

Aus dem

Institut für Virologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Professor Dr. Jörg Timm

**Epidemiologie und Immunantwort von Infektionen mit dem
Respiratorischen Syncytialvirus, Humanen Metapneumovirus
und Rhinovirus bei Kindern mit respiratorischem Infekt der
unteren Atemwege**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Katarzyna Magdalena Hluchnik

2021

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

Zweitgutachter: PD Dr. med. Hans Martin Bosse

Zusammenfassung

RSV, RV und hMPV sind relevante Pathogene der respiratorischen oberen sowie schweren, mitunter letalen unteren Atemwegsinfekte bei Kleinkindern. In ihrer klinischen Ausprägung lassen sich die Infektionen mit ihnen nicht immer eindeutig unterscheiden und sind nur durch molekulare Techniken zu differenzieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 110 RSV positiv getestete NPAs (Nasopharynxaspirate) mittels eines hierfür etablierten Immunglobulin-ELISA auf IgG untersucht. Lediglich in zwei Proben konnte eine Serokonversion nachgewiesen werden. In dem 17 NPAs umfassenden hMPV Kollektiv wurde nur in einer Probe IgG nachgewiesen. IgA konnte nur in einem RSV-positivem NPA ermittelt werden. Weiterhin wurden mittels ELISA die IL-8- und die ECP-Konzentration (Eosinophiles kationisches Protein) in den drei Kollektiven verglichen. Die IL-8-Konzentration war im RV-Kollektiv am höchsten und im RSV-Kollektiv am niedrigsten. Ein Konzentrationsunterschied konnte weder in den einzelnen Kollektiven, bei der Unterteilung in die RSV Subtypen A und B, noch beim Vergleich der Interleukin-8-Konzentration nach den einzelnen Krankheitsausprägungen (Bronchitis, obstruktive Bronchitis, Bronchiolitis, Pneumonie) festgestellt werden. Weder die Konzentrationen in den Proben unterteilt nach RSV-Subtypen noch den einzelnen Virenkollektiven wiesen einen statistisch signifikanten Unterschied auf. Weiterhin wurde untersucht, ob Koinfektionen mit Herpesviren einen Einfluss auf die klinischen und laborchemischen Parameter einer RSV Infektion nehmen. Mittels einer PCR wurden 154 RSV positive Proben auf CMV, HHV-6, EBV und HSV-1 Koinfektionen untersucht. Verglichen wurden die Parameter CRP, Leukozyten, IL-8, ECP, Temperatur und das Alter. Eine klinische oder laborchemische Auswirkung durch eine dieser Koinfektionen konnte hier nicht nachgewiesen werden. Es bestand jedoch ein höheres Alter von durchschnittlich 2,5 Monaten bei den mit CMV koinfizierten Kindern. Die Viruslast von RSV zeigte sich bei Krankheitsbeginn mehr als 20-fach höher als im Verlauf nach drei bis sechs Tagen, wobei auch hier ein Unterschied zwischen den RSV-Subtypen ausgeschlossen werden konnte. Die Kinder, die im Rahmen ihrer RSV Infektion eine Bronchiolitis entwickelten, waren im Median mit 0,23 Jahren deutlich jünger als die Kinder, die eine Pneumonie entwickelten. Bei diesen lag der Median bei 0,76 Jahren. Zudem zeigten die Kinder mit Pneumonie im RSV-Kollektiv signifikant höhere Temperaturen mit 39°C, Leukozyten von 13,75 tsd./ μl und ein CRP von 2,2 mg/dl. Hingegen lag die Temperatur im Median bei der Bronchiolitis bei 38°C, die Leukozyten bei 9,6 tsd./ μl und das CRP bei 0,3 mg/dl. In dem RV-Kollektiv konnte eine solche Korrelation nicht ermittelt werden. Ebenfalls zeigten die Auswertungen, dass eine Pneumonie im RSV- und im RV-Kollektiv signifikant häufiger mit einer Röntgenaufnahme, einer Antibiotikaverordnung sowie einer längeren Liegedauer und der höheren Notwendigkeit einer Sauerstofftherapie einherging.

Summary

RSV, RV and hMPV are relevant pathogens of respiratory upper as well as severe, sometimes lethal lower respiratory tract infections in young children. In their clinical expression, infections with them cannot always be clearly distinguished and can only be differentiated by molecular techniques. In the present study, 110 RSV positive nasopharyngeal aspirates (NPAs) were tested for IgG using an immunoglobulin ELISA established for this purpose. Seroconversion was detected in only two samples. In the hMPV collective of 17 NPAs, IgG was detected in only one sample. IgA could only be detected in one RSV-positive NPA. Furthermore, IL-8 and ECP (eosinophil cationic protein) concentrations were compared by ELISA in the three collectives. IL-8 concentration was highest in the RV collective and lowest in the RSV collective. No difference in concentration was detected in the individual collectives, when subdivided into RSV subtypes A and B, nor when interleukin-8 concentration was compared according to the individual disease manifestations (bronchitis, obstructive bronchitis, bronchiolitis, pneumonia). Neither the concentrations in the samples subdivided by RSV subtypes nor the individual viral collectives showed a statistically significant difference. Furthermore, we investigated whether coinfections with herpesviruses have an influence on the clinical and laboratory parameters of RSV infection. By PCR, 154 RSV-positive samples were analyzed for CMV, HHV-6, EBV, and HSV 1 coinfection. Parameters compared were CRP, leukocytes, IL-8, ECP, temperature and age. No clinical or laboratory effect due to any of these coinfections was demonstrated here. However, there was a higher age of 2.5 months on average in the children coinfecting with CMV. The viral load of RSV was found to be more than 20-fold higher at the onset of illness than during the course after three to six days, again excluding any difference between RSV subtypes. The children who developed bronchiolitis as part of their RSV infection were, at a median of 0.23 years, significantly younger than those who developed pneumonia. For the latter, the median was 0.76 years. In addition, the children with pneumonia in the RSV collective showed significantly higher temperatures of 39°C, leukocytes of 13.75 tsd/ μ l, and CRP of 2.2 mg/dl. In contrast, the median temperature in bronchiolitis was 38°C, leukocytes 9.6 tsd./ μ l, and CRP 0.3 mg/dl. No such correlation could be determined in the RV collective. The analyses also showed that pneumonia was significantly more frequently associated with radiography, antibiotic prescription, longer duration of hospitalization, and greater need for oxygen therapy in the RSV and RV groups.

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
CMV	Cytomegalievirus
CD 21 Protein	<i>Clusters of Differentiation 21 Protein</i>
CT	<i>Cycle Treshold</i>
CRP	C-reaktives Protein
CC	Chemotaktisches Cytokin
CXC	chemotaktisches Cytokin mit einer Aminosäure zwischen den Cysteinresten
CCL	chemotaktisches Cytokin mit einem Ligand
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECP	Eosinophiles kationisches Protein
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	<i>Enzym-linked Immunosorbant Assay</i>
EVK	Evangelisches Krankenhaus
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i>
FBS	Fetales Bovines Serum
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
Gp22	Glykoproteinkomplex
GCSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
gQ-Protein	Oberflächenprotein auf dem HHV-6
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HHV 6	Humanes Herpesvirus 6
hMPV	Humanes Metapneumovirus
HSV 1	Herpes-Simplex-Virus 1
Hep 2	Humane Epitheliumzellen eines Larynxkarzinoms
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HepG2	Humane Zelllinie eines Leberzellkarzinoms
ICAM Molekül	Intrazelluläre Adhäsionsmoleküle
IgA/IgG	Immunglobulin A/G
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
IL-6/IL-8/IL-1β	Interleukin-6/8/1 β
IP-10	<i>Interferon gamma induced Protein-10</i>
INF β	Interferon β
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MCP-1	<i>Monocyten Chemotactic protein-1</i>
MIP-1α/MIP-1β	<i>Macrophage inflammatory protein 1α/1β</i>
NF-kB	<i>Nuklear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells</i>
NPA	Nasopharynxaspirat
NS ½	Nichtstrukturprotein 1/2

O₂	Sauerstoff
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCT	Procalcitonin
p-Wert	<i>Probability-value</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted</i>
RNase3	Ribonuklease 3
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
RV	Rhinovirus
Stat-2	<i>Signal transducers and activators for transcription</i>
TGF	<i>Tumor growth factor</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
UNG	Uracil-N-glycosidase
US2/6	<i>Unique short glycoprotein US2/6</i>
UL18	<i>Membrane glycoprotein UL18</i>
US11	<i>Membrane glycoprotein US11</i>

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das respiratorische Syncytialvirus	3
1.1.1	Entdeckung und Pathogenese	3
1.1.2	Einfluss auf die Abwehr	3
1.1.3	Klinik	4
1.2	Das humane Rhinovirus	5
1.2.1	Entdeckung und Pathogenese	5
1.2.2	Klinik	5
1.3	Das humane Metapneumovirus	6
1.3.1	Entdeckung und Pathogenese	6
1.3.2	Einfluss auf die Abwehr	7
1.3.3	Klinik	7
1.4	Allgemeine Labordiagnostik	8
1.4.2	Interleukin-8/ CXCL 8	8
1.4.3	Das eosinophile kationische Protein	9
1.5	Herpesviren	10
1.5.1	Das humane Cytomegalievirus	10
1.5.2	Das Epstein-Barr-Virus	11
1.5.3	Das Herpes-simplex-Virus Typ 1	12
1.5.4	Das humane Herpesvirus Typ 6	12
1.6	Spezielle Labordiagnostik der respiratorischen Viren	13
1.6.1	Virusnachweis mittels Zellkultur	13
1.6.2	Schnelltest zum Nachweis von Virusantigen	14
1.6.3	Nachweis mittels peroxidasegekoppelter Antikörper	15
1.6.4	Nachweis mittels fluoreszenzmarkierten Antikörper	16
1.6.5	Molekulare Techniken	17
1.7	Zielsetzung der Arbeit	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Liste der verwendeten Materialien	20
2.1.1	Materialien ohne feste Arbeitsplatzzuweisung	20
2.1.2	Proteinbestimmung nach Bradford	21
2.1.3	IgG-ELISA (<i>Enzym-linked Immunosorbant Assay</i>)	21

2.1.4	IgA-ELISA	22
2.1.5	IL-8-ELISA.....	22
2.1.6	ECP-ELISA.....	23
2.1.7	RNA-Extraktion	24
2.1.8	TaqMan-PCR	24
2.1.9	Geräte	24
2.1.10	<i>Software</i>	25
2.2	Selektion der Nasopharynxaspirate.....	25
2.3	Zellkultur und Virusanzucht	26
2.3.1	Zellkultur	26
2.3.2	Zellzählung in der Neubauerzählkammer.....	26
2.3.3	Einfrieren der Zellen.....	27
2.3.4	Auftauen der Zellen	27
2.3.5	Virusinfektion von Zelllinien.....	27
2.3.6	Cytopathischer Effekt.....	28
2.3.7	Virus- und Zellernte für den Immunglobulin-ELISA.....	29
2.4	Proteinbestimmung nach Bradford	29
2.4.1	Vorbereitung der Proteinstandards	29
2.4.2	Durchführung der Proteinbestimmung	29
2.5	Nachweis von Immunglobulin G und Immunglobulin A im ELISA.....	30
2.5.1	Vorbereitung und Beschichtung der ELISA-Platten	30
2.5.2	Testdurchführung	30
2.6	Quantitative Interleukin-8-Bestimmung mittels <i>Sandwich</i> -ELISA	31
2.6.1	Vorbereitung und Beschichtung der ELISA-Platten	31
2.6.2	Testdurchführung	32
2.7	Quantitative Bestimmung des eosinophilen kationischen Proteins mittels ELISA	33
2.8	Untersuchung respiratorischer Proben mittels <i>TaqMan-Real-Time PCR</i>	34
2.8.1	Aufbereitung der Nasopharynxaspirate und Nukleinsäureextraktion	34
2.8.2	Suche nach Koinfektionen mit den Herpesviren CMV, EBV, HHV-6, HSV-1	34
3.	Ergebnisse	36
3.1	Nachweis von Immunglobulin G und Immunglobulin A im Nasopharynxaspirat ..	36
3.2	Quantitative IL-8-Bestimmung mittels <i>Sandwich</i> -ELISA.....	36
3.3	Quantitative Bestimmung des eosinophilen kationischen Proteins	40

3.4	Untersuchung respiratorischer Proben mittels TaqMan-Real-Time-PCR	42
3.5	Auswertung klinischer Daten bezogen auf Alter, Diagnose und Viruslast	50
3.6	Infektparameter im Vergleich	56
3.7	Diagnosen betrachtet nach Standort, Klinik und Infektiologie.....	59
4.	Diskussion	65
4.1	Nachweis von Immunglobulin A und Immunglobulin G im Nasopharynxaspirat ..	65
4.2	Quantitative IL-8-Bestimmung mittels Sandwich-ELISA.....	65
4.3	Quantitative Bestimmung des eosinophilen kationischen Proteins	67
4.4	Untersuchung respiratorischer Proben mittels TaqMan-Real-Time-PCR	68
4.5	Auswertung klinischer Daten bezogen auf Alter, Diagnose und Viruslast	69
4.6	Infektparameter im Vergleich	71
4.7	Diagnosen betrachtet nach Standort, Klinik und Infektiologie.....	72
5.	Literatur	74

1. Einleitung

Eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität bei Kleinkindern unter fünf Jahren ist der respiratorische Infekt. Mit einer Frequenz von fünf bis sechs Infektionen pro Jahr entstehen bei Kindern in Deutschland jährlich geschätzte Kosten von 213 Millionen Euro. Bei hospitalisierten Kindern fallen aufgrund von Infekten der unteren Atemwege jährlich Kosten von 185 Millionen Euro an, davon werden 46% durch Erkrankungen mit dem respiratorischen Syncytialvirus (RSV) verursacht (Ehlken et al., 2005). Insgesamt traten 2005 weltweit geschätzte 33,8 Millionen durch das RSV ausgelöste Atemwegsinfekte bei Kindern unter fünf Jahren auf, von denen 3,4 Millionen schwere krankenhausbedürftige Erkrankungen entwickelten. Bis zu 200000 Kinder, davon 99% aus Entwicklungsländern, verstarben an den Krankheitsfolgen (Nair et al., 2010). Die weltweite Verteilung der respiratorischen Viren ist von mehreren Faktoren abhängig, so zum Beispiel der Saison, dem Land und der untersuchten Kohorte (stationär oder ambulant). In einer prospektiven Studie wurden Kinder einer Tagesstätte über einen Zeitraum von zwei Jahren begleitet. Beim Auftreten respiratorischer Infekte wurden Nasenabstriche auf 14 verschiedene Viren mittels einer Real-Time-PCR untersucht. Am häufigsten traten Infekte mit Rhinoviren (35%) auf (Abbildung 1). Rhinoviren, Adenoviren und RSV verursachten 67% der Monoinfektionen. Das humane Metapneumovirus wurde hier mit einem Anteil von lediglich 4% als nicht signifikantes Pathogen gewertet (Fairchok et al. 2010). Hingegen wurden bei 254 hospitalisierten Kindern mit respiratorischem Infekt in 164 Proben Viren als Krankheitsauslöser nachgewiesen und RSV mit 54% als häufigster viraler Erreger erkannt. Das Rhinovirus trat an dritter Stelle mit 8% gefolgt vom humanen Metapneumovirus mit 4% auf (Abbildung 2)(Bonzel et al., 2008). Der Altersdurchschnitt bei den hospitalisierten Kindern lag mit 194 Tagen unter dem Altersdurchschnitt in der zweiten Studie, der bei 10 Monaten lag, Die Studie von Fairchok fand jedoch an Kindern aus der Kindertagesstätte statt, das heißt alle Kinder mit respiratorischem Infekt, also auch jede Rhinitis wurden einbezogen. Die Kinder in der Studie um Bonzel wiesen alle einen schweren Krankheitsverlauf auf mit der Indikation zur Hospitalisierung. Wie bereits eingangs erwähnt, verursacht RSV häufig schwere Atemwegsinfekte bei Kindern. Bei klinisch ähnlichem Symptomenspektrum ist eine Virusdifferenzierung oft nur durch molekulare Techniken möglich. Insbesondere im Vergleich des humanen Rhino- und Metapneumovirus zeigt sich oft eine gleiche Krankheitsausprägung

mit der Entwicklung von schweren Krankheitsbildern wie Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie (Manoha et al., 2007).

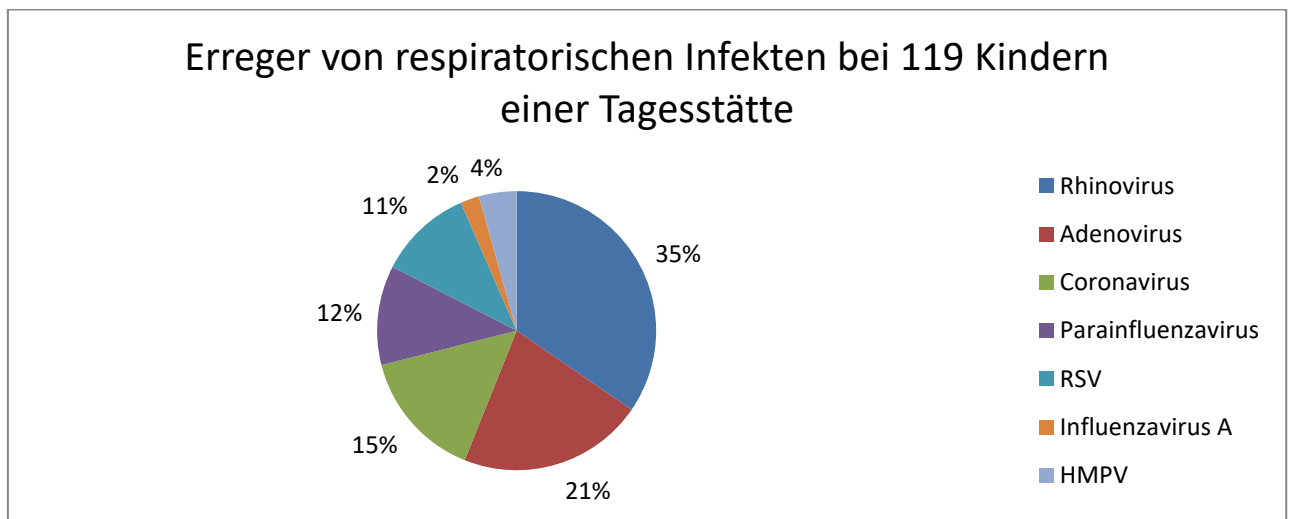


Abbildung 1: Die Abbildung zeigt die prozentuale Verteilung der Virusnachweise aus einer prospektive Kohortenstudie (Februar 2006 - April 2008), adaptiert aus (Fairchok et al., 2010) Begleitet wurden 119 Kinder einer Tagesstätte bei denen beim Auftreten respiratorischer Infekte Abstriche entnommen wurden. Das Diagramm zeigt die Verteilung der nachgewiesenen Monoinfektionen (RSV-respiratorische Syncytialvirus, HMPV- humanes Metapneumovirus).

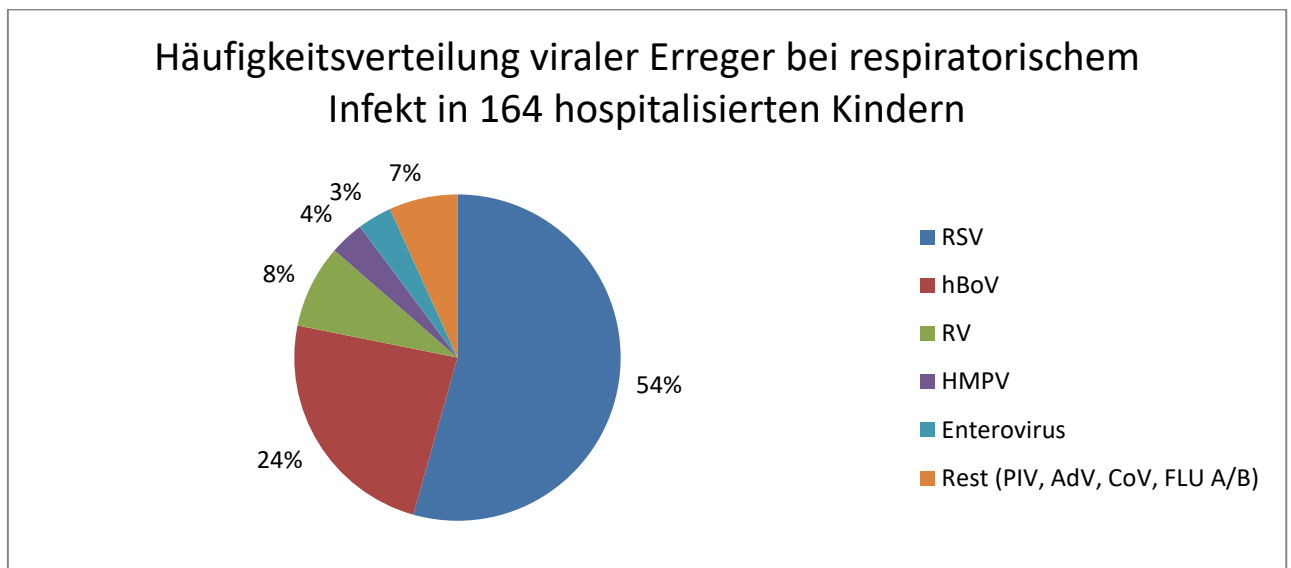


Abbildung 2: Prozentuale Verteilung der Virusnachweise in einer Studie an 254 hospitalisierten Kindern mit respiratorischem Infekt zur Etablierung einer 1-step-RT-PCR zum Nachweis von respiratorischen Viren, adaptiert aus (Bonzel et al., 2008) Das Diagramm zeigt die Verteilung der nachgewiesenen Monoinfektionen (RSV-respiratorische Syncytialvirus, hBoV- humanes Bocaparvovirusvirus, RV- Rhinovirus, HMPV- humanes Metapneumovirus, PIV- Parainfluenzavirus, AdV- Adenovirus, CoV- Coronavirus, FLU A/B- Influenzavirus A/B).

1.1 Das respiratorische Syncytialvirus

1.1.1 Entdeckung und Pathogenese

Das respiratorische Syncytialvirus (RSV) gehört zur Familie der Paramyxoviridae und zusammen mit dem humanen Metapneumovirus zur Unterfamilie der Pneumovirinae. Es wird in die Subtypen A und B unterteilt, da diese in dem G-Protein, ein zur Zelladsorption befähigtes Membranprotein, Sequenzunterschiede aufweisen. Wie bei allen Paramyxoviren besteht das Genom aus negativ orientierter einzelsträngiger Ribonukleinsäure. Die erste RSV-Isolierung erfolgte 1956 aus Schimpansen mit Schnupfen, welche ähnliche Symptome bei den Tierpflegern verursachten (Modrow et al., 2010). Im darauffolgenden Jahr isolierten Robert M. Chanock und Mitarbeiter ein identisches Virus aus Kindern mit schwerem Infekt des unteren Respirationstrakts (Chanock et al., 1962). Die Erkrankung des Respirationstrakts und die *in vitro* erzeugte Syncytienbildung bestimmten die Namensgebung. Durch Tröpfcheninfektion oder direkten Kontakt mit kontaminierten Gegenständen wird das hochkontagiöse Virus übertragen. Es vermehrt sich in den Zellen des Schleimhautepithels und kann sich innerhalb von ein bis zwei Tagen von Zelle zu Zelle bis in die unteren Luftwege ausbreiten. Ebenfalls zeigen Tierversuche, dass es durch Aspirationen infizierter Sekrete bis in die Alveolen transportiert wird (Modrow et al., 2010). Typ I Pneumozyten, das Bronchial- und Alveolarepithel sowie alveoläre Makrophagen können dabei ebenfalls infiziert werden. Aus der Infektion resultieren ein Zellödem, vermehrte Schleimsekretion und die Zerstörung des Epithels unter Syncytienbildung sowie Epithelverschorfungen, die zum Verschießen der Alveolen führen und somit den CO₂/O₂-Austausch beeinflussen. Gleichzeitig kann es zu einer Beeinträchtigung der ziliaren Funktion kommen. Zahlreiche Infiltrate von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen werden in den Bronchien, Bronchiolen und Alveolen gefunden. Diese Zellen als auch die Epithelzellen sezernieren die folgenden Chemokine und Cytokine: IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , Rantes, IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IFN- α , IFN- β (Watkiss, 2012) (Modrow et al., 2010).

1.1.2 Einfluss auf die Abwehr

Das Genom des RSV kodiert unter anderem für die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2. Diese induzieren in der infizierten Zelle einen Proteasom-vermittelten Abbau von Stat-2, einem Signalprotein der Interferon-Signalkaskade (Elliott et al., 2007). NS2 inhibiert ebenfalls die Interferon-Transkription, indem es an RIG-I bindet, einem cytoplasmatischen RNA-Detektor mit einer RNA-Helikase Aktivität, welcher bei der Einleitung der Transkription mitwirkt (Ling,

Tran, and Teng, 2009). Beide Proteine unterdrücken die Reifung von dendritischen Zellen, wobei hier ebenfalls ein Zusammenhang zur inhibierten Interferon-Produktion gesehen wird. So verhält es sich auch mit der Chemokin- und Cytokinproduktion. Bei RSV-infizierten dendritischen Zellen können erhöhte Werte für IL-8/CXCL8, RANTES/CCL5, IP-10/CXCL10, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 und für MCP-1/CCL2 gemessen werden. Die Cytokine IL-12/23, p40, IL-10, TGF- α , G-CSF, GM-CSF, IL-4 und IL-7 sind entweder gar nicht oder nur mäßig erhöht. In Experimenten, in denen vor allem NS1 aber auch NS2 unterdrückt wurden, ist ein relevanter Anstieg der Cytokine als auch der Chemokine zu verzeichnen, besonders des TNF- α und RANTES, wobei auch hier eine Beziehung zur Interferonsuppression ursächlich zu sein scheint (Munir et al., 2008). Diese beeinflusste Abwehrreaktion könnte mitunter ein Grund für die hohe Rate an Reinfektionen sein. Einen zugelassenen Impfstoff gibt es zum jetzigen Zeitpunkt nicht, wobei zahlreiche Impfstoffe aktuell in Erprobung stehen (Simoès et al., 2018).

1.1.3 Klinik

Nach einer Inkubationszeit von drei bis fünf Tagen äußern sich die Symptome einer Infektion des oberen Respirationstrakts. Schnupfen begleitet von Husten und kurz andauerndem, mäßigem Fieber persistieren einige Wochen oder gehen in 30-50% in eine Entzündung des unteren Respirationstrakts über. Eine Pharyngitis tritt gehäuft auf. Respiratorische Symptome mit Nasenflügeln, Giemen, Tachypnoe und verlängerter Expiration können eine Folge sein. Rasselgeräusche können gegebenenfalls auskultiert und pulmonale Infiltrate radiologisch sichtbar werden. Kleinkinder können durch Lethargie und Nahrungsverweigerung imponieren (Black, 2003). Ein Befall der Bronchien verursacht eine Bronchitis. Bis zu 40% der Säuglinge entwickeln eine Bronchiolitis mit Zyanose und Pneumonie. Mittelohrentzündungen treten intensiviert durch bakterielle Superinfektion als Komplikation auf (Modrow et al., 2010). Bis zum zweiten Lebensjahr sind nahezu alle Kinder mit dem RSV infiziert, wobei das Risiko für schwere Verläufe und Hospitalisierung mit steigendem Alter abnimmt. Für einen schweren Verlauf wurden mehrere Risikofaktoren erfasst, die im Folgenden aufgeführt werden: Frühgeborene mit und ohne pulmonaler Vorerkrankung sowie Kinder mit kongenitalem Herzfehler (Simoès et al., 2018). Weitere Studien weisen ebenfalls auf einen schweren Krankheitsverlauf bei Kindern mit Down-Syndrom, Zystischer Fibrose, Krebs, kongenitalen Malformationen sowie chronischen Erkrankungen und Immunsupprimierten hin (Murray et al., 2014) (Manzoni et al., 2017) (Chemaly et al., 2014).

1.2 Das humane Rhinovirus

1.2.1 Entdeckung und Pathogenese

Das Rhinovirus gehört zur Familie der Picornaviren, die ein plusstrangorientiertes, einzelsträngiges RNA-Genom besitzen. Es wird in die Spezies A und B unterteilt, wobei eine dritte Spezies das humane Rhinovirus C erst im vorletzten Jahrzehnt entdeckt wurde (Lau et al., 2007) (Lamson et al., 2006) (Renwick et al., 2007). Der Unterschied ist durch die Aminosäuresequenzen in den Capsidproteinen bedingt. Insgesamt sind bisher mehr als 100 Serotypen nachgewiesen worden (Hamparian et al., 1987) (Conant and Hamparian, 1968). Die erstmalige Beschreibung erfolgte 1956 im Rahmen einer Isolation dieses neuen Virus aus Zellkulturen (Pelon et al., 1957). Der Anteil an respiratorischen Infekten beläuft sich auf schätzungsweise 40%. Die Übertragung erfolgt meist als Kontaktinfektion oder auch als Tröpfcheninfektion. Das Rhinovirus gelangt durch Bindung zum einen über das ICAM-1-Molekül als zellulären Rezeptor und den LDL-Rezeptor in die Epithelzellen der Nasenschleimhaut. Nach acht bis zehn Stunden hat die Virusreplikation stattgefunden und die Viren werden durch Zelllyse freigesetzt. Das Rhinovirus bewirkt ebenfalls eine Zellschädigung im Bereich des Flimmerepithels. Lokal kommt es zu einer Hyperämie mit Ödemen sowie einem vermehrten schleimhaltigen Sekret. Dieses enthält zahlreiche Chemokine wie IL-8, RANTES, MCP-1 und die Cytokine IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-11. Das IL-8 induziert die Einwanderung von dendritischen Zellen, Monozyten und Granulozyten ins infizierte Gewebe. Das Rhinovirus ist wie auch das RSV befähigt, die Produktion von IFN- β zu hemmen, wobei es an einer anderen Stelle der Produktion ansetzt. Es hemmt nach dem Transport des phosphorylierten *interferon regulatory factor* (IRF-3) in den Zellkern die Ausbildung eines funktionellen Dimers, welches die Expression des Interferon- β induziert (Modrow et al., 2010).

1.2.2 Klinik

Nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Tagen treten Niesen, Schnupfen, Halskratzen sowie eine verstopfte Nase auf. Das Nasensekret wechselt von klar, dünnflüssig zu gelblich und dickflüssig. Bei einer Symptombdauer von über einer Woche ist eine bakterielle Superinfektion wahrscheinlich. Eine Otitis media als auch eine Sinusitis können resultieren (Modrow et al., 2010). Eine Beteiligung der unteren Atemwege mit Manifestation als Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie kann ebenfalls auftreten. Die initiale Vermutung über eine gehäufte Korrelation zwischen dem Subtyp C und schweren unteren Atemwegserkrankungen im Vergleich zu den anderen Subtypen, wurde durch weitere Studien

wiederlegt (Hasegawa et al., 2019). Als zweithäufigstes virales Pathogen bei Pneumonien und Bronchiolitiden wurden Rhinoviren nachgewiesen (Renwick et al., 2007) (Miller et al., 2009) (Hamparian et al., 1987). Eine Exazerbation eines Asthma bronchiale wurde ebenfalls mehrfach beschrieben (Gern, 2002) (Hayden, 2004) (Lemanske et al., 2005).

1.3 Das humane Metapneumovirus

1.3.1 Entdeckung und Pathogenese

Bernadette van den Hoogen und Mitarbeiter isolierten 2001 ein bis dahin unbekanntes Virus aus Nasopharynxaspiraten von Kindern mit respiratorischem Infekt. Aufgrund von Übereinstimmungen in Sequenzanalysen wurde es der Familie der Paramyxoviren der Unterfamilie der Pneumoviren zugeordnet. Die Proben entstammten einer zwanzigjährigen Sammlung von NPAs von unter fünfjährigen Patienten mit Atemwegsinfekten mit einem bis dahin nicht bekannten Virus. Alle Proben wurden in den Wintermonaten gesammelt. Mittels neu etablierter PCR gelang die Genomentschlüsselung und die Taxonomie, wobei auch eine Verwandtschaft zum aviären Metapneumovirus nachgewiesen wurde. Hieraufhin folgten Untersuchungen an 72 Seren von Patienten im Alter von 8-99 Jahren (Seren entstammen dem Jahr 1958) zur Klärung der Seroprävalenz, welche auf eine Existenz des RNA-haltigen Virus bereits seit 1958 hinwies bei einer Durchseuchung von 100% (Van den Hoogen et al., 2001). Eine dauerhafte Immunität verbleibt jedoch nicht, da Reinfektionen bei Erwachsenen mit milden Verläufen im jungen Erwachsenenalter häufig sind und eine Zunahme der Krankheitsschwere im Alter (Shafagati and Williams, 2018) beschrieben ist. In weiteren Studien wurde eine Seroprävalenz von über 80% bei über Fünfjährigen beschrieben (Dunn et al., 2013) und eine Seroprävalenz von 100% bei Achtjährigen (Wolf et al., 2003), beziehungsweise nach neuere Daten auch bereits die nahezu 100-prozentige Durchseuchung bei Fünfjährigen (Shafagati and Williams, 2018). Das humane Metapneumovirus wird in die Subtypen A und B unterteilt und weiterhin in die Untergruppen A1 und A2 sowie B1 und B2. Das Genom vom hMPV kodiert jedoch im Vergleich zum RSV nicht für die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 (Van den Hoogen et al., 2001). Die Übertragung erfolgt über Tröpfcheninfektion mit einer Inkubationszeit von bis zu sechs Tagen. Bei der in-vitro Anzucht in Nierenzellkulturen aus Rhesusaffen wurde ebenfalls ein cythopatischer Effekt gesehen, der sich morphologisch nicht vom respiratorischen Syncytialvirus unterschied (Schildgen et al., 2011). Dieser Effekt trat aber erst nach einer Zeit von bis zu zwei Wochen auf

und war oft nur schwer erkennbar (Van den Hoogen et al., 2001). Histopathologische Untersuchungen in Makaken zeigten wie auch beim respiratorischen Syncytialvirus eine Störung der Epithelzellstruktur, Verschorfungen der Epithelzellen, Beeinträchtigung der Ziliarfunktion und inflammatorische Infiltrate der Lunge (Schildgen et al., 2011). In einer prospektiven Studie und weiteren Untersuchungen wurden die Konzentrationen von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α gemessen, wobei hMPV infizierte Kinder insgesamt erhöhte jedoch signifikant niedrigere Werte als RSV infizierte Kinder aufwiesen (Schildgen et al., 2011) (Laham et al., 2004).

1.3.2 Einfluss auf die Abwehr

Da die Entdeckung des hMPV erst vor ca. 20 Jahren erfolgte, ist dessen Einfluss auf die Immunabwehr im Vergleich zum RSV noch nicht so weit erforscht. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass das Virus eine ds-RNA induzierte Interferon-Expression inhibiert. Weiterhin weist der Subtyp B Phosphoproteine auf, die als Interferonantagonisten fungieren. Beim Subtyp A fehlt diese Funktion. Zellinfektionen mit mutiertem hMPV (fehlendes G-Protein) ergaben eine vermehrte Produktion von Chemokinen und Typ-I Interferon (Schildgen et al. 2011) (Bao et al., 2008). So weisen diese Erkenntnisse bereits Unterschiede zum RSV auf. Eine durch hMPV und RSV ausgelöste Infektion bedingt eine veränderte T-Zell-Antwort, diese führt zu einer Exazerbation der Infektion sowie zu einer verminderten Produktion von B- und T-Gedächtniszellen. Aufgrund der fehlenden Langzeitimmunität erklärt sich unter anderem die häufige Rate an Reinfektionen und der bisher noch nicht entwickelte Impfstoff (Gonzalez et al., 2017).

1.3.3 Klinik

Die Infektion beginnt im oberen Respirationstrakt mit Husten, Rhinorrhoe und Fieber. Konjunktivitis, Erbrechen und Durchfälle wurden ebenfalls beobachtet. Die Symptome klingen häufig innerhalb einer Woche ab. Ein Übergang auf den unteren Respirationstrakt ist ebenfalls möglich und imponiert klinisch als Bronchiolitis, Pneumonie und Krupp. Eine Infektion kann zusätzlich die Exazerbation eines Asthmas induzieren (Schildgen et al. 2011).

1.4 Allgemeine Labordiagnostik

1.4.1 Immunglobuline

Die Immunglobuline sind Y-förmige, aus Glykoproteinen bestehende Antikörper, die von Plasmazellen sezerniert werden. Sie bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die zusammen den Fc- und Fab-Teil bilden. Der Fab-Teil hat eine variable Domäne, die unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen kann und somit theoretisch fähig ist, sich an alle möglichen Antigenstrukturen anzupassen. Zur Antikörperproduktion ist ein Antigenkontakt notwendig, somit ist auch verständlich, dass Säuglinge erst einen immunkompetenten Antikörperstatus produzieren müssen. Der Schutz für die ersten Lebensmonate wird durch die mütterlichen Antikörper (Gonzalez et al., 2017) vermittelt, die während der Schwangerschaft ins kindliche Blut übertreten. Weiterhin werden auch IgAs über das Kolostrum auf das Kind übertragen (Modrow et al., 2010). Die Ergebnisse einer Antikörperuntersuchung von RSV-infizierten Kindern unterteilt nach Alter zeigten eine schwächere Immunantwort bei den über sechs Monate alten Kindern, was der vorherigen Aussage entspricht (Murphy et al., 1986). In einer Studie zur Seropositivität bei hMPV infizierten Kindern wurden die spezifischen Immunglobulin-Konzentrationen in verschiedenen Altersklassen gemessen. In der Altersklasse der sechs bis zwölf Monate alten Kinder sind sie in 25% nachweisbar. Bei den Ein- bis Zweijährigen sind sie in 31% und bei den Zwei- bis Fünfjährigen in 38% der Fälle positiv. Bei den über fünfjährigen Kindern liegt bis zu 100% eine Seropositivität vor (Van den Hoogen et al., 2001). Eine Studie über IgA und IgG bei 22 mit RSV-infizierten Kindern, zeigte einen Anstieg des IgA Titers nach drei bis vier Tagen, wobei innerhalb der ersten zwei Tage kein Nachweis gelang. Das IgG konnte in niedriger Konzentration oft bereits in der ersten Probe nachgewiesen werden und war in allen Proben zwischen dem fünften und sechsten Tag in bis zu vierfacher Menge nachweisbar (McIntosh, McQuillin, and Gardner, 1979).

1.4.2 Interleukin-8/ CXCL 8

Das IL-8 gehört zur Familie der Chemokine, einer Gruppe sich strukturell sehr ähnelnder Proteine. Der Name steht für chemotaktische Cytokine. Diese werden in die Untergruppen CC-, CXC-, XC- und CX3C-Chemokin unterteilt, beruhend auf der Anzahl und Anordnung konservierter Cysteinreste in ihrer Sequenz. Bei den CC-Chemokinen befinden sich zwei Cysteinreste am aminoterminalen Ende nebeneinander. Bei den CXC-Chemokinen sind die Cysteinreste durch eine, bei den CX3C-Chemokinen durch drei andere Aminosäuren getrennt.

Der Zusatzbuchstabe „L“ steht für Ligand, da sie an den Rezeptor binden. IL-8 wird unter anderem von aktivierten Monozyten, Granulozyten und Endothelzellen gebildet (Modrow et al., 2010). Im Vergleich der IL-8-Konzentrationen zwischen RSV und hMPV positiven Proben gibt es unterschiedliche Forschungsergebnisse. So wurden in einer finnischen Studie höhere Konzentrationen im hMPV-Kollektiv gemessen. In einer weiteren prospektiven Studie ergab der Vergleich höhere IL-8-Spiegel bei den mit RSV infizierten Kindern (Schildgen et al., 2011). Ein Vergleich der Cytokinantwort zwischen RSV- und Rhinovirusinfizierten Kindern, bei dem unter anderem auch IL-8 gemessen wurde, ergab tendenziell höhere Werte beim RSV-Kollektiv (Garcija et al., 2012).

1.4.3 Das eosinophile kationische Protein

Das eosinophile kationische Protein, das wegen seiner Homologie zur Ribonuklease und RNase auch den Namen Ribonuklease 3 (RNase 3) trägt, wird in Granula von eosinophilen Granulozyten gespeichert und unter Stimulation von Immunglobulin E und G, Rantes/CCL, MIP-1 α /CCL3 und der Komplementfaktoren C5, C3a freigesetzt. Es wirkt zum einen zytotoxisch auf Parasiten, Tumorzellen, respiratorische Zellen aber auch neurotoxisch sowie antibakteriell/-viral. Seine nichttoxischen Effekte sind zum einen die Inhibition der T-Zellproliferation, Stimulation der Schleimsekretion in den Atemwegen, Freisetzung von Histamin in basophilen Granulozyten, niedrigdosiert die Verkürzung der Koagulationszeit, hochdosiert deren Verlängerung, Heparinantagonismus sowie die Hochregulation von ICAM-1 in Epithelzellen. Erhöhte Konzentrationen werden bei allergischer Rhinitis, chronischer Sinusitis und Polypen gemessen (Venge et al., 1999). In einer Studie über die ECP-Konzentration in Nasopharynxaspiraten von RSV infizierten Kinder und dem Symptom Giemen wurden im Verhältnis zu einer Kontrollgruppe bei fast allen Patientenkonzentrationen über 200 ng/ml gemessen, wobei zwei Drittel der Proben sogar einen Wert über 400 ng/ml aufwiesen. In der Kontrollgruppe lagen die Konzentrationen bei 85% unter 100 ng/ml. Zum einen gelang eine positive Korrelation der ECP-Konzentrationen mit dem Alter, im Sinne von je älter desto höher (Ingram et al, 1995), sowie mit den auftretenden Symptomen, das heißt höhere ECP-Spiegel in RSV infizierten Kindern mit dem Symptom Giemen. Ein Vergleich des Medians der ECP-Konzentrationen bei Pneumonie- und Bronchiolitis, induziert durch RSV, Parainfluenza und andere respiratorische Viren, ergab in einer weiteren Studie annähernd gleiche Werte. Jedoch wurde kaum ein Unterschied im Median zwischen RSV-positiven und RSV-negativen Proben gesehen (Zelaya, Orvell, and Strannegard, 1994).

1.5 Herpesviren

Die humanen Herpesviren bestehen aus einer Gruppe von bisher acht bekannten Viren, die in ihrem Zellkern eine doppelsträngige DNA enthalten. Diese werden anhand ihrer Pathogenität, der Replikation und den Zelltypen, die sie infizieren, den Unterfamilien α -, β - und γ -Herpesviren zugeordnet. Trotz zahlreicher Symptomunterschiede gleichen sich alle Vertreter in der Partikelmorphologie und den molekularbiologischen Eigenschaften. Nach erfolgter Erstinfektion besitzen alle die Fähigkeit, lebenslang latent im Organismus zu verbleiben. Die Produktion von Partikeln ist in diesem Stadium oft unterbrochen, sodass es zu keinem Zelluntergang kommt, der gewöhnlich bei klinisch manifester Herpesvirusreplikation eintritt. Mit ähnlichen Symptomen wie bei der Primärinfektion kann das Virus aus der Latenzphase wieder reaktiviert werden. Eine weitere Gemeinsamkeit der Herpesviren ist die Fähigkeit, der Immunkontrolle des Wirtes zu entgehen (Modrow et al., 2010). Der Nachweis der Viren ist mittels PCR oder Antikörpernachweis möglich. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit thematisierten Herpesviren vorgestellt.

1.5.1 Das humane Cytomegalievirus

Das Cytomegalievirus kann zu ernstesten Erkrankungen vor allem bei prä- oder perinatal infizierten Feten und immunsupprimierten Personen führen. In Deutschland sind 40-90% der Bevölkerung mit dem Virus infiziert. Eine Übertragung kann durch infizierte Zellen im Speichel, durch Muttermilch, Kontakt mit CMV-haltigem Blut oder Urin sowie transplazentar erfolgen. Eine Übertragung über Organtransplantate und Bluttransfusionen ist ebenfalls möglich. Nach einer Inkubationszeit von vier bis acht Wochen verläuft die Primärinfektion meist asymptomatisch. Seltener treten Fieber, Lymphknotenschwellung, Gastritis oder grippeähnliche Erscheinungen auf. Thrombo- und Leukopenien wurden ebenfalls dokumentiert. Eine transplazentare Infektion des Feten durch eine während der Schwangerschaft primär infizierte Mutter, kann zu Spätschäden wie einer geistigen Retardierung, Hirnsklerose, Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenie, Sehstörungen und Taubheit führen. Es ist das häufigste Virus, welches Embryo- und Fetopathien verursacht. Immunsupprimierte können unter Colitiden, Hepatitiden, gastrointestinalen Ulcerationen und Chorioretinitiden leiden. Die interstitielle CMV-Pneumonie ist die häufigste Todesursache bei AIDS- und Organtransplantierten Patienten. Durch eine hämatogene Verbreitung persistiert das Virus in zahlreichen Organen sowie in Zellen des Gefäßendothels und in Granulozyten. Das CMV greift in verschiedene Bereiche der Immunantwort des Wirtes ein. Zum einen entzieht es den MHC-I-Klasse-Antigenen den Interaktionspartner β_2 -Mikroglobulin, indem es ein ihm

sehr ähnliches Protein produziert, wodurch die Zahl der MHC-Komplexe sinkt. UL18 Proteine an der Zelloberfläche verhindern einen Angriff durch natürliche Killerzellen und Chemokinrezeptor ähnliche Produkte binden die Chemokine RANTES und MCP-1 und führen zu deren Eliminierung. Weiterhin fördern die Proteine US2 und US11 den Transport und den Abbau von MHC-Klasse-I-Antigenen in Proteasomen sowie die Beladung dieser, wofür das US6 Protein zuständig ist (Modrow et al., 2010). Koinfektionen mit CMV und deren Auswirkung auf respiratorische Infekte sind bisher wenig untersucht worden. In einer Studie mit 3955 untersuchten Nasopharynxaspiraten hospitalisierter Kinder wurden 174 CMV-Infektionen nachgewiesen. Koinfektion lagen in 33 Fällen vor, wovon 22 mit RSV koinfiziert waren. Die stationäre Liegedauer betrug bei CMV-Monoinfizierten 2,49 Tage und bei Koinfizierten 3,94 Tage (Fuller et al., 2005).

1.5.2 Das Epstein-Barr-Virus

1964 wurden von Anthony Epstein, Budd Achong, Yvonne Barr und Robert Pulvertaft Herpersvirus-ähnliche Partikel in B-Zelllinien eines monoklonalen Burkitt-Lymphoms gefunden (Epstein, 1964). Diese wurden in den folgenden Jahren als neue Virusgattung anerkannt und nach seinen Entdeckern benannt. 1958 beschrieb Dennis Burkitt erstmalig das Burkitt-Lymphom was in Ost- und Zentralafrika als häufigste Tumorursache mit einer Inzidenz von 1/10000 bei Kindern und Jugendlichen auftrat. 1968 wurden Antikörper gegen das Epstein-Barr-Virus (EBV) aus Blut von Personen mit zuvor durchgemachter infektiöser Mononukleose entdeckt. Schätzungsweise sind 95% der weltweiten Bevölkerung mit EBV infiziert, wobei das Virus lebenslang in B-Lymphozyten persistiert. Es wird lebenslang über den Speichel ausgeschieden. Eine Primärinfektion erfolgt meist im Jugend- und Erwachsenenalter, wobei in Entwicklungsländern durch geringere Hygiene meist eine hohe Durchseuchung im frühen Kindesalter vorliegt. Weiterhin ist das Virus mit dem Hodgkin-Lymphom und dem Nasopharynxkarzinom assoziiert. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis vier Wochen treten bei Jugendlichen häufig Fieber, Angina mit Halsschmerzen und geschwollene Halslymphknoten sowie nach 2-3 Wochen eine Milzschwellung als Zeichen einer Mononukleose auf, wobei der Verlauf bei Kleinkindern häufig asymptomatisch ist. Gelegentlich treten Hautausschläge, erhöhte Transaminasen, seltener Meningitiden auf. Eine chronisch-aktive Infektion äußert sich in dauerhafter Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Lymphknotenschwellung. Bei der Infektion bindet das Virus mit seinem Glykoproteinkomplex gp220/350 an das CD21-Protein der B-Lymphozyten, um von diesen aufgenommen zu werden. Es folgt eine ausgeprägte Immunantwort, die wahrscheinlich auch die Schwellung des

lymphatischen Gewebes bedingt. Die B-Lymphozyten, die in der Latenzphase das Virus beinhalten, exprimieren nur wenige MHC-Antigene auf ihrer Oberfläche und ihnen fehlt der Faktor B7, der bei der Aktivierung des zellulären Immunsystems mit stimulierend wirkt. Diese Zellen sind daher nicht an der Immunantwort beteiligt und dienen als Erreger-Reservoir. Weitere EBV-infizierte Zellen sind die Epithelzellen des Oro- und Nasopharynx. Während einer frischen oder reaktivierten Infektion ist das Virusgenom aus Blut oder B-Lymphozyten durch eine PCR nachweisbar (Modrow et al., 2010).

1.5.3 Das Herpes-simplex-Virus Typ 1

Das Virus, das in die Typen 1 und 2 unterteilt wird, hat sich seit dem Altertum, in dem es bereits als Herpes bezeichnet wurde, an den Menschen adaptiert. Die Durchseuchung mit dem Typ I beträgt unter den Erwachsenen weltweit mehr als 90% und beginnt bereits im Kindesalter durch Kontakt mit virushaltigem Bläscheninhalt oder Sekret aus der Mundhöhle. Es besiedelt auf retrogradem Weg das Trigeminalganglion und manifestiert sich bei Reaktivierung oft im Bereich der Primärinfektion, das heißt es kommt zum Auftreten von Hautbläschen meist im Mund-Gesichtsbereich. Der Bläscheninhalt enthält eine hohe Konzentration von Virionen, sodass eine Übertragung stattfinden kann. Diese kann aber ebenfalls bei asymptomatischen Trägern (50%) erfolgen, da sie geringe Mengen an Virus über den Speichel ausscheiden. Die Primärinfektion verläuft nach einer Inkubationszeit von sechs bis acht Tagen meist asymptomatisch oder als Gingivostomatitis aphtosa, einhergehend mit schmerzhaften Schleimhautentzündungen im Mund- und Rachenbereich. Fieber und Lymphknotenschwellung sind möglich, selten treten Meningitiden und Enzephalitiden auf. Eine Reinfektion wird durch diverse Ursachen wie zum Beispiel Stress, Fieber und UV-Strahlen ausgelöst. Immunsuppressionen können eine Herpesviren- assoziierte Pneumonie auslösen. Ein positiver Virusnachweis ist durch PCR aus verschiedenen Materialien (zum Beispiel Vollblut, Serum, Bläschensekret, Speichel) möglich. Eine Primärinfektion kann mittels quantitativer PCR von einer Reinfektion differenziert werden (Modrow et al., 2010).

1.5.4 Das humane Herpesvirus Typ 6

Das humane Herpesvirus Typ 6 (HHV-6) wurde 1986 als B-lymphotropes Virus aus Patienten isoliert, die unter lymphoproliferativen Erkrankungen litten. Es infiziert hauptsächlich CD4⁺-T-Lymphozyten. Das HHV-6 wird aufgrund von Unterschieden in der Genomsequenz in die Subtypen A und B unterteilt, wobei die größte Variabilität in den frühen Genprodukten und der Genomregion für das Oberflächenprotein gQ liegt. Der Subtyp B ist Verursacher des

Exanthema subitum, des Dreitagefiebers. Subtyp A wurde bisher noch keiner Erkrankung zugeschrieben, beziehungsweise erscheint zum jetzigen Zeitpunkt asymptomatisch (Agut, Bonnafous, and Gautheret-Dejean, 2016). Die Primärinfektion findet häufig asymptomatisch im Alter von unter zwei Jahren statt (Modrow et al., 2010). Die Übertragung erfolgt über Tröpfcheninfektion. Nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Wochen tritt beim Primärinfekt hohes Fieber mit plötzlichem Abfall nach drei Tagen auf sowie ein milder Hautausschlag, vornehmlich im Gesicht-, Nacken- und Rumpfbereich. Als Komplikationen treten gastrointestinale und respiratorische Symptome und in bis zu zehn Prozent der Fälle Krampfanfälle auf. Seltener führen die Infektionen zur Meningoenzephalitis. Hepatitiden bis hin zum Leberversagen treten nur vereinzelt auf. Bei Erwachsenen wurden ähnliche Symptome wie bei einer Mononukleose beschrieben (De Bolle, Naesens, and De Clercq, 2005). Der weitere Unterschied zwischen den Subtypen ist der Zugang in die Wirtszelle. Der HHV-6 Subtyp A gelangt über Bindung an das CD46-Protein, welches auf allen Zellen mit Zellkern exprimiert wird, in die Zelle. Hieraufhin folgt im Gegensatz zum Subtyp B eine Syncytienbildung der infizierten Zellen in Anwesenheit von Glycoprotein H und B. Die Replikation erfolgt hauptsächlich in CD4⁺-T-Lymphozyten, aber auch in den Zellen der Speicheldrüsen, wo sie durchgehend geringe Virusmengen produzieren (Modrow et al., 2010) (Mori et al., 2002). HHV-6 Subtyp B hingegen benutzt als Rezeptor im Komplex mit gQ1 und gQ2 CD134 für den Zelleintritt (Tang et al., 2013).

1.6 Spezielle Labordiagnostik der respiratorischen Viren

1.6.1 Virusnachweis mittels Zellkultur

Traditionell: Klassische Zellkultur und Virusisolierung

Das virushaltige Material wird auf susceptible Zelllinien verimpft und löst durch die Zellschädigung einen lichtmikroskopisch sichtbaren cytopathischen Effekt aus. Der Virusnachweis kann dann durch Immunfluoreszenz bestätigt werden. Die Zellkultur war früher der Goldstandard in der Diagnostik und ist heute weitestgehend durch molekulare Techniken abgelöst.

Kurzversion: *Shell-vial-culture*

Auch hier wird virushaltiges Material auf susceptible Zelllinien verimpft, die sich jedoch in 24-Well Platten oder Mikrotiterplatten befinden. Die Zellen werden inkubiert und mit niedriger Umdrehungszahl anzentrifugiert. Durch eine veränderte Fluidität der

Zytoplasmamembran, wird die Zelle schneller infiziert und der cytopathische Effekt ist bereits nach ein bis zwei Tagen sichtbar.

- **Vorteile**

Traditionell: Möglichkeit der Züchtung und Vermehrung vieler Viren. Sichtbare Virusinfektion durch den cytopathischen Effekt.

Kurzversion: Ein Ergebnis ist bereits nach ein bis zwei, maximal drei Tagen vorhanden. Es besteht ebenfalls ein sichtbarer cytopathischer Effekt als Virusbeweis und die Sensitivität ist höher als bei der traditionellen Zellkultur (Mahony, 2008).

- **Nachteile**

Traditionell: Lange Inkubationszeiten von bis zu zwei Wochen. Hohe Sorgfalt ist bei der Materialgewinnung, dem Transport, der Beimpfung sowie der Inkubation notwendig, um eine hohe Sensitivität zu erreichen. Einige Viren lassen sich nicht oder nur sehr schwer anzüchten. Es besteht die Gefahr, Mehrfachinfektionen nicht nachzuweisen. Es ist keine Aussage über das Vorliegen einer akuten oder chronischen Infektion möglich. Niedrige Sensitivität bei RSV-Infektionen im Vergleich zur PCR mit nur 75% (Henrickson, 2004).

Kurzversion: Wie bei der traditionellen Zellkultur

1.6.2 Schnelltest zum Nachweis von Virusantigen

Der Schnelltest funktioniert nach dem Prinzip eines ELISA, wobei ein Antikörper auf einem Teststreifen fixiert ist und nur noch das Patientenmaterial, der zweite Antikörper und das Substrat hinzugefügt werden müssen. Kommt es zu einem Farbumschlag so ist der Test positiv.

- **Vorteile**

Das Ergebnis erhält man innerhalb von 15 bis 30 Minuten. Der Aufwand ist gering bei geringem Materialbedarf.

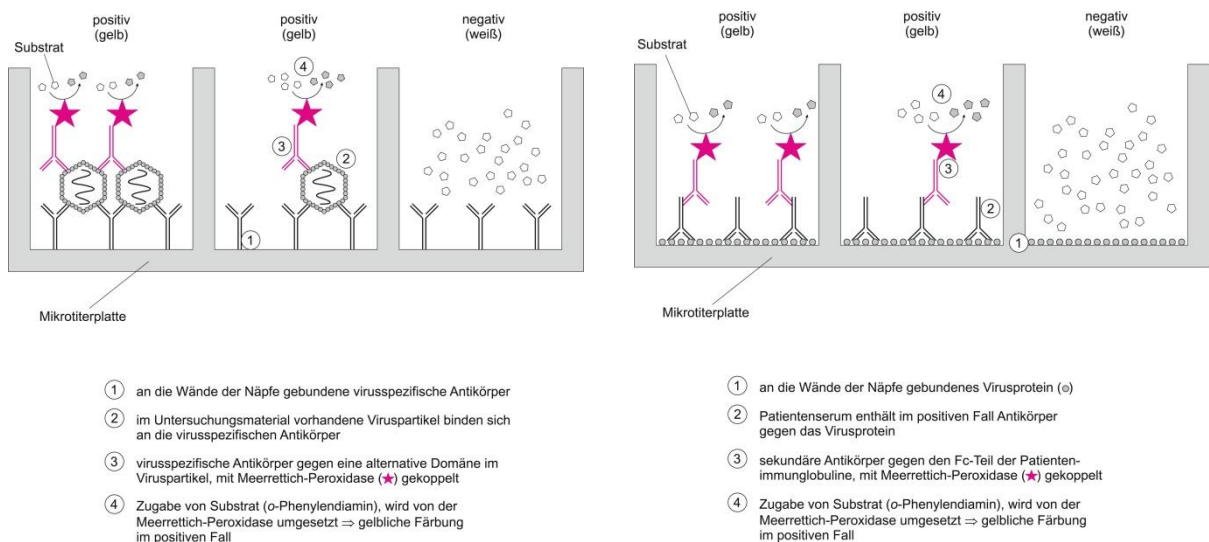
Die Durchführung ist unkompliziert.

- **Nachteile**

Die Sensitivität beim RSV-Schnelltest beträgt 61-86%. Die Sensitivität sinkt wie beim ELISA bei Erwachsenen, die geringere Viruslasten aufweisen, im Vergleich zu Kindern (Mahony, 2008). So ist sie auch bei immunsupprimierten Patienten wie zum Beispiel Patienten mit Zustand nach Transplantation geringer, da diese ebenfalls oft nur geringe Mengen an Antikörpern aufweisen.

1.6.3 Nachweis mittels peroxidasegekoppelter Antikörper

Beim *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) wird das Virusantigen direkt nachgewiesen. Hierzu werden Mikrotiterplatten mit einem virusspezifischen Antikörper beschichtet, der im nächsten Schritt Antigene aus dem hinzugefügten Patientenmaterial binden kann. Ein zweiter Antikörper bindet in einem weiteren Schritt an andere Epitope des Virusantigens. Die an ihn gekoppelte Meerrettichperoxidase setzt das anschließend verabreichte Substrat um und bewirkt dadurch einen gelben Farbumschlag. Die Extinktion wird über ein Photometer gemessen. Der indirekte Nachweis einer Infektion über die serologische Immunantwort funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip, wobei nicht das Virusantigen im Untersuchungsmaterial, sondern die Antikörper gegen das Virus nachgewiesen werden. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden erst mit Virusantigenen beschichtet, gegen das die gesuchten Antikörper gerichtet sind. Anschließend wird das Material, meist Serum mit den nachzuweisenden Antikörpern hinzugegeben, die an das Antigen binden können. Als nächstes wird ein Antikörper mit einer gekoppelten Peroxidase hinzugegeben, der an den Fc-Teil des ersten Antikörpers binden kann. Die weiteren Schritte sind dem direkten Antigennachweis gleich.



Aus: Modrow, Falke, Truyen, Schätzl: *Molekulare Virologie*, 3. Aufl. © Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010

Aus: Modrow, Falke, Truyen, Schätzl: *Molekulare Virologie*, 3. Aufl. © Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010

Abbildung 3: Links direktes und rechts indirektes Schaubild zum Virusnachweis mittels ELISA Beim direkten ELISA wird das Virusantigen mittels zweier Antikörper nachgewiesen. Der erste Antikörper wird auf der Mikrotiterplatte fixiert, gefolgt vom Antigen und dann vom zweiten Antikörper mit gekoppelter Meerrettichperoxidase für den folgenden Substratumsatz. Beim indirekten ELISA erfolgt der Nachweis des Antikörpers gegen das Virus mittels eines mit einem Substrat gekoppelten Antikörper.

- **Vorteile**

Günstige und schnelle Nachweismethode.

- **Nachteile**

Die Sensitivität des Antigennachweises sinkt zusammen mit der Viruslast, sodass sie bei Erwachsenen wegen einer niedrigeren Virusmenge geringer ist (Mahony,2008).

1.6.4 Nachweis mittels fluoreszenzmarkierten Antikörper

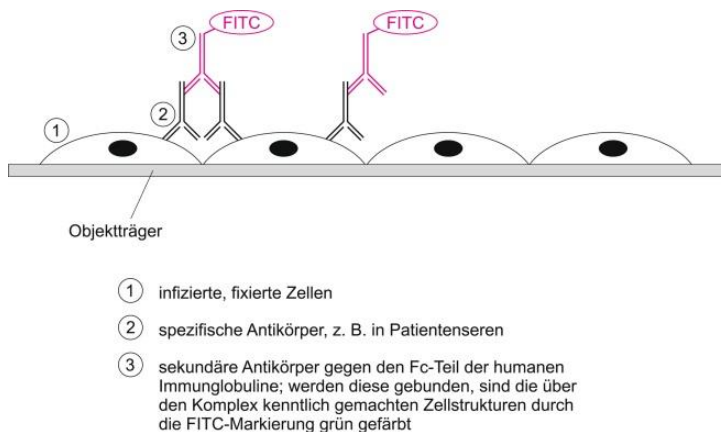
Beim Immunfluoreszenztest (IFT) wird ebenfalls direkt das Antigen (DIF) oder indirekt ein Antikörper (IIF) gegen das Antigen sichtbar gemacht. Hierfür wird bei der direkten Methode ein Objektträger, auf dem virusinfizierte Zellen fixiert sind, mit Patientenserum beschichtet, fixiert und ein anschließend applizierter fluoreszenzmarkierter zweiter Antikörper bindet das Antigen. Nach einem erfolgten Waschschrift verbleiben nur gebundene Antikörper. Diese können unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einem Anregungslicht um 480 nm nachgewiesen werden. Beim IIF wird erst der Objektträger mit einem Virusantigen beschichtet, dann das Material mit antigenbindenden Patientenantikörpern und zum Schluss ein zweiter Antikörper (fluoreszenzmarkierter AK) hinzugefügt.

- **Vorteile**

Schneller Virusnachweis und breite Anwendbarkeit.

- **Nachteile**

Nicht automatisierbar. Für die direkte Methode wird zellhaltiges Material benötigt. Spezifität geringer als bei der Virusisolierung in der Zellkultur.



Aus: Modrow, Falke, Truyen, Schätzl: *Molekulare Virologie*, 3. Aufl. © Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010

Abbildung 4: Prinzip eines Immunfluoreszenztest Beim direkten Immunfluoreszenztest erfolgt der Nachweis des auf einem Objektträger fixierten Antigens (z.B. Patientenserum) mittels spezifischem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper, der unter dem Fluoreszenzmikroskop unter einem Anregungslicht von 480 nm nachgewiesen wird. Beim indirekten Immunfluoreszenztest wird der antigenbindende Patientenantikörper mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen.

1.6.5 Molekulare Techniken

Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Während einer PCR wird eine bestimmte Gensequenz über 30 bis 45 Zyklen repliziert, wobei bei jedem Zyklus das Amplifikat verdoppelt wird. Der Ablauf eines jeden Zyklus beginnt mit der Denaturierungsphase bei 94°C, in der die Ziel-DNA aufgespalten wird. In der folgenden Annealingphase wird die Temperatur auf 55°C gesenkt und die *Primer* können sich an die Ziel-DNA anlagern. In der Elongationsphase bei 72°C lagert die Taq-Polymerase Nukleotide an das 3'-Ende der Primer an, sodass am Ende wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Der Nachweis der Amplifikate gelingt dann klassischerweise über eine Gelelektrophorese (Neumeister et al., 2009).

Multiplex-PCR: In dieser PCR lassen sich mehrere Pathogene in einer PCR erfassen. Hierfür werden zwei oder mehrere *Primerpaare* zum Reaktionsgemisch hinzugefügt.

Quantitative Real-Time-PCR: Die Methode beruht auf der klassischen PCR, wobei hier eine Messung der neu entstandenen DNA-Stränge in jedem Zyklus erfolgt und dadurch eine Kinetik erstellt werden kann. Diese Möglichkeit ist durch folgende Substanzen im PCR-Reaktionsansatz möglich: DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe oder mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Nukleinsäuren. Das Maß für die quantitative Messung ist der Ct-Wert (*Cycle-Threshold* = Schwellenwert). Er entspricht dem Beginn der exponentiellen Phase, d.h. wenn die Fluoreszenz ein festgelegtes Niveau erreicht (Neumeister et al., 2009).

- **Vorteile**

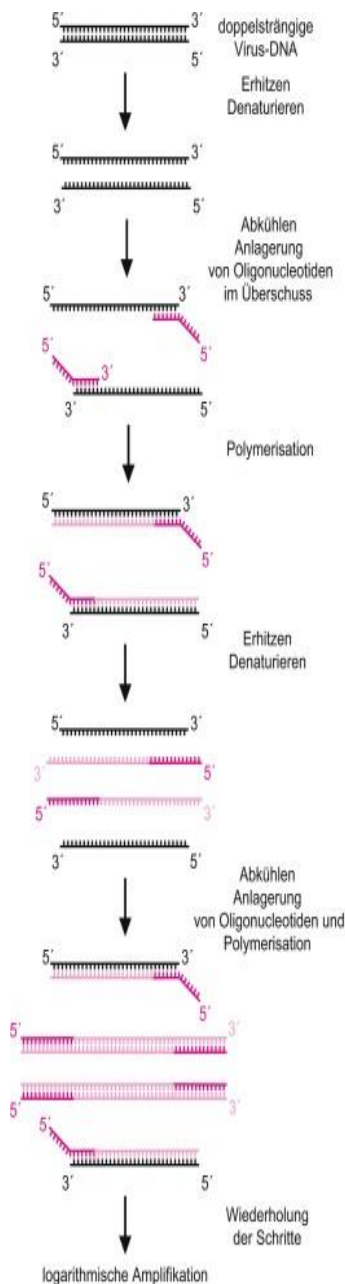
Die PCR ist hoch automatisierbar und die Nukleinsäuren sind in entsprechenden Versandmedien stabil, was einen Transport von mehreren Stunden bis Tagen ermöglicht. Sensitivität und Spezifität betragen im Idealfall maximale Werte (Henrickson, 2004), sodass die PCR heute in vielen Bereichen zum sogenannten Goldstandard geworden ist.

Multiplex-PCR: Mehrere Pathogene werden auf einmal detektiert. Die in einer früheren Studie des UKD entwickelte PCR ermöglicht zeitgleich den Nachweis von 12 respiratorischen Viren, ohne große Einbußen bezüglich der Sensitivität zu erleiden (Bonzel et al., 2008). Die von L. Bonzel verwendeten Nasopharynxaspirate und die erhobenen Daten bezüglich Virus, Viruslast und Koinfektionen aus Ihrer PCR Studie, stellen die Grundlage für diese Arbeit dar.

- **Nachteile**

Falsch positive Ergebnisse durch Kontamination der Proben.

Multiplex-PCR: Sensitivität sinkt bei mehreren *Primern*, wenn unterschiedliche *Annealing* Temperaturen notwendig sind.



Aus: Modrow, Falke, Truyen, Schätzl. *Molekulare Virologie*, 3. Aufl. © Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010

Abbildung 5: Schematischer Ablauf einer PCR Initial erfolgt die Denaturierung, also das Erhitzen der DNA auf 95°C und das Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleosidsträngen. Anschließend folgt die *Annealingphase*/Phase der *Primerhybridisierung*. Hier wird der Ansatz auf 50-65°C abgekühlt, damit sich der *Primer* an die DNA anlagern kann. Im dritten Schritt der Polymerisation, wird nach einem Temperaturanstieg auf 72°C, mit Hilfe der Taq-Polymerase ein komplementärer DNA-Strang erstellt. Diese Schritte werden 25-40 Mal wiederholt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die in dieser Arbeit untersuchten Materialien entstammen einer abgeschlossenen prospektiven Pneumonie-Studie, durchgeführt von dem Institut der Medizinischen Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, dem Institut für Virologie der HHU Düsseldorf, der Kinderklinik der Universität Düsseldorf sowie der pädiatrischen Abteilung des EVK Düsseldorf.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, mittels ELISA die Immunantwort durch die im Nasensekret sezernierten Immunglobuline A und G auf eine RSV-A oder B Infektion zu untersuchen. Die Untersuchungen im zeitlichen Infektionsverlauf von drei bis sechs Tagen sollten eine mögliche Serokonversion nachweisen. Hierfür wurde ein ELISA verwendet und die viruspezifischen Immunglobuline aus Nasopharynxaspiraten nachgewiesen. Diese Zielsetzung basiert auf einer vorangegangenen Dissertation, in der die Immunantwort in einem kleinen Kollektiv mittels Immunfluoreszenz untersucht wurde.

Das zweite Ziel war es, den Konzentrationsanstieg des Chemokins IL-8 und des eosinophilen kationischen Proteins sowie einen möglichen direkten Bezug zu klinischen Symptomen zu untersuchen. Hierfür erfolgte der Vergleich zwischen den Kollektiven der Kinder, die mit RSV, hMPV oder dem Rhinovirus infiziert waren. Ein Vergleich in den Kollektiven wurde auch hinsichtlich weiterer Infektparameter (CRP, Leukozyten) sowie der Beziehung klinischer Daten zur Diagnose durchgeführt.

Als drittes Ziel sollten möglicherweise vorhandene Koinfektionen mit Herpesviren nachgewiesen werden, die Einfluss auf den klinischen Verlauf gehabt haben könnten. Hierfür wurden die vorhandenen Proben auf das Vorhandensein von CMV-, HHV-6-, EBV-, HSV-1-DNA mittels quantitativer Real-time-PCR untersucht.

Alle drei genannten Ziele dienen der Frage, ob messbare Parameter existieren, die zusätzlich zum alleinigen Erregernachweis ermöglichen, Aussagen zum Krankheitsverlauf und zu der gemessenen Viruslast in den Untersuchungsmaterialien zu treffen.

2. Material und Methoden

2.1 Liste der verwendeten Materialien

2.1.1 Materialien ohne feste Arbeitsplatzzuweisung

- | | |
|--------------------------------------|---|
| ➤ Einkanalpipetten | Eppendorf, Hamburg, DE |
| ➤ Einkanalpipetten | Gilson Pipetman, Frankreich |
| ➤ Sterile Einmalpipetten | Costar, Corning, USA |
| • Pipettiervolumen: | 5 ml |
| | 10 ml |
| | 25 ml |
| ➤ 8-Kanalpipette | Eppendorf, Hamburg, DE |
| • Pipettiervolumen: | 1-100 µl |
| | 3-300 µl |
| ➤ 12-Kanalpipette | Eppendorf, Hamburg, DE |
| • Pipettiervolumen | 1-100 µl |
| | 30-300 µl |
| ➤ Pipettenspitzen | |
| • <i>Tip One Filter Tip</i> | Starlab-GmbH, Ahrensburg, DE |
| ✓ <i>Bevelled Filter Tips:</i> | 0,1-10 µl |
| | 1-20 µl |
| | 1-200 µl |
| | 101-1000 µl |
| ✓ <i>Graduated Filter Tips:</i> | 10 µl |
| | 200 µl |
| | 1000 µl |
| ➤ <i>Safe-Lock-Tubes</i> 1,5 ml | Eppendorf, Hamburg, DE |
| 2.1.1.1 Zellkulturmedien | |
| ➤ DPBS Puffer pH 7,3 | GibcoBRL, <i>Life Technologies</i> , Paisley,UK |
| ➤ DMEM | GibcoBRL, <i>Life Technologies</i> , Paisley,UK |
| ➤ FCS | GibcoBRL, <i>Life Technologies</i> , Paisley,UK |
| ➤ Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml | GibcoBRL, <i>Life Technologies</i> , Paisley,UK |
| ➤ Gentamycin 10 mg/ml | GibcoBRL, <i>Life Technologies</i> , Paisley,UK |

- Trypsin-EDTA 0.5% GibcoBRL, *Life Technologies*, Paisley, UK
- Trypsin acetyliert SIGMA-Aldrich Chemie, München, DE
- Dimethylsulfoxid (DMSO) Karl-Roth GmbH, Karlsruhe, DE
- Iscove's *Modified* Dulbecco's Medium Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
- Sputasol Oxoid, Hampshire, UK

2.1.1.2 Zellkulturgefäße und sonstige Materialien

- Zellkulturflaschen
 - 175 cm² Bodenfläche Nunc, Roskilde, Dänemark
 - 75 cm² Bodenfläche TPP, Trasadingen, Schweiz
 - 25 cm² Bodenfläche TPP, Trasadingen, Schweiz
- Zentrifugenröhrchen
 - 50 ml Volumen Greiner Labortechnik, Frickenhausen, DE
 - 15 ml Volumen Sarstedt, Nümbrecht, DE
- 6-Well-Kulturplatten TPP, Trasadingen, Schweiz
- 24-Well Kulturplatten TPP, Trasadingen, Schweiz
- Sterile Zellschaber Greiner Labortechnik, Frickenhausen, DE
- Neubauer Zählkammer Welabo, Düsseldorf, Deutschland

2.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

- *Phosphate Buffered Saline* (Dulbecco A) Oxoid Basingstoke, Hampshire, UK
- Bradford-Reagenz Bio RAD *Protein Assay* BIO-RAD-*Laboratories*, Kalifornien, USA
(Trimethylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250)
- Albumin Fraktion V Art. No. 8076.3 Karl-Roth GmbH, Karlsruhe, DE
- 96-Well Mikrotiterplatte, transparent Greiner Labortechnik, Frickenhausen, DE

2.1.3 IgG-ELISA (*Enzym-linked Immunosorbant Assay*)

- ANTI-HUMAN IgG (*Fab-Specific*) SIGMA, Missouri, USA
Peroxidase Conjugate
Product No. A 0293
- *Nunc Immunoplate V 96 Maxisorp* NuncGmbH & Co. KG, Langenselbold, DE
Product No.449824
- Beschichtungspuffer „*Coating Buffer*“ pH 9,6

- Na_2CO_3 1,59 g
- NaHCO_3 2.93 g
- Aqua dest 1,0 L
- Blockierungspuffer „*Blocking Buffer*“
 - *Foetal Bovine Serum* (FBS) 5% GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA
 - Albumin Fraktion V s. Bradford
 - PBS s. Bradford
- Verdünnungspuffer
 - PBS s.o.
 - FBS 5% s.o.
 - 0,5% Tween[®] 20 SERVA, Heidelberg, Deutschland
- Waschlösung
 - PBS s.o.
 - 0,5% Tween[®] 20 s.o.
- Substrat
 - *Phosphate Citrate Buffer with* SIGMA–Aldrich, St. Louis, USA
Sodium perborate (Na-Borat Kapsel)
 - o-Phenylenediamine dihydrochloride SIGMA Aldrich, St. Louis, USA
 - Stopplösung 0.1 M
 - dH₂O 1,0 L
 - Schwefelsäure 53,55 ml
- *Reagent Reservoir Polystyrene* Costar, Corning, NY, USA
(Kunststoffwannen)

2.1.4 IgA-ELISA

- ANTI-Human IgA (α -CHAIN SPECIFIC) *Product No. A 0295*
- Peroxidase Conjugate* SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA
- sonstige Materialien wie bei IgG-ELISA

2.1.5 IL-8-ELISA

- *Nunc Immunoplate V 96 Maxisorp* *Product No. 449824*
- Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, DE

- 1. Antikörper: *purified anti cytokine capture antibody*
(Purified Mouse Anti-Human IL-8) *Cat. No. 554716*
 BD Biosciences, Heidelberg, DE
- 2. Antikörper: *biotinlayed anti cytokine-detection antibody*
(Biotin Mouse Anti-Human IL-8) *Cat. No. 554718*
 BD Biosciences, Heidelberg, DE
- Standard: *Recombinant Human IL-8* *Cat. No. 554609*
 BD Biosciences, Heidelberg, DE
- Streptavidin-HRP *Cat. No. 554066*
 BD Biosciences, Heidelberg, DE
- Substrat: *TMB Substrate Reagent* *Cat. No. 555214*
 - Reagenz A 51-2606KC
 - Reagenz B 51-2607KC
 BD Biosciences, Heidelberg, DE
- Beschichtungspuffer "*Binding Solution*" pH 9
 - 0,1M Na HPO₄
- Blockierungspuffer „*Blocking Buffer*“
 - *Foetal Bovine Serum* (FBS) 5 % GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA
 - PBS s.o.
- *Blocking Buffer Tween*[®]
 - Blockierungspuffer s.o.
 - Tween[®]20 s.o.
- Waschlösung, Stopplösung und Wannan s.IgG-ELISA

2.1.6 ECP-ELISA

- *Meascup* ECP Test Code: 7618E
Medical Biological Laboratories Co., Ltd.
 Nagoya, Japan
- 96-Well Mikrotiterplatte, transparent Greiner Labortechnik, Frickenhausen, DE

2.1.7 RNA-Extraktion

EZ-1-Virus Mini Kit (Strausbaugh et al. 829-33) *Cat.No.955134, Qiagen, Hilden DE*

2.1.8 TaqMan-PCR

- TaqMan®*Universal PCR Master Mix* No.430571
Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- *Aqua ad iniectabilia* Braun
- *Sample Tubes 2 ml* Qiagen, Hilden, DE
- *MikroAmp optical Caps (8 Caps/Strip)* *Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*
- *MikroAmp optical 8-Tube Strip 0,2 µl* *Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*
- Supermix Volumen Einzelansatz:
 - Universal MM 25 µl
 - *Primer F* 0,15 µl
 - *Primer R* 0,15 µl
 - Sonde 0,05 µl
 - *Aqua dest.* 19,65 µl

2.1.9 Geräte

- Photometer Sunrise, Tecan, Crailsheim, DE
- Zentrifuge Megafuge 1.0 Heraeus Instruments, Kleinostheim, DE
- Vortexer VIBROFIX VF1 Electronic, Janke & Klunkel
IKA Labortechnik, Littau, Schweiz
- Magnetrührer IKAMAG RH, Janke & Klunkel
IKA Labortechnik, Littau, Schweiz
- Werkbank HERAsafe, Heraeus Instruments, Typ KS 12, Kleinostheim, DE
- Inkubator BBD-6620, Heraeus-Instruments, Hanau, DE
- *PCR Chamber (Master-Mix-Raum)* BÄRO GmbH & Co. KG, Leichlingen, DE
- Minirocker MR1/Wippschüttler PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE

- Waage Mettler PC2000 Mettler-GmbH, Giessen, DE
- Vakuum-Pipettierhilfe *Pipetboy acu*, IBS, Integra Biosciences,
Heidelberg, DE
- Einfriercontainer Nalgene Labware, Rochester, NY, USA
- Mikroskop
 - Zeiss Axiovert 40CFL, Zeiss, DE
 - Leitz, Wetzlar, DE
- *TaqMan-Real-Time-Thermo-Cycler* *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA
7500 SDS

2.1.10 Software

- *7500 Real Time PCR System* *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA
- Magellan V6.4 Tecan 2007, Crailsheim, Deutschland
- Sigma Plot Version 10.0 Statistische Auswertung

2.2 Selektion der Nasopharynxaspirate

Im Zeitraum von November 2006 bis November 2008 wurden im Rahmen einer bereits abgeschlossenen prospektiven Studie 404 Nasopharynxaspirate von hospitalisierten Kindern mit Infekten der unteren Atemwege entnommen. Nach Möglichkeit wurden von jedem Kind zwei Proben gewonnen, am Aufnahmetag und drei bis sechs Tage später. Eine Studie mit dem Titel „Epidemiologische Untersuchung von Infektionen des unteren Respirationstrakts in Kindern“ entstand in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Uniklinik Düsseldorf, der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie sowie der Pädiatrie des Evangelischen Krankenhauses in Düsseldorf. Die Studiennummer des Ethikvotums lautet 2837. Die von L. Bonzel (Bonzel et al., 2008) etablierte Real-Time-PCR ermöglichte einen schnellen quantitativen Nachweis (Kopien/ml) der viralen Erreger. Das Vorhandensein bakterieller Koinfektionen in diesen Proben wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene untersucht. Die in dieser Arbeit nachuntersuchten Materialien entstammen den jeweils für das bestimmte Virus positiv getesteten Proben der oben genannten Studie. Es wurden 17 hMPV- positive Nasopharynxaspirate (NPA), von denen 13 Monoinfektionen waren, untersucht. Weiterhin wurden 120 RSV-positive Proben untersucht. Die Verteilung der auf RSV positiv getesteten Proben ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Anzahl 1. NPA insgesamt	1. NPA RSV-Monoinfektionen	Anzahl 2. NPA	Anzahl Eluate
146	120	112	154

Tabelle 1: RSV-Kollektiv unterteilt in 1. und 2. NPA sowie in RSV-Monoinfektionen.

1. NPA: Nasopharynxaspirat am Aufnahmetag abgenommen.

2. NPA: Nasopharynxaspirat am 3-6 Tage nach Aufnahme abgenommen

Eluat: Aufgereinigter Nukleinsäureextrakt

2.3 Zellkultur und Virusanzucht

2.3.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Hep2 und HepG2 Zellen (Tabelle 2) erfolgte in den Zellkulturflaschen T75 bei Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂. Das Erhaltungsmedium der Zelllinien bestand aus 2% FKS in DMEM mit einem Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin. Täglich wurden die Zellen bezüglich ihrer Konfluenz und Vitalität lichtmikroskopisch untersucht. Alle vier bis fünf Tage wurden die Zelllinien passagiert. Hierfür wurde das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit 1% Trypsin-EDTA beschichtet und für 5 Minuten bei 37°C zur Ablösung im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von Wachstumsmedium (2% FKS in DMEM) wurden die Zellen im definierten Verhältnis gesplittet und auf neue T75 Zellkulturflaschen verteilt.

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle	Passagierung konfluenter Kulturen
Hep-2	Organismus: <i>human</i> Organ: Lunge Zellart: epidermoidale Karzinomzellen	ATCC: Nr.: CCL-23™	1:10
Hep-G2	Organismus: <i>human</i> Organ: Leber Zellart: heptozelluläre Karzinomzellen	ATCC: Nr.: HB-8065 Virologie Bonn	1:20

Tabelle 2: Verwendete Zelllinie ATCC: American Type Culture Collection

2.3.2 Zellzählung in der Neubauerzählkammer

Für die Herstellung eines geeigneten Zellrasens für die Virusinfektion wurde dieser nach Inkubation mit Trypsin mit 10 ml PBS resuspendiert und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Neubauer-Zählkammer wurde mit 20 µl der Zellsuspension gefüllt. Die Gesamtzellzahl ergab sich aus der Auszählung aller vier Quadrate und der Errechnung des Mittelwerts. Die Einsaat in das Zellkulturgefäß erfolgte abhängig vom Zelltyp in einer Dichte von ca. 3x10⁴ Zellen/cm².

Die Zellsuspension wurde zuvor in einem bestimmten Verhältnis mit Wachstumsmedium gemischt.

2.3.3 Einfrieren der Zellen

Der Zellrasen wurde täglich lichtmikroskopisch auf seine Konfluenz und Zellmorphologie untersucht. Erst wenn dieser zu 100% konfluent war, konnten die Zellen eingefroren werden. Dafür wurde 0,5-prozentiges Trypsin-EDTA auf den Rasen gegeben und für ca. 10 min bei 37°C inkubiert. Die danach abgelösten Zellen wurden in 10 ml DMEM mit 10% FKS aufgenommen und 10 Minuten bei 600 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (70% DMEM, 20% FKS, 10% DMSO) überführt und anschließend mit jeweils 1 ml pro Gefäß in die auf 4°C gekühlten Einfrierampullen verteilt. Die Ampullen wurden zunächst im Einfriercontainer für 24 Stunden bei -80°C gelagert und dann in flüssigem Stickstoff bei -180°C aufbewahrt.

2.3.4 Auftauen der Zellen

Das Kryoröhrchen wurde aus dem flüssigen Stickstofftank entnommen und die Zellen im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Zuvor wurden 10 ml des 37°C warmen Mediums in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt. Die Zellsuspension wurde nur soweit aufgetaut, dass sie ins Medium überführt werden konnte. Die Zellen sedimentierten durch Zentrifugation bei 600 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 20 ml 37°C warmen Medium resuspendiert und in eine neue 75 cm² Gewebekulturflasche überführt. Die Zellen wurden unter 5% CO₂-Begasung im Brutschrank kultiviert.

2.3.5 Virusinfektion von Zelllinien

Für die Infektion des Zellrasens mit hMPV wurden konfluente Hep-G-2 Zellen aus einer T75 Kulturflasche wie oben beschrieben abtrypsiniert und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Pro Kavität einer 6-Well-Platte wurden 0,5 x 10⁶ Zellen zusammen mit Wachstumsmedium pipettiert. Die Infektion erfolgte bei annähernd 50% Konfluenz des Zellrasens. Das bei -80°C gelagerte Virusinokulum (1 ml Aliquot) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 4 ml PBS zu einem Inokulationsvolumen von 5 ml aufgefüllt (Tabelle 3). Zusätzlich wurde 50 µl Trypsin-Stocklösung (Endkonzentration 0,5 µg/ml) hinzugegeben. Das Medium der 6-Well-Platte wurde entfernt, 500 µl Inokulum pro Vertiefung pipettiert und die Platte zweimal 15 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach der Hälfte der Zeit wurde diese um 180 Grad gedreht. Anschließend folgte die Zugabe des Erhaltungsmediums und die Inkubation der Platte für zwei Wochen im temperaturfixierten Brutschrank bei 37°C und 5%

CO² Begasung. Da im Gegensatz zu RSV-infizierten Zellen hier kein cytopathischer Effekt sichtbar wird, wurde nach entsprechender Inkubationszeit eine Immunfluoreszenz mit HMPV-spezifischen Antikörpern durchgeführt, um eine erfolgreiche Virusinfektion zu bestätigen oder auszuschließen. Hierfür wurde der Zellrasen mit Trypsin abgelöst, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bei 1000 rpm für je 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden dann mit je 2 µl pro *Cup* auf einen Objektträger aufgetragen und in Aceton fixiert. Der monoklonale Antikörper *Human Metapneumovirus DFA Reagent* wurde sodann auf die *Cups* pipettiert und der Objektträger im Brutschrank für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem 10-minütigen Waschschrift mit PBS konnte der Objektträger unter Verwendung eines Eindeckmittels mikroskopiert werden. Für die Infektion mit RSV wurde das Medium der T75 Kulturflasche (Hep-G-2 Zellen) verworfen und der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen. Dieser wurde anschließend mit 5 ml Virusinokulum beschichtet und für eine Stunde bei 37°C auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und zeitgleich die Virussuspension entfernt. In die Kulturflasche wurden 25 ml Erhaltungsmedium mit 1% Trypsin (250 µl) pipettiert und unter analogen Bedingungen zu den mit hMPV beschichteten Zellen im Brutschrank inkubiert, hier jedoch bis zum Eintritt eines cytopathische Effekts.

Virus	Abkürzung	Stamm	Herkunft	Susceptible Zelllinie
<i>Respiratory Syncytial Virus Subtyp A</i>	RSV A	long strain	M.A. Bioproducts; Nr.: 30-875 J	Hep-2
Humanes Metapneumovirus	hMPV		Virologie Bonn bereitgestellt von Hr. Prof. Dr. O. Schildgen	Hep-G2

Tabelle 3: Verwendete Referenzviren mit Angabe von Abstammung und suszeptiblen Zelllinien

2.3.6 Cytopathischer Effekt

Das RSV verursacht in der Zellkultur nach drei bis vier Tagen ein für dieses Virus charakteristischen cytopathischen Effekt (CPE), nämlich die Zellfusionen der Wirtszellen. Aufgrund dessen wurde eine tägliche lichtmikroskopische Kontrolle durchgeführt und der Zellrasen hinsichtlich seiner Morphologie begutachtet. Bei Auftreten von Zellfusionen konnte eine Virusernte durchgeführt werden.

2.3.7 Virus- und Zellernte für den Immunglobulin-ELISA

Wie unter dem Kapitel „Zellkultur und Virusinfektion“ beschrieben, wurden jeweils T75, T175 Gewebekulturflaschen für die Herstellung von Virusantigen (ein Zellrasen und Zellkulturüberstand einer mit dem Zielvirus infizierten Zellkultur) und Kontrollantigen (ein nichtinfizierter Zellrasen mit Überstand) hergestellt. Hierfür wurden die Zellen der beiden Flaschen mit einem sterilen Zellschaber vom Untergrund gelöst und mit dem noch enthaltenen Medium in je ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Diese wurden bei 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde dann jeweils mit 10 ml PBS resuspendiert und in ein neues Falcon-Röhrchen pipettiert um anschließend erneut zentrifugiert und mit 1 ml PBS resuspendiert zu werden. Die beiden Gefäße wurden anschließend im Trockeneis mit Methanol für 1 Minute schockgefroren und danach im 37°C warmen Wasserbad erwärmt. Eine erneute Zentrifugation bei 2000 rpm für 10 Minuten folgte. Der nun entstandene Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und war jetzt zur Beschichtung der Mikrotiterplatten bereit. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

2.4.1 Vorbereitung der Proteinstandards

Es wurden Lösungen als Standards, einer Mischung aus destilliertem Wasser mit BSA bestehend mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 0µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml, 60µg/ml, 80µg/ml und 120µg/ml. Diese dienen der Kalibrierung für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford (Bradford, 1976).

2.4.2 Durchführung der Proteinbestimmung

Die Proben wurden zu Beginn 1:20 und 1:40 mit H₂O verdünnt. Das Bradford-Reagenz ebenfalls mit H₂O 1:5 verdünnt, wurde mit 200 µl in jedes *Well* einer unbeschichteten Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde 50 µl der Proben in jede Vertiefung hinzugefügt. Die Standards wurden in gleicher Menge in aufsteigender Konzentration in die ersten 6 vertikalen *Wells* gefüllt. Standards und Proben wurden jeweils im Doppelansatz bestimmt. Die Zugabe der Proben löst eine Komplexbildung zwischen Proteinen und Farbstoff aus, die eine Verschiebung des Absorptionsspektrums des Farbstoffs bewirkt von zuvor 470 nm zu 595 nm. Ebenfalls ändert sich die Farbe von Rot zu Blau. Die erhöhte Extinktion des

Komplexes im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff ermöglicht die Messung im Photometer bei 620 nm. Die Absorptionszunahme stellt somit ein Maß für die Proteinkonzentration der untersuchten Proben dar. Befanden sich die Proteinkonzentration außerhalb der Standardreihe, wurden sie in höheren oder niedrigeren Verdünnungen gemessen.

2.5 Nachweis von Immunglobulin G und Immunglobulin A im ELISA

2.5.1 Vorbereitung und Beschichtung der ELISA-Platten

Zur Beschichtung der *Nunc Immunoplate V 96 Maxisorp* wurden vorab Proteinlösungen hergestellt, die je aus dem Kontroll-Antigen sowie dem Virus-Antigen bestehen. Für den Immunglobulin-Nachweis in RSV-positiven Proben wurde der *RSV-A-long strain* (Laborstamm) als Virus verwendet, der in Hep2-Zellen kultiviert wurde. Für hMPV-positive Proben wurde ein Zellrasen aus HepG2-Zellen verwendet und das humane Metapneumovirus (Virologie Bonn bereitgestellt von Hr. Prof. Dr. O. Schildgen). Die Proteinlösungen wurden auf eine Konzentration von 3 µg/ml in Beschichtungspuffer verdünnt, wobei zuvor ihre Gesamtproteinkonzentration nach Bradford bestimmt wurde. Es folgte eine Beschichtung der Platte mit je 100 µl Proteinlösung und die Inkubation über Nacht bei 4°C. Die Spalten mit den geraden Zahlen enthielten das Virus-Antigen, die mit den ungeraden das Kontrollantigen. Die Platten wurden am Folgetag entleert und mit Blockierungslösung, je 150 µl pro *Well* mit einer Acht-Kanal-Pipette aufgetragen und für ein Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden diese erneut geleert, zwei Mal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen und getrocknet. Die Mikrotiterplatten konnten in dieser Form verpackt bei 4°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet werden.

2.5.2 Testdurchführung

Für die Immunglobulin-Bestimmung wurden die Nasopharynxaspirate (NPA), welche bei -80°C gelagert werden, bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Proben wurden *gevortext*, das heißt in einem Gerät, dem Vortexer durch Vibration durchmischt und anschließend Verdünnungsreihen des 1. Antikörpers (im NPA vermutete IgG) mit dem Verdünnungspuffer erstellt. Jedes *Well* enthielt 100 µl. Als Negativkontrolle wurde PBS und als Positivkontrolle ein IgG-reiches Serum auf den Platten aufgetragen. Jede Probe wurde in vier Schritten verdünnt, sodass die Mikrotiterplatte in der Hälfte unterteilt wurde und maximal fünf NPA Pärchen mit den zugehörigen Positiv- und Negativkontrollen untersucht werden konnten.

Verdünnung		V	K	V	K	V	K	V	K	V	K	V	K
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:10	A	Probe Pat. X										Serum	
1:40	B	1. NPA											
1:160	C												
1:600	D												
1:10	E	Probe Pat. X										PBS	
1:40	F	2. NPA											
1:160	G												
1:600	H												

V: Virus-Antigen

K: Kontroll-Antigen

Tabelle 4: Mikrotiterplatte mit Pipettierschema und Angabe der Verdünnungen In den Reihen 1-10 wurde jeweils das NPA und ein Kontrollantigen in aufsteigender Verdünnung von 1:10-1:600 aufgetragen, von A-D das jeweils 1. NPA des Patienten und von E-H das 2. NPA. In den Reihen 11-12 wurde von A-D ein IgG-reiches Serum als Positivkontrolle mit Kontrollantigen und von E-H PBS als Negativkontrolle mit Kontrollantigen pipettiert.

Die Platte wurde im nächsten Schritt 60 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Entleerung dieser und anschließend drei weitere Waschschrte mit je 250 µl Waschpuffer. Hierdurch verblieben nur die an das Virusantigen gebundenen Immunglobuline. Anschließend wurden je 100 µl pro Well einer 2. Antikörper/Verdünnungspuffer-Lösung appliziert. Das *Anti-Human* IgG Peroxidase Konjugat für die IgG-Bestimmung wurde nach Herstellerangaben 1:40.000 verdünnt, das *Anti-Human* IgA Peroxidase Konjugat für die IgA-Bestimmung 1:50.000. Die ungebundenen Antikörper wurden durch erneutes Waschen von der Platte entfernt, sodass nur die Peroxidase der gebundenen das im folgenden Schritt hinzugefügte Substrat umsetzen konnte. Die Platte wurde mit je 100 µl der Lösung pro Vertiefung befüllt. Das Substrat durfte maximal 15 Minuten zuvor vorbereitet werden. Nach einer 30-Minuten-Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden je 100 µl Stopplösung hinzugegeben, um den Substratumsatz zu unterbrechen. Dieser wurde durch einen Farbumschlag zu gelb-orange sichtbar, welcher proportional zur Menge des gesuchten Antikörpers war. Zum Schluss wurde die Extinktion bei 495 nm im Photometer gemessen.

2.6 Quantitative Interleukin-8-Bestimmung mittels *Sandwich*-ELISA

2.6.1 Vorbereitung und Beschichtung der ELISA-Platten

Im ersten Schritt wurde die Nunc-*Immunoplate* V 96 Maxisorp mit dem 1. Antikörper beschichtet. Dazu wurde dieser auf eine Konzentration von 2 µg/ml=1:250 in *Binding Solution* verdünnt und in jede Vertiefung mit je 100 µl pipettiert. Mit einer Platte zugedeckt und somit vor Verdunstung geschützt, inkubierte die Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C. Am nächsten

Tag wurde diese auf Raumtemperatur erwärmt und zur Entfernung der verbleibenden freien Antikörper geleert, mit je 200 µl *Blocking-Buffer* (10% FBS in PBS) pro *Well* befüllt um auch die restlichen freien Stellen eines *Wells* zu beschichten. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur, wurde die Platte geleert und drei Mal mit Waschlösung (0,5 ml Tween-20 in PBS) gewaschen. Diese war nun zur direkten Weiterverarbeitung bereit oder konnte bei 4°C verpackt gelagert werden.

2.6.2 Testdurchführung

Die Standards wurden aus einer Mischung von *Rekombinant Human* IL-8 und PBS in folgenden Konzentrationen vorgefertigt: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 16,06 pg/ml, 8,04 pg/ml, 4,0 pg/ml. Die Standards wurden entsprechend der höchsten Konzentration absteigend in die erste Spalte der Mikrotiterplatte in den Vertiefungen A-H pipettiert. Die Proben wurden mit *Blocking Buffer Tween*[®] 1:10 und 1:20 verdünnt und im Doppelansatz mit 100 µl pro *Well* aufgetragen. Lag die IL-8-Konzentration der Probe außerhalb des Messbereichs, erfolgte der ELISA in einer entsprechend niedrigeren oder höheren Verdünnung. Die verdeckte Platte wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei kam es zur Bindung des 1. Antikörpers an Interleukin-8 aus der Patientenprobe. Die *Wells* wurden erneut geleert und vier Mal mit Waschlösung gewaschen. Der 2. Antikörper, ein Detektionsantikörper der ebenfalls das IL-8 an einem anderen Epitop bindet, wurde auf eine Konzentration von 1 µg/ml=1:500 in *Blocking Buffer Tween*[®] verdünnt und mit 100 µl in jedes *Well* pipettiert. Der dadurch entstehende Komplex aus 1. Antikörper, IL-8 und 2. Antikörper ist für den Test namensgebend. Eine einstündige Inkubation und erneuter Waschschrift mit Waschlösung folgte. Im nächsten Schritt wurde ein sekundärer Antikörper Streptavidin-HRP hinzugegeben, an den eine Meerrettich-Peroxidase gebunden ist, die das folgende Substrat umsetzen kann. Streptavidin-HRP wurde in einer Verdünnung von 1:2000 mit *Blocking Buffer Tween*[®] mit je 100 µl pro Vertiefung aufgetragen. In diesem Schritt bindet es an den 2. Antikörper. Die Mikrotiterplatte inkubierte 30 Minuten bei Raumtemperatur und wurde danach fünf Mal mit Waschlösung gewaschen. Die Substrat Reagenzien A und B wurden maximal 15 Minuten vor Gebrauch 1:1 in der benötigten Menge vermischt und mit je 100 µl pro *Well* pipettiert. Die Platte wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Der Substratumsatz wurde durch die Zugabe von 100 µl Stopplösung pro Vertiefung unterbrochen und die Extinktion bei 405 nm im Photometer gemessen.

2.7 Quantitative Bestimmung des eosinophilen kationischen Proteins mittels ELISA

Die Bestimmung der ECP-Konzentration erfolgte mit einem von der Firma MBL hergestellten *Kit*. Wie das IL-8 wird auch das ECP durch einen *Sandwich*-ELISA bestimmt, wobei hier der 2. Antikörper bereits mit der Meerrettich-Peroxidase markiert ist und somit ein weiterer Antikörper nicht mehr notwendig ist. Im ersten Schritt wurden je 50 µl der Positiv-/Negativkontrolle (0.09% Natriumazid, Konservierungsmittel, 1% Ziegen Serum) im Verhältnis 1:5 mit 200 µl des Probendiluent (0.09% Natriumazid, Konservierungsmittel, 1% Ziegen Serum) in einer unbeschichteten Mikrotiterplatte gemischt. Die Proben wurden mit derselben Lösung im Verhältnis von 1:10 und 1:100 mit einem Volumen von 150 µl pro *Well* verdünnt. Waren diese bei der folgenden Photometrie außerhalb des Messbereichs, wurde der Versuch mit einer höheren Verdünnung wiederholt. Die Standards (0.09% Natriumazid, Konservierungsmittel, 1% Ziegen Serum) lagen gebrauchsfertig in folgenden Konzentrationen vor: 0 ng/ml, 0,4 ng/ml, 1,2 ng/ml, 4 ng/ml, 12 ng/ml, 40 ng/ml. Diese wurden mit ebenfalls 150 µl in die erste Spalte von A bis F der Konzentration nach aufsteigend pipettiert. In *Well* G kam die Positivkontrolle, in H die Negativkontrolle hinein. Mit einer Acht-Kanal-Pipette wurden die Standards und Proben aus der Mikrotiterplatte mit je 100 µl auf die mit *anti-human*-ECP-Antikörpern beschichteten Mikrotiterstreifen übertragen. Die Reihenfolge wurde wie vorgelegt beibehalten. Die Mikrotiterstreifen inkubierten eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden diese geleert und vier Mal mit Waschlösung gewaschen, wobei zuvor 100 ml der konzentrierten Lösung mit 900 ml destilliertem Wasser verdünnt wurden. Reste wurden auf einem saugfähigen Papier ausgeklopft. Die Haltbarkeit der Waschlösung betrug bei 4°C gekühlt zwei Wochen und musste bei Wiederverwendung auf Raumtemperatur erwärmt werden. Als nächstes wurde das Konjugat, ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter polyklonaler Antikörper, in eine Wanne gefüllt und je 100 µl mit einer 8-Kanal-Pipette auf die geleerten *Wells* verteilt. Die Inkubationszeit betrug hier eine Stunde. Daraufhin folgte erneut der bereits beschriebene Waschschrift. Die geleerten Kavitäten wurde nun mit 100 µl Substrat (TMB/H₂O₂) befüllt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurden 100 µl Stopplösung (0,5M H₂SO₄) in jedes *Well* pipettiert und eine Extinktionsmessung bei 450 nm durchgeführt.

2.8 Untersuchung respiratorischer Proben mittels *TaqMan-Real-Time PCR*

2.8.1 Aufbereitung der Nasopharynxaspirate und Nukleinsäureextraktion

Die Proben wurden nach Ankunft vom Routinelabor aufbereitet. Der Absaugschlauch der das NPA enthielt, wurde mit 2 ml Sputasol durchgespült und der Inhalt in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Das Material wurde *gevortext* und für drei Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zum einen für die Inokulation der Zelllinien gebraucht und 200 µl wurden für die Virusisolierung und Extraktion des zellulären Virus verwendet. Dafür wurde das EZ-1-Virus Minikit verwendet und im BioRobot EZ-1 (Quiagen) die komplette Extraktion durchgeführt, sodass ein Endvolumen von 60 µl Eluat resultierte. Die Auftrennung erfolgt durch Bindung der Nukleinsäuren an Silica beschichteten Magnetpartikeln, wobei die DNase I diese wieder separiert und die RNA eluiert werden konnte. Das Eluat wurde anschließend bei -80°C gelagert.

2.8.2 Suche nach Koinfektionen mit den Herpesviren CMV, EBV, HHV-6, HSV-1

Für die CMV, EBV, HHV-6 Bestimmung wurde ein Protokoll verwendet, das bereits im Routinelabor des Instituts etabliert war. Dazu existierten bereits „Supermix“-Vorräte vorgefertigt in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -20°C im PCR-Mastermix-Raum. Die hierfür verwendeten *Primer* und Sonden sind in Tabelle 5 aufgeführt. Für die PCR wurden 45 µl des jeweiligen Supermix in jedes Gefäß eines PCR-Gefäßstreifens pipettiert. Dieser Vorgang wurde im *PCR-Mastermix*-Raum (einem Instituts-eigenen Raum für PCR-Techniken) durchgeführt, um das Risiko einer Kontamination der Reagenzien zu minimieren. Die PCR wurde mit folgender Anordnung durchgeführt: Spalten 1 bis 3 CMV, Spalten 4 bis 6 EBV, Spalten 7 bis 9 HHV-6, Spalten 10 bis 12 HSV-1. Der Supermix für die Bestimmung von HSV-1 lag bereits, ebenfalls durch das Routinelabor vorgefertigt, in „*Frozen Strips*“ bei -20°C vor und wurde bei Bedarf aufgetaut. In einem weiteren PCR-Labor wurden die Kontrollen und Eluate mit 5 µl pro Vertiefung hinzugefügt und mit einem Deckelstreifen luftdicht verschlossen. Die Kontrollstandards wurden den Konzentrationen nach absteigend in die Vertiefungen A bis D der Spalten 1, 4, 7 und 10 pipettiert, wobei D eine Negativkontrolle enthielt. Die Standards lagen in drei zehnfach-Verdünnungen mit 5000/500/50 Kopien pro Ansatz vor und enthielten Plasmide mit einem Teil des Virusgenoms, der von den *Primern* und Sonden erkannt wird. Die fertigen Reaktionsstreifen wurden in den *Thermocycler* überführt und die PCR mit dem Programm *TaqMan-CMV-EBV-HHV-6-HSV-1* Tagesprotokoll gestartet. Die PCR bestand aus 45 Zyklen und begann mit einem 2- minütigem Temperaturanstieg auf 50°C. Die im *Master-Mix* enthaltene

Uracil-N-glycosylase (UNG) hydrolysierte dabei in der DNA enthaltene uracil-glykosidische Bindungen. Somit blieben nicht amplifizierbare Bruchstücke zurück und potentiell vorhandene kontaminierende Uracil-haltige Produkte aus früheren Amplifikationsreaktionen konnten eliminiert werden. Es folgte die Phase der Denaturierung bei 95°C, in der auch die UNG zerstört wurde und die Ziel-DNA an den Wasserstoffbrückenbindungen aufgespalten wurde. Anschließend kam es zur Anlagerung (*Annealing*) der *Primer*, Sonde (Oligonukleotid) bei 60°C und zur Elongation der DNA. Beim Abbau der Sonde an ihrem 5' Ende durch die TaqPolymerase entfernten sich dadurch der *Quencher* (TAMRA) am 5' Ende und das Reporter-molekül (FAM) am 3' Ende voneinander, wodurch eine steigende Reporterfluoreszenz bei jedem Zyklus gemessen werden konnte. Ab einem vorgegeben Schwellenwert (*CT= threshold cycle*) stieg die Fluoreszenz proportional zur Ausgangs-DNA-Konzentration an. Er gab den Zyklus an, indem der Schwellenwert überschritten wurde, das heißt, je mehr Ausgangs-DNA vorlag desto früher wurde er erreicht. Die Nachweisgrenze der PCR liegt bei weniger als 10 Kopien/Ansatz.

TaqMan-PCR	Primer / Sonden	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
CMV	F- Primer R- Primer Sonde	CMV-Pol-F CMV-Pol-R CMV-Pol-pr	TCT GCA GGA CGC CGT ATT G GCC CCG GCC TCG TAG T FAM- TGCGCGATCTGTTCAACACCATTAATTTT – TAMRA
EBV	F- Primer R- Primer Sonde	EBV-Pol5 EBV-Pol3 EBV-pol	AGT CCT TCT TGG CTA GTC TGT TGA C CTT TGG CGC GGA TCC TC FAM- CAT CAA GAA GCT GCT GGC GGC C- TAMRA
HHV-6	F-Primer R- Primer Sonde	HSV-TypF HSV-TypR HSV-1Typ	ACC ATG ACC AAG TGG CAG GA AGA AKC GGA AGG AGC CGC FAM- CGG AGC GCA GCA TCT CGT CCA- TAMRA
HSV-1	F- Primer R- Primer Sonde	HHV6-Pol5 HHV6-Pol3 HHV6-pol	AAT TAT CAT TTT GAG GTT GCC GA CCC TCG AAC ACC ACA CAT CTA G FAM- CGC CAG ATT GGC ACA CGT CAC G- TAMRA

Tabelle 5: Primer und Sonden Aufgelistet sind die verwendeten *Primer* und Sonden für die TaqMan-PCR, zum Nachweis der Herpesviren CMV, EBV, HHV-6, HSV-1.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von Immunglobulin G und Immunglobulin A im Nasopharynxaspirat

Beim RSV-Kollektiv wurden 110 Nasopharynxaspiratpärchen (1. NPA und 2. NPA) auf Antikörper mittels ELISA untersucht, wobei Serokonversionen gemessen werden sollten, das heißt, dass das 2. NPA im Gegensatz zum 1. NPA nachweisbares Immunglobulin G enthielt. Insgesamt wurde nur in vier Proben IgG nachgewiesen. In lediglich einer Probe konnte IgA nachgewiesen werden. Das aus 17 Pärchen bestehende hMPV-Kollektiv beinhaltete nur eine IgG positiv getestete Probe. Ein IgA-Nachweis gelang nicht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Kollektiv der Nasopharynxaspirat Pärchen	IgG	IgA
RSV n=110	1x 1. NPA und 2. NPA positiv 2x 2. NPA positiv (Serokonversion)	1x 1. NPA positiv.
HMPV n=17	1x 1. NPA positiv	Kein IgA-Nachweis

Tabelle 6: Ergebnisse des Immunglobulin-ELISA Im RSV-Kollektiv mit 110 Nasopharynxaspirat Pärchen wurde zwei Mal eine Serokonversion nachgewiesen. Bei einem Pärchen beinhaltete bereits das 1.Nasopharynxaspirat IgG. IgA war in einem 1.Nasopharynxaspirat positiv. Im HMPV Kollektiv mit 17 Nasopharynxaspirat Pärchen gelang in einem 1.Nasopharynxaspirat ein IgG-Nachweis. IgA war nicht nachweisbar.

3.2 Quantitative IL-8-Bestimmung mittels Sandwich-ELISA

Die IL-8-Konzentration im Nasopharynxaspirat wurde in den drei Untersuchungskollektiven (RSV-, hMPV-, RV-Gruppe) bestimmt und zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 6) (p-Wert von 0,002). Der Median der IL-8-Konzentration der RSV-Gruppe lag bei 2398,30 µg/ml, in der hMPV-Gruppe lag er bei 3955,07 µg/ml und in der Rhinovirus-Gruppe bei 6244,77 µg/ml. Ein direkter Vergleich zwischen den IL-8-Konzentrationen der RSV-positiven Gruppe und RV-positiven Gruppe war statistisch signifikant mit einem p-Wert $\leq 0,05$, zum hMPV-positiven Kollektiv waren hingegen keine signifikanten Abweichungen sichtbar (Abbildung 6).

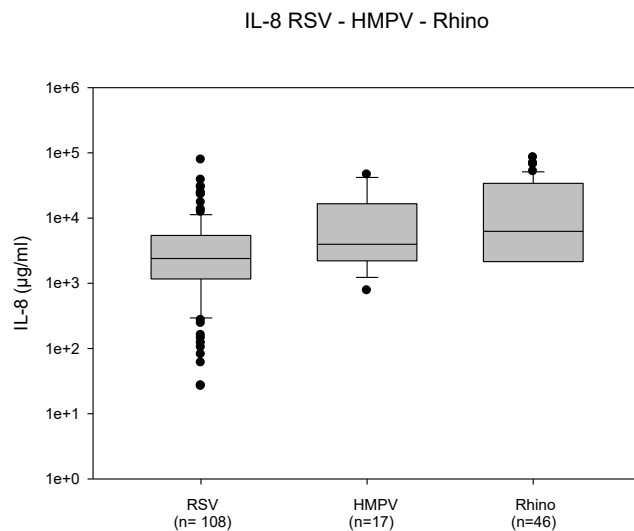


Abbildung 6: IL-8-Konzentration der drei Untersuchungskollektive (RSV-, hMPV-, RV-Gruppe), dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die IL-8-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ an. In der x-Achse befinden sich die einzelnen Virus-Kollektive mit Angabe der Probenanzahl.

Wie im Immunglobulin-ELISA wurden auch hier NPA-Pärchen untersucht, somit stellte sich die Frage nach der IL-8-Konzentration im Verlauf der Erkrankung. Im Vergleich der ersten und zweiten Proben konnte kein signifikanter Unterschied der Konzentration nachgewiesen werden (Abbildung 7).

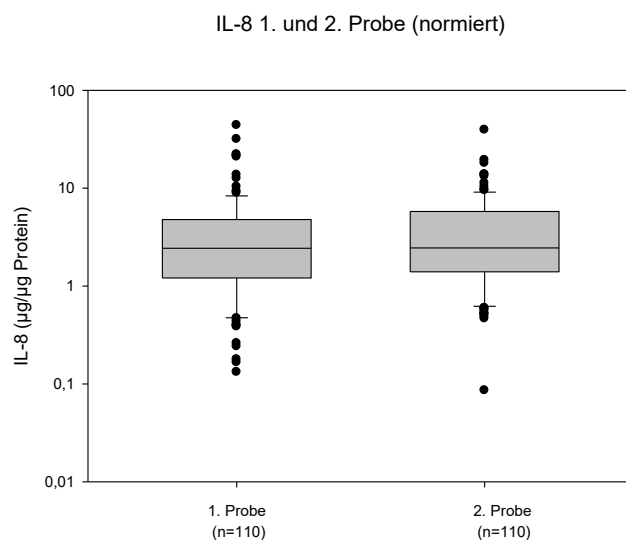


Abbildung 7: Vergleich der IL-8-Konzentrationen zwischen dem 1. und 2. Nasopharynxaspirat im RSV-Kollektiv, dargestellt in Box-plots Das IL-8 wurde vorab nach der Proteinkonzentration des NPA normiert. Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet das Median, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die IL-8-Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Protein an. In der x-Achse befinden sich die 1. und 2. Probe mit Angabe der Probenanzahl.

Die Infektion mit RSV manifestierte sich klinisch als Bronchitis, obstruktive Bronchitis, Bronchiolitis und als Pneumonie. Die Verteilungshäufigkeit ist in (Abbildung 8) aufgeführt.

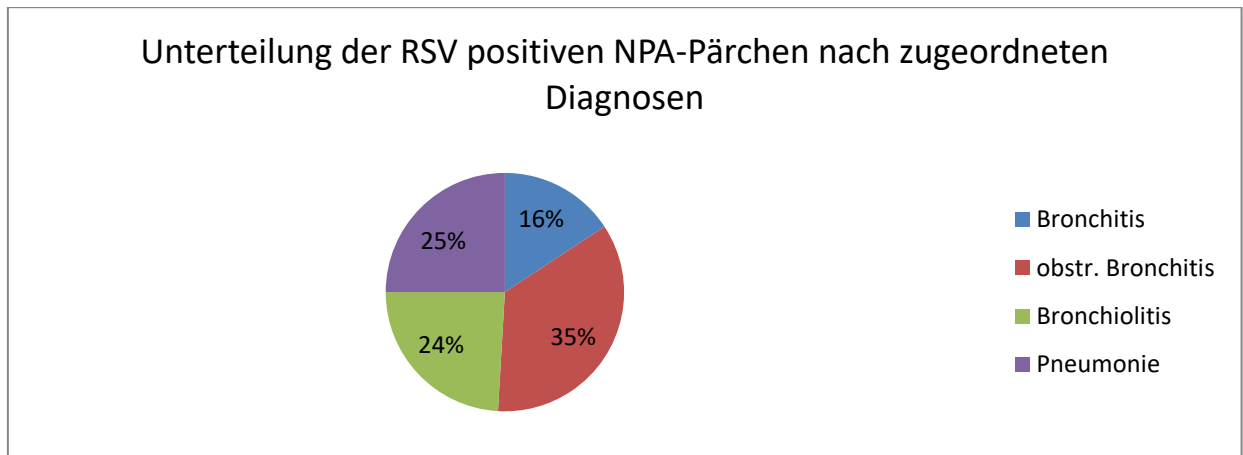


Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der klinischen Diagnosen im RSV-Kollektiv Die RSV-infizierten Patienten entwickelten folgende klinische Erkrankungen: Bronchitis 17 Patienten/ 16%, obstruktive Bronchitis 38 Patienten/ 35%, Bronchiolitis 26 Patienten/ 24% und Pneumonie 27 Patienten/ 25% (108 Nasopharynxaspirate).

Weiterhin wurden die IL-8-Werte getrennt für das RSV-A und RSV-B-Kollektiv ausgewertet. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht gezeigt werden (Abbildung 9).

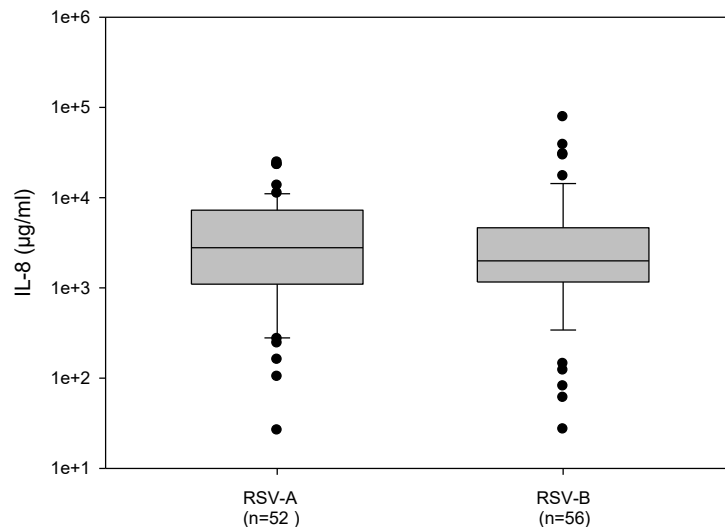


Abbildung 9: IL-8-Konzentration bei RSV-A und RSV-B-Infektion, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die y-Achse gibt die IL-8-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ an. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. In der x-Achse befinden sich die unterteilten Proben nach RSV-A- und RSV-B-Infektion mit Angabe der Probenanzahl.

Die Unterteilung nach Krankheitsbildern ermöglichte einen Vergleich der zugehörigen IL-8-Konzentrationen untereinander (Abbildung 10). Die Werte sind annähernd gleich. Es konnte

kein statistisch signifikanter Unterschied in der IL-8-Antwort bezüglich der einzelnen Krankheitsausprägungen gezeigt werden bei einem p-Wert von 0,603.

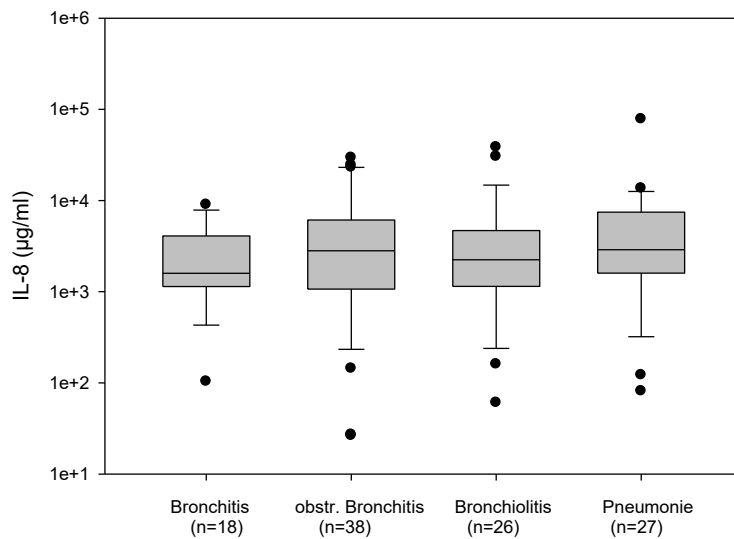


Abbildung 10: IL-8-Konzentrationen je nach klinischer Diagnose bei RSV-Infektion, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die IL-8-Konzentration in µg/ml an. In der x-Achse befinden sich die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

Ein Vergleich der IL-8-Konzentration unterteilt nach den einzelnen Krankheitsbildern in Rhinovirus positiven NPAs, erbrachte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied p-Wert von 0,386 (Abbildung 11).

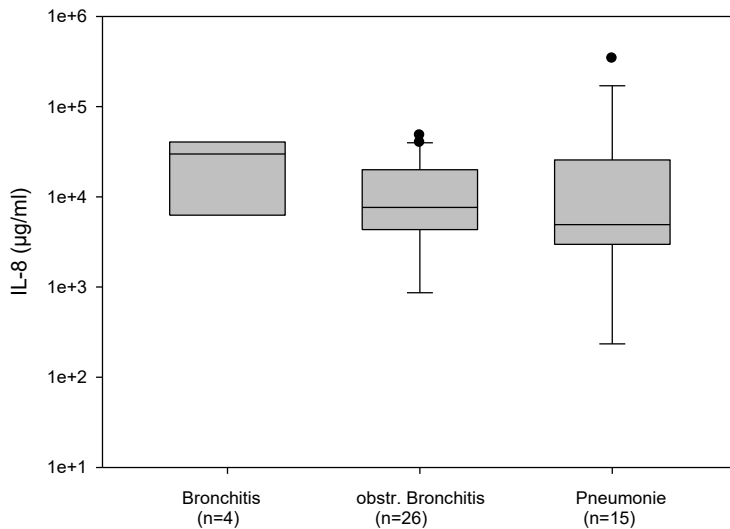


Abbildung 11: Vergleich der IL-8-Konzentrationen in den Proben des Rhinoviruskollektivs unterteilt nach klinischer Diagnose des Patienten, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die IL-8-Konzentration in µg/ml an. In der x-Achse befinden sich die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

3.3 Quantitative Bestimmung des eosinophilen kationischen Proteins

Wie auch beim IL-8 wurde die Konzentration des eosinophilen kationischen Proteins in den NPA-Pärchen bestimmt (Abbildung 12). Die Konzentrationen des 1. und 2. NPA wurden normiert mit der Proteinkonzentration miteinander verglichen. Der Konzentrationsvergleich des ECP der beiden RSV-Subtypen zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 13).

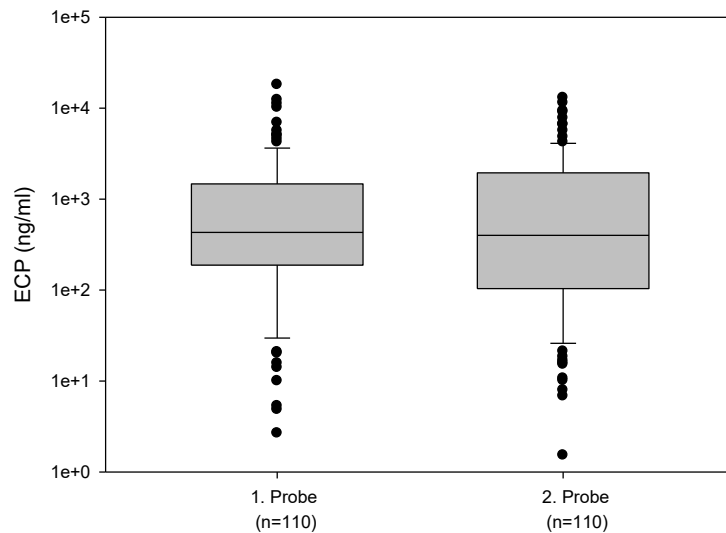


Abbildung 12: ECP-Konzentration des 1. und 2. NPA normiert auf die Proteinkonzentration, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die IL-8-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ an. In der x-Achse befinden sich die unterteilten Proben nach RSV-A- und RSV-B-Infektion mit Angabe der Probenanzahl.

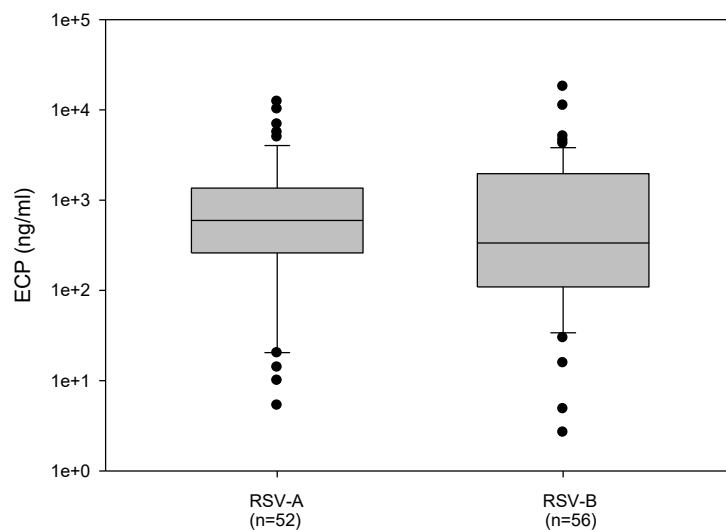


Abbildung 13: Vergleich der ECP-Konzentration unterteilt nach RSV-A und RSV-B-Infektion, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die ECP-Konzentration in ng/ml an. In der x-Achse befinden sich die unterteilten Proben nach RSV-A- und RSV-B-Infektion mit Angabe der Probenanzahl.

Der Vergleich der ECP-Konzentration zwischen den für die jeweils drei Viren positiven NPAs, wies eine ähnliche Konzentration auf (Abbildung 14). Mit einem p-Wert von 0,134 konnte ein statistisch signifikanter Unterschied nicht bewiesen werden.

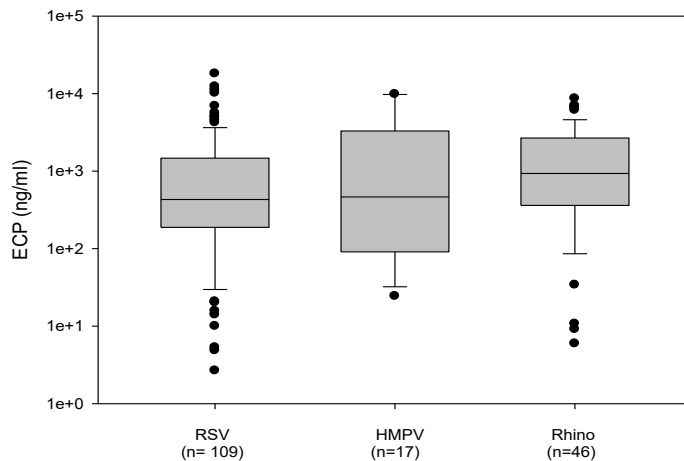


Abbildung 14: Konzentrationsvergleich des ECP der NPAs unterteilt nach dem jeweils nachgewiesenen Viruskollektiv (RSV, RV und hMPV), dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die ECP-Konzentration in ng/ml an. In der x-Achse befinden sich die einzelnen Kollektive mit zugehöriger Probenanzahl.

3.4 Untersuchung respiratorischer Proben mittels TaqMan-Real-Time-PCR

In dieser PCR wurden die 154 RSV-positiven Eluate im Hinblick auf Koinfektionen mit Herpesviren nachuntersucht. Fehlende Proben des 1. NPA wurden durch das Eluat aus dem 2. NPA ersetzt. In 19 Proben wurde eine Koinfektion mit CMV gemessen. 20 Proben enthielten HHV-6-DNA. Koinfektionen mit EBV ergaben sich bei drei Proben und HSV-1 wurde in lediglich einem Eluat nachgewiesen. Der Einfluss der CMV beziehungsweise HHV-6-Koinfektion auf die klinischen Parameter sowie auf die Laborparameter wurde bestimmt, indem die Kollektive nach isolierter RSV-Infektion und RSV-Koinfektion mit CMV/HHV-6 getrennt ausgewertet und anschließend verglichen wurden. Bezüglich der ECP-Konzentration fand sich dabei kein statistisch signifikanter Unterschied (Abbildung 15).

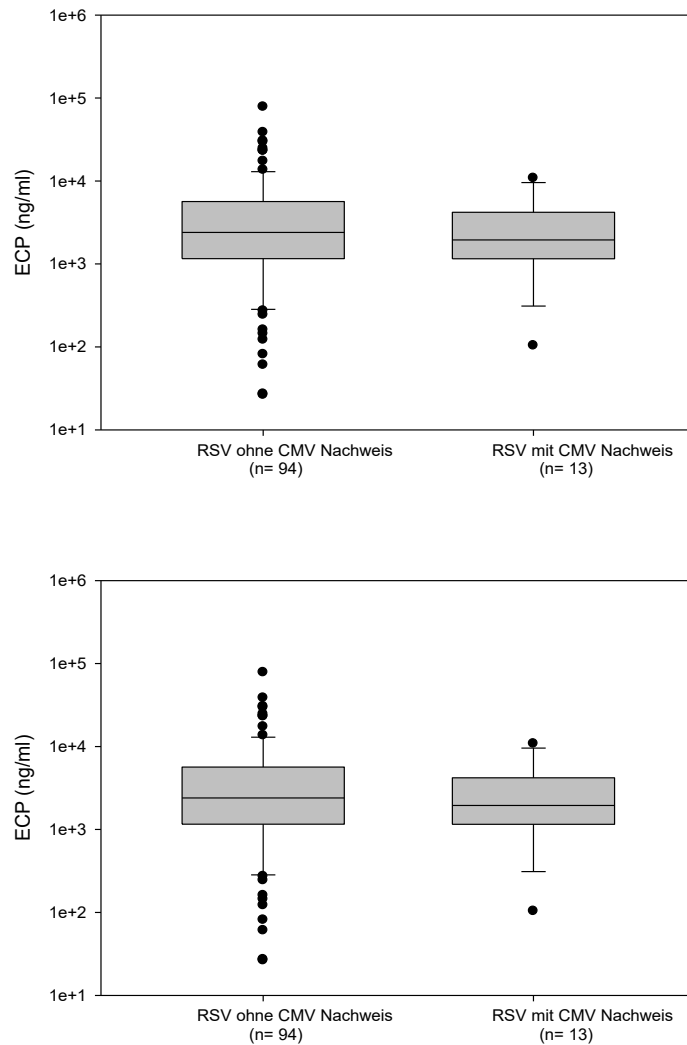


Abbildung 15: ECP-Konzentrationsvergleich in RSV-positiven Proben mit und ohne CMV-Koinfektion, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die ECP-Konzentration in ng/ml an. In der x-Achse befinden sich die Proben unterteilt nach RSV-Infektionen ohne und mit CMV-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

Auch die IL-8-Konzentration wurde verglichen und zeigte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abbildung 16, Abbildung 17). Weder der Vergleich der IL-8-Konzentration des Kollektivs der isolierten RSV-Infektionen mit der CMV-koinfizierten Gruppe (p-Wert von 0,697) noch der Vergleich zur HHV-6-positiven Gruppe (p-Wert von 0,514) erbrachte einen statistisch signifikanten Konzentrationsunterschied.

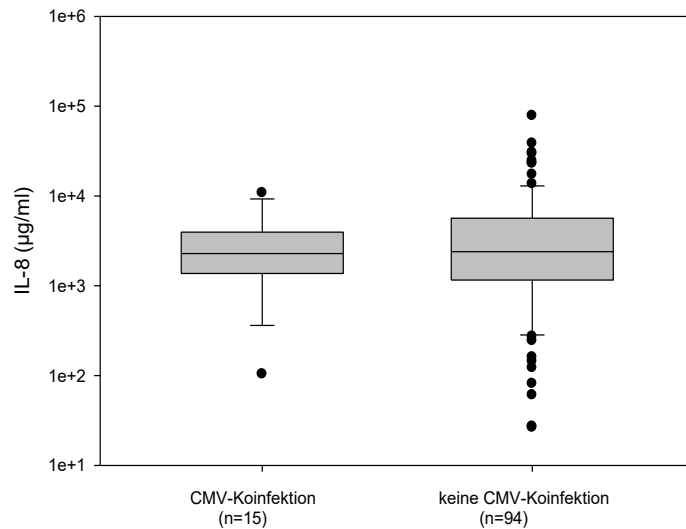


Abbildung 16: Vergleich der IL-8-Konzentration von RSV-positiven Proben ohne und mit CMV-Nachweis, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die IL-8-Konzentration in µg/ml an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben ohne und mit CMV-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

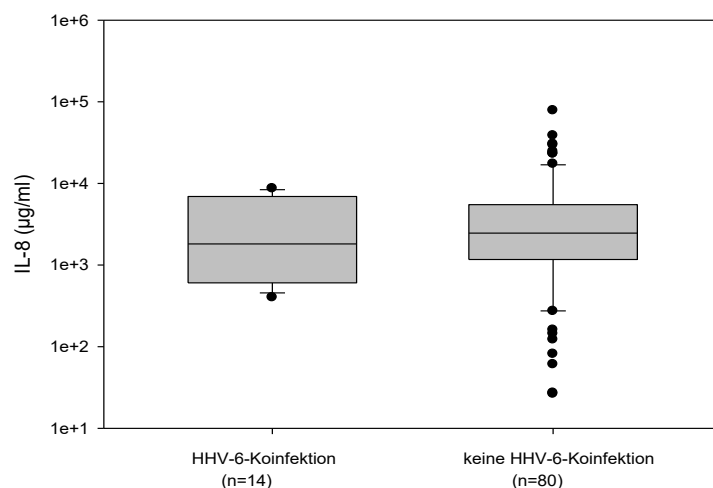


Abbildung 17: Vergleich der IL-8-Konzentration von RSV-positiven Proben ohne und mit HHV-6-Nachweis, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die IL-8-Konzentration in µg/ml an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben ohne und mit HHV-6-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

Ferner erbrachte der Vergleich der Viruslast zwischen der Gruppe der CMV-Koinfektionen und der RSV-Monoinfektionen (p-Wert von 0,158) sowie der HHV-6-Koinfektionen und der RSV-Monoinfektionen (p-Wert von 0,180) keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abbildung 18, Abbildung 19).

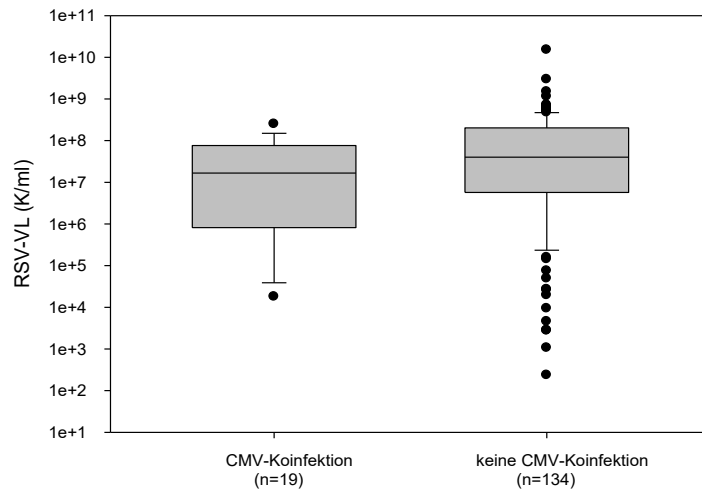


Abbildung 18: Vergleich der RSV-Viruslast zwischen RSV-positiven Proben mit und ohne CMV-Koinfektionen, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die RSV-Viruslast in K/ml an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne CMV-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

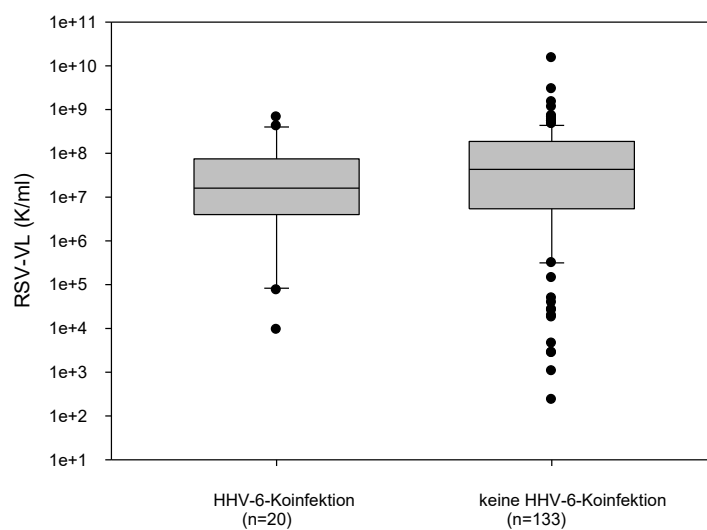


Abbildung 19: Vergleich der RSV-Viruslast zwischen RSV-positiven Proben mit und ohne HHV-6-Koinfektionen, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die RSV-Viruslast in K/ml an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne HHV-6-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

Ein Zusammenhang zwischen erhöhten Infektparametern und einer CMV-Koinfektion, ergab weder beim CRP (p-Wert von 0,457) noch bei den Leukozyten (p-Wert von 0,217) einen statistisch signifikanten Konzentrationsunterschied im Vergleich zur RSV-Monoinfektion (Abbildung 20, Abbildung 21).

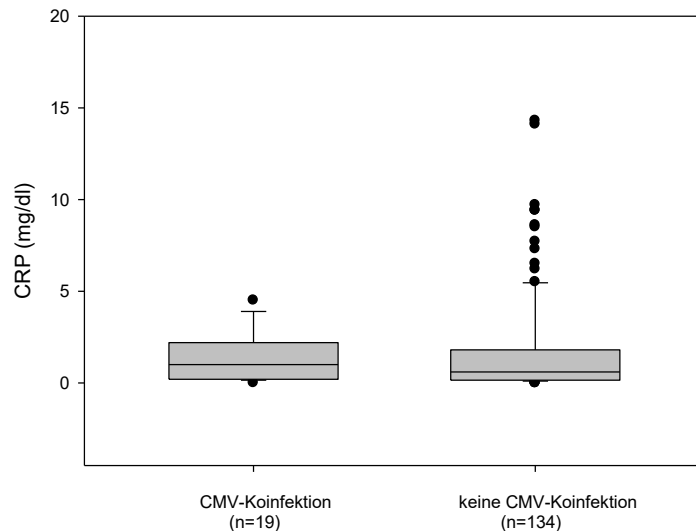


Abbildung 20: Vergleich der CRP-Konzentrationen in RSV-positiven Proben mit und ohne CMV-Koinfektion, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die CRP-Konzentration in mg/dl an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne CMV-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

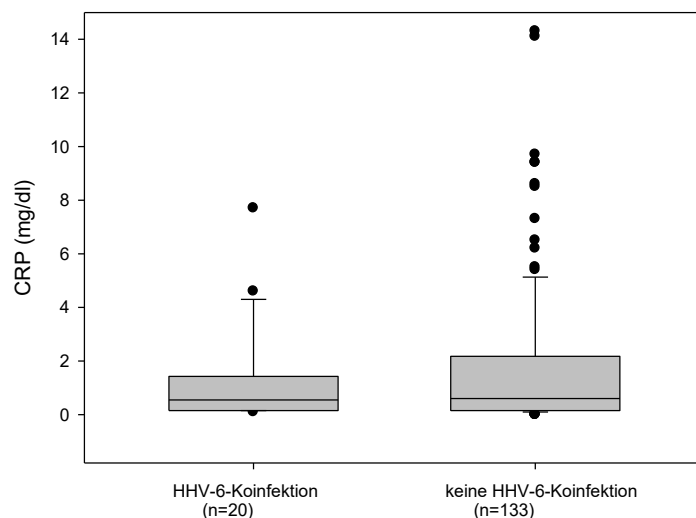


Abbildung 21: Vergleich der CRP-Konzentrationen in RSV-positiven Proben mit und ohne HHV-6-Koinfektion dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die CRP-Konzentration in mg/dl an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne HHV-6-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

Ebenso zeigten sich ähnliche Ergebnisse im Vergleich der Infektparameter der RSV-Monoinfektionen mit HHV-6-Koinfektionen, ohne statistisch signifikanten Konzentrationsunterschieden für das CRP mit einem p-Wert von 0,585 und die Leukozyten mit einem p-Wert von 0,855 (Abbildung 22).

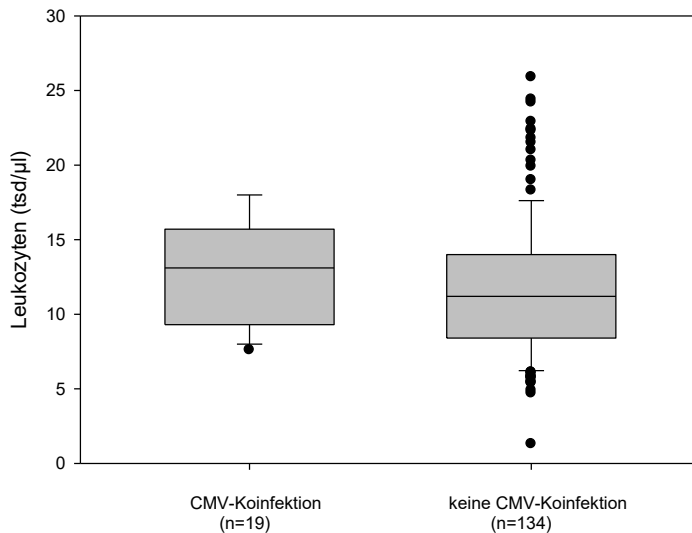


Abbildung 22: Vergleich der Leukozytenkonzentration in RSV positiven Proben mit und ohne CMV-Koinfektion, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Leukozyten-Konzentration in tsd/ μ l an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne CMV-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

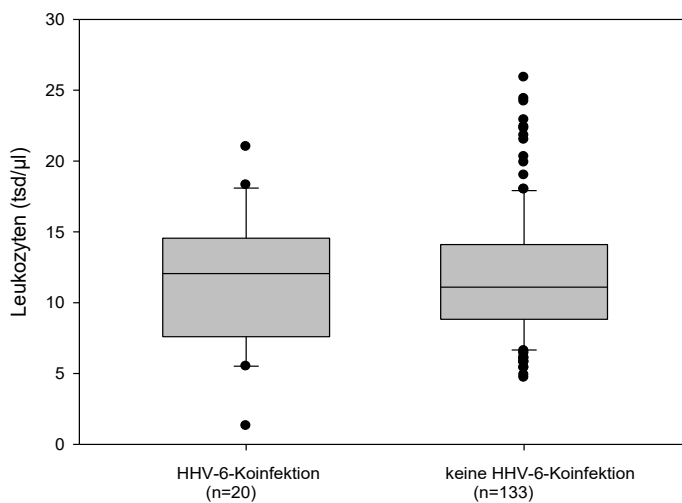


Abbildung 23: Vergleich der Leukozytenkonzentration in RSV-positiven Proben mit und ohne HHV-6-Koinfektion, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Leukozyten-Konzentration in tsd/ μ l an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne HHV-6-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

In den vorab genannten Kollektiven wurden ebenfalls die Temperaturunterschiede der Kinder ausgewertet nachweislich ohne signifikanten Unterschied. Die Kohorte der CMV-koinfizierten Kinder hatte eine Temperatur von 38,8°C im Median im Vergleich zu 38,4°C bei RSV-Monoinfizierten. Ähnlich war es bei den Kindern mit einer HHV-6-Koinfektion bei denen eine mediane Temperatur von 38,5°C im Vergleich zu 38,4°C bei RSV-Monoinfizierten vorlag (Abbildung 24, Abbildung 25).

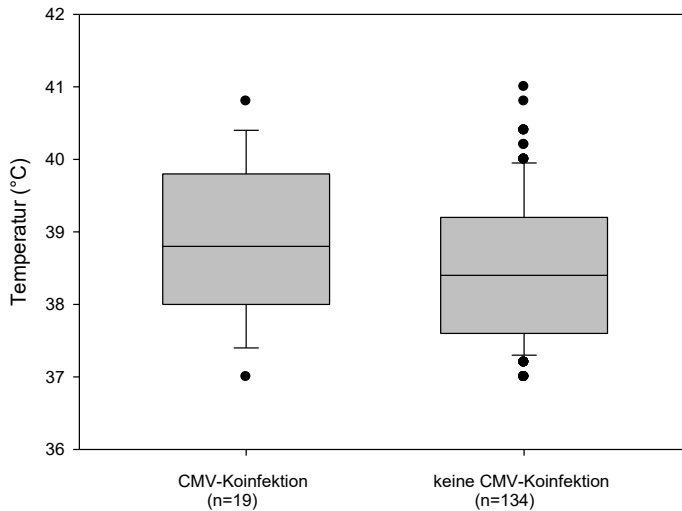


Abbildung 24: Temperaturvergleich zwischen CMV-koinfizierten Kindern und RSV-Monoinfizierten, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Temperatur in °C an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne CMV-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

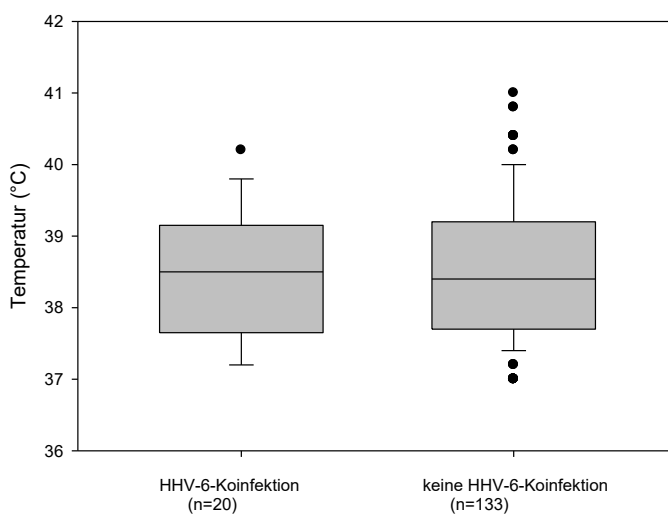


Abbildung 25: Temperaturvergleich zwischen HHV-6-koinfizierten Kindern und RSV-Monoinfizierten, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Temperatur in °C an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne HHV-6-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

Die Auswertung des Alters in der CMV-positiven und CMV-negativen Gruppe ergab einen statistisch signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,020. Das Altersmedian herpesvirusinfizierter Kinder lag bei 0,688 Jahren und somit deutlich über dem, nichtinfizierter Kinder mit 0,422 Jahren. Im Gegensatz dazu wies die HHV-6-positive Gruppe keine signifikante Altersdifferenz zum nichtinfizierten Kollektiv mit einem p-Wert von 0,208 auf (Abbildung 26, Abbildung 27).

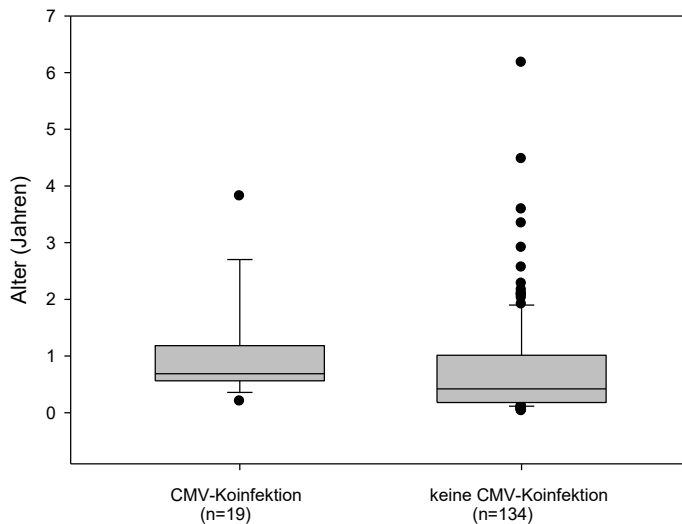


Abbildung 26: Altersvergleich der Kinder des RSV-positiven Kollektivs mit und ohne CMV-Koinfektion, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Alter in Jahren an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne CMV-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

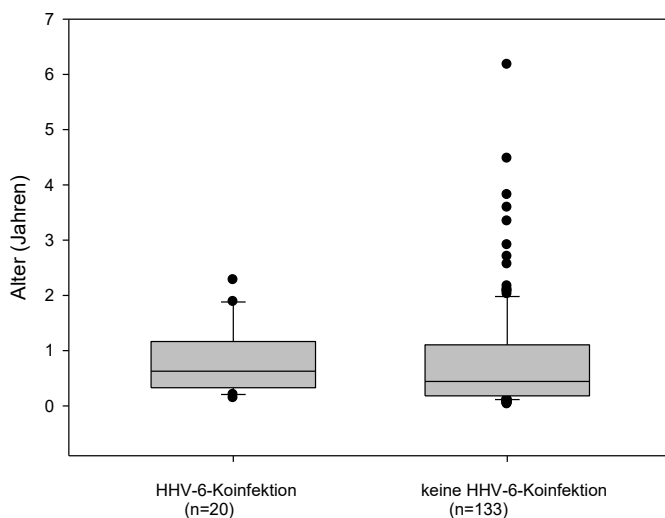


Abbildung 27: Altersvergleich der Kinder des RSV-positiven Kollektivs mit und ohne HHV-6-Koinfektion, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt das Alter in Jahren an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne HHV-6-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

Weder die CMV-Koinfektion mit einem p-Wert von 0,761 noch die HHV-6-Koinfektion mit einem p-Wert von 0,112 führten zu einer statistisch relevanten längeren Liegedauer der infizierten Kinder im Vergleich zum RSV Kollektiv ohne nachgewiesenen Herpesinfektionen (Abbildung 28, Abbildung 29). Insgesamt konnte kein Einfluss einer herpesviralen Koinfektion auf die klinischen Parameter oder die Laborparameter nachgewiesen werden.

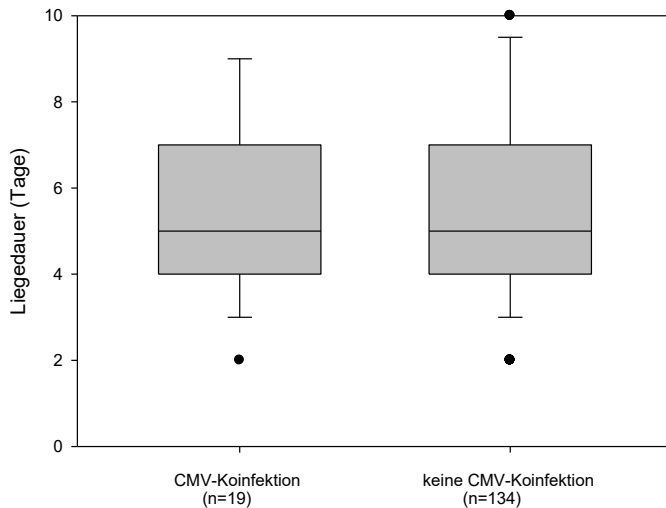


Abbildung 28: Vergleich der Liegedauer der Kinder im RSV-positiven Kollektiv mit und ohne CMV-Koinfektion, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Liegedauer in Tagen an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne CMV-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

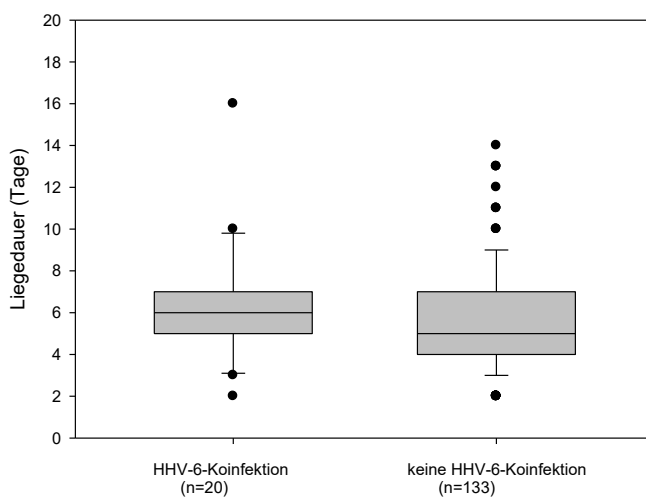


Abbildung 29: Vergleich der Liegedauer der Kinder im RSV-positiven Kollektiv mit und ohne HHV-6-Koinfektion, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Liegedauer in Tagen an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben mit und ohne HHV-6-Koinfektion mit zugehöriger Probenanzahl.

3.5 Auswertung klinischer Daten bezogen auf Alter, Diagnose und Viruslast

Nach Unterteilung der RSV-positiven Kohorte in die RSV-Subtypen A und B, erfolgte die Berechnung des medianen Alters der betroffenen Kinder, hinsichtlich der Frage nach einer subtypenspezifischen Altersverteilung. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht

nachgewiesen werden. Die Altersverteilung der Kinder bei Erstinfektion war unabhängig vom jeweiligen Subtyp und annähernd kongruent (Abbildung 30).

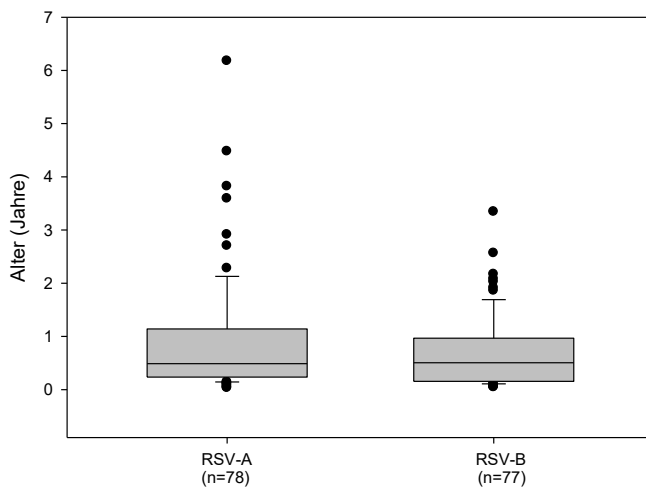


Abbildung 30: Vergleich der Altersverteilung nach Unterteilung des RSV-Kollektivs in die Subtypen A und B, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt das Alter in Jahren an. In der x-Achse befinden sich die RSV-Proben unterteilt nach RSV-A und RSV-B mit zugehöriger Probenanzahl.

Bei der Analyse des Patientenalters in Bezug auf die klinische Diagnose zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,001. Das mediane Alter der Patienten mit Bronchiolitis lag bei 0,233 Jahren, bei Kindern mit Bronchitis bei 0,438 Jahren, bei pädiatrischen Patienten mit obstruktiver Bronchitis betrug es 0,611 Jahre und bei Kindern mit Pneumonie 0,756 Jahre. Eine gegenüberstellende Betrachtung ergab eine statistische Signifikanz mit deutlichem Altersunterschied der Kinder mit einer Pneumonie im Vergleich zu denen mit der klinischen Manifestation einer Bronchiolitis, sowie den Kindern mit obstruktiver Bronchitis im Vergleich zu den Patienten mit einer Bronchiolitis p-Wert $\leq 0,05$ (Abbildung 31). Die Gruppe der Kinder mit Bronchiolitis war insgesamt signifikant jünger.

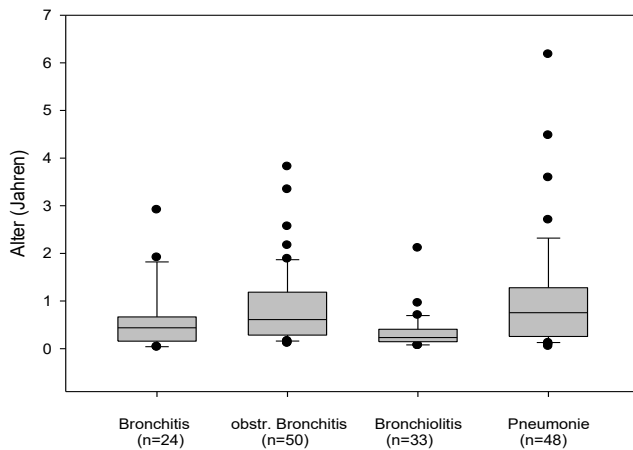


Abbildung 31: Vergleich der Altersverteilung im RSV-Kollektiv nach Unterteilung der RSV-Kohorte nach der klinischen Diagnose der Patienten, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt das Alter in Jahren an. Dargestellt in der x-Achse sind die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

Der Vergleich der Viruslasten zwischen den 1. und 2. NPAs ergab eine statistische Signifikanz p -Wert $\leq 0,001$. Der Median der 1. Probe liegt bei 39608000 K/ml und befindet sich somit wesentlich über dem Median der 2. Probe 1895040 K/ml (Abbildung 32).

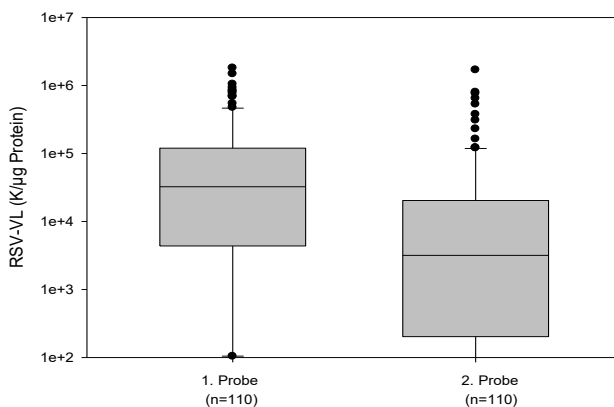


Abbildung 32: Vergleich der RSV-Viruslast zwischen 1. und 2. NPA, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die RSV-Viruslast in K/µg Protein an. Dargestellt in der x-Achse sind die RSV-Proben im zeitlichen Verlauf mit Angabe der Probenanzahl.

Ein Vergleich der Viruslast unterteilt nach RSV-Subtyp A und B wies keinen relevanten Unterschied in der Auswertung auf (Abbildung 33).

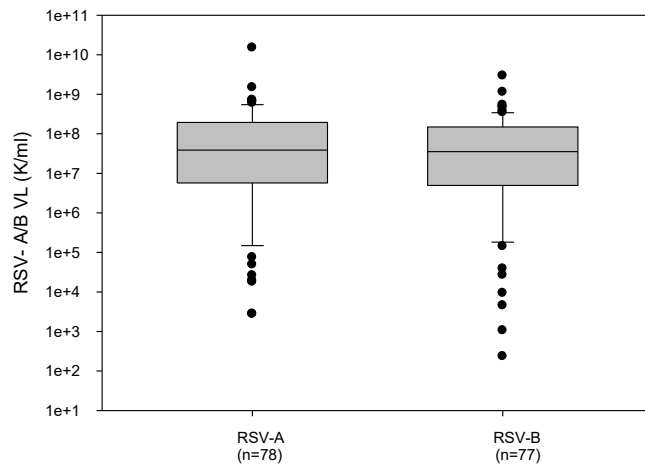


Abbildung 33: Vergleich der RSV-Viruslast innerhalb der Kohorten nach Unterteilung des RSV-Kollektivs in die Subtypen A und B, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die RSV-Viruslast in K/ml an. Dargestellt in der x-Achse sind die RSV-Proben im zeitlichen Verlauf mit Angabe der Probenanzahl.

Die Errechnung des Temperaturmedians nach Unterteilung der RSV-Kohorte nach den klinischen Diagnosen wies deutliche Altersunterschiede in der statistischen Auswertung auf. Der Vergleich des Temperaturmedians der einzelnen Patienten zwischen der Pneumonie und Bronchiolitis-Gruppe ergab einen statistisch signifikanten Unterschied ($p\text{-Wert} \leq 0,001$), welcher ebenfalls im Vergleich zwischen der Pneumonie-Gruppe und der obstruktiven Bronchitis nachgewiesen wurde. Der Temperaturmedian bei der Pneumonie lag bei 39°C , bei der Bronchiolitis bei 38°C und bei der obstruktiven Bronchitis bei $38,1^{\circ}\text{C}$ (Abbildung 34).

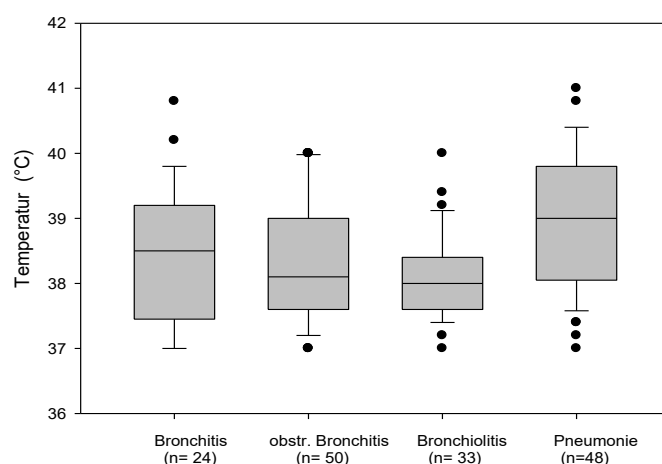


Abbildung 34: Mediane Temperatur nach Unterteilung der Patienten in die zugehörige klinische Diagnose, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Temperatur im °C an. Dargestellt in der x-Achse sind die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

Vergleiche der Viruslast nach Aufteilung der Ergebnisse in die klinischen Diagnosen, wiesen keine statistisch signifikante Abweichung auf p-Wert von 0,301 (Abbildung 35).

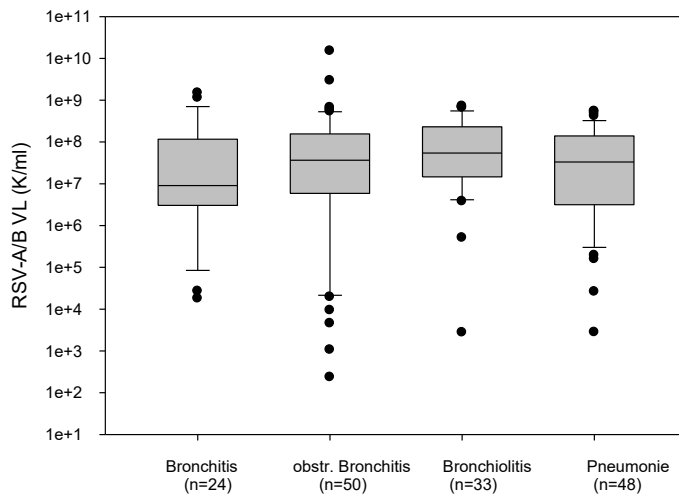


Abbildung 35: Mediane Viruslast nach Unterteilung der Proben in die zugehörige klinische Diagnose, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die RSV-A/B-Viruslast in K/ml an. Dargestellt in der x-Achse sind die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

Ebenfalls wurde der Median der Viruslast nach Unterteilung in die Subtypen RSV-A und RSV-B verglichen, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied (Tabelle 9). Die Viruslast war somit unabhängig vom Subtyp. Auch die Bestimmung der Viruslast nach Unterteilung in die Subtypen zugeordneten klinischen Diagnosen der Patienten, wies weder bei RSV-A mit einem p-Wert von 0,562 noch bei RSV-B mit einem p-Wert von 0,337 einen statistisch signifikanten Unterschied auf (Abbildung 36, Abbildung 37, Tabelle 11). Hiernach erscheint ein Zusammenhang zwischen der Viruslast und der Krankheitsausprägung unwahrscheinlich.

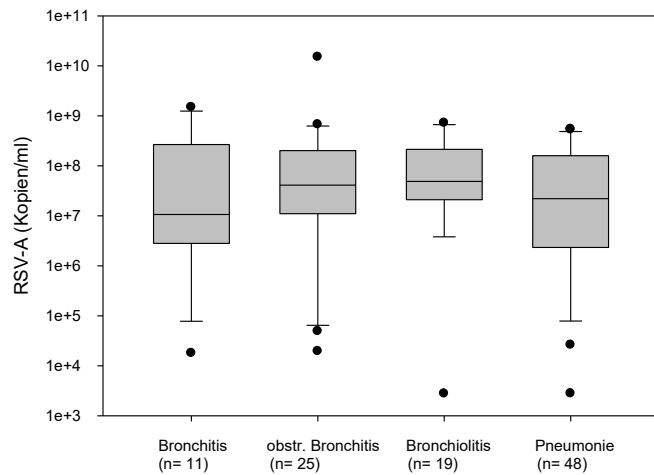


Abbildung 36: Viruslasten bei RSV-A-Infektionen nach Unterteilung in die klinischen Diagnosen, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die RSV-A-Viruslast in Kopien/ml an. Dargestellt in der x-Achse sind die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

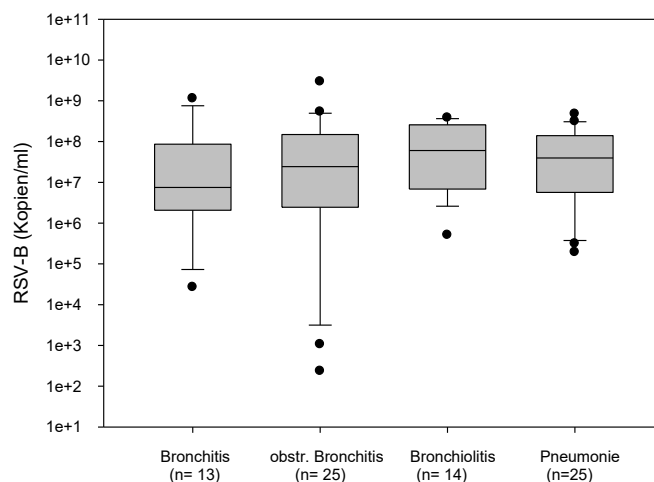


Abbildung 37: Viruslasten bei RSV-B-Infektionen nach Unterteilung in die klinischen Diagnosen, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die RSV-B-Viruslast in Kopien/ml an. Dargestellt in der x-Achse sind die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

Das Rhinovirus-Kollektiv wurde ebenfalls hinsichtlich einer Korrelation zwischen gestellter Diagnose und der Abhängigkeit vom Alter (Abbildung 38) sowie den Diagnosen und der jeweiligen Viruslast (Abbildung 39) untersucht. Im ersten und auch im zweiten Fall konnte keine direkte Korrelation festgestellt werden. Beim Altersvergleich resultiert der p-Wert von 0,085 in der statistischen Auswertung, beim Viruslastvergleich ein p-Wert von 0,133 womit jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied ausgeschlossen werden kann.

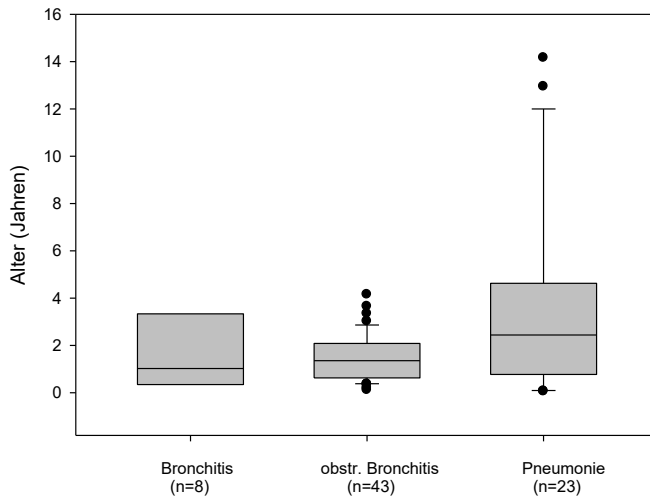


Abbildung 38: Vergleich des Altermedians nach Unterteilung des Rhinovirus-Kollektivs in die klinisch zugeordneten Diagnosen, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt das Alter in Jahren an. Dargestellt in der x-Achse sind die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

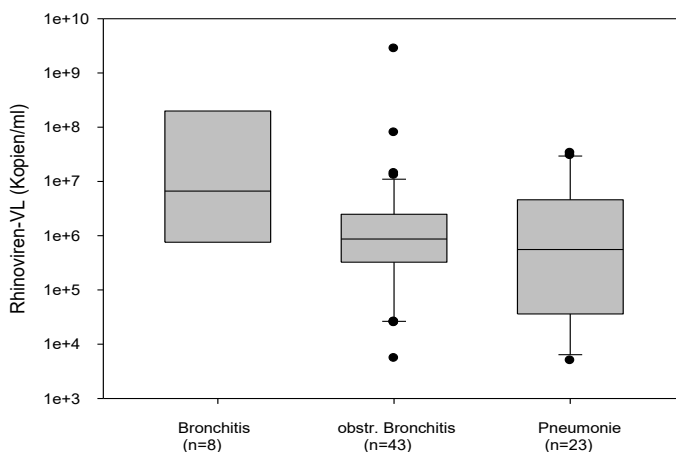


Abbildung 39: Viruslasten bei Rhinovirusinfektionen nach Zuordnung zu der klinischen Diagnose, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Rhinoviren-Viruslast in Kopien/ml an. Dargestellt in der x-Achse sind die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

3.6 Infektparameter im Vergleich

Innerhalb der RSV-Gruppe wurden die Leukozyten- und CRP-Konzentrationen nach Unterteilung in die klinischen Diagnosen hinsichtlich eines Konzentrationsunterschieds miteinander verglichen. Die Auswertung der Leukozytenkonzentrationen ergab einen statistisch signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,0017. Der Median bei der

Leukozytenzahl in der Pneumoniegruppe betrug 13,350 tsd./ μl und bei der Bronchiolitisgruppe 9,6 tsd./ μl . Auch der Vergleich der CRP-Konzentration erbrachte einen statistisch signifikanten Unterschied mit einem p-Wert $\leq 0,001$. Demnach kam es bei einer Pneumonie zum höchsten CRP Anstieg mit 2,2 mg/dl im Vergleich zur Bronchiolitis mit einem CRP-Median von 0,3 mg/dl sowie der obstruktiven Bronchitis mit 0,4 mg/dl (Abbildung 40, Abbildung 41).

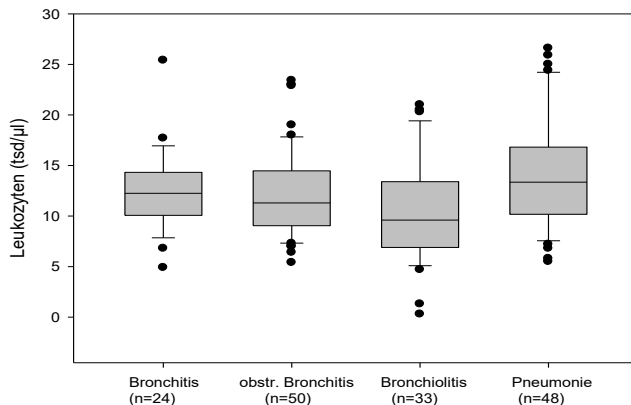


Abbildung 40: Konzentrationsvergleich der maximalen Leukozytenzahl innerhalb der einzelnen Gruppen unterteilt nach klinischen Diagnosen der mit RSV infizierten Kinder, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Leukozyten in tsd/ μl an. Dargestellt in der x-Achse sind die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

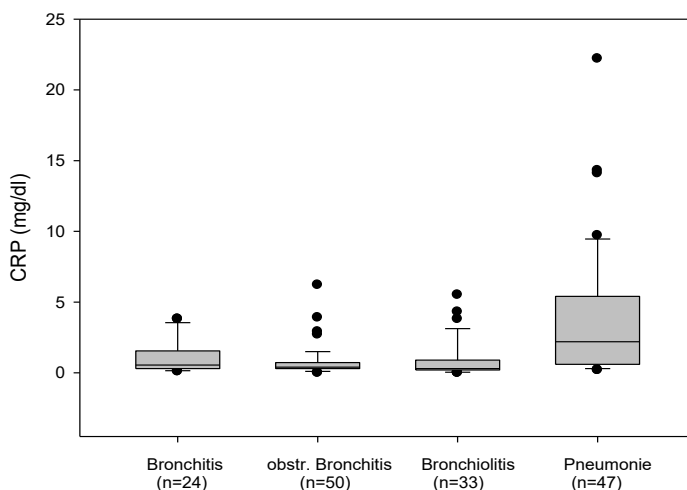


Abbildung 41: Konzentrationsvergleich der maximalen CRP-Konzentration innerhalb der einzelnen Gruppen unterteilt nach klinischen Diagnosen der mit RSV infizierten Kinder, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt das CRP in mg/dl an. Dargestellt in der x-Achse sind die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

Bei den Rhinovirus positiven NPAs wurde ebenfalls ein Vergleich zwischen den Leukozyten-/CRP-Konzentrationen unterteilt nach den einzelnen klinischen Diagnosen durchgeführt. In beiden Fällen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 42, Abbildung 43).

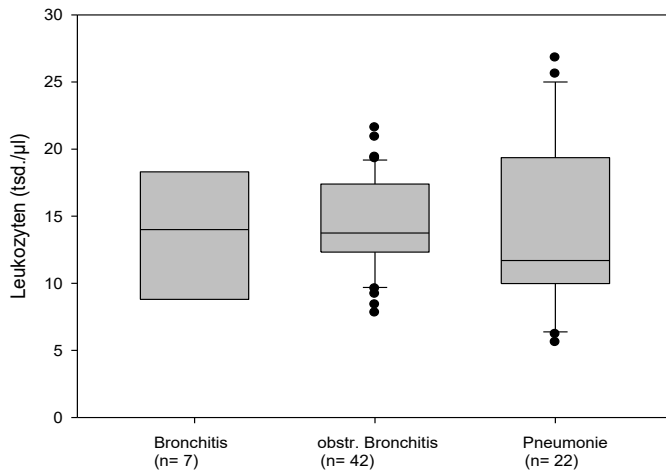


Abbildung 42: Konzentrationsvergleich der maximalen Leukozytenzahl im Rhinovirus-Kollektiv unterteilt nach klinisch zugehöriger Diagnose, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Leukozyten in tsd./ μ l an. Dargestellt in der x-Achse sind die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

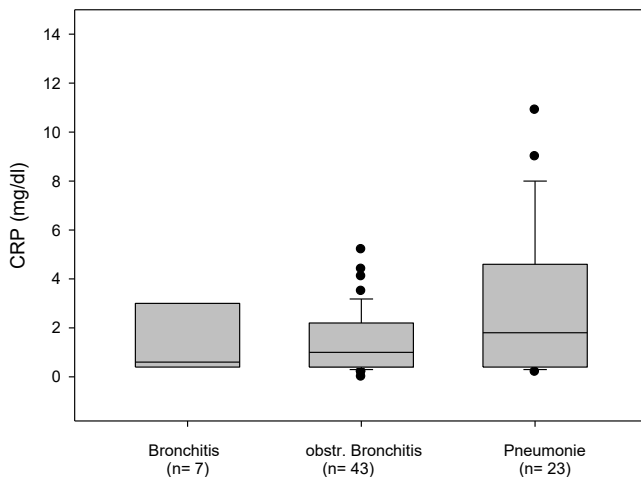


Abbildung 43: Konzentrationsvergleich der maximalen CRP-Konzentration bei Rhinovirusinfektionen unterteilt nach klinisch zugehöriger Diagnose, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt das CRP in mg/dl an. Dargestellt in der x-Achse sind die unterteilten Proben nach Bronchitis, obstruktiver Bronchitis und Pneumonie mit Angabe der Probenanzahl.

3.7 Diagnosen betrachtet nach Standort, Klinik und Infektiologie

Bei der Verteilung der Krankheitsbilder in den Kliniken fiel eine deutlich höhere Rate an Pneumonie-Diagnosen sowohl bei den RSV als auch den mit Rhinovirus infizierten Kindern in Klinik 2 auf (Abbildung 46, Abbildung 47). Diese Diagnose war an beiden Standorten zu fast 100% assoziiert mit einer Röntgenaufnahme des Thorax sowie einer Antibiotikaapplikation (Tabelle 7, Tabelle 8), unabhängig von der Anzahl nachgewiesener bakterieller Erreger (Tabelle 11). Insgesamt wurde jedoch in Klinik 2 häufiger ein Röntgen-Thorax und eine Antibiotikatherapie durchgeführt (Tabelle 12). Ein ebenfalls vermehrter Sauerstoffbedarf sowie eine Erhöhung der Liegedauer lagen klinikungebunden bei diesem Krankheitsbild vor (Tabelle 10). Die Gegenüberstellung der Liegedauer der Patienten mit und ohne Antibiotikaapplikation ergab im RSV- als auch im Rhinovirus-Kollektiv einen statistisch signifikanten Unterschied. Im ersten Fall lagen diese Kinder im Median einen Tag länger d.h. sechs Tage im Krankenhaus (p -Wert $\leq 0,001$) und im zweiten Fall viereinhalb anstelle von vier Tagen ohne Antibiotikum (p -Wert $\leq 0,037$) (Abbildung 44). Die Liegedauer lag in beiden Kliniken bezogen auf das Gesamtkollektiv der mit RSV infizierten Kinder im ähnlichen Zeitrahmen. Der Mittelwert der Liegedauer in Klinik 1 betrug 6,28 Tage und in Klinik 2 5,58 Tage. Der Sauerstoffbedarf korrelierte an beiden Standorten mit der Diagnose und war im Bronchitis-Kollektiv am niedrigsten und im Pneumoniekollektiv am höchsten (Tabelle 10). Das diagnosezugeordnete Alter betrug bei einer diagnostizierten Bronchiolitis im Median 0,233 Jahre, bei der Bronchitis 0,438 Jahre, obstruktive Bronchitis 0,611 Jahre und bei der Pneumonie 0,756 Jahre (Tabelle 9). Das Rhinovirus-Kollektiv weist an beiden Standorten als häufigste Krankheitsausprägung die obstruktive Bronchitis mit über 50% am Gesamtanteil auf (Abbildung 47).

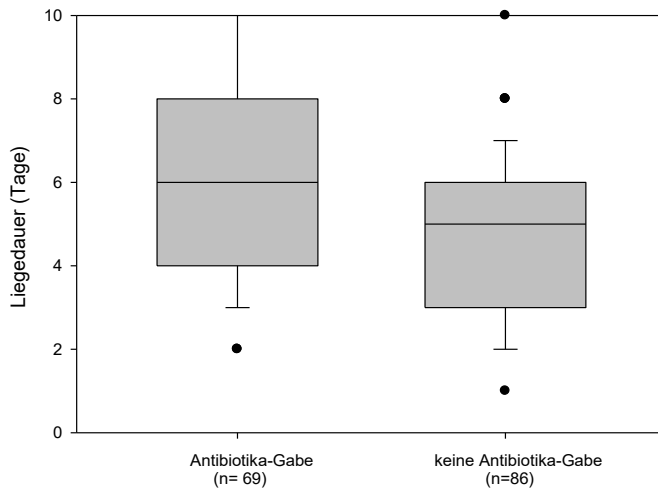


Abbildung 44: Vergleich der Liegedauer der Kinder mit und ohne Antibiotikagabe im RSV-Kollektiv, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Liegedauer in Tagen an. Dargestellt in der x-Achse sind RSV-infizierten Patienten unterteilt nach Antibiotika-Gabe und ohne.

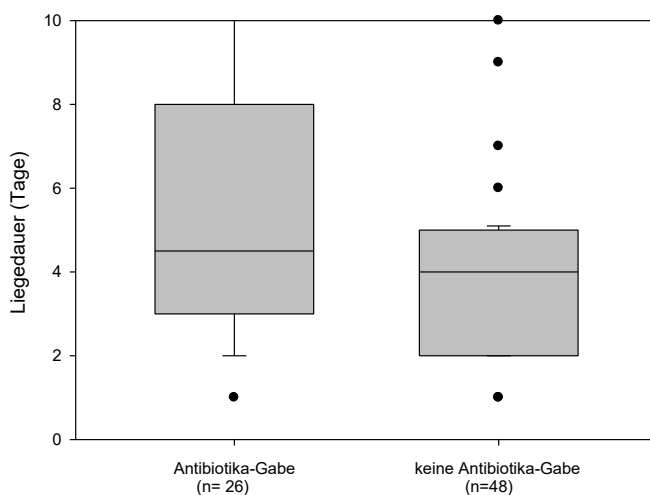


Abbildung 45: Vergleich der Liegedauer der Kinder mit und ohne Antibiotikagabe im Rhinovirus-Kollektiv, dargestellt in Box-plots Die zusätzliche Linie in dem Balkendiagramm bildet den Median ab, das 50. Perzentil. Die Box begrenzt nach unten hin das 25%-Quantil und nach oben hin das 75%-Quantil. Die Antennen stellen das Minimum und Maximum der Datenreihe dar. Die y-Achse gibt die Liegedauer in Tagen an. Dargestellt in der x-Achse sind Rhinovirus-infizierten Patienten unterteilt nach Antibiotika-Gabe und ohne.

Klinik 1 RSV-Infektionen	Patienten		Antibiotika		Röntgen Thorax	
	n	%	n	%	n	%
Bronchitis	12	17,4	1	8,3	1	8,3
obstruktive Bronchitis	32	46,4	5	15,6	1	3,1
Bronchiolitis	17	24,6	4	23,5	2	11,8
Pneumonie	8	11,6	7	87,5	8	100

Klinik 2 RSV-Infektionen	Patienten		Antibiotika		Röntgen Thorax	
	n	%	N	%	n	%
Bronchitis	12	14,0	4	33,3	6	50,0
obstruktive Bronchitis	18	20,9	4	22,2	4	22,2
Bronchiolitis	16	18,6	5	31,3	5	31,3
Pneumonie	40	46,5	39	97,5	38	95,0

Tabelle 7: Unterteilung der mit RSV infizierten Kinder nach klinischer Diagnose in Klinik 1 und 2. Die Tabellen führen den prozentualen Anteil der Patienten auf, welche ein Antibiotikum oder eine Röntgenaufnahme des Thorax erhielten.

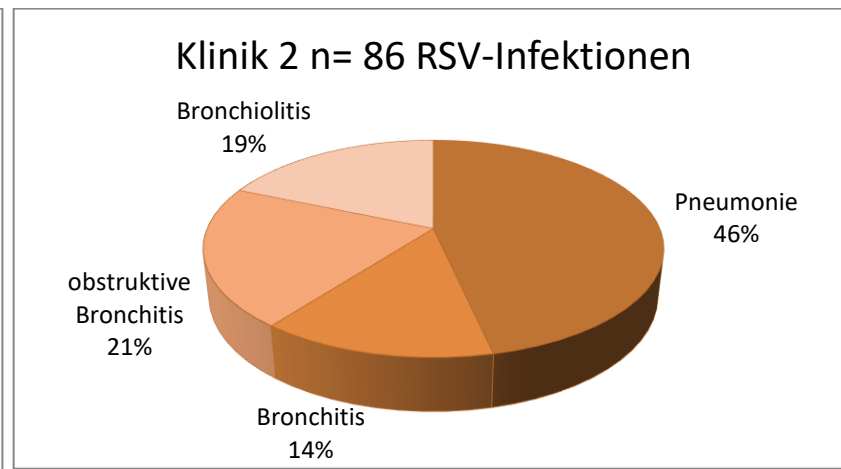
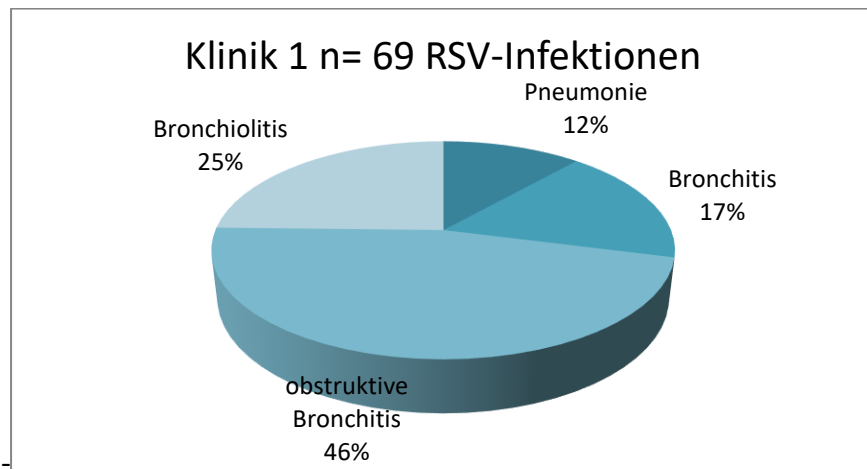


Abbildung 46: Prozentuale Verteilung der RSV-infizierten Kinder nach klinischer Diagnose in beiden Kliniken bei 69 Kindern in Klinik 1 und 86 Kindern in Klinik 2.

Klinik 1 Rhinovirusinfektionen	Patienten		Antibiotika		Röntgen Thorax	
	n	%	n	%	n	%
Bronchitis	5	19,2	1	20	1	20
obstruktive Bronchitis	16	61,5	0	0	2	12,5
Pneumonie	5	19,2	5	100	5	100

Klinik 2 Rhinovirusinfektionen	Patienten		Antibiotika		Röntgen Thorax	
	n	%	n	%	n	%
Bronchitis	3	6,25	1	33,3	2	66,7
obstruktive Bronchitis	27	56,3	3	11,1	10	37
Pneumonie	18	37,5	16	88,9	18	100

Tabelle 8: Unterteilung der hospitalisierten RV-positiv getesteten Kinder nach klinischer Diagnose Aufgelistet wurde die prozentualen Antibiotikaverordnungen sowie Röntgenaufnahmen jeweils den einzelnen Krankheitsgruppen zugeordnet. Links in Klinik 1 und rechts in Klinik 2.

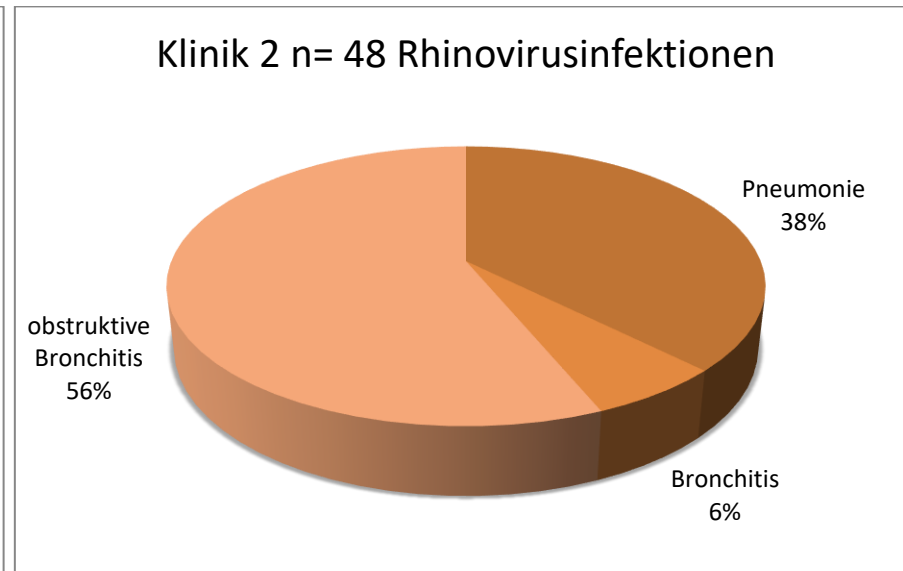
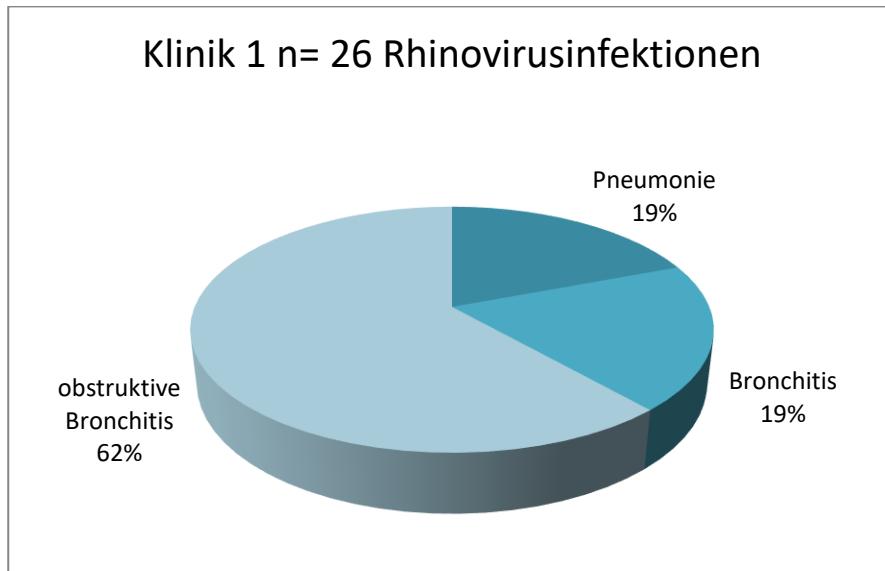


Abbildung 47: Prozentuale Verteilung RV-infizierter Kinder nach klinischen Diagnosen in beiden Kliniken In Klinik 1 lagen 26 hospitalisierte Kinder, in Klinik 2 lagen 48 RV-positive Kinder im genannten Untersuchungszeitraum.

Diagnose	n	Median Alter in Jahren	Median CRP max. (mg/dl)	Median Leukozyten max.(tsd/ μ l)	Anzahl der Kinder mit grob/ feinblasige Rasselgeräuschen	Median Fieber
Bronchitis	24	0,438 (0,03-2,91)	0,55 (<0,3-6,3)	12,2 (11,3-25,4)	12	38,5°C (37,0-40,8)
obstruktive Bronchitis	50	0,611 (0,12-3,82)	0,4 (<0,3-6,2)	11,3 (5,4-23,4)	27	38,1°C (37,2-40,0)
Bronchiolitis	33	0,233 (0,07-2,11)	0,3 (0,0-5,5)	9,6 (0,3-21,0)	20	38°C (37,0-40,0)
Pneumonie	48	0,756 (0,09-4,48)	2,2 (<0,3-25,9)	13,35 (5,5-26,6)	40	39°C (37,0-41,0)

Tabelle 9: Die Tabelle zeigt die Aufteilung RSV-infizierter Kinder nach klinischer Diagnose Aufgeführt sind die jeweiligen Mediane des Alters, des CRPs, der Leukozytenzahl und des Fiebers. Zusätzlich benannt ist die Anzahl der Kinder mit dem klinischen Symptom Rasselgeräusche. In Klammern angegeben ist jeweils die „range“(min-max).

Diagnose	n	Summe Dauer O ₂ -Bedarf (h)	Mittelwert Dauer O ₂ -Bedarf (h)	Summe Dauer O ₂ -Bedarf (h) K1	Mittelwert Dauer O ₂ -Bedarf (h) K1	Liegedauer K1 Tage G= Gesamt M= Mittelwert	Summe Dauer O ₂ -Bedarf(h) K2	Mittelwert Dauer O ₂ -Bedarf(h) K2	Liegedauer K2 Tage G= Gesamt M= Mittelwert	Grunderkrankung/ Frühgeburt (vor 36 SSW.)
Bronchitis	24	n= 6 177 (0-60)	29,5 (0-60)	n= 3 82	27,3 (0-49)	G= 67 M= 5,6 (2-8)	n= 3 95	31,7 (0-60)	G= 41 M= 3,4 (2-5)	7
obstruktive Bronchitis	50	n= 14 526,5 (0-87)	37,6 (0-87)	n= 12 433,5	36,1 (0-96)	G= 170 M= 5,31 (3-16)	n= 2 93	46,5 (0-81)	G= 67 M= 3,72 (1-8)	16
Bronchiolitis	33	n= 20 1085,5 (0-174)	54,3 (0-174)	n= 12 654	54,5 (0-194)	G= 104 M= 6,12 (3-13)	n= 8 431,5	53,9 (0-121,5)	G= 101 M= 6,31 (3-11)	12
Pneumonie	48	n= 24 2160,5 (0-333)	90 (0-333)	n= 5 346,5	69,3 (0-196)	G= 92 M= 7,67 (3-14)	n= 19 1814	95,5 (0-333)	G= 271 M= 6,78 (2-37)	22

Tabelle 10: Aufteilung RSV-infizierter Kinder nach den klinischen Diagnosen. Es erfolgte die Auswertung der klinischen Daten (Sauerstoffbedarf in Stunden und Liegedauer in Tagen), unterteilt nach Klinik 1 (blau) und Klinik 2 (orange) (Grunderkrankung = z.B. persistierendes Foramen ovale, Anämie, rezidivierende Bronchitiden, Mikrocephalie)

Diagnose	n	Anzahl Infektionen RSV-A	Median Viruslast RSV-A (K/ ml)	Anzahl Infektionen RSV-B	Median Viruslast RSV-B (K/ ml)	CMV-Koinfektionen	HHV-6-Koinfektionen	Häufigkeit viraler 2.Erreger	Bakterielle Erreger (reichlich)
Bronchitis	24	11	10.653.480 (17.880-1.488.000.000)	13	7.481.880 (26.824-1.142.400.000)	3	5	3	8
obstruktive Bronchitis	50	25	41.220.000 (19.536-600.000.000)	25	24.244.350 (234-537.600.000)	10	4	7	7 davon zwei mit 2 Erregern reichlich
Bronchiolitis	33	19	48.712.000 (2.760-720.000.000)	14	60.553.050 (509000-383.000.000)	2	4	4	11
Pneumonie	48	23	22.016.880 (2.790-542.400.000)	25	39.608.000 (313.350-472.800.000)	4	7	11	13 davon zwei mit 2 reichlich Erregern

Tabelle 11: Unterteilung des RSV-Kollektivs nach klinischen Diagnosen der Kinder Ausgewertet wurde die mediane RSV-Viruslast, unterteilt nach RSV-A und RSV-B sowie bakterieller/ viraler Koinfektionen. Ebenfalls aufgezählt sind die Herpesvirus-Koinfektionen mit CMV und HHV-6 im RSV Gesamtkollektiv.

	Röntgen RSV		Antibiotika RSV		RSV Infektionen	Röntgen Rhinovirus		Antibiotika Rhinovirus		Rhinovirus Infektionen
	n	%	N	%	N	n	%	n	%	n
Klinik 1	12	17,4	17	24,6	69	8	30,8	6	23,1	26
Klinik 2	53	61,6	52	60,5	86	30	62,5	20	41,7	48

Tabelle 12: Prozentuale Verteilung der Röntgenaufnahmen und Antibiotikaverordnungen im Kollektiv RSV- und RV-Infizierter Betrachtet wurde die Verteilung in den beiden Kliniken (Klinik 1 und 2), unterteilt nach RSV- und Rhinovirus-Kollektiv.

4. Diskussion

4.1 Nachweis von Immunglobulin A und Immunglobulin G im Nasopharynxaspirat

In dieser Arbeit konnte mit Ausnahme von 4 aus 110 Proben weder Immunglobulin A noch Immunglobulin G im Nasopharynxaspirat nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist der Zeitpunkt der Probeentnahme am Patienten. Das 1. NPA wurde innerhalb der ersten 24 Stunden der Hospitalisation und das 2. NPA zwei Tage später entnommen. Somit stellt sich die Frage, ob bereits in diesem Zeitraum eine messbare lokale Immunreaktion stattgefunden hat. So fand eine Forschungsgruppe zellungebundene IgA-Antikörper bereits im Jahr 1979 im Durchschnitt erst 3,5 Tage später als zellgebundene IgA-Antikörper (McIntosh, McQuillin, and Gardner, 1979). Auch diese waren ebenfalls in den NPAs der Erkrankten erst nach einer mittleren Hospitalisationsdauer von 2,3 Tagen messbar. Innerhalb der ersten zwei Tage wurden bei kleinen Kindern freie IgA-Antikörper nachgewiesen. Im Vergleich zu unseren Untersuchungen konnte IgG im Rahmen einer anderen Arbeit, wenn auch in geringer Konzentration, bereits mehrfach in der ersten Probe nachgewiesen werden. Die damals gewählte Untersuchungsmethode zum Nachweis von Antikörpern war die Immunfluoreszenz. Eine andere Arbeitsgruppe fand in Ihrem Kollektiv bei einem Drittel der Proben einen primären Anstieg des Immunglobulin G frühestens drei Tage nach Krankheitsbeginn, wobei ein Maximum erst nach zwei bis vier Wochen erreicht wurde (Kaul, Welliver, and Ogra, 1982). Die mittlere Krankheitsdauer der 110 RSV positiv getesteten Kinder in unserer Studie betrug zum Abnahmezeitpunkt des 1. NPAs drei Tage und fiel theoretisch in die Phase des frühestmöglichen Immunglobulinnachweises, wobei wir die Zeitspanne zwischen dem IgG-Maximum und einem sicheren Nachweis gar nicht erfasst haben. Die Tatsache, dass in unseren Proben keine freien IgG-Antikörper nachgewiesen wurden, kann möglicherweise an den vorab mehrfach durchgeführten Auftau- und Gefrierprozessen liegen, die zu einer Zerstörung der Immunglobuline geführt haben könnten. Ein zu diskutierender technischer Durchführungsfehler erscheint bei korrekter Positiv- und Negativkontrolle, die bei jeder Testreihe vorlag, unwahrscheinlich.

4.2 Quantitative IL-8-Bestimmung mittels Sandwich-ELISA

In unserem Kollektiv konnte eine bei RV-Infektionen signifikant höhere IL-8-Konzentration im Vergleich zu der von hMPV oder RSV nachgewiesen werden. In einer anderen Studie wurde

hingegen eine höhere IL-8-Konzentration im RSV-Kollektiv gefunden (Garcija et al., 2012). Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Resultate ist möglicherweise unser zweifach (Rhinovirusgruppe n=49) bzw. fünffach (RSV-Gruppe n=108) größeres Patientenkollektiv. Im Gegensatz zu unserer Studie wurden Kinder mit rezidivierend auftretendem Giemen/Keuchen ausgeschlossen und nur Kinder mit einer Erstmanifestation dieses Symptoms in die Studie aufgenommen. Dies kann womöglich zu den unterschiedlichen Untersuchungsergebnissen geführt haben. In einer experimentellen in vitro Studie, in der die Pathogenese des RS-Virus untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten des Nicht-Strukturproteins NS1 in einer gesteigerten Reifung der dendritischen Zellen mit konsekutiv erhöhten Interferon-Werten und somit einer erhöhten Cytokin/Chemokin Produktion resultierte (Munir et al., 2008). Im Umkehrschluss führt dies zu einer eingeschränkten Proteinproduktion bei einem intakten RS-Virus. Dies wiederum würde unsere Ergebnisse stützen und die am niedrigsten gemessenen IL-8-Konzentrationen beim RS-Virus erklären. Die IL-8-Expression in unseren Untersuchungen korreliert in keinem der drei Kollektive mit der Schwere der Erkrankung. Somit scheint die IL-8-Produktion zu keinem veränderten Schweregrad zumindest bei den RSV-Infizierten zu führen. In einer publizierten Studie mit 289 Kindern wurde wie bei uns keine Korrelation zwischen IL-8-Konzentration und Krankheitsschweregrad gefunden. Nasopharynxaspirate wurden in dieser Studie bei Erreichen eines Punktwertes von 5 in einem Symptomscore entnommen. Ein zusätzliches Aufnahmekriterium der infizierten Kinder dieser Studie war ein bekanntes Asthma bronchiale oder ein Atopiker unter den Eltern, also die körperliche Bereitschaft, auf Kontakt mit natürlichen Umweltstoffen mit gesteigerter IgE-Bildung zu reagieren (Gern et al., 2002). Eine weitere Arbeitsgruppe hingegen konnte eine Korrelation zwischen Schweregrad der Krankheit (anhand eines Symptomscores) und der IL-8-Konzentration beim RS-Virus nachweisen. In dieser wurden Trachealaspirate von 14 intubierten und Nasopharynxaspirate von 14 nichtintubierten Kindern untersucht. Die Kontrollgruppe bestand aus sieben nichtinfizierten Kindern. Der Aufnahmegrund der nichtintubierten Kinder war wie auch bei uns eine Bronchiolitis oder Pneumonie. Bei den intubierten Kindern war der Aufnahmegrund ebenfalls Bronchiolitis oder Pneumonie, drei wurden mit Apnoe aufgenommen (Sheeran et al., 1999). Möglicherweise liegt der Unterschied darin, dass die Patienten unserer Studie eine schwere Infektion des unteren Respirationstrakt mit unterschiedlicher Manifestation hatten, die zur Hospitalisation geführt haben, das heißt, milde Krankheitsverläufe wurden hier nicht erfasst und untersucht. Faktoren, die zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Korrelation zwischen IL-8 und Schweregrad der

Erkrankung führen, können unter anderem die unterschiedlichen Aufnahmekriterien sein; unser Kollektiv bestand nur aus hospitalisierten, infizierten Kindern. Andererseits waren die Patienten in der vorab zitierten Arbeit mit den gleichen Aufnahmediagnosen hospitalisiert und teilweise intubiert, mit Nachweis einer Korrelation zwischen Schweregrad der Krankheit und der IL-8-Konzentration. Zu vermerken ist jedoch das vergleichsweise kleine Kollektiv von 28 Patienten. Die IL-8-Konzentration in unseren Untersuchungen ist also abhängig vom jeweiligen Virus (RSV, RV, HMPV) bzw. dessen Immuninduktion und zeigt im Krankheitsverlauf keinen wesentlichen Anstieg mehr. Einen Unterschied in der IL-8-Konzentration zwischen den RSV-Subtypen A und B fanden wir nicht. Dies konnte auch in anderen Untersuchungen ausgeschlossen werden (Smyth et al., 2002), wobei hier unterschiedliche Genotypen und nicht nur Subtyp A und B untersucht wurden. In der genannten Arbeit konnte eine direkte Korrelation zwischen IL-8-Konzentration und Krankheitsschwere gefunden werden, womit die Vermutung nahe liegt, dass nicht das Virus, sondern die Immunreaktion des einzelnen Wirtes für die Manifestation ursächlich ist. Auch beim RV wurden in anderen Studien erhöhte IL-8-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Schweregrad nachgewiesen (Gern et al., 2002) (Vandini et al., 2017), wobei auch hier mittels Symptomscore gearbeitet wurde und sogar IL-8-Anstiege für eine Rhinitis erhoben worden sind. Andere Arbeitsgruppen untersuchten *in Vitro* den postinfektiösen Chemokinanstieg in RSV-infizierten Zellen und wiesen eine maximale IL-8-Freisetzung nach 24 Stunden mit anschließender Plateau-Phase auf (Turner et al., 1998) (Noah and Becker, 1993). Diese Ergebnisse decken sich mit unseren, da sich die Symptome erst nach 24 Stunden manifestieren und das 1. NPA frühestens zu diesem Zeitpunkt entnommen wurde. Im Vergleich der IL-8-Konzentrationen zwischen RSV- und HMPV- positiven Proben gibt es kontroverse Forschungsergebnisse. So wurden in einer finnischen Studie höhere Konzentrationen im HMPV Kollektiv gemessen (Jartti et al., 2002). In einer weiteren prospektiven Studie ergab der Vergleich höhere IL-8-Spiegel bei RSV infizierten Kindern (Schildgen et al., 2011) (Laham et al., 2004).

4.3 Quantitative Bestimmung des eosinophilen kationischen Proteins

Mit dem ECP wollten wir einen Parameter finden, welcher zur Beurteilung einer Infektion beziehungsweise deren Schweregrad hinzugezogen werden kann und dessen Konzentration gegebenenfalls auch bereits ohne nachgewiesenes Virus einen Rückschluss auf die jeweilige Virusinfektion erlaubt (Venge et al., 1999). In unseren Untersuchungen konnten jedoch keine

relevanten Unterschiede der lokalen Immunantwort zwischen den einzelnen Virustypen sowie den RSV-Subtypen nachgewiesen werden und auch kein wesentlicher Anstieg im Verlauf einer RSV-Infektion. In einer weiteren Studie wurden zwar signifikant höhere ECP-Konzentrationen bei kranken Kindern im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrollgruppe nachgewiesen, eine erhöhte Konzentration bei RSV-infizierten Kindern im Vergleich zu RSV-negativen Infektionen konnte ebenfalls nicht bestätigt werden (Ingram et al., 1995). Ähnliche Resultate erzielten auch andere Studien, wobei diese eine deutlich höhere ECP-Konzentration in den NPAs bei der RSV-positiven Bronchiolitis nachwies (Kim, Lee, and Lee, 2007) (Garofalo et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit haben wir jedoch nur die ECP-Konzentrationen in RSV positiven Proben bestimmt, eine Negativkontrollgruppe wurde nicht untersucht. Somit ist eine abschließende Aussage, ob ein erhöhter ECP-Spiegel gegenüber gesunden Kindern bestand, nicht möglich. Im Vergleich zu den IL-8-Konzentrationen im 1. und 2. NPA blieb die ECP-Konzentration in beiden Proben gleich. In einer anderen Arbeitsgruppe konnte ein deutlicher Konzentrationsabfall des ECPs als auch des IL-8 nach eingetretener Genesung nachgewiesen werden (Norzila et al., 2000). Hier bestand jedoch ein deutlich längerer zeitlicher Abstand zur Kontrollprobe (zwei Wochen), wobei unser Abnahmezeitpunkt möglicherweise noch in die akute Phase der Immunreaktion gefallen ist.

4.4 Untersuchung respiratorischer Proben mittels TaqMan-Real-Time-PCR

Der Anteil an CMV-Koinfektionen in dieser Arbeit betrug 12,3%. Gründe für eine CMV-Koinfektion können eine asymptomatische Primärinfektion, latente asymptomatische Persistenz oder Reaktivierung sowie die Monate anhaltende Virusausscheidung nach kongenitaler Infektion sein (Fuller et al., 2005). Der isolierte Nachweis des Virus ohne spezifische Antikörper lässt diesbezüglich keine Differenzierung zu (Tanaka et al., 2000). Im Vergleich zu der CMV-negativen Kohorte war der einzig signifikante Unterschied das höhere Alter der mit CMV koinfizierten Kinder. Es gibt bisher wenige Untersuchungen zu diesen Viruskoinfektionen. In einer Arbeitsgruppe untersuchte man mittels einer retrospektiven Analyse klinischer Daten, die Koinfektionen und Liegedauer von Patienten mit respiratorischen Virusinfektionen. In diesem Patientenkollektiv war die Liegedauer bei einer RSV/CMV-Koinfektion signifikant länger (Fuller et al., 2005). Eine diesbezügliche Korrelation konnten wir nicht bestätigen. Sicherlich war unser Kollektiv weitaus kleiner, jedoch der prozentuale Anteil an CMV-Koinfektionen wesentlich höher. In der genannten Arbeit wurde bereits auf die mögliche

Wahrnehmungsverzerrung und Therapieänderung der behandelnden Ärzte hingewiesen, die während des Klinikaufenthaltes über alle Koinfektionen ihrer Patienten informiert wurden. In dieser Dissertation erfolgte der CMV-Nachweis jedoch erst im Nachhinein und konnte damit keinen Einfluss haben auf Therapieentscheidungen. Ebenfalls wurde die klinisch schwere Differenzierung zwischen der RSV-Pneumonie und der durch CMV ausgelösten Pneumonie beschrieben (Fuller et al., 2005). Schließen wir aus unseren Daten, dass es keine Korrelation zwischen einer RSV-Infektion und einem relevanten IL-8-Anstieg gibt (Gern et al., 2002) (Sheeran et al., 1999), sollte eine symptomatische CMV-Koinfektion zur nachweislich gesteigerten, durch NF- κ B aktivierten IL-8-Produktion führen (Murayama et al., 2000) (Craig et al., 1997). Da dies jedoch aus unseren Daten nicht hervorgeht, könnte man annehmen, dass der CMV-Nachweis keine klinische Relevanz besitzt. Auch bei immunsupprimierten Patienten wurden asymptomatische CMV-Träger nachgewiesen (Tanaka et al., 2000). Somit ist es ebenfalls denkbar, dass in unserem nicht immunsupprimierten Patientenkollektiv asymptomatische Träger nachgewiesen wurden. In dem Kollektiv der HHV-6-Koinfektionen konnten wir anhand der verglichenen Parameter keine Unterschiede zur HHV-6 negativen Kohorte aufweisen. Ein möglicher Grund für den Nachweis ist die nach Primärinfektion lebenslange asymptomatische Persistenz des Erregers im Wirt. Eine Primärinfektion ist auch hier erschwert zu unterscheiden, weil sie ebenfalls zu febrilen Temperaturen führen kann (Strausbaugh et al., 2001). Das in nur 20% der Fälle beschriebene Exanthema subitum als Hinweis für eine Primärinfektion wurde in unserem Kollektiv nicht beschrieben.

4.5 Auswertung klinischer Daten bezogen auf Alter, Diagnose und Viruslast

In den Nasopharynxaspiraten der vorliegenden Studie wurden zwischen den einzelnen Diagnosen/Krankheitsmanifestationen keine signifikant unterschiedlichen Viruslasten nachgewiesen. Eine andere Studie konnte hingegen eine Korrelation zwischen Krankheitsschwere und Viruslast nachweisen, wobei die Krankheitsschwere über Parameter wie Atemfrequenz, Liegedauer und mechanische Beatmung definiert wurde (Fodha et al., 2007). In unserem Kollektiv hingegen wurde keines der Kinder intubiert und nur vier Kinder maskenbeatmet, womit der Parameter der mechanischen Beatmung vernachlässigbar klein ist. Auch eine Arbeitsgruppe um DeVincenzo fand eine Korrelation zwischen der erhöhten Viruslast und der Häufung eines respiratorischen Versagens sowie der Aufnahme auf der Intensivstation (DeVincenzo, El Saleeby, and Bush, 2005). Ebenfalls wurden die

Untersuchungen in der zitierten Arbeit nur an Kindern mit Bronchiolitis durchgeführt. Es liegen weitere Arbeiten vor, in denen wie auch bei uns keine Korrelation zwischen Viruslast und Krankheitsschwere nachgewiesen werden konnte (Bosis et al., 2008).

Wie beim RSV-Kollektiv lag in unserem Rhinovirus-Kollektiv keine statistisch signifikante Abhängigkeit zwischen Viruslast und Diagnose/Krankheitsschwere vor. In anderen Arbeiten hingegen konnte ein Zusammenhang zwischen Viruslast des Rhinovirus und Krankheitsschwere nachgewiesen werden (Laza-Stanca et al., 2008).

Da in unserem Kollektiv RSV-A und RSV-B Infektionen auftraten, bestimmten wir die Viruslasten der jeweiligen RSV-A und RSV-B positiven Proben, ohne dabei einen Konzentrationsunterschied nachweisen zu können. Bezüglich des Zusammenhangs zwischen RSV A/B und der Viruslast liegen bereits weitere Arbeiten vor, in denen, wie auch bei uns, keine Korrelation zwischen RSV A/B-Viruslast nachgewiesen werden konnte (DeVincenzo, 2004). Eine weitere Studie, die sich mit dem Thema beschäftigte, sah bei zeitgleich bestehender Dominanz der RSV-A –Infektionen eine höhere Viruslast beim RSV-B- Subtyp (Campanini et al., 2007). Wir fanden einen deutlichen Abfall der Viruslast zwischen der ersten und zweiten Probe, was auch in anderen Studien nachgewiesen wurde und der Immunantwort des Wirtes entspricht die bereits mit der Viruseliminierung begonnen hat (DeVincenzo, El Saleeby, and Bush, 2005).

Die Verteilung der Krankheitsmanifestationen war identisch bei RSV-A und RSV-B. Diese Beobachtung fand auch in einer vorangegangenen Studie statt, in der keine Korrelation zwischen RSV-Subtyp und Krankheitsschwere nachgewiesen wurde, sodass die Verteilung gleich war (Fodha et al., 2007). Andere Arbeitsgruppen hingegen konnten RSV-A als Auslöser eines schweren Krankheitsverlaufs identifizieren (Walsh et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss des Alters auf die Viruslast gefunden werden. Andererseits wurde anderweitig ein voneinander unabhängiger Einfluss des niedrigen Alters sowie der Viruslast auf die Krankheitsschwere beschrieben. Ein direkter Vergleich des Alters und der Viruslast fand jedoch nicht statt (DeVincenzo, El Saleeby, and Bush, 2005).

Daten aus den Vereinigten Staaten ergaben einen Gesamtanteil von 80% durch RSV ausgelösten Bronchiolitiden sowie 50% an kindlichen Pneumonien. Dabei machen Säuglinge unter sechs Monaten einen prozentualen Anteil von 57% und Kinder unter einem Jahr einen Anteil von 81% aus (DeVincenzo, El Saleeby, and Bush, 2005). In unserem Kollektiv korrelierte das Alter deutlich mit der Diagnose, womit die Bronchiolitiden bei den jüngsten Kindern (Median - 0,233 Jahren) auftraten, was womöglich dem unreifen Immunsystem zuzuschreiben

ist, welches eine unverhältnismäßige Verlagerung zu Gunsten der Th2-Immunantwort und eine konsekutive Bronchiolitis bedingt (Gerna et al., 2008). Es wird auch eine Rolle spielen, dass bei den sehr jungen Kindern höchstwahrscheinlich eine Erstinfektion mit dem RSV stattgefunden hat, bei älteren Kindern dagegen wird der Anteil der RSV-Reinfektionen zunehmend größer sein. In weiteren Studien wurde eine Korrelation zwischen der Krankheitsschwere und jungem Kindesalter bei RSV-Infektionen beschrieben, wobei die Krankheitsschwere anhand eines Krankheitsindex (pH, pCO₂, arterielle sO₂, Liegedauer >7 Tage) festgelegt wurde (Walsh et al., 1997) (Kneyber et al., 1996) (DeVincenzo, El Saleeby, and Bush, 2005).

Im Rhinovirus-Kollektiv hingegen konnten wir keine Korrelation zwischen Alter und der gestellten Diagnose finden, wobei auch hierzu kontroverse Studien existieren, welche eine Korrelation nachweisen (Gerna et al., 2009) beziehungsweise ausschließen konnten (Kennedy et al., 2014).

4.6 Infektparameter im Vergleich

Der Anstieg der Leukozyten und des CRP sind ein Maß für die Invasivität einer Infektion. Die Leukozyten lassen nicht immer Rückschluss über die Genese zu - bakteriell oder viral- , wobei das CRP bei moderatem Anstieg (bis 65mg/l) auch bei viralen Erkrankungen nachgewiesen werden kann (Prat et al., 2003). Somit erklärt sich auch die leicht erhöhte Zahl der beiden Parameter in den an Pneumonie erkrankten Kindern. Erstaunlich ist, dass die mit Rhinovirus infizierten Kinder keinen signifikanten Anstieg zwischen 1. und 2. Materialentnahme zeigen. Vielleicht war die Immunantwort bei Rhinovirus-Infektionen geringer ausgeprägt. Betrachtet man jedoch die Schwere der Krankheitsbilder, löst das RV die gleiche Anzahl an schweren Atemwegsinfekten wie das RSV aus (Iwane et al., 2011). Alternativ besteht die Möglichkeit eines höheren Anteils an bakteriellen Ko-Infektionen bei dem RSV Kollektiv, die für RSV bereits anderweitig beschrieben wurden (Tregoning and Schwarze, 2010). Eine bakterielle Koinfektion, insbesondere bei Pneumonien, wurde in einer weiteren Studie vermutet und als Erklärung für das erhöhte CRP angesehen. Erhöhte Leukozytenzahlen konnten in dieser jedoch nicht nachgewiesen werden (Saijo et al., 1996). Ein weiteres Ergebnis bei Untersuchungen vom CRP und PCT als Parameter zur Unterscheidung viraler und bakterieller Infekte ist eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine bakterielle Infektion ab einem CRP von 10 mg/dl (Ip et al., 2007), das heißt also deutlich über dem von uns gemessenem Median bei Pneumonien. Der Pathomechanismus der Immunabwehr unterscheidet sich durch teilweise immunsuppressive

Wirkung des Virus bei beiden. Das Rhinovirus ist wie auch das RSV befähigt, die Produktion von IFN β zu hemmen, wobei es an einer anderen Stelle der Produktion ansetzt. Es hemmt nach dem Transport des phosphorylierten interferon regulatory factor (IRF 3) in den Zellkern die Ausbildung eines funktionellen Dimers, welches die Expression des Interferon β induziert (Modrow et al.; 2010) (Kneyber et al., 1996). Dies könnte ebenfalls die Ursache für einen signifikanten Unterschied im Leukozytenanstieg sein, wobei dies dann bei allen Krankheitsausprägungen (obstruktive-/Bronchitis, Bronchiolitis, Pneumonie) auftreten sollte, was jedoch hier nicht zutrifft. Wie bereits im Abschnitt über die quantitative IL-8-Bestimmung erwähnt, konnte ein signifikant höherer IL-8-Anteil bei den RV-Infizierten, nicht jedoch bei RSV-Infizierten nachgewiesen werden. Auch das deutet auf die unterschiedliche Immunreaktion des Wirtes in Abhängigkeit vom jeweiligen Virusbefall hin (Gern et al. 386-93). In Anbetracht der erhöhten Leukozyten- und CRP-Konzentrationen bei viralen Pneumonien sind weitere Labormarker zur besseren Differenzierung von viralen oder viralen/bakteriellen Infektion mit Superinfektion möglicherweise besser geeignet wie zum Beispiel das Procalcitonin (Higdon et al., 2017).

4.7 Diagnosen betrachtet nach Standort, Klinik und Infektiologie

Laut einer Übersichtsarbeit kann der frühzeitige Nachweis des RSV zu einer verminderten Anwendung von Antibiotika sowie der Durchführung von Röntgenaufnahmen führen (Black, 2003). Ebenfalls wurde in der zitierten Arbeit nachgewiesen, dass eine diesbezüglich positive Verhaltensänderung bei Vorgabe eines evidence-based Klinikleitfadens, bezogen auf das Krankheitsbild stattfand. Jedoch führten die Autoren auch kontroverse Arbeiten auf. Einer der Gründe für nosokomiale RSV-Infektionen ist die Infektion in Kinderarztpraxen und pädiatrischen Stationen mit niedrigem Hygienestandard bei Kindern, die aus einem anderen Grund hospitalisiert wurden. Somit können bei den Patienten bereits erhöhte Infektwerte (CRP, Leukozyten) aus anderen Krankheitsgründen/Koinfektionen vorliegen und diese nicht durch das RSV ausgelöst worden sein (Noah and Becker, 1993). Andererseits erscheinen weitere diagnostische Laborparameter zur genaueren Differenzierung viraler und bakterieller Infektionen notwendig zur Vermeidung unnötiger Antibiotikaverordnungen. Dies würde zu einer Reduktion der Antibiotikaresistenzen, weniger Nebenwirkungen und durch die gedrosselten Kosten zu einem sozioökonomischen Benefit führen. Untersuchungsergebnisse einer weiteren Studie zeigten, dass 33% der Pneumonien mit einer viral/viralen Mischinfektion einhergingen und RSV-Infizierte am häufigsten Mischinfektionen mit dem

Bocavirus aufwiesen. Dennoch führen auch die RSV-Monoinfektion zu schweren Pneumonien, sodass das Antibiotikum demnach unnötig wäre (Bonzel et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit besteht ein deutlicher Unterschied bzgl. der Häufigkeit der Diagnosestellung „Pneumonie“ in den beiden Kliniken. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass in der zweiten Klinik eher Kinder mit zusätzlichen Risikofaktoren (Frühgeborene, Herzvitien, Atemwegsanomalien und angeborene Erkrankungen des Immunsystems) und damit einem schwereren Krankheitsverlauf aufgenommen wurden. Insgesamt betrachtet waren die Kinder mit antibiotischer Therapie im RSV- als auch im RV-Kollektiv um einen bzw. einen halben Tag länger hospitalisiert. Natürlich können diese Patienten länger klinisch symptomatisch gewesen sein, wobei nicht auszuschließen ist, dass der Kliniker den Verlauf durch eine vermutete bakterielle Superinfektion mit Antibiotikaapplikation als schwerwiegender bewertete und somit eine längerer Krankenhausverweildauer anordnete. Die Möglichkeit einer bei Aufnahme bestehenden bakteriellen Koinfektion und die Empfehlungen der WHO bezüglich ambulant erworbener Pneumonien stellen jedoch primär die Indikation zur antibiotischen Therapie, ob sie nun im Verlauf fortgeführt oder beendet wird. Eine mögliche Resistenzentwicklung nach Antibiotikaapplikation konnte in einer vierjährigen Studie nicht nachgewiesen werden (Thorburn et al., 2006). Insgesamt betrachtet resultiert eine antibiotische Therapie und die somit längere Verweildauer in höheren Krankenhauskosten pro Fall.

Wie bereits unter 4.5 beschrieben korrelierte das Alter in unserem Kollektiv deutlich mit der Diagnose, womit die Bronchiolitiden bei den jüngsten Kindern auftraten, aufsteigend zu den Pneumonien bei den ältesten Kindern (Gerna et al., 2008).

5. Literatur

- Agut, Henri, Pascale Bonnafous, and Agnes Gautheret-Dejean. "Human Herpesviruses 6A, 6B, and 7." *Microbiology spectrum* 4.3 (2016).
- Bao, Xiaoyong, et al. "Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses." *PLoS pathogens* 4.5 (2008): e1000077.
- Black, Craig Patrick. "Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection." *Respiratory Care* 48.3 (2003): 209-33.
- Bonzel, Linda, et al. "Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction." *The Pediatric infectious disease journal* 27.7 (2008): 589-94.
- Bosis, Samantha, et al. "Role of respiratory pathogens in infants hospitalized for a first episode of wheezing and their impact on recurrences." *Clinical Microbiology and Infection* 14.7 (2008): 677-84.
- Bradford, Marion M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* 72.1-2 (1976): 248-54.
- Campanini, Giulia, et al. "Human respiratory syncytial virus (hRSV) RNA quantification in nasopharyngeal secretions identifies the hRSV etiologic role in acute respiratory tract infections of hospitalized infants." *Journal of clinical virology* 39.2 (2007): 119-24.
- Chanock, Robert M., et al. "IV. Respiratory Syncytial Virus." *American Journal of Public Health and the Nations Health* 52.6 (1962): 918-25.
- Chemaly, Roy F., et al. "Respiratory syncytial virus infections in children with cancer." *Journal of pediatric hematology/oncology* 36.6 (2014): e376-e381.
- Conant, Robert M. and Vincent V. Hamparian. "Rhinoviruses: Basis for a Numbering System." *The Journal of Immunology* 100.1 (1968): 107-13.
- Craig, J. L., et al. "Human cytomegalovirus infection upregulates interleukin8 gene expression and stimulates neutrophil transendothelial migration." *Immunology* 92.1 (1997): 138-45.
- De Bolle, Leen, Lieve Naesens, and Erik De Clercq. "Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy." *Clinical microbiology reviews* 18.1 (2005): 217-45.
- DeVincenzo, John P. "Natural infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: a study of frequency, disease severity, and viral load." *Pediatric research* 56.6 (2004): 914-17.
- DeVincenzo, John P., Chadi M. El Saleeby, and Andrew J. Bush. "Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants." *Journal of Infectious Diseases* 191.11 (2005): 1861-68.
- Dunn, Sarah R., et al. "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.* 20.10 (2013): 1654-56.

- Ehlken, Birgit, et al. "Economic impact of community-acquired and nosocomial lower respiratory tract infections in young children in Germany." *European journal of pediatrics* 164.10 (2005): 607-15.
- Elliott, Joanne, et al. "Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase." *Journal of virology* 81.7 (2007): 3428-36.
- Epstein, Michael Anthony. "Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma." *Lancet* 1 (1964): 702-03.
- Fairchok, Mary P., et al. "Epidemiology of viral respiratory tract infections in a prospective cohort of infants and toddlers attending daycare." *Journal of clinical virology* 49.1 (2010): 16-20.
- Fodha, Imene, et al. "Respiratory syncytial virus infections in hospitalized infants: association between viral load, virus subgroup, and disease severity." *Journal of medical virology* 79.12 (2007): 1951-58.
- Fuller, David G., et al. "Analysis of respiratory viral coinfection and cytomegalovirus coisolation in pediatric inpatients." *The Pediatric infectious disease journal* 24.3 (2005): 195-200.
- Garofalo, Roberto, et al. "Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection." *The Journal of pediatrics* 120.1 (1992): 28-32.
- Garcija, Carla, et al. "Decreased innate immune cytokine responses correlate with disease severity in children with respiratory syncytial virus and human rhinovirus bronchiolitis." *The Pediatric infectious disease journal* 31.1 (2012): 86-89.
- Gern, James E. "Rhinovirus respiratory infections and asthma." *The American journal of medicine* 112.6 (2002): 19-27.
- Gern, James E., et al. "Relationships among specific viral pathogens, virus induced interleukin8, and respiratory symptoms in infancy." *Pediatric allergy and immunology* 13.6 (2002): 386-93.
- Gerna, G., et al. "Correlation of viral load as determined by real-time RT-PCR and clinical characteristics of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections in early infancy." *Journal of clinical virology* 41.1 (2008): 45-48.
- Gerna, G., et al. "Correlation of rhinovirus load in the respiratory tract and clinical symptoms in hospitalized immunocompetent and immunocompromised patients." *Journal of medical virology* 81.8 (2009): 1498-507.
- Gonzalez, Andrea E., et al. "Aberrant T cell immunity triggered by human Respiratory Syncytial Virus and human Metapneumovirus infection." *Virulence* 8.6 (2017): 685-704.
- Hamparian, V. V., et al. "A collaborative report: rhinoviruses-extension of the numbering system from 89 to 100." *Virology* 159.1 (1987): 191-92.
- Hasegawa, Kohei, et al. "Rhinovirus species in children with severe bronchiolitis: multicenter cohort studies in the United States and Finland." *The Pediatric infectious disease journal* 38.3 (2019): e59-e62.
- Hayden, Frederick G. "Rhinovirus and the lower respiratory tract." *Reviews in medical virology* 14.1 (2004): 17-31.

- Henrickson, Kelly J. "Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease." *The Pediatric infectious disease journal* 23.1 (2004): S6-S10.
- Higdon, Melissa M., et al. "Association of C-reactive protein with bacterial and respiratory syncytial virus associated pneumonia among children aged < 5 years in the PERCH Study." *Clinical infectious diseases* 64.suppl_3 (2017): S378-S386.
- Ingram, Jim Mark, et al. "Eosinophil cationic protein in serum and nasal washes from wheezing infants and children." *The Journal of pediatrics* 127.4 (1995): 558-64.
- Ip, Margaret, et al. "Value of serum procalcitonin, neopterin, and C-reactive protein in differentiating bacterial from viral etiologies in patients presenting with lower respiratory tract infections." *Diagnostic microbiology and infectious disease* 59.2 (2007): 131-36.
- Iwane, Marika K., et al. "Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children." *Journal of Infectious Diseases* 204.11 (2011): 1702-10.
- Jartti, Tuomas, et al. "Metapneumovirus and acute wheezing in children." *The Lancet* 360.9343 (2002): 1393-94.
- Kaul, T. N., Robert C. Welliver, and P.L. Ogra. "Development of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the respiratory tract after natural infection with respiratory syncytial virus." *Infection and immunity* 37.2 (1982): 492-98.
- Kennedy, Joshua L., et al. "Comparison of viral load in individuals with and without asthma during infections with rhinovirus." *American journal of respiratory and critical care medicine* 189.5 (2014): 532-39.
- Kim, Hyun Hee, Mi Hee Lee, and Joon Sung Lee. "Eosinophil cationic protein and chemokines in nasopharyngeal secretions of infants with respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis and non-RSV bronchiolitis." *Journal of Korean medical science* 22.1 (2007): 37-42.
- Kneyber, M. C., et al. "Relationship between clinical severity of respiratory syncytial virus infection and subtype." *Archives of disease in childhood* 75.2 (1996): 137-40.
- Laham, Federico R., et al. "Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy." *The Journal of infectious diseases* 189.11 (2004): 2047-56.
- Lamson, Daryl, et al. "MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004/2005." *The Journal of infectious diseases* 194.10 (2006): 1398-402.
- Lau, Susanna KP, et al. "Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children." *Journal of clinical microbiology* 45.11 (2007): 3655-64.
- Laza-Stanca, Vasile, et al. "Rhinovirus-induced lower respiratory illness is increased in asthma and related to virus load and Th1/2 cytokine and IL-10 production." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.36 (2008): 13562-67.
- Lemanske, Robert F., et al. "Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116.3 (2005): 571-77.

- Ling, Zhenhua, Kim C. Tran, and Michael N. Teng. "Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I." *Journal of virology* 83.8 (2009): 3734-42.
- Mahony, James B. "Detection of respiratory viruses by molecular methods." *Clinical microbiology reviews* 21.4 (2008): 716-47.
- Manoha, Catherine, et al. "Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children." *Journal of clinical virology* 38.3 (2007): 221-26.
- Manzoni, Paolo, et al. "Defining the incidence and associated morbidity and mortality of severe respiratory syncytial virus infection among children with chronic diseases." *Infectious diseases and therapy* 6.3 (2017): 383-411.
- McIntosh, K. E. N. N., J. O. Y. C. McQuillin, and P. S. Gardner. "Cell-free and cell-bound antibody in nasal secretions from infants with respiratory syncytial virus infection." *Infection and immunity* 23.2 (1979): 276-81.
- Miller, E Kathryn, et al. "A novel group of rhinoviruses is associated with asthma hospitalizations." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123.1 (2009): 98-104.
- Modrow, Susanne, et al. *Molekulare Virologie*. Springer-Verlag, 2010.
- Mori, Yasuko, et al. "Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46." *Journal of virology* 76.13 (2002): 6750-61.
- Munir, Shirin, et al. "Non-structural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells." *Journal of virology* (2008).
- Murayama, Tsugiyu, et al. "The immediate early gene 1 product of human cytomegalovirus is sufficient for up-regulation of interleukin-8 gene expression." *Biochemical and biophysical research communications* 279.1 (2000): 298-304.
- Murphy, B. R., et al. "Serum and nasal-wash immunoglobulin G and A antibody response of infants and children to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins following primary infection." *Journal of clinical microbiology* 23.6 (1986): 1009-14.
- Murray, Joanna, et al. "Risk factors for hospital admission with RSV bronchiolitis in England: a population-based birth cohort study." *PloS one* 9.2 (2014): e89186.
- Nair, Harish, et al. "Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis." *The Lancet* 375.9725 (2010): 1545-55.
- Neumeister, Birgid, et al. *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie*. Georg Thieme Verlag, 2009.
- Noah, TERRY L. and S. U. S. A. Becker. "Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by a human bronchial epithelial cell line." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 265.5 (1993): L472-L478.
- Norzila, M. Z., et al. "Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma." *American journal of respiratory and critical care medicine* 161.3 (2000): 769-74.
- Pelon, W., et al. "A Cytopathogenic Agent Isolated from Naval Recruits with Mild Respiratory Illnesses." *Proc.Soc.flxper.Biol.& Med.* 94.2 (1957): 262-67.

- Prat, Cristina, et al. "Procalcitonin, C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection." *The Pediatric infectious disease journal* 22.11 (2003): 963-67.
- Renwick, Neil, et al. "A recently identified rhinovirus genotype is associated with severe respiratory-tract infection in children in Germany." *Journal of Infectious Diseases* 196.12 (2007): 1754-60.
- Saijo, Masayuki, et al. "White blood cell count, C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract." *Pediatrics International* 38.6 (1996): 596-600.
- Schildgen, Verena, et al. "Human Metapneumovirus: lessons learned over the first decade." *Clinical microbiology reviews* 24.4 (2011): 734-54.
- Shafagati, Nazly and John Williams. "Human metapneumovirus-what we know now." *F1000Research* 7 (2018).
- Sheeran, Paul, et al. "Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease." *The Pediatric infectious disease journal* 18.2 (1999): 115-22.
- Simoes, Eric AF, et al. "Past, present and future approaches to the prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection in children." *Infectious diseases and therapy* 7.1 (2018): 87-120.
- Smyth, Rosalind L., et al. "Respiratory syncytial virus bronchiolitis: Disease severity, interleukin 8, and virus genotype*." *Pediatric pulmonology* 33.5 (2002): 339-46.
- Strausbaugh, Larry J., et al. "Human herpesvirus 6." *Clinical infectious diseases* 33.6 (2001): 829-33.
- Tanaka, Naoko, et al. "Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real time PCR assay." *Journal of medical virology* 60.4 (2000): 455-62.
- Tang, Huamin, et al. "CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.22 (2013): 9096-99.
- Thorburn, Kentigern, et al. "High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis." *Thorax* 61.7 (2006): 611-15.
- Tregoning, John S. and J. + Schwarze. "Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology." *Clinical microbiology reviews* 23.1 (2010): 74-98.
- Turner, Ronald B., et al. "Association between interleukin-8 concentration in nasal secretions and severity of symptoms of experimental rhinovirus colds." *Clinical infectious diseases* 26.4 (1998): 840-46.
- Van den Hoogen, Bernadette G., et al. "A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease." *Nature medicine* 7.6 (2001): 719-24.
- Vandini, Silvia, et al. "Immune and inflammatory response in bronchiolitis due to respiratory Syncytial Virus and Rhinovirus infections in infants." *Paediatric respiratory reviews* 24 (2017): 60-64.
- Venge, R., et al. "Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease." *Clinical and experimental allergy* 29 (1999): 1172-86.

- Walsh, Edward E., et al. "Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain." *Journal of Infectious Diseases* 175.4 (1997): 814-20.
- Watkiss, Ellen R. "Pathogenesis of respiratory syncytial virus." *Current opinion in virology* 2.3 (2012): 300-05.
- Wolf, Dana G., et al. "High seroprevalence of human metapneumovirus among young children in Israel." *The Journal of infectious diseases* 188.12 (2003): 1865-67.
- Zelaya, EA Colocho, C. Orvell, and O. Strannegard. "Eosinophil cationic protein in nasopharyngeal secretions and serum of infants infected with respiratory syncytial virus." *Pediatric allergy and immunology* 5.2 (1994): 100-06.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ortwin Adams bedanken für die freundliche Übernahme der Betreuung, die Bereitstellung des interessanten Themas, seine wertvollen Ratschläge über viele Jahre und nicht zuletzt die viele Zeit die er mit dem Korrekturlesen verbracht hat.

Meiner guten Freundin Johanna danke ich für Hilfen, Tipps und Korrekturlesen sowie ihre Fähigkeit mich jedes Mal aufs Neue zu motivieren, mein Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinem Ehemann, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre. Er schaffte es mich auch in schwierigen Situationen zu motivieren und durchzuhalten, insbesondere wenn ich es selbst nicht konnte.