Protokoll für die Real-Time PCR (Tabelle 20)

2.4.2 DNA-Extraktion

Die Aufreinigung der amplifizierten viralen DNA erfolgte mit einem kommerziellen Kit (Qiaquick PCR Purification Kit). Die Fällung der DNA erfolgte über Zugabe des Puffers PB I (mit Guanidinhydrochlorid und Isopropanol) im Volumenverhältnis Probe zu Puffer von 1:5. Das Probenpuffergemisch wurde in eine QiAquick Spinsäule pipettiert und für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert, um eine Bindung der ausgefällten DNA an die Silicamembran der Spinsäule zu gewährleisten. Nach einem Waschschriff mit 750 μ l PE Puffer (auf Ethanolbasis) und erneuter Zentrifugation wurde die an die Spinsäule gebundene DNA durch Zugabe von 50 μ l Puffer EB (10mM Tris-Cl) und erneuter Zentrifugation eluiert.

2.4.3 Restriktionsenzymverdau

Um eine Aufnahme des PCR-Produkts in den Vektor zu ermöglichen, wurden beide über die Aktivität von Restriktionsendonukleasen an den EcoRI- bzw. BamHI-sites geschnitten. Hierzu wurden 5 μ l des DNA Extrakts sowie 5 μ l Vektor (1 μ l Vektor in 4 μ l Aqua dest.) mit den Restriktionsendonukleasen und Puffer nach folgendem Ansatz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert:

Tabelle 23: Ansatzschema Restriktionsendonucleaseverdau von Vektor bzw. PCR-Produkt

	Volmen (μl)	Volmen (μl)
Vektor	1	--
PCR-Produkt	--	5
EcoRI	1	1
BamHI	1	1
Puffer	2	2
Aqua dest	15	11
Gesamtvolumen	20 μ l	20 μ l

Für die Ligation wurden im Anschluß die enzymatisch verdauten DNA-Fragmente im low-melt-Agarosegel aufgetrennt (NuSieve 1,2% versetzt mit Ethidiumbromid, 0,4 μ g/ml) und die spezifischen Banden unter langwelligem UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

2.4.4 Ligation

Für die Ligation wurden die Agarosegelbanden, welche den Vektor bzw. das DNA-Fragment (Insert) enthielten, bei 68°C verflüssigt und 1µl Vektor mit 2µl Insert nach folgendem Ansatzschema für 1 Stunde bei 37°C und schließlich über Nacht bei 14°C unter Einwirkung der DNA-Ligase inkubiert:

Tabelle 24: Ansatzschema für die Ligation von Vektor und Insert

	Volmen (µl)
Vektor	1
Insert	2
T4-DNA-Ligase	1
10x Ligationspuffer	2
Aqua dest	15
Gesamtvolumen	21µl

2.4.5 Transfektion

Zu 100µl transfektionskompetener *E.coli*-Suspension wurden 5µl Ligationsgemisch pipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme des Vektors in die *E.coli* wurde über eine 90-s-Inkubation bei 42°C und sofortiger anschließender 90-s-Inkubation auf Eis ermöglicht. Im Anschluß wurden die *E.coli* in 800µl SOB-Medium mit 5µl 2M MgCl₂ sowie 20µl 1M Glucose überführt und 1 Stunde bei 37°C bei 200 rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Das bakterienhaltige Medium wurde nach Inkubation mit jeweils 300µl pro Platte auf ampicillinhaltigen Agarplatten (100µg Ampicillin/ml) ausgestrichen und über bei Nacht bei 37°C bebrütet. Erfolgreich transfizierte *E.coli* verfügten über eine vektorassoziierte Ampicillinresistenz, so daß nur vektorhaltige *E.coli* auf den ampicillinhaltigen Agarplatten zur Koloniebildung kommen konnten.

2.4.6 Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde in kleinen Mengen mittels Minipräparation sowie in größeren Mengen mittels Maxipräparation gewonnen. Die Minipräparation von Plasmid-DNA sowie die Durchführung eines Kontrollrestriktionsverdaus mit anschließender Detektion der Fragmente diente der Dokumentation des Transfektionserfolgs über den Nachweis der ligierten Fragmente (Vektor und Insert) im Agarosegel. Größere über die Maxipräparation extrahierte Plasmidmengen wurden für die Herstellung von Positivkontrollen mit definierter Kopienzahl (Plasmidstandards) als Grundlage für den quantitativen PCR-Nachweis hergestellt. Zur Mini- und Maxipräparation wurden Bakterienkolonien von der Agarplatte gelöst und in ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht im Bakterienrotator bei 37°C bebrütet. Am Folgetag wurde die zu

extrahierende Plasmid-DNA durch Lyse der Bakterienzellmembran unter Zugabe der Puffer P1, P2 und P3 freigesetzt. Im Falle der Maxipräparation wurde die extrahierte DNA nach Bindung an eine Resinmembran (Qiagen-tip Säule) eluiert, in 200µl Min-TE aufgenommen und anschließend photometrisch über Messung der OD₂₆₀ justiert.

2.4.7 Herstellung von Plasmidstandards als Grundlage für den quantitativen PCR-Nachweis

Für den quantitativen PCR-Nachweis wurde ein Plasmidmix zusammengestellt bestehend aus allen für die Respiratorische-Viren-PCR relevanten viralen Plasmiden mit einer Ausgangsmenge von jeweils 10¹⁰ Molekülen viralen Plasmids in Minimal-TE. Aus diesem Plasmidmix wurden 20µl entnommen und in Minimal-TE 1:10 vorverdünnt, was in einer Gesamtmolekülzahl von 10⁹ eines jeden Virusplasmids resultierte. Da das PCR-Einsatzvolumen des templates 2,5µl war und der Gesamtansatz sich auf 25µl Gesamtvolumen belief, wurde der Plasmidmix nach dem in Tabelle 25 dargestellten Pipettierschema bis zu den Verdünnungsstufen 25.000 Kopien, 2.500 Kopien und 250 Kopien bezogen auf 2,5µl Einsatzvolumen ausverdünnt. Diese Verdünnungsstufen kamen in der Respiratorische-Viren PCR zur Generierung der Standardkurve als Grundlage der Viruslastbestimmung zum Einsatz.

Tabelle 25 : Verdünnungsreihe zur Herstellung der PCR-Plasmidstandards

	1	2	3	4	5	6	7	8
Min-TE (µl)	225	900	900	900	900	900	900	900
Plasmidmix (µl)	25							
Übertrag (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100
Kopien/2,5µl	2,5x10 ⁹	2,5x10 ⁸	2,5x10 ⁷	2,5x10 ⁶	2,5x10 ⁵	2,5x10⁴	2,5x10³	2,5x10²

Tabelle 26 fasst alle für die vorliegende Arbeit erstellten Plasmide zusammen:

Tabelle 26: Liste aller hergestellten Plasmidstandards

Virus	Plasmidbezeichnung	Virus	Plasmidbezeichnung
Influenza A	pSGInfA	Coronavirus 229E	pSGCoV229E
Influenza B	pSGInfB	Coronavirus NL63	pSGCoVNL63
Parainfluenza 1	pSGPIV1	Coronavirus OC43	pSGCoVOC43
Parainfluenza 2	pSGPIV2	Adenovirus	pSGAdHex5
Parainfluenza 3	pSGPIV3	Rhinovirus	pSGCoV229E
Respiratory Syncytial Virus A	pSGRSVA	Enterovirus	pSGCoxB3
Respiratory Syncytial Virus B	pSGRSVB	Bocavirus	pSGBoca
Humanes Metapneumovirus A	TopoClonHMPVA		
Humanes Metapneumovirus B	TopoClonHMPVB		

2.5 Untersuchung von Respirationstraktmaterialien in der One-Step Real-Time RT-PCR („Respiratorische Viren PCR“)

Die simultane Untersuchung der oben genannten respiratorischen Viren in klinischen Materialien wurde durch den Einsatz des Quantitect Multiplex PCR Kits (Qiagen) ermöglicht. Dieses Kit beinhaltet sowohl eine reverse Transkriptase als auch eine Polymerase, so daß die Durchführung der reversen Transkription des viralen RNA-Genoms als auch die anschließende Amplifikation in einem Reaktionsansatz („one step“) durchgeführt werden konnte. Darüberhinaus ist die Zusammensetzung des PCR-Mastermixes speziell für Multiplexanwendungen modifiziert, so daß Primerpaare und Sonden für die Detektion unterschiedlicher Viren in einem Reaktionswell zusammengefasst werden konnten. Vorversuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit hatten gezeigt, daß dieses Reagenz im Vergleich zu Reagenzien anderer Hersteller die höchste Sensitivität in Duplex/Triplex-PCR-Ansätzen besitzt.

Die Respiratorische Virus PCR wurde in zwei Schritten durchgeführt: im ersten PCR-Lauf wurde das Eluat mittels Du-/Triplex-Assay auf das Vorhandensein eines oder mehrerer respiratorischer Viren untersucht. Im Falle eines positiven Ergebnisses wurde aus demselben Eluat die Viruslast in einem Monoplex-assay bestimmt. Sämtliche für den PCR-Nachweis relevanten Komponenten (Primer und Sonden, QuantiTect Master Mix) wurden im Vorfeld auf PCR-Reaktionsstreifen vorpipettiert und bis zur Weiterverarbeitung auf -20° C gelagert („frozen strips“).

2.5.1 Aufarbeitung klinischer Materialien

In der one-step real-time PCR wurden folgende Respirationstraktmaterialien untersucht: Sputum, Nasen- und Rachenspülwasser, Trachealsekret sowie bronchoalveoläre Lavage. Besonders zähe

Sekrete wurden für die weitere Untersuchung durch die Zugabe von Sputasol (N-Acetyl-Cystein) im Volumenverhältnis 1:1 und anschließender 5 minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm verflüssigt. Alle respiratorischen Materialien wurden 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und anschließend 200µl des Überstands für die Nukleinsäureextraktion entnommen. Das verbleibende Material wurde als Rückstellprobe bei -80°C archiviert.

2.5.2 Automatisierte RNA-und DNA-Extraktion

Da es sich bei den nachzuweisenden Respirationstraktviren sowohl um RNA- als auch um DNA-Viren handelt, wurde das EZ-1- Virus Minikit (Qiagen) verwendet, welches die Extraktion von viraler RNA und DNA unter Verwendung von Reaktionskassetten mit den für die Extraktion notwendigen Chemikalien (Proteinase K, Isopropanol u.a.) ermöglichte. Die Extraktion erfolgte automatisiert über die Bindung der viralen Nukleinsäure an silicabeschichtete Magnetpartikel mit dem EZ-1-BioRobot (Qiagen). Aus den 200µl der aufgearbeiteten Untersuchungsprobe wurden 60µl eluiert. Pro well des PCR-Reaktionsstreifens wurden jeweils 2,5µl des Eluats eingesetzt, das verbleibende Material bei -80 C archiviert.

2.5.3 Qualitativer Virusnachweis mittels One-Step Du-/Triplex Real-Time PCR

Das Reaktionsgemisch bestehend aus Quantitect PCR Master Mix, Reverse Transkriptase Mix sowie die für den PCR-Nachweis erforderlichen Primer-und Sonden wurden wie in Tabelle 25 beschrieben angesetzt und in definierter Position auf dem 8-well PCR-Reaktionsstreifen verteilt (Tabelle 28)

Tabelle 27: Pipettierschema für den PCR-Nachweis von Respirationstraktviren im Multiplexansatz

PCR-Assay:	Monoplex 1x-Ansatz (µl)	Duplex 1x-Ansatz (µl)	Triplex 1x-Ansatz (µl)	Endkonzentration
2xQuantitect PCR Mastermix	12,5	12,5	12,5	1x
F-Primer Virus 1	0,5	0,5	0,5	500 nM
R-Primer Virus 1	0,5	0,5	0,5	500 nM
Sonde Virus 1	0,5	0,5	0,5	500 nM
F-Primer Virus 2	--	0,5	0,5	500 nM
R-Primer Virus 2	--	0,5	0,5	500 nM
Sonde Virus 2	--	0,5	0,5	500 nM
F-Primer Virus 3	--	--	0,5	500 nM
R-Primer Virus 3	--	--	0,5	500 nM
Sonde Virus 3	--	--	0,5	500 nM
Multiplex Reverse Transkriptase Mix	0,25	0,25	0,25	
Aqua dest.	8,25	6,75	5,75	
Gesamtvolumen	22,5	22,5	22,5	

Tabelle 28: Positionsbelegung des PCR-Reaktionsstreifens

Position	PCR-Ansatz	Primer-und Sonden
1	Duplex	Influenza A
		Influenza B
2	Triplex	Paraflu 1
		Paraflu 2
		Paraflu 3
3	Duplex	HMPV A
		Adenoviren
4	Triplex	Corona 229 E
		Corona OC43
		Corona NL63
5	Duplex	RSV A
		HMPV B
6	Duplex	Rhinoviren
		Boca
7	Duplex	RSV B
		Enteroviren
8	leer	--
		--

2.5.4 Amplifikation und Auswertung der Multiplex-PCR

Die Amplifikation erfolgte mit dem Thermocycler 7500 (Applied Biosystems) nach folgendem Thermalprotokoll:

Tabelle 29: Thermalprotokoll der one-step du-/triplex real-time PCR

	Reverse Transkription	Initiale Denaturierung	Ein-Schritt Annealing/Extension	
Temperatur	50°C	95°C	94°C	60°C
Zeit	20 min	15 min	45 s	1,15 min
Zyklenzahl	1	1	45	
Gesamtdauer	2 h 40 min			

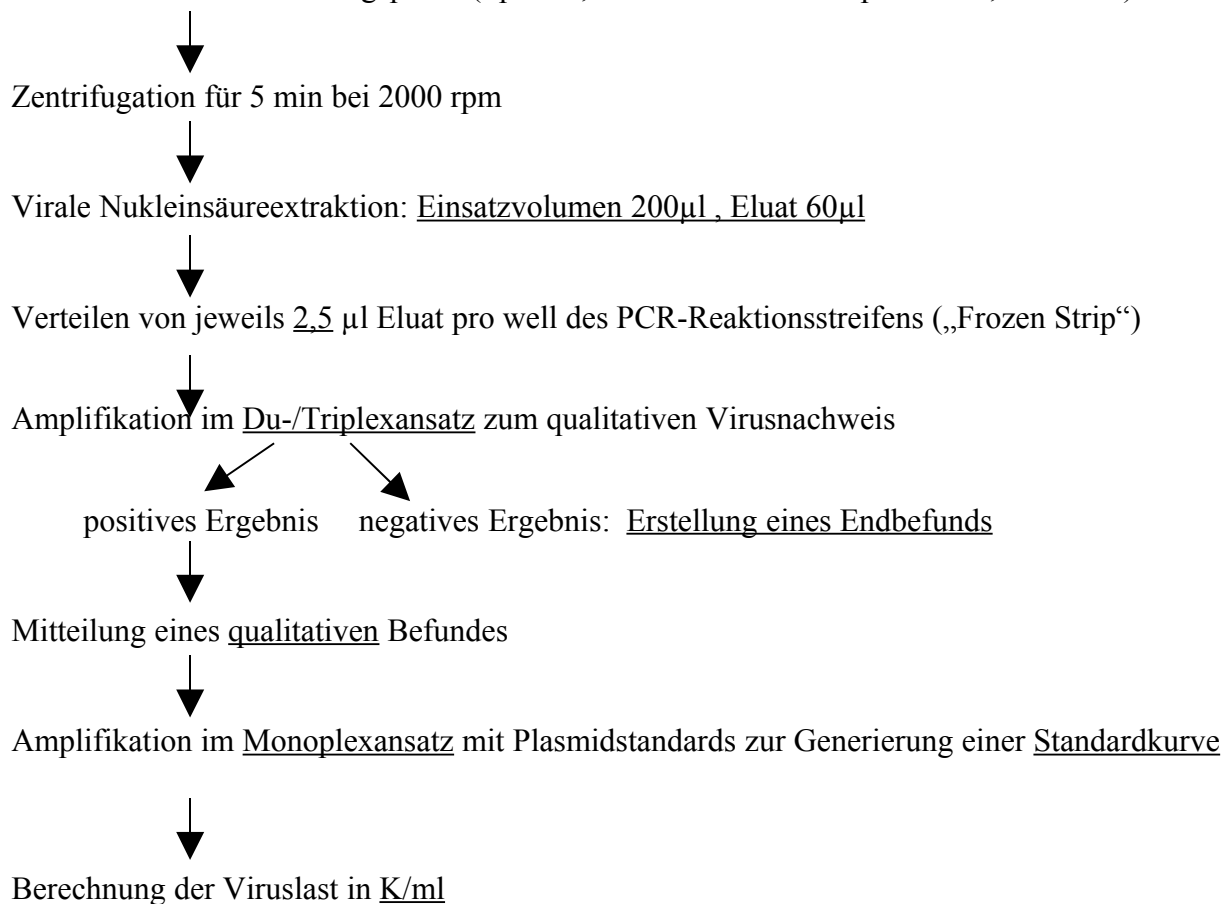
In jedem PCR-Lauf wurde eine Positivkontrolle mitgeführt, welche sich aus den Plasmiden von allen in der PCR nachzuweisenden Viren zusammensetzte. Die Auswertung des PCR-Laufs erfolgte über die Software gestützte (ABI 7500 SDS) Detektion und Beurteilung von Amplifikationskurven. Eine Untersuchungsprobe wurde bei Nachweis von einer oder mehrerer Amplifikationskurven als positiv für das Vorliegen von einer bzw. mehrerer (virale Koinfektion) Respirationstraktviren im eingesandten Material beurteilt. Der Du-/Triplex-PCR-Lauf wurde als qualitativer Ansatz durchgeführt. Im Falle des Nachweises einer oder mehrerer Respirationstraktviren wurde das Untersuchungsmaterial in einer quantitativen Monoplex-PCR zur Ermittlung der Viruslast amplifiziert (2.5.5).

2.5.5 Quantitativer Virusnachweis mittels One-Step Monoplex Real-Time PCR

Zur Quantifizierung eines zuvor als PCR-positiv getesteten Materials wurden für die Berechnung einer Standardkurve drei Virusplasmidstandards mit einer Gesamtkopienzahl von 25.000 K/2,5µl (Standard 1), 2.500 K/2,5µl (Standard 2) sowie 250 K/2,5µl (Standard 3) mitgeführt bei gleichem Thermalprotokoll (Tabelle 29). Das Programm berechnet mittels linearer Regression die Standardkurve, anhand derer die Untersuchungsproben quantifiziert werden.

Abb. 23 : Untersuchungsverfahren zum Nachweis respiratorischer Viren in klinischen Materialien mittels qualitativer one-step du-/triplex - und quantitativer one-step monoplex PCR

Entnahme der Untersuchungsprobe (Sputum, Nasen-oder Rachenspülwasser, BAL u.a.)



2.6 Evaluation der One-Step Multiplex Real-Time PCR

2.6.1 Spezifität

Zum Ausschluss von Kreuzreaktionen wurden extrahierte Zellkulturüberstände bzw. Plasmide der im Assay vorkommenden Respirationstraktviren in hohen Konzentrationen zu jedem der Reaktionsansätze der one-step real-time PCR gegeben und amplifiziert. Darüberhinaus wurde die PCR im Hinblick auf Kreuzreaktionen mit Viren und Bakterien getestet, die im

Respirationstrakt vorkommen können: Herpes simplex Virus Typ 1 und 2, Humanes Cytomegalievirus, Humanes Herpesvirus 6, Epstein-Barr Virus, Parvovirus B-19, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*. Es wurden keinerlei Kreuzreaktionen mit den genannten Erregern gefunden.

2.6.2 Bestimmung und Vergleich der unteren Nachweisgrenzen (Du/Triplexassay versus Monoplex)

Die methodische Evaluation der Du-/und Triplexassays erfolgte über die Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen sowie über deren Vergleich mit der jeweiligen unteren Nachweisgrenze des Monoplexansatzes. Hierfür wurden Verdünnungsstufen der viralen Plasmidsstandards (Verdünnungsstufen $2,5 \times 10^6$ bis $2,5 \times 10^0$ K/ml) und bei passagierbaren Viren der Zellkulturüberstände hergestellt (Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-10}). Die Verdünnungsstufe, bei der noch eine Amplifikationskurve nachweisbar war, wurde als untere Nachweisgrenze definiert. In Abb. 24 ist am Beispiel von Influenza A die Vorgehensweise zur Ermittlung der unteren Nachweisgrenze sowie zum Vergleich des Du-/Triplex- mit dem Monoplexassay dargestellt.

	Reaktionsstreifen 1 (Influenza A/B Duplex)	Reaktionsstreifen 2 (Influenza A/B Duplex)	Reaktionsstreifen 3 (Influenza A Monoplex)	Reaktionsstreifen 4 (Influenza A Monoplex)
well Nr.:	Verdünnungsstufe	Verdünnungsstufe	Verdünnungsstufe	
1	10^{-1}	10^{-9}	10^{-1}	10^{-9}
2	10^{-2}	10^{-10}	10^{-2}	10^{-10}
3	10^{-3}	Negativkontrolle	10^{-3}	Negativkontrolle
4	10^{-4}	Negativkontrolle	10^{-4}	Negativkontrolle
5	10^{-5}	leer	10^{-5}	leer
6	10^{-6}	leer	10^{-6}	leer
7	10^{-7}	leer	10^{-7}	leer
8	10^{-8}	leer	10^{-8}	leer

Abb. 24: Ansatzschema zur Austestung der unteren Nachweisgrenze und Vergleich von Multi- und Monoplexassay

2.7 Untersuchung respiratorischer Materialien im Rahmen zweier klinischer Studien

Es wurden sukzessive zwei prospektive klinische Studien initiiert, um die Inzidenz, die Saisonalität sowie die ätiologische Bedeutung von Respirationstraktviren bei akuten Atemwegsinfektionen von pädiatrischen Patienten zu untersuchen, die aufgrund der Schwere der Symptomatik hospitalisiert worden waren. Einsendende Kliniken waren die pädiatrischen

Abteilungen sowohl des Universitätsklinikums Düsseldorf als auch des Evangelischen Krankenhauses Düsseldorf.

2.7.1 Klinische Studie I: Dezember 2005 bis Oktober 2006

Die erste klinische Studie umfasst einen zehnmonatigen Zeitraum von Dezember 2005 bis Oktober 2006. Insgesamt wurden 254 Proben von 254 pädiatrischen Patienten bestehend aus 235 Nasopharyngealaspiraten, 9 Trachealaspiraten, 8 Sputumproben und 2 Rachenabstrichen prospektiv auf Respirationstraktviren untersucht. Von den 254 untersuchten Patienten waren 28 immunsupprimiert aufgrund einer HIV-Infektion oder einer malignen Grunderkrankung. Die Untersuchungsmaterialien wurden wie unter Abschnitt 2.5 beschrieben aufgearbeitet, extrahiert und in der one-step real-time PCR untersucht. Alle positiv getesteten Materialien wurden in der monoplex PCR verifiziert. Alle Ergebnisse wurden als qualitative Befunde, d.h. ohne die Angabe einer Viruslast erstellt.

2.7.2 Klinische Studie II : seit November 2006 (Stand Dezember 2007)

Die zweite klinische Studie trägt den Studientitel: „Epidemiologische Untersuchung von Infektionen des unteren Respirationstrakts in Kindern - Korrelation des quantitativen Erregernachweises mit der klinischen Symptomatik und dem Therapieverlauf“. Die Studie läuft seit November 2006 über insgesamt 2 Jahre (voraussichtliches Ende November 2008). In dieser Studie werden Respirationstraktmaterialien von Kindern, die hospitalisiert sind mit einer akuten Infektion des unteren Respirationstrakts auf das Vorhandensein von respiratorischen Viren mittels PCR untersucht. Neben dem Nachweis von viralen Erregern werden darüberhinaus in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Düsseldorf alle Proben auf bakterielle Pathogene untersucht. Von jedem Kind werden jeweils zwei aufeinanderfolgende Untersuchungsproben entnommen, am Tag der stationären Aufnahme sowie zwischen Tag 3 und 6 der Hospitalisierung. Es wird ein quantitatives Ergebnis, d.h. eine Viruslast in K/ml ermittelt. Ein Ziel der Studie ist die Klärung der Frage, ob die Höhe der ermittelten Erregerlast einen Einfluß auf den klinischen Verlauf einer akuten Infektionen des unteren Respirationstrakts bei Kindern nimmt. Bis dato (Stand: Dezember 2007) wurden 182 Patienten in Rahmen der Studie sowie insgesamt 345 Respirationstraktmaterialien untersucht.

2.7.3 Statistische Analysen

Die Präzision (Interassayvarianz) der one-step real-time PCR wurde bestimmt über die Berechnung des Mittelwerts der Ct-Wert-Standardabweichung unter Angabe des 95%-

Konfidenzintervalls. Der Vergleich der Altersmediane der Patientengruppen wurde mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Die Korrelation der klinischen Diagnose mit dem Auftreten einer Mono- oder einer Koinfektion erfolgte mit dem Fisher Exakt Test.

3 Resultate

3.1 Vortestung der Primer und Sonden in der Sybr green® sowie in der TaqMan™ Real-Time PCR

3.1.1 Sybr green® PCR

Vor Einsatz der Primerpaare im real-time TaqMan™ PCR-Format mit Sonde wurden diese mittels einer Sybr green® PCR auf ihre Funktionalität hin überprüft. Der Sybr green® Assay ermöglichte die sondenunabhängige Detektion einer erfolgreichen Amplifikation viraler Nukleinsäure. Als Kriterium für eine spezifische Amplifikation des viralen templates mit dem eingesetzten Primerpaar gilt der Nachweis sigmoider Wachstumskurven innerhalb eines Ct-Wertbereichs bis zum 35 Zyklus. In Abb. 25 ist dies exemplarisch für die erfolgreiche Amplifikation von viraler Nukleinsäure im Zweifachansatz mittels Sybr green® PCR dargestellt.

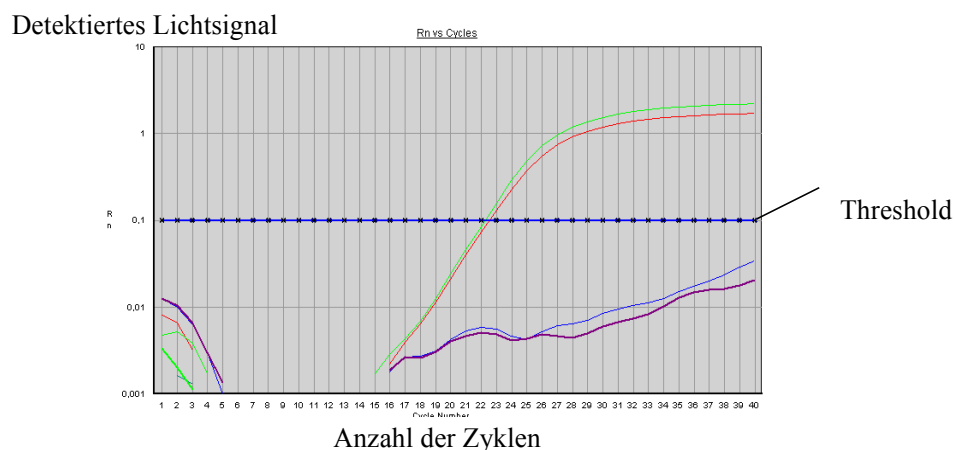


Abb. 25 : Nachweis der Funktionalität der eingesetzten Primer in der Sybr green® PCR: positive Proben in rot und grün, negative Proben in blau und lila. Der Cycle-threshold (Ct)-Wert der beiden positiven Proben liegt bei ca. 22,5

Da es sich bei Sybr green® um einen DNA-interkalierenden Farbstoff handelt, werden auch unspezifische doppelsträngige Produkte, die aufgrund ihrer geringen Menge meist jenseits eines Ct-Werts von 35 nachweisbar sind, über diesen Farbstoff detektiert. Die Amplifikation spezifischer viraler PCR-Produkte wurde aus diesem Grund zusätzlich zum Nachweis von sigmoiden Amplifikationskurven vor Ct 35 über die Detektion spezifischer Banden mit einer dem Amplifikationsprodukt entsprechenden Größe im Agarosegel bestätigt. Der Bandenachweis im Agarosegel ist in Abb. 26 exemplarisch dargestellt anhand von vier verschiedenen Proben, mit der Probe 1 im Dreifachansatz (1.1, 1.2 und 1.3). Über den Abgleich mit mitgeführten

Kontrollbanden als Größenstandard („Kb-Leiter“) kann auf die Größe der aufgetragenen Amplifikate geschlossen werden, wobei eine Übereinstimmung zwischen der Größe des Fragments im Gel sowie der anhand von Primerexpress ermittelten Amplifikatgröße (Tabelle 21) die erfolgreiche Amplifikation der viralen Zielregion bestätigt.

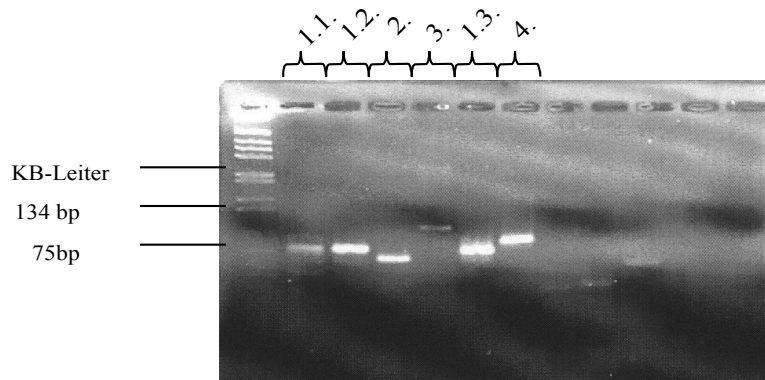


Abb. 26 : Nachweis der Amplifikate im Agarosegel

Probe 1.1., 1.2 und 1.3 : Amplifikatgröße ca. 75 kb (Parainfluenza Subtyp 2)

Probe 2 : Amplifikatgröße <75 kb (Influenzavirus B)

Probe 3 : Amplifikatgröße ca. 100 kb (Parainfluenza Subtyp 1)

Probe 4 : Amplifikatgröße ca. 80 kb (Influenza A)

Bei der Bindung der Primer an die virale Zielregion (Annealing) entstehen kurze doppelsträngige DNA-Abschnitte. Darüberhinaus können sich durch unspezifische Bindung von Primern untereinander doppelsträngige DNA-Abschnitte, sogenannte Primerdimere bilden. Die Spezifität der Bindung komplementärer Nukleotidsequenzen ist über eine Schmelzkurvenanalyse nachweisbar: so werden kurze und weniger spezifische Bindungsprodukte (Primerdimere) bei einer niedrigeren Temperatur (<70°C) getrennt als längere, doppelsträngige DNA-Produkte aus PCR-Amplikons. Somit ist über eine Schmelzkurvenanalyse der Nachweis spezifischer Bindungen im Sinne eines Annealings ein weiteres Kriterium für die Funktionalität und Spezifität der eingesetzten Primer. In Abb. 27 sind exemplarisch die Schmelzkurven einer im Doppelansatz amplifizierten Probe dargestellt. Die hohe Schmelztemperatur von annähernd 80°C weist auf die Trennung der beiden Amplicon-DNA-Stränge hin.

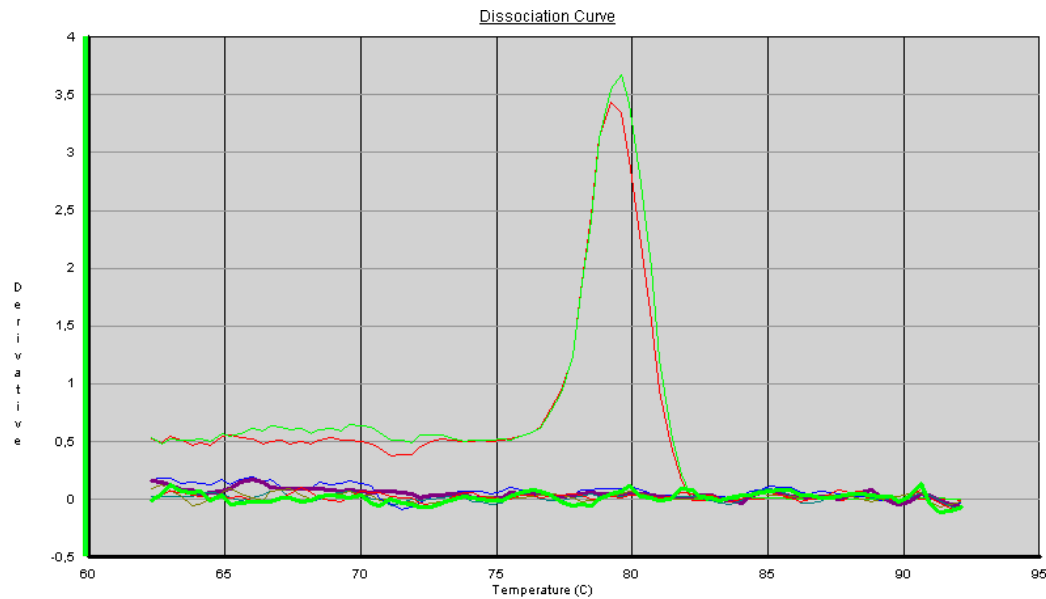


Abb. 27: Sybr green® PCR, Schmelzkurvenanalyse: Die Trennung des DNA-Doppelstrangs des Amplikons erfolgte bei ca. 78°C

3.1.2 TaqMan™ Real-Time PCR

Der Virus-Nachweis im TaqMan™ real-time PCR-Format wurde über das Hinzufügen einer farbmarkierten Sonde zum entsprechenden Primerpaar ergänzt. Im Gegensatz zum Sybr green® Assay wird bei Einsatz der TaqMan™ Sonde nur dann ein Fluoreszenzsignal generiert, wenn die Sonde über die Exonukleaseaktivität der Polymerase im Rahmen der Amplifikation hydrolysiert und das Reportersignal über die nun entstandene Trennung nicht mehr vom Quencher-Farbstoff absorbiert wird. Somit ist die Fluoreszenzdetektion nach Überschreiten eines Schwellenwerts (threshold) beweisend für die Amplifikation viraler Nukleinsäure, weiterführende Detektionsschritte (Schmelzkurvenanalyse, Gelanalyse) sind nicht notwendig. In Abb. 28 ist die Amplifikation viraler Nukleinsäure im Triplex-Format unter Einsatz dreier unterschiedlich farbmarkierter Sonden dargestellt.

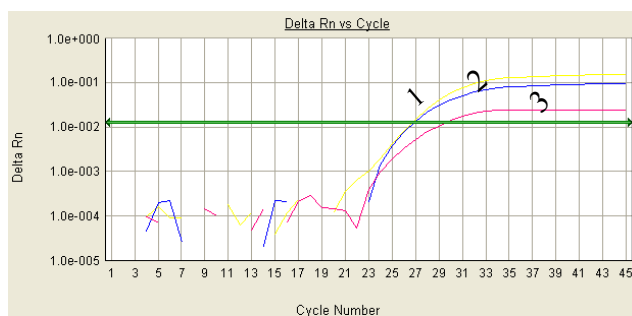


Abb. 28 : Amplifikation viraler Nukleinsäure in der TaqMan™ Real-Time PCR. Die Ziffern 1,2,3 bezeichnen Amplifikationskurven mit unterschiedlicher Farbmarkierung (Fam, Hex, Cy5)

3.2 Herstellung von Virusgen-kodierenden rekombinanten Plasmiden

3.2.1 Klonierungs-PCR und Darstellung im Agarosegel

Ziel der Klonierungs-PCR war die Generierung von mit Restriktionssites versehenen Amplifikaten der viralen Zielregion als Grundlage der Herstellung von viralen Plasmidstandards (2.4.1). Die Klonierungs-PCR erfolgte unter Verwendung einer Polymerase mit proof reading Funktion und den mit Restriktionssites versehenen F-und R-primern, jedoch ohne den Einsatz einer virusspezifischen TaqMan™ Sonde. Folglich war auch hier die Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation über die Auftrennung und Detektion der PCR-Produkte im Agarosegel notwendig. In Abb. 29 ist dies exemplarisch für eine erfolgreiche Klonierungs-PCR im Achtfachansatz dargestellt.

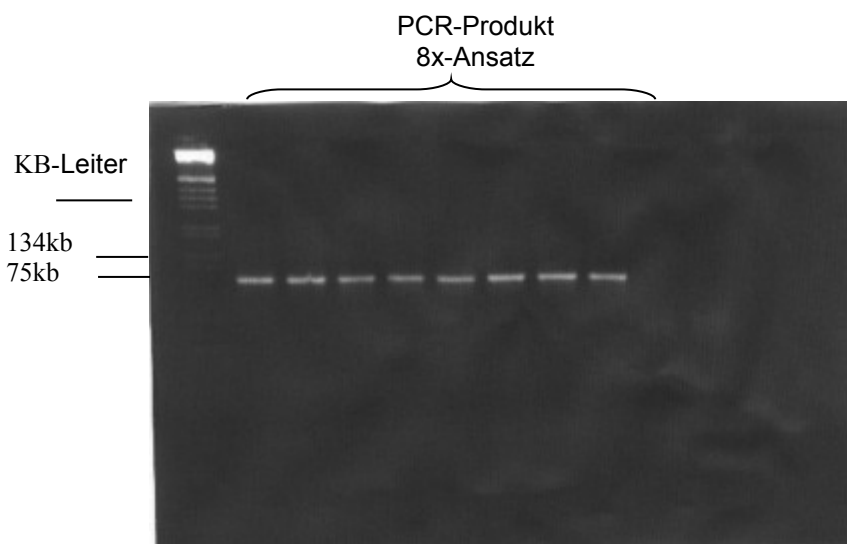


Abb. 29 : Klonierungs-PCR: die Amplifikation erfolgte mit primern, die Restriktions-sites endständig enthielten. Die PCR-Produkte wurden im Agarose-Gel mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und das Laufverhalten im Vergleich zu den Größenmarkern kontrolliert

3.2.2 Restriktionsverdau nach Minipräparation

Die Kontrolle der erfolgreichen Aufnahme des viralen PCR-Produkts (Insert) in den Vektor (2.4.4) erfolgte über einen erneuten Restriktionsendonukleaseverdau des Vektors und dem Nachweis des enzymatisch verdauten PCR-Produkts anhand von dessen spezifischer Größe im Agarosegel. Eine nicht erfolgreiche Transfektion war über den Nachweis des ursprünglich im Vektor vorhandenen Fragments detektierbar, welches sich in seiner Größe vom wesentlich kleineren Insert unterschied (Abb. 30).

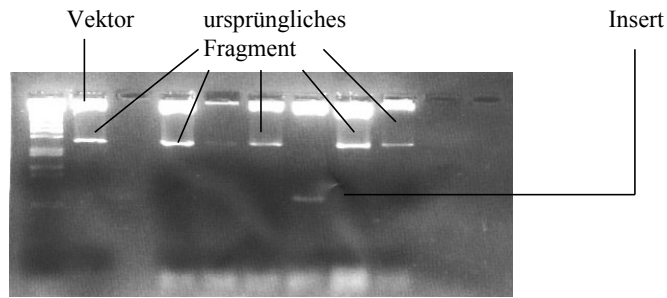


Abb. 30 : Gelanalytische Kontrolle des Transfektionserfolgs nach Restriktionsverdau

3.2.3 Austestung der Plasmidstandards in der Real-Time PCR

Im Rahmen der Etablierung einer PCR zum quantitativen Nachweis von Respirationstraktviren wurden die viralen Plasmidstandards im one-step TaqMan™ PCR-Format vorgetestet. Hierbei kamen die Verdünnungsstufen zum Einsatz, welche für den PCR-Nachweis in der diagnostischen Routine vorgesehen waren (Standard 1: $2,5 \times 10^4$ K/2,5 μ l, Standard 2: $2,5 \times 10^3$ K/2,5 μ l und Standard 3: $2,5 \times 10^2$ K/2,5 μ l). In Abb. 31 wird dies exemplarisch dargestellt. Die Effizienz einer PCR-Reaktion ist ein Maßstab für die Aktivität der beteiligten Komponenten (Primer, Polymerase u.a.) und ist optimal, wenn pro PCR-Zyklus eine Verdopplung der Menge an Ausgangsprodukt erreicht wird: $y = x \cdot 2^n$, wobei y = Anzahl der PCR-Produkte, x = initiale Kopienanzahl und n = Anzahl der PCR-Zyklen. Eine Verzehnfachung einer vorhandenen Menge an Kopien wird rechnerisch nach $n=3,32$ Zyklen erzielt. Daraus folgt schließlich, daß bei einer in 10er Schritten ausverdünnnten Probe ein Ct-Wert-Abstand von 3,32 Zyklen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen vorliegt im Falle einer effizienten PCR-Reaktion. In Abb. 31 ist dies exemplarisch für die drei Verdünnungsstufen eines viralen Plasmidstandards (Standard 1: $2,5 \times 10^4$ K/2,5 μ l, Standard 2: $2,5 \times 10^3$ K/2,5 μ l und Standard 3: $2,5 \times 10^2$ K/2,5 μ l) dargestellt. Der Ct-Wert-Abstand beträgt 3,5 Zyklen bzw. 4 Zyklen. Die lineare Darstellung dieser Ergebnisse erfolgt in Form der unter Abb. 32 dargestellten Standardkurve. Hierbei sind die gemessenen Ct-Werte der drei getesteten Plasmidstandards (y-Achse) in Korrelation zum logarithmischen Wert der jeweiligen Kopienzahlen (x-Achse) aufgetragen. Die Effizienz der PCR-Reaktion spiegelt sich hierbei in der (negativen) Steigung der Gerade (slope) wider, welche in diesem Beispiel einen Wert von $-3,22$ erreicht.

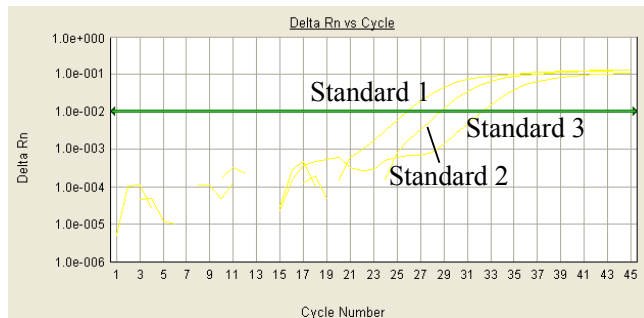


Abb. 31 : Austestung eines Plasmidstandards in der one-step real-time TaqMan™ PCR

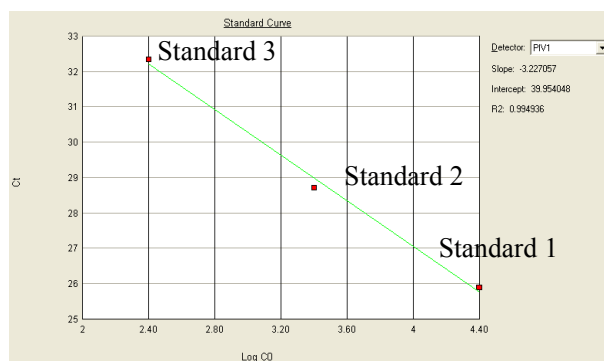


Abb. 32 : Generierung einer Standardkurve auf Grundlage der Plasmidstandards: Slope gibt den Wert der Steigung der Gerade wider, Intercept den Schnittpunkt mit der y-Achse, R2 den Korrelationskoeffizienten

3.3 Evaluation der One-Step Du-/Triplex Real-Time PCR

3.3.1 Spezifität

Die Spezifität der one-step Du-/Triplex real-time PCR wurde über die Austestung virushaltiger Zellkulturüberstände bzw. der Plasmidstandards in allen Ansätzen des Nachweises überprüft und auftretende Kreuzreaktionen anhand ihrer Ct-Werte dokumentiert. Sämtliche im Assay vorkommenden Viren wurden in allen im Assay vorkommenden Ansätzen (Duplex- und Triplexansätzen) ausgetestet. In Tabelle 30 sind die Ergebnisse der Austestung der jeweiligen Proben in ihrem entsprechenden Ansatz, z.B. die Austestung von Influenza A- bzw. B-Zellkulturüberstand im Influenza A/B - Duplex-Assay dargestellt. Die Ergebnisse der Austestung von Proben in dem nicht für sie bestimmten Ansatz, z.B. Influenza A- und B-Zellkulturüberstand im Coronavirus-Triplex-Assay sowie der bakteriellen Pathogene und weiterer Viren (2.6.1) ist aufgrund des vollständigen Fehlens von Kreuzreaktionen nicht dargestellt. Aus Tabelle 30 wird die hohe Spezifität aller Assays der one-step real-time™ PCR

deutlich. Lediglich im RSV B/HMPV B-Duplex wird über die HMPV-B -Primer das RSV-B-Plasmid mitamplifiziert und ist mit einem Ct-Wert von 30 nachweisbar.

Tabelle 30 : Spezifitätsnachweis der one-step real-time™ PCR. Dargestellt sind nur die Austestungen der jeweiligen Subtypen des Virus bzw. die jeweiligen Partner eines Mehrfachansatzes untereinander.

	Spezifität		
	Ct-Wert/		
	Influenza Duplex		
Virus/ Plasmid	Inf A	Inf B	
Inf A	26	neg.	
Inf B	neg.	26	
	Parainfluenza Triplex		
Virus/ Plasmid	PIV 1	PIV 2	PIV 3
PIV 1	26	neg.	neg.
PIV 2	neg.	23	neg.
PIV 3	neg.	neg.	26
	HMPV A/Adeno Duplex		
Virus/ Plasmid	HMPV A	Adeno	
HMPV A	22	neg.	
Adeno	neg.	16	
	Coronavirus Triplex		
Virus/ Plasmid	CoV229E	CoVOC43	CoVNL63
CoV229E	17	neg.	neg.
CoVOC43	neg.	21	neg.
CoVNL63	neg.	neg.	20
	RSV/HMPV B Duplex		
Virus/ Plasmid	RSV	HMPV B	
RSV B	17	30	
HMPV B	neg.	19	
	Rhino/Boca Duplex		
Virus/ Plasmid	Rhino	Boca	
Rhino	19	neg.	
Boca	neg.	18	
	RSV A/Entero Duplex		
Virus/ Plasmid	RSV A	Entero	
RSV A	22	neg.	
Entero	neg.	23	

3.3.2 Sensitivität

Austitrierte virushaltige Zellkulturüberstände bzw. Plasmidstandards wurden im Mono- als auch im entsprechenden Du-/ bzw. Triplexansatz parallel amplifiziert (Tabelle 31 und Tabelle 32). Die Nachweisgrenze des Assays wurde für jeden einzelnen Parameter definiert als die Verdünnungsstufe, bei der noch ein PCR-Signal nachweisbar war und wurde in Form des entsprechenden Ct-Werts dokumentiert („Limit Of Detection“, LOD). Aus den in den

nachfolgenden beiden Tabellen dokumentierten Ct-Werten wird deutlich, daß der Virusnachweis mittels Du-/Triplex-Ansatz im Vergleich zum Monoplex-Ansatz nicht zu einer Ct-Wert-Verschiebung im Sinne eines Sensitivitätsverlusts („Rechtsverschiebung“) führt. Die in Mono- und Multiplexansatz gemessenen Ct-Werte sind nicht systematisch unterschiedlich, in einigen Assays sind sogar die mittels Multiplexansatz erzielten Ct-Werte (PIV1, CoV 229E, RSV) geringfügig kleiner als im Monoplexansatz.

Tabelle 31 : Passagierbare Viren, Vergleich der Mono-und Du-/Triplex-PCR, Berechnung der Interassayvarianz von jeweils 10 unabhängigen Ansätzen

Virus/TCID ₅₀	Ct-Wert		Plasmid-standards/ K/ml	Ct-Wert		Pos.Kontrolle- Interassayvarianz Mittlerer Ct-Wert
	Monoplex	Du-/Triplex		Monoplex	Du-/Triplex	
Influenza A						25,12 (24,95-25,30)
75 TCID ₅₀	29	29	2,5x10 ²	30	32	
7,5 TCID ₅₀	32	32	2,5x10 ¹	33	34	
0,75 TCID ₅₀	36	38	2,5x10 ⁰	neg.	neg.	
Influenza B						29,66 (29,50-29,81)
0,43 TCID ₅₀	23	25	2,5x10 ²	29	29	
0,043 TCID ₅₀	26	28	2,5x10 ¹	32	32	
0,0043 TCID ₅₀	30	33	2,5x10 ⁰	36	38	
PIV 1						25,50 (25,22-25,79)
10 TCID ₅₀	25	22	2,5x10 ²	30	33	
1 TCID ₅₀	30	24	2,5x10 ¹	34	34	
0,1 TCID ₅₀	33	27	2,5x10 ⁰	neg.	neg.	
PIV 2						25,94 (25,59-26,30)
3162 TCID ₅₀	28	26	2,5x10 ²	31	31	
316 TCID ₅₀	32	32	2,5x10 ¹	33	35	
31,6 TCID ₅₀	36	38	2,5x10 ⁰	36	38	
PIV 3						27,50 (27,14-27,85)
1,0 TCID ₅₀	24	25	2,5x10 ²	32	34	
0,1 TCID ₅₀	31	29	2,5x10 ¹	38	neg.	
0,01 TCID ₅₀	33	33	2,5x10 ⁰	neg.	neg.	
RSV						24,03 (23,77-24,30)
1,77 TCID ₅₀	30	26	2,5x10 ²	29	29	
0,17 TCID ₅₀	33	31	2,5x10 ¹	33	34	
0,017 TCID ₅₀	38	36	2,5x10 ⁰	36	neg.	
Adenovirus						25,95 (25,65-26,25)
0,03 TCID ₅₀	23	24	2,5x10 ²	31	31	
0,003 TCID ₅₀	26	27	2,5x10 ¹	34	34	
0,0003 TCID ₅₀	29	29	2,5x10 ⁰	37	38	
CoV 229E						22,73 (22,45-23,02)
0,4 TCID ₅₀	26	23	2,5x10 ²	26	28	
0,04 TCID ₅₀	30	27	2,5x10 ¹	29	30	
0,004 TCID ₅₀	33	31	2,5x10 ⁰	33	34	
Rhinovirus						24,84 (24,62-25,06)
5,6 TCID ₅₀	23	23	2,5x10 ²	30	28	
0,56 TCID ₅₀	26	25	2,5x10 ¹	33	33	
0,056 TCID ₅₀	30	30	2,5x10 ⁰	neg.	neg.	
Enterovirus						25,55 (25,14-25,96)
42 TCID ₅₀	26	28	2,5x10 ²	30	nd	
4,2 TCID ₅₀	30	30	2,5x10 ¹	33	nd	
0,042 TCID ₅₀	34	neg.	2,5x10 ⁰	neg.	nd	

Tabelle 32 : Nichtpassagierbare Viren, Vergleich der Mono-und Du/Triplex-PCR, Berechnung der Interassayvarianz von jeweils 10 unabhängigen Ansätzen

	Ct	Wert	
	Monoplex	Du-Triplex	Pos.Kontrolle- Interassayvarianz Mittlerer Ct-Wert (96% Konfidenzintervall)
HMPV A			25,08 (24,79-25,37)
2,5x10 ⁵ K/ml	22	23	
2,5x10 ⁴ K/ml	27	25	
2,5x10 ³ K/ml	30	28	
CoV OC 43			24,05 (23,75-24,34)
2,5x10 ⁶ K/ml	20	20	
2,5x10 ⁵ K/ml	23	23	
2,5x10 ⁴ K/ml	27	27	
Bocavirus			24,02 (23,79-24,25)
2,5x10 ⁶ K/ml	25	23	
2,5x10 ⁵ K/ml	28	27	
2,5x10 ⁴ K/ml	32	33	
HMPV B			26,44 (26,07-26,80)
2,5x10 ⁴ K/ml	23	23	
2,5x10 ³ K/ml	26	26	
2,5x10 ² K/ml	29	29	
CoV NL 63			27,49 (27,09-27,90)
2,5x10 ⁵ K/ml	24	25	
2,5x10 ⁴ K/ml	27	29	
2,5x10 ³ K/ml	35	33	

3.3.3 Vergleich des RSV-Schnelltests mit der RSV-PCR

Der bislang in der Routinediagnostik durchgeführte direkte RSV-Antigennachweis mittels Schnelltest wurde anhand einer Vierfeldertafelanalyse mit dem Nukleinsäurenachweis mittels RSV-PCR verglichen. (Tabelle 33). Hierbei ergab sich für den RSV-Schnelltest eine Sensitivität von 88,4% bei einer Spezifität von 99,8%.

Tabelle 33 : Vierfeldertafel zum Vergleich der RSV-PCR mit dem Schnelltest

		RSV-PCR		
		Positiv	Negativ	Gesamt
RSV-Schnelltest	Positiv	49	0	49
	Negativ	6	26	32
	Gesamt	55	26	81

3.3.4 Vergleich Virusisolierung mit Du/Triplex-PCR

Zusätzlich zur Untersuchung von Respirationstraktmaterialien in der PCR wurden diese auf susceptible Zelllinien verimpft und die Rate der in der Virusisolierung positiv getesteten Untersuchungsproben mit denen der PCR verglichen. In einem Zeitraum von November 2006 bis Juli 2007 waren von insgesamt 373 der PCR-positiven Proben 106 in der Virusisolierung positiv.

Proben, die PCR-positiv waren für die in der Zellkultur nicht anzüchtbaren Viren (Humanes Metapneumovirus, Coronavirus OC 43 und NL 63, Bocavirus) wurden beim Vergleich beider Methoden nicht berücksichtigt. Somit ergab sich für die Virusisolierung bei Nachweis von 106 der 373 PCR positiven Proben eine Detektionsrate von 28,4 % (Tabelle 34). Darüberhinaus wurden über die Detektion eines cytopathischen Effekts Untersuchungsproben mittels Virusisolierung als positiv befundet, für welche im entsprechenden PCR-Ansatz kein Amplifikationssignal nachweisbar war. Insgesamt traf dies zu auf 11 Untersuchungsproben, wobei es sich um jeweils 1 RSV-, Parainfluenza Subtyp 3- und Rhinovirus-positive Probe sowie um 3 Entero- und 5 Adenovirus-positive Proben handelte. Virushaltiger Zellkulturüberstand dieser Untersuchungsproben wurde bei Auftreten eines CPE-Nachweis erneut mittels PCR untersucht und konnte dann bestätigt werden, d.h. das initial negative PCR-Ergebnis war auf Virusmengen unterhalb der Sensitivitätsgrenze der PCR zurückzuführen.

Tabelle 34 : Vergleich der Virusisolierung mit der Respiratorische-Viren-PCR

Virus	Anzahl positiver Zellkulturisolate	Anzahl positiver PCR-Nachweise	Anzahl negativer PCR-Nachweise
RSV	56	55	1
Adeno	36	31	5
Enterovirus	3	0	3
Influenza A	4	4	0
Parainfluenza 3	2	1	1
Rhinoviren	5	4	1
gesamt	106	95	11

3.4 Auswertung der Ergebnisse der ersten klinischen Studie

3.4.1 Die 1. klinische Studie : Gesamtübersicht

In einem zehnmonatigen Zeitraum wurden respiratorische Materialien von insgesamt 254 pädiatrischen Patienten in der Respiratorische-Viren-PCR untersucht (Tabelle 35). Bei 164 Kindern wurden 1 oder mehrere Respirationstraktviren nachgewiesen (64,6 %), 90 Patienten waren PCR negativ (35,4%). Respiratory Syncytial Virus war mit 112 Fällen (44,1%) der am häufigsten nachgewiesene Erreger, gefolgt von Bocaviren (49 Fälle, 19,3%) und Rhinoviren (17 Fälle, 6,69%). 28 Patienten (11 %) waren positiv für weitere Respirationstraktviren: 7 für HMPV A, 7 für Enterovirus (jeweils 2,75%), jeweils 4 (1,6%) für Parainfluenza- bzw. Coronaviren, 3 für Adenoviren (1,18%) und schließlich jeweils 2 (0,78%) Patienten für Influenzavirus A bzw. B. Respirationstraktviren wurden am häufigsten nachgewiesen während der kühlen Jahreszeit (Dezember-Mai) mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen März und Mai (117 positive Patienten) und einer niedrigeren Inzidenz in den Sommermonaten (Juni-September, 42 positive Patienten).

Tabelle 35 : Auswertung der ersten klinischen Studie: Gesamtübersicht

	Anzahl der Patienten (%)	Alter in Tagen (Median)	Saisonale Verteilung		
			Dezember-Februar	März-Mai	Juni-September
Gesamt	254 (100)	208 (14-6027)	95	117	42
Positiv für 1 oder mehrere Respirationstraktviren	164 (64,6)	156 (14-6027)	59	84	21
Positiv für 1 respiratorisches Virus	123 (48,4)	150 (14-4433)	38	65	20
Positiv für mehrere Respirationstraktviren	41 (16,1)	158 (14-6027)	21	19	1
Positiv für RSV in Kombination mit huBoV	27 (10,6)	195 (14-6027)	15	12	0
Negativ	90 (35,4)	335 (20-5862)	36	33	21
RSV positiv	112 (44,1)	135 (14-6027)	43	66	3
huBov positiv	49 (19,3)	216 (14-6027)	25	16	8
Rhinovirus positiv	17 (6,69)	174 (22-1775)	1	8	8
positiv für andere respiratorische Viren*	28 (11,0)	151 (28-4433)	12	13	4

*davon 7 HMPV A-, 7 Enterovirus-, 4 Parainfluenzavirus-, 4 Coronavirus-, 3 Adenovirus-, 2 Influenzavirus A und 2 Influenzavirus B-Infektionen

3.4.2 1. klinische Studie : Erregernachweis und Altersverteilung

Die jüngsten Kinder waren die enterovirusinfizierten Kinder mit einem Altersmedian von 92 Tagen (Tabelle 36) gefolgt von den RSV-infizierten Kindern (Altersmedian 135 Tage) sowie den Rhinovirus-infizierten Kindern mit einem Altersmedian von 174 Tagen. Im Gegensatz hierzu waren Kinder mit einer Bocavirusinfektion signifikant älter als RSV-positive Patienten (Altersmedian Bocavirusinfektion: 216 Tages versus 135 Tage bei RSV-Infektion, $p=0,045$). Kinder mit HMPV-Infektion waren im Durchschnitt am ältesten (Altersmedian 297 Tage).

3.4.3 1. klinische Studie: Analyse viraler Koinfektionen

Insgesamt 41 (16,1%) Patienten hatten eine Infektion mit zwei oder mehr Respirationstraktviren (virale Koinfektion) (Tabelle 36). In 3 Fällen waren 3 Respirationstraktviren nachweisbar und 38 Patienten waren für jeweils zwei Erreger positiv. RSV und Bocavirus mit jeweils 33 Fällen waren die am häufigsten in viralen Koinfektionen nachweisbaren Viren, gefolgt von Rhinoviren (5 von 41 Koinfektionen) und Enteroviren sowie HMPV A (jeweils 2 virale Koinfektionen). Bocaviren traten in der Mehrzahl der Fälle in Kombination mit einem zweiten viralen Erreger auf, d.h. von den 49 Bocavirus positiven Proben waren insgesamt 33 (67,3%) in Kombination mit einem anderen Virus, am häufigsten mit RSV.

Tabelle 36 : Analyse viraler Koinfektionen

Virus	Anzahl aller Infektionen	Altersmedian in Tagen (Spannweite)	Anzahl von Koinfektionen (%)	Altersmedian in Tagen (Spannweite)	Häufigkeit des Auftretens mit*:			
					RSV	huBoV	Rhino virus	andere
RSV	112	135 (14-6027)	33 (29,5)	193 (14-6027)	--	27	2	6
hu BoV	49	216 (14-6027)	33 (67,3)	194 (14-6027)	27	--	2	6
Rhinovirus	17	174 (22-1775)	5 (29,4)	118 (22-158)	2	2	--	2
Enterovirus	7	92 (41-849)	2 (28,6)	--	0	2	1	0
HMPV A	7	297 (47-4433)	2 (28,6)	--	0	2	0	0

*die Summe übersteigt in manchen Fällen die Anzahl der links aufgeführten Koinfektionen aufgrund des Auftretens von Dreifachinfektionen

3.4.4 1. klinische Studie : Virale Koinfektion und klinische Manifestation

Mit Hilfe der ICD-10-Codierung der Patientendiagnosen seitens der behandelnden Ärzte konnte die klinische Manifestation des akuten Respirationstraktinfekts für die untersuchten Patienten eruiert werden. Klinische Daten wurden für 158 (entsprechend 158 Patienten) der 164 klinischen Proben ermittelt und wurden in die Kategorien: Infektion des oberen Respirationstrakts (URTI, upper respiratory tract infection), Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie unterteilt (Tabelle 37). Hierbei war Pneumonie die am häufigsten codierte Diagnose (72 Fälle, 45%) gefolgt von Bronchitis (69 Fälle, 44%), Bronchiolitis (36 Fälle, 22%) sowie Infektionen des oberen Respirationstrakts (7 Fälle, 4%). Der Anteil viraler Koinfektionen im Vergleich zur Inzidenz von Monoinfektionen war hoch in Patienten mit akuten Infektionen des unteren Respirationstrakts (Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie) mit insgesamt 22 Fällen (32%) in Patienten mit Bronchitis sowie 13 Fälle (36%) in Kindern mit Bronchiolitis und 35 Fällen (48%) in Patienten mit Pneumonie. Bei den Patienten mit Pneumonie waren sowohl das humane Bocavirus als auch das Rhinovirus mehrheitlich in Form einer viralen Koinfektion nachweisbar (hu BoV 15 Fälle Koinfektion versus 3 Fälle Monoinfektion, Rhinoviren 17 Fälle Koinfektion versus 3 Fälle Monoinfektion). Im Gegensatz hierzu war RSV in der Mehrzahl der Fälle von RSV-assoziiierter Pneumonie als alleiniges Pathogen nachweisbar (Monoinfektion: 24 Fälle, Koinfektion: 15 Fälle).

Tabelle 37 : Die fünf häufigsten Erreger viraler Koinfektionen und ICD-10 Diagnosen

Diagnose (ICD-10)	gesamt			RSV		hu BoV	
	Monoinf.	Koinf.	(%)	Monoinf.	Koinf.	Monoinf.	Koinf.
URTI*	6	1	(14)	4	0	0	1
Bronchitis	48	10	(17)	25	8	11	8
Bronchiolitis	23	7	(23)	23	7	0	5
Pneumonie	34	17	(33)	24	13	2	13
Diagnose (ICD-10)	Rhinovirus			Enterovirus		HMPV	
	Monoinf.	Koinf.		Monoinf.	Koinf.	Monoinf.	Koinf.
URTI	0	0		0	0	1	0
Bronchitis	4	0		2	0	3	2
Bronchiolitis	0	1		0	0	0	0
Pneumonie	6	3		2	1	0	0

*URTI=Infection of the Upper Respiratory Tract (Infektion des oberen Respirationstrakts)

3.5 Auswertung der Ergebnisse der zweiten klinischen Studie

3.5.1 Die 2. klinische Studie, Gesamtübersicht

Es wurden bisher insgesamt 182 Patienten untersucht, wovon 136 (74,73%) positiv für 1 oder mehrere Respirationstraktviren waren. Bei 46 Patienten (25,3%) konnte kein Respirationstraktvirus detektiert werden. Die häufigsten nachgewiesenen Viren waren RSV (75 Fälle, 55,14%) mit RSV A (32 Fälle, 24%) und RSV B (43 Fälle, 32%) gefolgt von Rhinoviren (35 Patienten, 25,74%) und Adenoviren (12 Patienten, 8,82%). Im Gegensatz zur ersten klinischen Studie mit 49 Fällen (19%) war das humane Bocavirus mit 10 Fällen (7,35 %) wesentlich seltener nachweisbar. Insgesamt 27 Patienten (14,8%) waren positiv für weitere Respirationstraktviren, davon 7 für Enteroviren (5,15%), 6 für Influenzavirus Subtyp A (4,41%), 5 für das Humane Metapneumovirus Subtyp A (3,68%), 5 für Parainfluenzaviren (3,68 %) und 4 für Coronaviren (2,94%). Da es Gegenstand dieser Studie ist, die gemessenen Viruslasten im Verlauf anhand einer zweiten Untersuchungsprobe zu bestimmen, wurden von jedem Patienten jeweils zwei Materialien untersucht. Von insgesamt 122 (67%) Patienten konnte ein zweites Material gewonnen werden, wovon 85 positiv in der PCR waren (69,6%). Eine Gesamtübersicht der Auswertung der Nachweise der jeweils *ersten* vom Patienten entnommenen Probe ist in (Tabelle 38).

Tabelle 38 : Auswertung der zweiten klinischen Studie (November 2006 bis Dezember 2007, 1.Probe)

	Anzahl der Patienten (%)
Gesamt	182 (100)
Positiv für 1 oder mehrere Respirationstraktviren	136 (74,73)
Positiv für 1 respiratorisches Virus	111 (82)
Positiv für mehrere Respirationstraktviren	25 (18)
Negativ	46 (25,27)
RSV A positiv	32 (24)
RSV B positiv	43 (32)
Rhinovirus positiv	35 (25,74)
Adenovirus positiv	12 (8,82)
positiv für andere respiratorische Viren*	27 (14,8)

- davon 7 Enterovirus, 6 Influenza A-, 5 HMPV A-, 5 Parainfluenzavirus -, und 4 Coronavirusinfektionen

3.5.2 PCR-Nachweisraten und Viruslasten

Der Mittelwert der Viruslasten in K/ml der fünf häufigsten Erreger ist in Abb. 33 (mit logarithmischer Skalierung der y-Achse) dargestellt. Abgebildet sind die Ergebnisse bezogen auf die jeweils 1. Patientenprobe. Von 182 waren 129 Patienten positiv für RSV, Rhino-, Entero-, Adenoviren oder das humane Bocavirus. Die gemessenen Viruslasten erreichen Werte um 10^7 bis 10^8 K/ml für RSV, Rhino- und Enterovirus. Adeno- und Bocavirus positive Proben erreichten durchschnittlich höhere Viruslasten mit 10^9 K/ml bis 10^{10} K/ml.

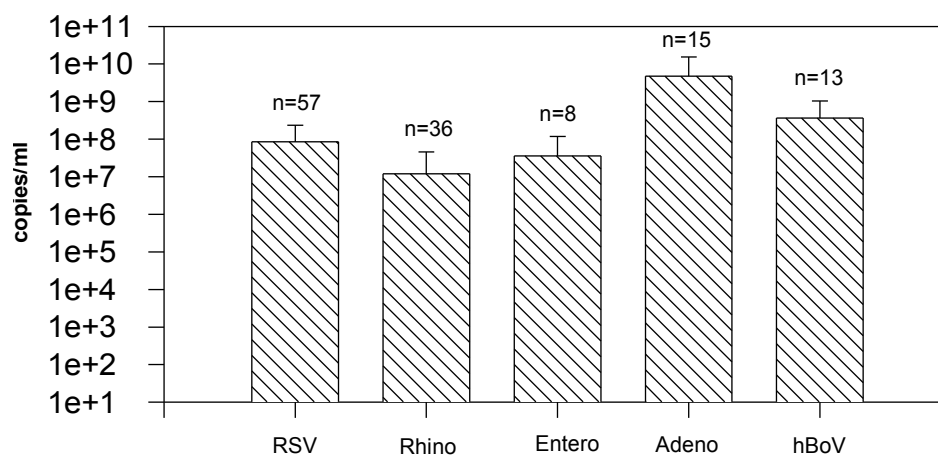


Abb. 33 : PCR-Viruslasten (incl. Standardabweichungen) der 1. Untersuchungsprobe von 129 Patienten der 2. Studie

3.5.3 2. Klinische Studie, Altersverteilung

Der Altersmedian des Patientenkollektivs lag bei 0,74 Jahren. Die meisten der Kinder, welche aufgrund einer akuten Infektion des unteren Respirationstrakts hospitalisiert wurden, waren zwischen 4 und 12 Monaten alt (59 Fälle, 32,43%). Eine Übersicht über die Altersverteilung ist in Tabelle 39.

Tabelle 39 : Altersverteilung des Patientenkollektivs, n=182 *

Alter	Anzahl der Patienten (%)
0-3 Monate	41 (23,03)
4-12 Monate	59 (32,43)
1-2 Jahre	31 (17,03)
2-5 Jahre	43 (23,63)
5-16 Jahre	8 (4,4)

*(Daten von cand. med. Rhea Willems, Kinderklinik, UKD)

3.5.4 2.Klinische Studie, Diagnosen

In dieser Studie wurden ausschließlich Kinder mit einer Beteiligung des unteren Respirationstrakts erfaßt. Die am häufigsten diagnostizierte Erkrankung war hierbei obstruktive Bronchitis mit 70 Patienten (38,46%) gefolgt von Pneumonie mit 52 Fällen (28,57%). Eine Übersicht über die diagnostizierten Krankheitsentitäten ist in Tabelle 40.

Tabelle 40 : Krankheitsentitäten bei n=182 Patienten*

Diagnose	Anzahl der Patienten (%)
Bronchitis	21 (11,54)
obstruktive Bronchitis	70 (38,46)
Bronchiolitis	21 (11,54)
Pneumonie	52 (28,57)
Pneumonie+ Bronchitis	2 (1,1%)
Pneumonie+ obstruktive Bronchitis	9 (4,95)
Pneumonie+ Bronchiolitis	4 (1,1)
Sonstige	3 (1,65)

*(Daten von cand. med. Rhea Willems, Kinderklinik, UKD)

3.5.5 Vergleich der Erregerhäufigkeiten 1. Studie versus 2. Studie

RSV war in beiden klinischen Studien das am häufigsten nachgewiesene Virus (Abb. 34). Das humane Bocavirus war im Untersuchungszeitraum der 1. Studie von Dezember 2005 bis September 2006 das zweithäufigste Virus. Seine Nachweishäufigkeit nahm in der darauffolgenden Saison (Zeitraum November 2006 bis Dezember 2007) ab, so daß das humane Bocavirus in der 2. klinischen Studie lediglich das viert häufigste nachgewiesene Virus hinter den Rhino- und den Adenoviren war. Die fluktuierenden Nachweishäufigkeiten einzelner Viren spiegeln ihre schwankende Inzidenz in unterschiedlichen Jahren wider, so auch bei den Rhinoviren, deren Inzidenz von 6,69% in den Jahren 2005/2006 (17 von 254 untersuchten

Proben, 1. klinische Studie) auf 26% in den darauffolgenden Jahren 2006/2007 (90 von 345 untersuchten Proben, 2.klinische Studie) anstieg

n=254, Zeitraum Dezember 2005 bis September 2006

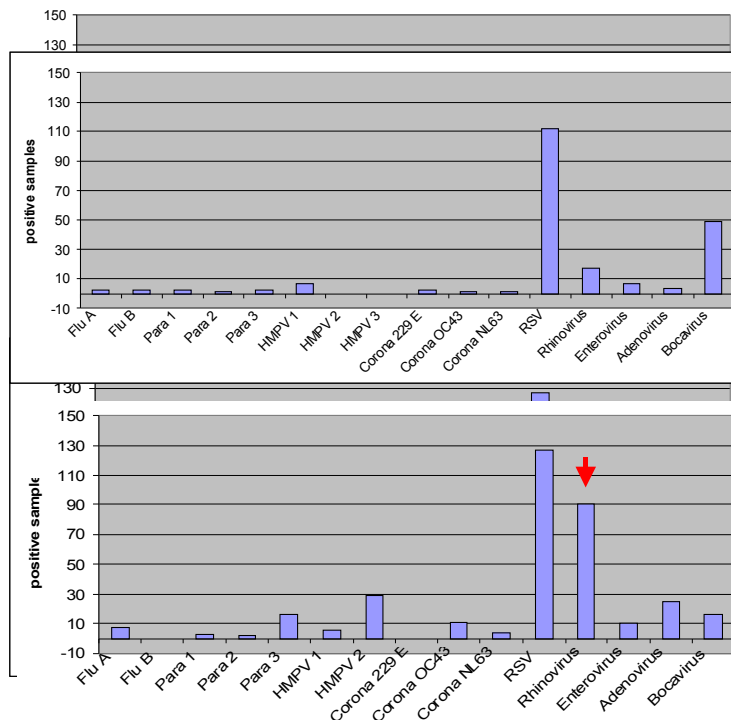


Abb. 34 : Vergleich der Erregerhäufigkeiten zwischen 1. und 2. klinischer Studie: Der rote Pfeil markiert den jeweils zweithäufigsten Erreger des Untersuchungszeitraums.

3.5.6 Jahreszeitliche Verteilung der häufigsten Infektionen

Die Frage, ob Virusgruppen oder sogar Subtypen einzelner Virusgruppen kozirkulieren sowie die Frage nach möglichen saisonalen Schwankungen läßt sich über die Analyse der Inzidenzraten der am häufigsten nachgewiesenen Viren bezogen auf einen definierten Untersuchungszeitraum (November 2006 bis November 2007) veranschaulichen (Abb. 35). Beide RSV-Subtypen A und B kozirkulieren mit einer hohen Nachweisrate in den Wintermonaten (Dezember bis März). Sowohl beim Humanen Metapneumovirus als auch bei den Parainfluenza- und Adenoviren zeigt sich ein tendenziell gehäuftes Vorkommen in den Winter- und Frühjahrsmonaten sowie eine Abnahme der Inzidenz in den Sommermonaten. Rhinoviren hingegen zeigen eine gleichmäßige Verteilung über den Untersuchungszeitraum. Die Anzahl nachgewiesener Rhinovirusinfektionen ist in den Monaten November und Januar zwar höher jedoch auch in den Sommermonaten sind Rhinovirusinfektionen im Vergleich zu RSV, HMPV, Parainfluenza- und Adenoviren häufig.

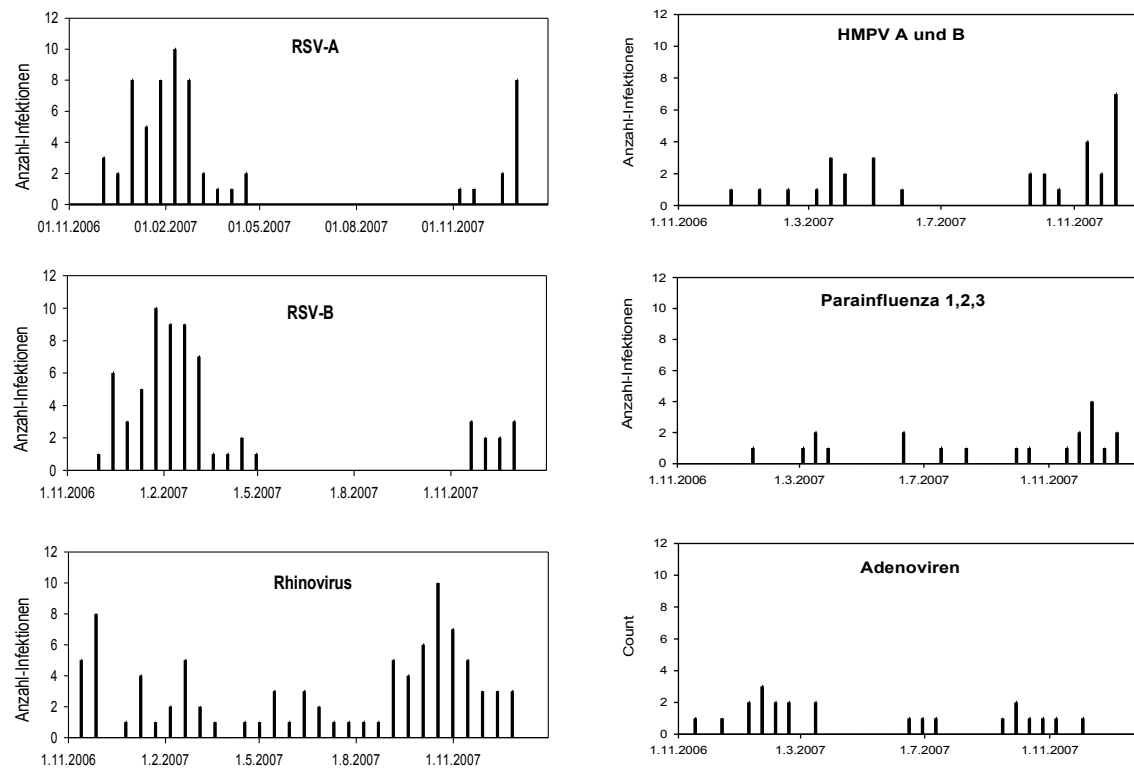


Abb. 35 : Jahreszeitliche Verteilung der häufigsten Infektionen des Düsseldorfer Untersuchungskollektivs, Zeitraum 11/2006-11/2007

3.5.7 2. Klinische Studie, Analyse viraler Koinfektionen

Von 325 klinischen Proben, die im Rahmen der zweiten klinischen Studie im Institut für Virologie untersucht wurden, waren in insgesamt 84 Proben zwei oder mehr Viren nachweisbar (Tabelle 41). Dies entsprach einer Detektionsrate von 25,8%. Die Analyse möglicher Viruskombinationen ergab das vollständige Fehlen vom gleichzeitigen Auftreten zweier Viren aus der Paramyxovirusfamilie. So kam beispielsweise die Kombination von RSV mit HMPV in keiner der klinischen Proben vor. Bei der Gruppe der Picornaviren waren in 8 der Rhinovirus-positiven Proben auch Enteroviren nachweisbar, so daß sich die Erregerkombination Rhino- und Enteroviren nicht ausschließt. Zusammenfassend betrachtet kommen bestimmte Erregerkonstellationen wie das gleichzeitige Auftreten zweier Paramyxoviren in einer Probe nicht vor wohingegen sich andere Nachweismöglichkeiten wie Rhino- und Enteroviren oder Viren aus unterschiedlichen Familien nicht ausschließen.

		Koinfektionen in Verbindung mit																		
	Monoinfektion			Paramyxoviridae										Picornaviridae					Koinfektion	
	n	Flu A	Flu B	Para 1	Para 2	Para 3	RSV A	RSV B	HMPV A	HMPV B	Corona 229 E	Corona OC43	Corona NL63	Rhinoviren	Enteroviren	Adenoviren	Bocavirus	n	%	
Parainfluenza	19													2				2	9,5	
RSV A	51												1	3	3	2	2	11	17,7	
RSV B	50											2	2	5		4	2	15	23,1	
HMPV	26											4		4				8	23,5	
Rhinovirus	63				1	1	3	5	1	3		3			8	5	2	27	30,0	
Adenovirus	25						2	4				1		5				12	32,4	
Boca	7						2	3	1					2		2		9	56,3	
Gesamt	241																	84	25,8	

Tabelle 41 : Verteilungsmuster viraler Koinfektionen in der 2. klinischen Studie

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation ist eine molekulare Nachweismethode zur Detektion von 12 Respirationstraktviren inklusive einiger ihrer Subtypen etabliert worden. Hierbei handelt es sich um eine auf der Polymerasekettenreaktion beruhenden Methode, welche sowohl die reverse Transkription als auch die Amplifikation mehrerer viraler Zielregionen in einem Reaktionsansatz umfaßt (one-step real-time PCR).

4.1 Evaluation der Respiratorische-Viren PCR

4.1.1 Spezifität

Die Methodik ermöglicht den spezifischen Nachweis von 10 RNA- sowie 2 DNA-Viren. Mit Ausnahme des RSV-B/HMPV-B-Duplex-Assays waren keinerlei Kreuzreaktionen nachweisbar (Tabelle 30). Bei Einsatz von RSV-B- haltigem Zellkulturüberstand im Duplexansatz erfolgte eine Mitamplifikation durch die HMPV-B-spezifischen Primer mit einem Ct-Wert von 30. Im Vergleich zum Ct-Wert, welcher bei virusspezifischer Amplifikation detektiert wurde (Ct-Wert von 17) ist eine Unterscheidung zwischen spezifischem Virusnachweis und Kreuzreaktion über den Ct-Wert-Abstand möglich (Ct-Wert-Abstand von 13 Zyklen). Darüberhinaus zeigte sich bei der Kreuzreaktion ein wesentlich flacherer Verlauf der Amplifikationskurve im Vergleich zum spezifischen Signal. Diese beiden Kriterien lassen eine recht sichere Unterscheidung zwischen der Kreuzreaktion und einer theoretisch vorhandenen Doppelinfektion von RSV/HMPV zu.

4.1.2 Sensitivität

Die Ct-Werte bei Amplifikation im Du/Triplexansatz waren mit denen des Monoplex-Assays vergleichbar (Tabelle 29), d.h. ein Sensitivitätsverlust durch die Amplifikation im Du/Triplex-Ansatz war nicht nachweisbar. Im Falle von Parainfluenzavirus Subtyp 1, Coronavirus Subtyp 229 E sowie dem Humanen Metapneumovirus Subtyp A ergaben sich beim Nachweis mittels Du/Triplex-PCR überraschenderweise sogar geringfügig niedrigere Ct-Werte im Vergleich zum entsprechenden Monoplex-Ansatz („Linksverschiebung“ der Ct-Werte im Du/Triplex-Assay). Da für beide Assays das gleiche PCR-Kit (QuantiTect-Multiplex RT-PCR Kit, Qiagen, Deutschland) verwendet wurde, wäre möglicherweise die Zusammensetzung der im Kit enthaltenen Reagenzien bzw. deren Konzentration eine mögliche Ursache für dieses Phänomen. Die Rücksprache mit der Herstellerfirma ergab, daß dieses Kit im Hinblick auf seine Ionenkonzentrationen (K^+ und $MgCl^+$) speziell für Multiplex-Anwendungen konzipiert wurde. Dies führt möglicherweise zu einem optimierten Primer Annealing in Multiplexansätzen.

4.1.3 Vergleich des RSV-Schnelltests mit der RSV-PCR

Der direkte Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz verfügt im Vergleich zum PCR-Nachweis über eine vergleichbare Spezifität bei einer geringeren Sensitivität ¹⁸. Im Rahmen dieser Dissertation wurde der herkömmlich eingesetzte, auf dem Prinzip der Immunfluoreszenz basierende RSV-Schnelltest mit dem RSV-PCR-Nachweis verglichen (Tabelle 33). Die Diagnosestellung mittels RSV-Schnelltest ist innerhalb von 2 bis 3 Stunden möglich und somit im Vergleich zur PCR, die ca. 4 bis 5 Stunden dauert geringfügig schneller. Jedoch ergab sich bei Analyse des RSV-Schnelltests mittels Vierfeldertafel eine Sensitivität von 88,4% bei einer Spezifität von 99,8%, was die in der Literatur (s.o.) beschriebene Evaluation des Schnelltests als spezifische, jedoch nicht ausreichend sensitive Methode bestätigt. Die mangelnde Sensitivität könnte vor allem bei anderen Patientenkollektiven als bei Kleinkindern, z.B. Immunsupprimierten oder älteren Menschen von Bedeutung sein, da bei diesen Kollektiven geringere Viruslasten zu erwarten sind.

4.1.4 Vergleich der Virusisolierung mit der one-step real-time PCR

Neben dem Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz ist die Virusisolierung eine weitere Methode des direkten Virusnachweises, die über den cytopathischen Effekt des inokulierten Virus auf eine susceptible Zellkultur ausgewertet wird. Diese Methode ist spezifisch, hat jedoch folgende deutliche Nachteile: 1. eine lange Untersuchungsdauer 2. einige Viren sind schwer/gar nicht anzüchtbar und 3. die seltene Detektion von viralen Koinfektionen ¹⁵. Bei Vergleich der Ergebnisse der Respiratorischen-Virus-PCR mit denen der mittels Zellkultur detektierten viralen Infektionen ergab sich eine Detektionsrate von 28,4 %, d.h. bei ca. einem Drittel aller klinischen Materialien, die in der PCR positiv waren wurde ein Virus über die Zellkultur identifiziert und durch eine erneute PCR-Untersuchung bestätigt (Tabelle 34). Hervorzuheben ist, daß in insgesamt 11 Fällen die PCR initial negativ war im Gegensatz zur Virusisolierung, wo ein cytopathischer Effekt beobachtet wurde. Bei Untersuchung des Zellkulturüberstands nach der Virusanzucht war dann in allen 11 Fällen in der PCR ein Signal nachweisbar. Folglich muß davon ausgegangen werden, daß diese Proben positiv für das jeweilige Virus sind, jedoch zunächst nicht über die PCR detektierbar waren. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ergibt sich für all jene Viren, welche über eine große Typenvielfalt verfügen (Adenoviren, Rhino- und Enteroviren). Der PCR-Nachweis verwendet in diesen Fällen „degenerierte“ primer, um möglichst viele Subtypen zu erfassen. Bei dem Design dieser PCR geht man zwangsläufig Kompromisse ein hinsichtlich der Primer/Template-Bindung, so daß das Auftreten von Fehlpaarungen (mismatches) zwischen Primer und template zu einem falsch-negativen PCR-

Signal führen kann. Dies wiederum führt zu einem Sensitivitätsverlust, welcher erst bei der Virusanzucht durch die Vermehrung des Virus ausgeglichen wird. Besonders im Falle der Adeno-und Enteroviren wäre eine Modifikation der PCR mit dem Ziel der Abdeckung einer breiteren Subtypenvielfalt erstrebenswert, aber vermutlich nur schwer zu erreichen.

4.2 Die erste klinische Studie

4.2.1 Erregerspektrum der mittels PCR nachgewiesenen Viren

Insgesamt 254 pädiatrische Patienten, die aufgrund eines akuten Respirationstraktinfekts hospitalisiert waren, wurden im Rahmen der ersten klinischen Studie auf respiratorische Viren mittels PCR untersucht mit einer Gesamtnachweisrate von 64,6%. Wie zu erwarten war, zeigte sich in den Winter-und Frühjahrsmonaten eine erhöhte Inzidenz von Respirationstraktviren. Wie bereits in anderen Studien beschrieben,^{58 48} war auch in dieser Studie das RSV mit 112 Fällen (44,1 %) das am häufigsten nachgewiesene Virus, dessen klinische Relevanz darüberhinaus deutlich wurde durch den alleinigen Nachweis von RSV als verursachendes Pathogen in 24 der insgesamt 72 Fällen von Pneumonie (33%). Interessanterweise war das humane Bocavirus als zweithäufigstes Pathogen detektierbar (49 Fälle, 19,3%). Obwohl eine Vielzahl von Studien eine Gesamtprävalenz des humanen Bocavirus von zwischen 1,5-11,3 % beschrieben haben,^{2 28 37 27 5}⁴⁵ wurde in einer kürzlich publizierten Studie von Allander et al. eine Nachweisrate von 19% bestimmt^{2 24}. Methodische Schwankungen innerhalb der einzelnen Bocavirus-Assays könnten eine Ursache für diese Diskrepanz sein. Desweiteren wurden in unserer Studie (ähnlich wie die von Allander et al.) ausschließlich hospitalisierte Kinder untersucht, wohingegen andere Studien weniger restriktiv waren. Seit seiner Erstbeschreibung im Jahr 2005³ wird über die klinische Relevanz des humanen Bocavirus diskutiert. Die häufige Detektion von huBoV in Verbindung mit einem weiteren Respirationstraktvirus läßt die Frage offen, ob dieses Virus als Auslöser einer akuten Infektion des Respirationstrakts eingestuft werden kann^{14 63}. Obwohl in der Mehrzahl der Fälle unserer Studie das humane Bocavirus in Verbindung mit einem weiteren Virus detektiert wurde (67,3% aller Bocavirus-positiven Untersuchungsproben) (Tabelle 36), lag umgekehrt in 16 Fällen eine Monoinfektion vor. Insgesamt 13 dieser 16 Patienten waren aufgrund einer Bronchitis bzw. in 3 Fällen aufgrund einer Pneumonie hospitalisiert. Die abschließende Bewertung der klinischen Relevanz dieses Virus bleibt abzuwarten und erfordert weitere klinische Studien. Wie von der Arbeitsgruppe um Allander et al. gefordert, ist eine Korrelation von Bocaviruslasten mit der klinischen Symptomatik und damit die Quantifizierung eine entscheidende Strategie zur Klärung der klinischen Relevanz dieses neu entdeckten Virus².

Das am dritthäufigsten nachzuweisende Virus in der ersten klinischen Studie war das Rhinovirus mit 17 Fällen (6,69%). Die in anderen Studien gemessene Prävalenz der Rhinoviren bewegte sich zwischen 9,7-46%^{32 48 38}. Möglicherweise sind saisonale Schwankungen die Ursache für die in unserer Studie niedrige Prävalenz von Rhinoviren.

4.2.2 Die klinische Manifestation und die Frequenz von viralen Koinfektionen

Die Rate von viralen Koinfektionen war mit 16,1% (41 Patienten) (Tabelle 36) hoch im Vergleich zu anderen klinischen Studien, in welchen die Koinfektionsrate zwischen 2 und 10% rangierte^{10 59 26}. Ein Grund für die höhere Frequenz in unserer Studie könnten Unterschiede in der Sensitivität der PCR oder in dem umfassten Erregerspektrum sein. In unserer Studie waren RSV, huBoV und Rhinovirus die häufigsten detektierten Pathogene in viralen Koinfektionen. Kinder, die hospitalisiert waren aufgrund einer Rhinovirus-assoziierten Koinfektion, waren im Median jünger (118 Tage) als solche mit einer RSV- oder Bocavirus-assoziierten Koinfektion (193 bzw. 194 Tage). Hierbei muß jedoch die niedrige Fallzahl der Rhinovirus-infizierten Kinder berücksichtigt werden (6 Fälle). Bei den mittels ICD-10-Codierung dokumentierten klinischen Diagnosen handelte es sich um Infektionen des oberen Respirationstrakts, Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie. Die Korrelation dieser Diagnosen mit den nachgewiesenen Viren ergab eine höhere Frequenz viraler Koinfektionen bei schweren Manifestationen eines akuten Respirationstraktinfekts (Pneumonie) im Gegensatz zur Bronchitis. So waren in 33% der Pneumoniefälle zwei oder mehr virale Erreger nachweisbar, wohingegen bei Bronchitis die Rate der viralen Koinfektionen bei 17% lag. Aus diesem Grund haben wir im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Studien Hinweise auf die Bedeutung viraler Koinfektionen als aggravierenden Faktor in der Manifestation einer akuten Infektion des Respirationstrakts. Zur weiteren Klärung wäre die vergleichende Analyse der Frequenz von viralen Koinfektionen im oberen Respirationstrakt mit der des unteren Respirationstrakts im Rahmen einer Studie, welche neben hospitalisierten Kindern auch solche mit einem banalen Infekt des oberen Respirationstrakts miteinschließt, sinnvoll.

4.3 Die zweite klinische Studie

4.3.1 Altersverteilung

Insgesamt wurden bis dato 182 pädiatrische Patienten in der zweiten klinischen Studie auf das Vorhandensein von viralen Erregern im Rahmen einer akuten Infektion des unteren Respirationstrakts untersucht. Es handelt sich hierbei ausschließlich um hospitalisierte Patienten.

Die Altersgruppe, welche aufgrund eines akuten Respirationstraktinfekts am häufigsten hospitalisiert wurde, ist die der 4 bis 12 Monate alten Kinder. Eine mögliche Ursache hierfür ist die im diesem Lebensalter häufig stattfindende Primärinfektion, welche zu einer schwerwiegenderen Manifestation mit Beteiligung des unteren Respirationstrakts führen kann. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die vergleichende Analyse der gemessenen Viruslasten z.B. von RSV bei Kindern mit gleicher klinischer Diagnose, aber aus unterschiedlichen Altersgruppen, z.B. 4-12 Monate versus 2-5 Jahre. Für RSV ist bekannt, daß annähernd alle Kinder bis zu ihrem 2. Lebensjahr ihre Erstinfektion durchmachen²⁵. Demnach wäre bei 2- bis 5-jährigen Kindern, die bereits über Antikörper gegen RSV verfügen, eine geringere Viruslast bei RSV-Infektion im Vergleich zu seronaiven Kindern zu erwarten. Schließlich wäre die Analyse von potentiell bestehenden Grunderkrankungen (Atopie, Asthma) miteinzuschließen, um Hinweise dafür zu gewinnen, welche Faktoren bei RSV- (Zweit)-Infektion zur Hospitalisierung beitragen.

4.3.2 Saisonale und jährliche Schwankungen der Inzidenzraten einzelner Viren

4.3.2.1 Respiratory Syncytial Virus

Mit Beginn der 2. klinischen Studie wurde die Differenzierung von RSV in die Subtypen A und B in der one-step real-time PCR durchgeführt. In der Saison 2006/2007 waren beide RSV-Subtypen nachweisbar mit einer gleichmäßigen Verteilung von 24% (32 Fälle) RSV A zu 32% (43 Fälle) RSV B. In verschiedenen Studien wurde zwar ein Überwiegen eines RSV Subtyps in einem jeweiligen Beobachtungszeitraum beschrieben, jedoch ist auch die Kozirkulation beider Subtypen in einer Saison - wenn auch seltener - möglich^{20 47 33}. Die Frage nach der Assoziation der RSV Subtypen mit dem Schweregrad der klinischen Erkrankung ist in einer Studie von Papadopoulos et al. adressiert worden. In dieser Studie wurde bei Säuglingen mit RSV A-Infektion eine signifikant schwerwieendere Klinik dokumentiert als bei RSV-B-infizierten Säuglingen, ohne daß dies jedoch Einfluß hatte auf die Dauer der Hospitalisierung. Wir erhoffen durch die in unserer Studie durchgeführte Subtypendifferenzierung der RSV- positiven Proben mit Bestimmung der Viruslast aus zwei aufeinanderfolgenden Proben sowie der detaillierten Erfassung klinischer Daten eine fundierte Auseinandersetzung mit dieser Fragestellung ermöglichen zu können. Bis dato sind beide Subtypen ungefähr in gleichmäßiger Fallzahl nachweisbar.

4.3.2.2 Humanes Bocavirus

Für das humane Bocavirus wurde ein deutliches Absinken der Nachweisrate dokumentiert beim Vergleich der 1. klinischen Studie mit der 2. klinischen Studie. War huBoV in der Saison 2005/2006 noch das zweithäufigste Virus, so fiel es in der darauffolgenden Saison 2006/2007 auf den 4. Platz der Erregerhäufigkeiten. Dies spricht für eine saisonale Schwankung des humanen Bocavirus, welche auch in anderen Studien beschrieben wurde ^{27 37}. Die Frage, ob huBoV ganzjährig nachweisbar ist oder vornehmlich in den Wintermonaten vorkommt -vergleichbar mit anderen Respirationstraktviren wie RSV- wird kontrovers diskutiert. Während in der Studie von Kesebir et al. huBoV ausschließlich in den Wintermonaten detektiert wurde, war in einer Studie von Maggi et al das Bocavirus ganzjährig nachweisbar. In unserer 1.klinischen Studie war das huBoV zwar vornehmlich in den Wintermonaten (25 Fälle, Dezember bis Februar) detektierbar, jedoch waren auch in den Sommermonaten einige huBoV-Fälle (8 Fälle, Juni-September) zu verzeichnen, was für eine ganzjährige Verteilung des humanen Bocavirus spricht.

4.3.3 Quantifizierung von respiratorischen Viren

Die Quantifizierung von Virusmengen mittels PCR („viral load“) hat in anderen Bereichen der klinischen Virologie (HBV, HCV und HIV) ihren festen Stellenwert. Die Frage, ob die Viruslast im Respirationstraktmaterial mit der Klinik des Patienten (Liegedauer, O₂-Bedarf etc.) korreliert, ist Gegenstand der laufenden Studie. Die Viruslasten der fünf häufigsten Erreger aus den jeweiligen Ersteinsendungen von 129 Patienten der zweiten klinischen Studie wurden bis dato analysiert. Die hierbei gemessenen Viruslasten erreichten eine Größenordnung von zwischen 10⁷ bis 10⁸ K/ml für RSV, Rhino- und Enteroviren. bzw. zwischen 10⁹ bis 10¹⁰ K/ml für Adeno- und Bocaviren. Sämtliche Viruslasten erreichten vergleichbar hohe Maximalwerte, was zu eindeutig interpretierbaren Messergebnissen führte. Zum anderen weisen die hohen Viruslasten auf eine ausgedehnte Virusreplikation in den Atemwegen dieser Patienten hin, was bei pädiatrischen Patienten im Rahmen ihrer Erstinfektion mit dem entsprechenden Virus plausibel erscheint. Inwieweit die Höhe der Viruslasten mit dem Schweregrad der klinischen Erkrankung korreliert, bleibt abzuwarten. Schließlich spielen bei der Pathogenese von virusassoziierten akuten Respirationstraktinfektionen weitere Faktoren, wie die Immunantwort des Patienten oder bestehende Grunderkrankungen eine maßgebliche Rolle. In diesem Zusammenhang ist die Analyse der Viruslastkinetik, d.h. das Ausmaß des zu erwartenden Absinkens der Viruslast in der Zweitprobe als Hinweis auf die beginnende Rekonvaleszenz des Patienten von besonderem Interesse. Es ist geplant, die Viruslasthöhe, die Viruslastdynamik und das Vorkommen von viralen

Koinfektionen bei akuten Respirationstraktinfektionen in Korrelation zu bringen mit klinischen Parametern wie z.B. O₂-Bedarf, Liegedauer und C-reaktivem Protein.

4.3.4 Kombinationsmuster von viralen Koinfektionen

Die Entwicklung von molekularen Nachweismethoden erleichtert die Detektion von zwei oder mehr Viren in ein und derselben Probe. Mit Zellkulturmethoden war dies bislang nur schwer möglich, da in aller Regel das Virus mit der effizienteren Replikation das sich langsamere replizierende Virus verdrängt und folglich das Vorhandensein zweier Viren nicht sicher detektiert werden konnte. Somit eröffnen molekulare Nachweismethoden mit der Möglichkeit, virale Koinfektionen zu detektieren, eine wissenschaftliche Analyse dieses Phänomens. Bislang wurde in einigen klinischen Studien auf die Relevanz einer viralen Koinfektion im Hinblick auf den Schweregrad der klinischen Manifestation eingegangen ^{9 50}, jedoch sind die zellulären und immunologischen Mechanismen viraler Koinfektionen noch nicht gründlich untersucht. Bei der Analyse der Koinfektionen unserer 2. klinischen Studie (s. Tabelle 41) fiel auf, daß einige Kombinationen von Viren, z.B. Koinfektion von RSV mit Parainfluenzaviren oder HMPV, nicht auftreten. Bei Detektion zweier Viren in einer Probe ist u.a. die Frage zu stellen ob eine Zelle von zwei Viren gleichermaßen infiziert wird oder ob verschiedene Zelltypen im Respirationstrakt jeweils unterschiedliche Viren beherbergen. Zwar wäre eine Doppelinfection einer Zelle über unterschiedliche Replikationsstrategien verschiedener Respirationstraktviren denkbar, jedoch sezernieren virusinfizierte Zellen Interferon, um sich selbst und benachbarte Zellen vor einer weiteren Infektion zu schützen. RSV exprimiert während der Replikation ein interferonantagonisierendes Nichtstrukturprotein. Möglicherweise wäre aufgrund der RSV-induzierten Blockade der Interferon-Signalkaskade die Zelle vulnerabel gegenüber einer weiteren Virusinfektion. Zusammenfassend wäre ein geeigneter experimenteller Ansatz zur Analyse der Mechanismen viraler Koinfektionen eine interessante Herausforderung zur Untersuchung dieses in klinischen Studien beschriebenen Phänomens.

5 Literatur

1. **Adkins, B., C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke.** 2004. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:553-564.
2. **Allander, T., T. Jartti, S. Gupta, H. G. Niesters, P. Lehtinen, R. Osterback, T. Vuorinen, M. Waris, A. Bjerkner, A. Tiveljung-Lindell, B. G. van den Hoogen, T. Hyypia, and O. Ruuskanen.** 2007. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin. Infect. Dis.* **44**:904-910.
3. **Allander, T., M. T. Tammi, M. Eriksson, A. Bjerkner, A. Tiveljung-Lindell, and B. Andersson.** 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:12891-12896.
4. **Arruda, E., A. Pitkaranta, T. J. Witek, Jr., C. A. Doyle, and F. G. Hayden.** 1997. Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2864-2868.
5. **Bastien, N., N. Chui, J. L. Robinson, B. E. Lee, K. Dust, L. Hart, and Y. Li.** 2007. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J. Clin. Microbiol.* **45**:610-613.
6. **Bennett, B. L., R. P. Garofalo, S. G. Cron, Y. M. Hosakote, R. L. Atmar, C. G. Macias, and P. A. Piedra.** 2007. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* **195**:1532-1540.
7. **Black, C. P.** 2003. Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Respir. Care* **48**:209-231.
8. **Boyton, R. J. and P. J. Openshaw.** 2002. Pulmonary defences to acute respiratory infection. *Br. Med. Bull.* **61**:1-12.
9. **Brouard, J., F. Freymuth, A. Vabret, M. Jokic, B. Guillois, and J. F. Duhamel.** 2000. [Viral co-infections in immunocompetent infants with bronchiolitis: prospective epidemiologic study]. *Arch. Pediatr.* **7 Suppl 3**:531s-535s.
10. **Coiras, M. T., J. C. Aguilar, M. L. Garcia, I. Casas, and P. Perez-Brena.** 2004. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J. Med. Virol.* **72**:484-495.
11. **Collins, P. L. and B. S. Graham.** 2008. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J. Virol.* **82**:2040-2055.
12. **Culley, F. J., J. Pollott, and P. J. Openshaw.** 2002. Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood. *J. Exp. Med.* **196**:1381-1386.
13. **Dowell, S. F., L. J. Anderson, H. E. Gary, Jr., D. D. Erdman, J. F. Plouffe, T. M. File, Jr., B. J. Marston, and R. F. Breiman.** 1996. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J. Infect. Dis.* **174**:456-462.

-
14. **Foulongne, V., Y. Olejnik, V. Perez, S. Elaerts, M. Rodiere, and M. Segondy.** 2006. Human bocavirus in French children. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1251-1253.
 15. **Freymuth, F., A. Vabret, D. Cuvillon-Nimal, S. Simon, J. Dina, L. Legrand, S. Gouarin, J. Petitjean, P. Eckart, and J. Brouard.** 2006. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J. Med. Virol.* **78**:1498-1504.
 16. **Fry, A. M., X. Lu, M. Chittaganpitch, T. Peret, J. Fischer, S. F. Dowell, L. J. Anderson, D. Erdman, and S. J. Olsen.** 2007. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J. Infect. Dis.* **195**:1038-1045.
 17. **Gunson, R. N., T. C. Collins, and W. F. Carman.** 2005. Real-time RT-PCR detection of 12 respiratory viral infections in four triplex reactions. *J. Clin. Virol.* **33**:341-344.
 18. **Henrickson, K. J.** 2004. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**:S6-10.
 19. **Henrickson, K. J., S. Hoover, K. S. Kehl, and W. Hua.** 2004. National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**:S11-S18.
 20. **Imaz, M. S., M. D. Sequeira, C. Videla, I. Veronessi, R. Cociglio, E. Zerbini, and G. Carballal.** 2000. Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fe, Argentina. *J. Med. Virol.* **61**:76-80.
 21. **Johnston, S. L.** 2003. Experimental models of rhinovirus-induced exacerbations of asthma: where to now? *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **168**:1145-1146.
 22. **Kahn, J. S.** 2006. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:546-557.
 23. **Kahn, J. S.** 2007. Newly identified respiratory viruses. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **26**:745-746.
 24. **Kaplan, N. M., W. Dove, A. F. Abu-Zeid, H. E. Shamooun, S. A. Abd-Eldayem, and C. A. Hart.** 2006. Human bocavirus infection among children, Jordan. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1418-1420.
 25. **Karron, R. A., R. J. Singleton, L. Bulkow, A. Parkinson, D. Kruse, I. DeSmet, C. Indorf, K. M. Petersen, D. Leombruno, D. Hurlburt, M. Santosham, and L. H. Harrison.** 1999. Severe respiratory syncytial virus disease in Alaska native children. RSV Alaska Study Group. *J. Infect. Dis.* **180**:41-49.
 26. **Kehl, S. C., K. J. Henrickson, W. Hua, and J. Fan.** 2001. Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1696-1701.
 27. **Kesebir, D., M. Vazquez, C. Weibel, E. D. Shapiro, D. Ferguson, M. L. Landry, and J. S. Kahn.** 2006. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J. Infect. Dis.* **194**:1276-1282.

-
28. **Kleines, M., S. Scheithauer, A. Rackowitz, K. Ritter, and M. Hausler.** 2007. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1032-1034.
 29. **Knipe, D. and P. Howley.** 2001. *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins.
 30. **Lau, S. K., C. C. Yip, T. L. Que, R. A. Lee, R. K. Au-Yeung, B. Zhou, L. Y. So, Y. L. Lau, K. H. Chan, P. C. Woo, and K. Y. Yuen.** 2007. Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. *J. Infect. Dis.* **196**:986-993.
 31. **Legg, J. P., I. R. Hussain, J. A. Warner, S. L. Johnston, and J. O. Warner.** 2003. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **168**:633-639.
 32. **Legg, J. P., J. A. Warner, S. L. Johnston, and J. O. Warner.** 2005. Frequency of detection of picornaviruses and seven other respiratory pathogens in infants. *Pediatr. Infect. Dis. J* **24**:611-616.
 33. **Lina, B., M. Valette, S. Foray, J. Luciani, J. Stagnara, D. M. See, and M. Aymard.** 1996. Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone-Alpes (France) during winter 1994 to 1995. *J. Clin. Microbiol.* **34**:3007-3011.
 34. **Lo, M. S., R. M. Brazas, and M. J. Holtzman.** 2005. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J. Virol.* **79**:9315-9319.
 35. **Lohmann-Matthes, M. L., C. Steinmuller, and G. Franke-Ullmann.** 1994. Pulmonary macrophages. *Eur. Respir. J.* **7**:1678-1689.
 36. **Mandell, G., J. Bennett, and R. Dolin.** 2005. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier.
 37. **Manning, A., V. Russell, K. Eastick, G. H. Leadbetter, N. Hallam, K. Templeton, and P. Simmonds.** 2006. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J. Infect. Dis.* **194**:1283-1290.
 38. **Manoha, C., S. Espinosa, S. L. Aho, F. Huet, and P. Pothier.** 2007. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J Clin. Virol.* **38**:221-226.
 39. **McNamara, P. S. and R. L. Smyth.** 2002. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *Br. Med. Bull.* **61**:13-28.
 40. **Message, S. D. and S. L. Johnston.** 2004. Host defense function of the airway epithelium in health and disease: clinical background. *J. Leukoc. Biol.* **75**:5-17.
 41. **Midulla, F., Y. T. Huang, I. A. Gilbert, N. M. Cirino, E. R. McFadden, Jr., and J. R. Panuska.** 1989. Respiratory syncytial virus infection of human cord and adult blood monocytes and alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**:771-777.
 42. **Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen.** 2003. *Molekulare Virologie*. Spektrum Verlag.

-
43. **Monto, A. S.** 2004. Occurrence of respiratory virus: time, place and person. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**:S58-S64.
 44. **Moscona, A.** 2005. Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. *J. Clin. Invest* **115**:1688-1698.
 45. **Naghipour, M., L. E. Cuevas, T. Bakhshinejad, W. Dove, and C. A. Hart.** 2007. Human bocavirus in Iranian children with acute respiratory infections. *J. Med. Virol.* **79**:539-543.
 46. **Openshaw, P. J.** 2005. Antiviral immune responses and lung inflammation after respiratory syncytial virus infection. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**:121-125.
 47. **Papadopoulos, N. G., D. Gourgiotis, A. Javadyan, A. Bossios, K. Kallergi, S. Psarras, M. N. Tsolia, and D. Kafetzis.** 2004. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Respir. Med.* **98**:879-882.
 48. **Pierangeli, A., M. Gentile, P. Di Marco, P. Pagnotti, C. Scagnolari, S. Trombetti, R. L. Lo, V. Tromba, C. Moretti, F. Midulla, and G. Antonelli.** 2007. Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *J Med. Virol.* **79**:463-468.
 49. **Polack, F. P., P. M. Irusta, S. J. Hoffman, M. P. Schiatti, G. A. Melendi, M. F. Delgado, F. R. Laham, B. Thumar, R. M. Hendry, J. A. Melero, R. A. Karron, P. L. Collins, and S. R. Kleeberger.** 2005. The cysteine-rich region of respiratory syncytial virus attachment protein inhibits innate immunity elicited by the virus and endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:8996-9001.
 50. **Portnoy, B., H. L. Eckert, B. Hanes, and M. A. Salvatore.** 1965. Multiple respiratory virus infections in hospitalized children. *Am. J. Epidemiol.* **82**:262-272.
 51. **Principi, N., S. Bosis, and S. Esposito.** 2006. Human metapneumovirus in paediatric patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:301-308.
 52. **Ratgeber, Influenza. Epidemiologisches Bulletin.** RKI . 18-2-2008.
Ref Type: Abstract
 53. **Schmidtke, M and Wutzler, P. Pleconaril-ein neues Breitspektumtherapeutikum zur Behandlung von Rhino-und Enteroviren?** 2007.
Ref Type: Report
 54. **Scholz, H. and Roos, R.** Handbuch Infektionen bei Kindern und Jugendlichen. Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie . 1-2-2003.
Ref Type: Abstract
 55. **Schütt, C and Bröker, B.** Grundwissen Immunologie. 1. 2006. Elsevier.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
 56. **Smyth, A.** 2002. Pneumonia due to viral and atypical organisms and their sequelae. *Br. Med. Bull.* **61**:247-262.

-
57. **Spann, K. M., K. C. Tran, and P. L. Collins.** 2005. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J. Virol.* **79**:5353-5362.
 58. **Templeton, K. E., S. A. Scheltinga, M. F. Beersma, A. C. Kroes, and E. C. Claas.** 2004. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1564-1569.
 59. **Templeton, K. E., S. A. Scheltinga, M. F. Beersma, A. C. Kroes, and E. C. Claas.** 2004. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1564-1569.
 60. **van den Hoogen, B. G., J. C. de Jong, J. Groen, T. Kuiken, R. de Groot, R. A. Fouchier, and A. D. Osterhaus.** 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* **7**:719-724.
 61. **van der, H. L., K. Pyrc, M. F. Jebbink, W. Vermeulen-Oost, R. J. Berkhout, K. C. Wolthers, P. M. Wertheim-van Dillen, J. Kaandorp, J. Spaargaren, and B. Berkhout.** 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**:368-373.
 62. **Ventre, K. and A. G. Randolph.** 2007. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD000181.
 63. **Weissbrich, B., F. Neske, J. Schubert, F. Tollmann, K. Blath, K. Blessing, and H. W. Kreth.** 2006. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC. Infect. Dis.* **6**:109.
 64. **Woo, P. C., S. K. Lau, C. M. Chu, K. H. Chan, H. W. Tsoi, Y. Huang, B. H. Wong, R. W. Poon, J. J. Cai, W. K. Luk, L. L. Poon, S. S. Wong, Y. Guan, J. S. Peiris, and K. Y. Yuen.** 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* **79**:884-895.

6 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer als ehemaligen kommissarischen Direktor sowie Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Hengel als Direktor des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, die mir die Möglichkeit zur Durchführung meiner Dissertation am Institut für Virologie gegeben haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei PD. Dr. med. Ortwin Adams für die interessante Aufgabenstellung sowie für die in jeglicher Hinsicht hervorragende Unterstützung bei der Umsetzung des Projekts.

Desweiteren möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen des Instituts für Virologie bedanken insbesondere bei Frau Maria Thieme und Frau Sara Scherger für die exzellente technische Unterstützung.

Bei Prof. Dr. med. Horst Schrotten und Dr. med. Tobias Tenenbaum aus der Abteilung Pädiatrische Infektiologie der Uniklinik Düsseldorf sowie Prof. Dr. med. Susanne Schweitzer-Krantz des Evangelischen Krankenhauses Düsseldorf möchte ich mich bedanken für die Zusammenarbeit, welche die Durchführung zweier klinischer Studien ermöglichte.

Bedanken möchte ich mich bei meinen lieben Freunden, insbesondere Alex Kruppa sowie bei meiner Familie, die mir stets ermutigend zur Seite gestanden haben.

Meine tiefe Dankbarkeit gilt meinen Eltern, die mich in allem stets liebevoll unterstützen und mir die Möglichkeit zum Medizinstudium gegeben haben.



7 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Linda Mary Bonzel
Anschrift	Stoffeler Damm 102a, 40225 Düsseldorf
E Mail	linbonzel@gmx.net
Geburtsdatum	02.04.1974
Geburtsort	Tralee, Irland

Schulbildung:

1994	Abitur am St.-Franziskus-Gymnasium, Olpe
------	--

Hochschulausbildung:

1994-2002	Studium der Humanmedizin an der Rheinisch-Westfälisch Technischen-Hochschule (RWTH), Aachen, (Gesamtnote „gut“ (1,9))
2003-2009	Dissertation am Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Betreuung durch PD Dr. med. Ortwin Adams)

Praktisches Jahr:

2001-2002	1.Tertial Chirurgie am Universitätsklinikum, der RWTH-Aachen 2.Tertial Innere Medizin am Universitätsklinikum, der RWTH-Aachen 3.Tertial Neurologie am Universitätsklinikum, der RWTH-Aachen
-----------	--

Facharztausbildung:

04/ 2003-10/2008	Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene (Prof. Dr. med Klaus Pfeffer), Institut für Virologie, Prof. Dr med. Hartmut Hengel, Universitätsklinikum Düsseldorf
------------------	---

Publikationen:

2008, Paper	Bonzel L., Tenenbaum T., Schrotten H., Schildgen O., Schweitzer-Kranz S. and Adams O. Frequent Detection of Viral Coinfection in Children Hospitalized with Acute Respiratory Tract Infection by a Real-Time Polymerase Chain Reaction, Pediatric Infectious Disease Journal, 2008 Jul; 27(7): 589-94
2008, Poster	Werczmircorwski J., Hengel H., Bonzel L., Ludwig A. and Adams O. Genetic and antigenetic variability of Human Respiratory Syncytial Virus A and B isolates over eleven years in Germany, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Heidelberg
2008, Poster	Schmidt M., Kupfer C., Hanselle T., van de Sand C., Adams O., Bonzel L. and Sprenger-Haussels M., Automated Extraction Platforms as Front End for Resplex II, Simultaneous Detection and Identification of a Panel of Respiratory RNA Viruses in Respiratory Samples, Symposium on Clinical Virology, Florida, USA
2007, Vortrag	Adams O., Bonzel L., Schildgen O. Diagnosis of Respiratory Viruses including Bocavirus in Children with Respiratory Tract Infections by a One-Step Multiplex Real-Time PCR, Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV), Lyon, France
2007, Vortrag	Bonzel L., Adams O. Diagnosis of Respiratory Viruses in Children with Acute Respiratory Tract Infection by a One-Step Multiplex Real-Time PCR, Arbeitskreis Klinische Virologie, Gesellschaft für Virologie e.V.(GfV), Zeilitzheim, Deutschland

8 Zusammenfassung

Eine one-step real-time PCR bestehend aus 5 Du- und 2 Triplexassays wurde etabliert zum Nachweis von 12 Respirationstraktviren (10 RNA- und 2 DNA-Viren inklusive Subtypen) in klinischen Untersuchungsmaterialien. Die Assays verfügen über eine mit dem entsprechenden Monoplexansatz vergleichbare Sensitivität und Spezifität, welche durch das Austesten von potentiell kreuzreaktiven Pathogenen evaluiert wurde. In einer prospektiven klinischen Querschnittsstudie (Dezember 2005 bis Oktober 2006) wurden die Häufigkeit, das Erregerspektrum sowie die saisonale Verteilung der nachgewiesenen Viren untersucht. Von 254 pädiatrischen Patienten waren 164 (64,6%) positiv für ein oder mehrere respiratorische Viren. Respiratory Syncytial Virus (RSV) war mit 112 Fällen (44,1%) der am häufigsten nachgewiesene Erreger, gefolgt vom humanen Bocavirus (huBoV) (49 Fälle, 19,3%) sowie Rhinoviren (17 Fälle, 6,69%). Eine hohe Inzidenz an viralen Infektionen fand sich während der kühlen Jahreszeit (Dezember-Mai) und eine niedrigere Inzidenz in den Sommermonaten (Juni-September). 41 Patienten (16,1%) waren positiv für zwei oder mehr Respirationstraktviren, wobei RSV und huBoV mit 33 Fällen die am häufigsten nachgewiesene Erregerkombination darstellte. Tendenziell war die Rate der viralen Koinfektionen bei Kindern mit Pneumonie (17 Fälle, 33%) höher als bei Kindern mit Bronchiolitis (7 Fälle, 23%) und Bronchitis (10 Fälle, 17%). In einer weiteren prospektiven klinischen Querschnittsstudie (Beginn: November 2006; Stand: Dezember 2007) wurden zwei im Abstand von einigen Tagen entnommene Proben von pädiatrischen Patienten auf Respirationstraktviren untersucht und die Viruslast bestimmt. Letztere bewegte sich zwischen 10^7 bis 10^8 K/ml für RSV, Rhino- und Enteroviren bzw. zwischen 10^9 bis 10^{10} K/ml für Adeno- und Bocaviren. Bis dato wurden 182 Patienten mit insgesamt 325 klinischen Proben untersucht. Der Altersmedian dieser Patienten betrug 0,74 Jahre, wobei 4 bis 12 Monate alte Kinder (59 Patienten, 32,42%) die größte Gruppe darstellten. Die am häufigsten diagnostizierte Erkrankung war die obstruktive Bronchitis (70 Fälle, 38,5 %) gefolgt von der Pneumonie (52 Fälle, 28,6%). RSV war in der 2. Studie wie zuvor dominierend (n=75, 55,14%), gefolgt von Rhino- (n=35, 14%) und Adenoviren (n=12, 8,82 %). Das huBoV war lediglich in 10 Proben (7,35 %) vorhanden (versus 49 Fälle, 19,3% in der ersten Studie), so daß es im Gegensatz zur Saison 2005/2006 nur noch als vierthäufigstes Virus in der Saison 2006/2007 zu finden war. Die RSV-Subtypen A und B kozirkulierten und traten v.a. in den Wintermonaten häufig in Erscheinung, wohingegen die Rhinoviren ganzjährig mit einem Anstieg der Inzidenz im Herbst nachgewiesen wurden. Eine virale Koinfektion wurde in 84 (25,6%) der 325 untersuchten Materialien nachgewiesen. In keinem Fall wurde das gleichzeitige Vorkommen zweier Paramyxoviren detektiert, wohingegen zwei Picornaviren (Rhino- in Kombination mit Enteroviren) in 8 Fällen nachgewiesen wurde.