

Aus dem
Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. Jörg Timm

**ENTWICKLUNG DER HUMORALEN IMMUNITÄT GEGEN DAS
RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS BEI SÄUGLINGEN UND
KLEINKINDERN**

Dissertation

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

vorgelegt von

Isabel Kornol

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ortwin Adams

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Antje Schuster

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Respiratory Syncytial Virus	1
1.1.1	Entdeckung und Isolierung des RSV	1
1.1.2	Klassifikation und Epidemiologie.....	1
1.1.3	Virion und Proteine.....	3
1.1.4	Glykoprotein F	3
1.1.5	Glykoprotein G	4
1.1.6	Pathogenese und Immunantwort	4
1.1.7	Klinik, Diagnose, Therapie und Prophylaxe.....	6
1.2	Neutralisierende Antikörper	9
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Materialien.....	12
2.1.1	Übersicht der Arbeitsmaterialien.....	12
2.1.2	Humane Seren	13
2.1.3	Virusisolate	13
2.2	Arbeitsmethoden.....	14
2.2.1	Isolierung von RSV in der Zellkultur.....	14
2.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford	14
2.2.3	TCID ₅₀	16
2.2.4	ELISA mit humanen Seren	17
2.2.5	Neutralisationstest (N-Test)	18
2.2.6	RSV-F-ELISA	20
3	Ergebnisse	22
3.1	RSV-ELISA	22
3.2	Neutralisations-Test (N-Test)	28
3.3	RSV-F-ELISA	33
4	Diskussion.....	34
4.1	Anstieg der RSV-Seroprävalenz im Untersuchungskollektiv	34
4.2	Neutralisationstest und ELISA im Vergleich	36
4.3	RSV-F-ELISA	38

4.4 Weitere Ergebnisse.....	38
5 Zusammenfassung.....	39
Anhang.....	40
Literaturverzeichnis	40
Internetquellen	46

Liste der verwendeten Abkürzungen

(h)RSV	<u>(h)umanes</u> <u>R</u> espiratory <u>S</u> yncytial <u>V</u> irus
a	Jahr (lat. <u>a</u> nnus)
Abb.	<u>A</u> bbildung
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum- <u>A</u> lbumin
CPE	<u>z</u> ytopathischer (engl. <u>c</u> ytopathic) <u>E</u> ffekt
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
FKS	<u>f</u> etales <u>K</u> älberserum
gp	<u>G</u> lykoprotein
HRPO	<u>h</u> orseradish- <u>p</u> eroxidase
IgA, IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>A</u> , <u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IVIG	<u>i</u> ntravenöse <u>I</u> mmunglobuline
Kap.	<u>K</u> apitel
M	<u>M</u> olar
min	<u>M</u> inuten
ml	<u>M</u> illiliter = 10^{-3} Liter
nm	<u>N</u> anometer = 10^{-9} Meter
N-Test	<u>N</u> eutralisationstest
OPD	<u>o</u> - <u>P</u> henylendiamin
PBS	<u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	$-\log [H^+]$
RNA	<u>R</u> ibonukleinsäure (engl. <u>a</u> cid)
RNase	<u>R</u> ibonuklease
rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute (Umdrehungen pro Minute)
RT	<u>R</u> aumtemperatur
s.	<u>s</u> iehe
ss	<u>s</u> ingle <u>s</u> trand
TCID ₅₀	<u>T</u> issue <u>c</u> ulture <u>i</u> nfectious <u>d</u> osis (<u>50%</u>)-Test

TMB	<u>T</u> etramethyl <u>b</u> enzidin
vgl.	<u>v</u> er <u>g</u> leiche
ZK	<u>Z</u> ell <u>k</u> ontrolle
µg	<u>M</u> ikrogramm = 10^{-6} Gramm
µl	<u>M</u> ikroliter = 10^{-6} Liter

1 Einleitung

1.1 Das Respiratory Syncytial Virus

1.1.1 Entdeckung und Isolierung des RSV

Erstmalig isoliert wurde das Respiratory Syncytial Virus (RSV) 1956 aus einem Schimpansen als „chimpanzee coryza agent“, welches bei Labortieren und Pflegern zu einer Rhinitis geführt hatte. Kurze Zeit später (1957) konnte es, als RSV bezeichnet, auch bei Kindern mit Atemwegsinfekten nachgewiesen werden und es wurde offenbar, dass es sich um eine weit verbreitete Infektionskrankheit mit sehr hoher Durchseuchungsrate handelt (1,2).

Ein Versuch in den 1960er Jahren, Kleinkinder mit einem inaktivierten RSV-Impfstoff vor der Infektion zu schützen, musste wegen unerwarteter Komplikationen abgebrochen werden (s. Kap. 1.1.7) Die Entwicklung eines Impfstoffes frei von den damals beobachteten Komplikationen wäre daher wünschenswert.

1.1.2 Klassifikation und Epidemiologie

Beim Respiratory Syncytial Virus handelt es sich um ein behülltes ss(-)-RNA-Virus. Es gehört zur Familie der Paramyxoviridae, darin zur Gattung (Unterfamilie) Pneumovirinae (Tabelle 1.1).

<u>Unterfamilie</u>	<u>Genus</u>	<u>Vertreter beim Menschen</u>
Paramyxovirinae	Respirovirus	Parainfluenzavirus Typ 1 und 3
	Rubulavirus	Mumpsvirus, Parainfluenzavirus Typ 2, 4a und 4b
	Avulavirus	-
	Morbillivirus	Masernvirus
	Henipavirus	Hendravirus, Nipahvirus
Pneumovirinae	Pneumovirus	Respiratory Syncytial Virus (RSV)
	Metapneumovirus	humanes Metapneumovirus

Tabelle 1.1 Einteilung der Paramyxoviridae RSV ist der einzige Vertreter des Genus Pneumovirus beim Menschen. Tabelle modifiziert aus: Molekulare Virologie (3) , S. 266.

Man unterteilt das Genus des Weiteren in die Untergruppen A und B, die sich vor allem in der Struktur des Glykoprotein G unterscheiden, während das Glykoprotein F stärker konserviert ist (s. Kap. 1.1.4 und 1.1.5). Zwischen den beiden Untergruppen besteht eine Kreuzimmunität (s. Kap. 1.1.4).

Der einzige natürliche Wirt des humanen RSV (hRSV) ist der Mensch. Es ist weltweit verbreitet. In Deutschland ist es das zahlenmäßig bedeutendste Virus bei Infektionen der tiefen Atemwege bei Kindern (4). In den ersten Lebensjahren sind Infektion und Reinfektionen aufgrund des ubiquitären Vorkommens und der hohen Virulenz des Virus häufig, sodass die Seropositivität schon bei Kindern sehr hoch ist (5). Da neutralisierende Antikörper, die der Mensch nach Infektionen bildet, nicht an alle zirkulierenden Wildviren binden und das immunologische Gedächtnis für RSV nicht dauerhaft erhalten bleibt, sind symptomatische Reinfektionen lebenslang möglich und gewinnen vor allem bei Immunsuppression, schwerwiegender Grunderkrankung und im Alter wieder an Bedeutung (6,7).

Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt durch Tröpfchen- und Schmierinfektion über die Nasen- oder Konjunktival-, allerdings kaum über die Mundschleimhaut (8). Die Hauptinfektionszeit des Virus erstreckt sich von November bis März, jedoch unterliegt dies einer großen regionalen und saisonalen Variabilität. Die geradzahligen Jahre weisen in Deutschland tendenziell eine frühe Saison auf, die ungeradzahligen eine späte (9).

1.1.3 Virion und Proteine

Das Respiratory Syncytial Virus verfügt über insgesamt elf Proteine. In der vorliegenden Arbeit soll nur auf die Glykoproteine F (Fusion) und G (Glykoprotein, auch als Attachment-Protein bezeichnet) näher eingegangen werden, bei denen es sich um Oberflächenproteine handelt.

Das Virus besitzt darüber hinaus das Oberflächenprotein SH (*small hydrophobic*), die Matrixproteine M, M2-1 und M2-2 (M2-ORF), die Nukleokapsidproteine N (Nukleo-) und P (Phosphoprotein) sowie den L-Polymerase-Komplex und die Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2 ((10); Fields Virology Fifth Edition, Volume Two, S. 1603 (11)).

Die Virionen messen elektronenmikroskopisch zwischen 100 und 500 nm, in filamentöser Form bis zu 10 µm (12). Das helikale Nukleokapsid ist von einer Lipidmembran umhüllt, die von der Wirtszelle stammt und mit viralen Proteinen (G, F, SH) durchsetzt ist. Innen angelagert findet sich das M-Protein.

1.1.4 Glykoprotein F

Beim RSV-F-Protein handelt es sich um ein Transmembran-Oberflächenprotein, das aus einer inaktiven Vorstufe F₀ gebildet wird. Diese wird vom zellulären Golgi-Apparat zum aktiven F-Protein gespalten, welches aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten, F₁ und F₂, besteht. Hierbei wird das Peptid p27 freigesetzt, welches möglicherweise eine Bedeutung für die Pathogenese hat (13).

Das F-Protein spielt eine Rolle bei der Viruspenetration der Wirtszelle, indem es an der Verschmelzung des Viruspartikels mit der Zellmembran beteiligt ist (14). Seine Hauptfunktion besteht jedoch darin, die Fusion infizierter Zellen mit deren Nachbarzellen zu vermitteln, sodass eine direkte Ausbreitung von Zelle zu Zelle ermöglicht wird (15). Eine hydrophobe Domäne der F₁-Untereinheit führt durch Verbindung mit der Zielmembran zur Fusion. Hierbei entstehen die für die RSV-Infektion typischen Synzytien. Diese Fähigkeit vermittelt das F-Protein *in vitro* auch in Ab-

wesenheit der anderen envelope-Proteine, wobei *in vivo* die Abwesenheit des G-Proteins zu attenuierten Viren führt (16). Zwischen den einzelnen Virusstämmen ist das F-Protein stark konserviert (17).

1.1.5 Glykoprotein G

Das Glykoprotein G ist ebenfalls ein Transmembranprotein, kommt aber zu etwa 20% *in vitro* bzw. 80% in der Zellkultur in sekretierter Form vor (18). Als das wichtigste Bindungsprotein ist es für die Virulenz des Virus von entscheidender Bedeutung (19). In Abwesenheit des Proteins erfolgt *in vivo* wahrscheinlich keine Replikation (16). Je nach infizierter Zelllinie befinden sich am G-Protein verschiedene Kohlenhydratseitenketten, was zu einer antigenen Vielfalt und damit zu einer reduzierten Erkennbarkeit durch das Wirtsimmunsystem führt (20).

Die Virusuntergruppen A und B werden anhand der Differenzen im G-Protein unterschieden. Das G-Protein variiert außerdem deutlich zwischen einzelnen Virusstämmen mit Ausnahme zweier stark konservierter Domänen (21). Von einer dieser wird vermutet, dass sie die angeborene Immunabwehr gegen RSV unterdrückt (22).

1.1.6 Pathogenese und Immunantwort

RSV zählt zu den für den Menschen am stärksten infektiösen Viren überhaupt. Die Inkubationszeit beträgt vier bis fünf Tage (23). Übertragen wird RSV durch Tröpfcheninfektion.

Ihren Ausgang nimmt die Infektion vom Nasopharynx in Form einer Rhinopharyngitis. Von hier breitet sich das Virus - bei empfänglichem Wirt - rasch bis in die tiefen Atemwege aus und infiziert die Bronchialepithelzellen. Symptome der tiefen Atemwegsinfektion treten nach weiteren ein bis drei Tagen auf (Fields Virology Fifth Edition, Volume Two, S. 1619, Abschnitt Infection and Pathogenesis (11)). Eine Ausbreitung des Virus erfolgt sowohl durch Freisetzung von Viruspartikeln, die dann weitere Zellen infizieren, als auch von Zelle zu Zelle über eine Verschmel-

zung der Zellmembranen, wobei die im mikroskopischen Bild typischen Synzytien entstehen. Hierbei ist das F-Protein von entscheidender Bedeutung. Dessen Expression auf der Zelloberfläche ermöglicht die Fusion mit der Nachbarzelle.

Zwischen der Viruslast und der Schwere des klinischen Bildes besteht in verschiedenen Studien eine positive Korrelation (z.B. (24)), in anderen jedoch nicht (z.B. (25)). Meist endet die Virusausscheidung mit der klinischen Genesung, manche Säuglinge scheiden hingegen noch mehrere Wochen danach das Virus aus (24,26).

Die RSV-Infektion beschränkt sich in der Regel auf die Epithelien der Atemwege. Darüber hinaus ist Virusantigen in Leukozyten und anderen Blutzellen nachgewiesen worden. Dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen werden ebenfalls befallen und in ihren Funktionen teilweise verändert; die Bedeutung dessen ist jedoch noch unklar (27). Vermutet werden immunmodulatorische Effekte (28). Es gibt Hinweise darauf, dass dendritische Zellen und Makrophagen als eine Art RSV-Reservoir dienen, das im Körper persistiert (29,30).

Die RSV-Bronchiolitis ist gekennzeichnet durch Nekrose und Proliferation der respiratorischen Epithelien sowie einen Untergang zilientrager Zellen (31). Hier kann die vermehrte Expression von Genen für Faktoren, die für lokale Entzündungsprozesse eine Rolle spielen, z.B. Chemokine, nachgewiesen werden (32). Das peribronchiale Gewebe wird von Abwehrzellen infiltriert und ist ödematös verdickt. Zudem kommt es zu einer vermehrten Schleimproduktion. Es resultiert eine bronchiale Obstruktion, die besonders bei den englumigen Bronchien sehr kleiner Kinder problematisch ist (33). Kommt es zur Pneumonie, werden die interalveolären Wände durch Immuzellinfiltrate verdickt und das Lumen füllt sich mit Flüssigkeit (31). Hieraus wird ersichtlich, dass die immunologische Reaktion des Wirtsorganismus von großer Bedeutung für das klinische Beschwerdebild ist.

Die wichtigste Rolle in der Krankheitsbekämpfung spielt das adaptive Immunsystem. Vor allem bei Reinfektionen wirken Antikörper im Mausmodell krankheitslimitierend (34). Um das Virus vollständig zu eliminieren, ist die Anwesenheit zytotoxischer T-Lymphozyten nötig (35). Beim Menschen spielen auf den Schleimhäuten

vorkommende Immunglobuline der Klasse A (IgA) eine große Rolle in Bezug auf die Eliminierung des Virus aus dem Respirationstrakt (36) und damit möglicherweise für die Virusausscheidung, auf die die IgG-Antikörper kaum Einfluss haben (37). Die Funktion der Gedächtniszellen, die zur Ausbildung einer anhaltenden Immunität beitragen, wird durch RSV verändert (38).

Obwohl in den ersten Lebensmonaten mütterliche RSV-Antikörper im kindlichen Serum nachweisbar sind, ist eine Infektion auch in dieser Zeit möglich und sogar ein häufiges Ereignis. Nichtsdestotrotz wird diesen Immunglobulinen ein protektiver Effekt zugeschrieben, da Frühgeborene, die eine geringere Antikörpermenge diaplazentar erhalten haben, besonders durch teilweise schwer verlaufende Infektionen gefährdet sind (39). Auf bisher unbekannte Weise unterdrücken die mütterlichen Antikörper, zusätzlich zur Unreife des kindlichen Immunsystems, die körpereigene Antikörperbildung beim Säugling (40,41). Insgesamt sind viele Aspekte der Immunantwort gegen RSV bis heute nicht vollständig verstanden und bedürfen der weiteren Erforschung.

Zwischen den Virusuntergruppen A und B besteht eine gewisse Kreuzimmunität. Diese begründet sich vor allem durch das F-Protein, das nicht untergruppenspezifisch ist (vgl. Kap. 1.1.4). Antikörper gegen dieses Virusprotein wirken in etwa gleich stark gegen RSV A und B (21). Der in der Prophylaxe bei Säuglingen und Kleinkindern verwendete monoklonale Antikörper Palivizumab (s. Kap. 1.1.7) bindet entsprechend an RSV A- sowie RSV B-Isolate. Auch Antikörper gegen bestimmte Regionen des RSV-G-Proteins können gegen die Untergruppen A und B gleichzeitig wirken (42).

1.1.7 Klinik, Diagnose, Therapie und Prophylaxe

Symptomatische RSV-Infektionen können lebenslang immer wieder auftreten. Die klinischen Symptome sind in ihrer Ausprägung allerdings stark variabel: Je nach Wirt reicht die Bandbreite von einer leichten Rhinorrhoe bis hin zur schweren Pneumonie. Besonders typisch ist die Bronchiolitis im Säuglings- und Kleinkindalter (43). Diese kann mit Fieber und Hypoxämie einhergehen und eine stationäre Be-

handlung erforderlich machen. Auch eine Otitis media, die durch bakterielle Superinfektion noch verkompliziert werden kann, tritt häufig auf (44).

Da auch bei vorhandenen Serumantikörpern eine Reinfektion erfolgen kann (vgl. Kap. 1.1.1 und 1.2), ist die Bestimmung des RSV-Antikörpertiters nicht sinnvoll zur Diagnosestellung. Als zuverlässiger hat sich der direkte Virusnachweis erwiesen, da das Virus bei akuten Infektionen in hohen Mengen im Nasenrachenraum nachweisbar ist. Eine Virusanzucht in der Zellkultur ist zwar möglich, gelingt aber nicht in allen Fällen und gestaltet sich arbeits- und zeitaufwendig. Heutzutage ist der Nachweis über eine Real-Time-PCR (rtPCR) in vielen Laboren etabliert (45). Diese sollte nicht aus dem Serum erfolgen, da eine Virämie nicht bei jedem Patienten zu erwarten ist (46). Sehr gut geeignet ist hingegen Material aus einem Nasen- oder Nasenrachenaspirat oder -abstrich, das abgeschilferte Epithelzellen enthält (47). Im klinischen Alltag wird üblicherweise mit Hilfe von Schnelltests über den erforderlichen Umfang der Hygienemaßnahmen bei der stationären Aufnahme eines Kindes entschieden. Diese Tests funktionieren meist auf der Basis eines ELISA und erzielen zufriedenstellende Ergebnisse in Bezug auf Sensitivität und Spezifität, wenn sie bei Kindern in den ersten beiden Lebensjahren mit Symptomen einer Atemwegsinfektion zum Einsatz kommen (48). In den letzten Jahren wurden auch Schnellteste auf molekularer Basis etabliert, die mit hoher Sensivität das RSV nachweisen können. Beispiele dafür sind der BinaxNOW® RSV von Alere oder der Xpert® Flu/RSV XC der Firma Cepheid.

Bis heute ist die Therapie der RSV-Infektion schwierig. Bei leichteren Fällen ist die ambulante Behandlung möglich. Liegt jedoch eine schwere Infektion der unteren Atemwege mit Atemnot, Hypoxämie oder Dehydrierung vor, muss eine stationäre Überwachung und Therapie erfolgen. Neben supportiven Maßnahmen wie Stressvermeidung (*minimal handling*), intravenöser Flüssigkeitssubstitution, Antipyrese, Absaugen des Schleims, Sauerstoffgabe und ggf. maschineller Beatmung stehen verschiedene symptomatische medikamentöse Ansätze zur Verfügung.

Bei starker Obstruktion werden teilweise inhalative β -Sympathomimetika eingesetzt, die allerdings nur eine begrenzte Kurzzeitwirkung haben (49) und von der American Academy of Pediatrics (AAP) nicht mehr empfohlen werden. Auch Adre-

nalin, ebenfalls inhalativ verabreicht, ist in den aktuellen amerikanischen Leitlinien nicht für den routinemäßigen Einsatz empfohlen. Die Inhalation mit hypertoner Kochsalzlösung zur Verbesserung der mukoziliären Clearance, Verminderung der Viskosität des Bronchialschleims und Verringerung des peribronchialen Ödems durch osmotischen Einstrom von Flüssigkeit in das bronchiale Lumen wird seit einigen Jahren eingesetzt, von der AAP jedoch nur eingeschränkt empfohlen (50).

Da die Immunantwort des Wirtes für die Pathogenese bedeutend ist (vgl. Kap. 1.1.6), zielt ein weiterer Therapieansatz auf die Unterdrückung der Entzündungsaktivität ab. Der systemische oder inhalative Einsatz von Kortikosteroiden zeigt jedoch nach derzeitiger Datenlage keine positiven Effekte auf Hospitalisierungsrate oder -dauer und wird daher nicht allgemein empfohlen (51).

Die Möglichkeiten der kausalen antiviralen Therapie spielen bislang lediglich eine untergeordnete Rolle. Inhalativ oder oral verabreichtes Ribavirin, ein in der Zellkultur wirksames Nukleosidanalogen, das als falscher Baustein in die virale RNA eingebaut wird, zeigt nur mäßige Effekte auf den klinischen Verlauf und die Virusausscheidung, wobei weitere Studien zur Bestätigung dieser Ergebnisse erforderlich sind (52). Bei der inhalativen Applikation mittels Vernebelung besteht zusätzlich das arbeitsmedizinische Problem, dass das Pflegepersonal den Aerosolen potentiell ebenfalls ausgesetzt ist und bei Ribavirin eine teratogene Wirkung bisher nicht sicher ausgeschlossen werden kann (53).

Immunglobuline sind zur Therapie einer manifesten RSV-Infektion ungeeignet, spielen aber eine Rolle bei der Infektionsprophylaxe. Dabei gilt jedoch die Einschränkung, dass der Einsatz sowohl bezüglich der Kosten-Nutzen- als auch der Aufwand-Nutzen-Relation nur in Risikogruppen (v. a. bei kleinen Frühgeborenen im ersten Lebensjahr oder pulmonal-kardiologischen Vorerkrankungen) sinnvoll ist. Hierzu wurden in der Vergangenheit Spenderseren mit hohen Titern RSV-neutralisierender Antikörper aufbereitet und dem Empfänger intravenös verabreicht (IVIG, RespiGamTM). Die monatliche Anwendung während der Wintermonate zeigte Erfolge bezüglich der Reduktion einer stationären Behandlung (54). Da es sich jedoch um ein menschliches Produkt handelt, besteht die prinzipielle Gefahr einer Übertragung noch nicht identifizierter Erreger. Zudem ist der Gehalt an

Fremdprotein für den Empfänger hoch, was allergische Reaktionen auslösen kann. Auf dem deutschen Markt war das Medikament nie erhältlich.

Seit einigen Jahren ist der monoklonale Antikörper Palivizumab (Synagis®) zur prophylaktischen Anwendung zugelassen. Es handelt sich hierbei um einen monoklonalen humanisierten Mausantikörper, der spezifisch das RSV-F erkennt und somit virusneutralisierend gegen RSV A und B wirkt (vgl. Kap. 1.2). Die hohe Spezifität und Affinität des Antikörpers bewirken eine effektive Bindung an das Virus, weshalb eine monatliche intramuskuläre Injektion ausreichend ist zur Vorbeugung einer Infektion. Der Nutzen der Anwendung bei Risikogruppen ist belegt (55).

Der Versuch einer aktiven Impfung gegen RSV mit attenuiertem Virus ist in den 1960er Jahren gescheitert. Die mit formalininaktiviertem Virus geimpften Kinder mussten im Vergleich mit den ungeimpften deutlich häufiger stationär behandelt werden, wofür ein verändertes Muster der Immunantwort auf die Impfung im Vergleich zur Wildinfektion als Ursache angenommen wird (56). Zwar konnte die Bildung von Antikörpern gegen RSV-F und RSV-G nachgewiesen werden, jedoch hatten diese kaum neutralisierende Wirkung (57), was vermutlich an der proteindenaturierenden Wirkung des Formalins lag.

An der Entwicklung günstigerer und weniger aufwändiger Alternativen sowie einer wirksamen Form der aktiven Immunisierung beim Menschen wird weiterhin intensiv geforscht.

1.2 Neutralisierende Antikörper

Als neutralisierend werden solche Antikörper bezeichnet, die den ersten Schritt der Virusreplikation, nämlich das Anbinden des Virus an den Zellrezeptor, verhindern, und damit bei einer Reinfektion erfolgreich vor dem Krankheitsausbruch schützen. *In vitro* sind sie mit Hilfe des sogenannten Neutralisationstests nachzuweisen, der mit Hilfe von Zellkulturen und replikationsfähigem Virus das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern misst (s. Kap. 2.2.5).

Es handelt sich dabei um Immunglobuline vom IgG-Typ. Im Fall des RSV sind dies vor allem Antikörper gegen das F-Protein und das G-Protein (58). Das F-Protein ist dabei deutlich stärker konserviert als die übrigen Antikörper-induzierenden Proteine (s. Kap. 1.1.2). Da vor allem das G-Protein stark glykosyliert ist und das Immunsystem von Säuglingen keine Reaktion gegen Zuckerstrukturen zeigt, könnte dies einer der Gründe für die nicht anhaltende Immunität nach RSV-Infektion in diesem Alter sein (59).

Allerdings existieren nicht nur neutralisierende, sondern auch krankheitsverstärkende Antikörper. Die gegensätzlichen Wirkungen dieser beiden Gruppen befinden sich meist nicht im Gleichgewicht, sondern es besteht in der Summe eine Tendenz in eine Richtung (60). Auf welchem Weg manche Antikörper die Entzündungsantwort verstärken und in welchem Fall sie gebildet werden, ist unklar.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die humorale Immunantwort gegen das RS - Virus in einer Studienpopulation, die die ersten sechs Lebensjahre umfasst, zu untersuchen. Es soll der Verlauf der Antikörperproduktion bei Kindern im Alter von sechs Monaten bis sechs Jahren, also vom Erlöschen des mütterlichen Antikörperschutzes („Nestschutz“) bis ins Schulalter hinein, nachvollzogen werden, um Hinweise auf die immunologischen Muster in der Abwehr gegen RSV sowie die Durchseuchungsrate im Kleinkindalter zu erhalten. Zudem soll die Kreuzimmunität insbesondere zwischen RSV Typ A und RSV Typ B in dieser Altersgruppe untersucht werden.

Da das RSV ähnlich wie das Influenzavirus einer ständigen antigenen Veränderung (*antigenic drift*) unterliegt, gibt es weder für RSV A noch für RSV B ein Standardisolat. Um dieses Problem methodisch zu berücksichtigen und zumindest teilweise auszugleichen, wurden in der vorliegenden Arbeit je drei verschiedene RSV A- und RSV B-Stämme in zwei verschiedenen serologischen Testsystemen verwendet. Damit soll die Frage beantwortet werden, ob es nach der RSV-Erstinfektion im Kindesalter eine typenspezifische Immunantwort gibt. Für den Patienten heiße

das, dass er nur einen unzureichenden Schutz vor Reinfektionen erlangt. Ließen sich signifikante Unterschiede in der Messung von RSV-Antikörpern in Abhängigkeit von dem verwendeten Virusisolat nachweisen, machte dies in der serologischen Diagnostik eine Mixtur von RSV-Stämmen als Antigen erforderlich, um die antigenetische Vielfalt des Virus besser abdecken zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Übersicht der Arbeitsmaterialien

Einen Überblick über die eingesetzten Arbeitsmaterialien gibt Tabelle 2.1.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Abkürzung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Bestellnummer</u>
Anti-human-IgG der Ziege		SIGMA	A0293
Bovines Serumalbumin	BSA	Roth	8076.3
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM	GIBCO	41966
ECC Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep)		GE Healthcare UK Ltd.	NA 931V
ELISA-Waschpuffer Konzentrat		Dade Behring	
fetales Kälberserum	FKS	GIBCO	10270-106
Mouse Anti RSV Fusion Protein		serotec	MCA 490
o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid	OPD	SIGMA	P8412
Penicillin-Streptomycin-Lösung		GIBCO	15140
Phosphat-Citrat-Puffer mit Natrium-Perborat		SIGMA	P4922
Phosphate-buffered saline solution	PBS	GIBCO	14190
Phosphate-buffered saline solution	PBS	OXOID	BR0014G
Protein Assay Dye Reagent Concentrate		BIO-RAD	500-0006
Sucrose		SERVA	35579
Tetramethylbenzidin	TMB	BD	2234663
Tween 20		SERVA	37470
U96 Maxisorp Nunc-immunoplate		nunc	449824
Zellkultur-Testplatte 96F		TPP	92696

Tabelle 2.1 Arbeitsmaterialien alphabetisch sortiert

2.1.2 Humane Seren

Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich die Seroimmunität der Kinder untersucht, die Schleimhautimmunität hingegen außer Acht gelassen. Die Auswahl der Kinder erfolgte nach mehreren Kriterien:

- Alter mindestens 0,5, maximal 6 Jahre
- keine bekannte Immunsuppression oder Immunglobulingabe
- keine bekannten Immundefekte.

Die verwendeten Seren stammen aus der Serumsammlung des Instituts für Virologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf aus den Jahren 2005 bis 2007.

Die Einteilung der Seren in Gruppen erfolgt nach Alter der Kinder in Schritten von jeweils zwölf Monaten, die jüngste Gruppe umfasst lediglich das zweite Lebenshalbjahr, sodass sich insgesamt sechs Blöcke ergeben: ein halbes bis ein Jahr, ein bis zwei Jahre, zwei bis drei Jahre, drei bis vier Jahre, vier bis fünf Jahre und fünf bis sechs Jahre. Insgesamt wurden 102 Seren getestet.

2.1.3 Virusisolate

Alle beschriebenen Versuche wurden mit sechs Virusisolaten parallel durchgeführt. Es handelt sich hierbei um zwei sogenannte Laborstämme sowie um vier Wildisolate aus dem Virusisolierungslabor des Instituts für Virologie (Universitätsklinikum Düsseldorf).

In den RSV-Untergruppen A und B wurden je ein Laborstamm und zwei Wildisolate ausgewählt. Beim RSV A handelt es sich um den Laborstamm Long strain von 1956 und die Wildisolate 2589 und 10615, beide aus dem Jahr 2005. Der RSV B-Laborstamm ist B 18537, die Wildisolate stammen aus den Jahren 2002 (211) und 2007 (1365).

2.2 Arbeitsmethoden

2.2.1 Isolierung von RSV in der Zellkultur

Zur Virusanzucht wurden ausschließlich HEp2-Zellen benutzt, bei denen es sich um adhärenent als Monolayer wachsende humane Larynxkarzinomzellen handelt. Als Nährmedium wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO Nr. 41966) gewählt. Dieses erhielt stets einen Antibiotikazusatz von 1% einer Penicillin-Streptomycin-Lösung (GIBCO Nr. 15140). In der Wachstumsphase waren zudem 10% fetales Kälberserum (FKS; GIBCO Nr. 10270-106) enthalten. Nach der Virusinfektion wurde dessen Anteil auf 2% reduziert.

Die Zellanzucht erfolgt bei einer Temperatur von 37°C bei 5% CO₂-Gehalt der Luft.

Bei einer Zellkonfluenz von ca. 30% wurde die Virusinfektion mit dem Überstand infizierter Zellen durchgeführt. Die Menge des Inokulums betrug hierbei 1,5ml. Nach einer Stunde Inkubation unter Schwenken bei 37°C wurde das Medium zugeetzt.

Geerntet wurde bei Vorhandensein eines deutlich ausgeprägten zytopathischen Effekts (CPE). Hierzu erfolgte das Lösen der Zellen von der Flasche mechanisch mittels Zellschaber. Die Zellen samt Überstand wurden portioniert und nach Zugabe von 10% Sucrose (SERVA Nr. 35579) bei -80°C eingefroren. Mit dieser Lösung ließ sich die nächste Viruspassage durchführen.

2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Um den Proteingehalt einer Lösung zu messen, eignet sich die Proteinbestimmung nach Bradford. Hierzu wird mit Hilfe von BSA-Standards (bovines Serumalbumin; Albumin Fraktion V, Roth Nr. 8076.3), deren Proteingehalt bekannt ist, eine Kalibrationskurve erstellt, anhand derer sich die Proteinmenge in anderen Lösungen bestimmen lässt. Das messbare Spektrum erstreckt sich für die sechs hier verwendeten Standards von einer proteinfreien Lösung bis 120 µg Protein/ml (je ein Standard mit 0, 20, 40, 60, 80, 120 µg Protein/ml).

Auf einer 96-well-Mikrotiterplatte (U96 Maxisorp Nunc-immunoplate, Nr. 449824) wurde die Proteinbestimmung im Doppelansatz für jede Konzentration bzw. Lösung durchgeführt. Dazu benötigte man 6x2 Cups für die Standards sowie 2x2 Cups für jede zu testende Lösung.

In jedes Cup wurden 200 µl der Bradford-Reagenz (BIO-RAD Protein Assay Dye Reagent Concentrate, BIO-RAD Nr. 500-0006) in einem Verhältnis von 1:5 mit aqua dest. gegeben. Es wurden in Cup A1 und B1 je 50 µl des ersten Proteinstandards pipettiert, in Cup A2 und B2 50 µl des zweiten Standards. Dies erfolgte synonym für alle sechs Proteinstandards.

Die zu testenden Lösungen wurden auf dieselbe Art aufgetragen, wobei jede Lösung je einmal in einer Verdünnung von 1:20 und 1:40 mit aqua dest. geprüft wurde. Zur Veranschaulichung dient das Beispiel in Abb. 2.1, in dem eine Probe A und eine Probe B getestet werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0µg	0µg	Probe B 1:20	Probe B 1:20								
B	20µg	20µg	Probe B 1:40	Probe B 1:40								
C	40µg	40µg										
D	60µg	60µg										
E	80µg	80µg										
F	120µg	120µg										
G	Probe A 1:20	Probe A 1:20										
H	Probe A 1:40	Probe A 1:40										

Abb. 2.1 Proteinbestimmung nach Bradford In den Reihen A bis F der beiden ersten Spalten Doppelansatz der Proteinstandards zur Erstellung der Kalibrationskurve. In Reihe G und H der ersten beiden Spalten sowie Reihe A und B der Spalten 3 und 4 Testung der Lösungen in zwei verschiedenen Verdünnungen im Doppelansatz.

Der Farbumschlag wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Anhand der Standards wurde eine Kalibrationskurve erstellt, mit Hilfe derer sich der Proteingehalt jeder im Messbereich gelegenen Lösung bestimmen ließ.

2.2.3 TCID₅₀

Der Tissue culture infectious dosis-Test (TCID₅₀) dient der Bestimmung der Virusmenge in einer Lösung.

Auf einer 96-well-Zellkulturplatte (Zellkultur-Testplatte 96F, TPP Nr. 92696) wurden HEp2-Zellen in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml DMEM (10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) in den Spalten eins bis zehn ausgesät. Diese wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und sollten am nächsten Tag eine Konfluenz von 20-30% zeigen.

Pro Platte können zwei Proben jeweils im Vierfachansatz bestimmt werden, wie in Abb. 2.2 dargestellt. In den ersten neun Spalten wurde eine Verdünnungsreihe der Lösungen nach unten stehendem Schema durchgeführt, die zehnte Spalte diente als Zellkontrolle (ZK). Als Medium wurde DMEM mit 2% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin eingesetzt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	ZK		
B	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	ZK		
C	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	ZK		
D	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	ZK		
E	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	ZK		
F	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	ZK		
G	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	ZK		
H	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	ZK		

Abb. 2.2 TCID₅₀ Reihe A-D erstes Isolat, Reihe E-H zweites Isolat. Verdünnungsreihen der beiden getesteten Virusisolate von 10^{-1} bis 10^{-9} . In Spalte 10 Zellkontrolle mit nicht infizierten Zellen (ZK).

Die Platte wurde für drei bis sieben Tage im Brutschrank inkubiert, bis ein zytopathischer Effekt (CPE) deutlich erkennbar war. Als TCID₅₀ wird die stärkste Verdünnung eines Isolates bezeichnet, bei der noch mindestens zwei der vier Cups einen CPE aufweisen.

2.2.4 ELISA mit humanen Seren

Zum Nachweis des Vorhandenseins von Serumantikörpern gegen RSV diente ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Hierzu wurden Mikrotiterplatten mithilfe eines Beschichtungspuffers mit dem Virusantigen beschichtet. Die Zellen, welche zur Virusanzucht dienten, wurden - nach einem Waschschrift mit PBS (Phosphate-buffered saline solution; GIBCO 14190) - mittels Zellschaber mechanisch von der Anzuchtflasche gelöst und in wenigen Millilitern PBS aufgenommen. Durch dreimaliges schnelles Einfrieren und Auftauen wurden die Zellen zerstört und die Viruspartikel freigesetzt. Die Suspension wurde zehn Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und die Zellen verworfen. Der Überstand diente als Proteinlösung zum Beschichten der ELISA-Platten.

In dieser Arbeit wurden 96-well-Immunoplates der Firma Nunc (s. Kap. 2.2.2) verwendet. Beschichtet wurden diese mit der oben beschriebenen Proteinlösung in einer Konzentration von 3 µg Protein/ml in Beschichtungspuffer (pH 9,6). Die Lösung verblieb bei einer Temperatur von 4°C über Nacht auf den Platten; danach war das Antigen an den Kunststoff adsorbiert.

Um nicht besetzte Kunststoffstellen zu blockieren, wurde eine BSA- und FKS-haltige Lösung aufgetragen. Die Einwirkzeit betrug 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden die Platten mit einer Pufferlösung (Dade Behring, 20-fach-Konzentrat) gewaschen, geleert und sofort weiterverarbeitet oder für wenige Tage bei 4°C gelagert.

Als erster Antikörper dienten die humanen Seren, welche im Verhältnis 1:50 in Verdünnungspuffer vorverdünnt wurden. Außerdem wurden auf einer Platte jeder Charge und jedes Virusisolates als Positivkontrolle ein vorgetestetes, gut reagierendes adultes Humanserum, ebenfalls in einer Vorverdünnung von 1:50, sowie eine Negativkontrolle (Verdünnungspuffer) geführt. Seren und Kontrollen wurden in einer Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:12.800 in Verdünnungspuffer aufgetragen (Abb. 2.3). In einer feuchten Kammer wurden die Platten bei 37°C 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der erste Antikörper abgewaschen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	pos. Ko.	pos. Ko.	neg. Ko.	neg. Ko.	Serum 1	Serum 1	Serum 2	Serum 2	Serum 3	Serum 3	Serum 4	Serum 4
C												
D	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
E	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis
F	1:12800	1:12800	1:12800	1:12800	1:12800	1:12800	1:12800	1:12800	1:12800	1:12800	1:12800	1:12800
G												
H												

Abb. 2.3 ELISA Serumverdünnung In Spalte 1 und 2 Positivkontrolle mit adultem Serum, in Spalte 3 und 4 Negativkontrolle mit Verdünnungspuffer, jeweils im Doppelansatz. In den übrigen Spalten Testseren, ebenfalls im Doppelansatz. Verdünnungsstufen 1:100 bis 1:12800.

Beim Zweitantikörper handelte es sich um ein Anti-human-IgG der Ziege (SIGMA A0293). Die Konzentration betrug 1:40.000 in Verdünnungspuffer. Inkubationsweise und -zeit entsprachen denen des Erstantikörpers, es folgte ein Waschschrift.

Anschließend wurde ein farbiges Substrat aufgetragen. Es wurde o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD; SIGMA P8412) verwendet, wovon 30mg zu einer Lösung einer Kapsel Phosphat-Citrat-Puffer mit Natrium-Perborat (SIGMA P4922) in 100 ml aqua dest. gegeben wurden. Die fertige Lösung wurde auf die Platten aufgetragen, die Einwirkzeit betrug 20min bei Dunkelheit. Bei Bindung an den Zweitantikörper erfolgte ein Farbumschlag. Gestoppt wurde die Reaktion durch das Auftragen einer einmolaren Schwefelsäurelösung (1M H₂SO₄(aq)).

Von der für das Substrat spezifischen Extinktion bei einer Wellenlänge von 492nm konnte auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen RSV in den getesteten Seren geschlossen werden.

2.2.5 Neutralisationstest (N-Test)

Mithilfe des Neutralisationstests lassen sich neutralisierende Antikörper spezifisch nachweisen. Er wird mit lebenden Zellen durchgeführt, die mit einem Virus-Serum-Gemisch inokuliert werden.

HEp2-Zellen wurden auf eine Konzentration von etwa 5x10⁴ Zellen/ml in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin verdünnt und in einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät. Über Nacht erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen sollten am nächsten Tag eine Dichte von 20-30% haben.

In einer Mutterplatte wurden die Verdünnungsreihen der zu prüfenden Seren und die Virusrücktitration zur Kontrolle vorbereitet. Pro Platte ließen sich vier Seren, jeweils im Doppelansatz, nach folgendem Verdünnungsschema (Abb. 2.4) testen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:30	1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920	1:3840	1:7680	1:15360		
B	1:30	1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920	1:3840	1:7680	1:15360		
C	1:30	1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920	1:3840	1:7680	1:15360		
D	1:30	1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920	1:3840	1:7680	1:15360		
E	1:30	1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920	1:3840	1:7680	1:15360		
F	1:30	1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920	1:3840	1:7680	1:15360		
G	1:30	1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920	1:3840	1:7680	1:15360	ZK	ZK
H	1:30	1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920	1:3840	1:7680	1:15360	ZK	ZK

Abb. 2.4 N-Test Serumverdünnung Verdünnungsreihen von 1:30 bis 1:15360 vierer Testseren, jeweils im Doppelansatz Reihe A/B, C/D, E/F, G/H. ZK=Zellkontrolle ohne Serum.

Dazu wurden erst in jedes Loch der Spalte 1 290µl, der Spalten 2 bis 10 150µl und der Spalten 11 und 12 180µl Medium pipettiert. Hierbei wurde DMEM mit 2% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Es wurden in die Cups der ersten Spalte je 10µl des gewünschten Serums hinzugefügt. Im Anschluss wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, indem jeweils 150µl der entstandenen Serumlösung mittels 8-Kanal-Pipette in die nächste Spalte überführt wurden.

Von dem ausgewählten Virusisolat wurde eine Lösung in einer Konzentration des zehnfachen des TCID₅₀-Ergebnisses hergestellt. Für die Virusrücktitration wurden in die beiden Löcher der Reihe A in den Spalten elf und zwölf je 20 µl der Viruslösung gegeben und eine Verdünnungsserie bis Reihe F durch Übertrag von je 20 µl durchgeführt. Die Reihen G und H dieser Spalten dienten als Negativkontrolle. In alle Cups der Spalten eins bis zehn wurden je 100µl der Viruslösung gegeben. Abb. 2.5 zeigt dies schematisch.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10 ⁻¹	10 ⁻¹
B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10 ⁻²	10 ⁻²
C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10 ⁻³	10 ⁻³
D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
E	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
F	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
G	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	ZK	ZK
H	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	ZK	ZK

Abb. 2.5 N-Test Viruszugabe In den Spalten 1 bis 10 Zugabe von 100µl Viruslösung je Cup. In den ersten sechs Reihen der Spalten 11 und 12 Virusrücktitration in der Verdünnung 10⁻¹ bis 10⁻⁶. ZK=Zellkontrolle ohne Zugabe von Serum oder Viruslösung.

Diese Mutterplatte inkubierte für 120 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden je 200µl, bei der Virustitration und der Negativkontrolle 180µl, auf die Zellkulturplatte vom Vortag übertragen. Die Platte wurde bei 37°C und 5% CO₂ für drei bis fünf Tage inkubiert. Anschließend wurde das Vorhandensein eines CPE mikroskopisch überprüft und die Messung des RSV-F-Proteins mittels eines ELISA nach der Beschreibung in Kapitel 2.2.4 durchgeführt.

2.2.6 RSV-F-ELISA

Dieser ELISA dient der Messung der Affinität der verwendeten Seren zum RSV-F-Protein. Hierzu wurden fünf vorbereitete Platten einer spanischen Arbeitsgruppe, beschichtet mit rekombinantem RSV-F-Protein, verwendet (61).

Als erster Antikörper dienten die humanen Seren, die auch im RSV-ELISA untersucht wurden. Jedes Serum wurde in vier Verdünnungsstufen von 1:200 bis 1:5400 getestet, wie in Abb. 2.6 dargestellt. Die Positivkontrolle erfolgte mit dem vorgetesteten adulten Serum, das auch beim RSV-ELISA eingesetzt wurde, die Negativkontrolle mit Verdünnungspuffer.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	11	12
A	pos. Ko.	pos. Ko.	neg. Ko.	neg. Ko.	Serum 1	Serum 1	Serum 2	Serum 2	Serum 3	Serum 3	Serum 4	Serum 4
B	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
C	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis
D	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400
E	Serum 5	Serum 5	Serum 6	Serum 6	Serum 7	Serum 7	Serum 8	Serum 8	Serum 9	Serum 9	Serum 10	Serum 10
F	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
G	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis
H	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400	1:5400

Abb. 2.6 RSV-F-ELISA Zehn Seren werden je im Doppelansatz über vier Verdünnungsstufen getestet. In den Spalten 1-4 der Reihen A-D Positiv- und Negativkontrollen.

Als zweiter Antikörper kam ein Ziege-anti-IgG (Mensch) zum Einsatz (Goat anti human IgG Horseradish Peroxidase-linked, SIGMA A0293). Beim verwendeten Substrat handelte es sich um Tetramethylbenzidin (TMB; BD 2234663), bei der Stopplösung um 0,5M H₂SO₄.

Die Durchführung entspricht der des ELISA mit humanen Seren, die in Kap. 2.2.4 beschrieben wird. Gemessen wurde anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm.

3 Ergebnisse

3.1 RSV-ELISA

Der Anteil der im ELISA positiven Proben in den verschiedenen Altersgruppen steigt tendenziell mit fortschreitendem Lebensalter (s. Tabelle 3.1 und Abb. 3.1). Als positiv wurden in dieser Arbeit Seren gewertet, die bei der fotometrischen Messung eine Extinktion von $\geq 0,200$ zeigten. Während im ersten Lebensjahr je nach Virusisolat nur 11-22% der Kinder seropositiv sind, beträgt dieser Anteil im sechsten Lebensjahr bereits 91-100%. In der Gruppe der Drei- bis Vierjährigen liegt der Positivanteil - mit Ausnahme des Isolates RSV A 10615 - niedriger als bei den Zwei- bis Dreijährigen.

	RSV Long			RSV 2589			RSV 10615		
	n	positiv	%	n	positiv	%	n	positiv	%
0,5 - 1 Jahr	9	1	11	9	1	11	9	1	11
1 - 2 Jahre	14	7	50	14	6	43	14	7	50
2 - 3 Jahre	15	12	80	15	12	80	15	12	80
3 - 4 Jahre	20	15	75	20	12	60	20	17	85
4 - 5 Jahre	22	21	95	22	20	91	22	21	95
5 - 6 Jahre	22	22	100	22	20	91	22	21	95
	RSV B			RSV 211			RSV 1365		
	n	positiv	%	n	positiv	%	n	positiv	%
0,5 - 1 Jahr	9	2	22	9	1	11	9	1	11
1 - 2 Jahre	14	6	43	14	7	50	14	7	50
2 - 3 Jahre	15	12	80	15	10	67	15	11	73
3 - 4 Jahre	20	11	55	20	12	60	20	14	70
4 - 5 Jahre	22	20	91	22	20	91	22	19	86
5 - 6 Jahre	22	20	91	22	20	91	22	20	91

Tabelle 3.1 Anteil positiver Seren im ELISA Oben die RSV A-Stämme RSV Long, RSV 2589 und RSV 10615, unten die RSV B-Stämme RSV B, RSV 211 und RSV 1365. Dargestellt sind die Gesamtzahlen der untersuchten Seren (n), die absoluten Zahlen der positiv getesteten Seren sowie der prozentuale Anteil der positiven Seren an der Gesamtzahl.

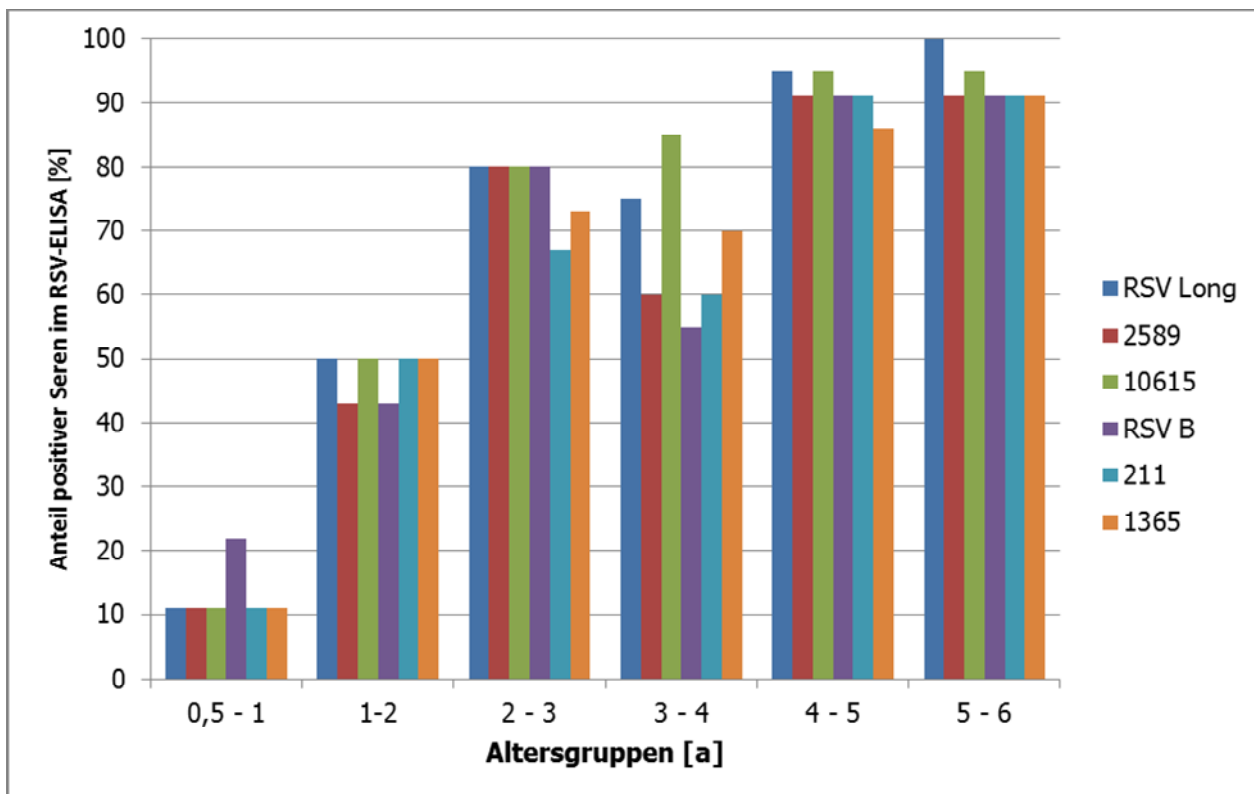


Abb. 3.1 Anteil positiver Seren im RSV-ELISA Prozentsatz der RSV-Antikörper-positiven Seren gegen die einzelnen untersuchten Virusisolate, sortiert nach Altersgruppen.

In den jüngeren Altersgruppen reagieren die Seren teilweise nur mit einzelnen Virusisolaten. Einige Beispiele zeigt Tabelle 3.2.

Alter (d)	RSV A			RSV B		
	RSV Long	2589	10615	RSV B	211	1365
213	0	0	0	1	0	0
404	0	0	0	1	0	0
435	0	0	0	0	1	0
1354	0	0	1	0	0	0
2030	2	0	0	0	0	0

Tabelle 3.2 Beispiele für Seren, die im ELISA nur mit einem einzelnen Virusisolat reagieren. Dargestellt sind die logarithmierten Titer.

Einige Seren zeigen keine Reaktion mit dem Laborstamm eines RSV-Typs, während ein Titer gegen ein oder beide getesteten Wildisolate desselben Typs vorhanden ist (s. Tabelle 3.3).

Alter (d)	RSV A			RSV B		
	RSV Long	2589	10615	RSV B	211	1365
1160	5	3	3	0	2	3
1278	0	0	2	0	0	0
1288	0	0	2	2	1	1

Tabelle 3.3 Beispiele für Seren, die im ELISA mit einem oder beiden getesteten Wildisolaten eines RSV-Typs reagieren, nicht jedoch mit dem Laborstamm des gleichen Typs. Dargestellt sind die logarithmierten Titer. Die entsprechenden Werte sind hervorgehoben.

Es zeigt sich, dass manche Kinder über Antikörper gegen RSV Typ A oder B verfügen, auf den jeweils anderen Typen jedoch nicht reagieren. Beispiele finden sich in Tabelle 3.4.

Alter (d)	RSV A			RSV B		
	RSV Long	2589	10615	RSV B	211	1365
1278	0	0	2	0	0	0
1337	2	1	1	0	0	0
1712	1	0	1	0	0	0
2033	1	0	1	0	0	0

Tabelle 3.4 Beispiele für Seren, die im ELISA mit einem der beiden RSV-Typen, in diesen Fällen RSV A, reagieren und mit den RSV B-Isolaten nicht. Dargestellt sind die logarithmierten Titer. Die entsprechenden Werte sind hervorgehoben.

Im ersten Lebensjahr sind die meisten getesteten Kinder noch seronegativ für RSV. Ein Kind weist einen positiven Titer für den RSV B-Laborstamm, jedoch keine Antikörper gegen die übrigen Isolate auf. Ein weiteres Kind zeigt Seropositivität gegenüber allen verwendeten Isolaten, wobei der Titer gegen den RSV A-Laborstamm höher ist als gegen die anderen Stämme.

Ab dem zweiten Lebensjahr lässt sich die Tendenz erkennen, dass in Bezug auf ein Virusisolat positive Seren auch Antikörper gegen die anderen Isolate aufweisen. Dies trifft jedoch nicht ausnahmslos zu. In drei Fällen der Gruppe der Zwei- bis Dreijährigen liegen nur Antikörper gegen ein bis drei der sechs Isolate vor, in einem Fall ist der Titer gegen den RSV B-Laborstamm negativ, gegen die übrigen getesteten Stämme positiv. Auch in höherem Lebensalter ist dies vereinzelt zu sehen.

Beim Vergleich der Gesamtimmunität gegen die verschiedenen Virusstämme zeigen sich im ELISA geringe Unterschiede. Der Gesamtscore aus allen logarithmierten Titern über alle Altersstufen fällt mit 254 Punkten am geringsten für den RSV B-Laborstamm, am höchsten für RSV A 10625 (338 Punkte) aus (s. Abb. 3.3).

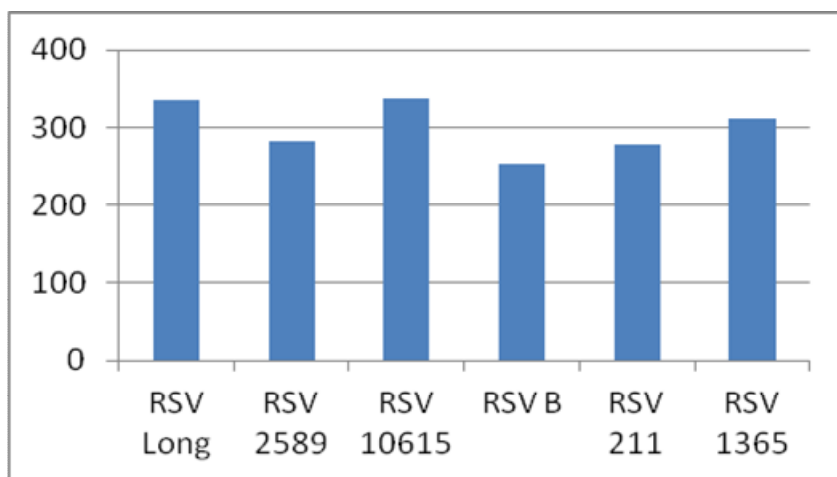


Abb. 3.3 Gesamtimmunität ELISA Score über alle Alterklassen. Es wurden die logarithmierten Titer aller Seren gegen das jeweilige Virusisolat summiert.

Auch bei der Auswertung mithilfe von Boxplots zeigt sich die Reaktivität gegenüber den verschiedenen Stämmen relativ gleichmäßig (s. Abb. 3.4).

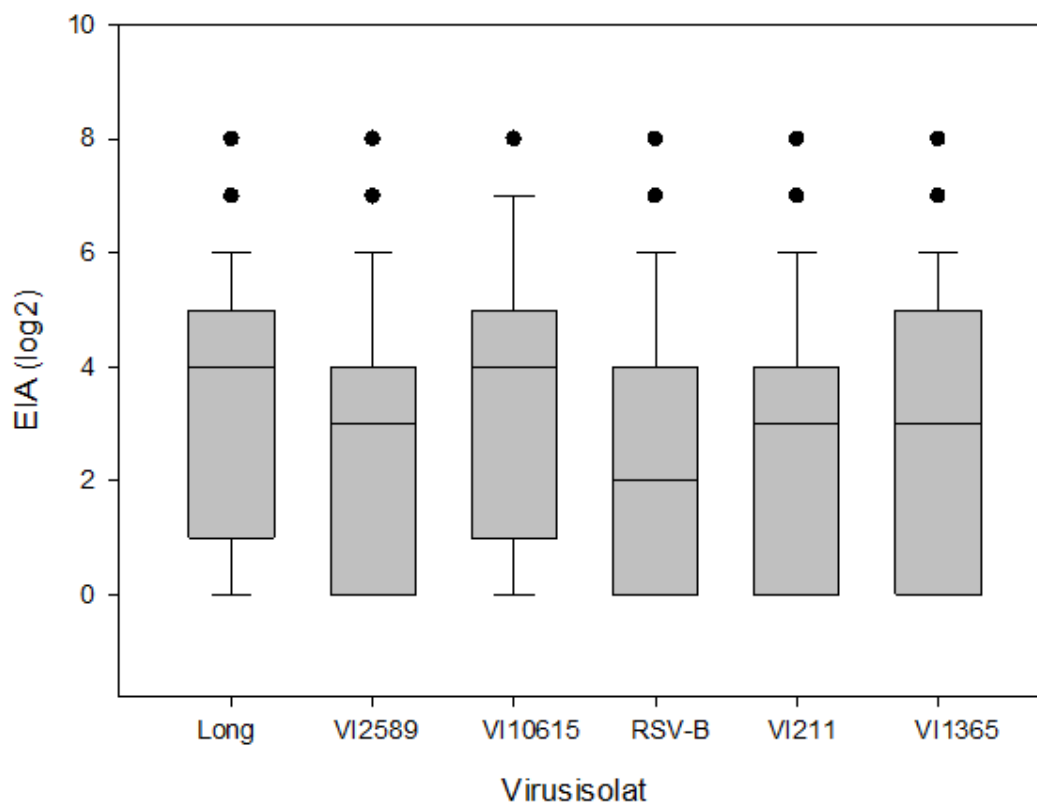


Abb. 3.4 Reaktivität ELISA Ergebnis über alle Altersgruppen. Die graue Box umfasst die mittleren beiden Quartile der Proben; der Median ist durch einen Querstrich markiert. Die Antennen umfassen den Bereich von 10 bis 90%. Werte außerhalb dieses Bereichs sind als Einzelpunkte dargestellt.

In der Regressionsanalyse der Titerhöhe gegen RSV A und B zeigt sich ein mäßiger durchschnittlicher Titeranstieg mit zunehmendem Alter. Dieser ist in etwa gleich stark gegen RSV A und B (s. Abb. 3.5).

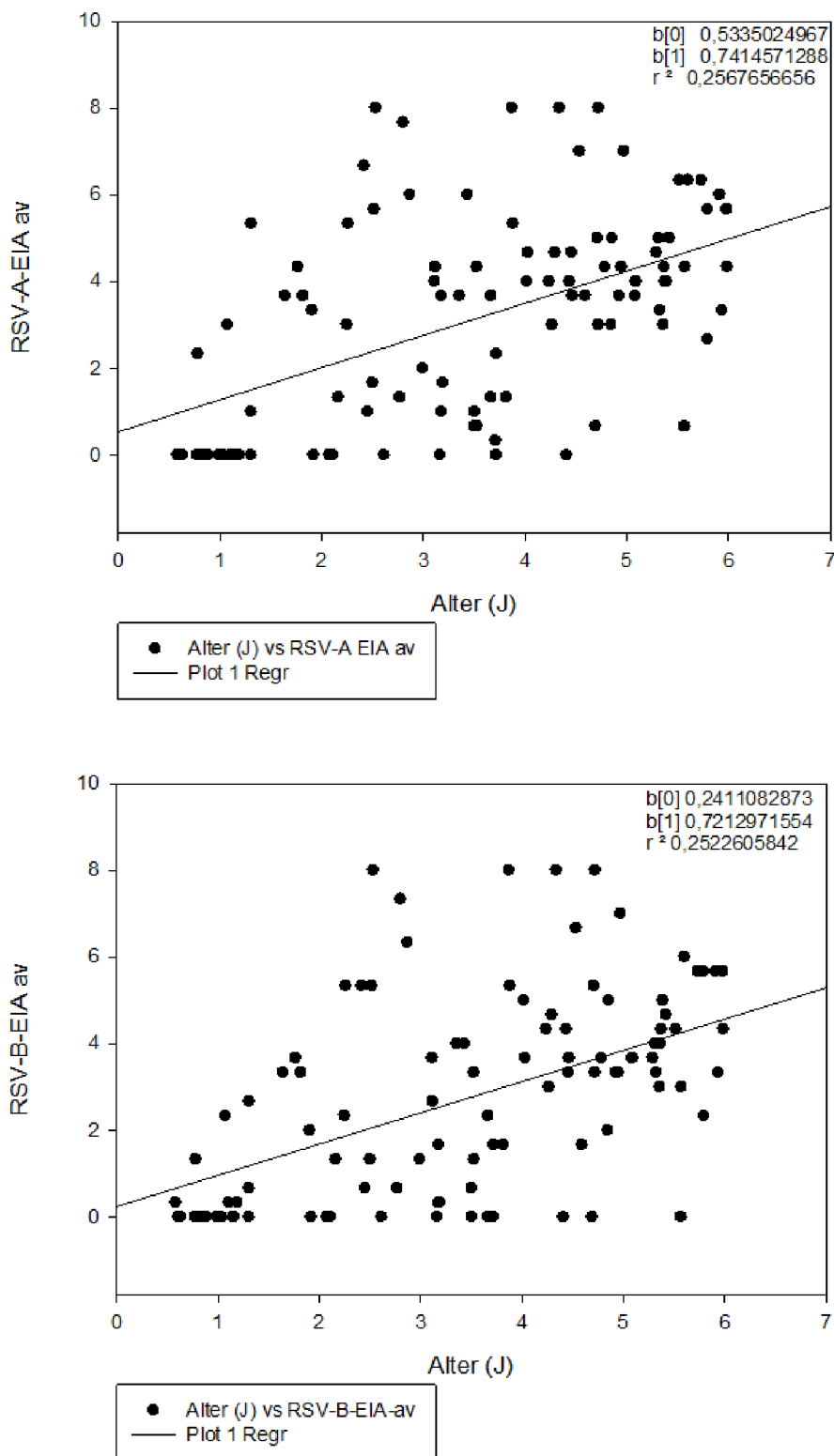


Abb. 3.5 Regressionsanalyse ELISA Oben: RSV A, unten: RSV B. Jeder Punkt stellt den Durchschnittstiter einer Probe gegen alle verwendeten RSV A- (n=3) bzw. B-Stämme (n=3) dar.

3.2 Neutralisations-Test (N-Test)

Beim N-Test ist die Seropositivität der Proben deutlich differenter zwischen den einzelnen Virusisolaten als beim ELISA. Auch hier wurde eine Extinktion von $\geq 0,200$ bei der fotometrischen Messung als positiv gewertet. Während innerhalb der einzelnen Altersgruppen die Positivität für die Gesamtantikörper gegen RSV sehr ähnlich ist, variiert sie in Bezug auf neutralisierende Antikörper innerhalb einer Altersgruppe stärker zwischen den verschiedenen Virusisolaten (s. Tabelle 3.5 und Abb. 3.6).

	RSV Long			RSV 2589			RSV 10615		
	n	positiv	%	n	positiv	%	n	positiv	%
0,5 - 1 Jahr	9	3	33	9	3	33	8	3	38
1 - 2 Jahre	14	7	50	13	6	46	14	8	57
2 - 3 Jahre	15	11	73	15	9	60	14	10	71
3 - 4 Jahre	20	20	100	19	17	89	20	17	85
4 - 5 Jahre	21	21	100	21	20	95	19	19	100
5 - 6 Jahre	22	22	100	22	13	59	22	21	95
	RSV B			RSV 211			RSV 1365		
	n	positiv	%	n	positiv	%	n	positiv	%
0,5 - 1 Jahr	9	4	44	9	2	22	9	4	44
1 - 2 Jahre	14	5	36	13	7	54	14	7	50
2 - 3 Jahre	14	10	71	15	10	67	15	10	67
3 - 4 Jahre	20	17	85	20	19	95	20	17	85
4 - 5 Jahre	21	19	90	20	20	100	18	11	61
5 - 6 Jahre	21	20	95	22	19	86	21	16	76

Tabelle 3.5 Anteil positiver Seren im N-Test Oben RSV A-Stämme, unten RSV B-Stämme. Dargestellt sind die Gesamtzahlen der untersuchten Seren (n), die absoluten Zahlen der positiv getesteten Seren sowie der prozentuale Anteil der positiven Seren an der Gesamtzahl.

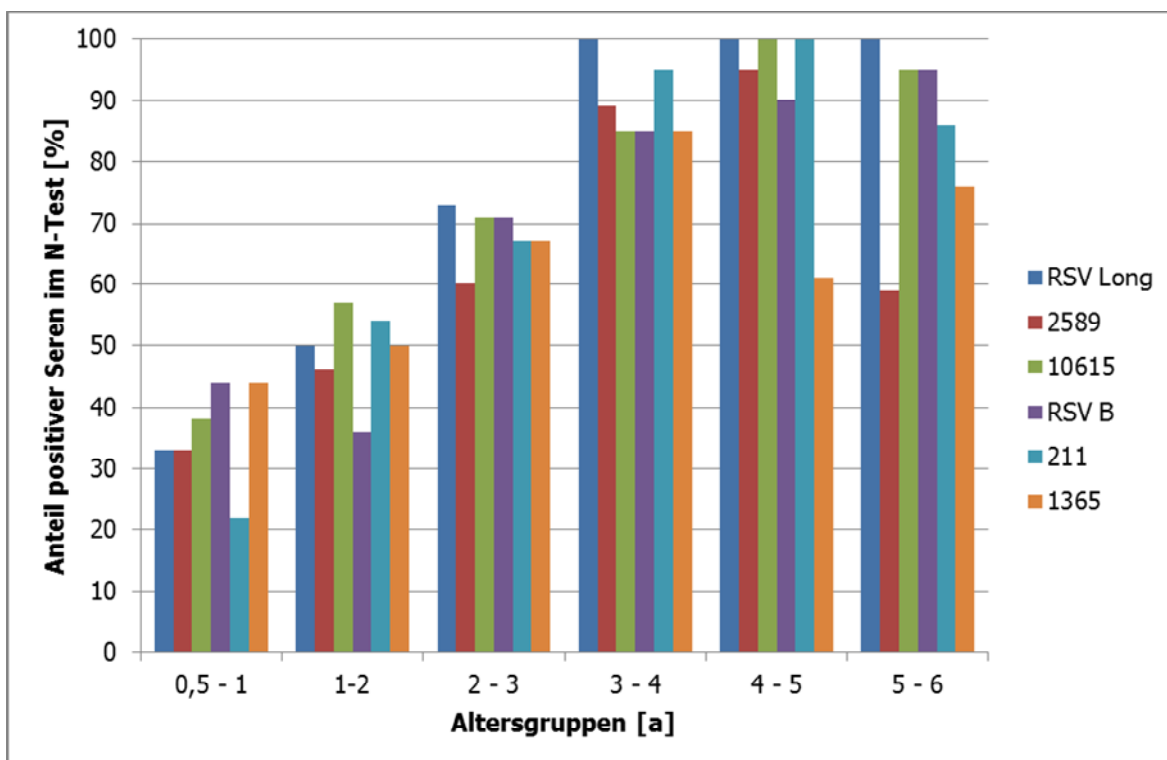


Abb. 3.6 Anteil positiver Seren im N-Test Prozentsatz der RSV-neutralisierenden Seren gegen die einzelnen untersuchten Virusisolate, sortiert nach Altersgruppen.

Wie im RSV-ELISA lassen sich auch im N-Test bei einigen Seren Antikörper gegen einzelne Virusisolate messen, während sie mit den übrigen Isolaten nicht reagieren. Hierbei handelt es sich vor allem um Kinder der jüngeren Altersgruppen. Beispiele finden sich in Tabelle 3.6.

Alter (d)	RSV A			RSV B		
	RSV Long	2589	10615	RSV B	211	1365
361	0	0	0	0	0	1
378	0	0	0	0	1	0
392	0		0	0	0	6
435	0	0	1	0	0	0

Tabelle 3.6 Beispiele für Seren, die im N-Test nur mit einem einzelnen Virusisolat reagieren. Dargestellt sind die logarithmierten Titer. Die leeren Datenfelder kennzeichnen wegen Serum Mangels nicht durchgeführte Testungen.

Zudem reagieren mehrere Testseren auf ein oder beide Wildisolate eines RSV-Typs, jedoch nicht auf den verwendeten Laborstamm. Tabelle 3.7 zeigt hierzu Beispiele.

Alter (d)	RSV A			RSV B		
	RSV Long	2589	10615	RSV B	211	1365
309	0	4		1	0	0
701	0	0	0	0	1	1
770	0	0	0	0	2	1
821	1	0	0	0	3	2
925	0	1	4	8	0	6
1022	0	1	3		0	3
1278	2		1	0	2	2
1773	6	3	7	0	4	1

Tabelle 3.7 Beispiele für Seren, die im N-Test mit einem oder beiden getesteten Wildisolaten eines RSV-Typs reagieren, nicht jedoch mit dem Laborstamm des gleichen Typs. Dargestellt sind die logarithmierten Titer. Die entsprechenden Werte sind hervorgehoben. Die leeren Datenfelder kennzeichnen wegen Serummangels nicht durchgeführte Testungen.

Auch zeigt sich bei den jüngeren Kindern zum Teil eine isolierte Reaktion gegen einen der beiden RSV-Typen A oder B (s. Tabelle 3.8).

Alter (d)	RSV A			RSV B		
	RSV Long	2589	10615	RSV B	211	1365
422	6	3	3	0		0
477	5	1	2	0	0	0
701	0	0	0	0	1	1
770	0	0	0	0	2	1

Tabelle 3.8 Beispiele für Seren, die im N-Test mit einem der beiden RSV-Typen reagieren, mit dem anderen nicht. Dargestellt sind die logarithmierten Titer. Die entsprechenden Werte sind hervorgehoben. Die leeren Datenfelder kennzeichnen wegen Serummangels nicht durchgeführte Testungen.

Im Gesamtscore der logarithmierten Titer erzielt der RSV Long strain mit 366 Punkten einen deutlich höheren Wert als die übrigen getesteten Stämme, die zwischen 223 und 298 Punkten liegen (s. Abb. 3.7).

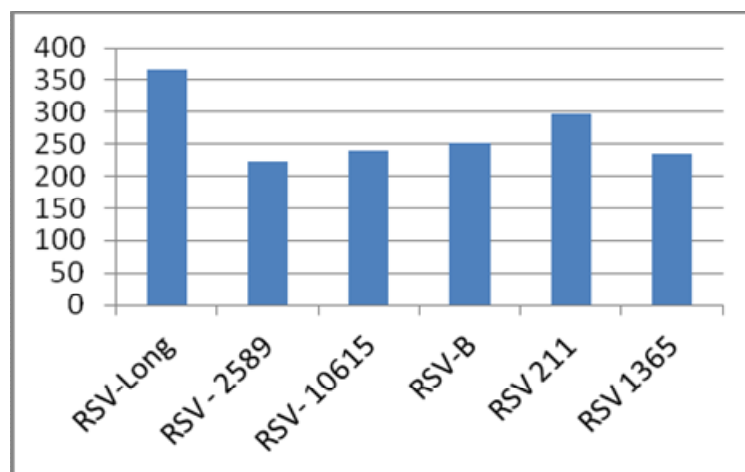


Abb. 3.7 Gesamtimmunität N-Test Score über alle Alterklassen. Es wurden die logarithmierten Titer aller Seren gegen das jeweilige Virusisolat summiert.

In der Boxplot-Auswertung zeigt sich jedoch eine relativ gleichmäßige Verteilung der Reaktivität gegen die verschiedenen Stämme (s. Abb. 3.8)

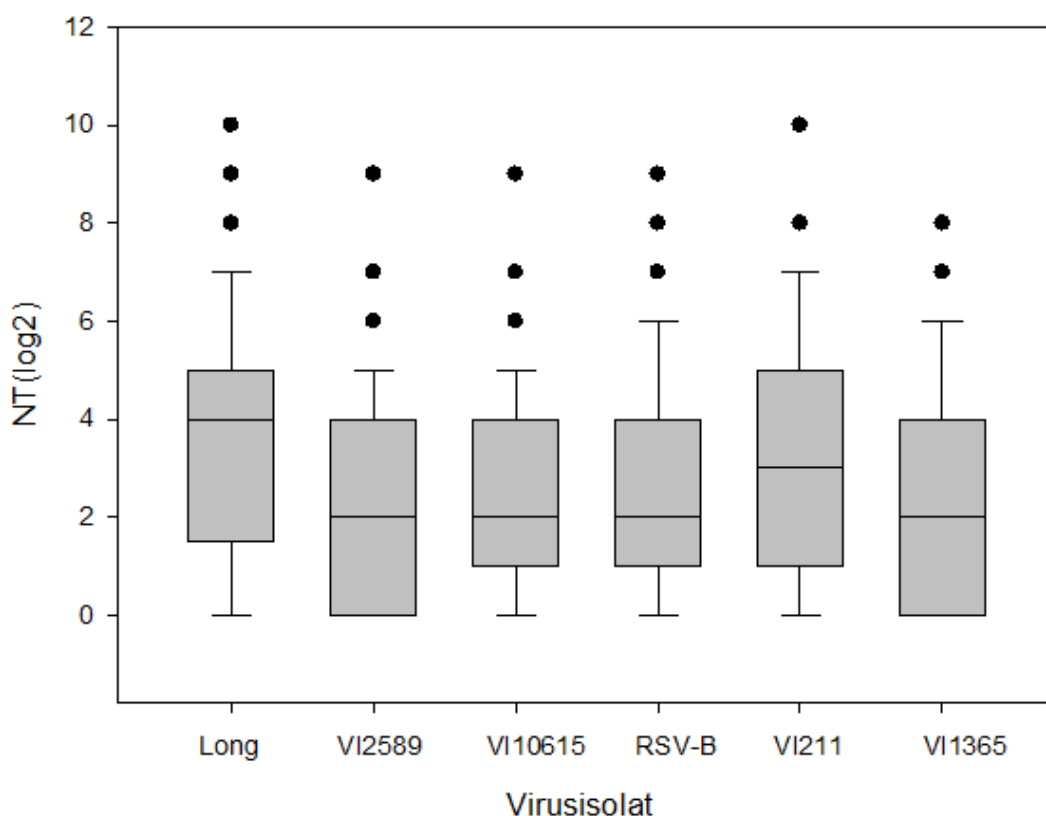


Abb. 3.8 Reaktivität N-Test Ergebnis über alle Altersgruppen. Die graue Box umfasst die mittleren beiden Quartile der Proben; der Median ist durch einen Querstrich markiert. Die Antennen umfassen den Bereich von 10 bis 90%. Werte außerhalb dieses Bereichs sind als Einzelpunkte dargestellt.

Die Regressionsanalyse der N-Test-Titer gegen die RSV-Untergruppen A und B zeigt einen langsamen Anstieg der Durchschnittstiter innerhalb des untersuchten Zeitraumes. RSV A und B unterscheiden sich hierin nicht signifikant (s. Abb. 3.9).

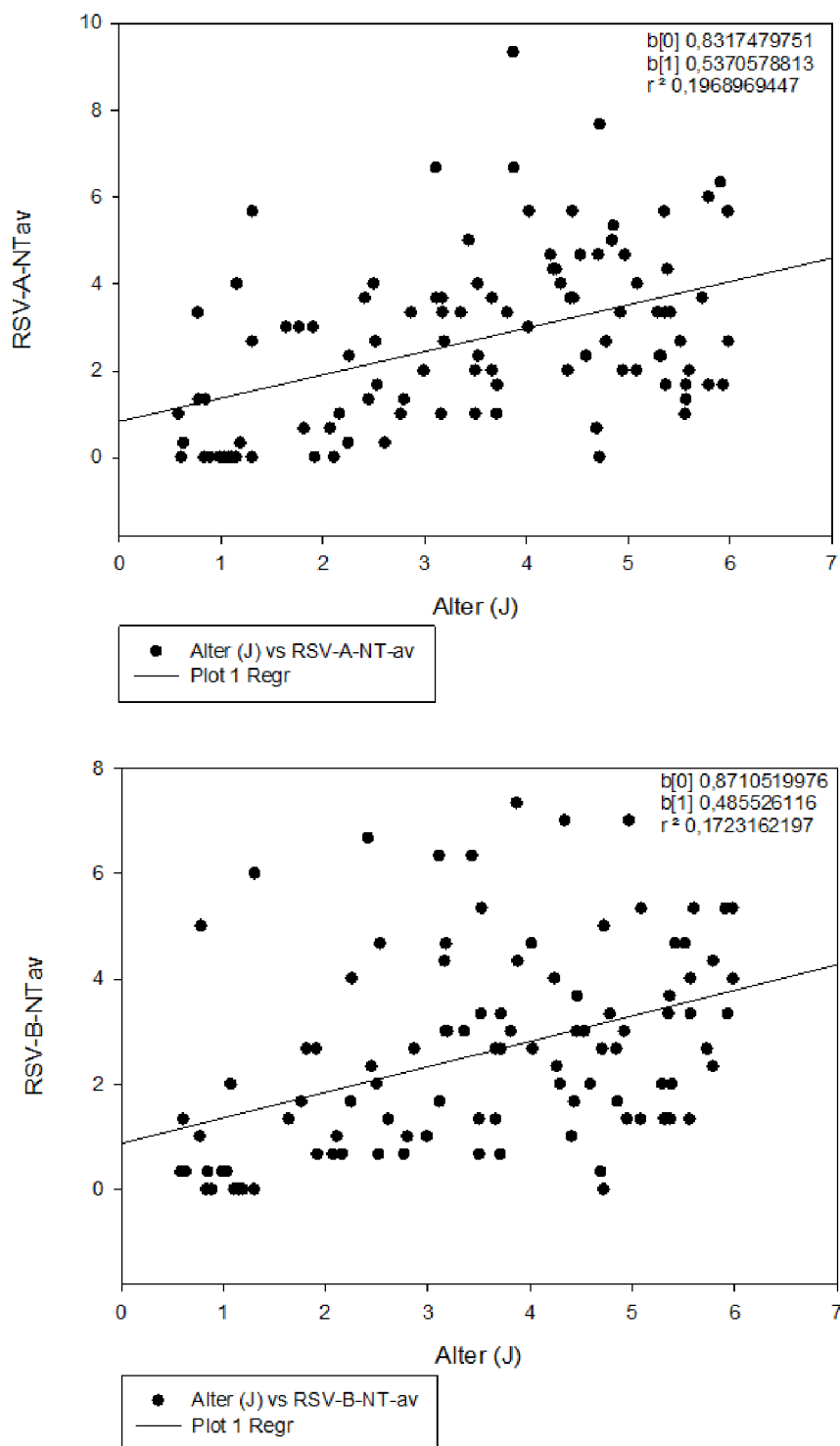


Abb. 3.9 Regressionsanalyse N-Test Oben: RSV A, unten: RSV B. Jeder Punkt stellt den Durchschnittstiter einer Probe gegen alle verwendeten RSV A- (n=3) bzw. B-Stämme (n=3) dar.

3.3 RSV-F-ELISA

Im RSV-F-ELISA steigt der Anteil der seropositiven Proben ebenfalls mit dem Alter und liegt ab dem vierten Lebensjahr bei 95-100% (s. Tabelle 3.5 und Abb. 3.10). Wie bei den anderen Versuchen wurde ein Serum als positiv gewertet, wenn die Extinktion bei der Fotometrie $\geq 0,200$ betrug.

	n	positiv	%
0,5 - 1 Jahr	7	1	14
1 - 2 Jahre	13	9	69
2 - 3 Jahre	14	12	86
3 - 4 Jahre	18	18	100
4 - 5 Jahre	22	21	95
5 - 6 Jahre	22	21	95

Tabelle 3.5 Anteil positiver Seren im RSV-F-ELISA Dargestellt sind die Gesamtzahlen der untersuchten Seren (n), die absoluten Zahlen der positiv getesteten Seren sowie der prozentuale Anteil der positiven Seren an der Gesamtzahl.

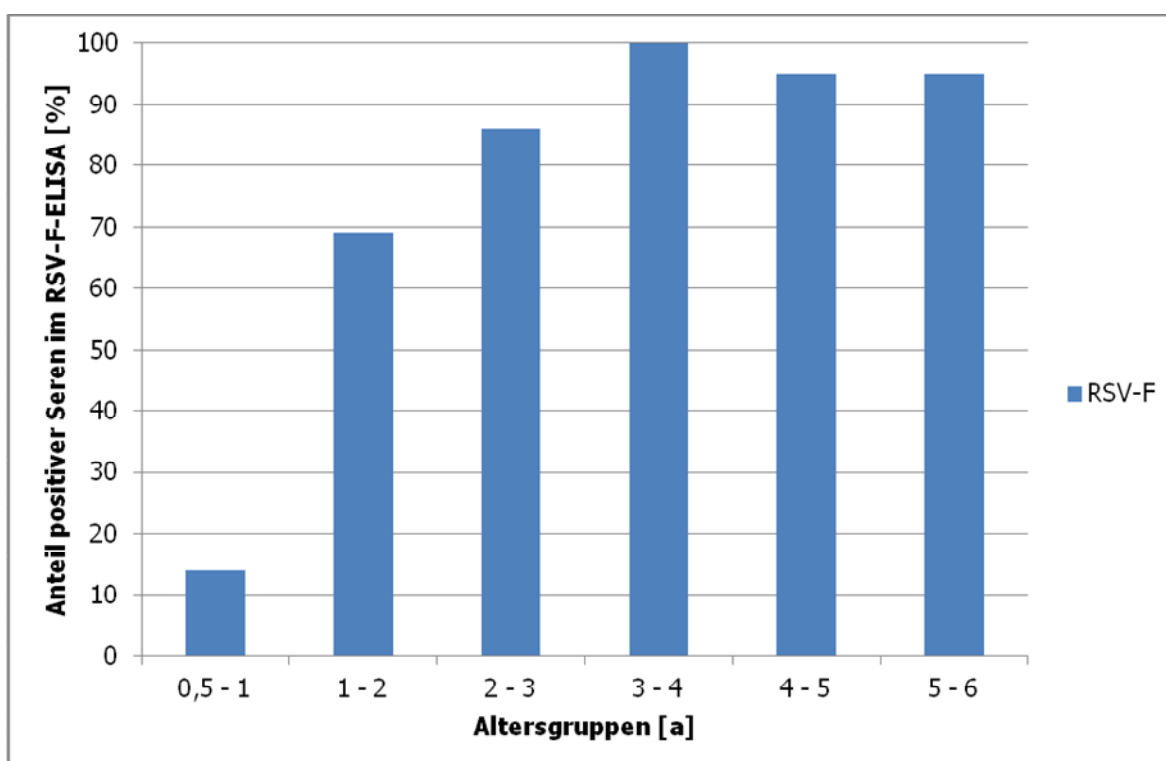


Abb. 3.10 Anteil positiver Seren im RSV-F-ELISA Prozentsatz der für Antikörper gegen das RSV-F-Protein positiven Seren, sortiert nach Altersgruppen.

4 Diskussion

4.1 Anstieg der RSV-Seroprävalenz im Untersuchungskollektiv

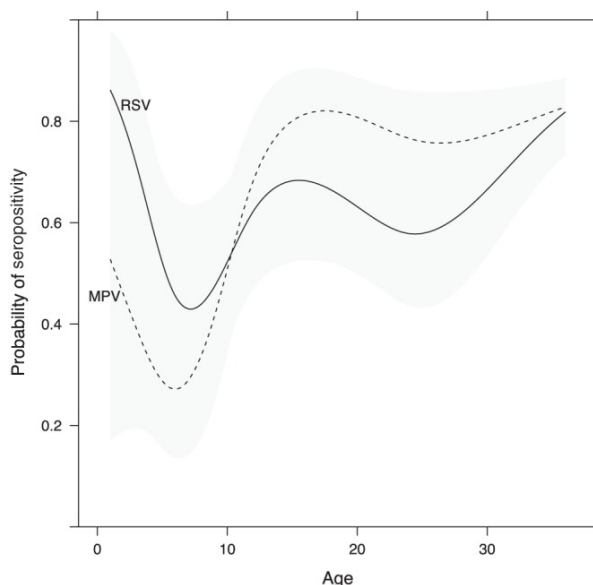
Wie zu erwarten war, steigen die Antikörpertiter gegen RSV in der ELISA-Testung sowie im N-Test im Verlauf der ersten Lebensjahre stark an, was auf die hohe Durchseuchung der Allgemeinbevölkerung in Deutschland zurückzuführen ist. Bis zum Ende des zweiten Lebensjahres verfügt etwa die Hälfte der mittels ELISA getesteten Kinder über RSV-Antikörper. Dieser Prozentsatz ist auffallend gering vor dem Hintergrund der immer wieder zitierten Annahme, dass bis zum zweiten Geburtstag fast jeder Mensch Kontakt zu RSV gehabt haben soll. Die Ergebnisse des N-Tests bestätigen diese Abweichung von der allgemeinen Annahme. Auch hier findet sich eine Serokonversionsrate für RSV bis zum zweiten Geburtstag von nur knapp über 50% (vgl. Kap. 4.2).

Das für epidemiologische Fragestellungen in Deutschland zuständige Robert Koch Institut (RKI) schreibt dazu: „Innerhalb des 1. Lebensjahres haben 50–70 % und bis zum Ende des 2. Lebensjahres nahezu alle Kinder mindestens eine Infektion mit RSV durchgemacht.“ (Epidemiologisches Bulletin 19/2011, RKI-Ratgeber für Ärzte, Respiratorische Synzytial-Viren (RSV), S.159, Abschnitt „Vorkommen“ (62)). Die US-amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention geben im Internet ähnlich Zahlen an (Centers for Disease Control and Prevention, Respiratory Syncytial Virus Infection, Abschnitt „Trends and Surveillance“, Zugriffsdatum 19.11.2015, <http://www.cdc.gov/rsv/research/us-surveillance.html>).

Ein Kritikpunkt an der vorliegenden Studie ist in der geringen untersuchten Probenanzahl zu sehen. Andererseits zeigt die Rate der Seropositiven einen kontinuierlichen Anstieg über die einzelnen Lebensabschnitte, der mit Beginn des Schulalters entsprechend die 90-100%-Rate erreicht (s. Abb. 3.1 und 3.6). Dieser Anstieg wirkt plausibel und unterstreicht die Validität der vorliegenden Daten.

Gestützt werden die Ergebnisse der Studie durch eine Untersuchung aus den USA aus dem Jahr 2012, in der 282 Seren mittels RSV-F-ELISA untersucht wurden.

Diese zeigt ähnlich niedrige Zahlen, die eine frühe vollständige Durchseuchung mit entsprechend hoher Seropositivität nicht bestätigen können (63). Untersucht wurden Kinder von der Geburt bis zum Alter von fünf Jahren. Nachdem bei Geburt über 80% der Kinder RSV-Antikörper aufweisen, nimmt der Anteil innerhalb der ersten Lebensmonate stark ab, was auf den Abbau diaplazentar übertragener mütterlicher Antikörper zurückgeführt werden kann. Anschließend erfolgt ab dem Ende des ersten Lebensjahres ein Anstieg der Seropositivität, die mit drei Jahren wieder etwa 80% erreicht (s. Abb. 4.2).



Estimated probabilities of seropositivity by virus and age (in months). Logistic regression was used to model seropositivity to hMPV (dotted) and RSV (solid) by age in months. The 95% confidence intervals (CIs) are indicated as shaded regions.

Abb. 4.2 Wahrscheinlichkeit der Seropositivität gegen RSV (und hMPV) in Abhängigkeit vom Alter aus der Untersuchung von Dunn, Ryder et al., 2013 (63)

In einer Untersuchung aus dem Jahr 2003 an 124 gesunden thailändischen Kindern, in der die Seren via ELISA auf RSV-IgG untersucht wurden, wiesen die Kinder in den Altersgruppen von sechs bis 23 Monaten in maximal 60,87% der Fälle Antikörper gegen RSV auf (64). Welcher Virusstamm bzw. ob mehrere Isolate getestet wurden, geht aus der verfügbaren Literatur nicht hervor.

Wie die Annahme der kompletten frühen Durchseuchung zustande gekommen ist, lässt sich schwer nachvollziehen, da viele der Arbeiten zur Grundlagenforschung in der 1950er bis 1980er Jahren nicht mehr in den Online-Datenbanken verfügbar sind. Eventuell trägt die zunehmende Zahl der Ein- oder Zwei-Kind-Familien dazu bei, dass sich die Erstinfektion mit RSV zeitlich nach hinten verschiebt. Bei fehlenden älteren Geschwisterkindern werden weniger Infektionen aus Kindergarten und Schule mit nach Hause gebracht. Die Kinder kommen somit statistisch betrachtet erst später mit RSV in Kontakt. Sollte hier die Ursache für eine spätere Erstinfektion liegen, wäre in den kommenden Jahren bzw. Jahrzehnten möglicherweise eine Verschiebung zurück in die ersten beiden Lebensjahre durch die zunehmende Betreuung von Säuglingen und Kleinstkindern in Gruppeneinrichtungen zu erwarten.

Der geringe Unterschied der durchschnittlichen Immunität gegen die verschiedenen Virusisolate scheint auf den ersten Blick einleuchtend zu sein aufgrund der bekannten Kreuzimmunität (21). Aufschlussreich ist dabei in der vorliegenden Arbeit die Betrachtung einiger Ergebnisse aus den ersten Lebensjahren: Hier weisen einige Seren lediglich Antikörper gegen einzelne Isolate oder eine der beiden Untergruppen RSV A oder B auf (vgl. Abschnitte 3.1 und 3.2). Da es sich dabei vermutlich um Erstinfektionen handelt, ist deutlich zu sehen, dass danach nicht mit einer Kreuzimmunität bzw. Kreuzprotektion gegen alle anderen RSV-Stämme auszugehen ist. Mit steigendem Lebensalter kommt es entsprechend vermehrt zu Reinfektionen, sodass die Differenzierung zwischen direkter und Kreuzimmunität anhand der Serumantikörper nicht mehr möglich ist. Vereinzelt finden sich jedoch im gesamten untersuchten Kollektiv Kinder, die nur gegen einen Teil der Virusisolate Antikörper aufweisen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen somit, dass von einer generellen Kreuzimmunität gegen RSV nicht auszugehen ist, diese jedoch mit der Anzahl der Reinfektionen im Laufe des Lebens zunimmt.

4.2 Neutralisationstest und ELISA im Vergleich

Insgesamt liegt der Anteil positiver Seren im N-Test in ähnlichen Größenordnungen wie im ELISA. Auch hier lässt sich, wie im ELISA, keine vollständige Serokon-

version des Probenkollektivs innerhalb der ersten beiden Lebensjahre beobachten, sondern nur etwa die Hälfte der untersuchten Seren weist Antikörper auf.

Interessanterweise lassen sich neutralisierende Antikörper im N-Test im ersten Lebensjahr bei einem höheren Prozentsatz der Kinder nachweisen als Gesamtantikörper im ELISA. Dies bestätigt die hohe Sensitivität des Neutralisationstests, der in der RSV-Diagnostik als Goldstandard gilt.

Bei der Betrachtung der Einzelwerte im Neutralisationstest fällt auf, dass manche Seren - vor allem bei den jüngeren Kindern - nur für einzelne Virusisolate positiv sind. Aufgrund dieser hohen Spezifität eignet sich der N-Test weniger für Screeninguntersuchungen im klinischen Alltag. Hier müsste jeder Patient mit einer Vielzahl von Virusstämmen getestet werden, um eine zuverlässige Aussage über den Antikörperstatus zu erhalten. Das bedeutet, dass die hohe Spezifität, die den N-Test auszeichnet, für epidemiologische Fragestellungen, die die Gesamtdurchseuchung mit RSV gemessen an der Seropositivität zum Gegenstand haben, zum Nachteil wird. Eine Untersuchung an nur einem Isolat pro Virusuntergruppe kann leicht ein falsch negatives Ergebnis liefern. Unser Vorgehen, jedes Serum an mehreren Virusisolaten zu testen, erweist sich hier dementsprechend als sinnvoll und notwendig, um die Qualität der Untersuchungen zu gewährleisten. Es fällt zudem auf, dass teilweise Antikörper gegen ein oder mehrere Wildisolate vorliegen, während dasselbe Serum nicht mit dem Laborstamm des gleichen RSV-Typs reagiert. Auch im ELISA trifft dies zu. Da die verwendeten Laborstämme mehrere Jahrzehnte alt sind - RSV Long strain wurde 1956, RSV B 18537 1962 isoliert - , unterscheiden sie sich möglicherweise aufgrund des stetig stattfindenden *antigenic drift*, also einer schrittweisen Veränderung der Antigene über längere Zeit, stark von den aktuelleren Wildisolaten. Die Ergebnisse früherer Studien, für die bei Verwendung eines Neutralisationstests nur ein einzelner, älterer Laborstamm untersucht wurde, sind folglich in ihrer Aussagekraft infrage zu stellen.

4.3 RSV-F-ELISA

Der hohe Prozentsatz der Kinder mit positiven Serumtitern gegen RSV-F bestätigt die Annahme, dass bei den meisten Menschen eine Ansteckung mit RSV innerhalb der ersten Lebensjahre erfolgt. Es zeigt sich ab dem zweiten Lebensjahr ein starker Anstieg des Anteils der Kinder, die bereits Antikörper gegen das F-Protein aufweisen, der im 4. Lebensjahr 100% erreicht. Eine Schwäche der durchgeführten Untersuchung liegt in der groben Abstufung der Ergebnisse mit insgesamt lediglich vier log-Stufen. Es fällt allerdings auf, dass der Prozentsatz der positiven Seren bis zum zweiten Geburtstag mit 69% höher liegt als im ELISA und N-Test mit je knapp 50%. Da es sich um ein rekombinantes F-Protein handelt, muss dieser hohe Prozentsatz kritisch betrachtet werden und kann nicht für RSV-Wildisolate angenommen werden. Möglicherweise besteht auch eine geringere Spezifität im Vergleich mit dem als Goldstandard geltenden Neutralisationstest, sodass ein Teil der Seren falsch-positive Ergebnisse zeigt.

4.4 Weitere Ergebnisse

In der Seroimmunogenität der RSV A-Stämme im Vergleich zu den B-Stämmen zeigen sich bei unseren Untersuchungen keine wesentlichen Unterschiede. Ob die klinische Symptomatik zwischen den Untergruppen divergiert, wird diskutiert. Eine australische Studie aus dem Jahr 1993 konnte keine signifikanten Unterschiede diesbezüglich feststellen (65). Im Gegensatz dazu zeigt sich in einer argentinischen Studie eine ausgeprägtere Symptomatik bei Infektion mit RSV A im Vergleich zu RSV B (66).

5 Zusammenfassung

Das Respiratory Syncytial Virus (RSV) ist der häufigste und klinisch bedeutsamste Erreger bei tiefen Atemwegsinfektionen im Kindesalter in Deutschland. Allgemein wurde bisher angenommen, dass innerhalb der ersten beiden Lebensjahre eine nahezu vollständige Durchseuchung mit dem hochkontagiösen Virus erfolgt. Eine wichtige Rolle für die humorale Immunantwort gegen RSV spielen die Oberflächenproteine F und G.

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung der Antikörperantwort gegen RSV innerhalb der ersten Lebensjahre untersucht. Hierzu wurden in den Seren von 102 Kindern im Alter zwischen sechs Monaten und sechs Jahren sowohl die Gesamtantikörper mittels ELISA als auch die neutralisierenden Antikörper im Neutralisationstest gemessen. Als Antigen wurden nicht nur die allgemein üblichen Laborstämme verwendet, sondern auch Wildisolate aus der jüngeren Zeit. Dies geschah unter der Annahme, dass diese Wildisolate den heutzutage zirkulierenden RSV-Stämmen antigenetisch ähnlicher sind. Zudem wurde die Antikörperantwort gegen ein rekombinantes RSV-F-Protein via ELISA ermittelt.

Es zeigt sich mit allen drei Messmethoden ein deutlicher Anstieg der Antikörpertiter über die ersten Lebensjahre, die aber erst im fünften bis sechsten Lebensjahr eine Seropositivrate von etwa 90-100% erreichen. Bei einigen Kindern finden sich in den ersten Lebensjahren im Neutralisationstest (N-Test) sowie im ELISA typenspezifische Immunantworten nur gegen einzelne Wildisolate. Dies unterstreicht die Problematik der Untersuchung zur RSV-Durchseuchung in jungen Patientenkollektiven mit nur einem RSV-Stamm. In den höheren Altersgruppen unterscheidet sich die Reaktivität zwischen den einzelnen Virusstämmen nicht mehr wesentlich, was als zunehmende Kreuzprotektion – abgebildet in serologischen Tests als Kreuzreaktivität - durch Reinfektionen mit verschiedenen Virusstämmen im Verlauf des Lebens zu werten ist.

Die bisher allgemein angenommene vollständige Durchseuchung mit RSV innerhalb der ersten beiden Lebensjahre, gemessen an der Antikörperbildung, konnte nicht bestätigt werden. Nur etwa die Hälfte der getesteten Kinder scheint bis zum zweiten Geburtstag eine Infektion mit RSV durchgemacht zu haben. Nicht genau nachvollziehbar ist, wie es zu dieser allgemeinen Annahme gekommen ist. Es ist denkbar, dass sich die Erstinfektion durch sozialen Wandel hin zu kleineren Familien, in denen die Kinder ein geringeres Risiko der Ansteckung durch ältere Geschwister haben, in den letzten Jahrzehnten zeitlich nach hinten verschoben hat.

Anhang

Literaturverzeichnis

1. **CHANOCK, R. M., H. W. Kim, A. J. Vargosko, A. DELEVA, K. M. JOHNSON, C. CUMMING, and R. H. Parrott.** 1961. Respiratory syncytial virus. I. Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases in children. *JAMA* **176**:647-653.
2. **Parrott, R. H., A. J. Vargosko, H. W. Kim, C. CUMMING, H. TURNER, R. J. HUEBNER, and R. M. CHANOCK.** 1961. Respiratory syncytial virus. II. Serologic studies over a 34-month period of children with bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases. *JAMA* **176**:653-657.
3. **Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen.** 2003. *Molekulare Virologie.* Spektrum Verlag.
4. **Weigl, J. A., W. Puppe, O. Belke, J. Neususs, F. Bagci, and H. J. Schmitt.** 2005. The descriptive epidemiology of severe lower respiratory tract infections in children in Kiel, Germany. *Klin.Padiatr.* **217**:259-267.
5. **Canducci F, D. M. S. M. M. B. S. T. C. G. G. C. P. R. E. C. M.** 2008. Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J Med.Virol.* **80**:716-723.
6. **Khanna N, W. A. D. M. S. I. H. J. H. D. W. M. G. A. F. U. H. HH.** 2008. Respiratory syncytial virus infection in patients with hematological diseases: single-center study and review of the literature. *Clin Infect Dis.* **46**:402-412.
7. **Elliot AJ, F. DM.** 2008. Influenza and respiratory syncytial virus in the elderly. *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.* **7**:249-258.
8. **Hall CB, D. R. J. S. K. G. JM.** 1981. Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation. *Infect Immun.* **33**:779-783.
9. **Terletskaia-Ladwig, E., G. Enders, G. Schalasta, and M. Enders.** 2005. Defining the timing of respiratory syncytial virus (RSV) outbreaks: an epidemiological study. *BMC.Infect.Dis.* **5**:20. doi:1471-2334-5-20 [pii];10.1186/1471-2334-5-20 [doi].
10. **Hall, C. B.** 2001. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N.Engl.J.Med.* **344**:1917-1928. doi:10.1056/NEJM200106213442507 [doi].
11. **Knipe, D. and P. Howley.** 2007. *Fields Virology.*
12. **Bachi, T. and C. Howe.** 1973. Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus. *J Virol.* **12**:1173-1180.

13. **Zimmer, G., M. Rohn, G. P. McGregor, M. Schemann, K. K. Conzelmann, and G. Herrler.** 2003. Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J.Biol.Chem.* **278**:46854-46861. doi:10.1074/jbc.M306949200 [doi];M306949200 [pii].
14. **Techaarpornkul S, C. P. P. ME.** 2002. Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology* **294**:296-304.
15. **Kahn JS, S. M. B. L. R. JK.** 1999. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology* **254**:81-91.
16. **Teng, M. N., S. S. Whitehead, and P. L. Collins.** 2001. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology* **289**:283-296. doi:10.1006/viro.2001.1138 [doi];S0042-6822(01)91138-9 [pii].
17. **Agenbach E, T. C. V. M.** 2005. Amino acid variation within the fusion protein of respiratory syncytial virus subtype A and B strains during annual epidemics in South Africa. *Virus Genes.* **30**:267-278.
18. **Hendricks, D. A., K. McIntosh, and J. L. Patterson.** 1988. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J.Virol.* **62**:2228-2233.
19. **Levine S, K.-F. R. P. PR.** 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen.Virol.* **68**:2521-2524.
20. **Garcia-Beato, R., I. Martinez, C. Franci, F. X. Real, B. Garcia-Barreno, and J. A. Melero.** 1996. Host cell effect upon glycosylation and antigenicity of human respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Virology* **221**:301-309. doi:S0042-6822(96)90379-7 [pii];10.1006/viro.1996.0379 [doi].
21. **Johnson PR, S. M. O. R. C. PL.** 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**:5625-5629.
22. **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.

23. **Kapikian, A. Z., J. A. Bell, F. M. MASTROTA, K. M. JOHNSON, R. J. HUEBNER, and R. M. CHANOCK.** 1961. An outbreak of febrile illness and pneumonia associated with respiratory syncytial virus infection. *Am.J.Hyg.* **74**:234-248.
24. **DeVincenzo, J. P., C. M. El Saleeby, and A. J. Bush.** 2005. Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants. *J.Infect.Dis.* **191**:1861-1868.
25. **Wright PF, G. W. P. M. R. G. Z. Y. R. F. C.-D. S. G. BS.** 2002. Illness severity, viral shedding, and antibody responses in infants hospitalized with bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *J Infect.Dis.* **185**:1011-1018.
26. **von Linstow ML, E.-O. J. K. A. W. T. W. H. H. B.** 2006. Excretion patterns of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus among young children. *Eur J Med Res.* **11**:329-335.
27. **Domurat F, R. N. J. W. E. D. R.** 1985. Respiratory syncytial virus infection of human mononuclear leukocytes in vitro and in vivo. *J Infect.Dis.* **152**:895-902.
28. **Schijf, M. A., M. V. Lukens, D. Kruijsen, N. O. van Uden, J. Garszen, F. E. Coenjaerts, B. Van't Land, and G. M. van Bleek.** 2013. Respiratory syncytial virus induced type I IFN production by pDC is regulated by RSV-infected airway epithelial cells, RSV-exposed monocytes and virus specific antibodies. *PLoS.One.* **8**:e81695. doi:10.1371/journal.pone.0081695 [doi];PONE-D-13-28377 [pii].
29. **Ugonna, K., C. D. Bingle, K. Plant, K. Wilson, and M. L. Everard.** 2014. Macrophages are required for dendritic cell uptake of respiratory syncytial virus from an infected epithelium. *PLoS.One.* **9**:e91855. doi:10.1371/journal.pone.0091855 [doi];PONE-D-13-28309 [pii].
30. **Rivera-Toledo, E. and B. Gomez.** 2012. Respiratory syncytial virus persistence in macrophages alters the profile of cellular gene expression. *Viruses.* **4**:3270-3280.
31. **Aherne W, B. T. C. S. G. P. M. J.** 1970. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol.* **23**:7-18.
32. **Janssen, R., J. Pennings, H. Hodemaekers, A. Buisman, O. M. van, R. L. de, K. Ozturk, J. Dormans, T. Kimman, and B. Hoebee.** 2007. Host transcription profiles upon primary respiratory syncytial virus infection. *J.Virol.* **81**:5958-5967. doi:JVI.02220-06 [pii];10.1128/JVI.02220-06 [doi].
33. **Hogg JC, W. J. R. J. M. P. T. WM.** 1970. Age as a factor in the distribution of lower-airway conductance and in the pathologic anatomy of obstructive lung disease. *N.Engl.J Med.* **282**:1283-1287.

34. **Graham BS, B. L. R. J. W. P. K. DT.** 1991. Respiratory syncytial virus infection in anti-mu-treated mice. *J Virol.* **65**:4936-4942.
35. **Ottolini MG, P. D. H. V. Z. M. S. N. P. GA.** 1999. Effectiveness of RSVIG prophylaxis and therapy of respiratory syncytial virus in an immunosuppressed animal model. *Bone Marrow Transplant.* **24**:41-45.
36. **McIntosh K, M. H. O. I. C. R. B. RM.** 1978. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J Infect.Dis.* **128**:24-32.
37. **Esposito, S., E. Scarselli, M. Lelii, A. Scala, A. Vitelli, S. Capone, M. Fornili, E. Biganzoli, A. Orenti, A. Nicosia, R. Cortese, and N. Principi.** 2016. Antibody response to respiratory syncytial virus infection in children <18 months old. *Hum.Vaccin.Immunother.* **12**:1700-1706. doi:10.1080/21645515.2016.1145847 [doi].
38. **Vojvoda, V., M. A. Savic, M. Jergovic, M. Kukuruzovic, L. Markovinovic, N. Aberle, S. Rabatic, and K. Bendelja.** 2014. The increased type-1 and type-2 chemokine levels in children with acute RSV infection alter the development of adaptive immune responses. *Biomed.Res.Int.* **2014**:750521. doi:10.1155/2014/750521 [doi].
39. **Englund JA.** 1994. Passive protection against respiratory syncytial virus disease in infants: the role of maternal antibody. *Pediatr.Infect.Dis.J* **13**:449-453.
40. **Murphy BR, A. D. S. M. W. E. P. G. C. R. H. V. R. W. K. H. G. B. e. al.** 1986. Effect of age and preexisting antibody on serum antibody response of infants and children to the F and G glycoproteins during respiratory syncytial virus infection. *J Clin.Microbiol.* **24**:894-898.
41. **Murphy BR, O. R. C. P. C. R. P. GA.** 1988. Passive transfer of respiratory syncytial virus (RSV) antiserum suppresses the immune response to the RSV fusion (F) and large (G) glycoproteins expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol.* **62**:3907-3910.
42. **Choi, Y., C. S. Mason, L. P. Jones, J. Crabtree, P. A. Jorquera, and R. A. Tripp.** 2012. Antibodies to the central conserved region of respiratory syncytial virus (RSV) G protein block RSV G protein CX3C-CX3CR1 binding and cross-neutralize RSV A and B strains. *Viral Immunol.* **25**:193-203. doi:10.1089/vim.2011.0094 [doi].
43. **Leader, S. and K. Kohlhase.** 2003. Recent trends in severe respiratory syncytial virus (RSV) among US infants, 1997 to 2000. *J.Pediatr.* **143**:S127-S132. doi:S0022347603005109 [pii].
44. **Heikkinen, T., M. Waris, O. Ruuskanen, A. Putto-Laurila, and J. Mertsola.** 1995. Incidence of acute otitis media associated with group A and B respiratory syncytial virus infections. *Acta Paediatr.* **84**:419-423.

45. **Caram, L. B., J. Chen, E. W. Taggart, D. R. Hillyard, R. She, C. R. Polage, J. Twersky, K. Schmader, C. A. Petti, and C. W. Woods.** 2009. Respiratory syncytial virus outbreak in a long-term care facility detected using reverse transcriptase polymerase chain reaction: an argument for real-time detection methods. *J.Am.Geriatr.Soc.* **57**:482-485. doi:JGS2153 [pii];10.1111/j.1532-5415.2008.02153.x [doi].
46. **Iankevich, O. D., R. S. Dreizin, N. L. Makhlinovskaia, and N. A. Gorodnitskaia.** 1975. [Viremia in respiratory syncytial virus infection]. *Vopr.Virusol.* 455-458.
47. **DeByle, C., L. Bulkow, K. Miernyk, L. Chikoyak, K. B. Hummel, T. Hennessy, and R. Singleton.** 2012. Comparison of nasopharyngeal flocced swabs and nasopharyngeal wash collection methods for respiratory virus detection in hospitalized children using real-time polymerase chain reaction. *J Virol.Methods* **185**:89-93. doi:S0166-0934(12)00207-8 [pii];10.1016/j.jviromet.2012.06.009 [doi].
48. **Tuttle, R., A. Weick, W. S. Schwarz, X. Chen, P. Obermeier, L. Seeber, F. Tief, S. Muehlhans, K. Karsch, C. Peiser, S. Duwe, B. Schweiger, and B. Rath.** 2014. Evaluation of novel second-generation RSV and influenza rapid tests at the point of care. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* doi:S0732-8893(14)00484-2 [pii];10.1016/j.diagmicrobio.2014.11.013 [doi].
49. **Kellner, J. D., A. Ohlsson, A. M. Gadomski, and E. E. Wang.** 1996. Efficacy of bronchodilator therapy in bronchiolitis. A meta-analysis. *Arch.Pediatr.Adolesc.Med.* **150**:1166-1172.
50. **Ralston, S. L., A. S. Lieberthal, H. C. Meissner, B. K. Alverson, J. E. Baley, A. M. Gadomski, D. W. Johnson, M. J. Light, N. F. Maraqa, E. A. Mendonca, K. J. Phelan, J. J. Zorc, D. Stanko-Lopp, M. A. Brown, I. Nathanson, E. Rosenblum, S. Sayles, III, and S. Hernandez-Cancio.** 2014. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics* **134**:e1474-e1502. doi:peds.2014-2742 [pii];10.1542/peds.2014-2742 [doi].
51. **Fernandes, R. M., L. M. Bialy, B. Vandermeer, L. Tjosvold, A. C. Plint, H. Patel, D. W. Johnson, T. P. Klassen, and L. Hartling.** 2013. Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD004878. doi:10.1002/14651858.CD004878.pub4 [doi].
52. **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.
53. **Sinclair, S. M., J. K. Jones, R. K. Miller, M. F. Greene, P. Y. Kwo, and W. C. Maddrey.** 2017. The Ribavirin Pregnancy Registry: An Interim Analysis of Potential Teratogenicity at the Mid-Point of Enrollment. *Drug Saf*

- 40**:1205-1218. doi:10.1007/s40264-017-0566-6 [doi];10.1007/s40264-017-0566-6 [pii].
54. **Wandstrat, T. L.** 1997. Respiratory syncytial virus immune globulin intravenous. *Ann.Pharmacother.* **31**:83-88.
 55. **Sorrentino, M. and T. Powers.** 2000. Effectiveness of palivizumab: evaluation of outcomes from the 1998 to 1999 respiratory syncytial virus season. The Palivizumab Outcomes Study Group. *Pediatr.Infect.Dis.J.* **19**:1068-1071.
 56. **Kapikian, A. Z., R. H. Mitchell, R. M. CHANOCK, R. A. Shvedoff, and C. E. Stewart.** 1969. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am.J.Epidemiol.* **89**:405-421.
 57. **Openshaw, P. J. and J. S. Tregoning.** 2005. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin.Microbiol.Rev.* **18**:541-555.
 58. **Connors M, C. P. F. C. M. BR.** 1991. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J Virol.* **65**:1634-1637.
 59. **Wagner, D. K., P. Muelenaer, F. W. Henderson, M. H. Snyder, C. B. Reimer, E. E. Walsh, L. J. Anderson, D. L. Nelson, and B. R. Murphy.** 1989. Serum immunoglobulin G antibody subclass response to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins after first, second, and third infections. *J Clin.Microbiol.* **27**:589-592.
 60. **Gimenez, H. B., S. Chisholm, J. Dornan, and P. Cash.** 1996. Neutralizing and enhancing activities of human respiratory syncytial virus-specific antibodies. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **3**:280-286.
 61. **Sastre, P., M. G. Cusi, C. Manoha, O. Schildgen, T. Ruiz, C. Vela, and P. Rueda.** 2010. Serum antibody response to respiratory syncytial virus F and N proteins in two populations at high risk of infection: children and elderly. *J Virol.Methods* **168**:170-176. doi:S0166-0934(10)00194-1 [pii];10.1016/j.jviromet.2010.05.011 [doi].
 62. Robert Koch Institut. RKI-Ratgeber für Ärzte Respiratorische Synzytial-Viren (RSV). *Epidemiologisches Bulletin* 19/2011 , 159-163. 16-5-2011. Brandenburgische Universitätsdruckerei und Verlagsgesellschaft Potsdam mbH.
 63. **Dunn, S. R., A. B. Ryder, S. J. Tollefson, M. Xu, B. R. Saville, and J. V. Williams.** 2013. Seroepidemiologies of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in young children, determined with a new recombinant fusion protein enzyme-linked immunosorbent assay.

Clin.Vaccine Immunol. **20**:1654-1656. doi:CVI.00750-12 [pii];10.1128/CVI.00750-12 [doi].

64. **Bhattarakosol, P., C. Pancharoen, V. Mungmee, R. Thammaborvorn, and L. Semboonlor.** 2003. Seroprevalence of anti-RSV IgG in Thai children aged 6 months to 5 years. *Asian Pac.J Allergy Immunol.* **21**:269-271.
65. **McIntosh, E. D., L. M. De Silva, and R. K. Oates.** 1993. Clinical severity of respiratory syncytial virus group A and B infection in Sydney, Australia. *Pediatr.Infect.Dis.J* **12**:815-819.
66. **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.

Internetquellen

1. Centers for Disease Control and Prevention, Respiratory Syncytial Virus Infection, Abschnitt „Trends and Surveillance“, Zugriffsdatum 19.11.2015, <http://www.cdc.gov/rsv/research/us-surveillance.html>