

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

**Epidemiologie und klinische Ausprägung
von Rhinovirus-Infektionen bei Kindern
mit respiratorischem Infekt**

Dissertation

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

vorgelegt von
Marcus Schönnenbeck

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Ortwin Adams

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

Zusammenfassung

Humane Rhinoviren (HRV) sind weltweit verbreitet und verursachen meist einen banalen Schnupfen [1]. Zuletzt gab es Hinweise darauf, dass Rhinoviren auch Pneumonien und Asthmaexazerbationen verursachen können [2–5]. Es gibt drei Subtypen: HRV-A, -B, -C, wobei der Subtyp C als letzter entdeckt wurde und im Vergleich zu den anderen beiden Subtypen als virulenter gilt [6].

In dieser Arbeit wurde ein Kollektiv von 37 Patienten untersucht. Sie stammen von Patienten, die in der pädiatrischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf mit einer Rhinovirusinfektion der Atemwege stationär aufgenommen worden waren. Das Alter lag im Median bei 1,58 Jahren. Die HRV-Infektionen verursachten eine obstruktive oder nicht-obstruktive Bronchitis. Auch Pneumonien traten auf.

In der vorliegenden Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob es einen Unterschied zwischen den Subtypen bezüglich des Auftretens, der Viruslast oder der Häufigkeit von Koinfektionen mit anderen Viren gibt. Ferner interessiert, ob es einen Unterschied bezüglich der Schwere der Verläufe und vor allem dem Auftreten von Pneumonien gibt.

In dem Kollektiv traten 27 mal HRV-A und 10 mal HRV-C auf. HRV-B wurde nicht gefunden. Die Infektionen waren zeitlich über das ganze Jahr verteilt, mit einem Peak im Frühjahr und Herbst. Bei jedem Patienten wurden als Untersuchungsmaterial zwei Nasopharynxaspirate (NPA) im mittleren Abstand von 2,84 Tagen entnommen. Die Viruslast änderte sich zwischen erstem und zweitem NPA nicht signifikant. Es gab keinen Unterschied in der Viruslast zwischen HRV-A und HRV-C.

Es wurde nach Koinfektionen mit CMV, EBV, HHV-6 und HSV 1 gesucht und das Auftreten von Koinfektion zwischen den Subtypen verglichen. Eine Koinfektion lag in 43 % aller Fälle vor, es bestand jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied in der Prävalenz zwischen HRV-A vs. HRV-C.

Die mit verschiedenen Subtypen infizierten Patienten wurden auch bezüglich der klinischen Verlaufparameter verglichen. Es ergab sich bei keinem der Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen HRV-A vs. HRV-C. Insbesondere bestand kein Unterschied in der Auftretenswahrscheinlichkeit einer Pneumonie bei einer Infektion mit HRV-A vs. HRV-C.

Es zeigte sich, dass die Patienten im Kollektiv mit Pneumonie signifikant älter waren als jene ohne Pneumonie, was jedoch einer Metastudie widerspricht und am ehesten auf das kleine Kollektiv zurück zu führen ist.

Darüber hinaus wurden IL-8- und ECP-Konzentrationen in den NPAs gemessen und kein Unterschied zwischen HRV-A und HRV-C gefunden. Die 1. und 2. NPAs wiesen im Hinblick auf die IL-8- und ECP-Konzentrationen keine Dynamik auf. Die IL-8-Konzentrationen waren bei Patienten ohne Pneumonie im Median mehr als doppelt so hoch als jene mit Pneumonie, statistisch jedoch nicht signifikant.

Abstract

Human rhinoviruses (HRV) are distributed worldwide and usually cause a common cold [1]. Recently there was evidence that rhinoviruses can also cause pneumonia and asthma exacerbations [2–5]. There are three subtypes: HRV-A, -B, -C. Subtype C was discovered last and considered more virulent compared to the other two subtypes [6].

In this work, a collective of 37 patients was examined. They come from patients who were admitted to the pediatric clinic of the University Hospital Düsseldorf with a rhinovirus infection of the respiratory tract. The median age was 1.58 years. The HRV infections caused obstructive or nonobstructive bronchitis. Pneumonias also occurred.

In the present work, the question is to be investigated whether there is a difference between the subtypes with regard to the occurrence, the viral load or the frequency of coinfections with other viruses. It is also of interest whether there is a difference in the severity of the illness and the occurrence of pneumonia.

HRV-A occurred 27 times and HRV-C 10 times in the collective. HRV-B was not found. Infections were distributed throughout the year, with a peak in spring and autumn. Two nasopharyngeal aspirates (NPA) were taken from each patient at a mean interval of 2.84 days as test material. Viral load did not change significantly between the first and second NPA. There was no difference in viral load between HRV-A and HRV-C.

Coinfections with CMV, EBV, HHV-6 and HSV-1 were searched for and the incidence of coinfection between the subtypes was compared. Co-infection was present in 43% of all cases, but there was no statistically significant difference in prevalence between HRV-A vs. HRV-C.

The patients infected with different subtypes were also compared with regard to the clinical course parameters. There was no significant difference between HRV-A vs. HRV-C for any of the parameters. In particular, there was no difference in the probability of occurrence of pneumonia when infected with HRV-A vs. HRV-C.

It was found that the patients in the collective with pneumonia were significantly older than those without pneumonia, which, however, contradicts a meta-study and can most likely be attributed to the small collective.

In addition, IL-8 and ECP concentrations were measured in the NPAs, but no difference was found between HRV-A and HRV-C. The 1st and 2nd NPAs showed no dynamics in terms of IL-8 and ECP concentrations. Median IL-8 levels in patients without pneumonia were more than twice as high as those with pneumonia, but were not statistically significant.

Abkürzungsverzeichnis

Ag.	Antigen
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
Cat. No.	Katalog-Nummer
CMV	Cytomegalievirus
CPE	Cytopathologischer Effekt
DNA	Desoxyribonucleicacid
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECP	Eosinophil cationic protein
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAM	6-FAM-phosphoramidit
FKS	Fetales Kälberserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HMPV	Humanes Meta Pneumo Virus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRV	Rhinovirus, zuvor bis 06/2012 Humanes Rhinovirus [7]
HSV 1	Humanes Herpes Virus 1
Ig	Immunglobulin
IFT	Immunfluoreszenztest
IL	Interleukin
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
MRC-5	Medical Research Council cell strain 5: Humane, embryonale Lungen-Fibroblasten
nm	Nanometer
NPA	Naso- Pharynx- Aspirat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PWO	Pyrococcus woesei
RSV	Respiratory-synthetical- Virus
RNA	Ribonucleicacid
ssRNA	single strand Ribonucleicacid
SuperScript II RT	SuperScript II Reverse Transkriptase

TAMRA	Tetramethylrhodamine
TBE	Tris-borate-Ethylendiamintetraacetat
Tbl	Tablette
UTR	Untranslated region
VI	≙ Patienten-Nummer des Universitätsklinikums Düsseldorf
vs.	versus

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
1.1 Rhinoviren.....	1
1.1.1 Aufbau des Rhinovirus.....	1
1.1.2 Serotypen / Genotypen.....	2
1.1.3 Epidemiologie und Virulenz von Rhinoviren.....	3
1.1.4 Therapie.....	4
1.2 Interleukin-8 / CXCL 8 (IL-8).....	5
1.3 Eosinophiles kationisches Protein (ECP).....	5
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	7
II Material und Methoden	8
2.1 Liste der verwendeten Materialien.....	8
2.1.1 Patienten- / Probenkollektiv.....	8
2.1.2 Materialien allgemein, für alle Arbeitsplätze.....	9
2.1.3 Zellkultur / -Infektion / -Ernte.....	10
2.1.4 Materialien Immunfluoreszenztest (IFT).....	10
2.1.5 Materialien ELISA.....	11
2.1.6 Materialien Bradford-Test.....	11
2.1.7 Materialien Eosinophil cationic protein-ELISA (ECP-ELISA).....	12
2.1.8 Materialien Interleukin-8-ELISA (IL8-ELISA).....	13
2.1.9 Materialien Rhinovirus Polymerase chain reaction und First-Strand cDNA Synthese.....	13
2.1.10 Sequenzen der in der Rhinovirus PCR und First-Strand cDNA Synthese verwendeten Primer.....	14
2.1.11 Materialien Herstellung Agarose Gel zur DNA-Elektrophorese.....	14
2.1.12 Materialien Aufreinigung der PCR-Produkte.....	14
2.1.13 Materialien TaqMan™-PCR für CMV-, EBV-, HHV-6, HSV 1.....	15
2.1.14 Sequenzen der in der TaqMan™ PCR verwendeten Primer und Sonden.....	16
2.1.15 Geräte.....	16
2.1.16 Software.....	17
2.2 Zellkultur und Virusinfektion.....	18
2.2.1 Zellkultur.....	18
2.2.2 Zellinfektion.....	18
2.2.3 Zellernte.....	19
2.3 Immunfluoreszenztest (IFT).....	20
2.3.1 Herstellung der IFT-Objektträger.....	20

2.3.2 Durchführung des Immunfluoreszenztests.....	21
2.4 Rhinovirus Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	22
2.4.1 Bradford-Test zur Proteinbestimmung.....	23
2.4.2 Vortestung und Durchführung des ELISA-Tests.....	24
2.5 Eosinophil cationic protein-ELISA (ECP-ELISA).....	26
2.5.1 Vorbereitung ECP-ELISA.....	26
2.5.2 Durchführung ECP-ELISA.....	26
2.6 Interleukin-8-ELISA (IL-8-ELISA).....	28
2.6.1 Vorbereitung IL-8-ELISA.....	28
2.6.2 Durchführung IL-8-ELISA.....	28
2.7 PCR zum Nachweis von Rhinovirus-RNA (Rhinovirus-PCR).....	30
2.7.1 Durchführung Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR).....	30
2.7.2 Durchführung der DNA-PCR-Amplifikation.....	31
2.7.3 Protokollentwicklung.....	31
2.7.4 Gelelektrophorese.....	32
2.7.5 PCR-Gel-Extraktion.....	33
2.8 Sequenzierung.....	34
2.9 Nachweis von Koinfektionen.....	35
2.9.1 Real Time Quantitative PCR.....	35
III Ergebnisse.....	37
3.1 Bradford-Test für NPAs.....	37
3.2 Rhinovirus Immunfluoreszenztest für IgG, IgA und IgM gegen HRV.....	37
3.3 Rhinovirus-ELISA.....	38
3.4 Sequenzierung der Rhinovirus-RNA.....	38
3.4.1 Sequenzierung.....	38
3.4.2 Alignment und Subtypisierung.....	39
3.4.3 Rhinovirus Stammbaum.....	40
3.5 Jahreszeitliches Auftreten.....	41
3.6 Statistische Auswertung.....	42
3.6.1 Veränderung Viruslast 1. vs. 2 NPA.....	42
3.6.2 Koinfektionen.....	42
3.6.3 Klinische Verlaufsparemeter.....	43
3.6.4 IL-8 und ECP-Messung.....	46
3.6.5 Co-Faktoren bei der Entwicklung einer Pneumonie.....	48
IV Diskussion.....	50
4.1 Subtypen im Kollektiv.....	50
4.2 Jahreszeitliches Auftreten.....	50

4.3 Klinischer Verlauf.....	51
4.5 Viruslast.....	52
4.6 Koinfektionen.....	52
4.7 Dauer der Infektion und spezifische Immunantwort.....	53
4.8 ECP-ELISA.....	54
4.9 IL-8-ELISA.....	54
V Schlussfolgerung.....	56
VI Abbildungsverzeichnis.....	57
VII Tabellenverzeichnis.....	57
VIII Literaturverzeichnis.....	59
IX Danksagung.....	76

I Einleitung

1.1 Rhinoviren

Rhinoviren sind weit verbreitet und weltweit die häufigste Ursache einer Erkältung [1]. Untersuchungen haben gezeigt, dass Rhinoviren aber auch eine Rolle bei der Exazerbation von Asthma spielen [8] und in einigen Fällen Auslöser einer Pneumonie sein können [3–5].

1.1.1 Aufbau des Rhinovirus

Das Genus Humane Rhinoviren gehören zur Ordnung und Familie der Picornaviridae [9]. Sie sind kleine, nicht-umhüllte, Positivstrang RNA-Viren mit einer Genomlänge zwischen 7.200 bis 7.500 bp, gepackt in ein 30 nm großes Kapsid. Das Kapsid besteht aus zwölf Pentameren, ein Pentamer jeweils aus fünf Protomeren und ein Protomer jeweils aus den Kapsid-Proteinen VP1, VP2, VP3 und VP4 [10]. 60 Kopien der vier Capsid Proteine geben dem Virion eine icosahedrale Struktur mit einer Vertiefung in VP1, welche als Bindungsstelle für die Zelloberflächen-Rezeptoren dient. Nachweislich tragen VP1, VP2 und VP3 zu der viralen Antigen-Diversität bei, während VP4 den RNA-Kern an das Capsid verankert. Der schematische Aufbau des Virus ist in Abbildung 1 dargestellt.

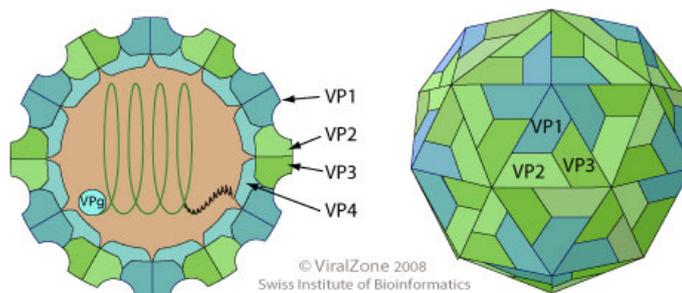


Abb. 1: Rhinovirus Aufbau

Das Kapsid besteht aus zwölf Pentameren, ein Pentamer jeweils aus fünf Protomeren und ein Protomer jeweils aus den Kapsid-Proteinen VP1, VP2, VP3 und VP4 [10].

Eine interne ribosomale Eintrittsstelle (engl. IRES) befindet sich in der untranslatierten 5'-Region des Genoms (5'UTR) und ist erforderlich für die Translation. Die Translation bringt zunächst ein Vorläufer-Polyprotein hervor, welches durch virale Proteasen in elf reife Proteine gespalten wird. Der einzelne offene Leserahmen ist in drei Regionen aufgeteilt. Die erste Region des Genoms (P1) enkodiert die Capsid-Proteine (VP1 bis

VP4). Die nächsten Regionen (P2, P3) bringen die nicht-strukturalen Proteine hervor (2A bis 2C und 3A bis 3D) [11].

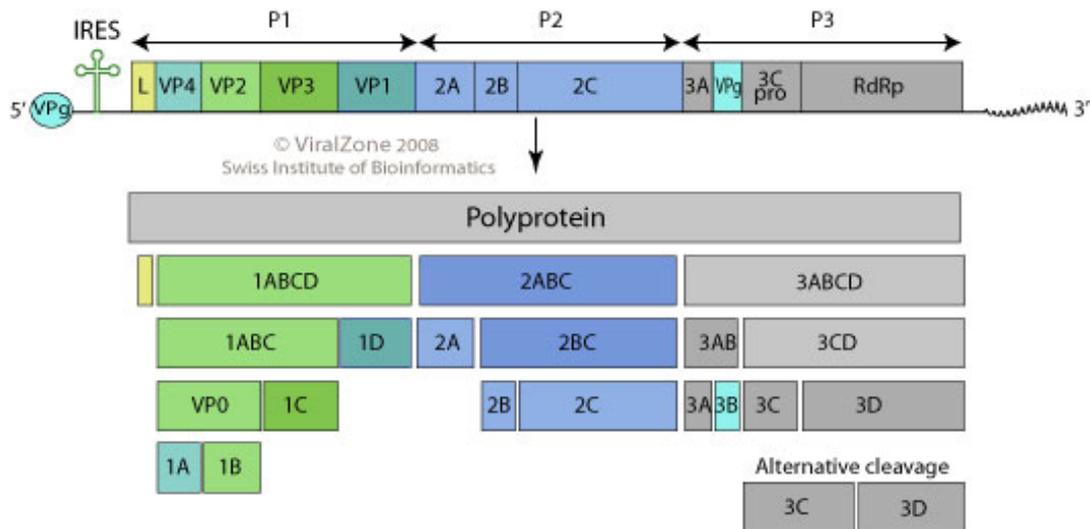


Abb. 2: Rhinovirus Genomstruktur

Aus einem Vorläufer-Polyprotein entstehen elf reife Proteine. Der einzelne offene Leserahmen ist in drei Regionen aufgeteilt. Die erste Region des Genoms (P1) encodiert die Capsid-Proteine (VP1 bis VP4). Die nächsten Regionen (P2, P3) bringen die nicht-strukturalen Proteine hervor (2A bis 2C und 3A bis 3D) [11].

Mehr als 90% der bekannten HRV-Serotypen (major group) benutzen den Zelloberflächen-Rezeptor 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), während die anderen (minor group) über den low-density lipoprotein receptor (LDLR) an die Zelle binden und in diese eindringen. Einige HRV-Subtypen der major group benutzen ebenso Heparin-Sulfate als zusätzlichen Rezeptor [12].

1.1.2 Serotypen / Genotypen

In der Taxonomie finden sich die Spezies Rhinovirus A, B und C in der Ordnung der Picornavirales, in der Familie der Picornaviridae [9]. Zunächst wurden in den 1960er und 1970er Jahren die ca. 100 verschiedenen Serotypen in die zwei Spezies HRV-A und HRV-B aufgeteilt [13]. Die Spezies HRV-C ist erst 2009 nach der Entwicklung von hochsensitiven, molekularen Techniken zur Identifikation von HRV-Spezies in die Taxonomie aufgenommen worden [14]. Es konnte festgestellt werden, dass auch viele HRV-C-Serotypen, ebenso wie die HRV-A- und HRV-B-Serotypen, über alle Kontinente weit verbreitet sind [15]. Die letzte Änderung der ICTV erfolgte im Juli 2019 und ordnete das Rhinovirus A wie folgt ein *Riboviria* > *Orthornavirae* > *Pisuviricota* > *Pisoniviricetes* > *Picornavirales* > *Picornaviridae* > *Enterovirus* > *Rhinovirus A* [16].

1.1.3 Epidemiologie und Virulenz von Rhinoviren

Das in den 1950er Jahren entdeckte Rhinovirus galt lange Zeit als Auslöser einer unkomplizierten Rhinitis [14]. Das Virus ist zu ca. 50% Auslöser aller Erkältungen [17]. Mittlerweile weiß man, dass Rhinovirus-Infektionen auch mit der Exazerbation von chronischen pulmonalen Erkrankungen, der Entwicklung von Asthma, schwerer Bronchiolitis und Pneumonien, besonders bei Kindern, sowie bei älteren und immunkompromittierten Erwachsenen assoziiert sind [18–29]. Eine Übertragung erfolgt durch Kontakt- und / oder Tröpfcheninfektion [30,31]. Das Reservoir liegt auf den Händen (bei 40% natürlich infizierter Personen) und auf Objekten im Haushalt (6%). Die Infektion beginnt in der Nasenschleimhaut oder den Konjunktiven, jedoch nicht über den oralen Weg [32]. Die Desinfektion mit begrenzt viruziden Mitteln ist nicht ausreichend, das Händewaschen mit Wasser und Seife scheint vermutlich durch den mechanischen Effekt effektiv das Virus zu beseitigen [33]. Die Inkubationszeit beträgt zwei bis vier Tage, die Symptome beginnen zwischen dem 1. und 9. Tag (Median) [17]. Unter experimentellen Bedingungen kann das Virus in häuslicher Umgebung Stunden bis Tage überleben, auf der Haut bis zu zwei Stunden [34]. Frühe Experimente zeigten, dass die Virusreplikation von HRV-2 optimal bei 33° C abläuft und bei 37° C bis 39° C deutlich reduziert ist [35]. In 1999 stellten Papadopoulos et al. bei acht verschiedenen HRV-Stämmen nur einen geringen Unterschied in der Replikation bei 33° C versus 37° C fest [36]. Außerdem war die Viruslast auch bei 37° C signifikant höher, als die Titer, die für eine Infektion notwendig sind [12]. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass bei Freiwilligen, die Kälte ausgesetzt wurden, nicht häufiger eine Rhinovirus-Infektion auftraten [37]. Der Begriff „Erkältung“ oder im Englischen „*common cold*“ scheint in diesem Zusammenhang nicht zuzutreffen. Jedoch wurde schon in den 1960er Jahren ein Peak bei der Inzidenz im frühen Herbst, als auch ein kleinerer Peak im Frühjahr gezeigt [38]. Dies konnte in mehreren prospektiven Studien bestätigt werden [39–41]. Die Ursachen scheinen, nach oben aufgeführten Untersuchungen, soziale Faktoren, wie z.B. Schulbeginn zu sein, und weniger die Witterung. In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass Rhinoviren auch nach Abheilung der Infektion einen bleibenden Einfluss auf das Immunsystem haben, z.B. eine IgE-vermittelte Förderung von Asthma bronchiale [42]. Es gibt Hinweise darauf, dass HRV-C virulenter sein könnte. In einigen Studien über Kinder mit Pneumonien, akutem Husten und Exazerbation von Asthma ist HRV-C überrepräsentiert. [6,26,43,44].

1.1.4 Therapie

Eine kausale Therapie gegen Rhinovirusinfektionen gibt es bis heute nicht, die Behandlung erfolgt symptomatisch. Eine Studie zeigte, dass Formoterol und Budesonid eine Rhinovirus-Infektion entweder über eine Reduktion der ICAM-1-Level und/oder saurer Endosomen hemmen können [45]. Aufgrund des großen volkswirtschaftlichen Schadens durch die Rhinovirus bedingte Erkältung [46] wurde ein Virostatikum namens Pleconaril entwickelt (Lizensiert 1997). Pleconaril interagiert mit dem Hüllen-Protein VP1, wodurch es zu einer Konformationsänderung im Kapsid kommt und die zelluläre Bindung erschwert wird. Dadurch kann die Infektionsdauer reduziert werden. Es erhöht sich aber das Risiko einer Resistenzentwicklung, so dass dies keine empfohlene Therapie darstellt [47,48]. Auch die viralen Proteasen werden als Ziel einer antiviralen Therapie gesehen. Unter anderem ein 3C-Protease-Inhibitor, Rupintrivir (entwickelt 2006), zeigte sich in vitro als hochwirksam. In klinischen Studien konnte jedoch keine Reduktion der Häufigkeit von Erkältungen gezeigt werden, woraufhin die Entwicklung eingestellt wurde [49]. Zur Zeit ist der Capsid-Binder Vapendavir in der klinischen Erprobung (Phase 2) [50]. Experimentell zeigte sich eine vorbeugende Behandlung mit Interferon als wirksam [51], findet aber wegen der ausgeprägten Nebenwirkungen keine empfohlene Anwendung. Kontrovers diskutiert wird der präventive Nutzen von Vitamin-C. Eine sichere Empfehlung für die Allgemeinbevölkerung lässt sich aus der Datenlage nicht ableiten. Es konnte jedoch ein protektiver Effekt durch die Gabe von 8 g Vitamin-C bei Auftreten von Erkältungssymptomen nachgewiesen werden [52]. Eine aktuelle Studie zeigt, dass Reservatrol dosisabhängig eine antivirale Aktivität gegen die HRV-16-Replikation in humanem, nasalen Epithel aufweist. Zudem unterdrückt es nachhaltig und stark HRV-induzierte pro-inflammatorische Mediatoren und die ICAM-1-Expression. Reservatrol ist ein Polyphenol, welches in vielen Pflanzenteilen und damit auch in Lebensmitteln, wie Wein und Früchten enthalten ist [53]. Die Entwicklung eines Impfstoffes stellt sich bei den über 100 Subtypen mit schlechter Kreuz-Reaktivität der neutralisierenden und damit als schützend geltenden Antikörper als schwierig heraus. Bis heute gibt es daher keinen verfügbaren Impfstoff [54]. Kürzlich wurde gezeigt, dass ein 50-wertiger inaktivierter HRV-Impfstoff, der mit einem Alhydrogel-Adjuvans zusammengesetzt ist, gegen ungefähr ein Drittel der zirkulierenden HRV-Typen in Rhesusaffen immunogen ist und weitgehend neutralisierende Antikörper-Reaktionen hervorruft [55].

1.2 Interleukin-8 / CXCL 8 (IL-8)

In dieser Arbeit wird die Konzentration von Interleukin-8 in den Naso-Pharynx-Aspiraten bestimmt. Studien legten bereits einen Zusammenhang von IL-8 und der Exazerbation von eosinophiler Aktivität in der Mukosa der Atemwege nahe [56]. Das Zytokin Interleukin-8 (nach neuer Nomenklatur CXCL 8) wurde 1987 als ein neuer Typ von neutrophil-aktivierenden Zytokinen identifiziert [57]. IL-8 ist ein Mitglied der Chemokin-Familie. Chemokine sind spezialisierte Zytokine, die von vielen normalen und neoplastischen, menschlichen Zell-Typen produziert und sezerniert werden. Sie bewirken eine gerichtete Migration von Leukozyten und werden grundsätzlich als Antwort auf Wachstumsfaktoren, inflammatorische Zytokine und pathophysiologische Bedingungen sezerniert [58–60]. Bei der Entdeckung der ersten Chemokine wurde IL-8 als ein chemotaktischer Faktor identifiziert, der von Monozyten und Makrophagen sezerniert und aktiviert wird. Er veranlasst die gezielte Migration von neutrophilen, basophilen und T-Lymphozyten [57,61]. Später wurde in Studien gezeigt, dass IL-8 eine wichtige Rolle bei autoimmunen und inflammatorischen Erkrankungen, sowie Infektionen spielt [62–64].

1.3 Eosinophiles kationisches Protein (ECP)

Aufgrund des Zusammenhanges zwischen ECP und Asthma-Aktivität wurde die Konzentrationen von eosinophilem kationischen Protein (ECP) in den Naso-Pharynx-Aspiraten in dieser Arbeit bestimmt. Die ECP-Konzentrationen der verschiedenen Rhinovirus-Subtypen wurden dann miteinander verglichen. ECP ist ein bei der Immunabwehr wichtiges Protein [57], welches von eosinophilen Granulozyten gebildet wird. Eosinophile Granulozyten treten bei Entzündungsreaktionen und als Antwort auf parasitäre Infektionen auf. Ihre zytoplasmatische Granula enthält positiv geladene Proteine, die die Zelle charakterisieren. ECP ist eines der vier stark basischen Proteine der Granula. Dazu zählen:

- Major basic protein (MBP),
- Eosinophil cationic protein (ECP),
- Eosinophile peroxidase (EPX),
- Eosinophil-derived neurotoxin (EDN) [66].

Bei einer Aktivierung des Immunsystems degranulieren eosinophile Granulozyten und geben diese Proteine an das umgebene Gewebe ab. Dies führt zu einem Gewebsschaden und Zell-Dysfunktion. [67]. MBP, EPX und ECP wirken zum einen toxisch

auf viele Gewebe [68]. ECP und EDN sind ebenso Ribonukleasen mit antiviraler Aktivität [69]. Dies erreicht ECP durch die Produktion toxischer Kanäle in die Membran der Zielzelle und erlaubt dadurch das Eintreten anderer zytotoxischer Moleküle [70]. Zudem kann ECP die Proliferation von T-Zellen hemmen, die Antikörper-Produktion von B-Zellen unterdrücken, die Degranulation von Mastzellen induzieren und Fibroblasten zur Sekretion von Mucus und Glycosaminen stimulieren [71]. Eosinophile Rekrutierung und Degranulation konnte mit der Pathogenese von Asthma und der Inflammation durch virale Infektion (in dem beschriebenen Fall durch RSV) in Verbindung gebracht werden [72,73]. Die Bestimmung von Serum-ECP kann hilfreich sein, um objektiv eine Asthma-Aktivität zu messen. Erhöhte ECP-Level korrespondieren mit dem Symptombeginn. Bei Patienten mit saisonalem Asthma können ECP-Messungen die Änderungen der Krankheitsaktivität über das Jahr anzeigen [74]. Eine Untersuchung zur Wirkung von Kortikoiden zeigte, dass die Serumspiegel von ECP bei Rhinovirus-induzierter akuter Exazerbation von Asthma nach Behandlungen mit systemischen Kortikosteroiden signifikant verringert waren [75].

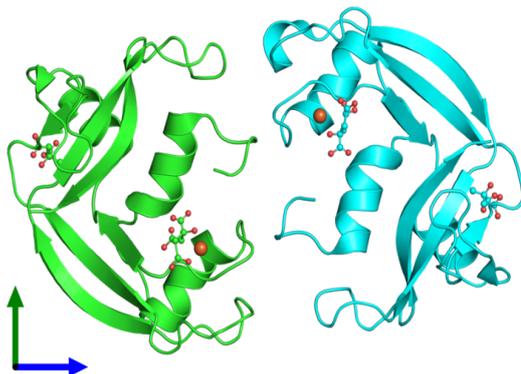


Abb. 3: ECP Struktur [224,225]

Zu sehen ist die molekulare Struktur des Proteins in räumlicher Darstellung

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ein wesentlicher methodischer Ansatz der vorliegenden Arbeit ist die Subtypisierung von Rhinoviren, die in einem Kollektiv von 48 Kindern bei einer Infektion der oberen oder unteren Atemwege oder Pneumonie auftraten. Die Typisierung erfolgt dabei aus gewonnenen Nasopharynxaspiraten (gewonnen zwischen 02.11.2006 bis 16.09.2008) und deren korrespondierenden Eluaten.

Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Tritt in dem Kollektiv der erst 2009 definierte Subtyp HRV-C auf?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen den Subtypen und dem Auftreten, der Viruslast oder der Häufigkeit von Koinfektionen mit anderen Viren?
3. Gibt es eine Korrelation zwischen Subtypen und der Schwere der Verläufe, vor allem des Auftretens einer Pneumonie?
4. Gibt es Hinweise auf andere Ursachen für einen schweren Verlauf, insbesondere beim Auftreten einer Pneumonie?
5. Verursacht ein bestimmter Subtyp eher einen chronischen, persistierenden Verlauf?
6. Ist ein Subtyp bevorzugt Auslöser einer Exazerbation von allergischem Asthma?

Folgende Methodik wurde zur Beantwortung der Fragen angewendet:

1. Amplifikation und Sequenzierung von HRV-Genomen von aus Nasopharynxaspiraten gewonnenen RNA-Eluaten,
2. Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums und Zuordnung der Proben zu den bekannten HRV-Subtypen,
3. Erstellung von Rhinovirus-IFT und -ELISA- Tests zum Nachweis von Antikörpern, um Rückschlüsse auf die humorale Immunantwort zu ziehen,
4. Vergleich der Krankheitsausprägung (klinische Ausprägung und laborchemische Parameter) bei den verschiedenen Subtypen,
5. Nachweis von Koinfektionen mit CMV-, EBV- und HHV-6,
6. Messung von den Zytokinen IL-8 oder ECP, als Zeichen einer Akut-Phase Antwort und Trigger für Allergien.

II Material und Methoden

2.1 Liste der verwendeten Materialien

2.1.1 Patienten- / Probenkollektiv

Als Untersuchungsmaterial wurden in dieser Arbeit Nasopharynxaspirate (NPA) und die daraus gewonnenen Nukleinsäure-Eluate verwendet. Die Nasopharynxaspirate wurden zwischen 22.11.2006 und 16.09.2008 von Kindern abgenommen, die in der pädiatrischen Klinik des Uniklinikums Düsseldorf wegen einer Rhinovirus-Infektion der oberen Atemwege (obstruktive und nicht-obstruktive Bronchitis) oder Pneumonie stationär aufgenommen wurden. Das Proben-Kollektiv setzte sich aus zwei NPAs, die in einem Abstand von einem bis fünf Tagen (im Mittel 2,84 Tage) abgenommen wurden, zusammen. Die Rhinovirus-Eluate aus den Nasopharynxaspiraten wurden mittels RNA-Extraktion (Quiagen® EZ1® RNA Cell Mini Kit, Cat. No.: 958034) im Rahmen einer früheren Dissertation (Johanna Weis: Immunantwort und klinisches Erscheinungsbild bei Infektionen mit dem Humanen Metapneumovirus, Respiratory Syncytial Virus und Rhinovirus im Kindesalter, 2014) hergestellt und bei -80 °C gelagert. Teilweise bestanden Koinfektionen mit anderen anderen respiratorischen Viren wie CMV, EBV und HHV-6. Eine Übersicht über die Eigenschaften des Kollektivs gibt folgende Tabelle:

Eigenschaft	n
Kollektiv NPA / Eluate	37
Zeitraum der NPA-Gewinnung	22.11.06 bis 16.09.08
Alter (Jahre) min.	0,12
Alter (Jahre) max.	14,16
Alter (Jahre) Median	1,578
Männliches Geschlecht*	26 (70,2 %)
Auftreten von Koinfektionen insgesamt	16 (43,2 %)
Auftreten von Pneumonien insgesamt	12 (32,4 %)

Tabelle 1: Charakteristika des Probenkollektivs

37 Proben = NPA (Naso- Pharynx- Aspirat) und Eluate, davon 26 von männlichen und 11 von weiblichen Patienten, mittleres Alter 1,6 Jahre. Davon hatten 16 Patienten eine virale Koinfektion (CMV-, EBV- und HHV-6) und 12 Patienten eine Pneumonie.

2.1.2 Materialien allgemein, für alle Arbeitsplätze

- Einmalpipetten, steril
 - 5 ml, Coring® Costar®, Cat. No. 4487
 - 10 ml, Coring® Costar®, Cat. No. 4488
 - 25 ml, Coring® Costar®, Cat. No. 4489
- Pipetten, Einkanal
 - eppendorf® Reference® 10 (1 – 10 µl)
 - eppendorf® Reference® 100 (10 – 100 µl)
 - eppendorf® Reference® 1000 (100 – 1000 µl)
 - INTEGRA Biosciences GmbH, Pipetboy acu
- Pipetten, Mehrkanal
 - eppendorf® 8-Kanal (20 – 200 µl)
- Pipettenspitzen
 - 0.1-10 µl, TipOne Bevelled Filter Tips, Cat. No. S 1121-3810
 - 1-20 µl, TipOne Bevelled Filter Tips, StarLab GmbH, Cat. No. S 1120-1810
 - 20 µl, TipOne Filterpipettenspitzen, StarLab GmbH, Cat. No. S1120-1810
 - 1-200 µl, TipOne Bevelled Filter Tips, StarLab GmbH, Cat. No. S 1120-8810
 - 200 µl, TipOne Filterpipettenspitzen, StarLab GmbH, Cat. No. S11-20-8810
 - 101-1000 µl, TipOne Bevelled Filter Tips, StarLab GmbH, Cat. No. S 1126-7810
 - 2 ml, STRIPETTE®, Coring® Costar®, Cat. No. 4486
 - 5 ml, STRIPETTE®, Coring® Costar®, Cat. No. 4487
 - 10 ml, STRIPETTE®, Coring® Costar®, Cat. No. 4488
 - 25 ml, STRIPETTE®, Coring® Costar®, Cat. No. 4489
- Reaktionsgefäße
 - 96-Loch-Mikrotiterplatte: Thermo Fisher Scientific Nunc Immuno 96 MicroWell™ Solid Plates, Cat. No. 449824
 - 1,5 ml-Reaktionsgefäße: Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Cat. No. 0030 120 086, Eppendorff AG
 - SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml, Sarstedt
 - Sample tubes 2 ml, Quiagen®
 - Optical caps (8 caps/strip), Applied Biosystems™, Cat. No. 4323032
 - PP-Test-tubes 15 ml, greiner bio-one GmbH, Cat. No. 188271
 - Blue Max™ 50 ml Polypropylene conical tube, Becton-Dickinson, Cat. No. 352070
 - Rührchen 50 ml, BD Falcon™

2.1.3 Zellkultur / -Infektion / -Ernte

- MRC-5 Zellen (Humane, embryonale Lungen-Fibroblasten)
- Rhinovirus, Laborstamm

Virus	Stamm	Herkunft	Susceptible Zelllinie	CPE	Auftreten des CPE
HRV-9	211-CV13	ATCC, VR-1119	MRC-5	Lyse	1 – 2 Tage

Tabelle 2: Eigenschaften Rhinovirus Laborstamm

HRV (Humanes Rhinovirus), MRC-5 (Medical Research Council cell strain 5)

- Zentrifugierröhrchen 15 ml, Greiner Labortechnik
- Zentrifugierröhrchen 50 ml, Greiner Labortechnik
- Zellkulturflasche 25 cm², Cat. No. 90025, TPP
- Zellkulturflasche 75 cm², Cat. No. 90075, TP
- PBS, Phosphat Buffered Saline (Dulbecco A) Tablets (1Tbl auf 100 ml dH₂O), Cat. No. BR0014G, Oxoid™, Thermo Fisher Scientific
- DMEM, Dubbecco's Modified Eagle Medium, Cat. No. 41966-029, Gibco®, Life Technologies
- Penicillin/Streptomycin. 10000 U/ml, Gibco®, Cat. No. 15140-122
- Trypsin-EDTA, 0,05 %, Gibco®, Cat. No. 25300-054
- Fetal bovine serum (FKS), Gibco®, Cat. No. 10270-106
- Flaschenwippe
- Zellschaber, Greiner Labortechnik

2.1.4 Materialien Immunfluoreszenztest (IFT)

- Rhinovirus-infizierte Zellen
- PBS Phosphat Buffered Saline (Dulbecco A) Tablets (1Tbl auf 100 ml dH₂O), Cat. No. BR0014G, Oxoid™, Thermo Fisher Scientific
- 1. Antikörper: In Nasopharynxaspiraten vorhandene humane Antikörper
- 2. Antikörper, 1:40.000 in Verdünnungspuffer Evans-blue/PBS-Lösung (0,001 %):
 - Anti-Human IgG (Fab specific) developed in Goat, Affinity isolated Antibody, FITC-gekoppelt, Product No. F1418, Sigma-AdrichR Chemie, München
 - Anti-Human IgA (Fab specific) developed in Goat, Affinity isolated Antibody, FITC-gekoppelt, Product No. F5259, Sigma-AdrichR Chemie, München
 - Anti-Human IgM (μ-chain specific) developed in Goat, Affinity isolated Antibody, FITC-gekoppelt, Product No. F5384, Sigma-AdrichR Chemie, München
- Methanol 100 % (Trockeneis-gekühlt)

- Objektträger für Immunfluoreszenz, bioMérieux Deutschland GmbH, Cat. No. 75751,
- Eindeckmittel („mounting fluid“)
- Deckgläser 24 x 60 mm
- feuchte Kammer für die Objektträger

2.1.5 Materialien ELISA

- Rhinovirus-infizierte Zellen
- PBS Phosphat Buffered Saline (Dulbecco A) Tablets (1Tbl auf 100 ml dH₂O), Thermo Fisher Scientific, Cat. No. BR0014G, Oxoid™
- Wärmebad 35°C
- 1. Antikörper: Nasopharynxaspirate
- 2. Antikörper: Anti-Human IgG (Fab specific) developed in Goat, Affinity isolated Antibody, Peroxidase-gekoppelt, (Sigma-Adrich® Chemie, München), Product No. A 0293, 1:40.000 in Verdünnungspuffer
- Beschichtungspuffer „coating buffer“, pH 9,6
 - Na₂CO₃ 1,59 g
 - NaHCO₃ 2,93 g
 - dH₂O 1,0 l
- Blockierungspuffer „blocking buffer“:
 - 10 % Gibco® fetal bovine serum (FKS) 5 ml
 - Bovine Albumin (BSA) 2 g
 - PBS 100 ml
- Verdünnungspuffer: DPBS mit 5% FKS und 0,5ml Tween® 20
- Waschlösung: PBS mit 0,5% Tween® 20
- Substrat: o-Phenylenediamine-dihydrochlorid (OPD) 30 mg Tablette
Phosphate-Citrate Buffer + Sodium Perporate (Na-Borat-Kapsel) P4922-100CAP
in Aqua dest. (dH₂O) 100 ml

2.1.6 Materialien Bradford-Test

- Bradford-Reagenz: Bio-Rad Laboratories GmbH Protein Assay, Cat. No. 500-0006
- Protein-Stammlösung: Albumin Fraktion V, Molare Masse (M) ca. 66.000 g/mol, Carl Roth GMBH, Cat. No. 8076.x

- Phosphat Buffered Saline (PBS) (Dulbecco A) Tablets (1Tbl auf 100 ml dH₂O), Oxoid™

2.1.7 Materialien Eosinophil cationic protein-ELISA (ECP-ELISA)

- Rhinovirus-positive Nasopharynxaspirate
- Mesacup ECP Test, Cat. No. 7618E, MBL (Medical & Biological Laboratories CO., LTD) beinhaltet:
 - Anti-Human ECP Antikörper beschichtete Mikrotitrierstreifen (12 Streifen zu je 8 Kavitäten)
 - ECP-Standards (0,09 % Natriumazid, Konservierungsmittel: 1 % Ziegen Serum; gebrauchsfertig), 6 Fläschchen zu je 1,3 ml
 - Probendiluent (0,09 % Natriumazid, Konservierungsmittel: 1 % Ziegen Serum)
 - Konjugat (Mit Meerrettichperoxidase markierte polyklonale Antikörper gegen menschliches ECP, 1 % BSA; gebrauchsfertig)
 - Waschpuffer (10fach konzentrierte Lösung)
 - Substrat (TMB/H₂O₂; gebrauchsfertig)
 - Stopplösung (0,5 M H₂SO₄; gebrauchsfertig)
 - Positivkontrolle (0,09 % Natriumazid, Konservierungsmittel: 1% Ziegen Serum)
 - Negativkontrolle (0,09 % Natriumazid, Konservierungsmittel: 1% Ziegen Serum)
- Aquadest (dH₂O)
- Messzylinder, 1L

2.1.8 Materialien Interleukin-8-ELISA (IL8-ELISA)

- Rhinovirus-positive Nasopharynxaspirate
- Human IL-8 ELISA Set, Cat. No. 555244, BD OptEIA™, beinhaltet:
 - 1. Antikörper („capture“): purified anti-human IL-8 monoklonaler Antikörper, 500 µg/ml
 - 2. Antikörper („detection“): biotinylated anti-human IL-8 monoklonaler Antikörper
 - Enzym-Reagenz: Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (SAv-HRP)
 - Standards: Rekombinantes human IL-8 (gefriergetrocknet) in Verdünnungsreihe über 8 Stufen von 500 µg/ml bis 4 µg/ml
- Beschichtungspuffer „binding solution“: M Na₂HPO₄, pH 9,0
- Blockierungspuffer „blocking buffer“: 10 % Gibco® fetal bovine serum (FKS)
- Blocking Buffer-Tween: 0,5 ml Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween® 20) in 1l Blockierungspuffer
- Substrat: BD Pharmingen™ Tetramethylbenzidine (TMB) Substrate Reagent Set (Substrate Reagent A + B), Cat. No. 555214,
- Stopplösung: 0,1 M (53.55 ml Schwefelsäure (H₂SO₄) in 1 l Aqua dest.)

2.1.9 Materialien Rhinovirus Polymerase chain reaction und First-Strand cDNA Synthese

- Rhinovirus-Eluat aus Nasopharynxaspiraten, RNA-Extraktion durch Quiagen® EZ1® RNA Cell Mini Kit (Cat. No.: 958034) – erstellt durch J. Weis (HHU) im Rahmen ihrer Dissertation 2014, bei -80 °C zurückgestellt
- Optical caps (8 caps/strip) Applied Biosystems™ No. 4323032
- PCR-Nukleotid Mix, Roche®, 10 mM each dNTP, 200 µl
- RNase-free Water
- 5x First strand buffer (250 mM Tris-HCl; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂)
- 0,1 M DTT
- SuperSkript™ II Reverse Transcriptase, invitrogen™, Cat. No. 18064-022
- 10x Puffer mit Mg²⁺
- PWO DNA Polymerase, Roche™, Ref.: 11 644 955 001
- Aqua dest. (dH₂O)

2.1.10 Sequenzen der in der Rhinovirus PCR und First-Strand cDNA Synthese verwendeten Primer

Primer-Name	Sequenz
F-Primer	GGG ACC AAC TAC TTT GGG TGT CCG TGT (5' → 3') [76]
Spezifikation*	Molekular-Gewicht: 7386 Daltons Basic T _m : 61 °C Salz-adjustiert T _m : 56 °C ΔH -189 kcal/mol
R-Primer	GCA TCA GGY ARY TTC CAC CAC CAN CC (5' → 3') [76]
Spezifikation*	Molekular-Gewicht: 7219 Daltons Basic T _m : 59 °C Salz-adjustiert T _m : 54 °C ΔH -187 kcal/mol
Hergestellt durch: Eurofins MWG Operon, Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Auftragsdatum: 02.07.2009, Mit MiniTE auf 10 µM verdünnt.	
Sequenz-Code: G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin, T = Thymin, Y = T	
*Primer-Spezifikationen berechnet durch <i>BioMath</i> [77].	

Tabelle 3: Rhinovirus-PCR Primer Spezifikationen

2.1.11 Materialien Herstellung Agarose Gel zur DNA-Elektrophorese

- DNA-Agarose, Biozym Scientific GmbH
- TBE-Puffer 10 %
- Ethidiumbromid (EtBr), Sigma-Adrich® Chemie, München, CAS Number 1239-45-8
- 1 kb DNA Ladder, invitrogen™, Cat. No. 15615-016
- Auftragspuffer
- Gel-Elektrophorese Kammer

2.1.12 Materialien Aufreinigung der PCR-Produkte

- Gel Extraction Kit, QIAquick®, Quiagen®, Cat. No.: 28704, beinhaltet:
 - QIAquick Zentrifugier-Säule (spin column)
 - Buffer QG
 - Buffer PE (konzentriert)
 - Buffer EB
 - Sammelröhrchen (Collection Tubes) 2 ml
 - Loading Dye
- Skalpell

2.1.13 Materialien TaqMan™-PCR für CMV-, EBV-, HHV-6, HSV 1

- Optical caps (8 caps/strip) Cat. No. 4323032, Applied Biosystems™
- Certified rigid thin wall skirted microplates, StarLab, Cat. No. I 1402-9700 (nur CMV, EBV, HHV-6)
- Certified 0,2 ml optically clear 8 strip, StarLab, Cat. No. E1400-0866 (nur CMV, EBV, HHV-6)
- Micro Amp optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems™, Cat. No. 8010560 (nur HSV 1)
- Micro Amp optical tubes (8-strips), Applied Biosystems™, Cat. No. 4316567 (nur HSV 1)
- Micro Amp splash free support base, Applied Biosystems™, Cat. No. 4312063
- m-TE puffer:
 - Aqua ad injectabilia, Braun, Cat. No. 3703452
 - Minimum sterile buffer (1 mM Tris-HCL pH 8 / 0,01 mM EDTA)
- Universal Master Mix 2x, Applied Biosystems™, Cat. No. 4305719
- Aqua ad injectabilia, Braun, Cat. No. 370 3452

2.1.14 Sequenzen der in der TaqMan™ PCR verwendeten Primer und Sonden

Die folgende Tabelle listet die verwendeten Sequenzen der für die TaqMan™-PCR verwendeten Primer und Sonden.

HSV 1	Name	Sequenz
F-Primer	HSV-TypF	ACC ATG ACC AAG TGG CAG GA
R-Primer	HSV-TypR	AGA AKC GGA AGG AGC CGC
Sonde	HSV-1Typ	<i>FAM</i> - CGG AGC GCA GCA TCT CGT CCA - <i>TAMRA</i>
CMV		
F-Primer	CMV-Pol-F	TCT GCA GGA CGC CGT ATT G
R-Primer	CMV-Pol-R	GCC CCG GCC TCG TAG T
Sonde	CMV-Pol-pr	<i>FAM</i> - TGC GCG ATC TGT TCA ACA CCA TTA ATT TT - <i>TAMRA</i>
EBV		
F-Primer	EBV-Pol5	AGT CCT TCT TGG CTA GTC TGT TGA C
R-Primer	EBV-Pol3	CTT TGG CGC GGA TCC TC
Sonde	EBV-Pol	<i>FAM</i> - CAT CAA GAA GCT GCT GGC GGC C - <i>TAMRA</i>
HHV-6		
F-Primer	HHV6-Pol5	AAT TAT CAT TTT GAG GTT GCC GA
R-Primer	HHV6-Pol3	CCC TCG AAC ACC ACA CAT CTA G
Sonde	HHV6-Pol	<i>FAM</i> - CGC CAG ATT GGC ACA CGT CAC G - <i>TAMRA</i>
Sequenz-Code: G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin, T = Thymin		
FAM = 6-FAM-phosphoramidit		
TAMRA = Tetramethylrhodamine		
F-Primer = forward primer, R-Primer = reverse primer		

Tabelle 4: TaqMan™-Primer Spezifikationen

2.1.15 Geräte

- Sicherheitswerkbank: HERAsafe, Heraeus Instruments GmbH
- Waage: Mettler PC 2000, Mettler GmbH
- Zentrifuge: Eppendorf® Centrifuge 5417C, Eppendorf AG
- Zentrifuge: Megafuge 1.0, Thermo Fisher Scientific Inc. Heraeus®
- Heizrührer: IKA®-Werke GmbH & CO. KG, IKAMAG RH, Janke & Kunkel
- Vortex-Schüttler: VIBROFIX VF1 Electronic, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Janke & Kunkel
- Inkubator: BBD-6220, Thermo Fisher Scientific Inc. Heraeus®
- Mikroskop: Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss AG
- Mikroskop: Leitz, Leica Microsystems GmbH
- Mikroskop-Fotoapparat: PowerShot A620, Canon Deutschland GmbH

- Photometer: Sunrise™, Tecan Trading AG
- Spektrophotometer: Nanodrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc.
- Thermomixer: Thermomixer Comfort, Eppendorf AG
- Thermocycler / TaqMan: 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems™
- Thermocycler: PCR System 9600, Gene Amp®
- Thermocycler: T3000, Biometra®
- Gelkammer: Kammer, Carl Roth®
- Gel-Betrachter: Lumi Imager™ F1, Roche Deutschland Holding GmbH
- Einfriercontainer: Thermo Fisher Scientific Inc., Nalgene™ Labware

2.1.16 Software

- Photometer Software: Magellan V 6.4, Tecan, Crailsheim
- Lumi-Tower Software: Lumianalyst 3.1.0, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Bildbearbeitung: Adobe Photoshop, Version 12, Adobe Systems Inc.
- Betrachter für ab1-Sequenzen: Geospiza FinchTV for Mac, Version 1.4.0
- Sequence-alignment-Editor und Analyse-Program: BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.0.8.0, Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Erstellung Stammbaum: MEGA5, Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28
- Nanodrop: Nanodrop Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc.
- Software Taq-Man-PCR: 7500 Software, V 2.3, Applied Biosystems™
- Statistik-Programme: SigmaPlot for Windows Version 10.0 Build 10.0.0.54 und SigmaStat for Windows Version 3.5 Build 3.5.0.54, Systat Software, Inc. 2006

2.2 Zellkultur und Virusinfektion

Für die Herstellung des IFT und des ELISA, wurden mit Rhinovirus infizierte Zellen benötigt. Dazu wurden Humane Fibroblasten (MRC-5-Zellen [78]) benutzt, die zunächst durch Zellsplitting aus einer Zelllinie vermehrt. Anschliessend wurden diese mit dem Rhinovirus-Laborstamm (HRV-9) infiziert und schließlich zu dem IFT bzw. ELISA-Test weiterverarbeitet.

2.2.1 Zellkultur

MRC-5-Zellen aus der Laborroutine wurden zunächst aus einer 75 cm²-Zellkulturflasche, nach dem Waschen mit PBS und Ablösen mit 1 ml 0,5%igem Trypsin-EDTA auf mehrere kleine 25 cm²-Zellkulturflaschen übertragen. Die Anzucht erfolgte daraufhin mit je 5 ml Nährmedium (10%-FKS in DMEM mit einem einprozentigem Zusatz von Penicillin und Streptomycin) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Ein Nährmedium-Wechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Der Zellverband wurde täglich lichtmikroskopisch beurteilt. Sobald die Zellen konfluierend den Flaschenboden bedeckten, wurden sie gewaschen, mit Trypsin abgelöst und im Verhältnis 1:2 bis 1:5 auf eine neue 75 cm²-Flaschen übertragen. Dieser Vorgang des Anzüchtens und Transferierens auf weitere Flaschen (splitting) wurde fortgesetzt, bis eine insgesamt ausreichende Anzahl von Zellkulturflaschen mit MRC-5-Zellen hergestellt war.

2.2.2 Zellinfektion

Die Zellinfektion erfolgte mit dem Rhinovirus-Laborstamm, der in Aliquots à 1 ml bei -80°C eingelagert war. Zur Zellinfektion wurde auf die Zellen in 75 cm²-Flaschen 1ml Rhinovirus-Lösung gegeben und danach 60 min im Brutschrank auf dem Kippschüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut mit Nährmedium (2 %- FKS) versorgt.

2.2.3 Zellernte

Bei täglicher mikroskopischer Sichtung, konnte nach ein bis zwei Tagen eine Lyse als typischer cytopathischer Effekt (CPE) beobachtet werden. Bei etwa 30 % - 50 % CPE im Sichtfeld wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und dann mit PBS zur weiteren Verarbeitung aufgenommen.

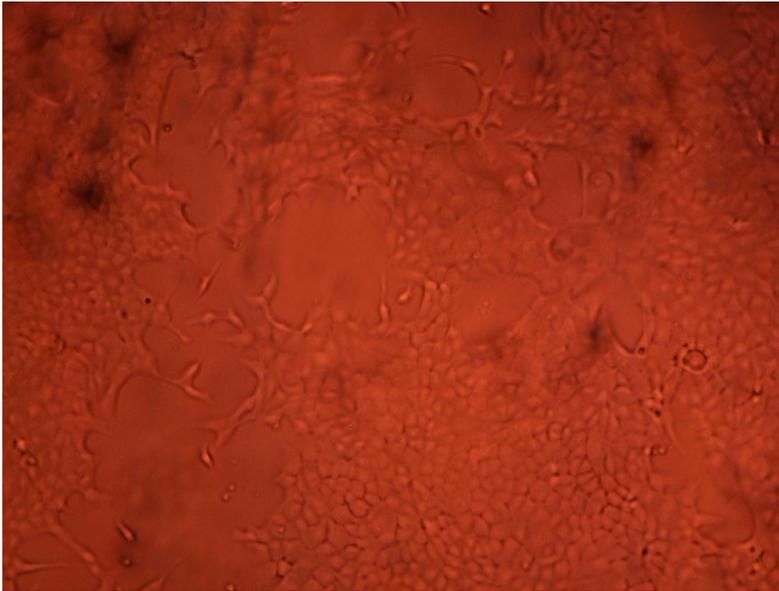


Abb. 4: MRC-5 Zellen mit typischem CPE (Lyse)

Das Foto zeigt MRC-5-Zellen mit einem typischen CPE, der Zell-Lyse, nach einer HRV-Infektion (Phasenkontrast-Objektiv 1:40) .

2.3 Immunfluoreszenztest (IFT)

Ein Immunfluoreszenztest nutzt das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie und dient dem Nachweis von Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen. Das Antigen, in diesem Fall virale Proteine, befindet sich im Cytoplasma und an der Oberfläche infizierter Zellen. Bei dem Test befinden sich diese Zellen in markierten Bereichen (cups) eines Objektträgers, auf dem die zu testende Probe, z.B. Serum oder Sekret, für eine gewisse Zeit gegeben wird. Während dieser Zeit können sich alle Klassen, die in den Proben vorhanden sind, an das Antigen binden. Nach der Inkubationszeit wird der Objektträger gewaschen, um nicht-gebundene und überschüssige Antikörper zu entfernen. Antikörper, die am Antigen gebunden sind, verbleiben am Antigen. Im nächsten Schritt werden Fluoreszenzfarbstoff-Antikörper (IFTC-AK) gegen die gebundenen Antikörper, z.B. Anti-Human-IgG für den Nachweis von menschlichem IgG, für eine definierte Inkubationszeit auf den Objektträger gegeben. Der Objektträger muss nach der Inkubationszeit erneut gewaschen werden, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Der Test wird mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe senden unter Bestrahlung mit einem Anregungslicht ein Emissionslicht aus. Dieses Emissionslicht kann dann durch einen Filter mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Sind in der Testlösung Antikörper gegen das Antigen vorhanden, leuchten die Zellen auf und der Test ist positiv zu werten.

2.3.1 Herstellung der IFT-Objektträger

In PBS gelöste infizierte MRC-5-Zellen wurden in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 1000 U/min 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zentrifugat resuspendiert. 2 µl Zellzentrifugat wurden pro cup auf den Objektträger pipettiert. Aufgrund einer Rauheit der cups besteht eine große Adhäsionsfläche. Lichtmikroskopisch wurde überprüft, ob die Zellen zu ca. 30 – 50 % konfluent auflagen. Andernfalls wurde das Zentrifugat mit PBS verdünnt und erneut aufgetragen. Die IFT-Objektträger wurden daraufhin 60 min. luftgetrocknet und abschließend mit Aceton fixiert.

2.3.2 Durchführung des Immunfluoreszenztests

Als Positivkontrolle wurde ein Serum-Mix von erwachsenen Patienten verwendet, wobei davon ausgegangen wurde, dass diese Seren aufgrund von Patientenalter und einer anzunehmenden vorherigen Exposition spezifische Antikörper gegen Rhinoviren enthält. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Als Proben wurden Nasopharynxaspirate des Kollektivs verwendet. Kontrollen und Proben wurden in den Verdünnungen 1:20 und 1:40 auf die IFT-cups pipettiert und in einer feuchten Kammer für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger in einer Küvette mit PBS 10 Minuten gewaschen und danach an der Luft getrocknet. Im nächsten Schritt wurden die Felder mit Anti-Human IgG, Anti-Human IgA oder Anti-Human IgM (Fab specific, Peroxidasegekoppelt) für 45 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Die Objektträger wurden erneut gewaschen und an der Luft getrocknet. Nach Aufbringen eines Tropfen Eindeckmittels und eines Deckgläschens konnten die Tests unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Anregungslicht (λ 480 nm) ausgewertet werden. Die Test-Objektträger wurden lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

2.4 Rhinovirus Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA-Test ermöglicht den Nachweis von spezifischen Antikörpern qualitativ, als auch semi-quantitativ. Die semiquantitative Aussage, erfolgt im Sinne der Antikörper-Konzentration, durch die Bestimmung der höchsten Verdünnungsstufe, bei dem der Antikörper noch nachgewiesen werden kann. Das Prinzip basiert darauf, dass eine Probe mit den gesuchten Antikörpern in einem Reaktionsgefäß in Kontakt zu einem bekannten korrespondierenden Antigen gebracht wird und sich bindet. Antigen können virusinfizierte Zellen sein, die Virusantigene exprimiert haben. Nach einem Waschschrift des Reaktionsgefäßes verbleiben gebundene Antikörper an den viralen Antigenen auf den Zellen. Im nächsten Schritt wird ein peroxidasegekoppelter zweiter Antikörper in das Reaktionsgefäß gebracht, welcher sich frei an alle gebundenen Antikörper binden kann. Nach einem erneuten Waschschrift verbleibt ein Komplex aus Antigen, Antikörper und zweitem Antikörper mit Peroxidase. Im letzten Schritt wird über eine definierte Zeit ein Substrat zugegeben, welches durch die Peroxidase des zweiten Antikörpers in ein farbiges Produkt umgewandelt und sichtbar gemacht wird. Dieses kann dann photometrisch ausgewertet werden. Wird die Patientenprobe mit den gesuchten Antikörpern in einer Verdünnungsreihe getestet, ist die Bildung eines farbigen Produktes je nach Antikörper-Konzentration bis zu einer bestimmten Verdünnung noch erkennbar. Je höher die Verdünnung ist, bei der noch ein farbiges Produkt gebildet wird, umso mehr Antikörper sind in der Probe vorhanden. Zur Herstellung des Rhinovirus-ELISA-Tests wurden infizierte MRC-5-Zellen in PBS-Lösung in ein Falcon-Röhrchen überführt, bei 1000 U/min 10 min lang zentrifugiert, mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert, dekantiert und danach mit 1ml PBS in ein neues Röhrchen überführt. Es erfolgte ein dreimalig wechselndes Schockgefrieren im Methanolbad mit Trockeneis und Erwärmen im 37 °C-Wasserbad. Dadurch wurden die Zellen thermisch lysiert. In eine unbeschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde 100 µl pro well (Vertiefung) der Proteinlösung in einer Konzentration von 3 µg/ml pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde mindestens 12 Stunden bei 4 °C inkubiert, damit die Proteine des Zelllysats an der Oberfläche der wells binden konnten. Nach Entleeren der Platten wurden pro well 150 µl Blockierungslösung pipettiert und 60 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Platten entleert, getrocknet und entweder sofort weiterverarbeitet oder lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

2.4.1 Bradford-Test zur Proteinbestimmung

Für die ELISA-Herstellung wird eine Protein-Konzentration von 3 µg/ml des Zelllysats aus infizierten MRC-5-Zellen benötigt. Die Protein-Konzentration wurde dafür zunächst mit einem Bradford-Test bestimmt [79]. Zum Erreichen der Konzentration wurde die Lösung ggf. mit Beschichtungspuffer verdünnt. Es wurden Protein-Standards erstellt. Dazu wurde die Protein-Stammlösung in der Konzentration 10 mg/ml mit Aquadest auf die Konzentrationen 0 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml und 120 µg/ml verdünnt. Für den Bradford-Test wurden in eine unbeschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatte 200 µl des Bradford-Reagenz, 1:5 in Aquadest verdünnt, pro well pipettiert. Anschließend wurden jeweils entweder 50 µl vom Standard bzw. das Zelllysats pipettiert. Das ungebundene Bradford-Reagenz hat eine rote Farbe. Bildet es Komplexe mit den Seitenketten der Proteine kommt es zu einem Farbumschlag nach blau. Je höher die Proteinkonzentration ist, umso stärker erfolgt der Farbumschlag. Über die Extinktion konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm die Konzentration bestimmt werden. Die Referenz bilden die oben genannten Proteinstandards.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	Pr1 1:20	Pr1 1:40	Pr9 1:20	Pr9 1:40						
B	S2	S2	Pr2 1:20	Pr 2 1:40	Pr10 1:20	Pr10 1:40						
C	S3	S3	Pr3 1:20	Pr3 1:40						
D	S4	S4	Pr4 1:20	Pr4 1:40								
E	S5	S5	Pr5 1:20	Pr5 1:40								
F	S6	S6	Pr6 1:20	Pr6 1:40								
G			Pr7 1:20	Pr7 1:40								
H			Pr8 1:20	Pr8 1:40								

Pr = Proteinlösung, S = Standard

Tabelle 5: Bradford-Test Pipettierschema

Zur Proteinbestimmung wurde Protein-Stammlösung eine 0 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml und 120 µg/ml verdünnt und in der Spalte 1 und 2 pipetiert. Ab Spalte 3 wurden die Proben immer abwechselnd mit der nächsten Spalte 1:20 und 1:40 pipetiert. Die Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt.

2.4.2 Vortestung und Durchführung des ELISA-Tests

Nach Herstellung des ELISA-Tests wurde zunächst eine Vortestung mit fünf verschiedenen Patientenproben aus der Laborroutine durchgeführt. Es handelte sich um vier Nasensekrete und ein Subduralhämatom. Die Proben wurden zu je 100 µl pro well der Reihe A, stets abwechselnd mit PBS, beginnend in einer Verdünnung von 1:10 um den Faktor 4 verdünnend bis Reihe H pipetiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	PBS	P2	PBS	P3	PBS						
B	1:40	1:40	1:40	1:40						
C	1:160	1:160	1:160	1:160								
D	1:320	1:320	1:320	1:320								
E	1:640	1:640	1:640	1:640								
F	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280								
G	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560								
H	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120								

P = Patientenprobe

Tabelle 6: ELISA-Test Pipettierschema

Die Proben wurden zu je 100 µl pro well der Reihe A, abwechselnd mit PBS, beginnend in einer Verdünnung von 1:10 um den Faktor 4 (d.h. 1:40, 1:160, 1:320, usw.) verdünnend bis Reihe H pipettiert.

Anschließend wurden die Tests 60 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Im nächsten Schritt wurden jeweils 100 µl pro cup des peroxidasegekoppelten 2. Antikörpers (Anti-human-IgG-POD) in Verdünnungspuffer 1:40.000 zugegeben und erneut 60 min wie im ersten Schritt inkubiert und gewaschen. Zuletzt wurde der Test mit 100 µl Substrat o-Phenylenediamine dihydrochloride pro cup 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 100 µl Stopplösung gestoppt. Das erwartete Oxidationsprodukt der Peroxidase ist 2,3-Diaminophenazine, ein gelb-oranges Produkt. Das Extinktionsmaximum liegt bei 492 nm und wurde photometrisch ausgewertet. Als positives Ergebnis wurde eine Differenz von > 0,1 zwischen den Rohwerten von Probe und PBS gewertet. Es konnte ein deutlich positives Ergebnis bei drei der fünf Proben gemessen werden, d.h. in diesen drei Proben konnten signifikant IgG-Antikörper gegen Rhinoviren bis zu einem Titer von 1:640 nachgewiesen werden. Der Test hatte somit die Vortestung bestanden und wurde für die weitere Testung verwendet.

2.5 Eosinophil cationic protein-ELISA (ECP-ELISA)

2.5.1 Vorbereitung ECP-ELISA

Für die Bestimmung der ECP-Konzentration in den Nasopharynxaspiraten wurden ein kommerzieller Test von MBL verwendet. Dieser beinhaltet eine mit Anti-human ECP-Antikörper beschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatte, sowie alle notwendigen Reagenzien.

2.5.2 Durchführung ECP-ELISA

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die NPAs wurden 1:100 (bei unzureichender Menge Verdünnung 1:200) mit Probendiluent verdünnt. In eine unbeschichtete Mikrotiterplatte wurde in die erste Spalte eine Standard-Reihe und eine Negativ- und Positiv-Kontrolle, ab der zweiten Spalte jeweils 150 µl pro well verdünnte NPAs pipettiert. Anschließend wurden mit einer Multikanalpipette jeweils 100 µl der Proben und Standards in die mit Antikörpern beschichtete Platte übertragen und 60 min bei Raumtemperatur (20 – 25°C) inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurden im Anschluss viermal gewaschen und gegen saugfähiges Papier ausgeklopft. Es wurden dann jeweils 100 µl pro well gebrauchsfähiges Konjugat pipettiert und ebenfalls 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen der Platte wurden jeweils 100 µl pro well der Substrat-Lösung pipettiert und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Ohne vorheriges Waschen wurden dann jeweils 100 µl der Stopplösung pipettiert. Die photometrische Auswertung erfolgte anschließend bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Die Messergebnisse wurden anhand der vom Hersteller mitgelieferten Standardkurve automatisch vom Photometer-Software Magellan™ in ng/ml ausgegeben und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	P1										
B	S2	P2										
C	S3	P3										
D	S4	...										
E	S5											
F	S6											
G	Pos											
H	Neg											

S = ECP-Standard, P = Patientenprobe 1, Pos = Positivkontrolle, Neg = Negativkontrolle

Tabelle 7: ECP-ELISA-Test Pipettierschema

In die erste Spalte wurde eine Standard-Reihe und eine Negativ- und Positiv-Kontrolle in Spalte 1 und ab der zweiten Spalte jeweils 150 µl pro well verdünnte NPAs (Nasopharynxaspirate) pipettiert.

2.6 Interleukin-8-ELISA (IL-8-ELISA)

2.6.1 Vorbereitung IL-8-ELISA

Alle Materialien für den IL-8-ELISA lieferte ein kommerzielles Set von BT Biociences, das eine unbeschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatte enthält. Zur Beschichtung der Festphase wurde der erste Antikörper mit Beschichtungspuffer auf eine Konzentration von 2 µg/ml verdünnt und 100 µl pro well pipettiert. Die Platte wurde über Nacht (> 8 Std.) bei 4 °C abgedeckt inkubiert. Nach dem Erwärmen auf Zimmertemperatur wurde die Platte entleert, dann 200 µl Blocking puffer pro well pipettiert und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden erneut entleert und dreimalig mit Waschpuffer gewaschen. Nach abschließendem Leeren und Trocknen wurden die Tests entweder sofort verwendet oder bei 4 °C gelagert.

2.6.2 Durchführung IL-8-ELISA

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. In die erste Spalte von A1 nach H1 wurde zunächst der Standard in den vorbereiteten Verdünnungen mit Beschichtungspuffer 500, 250, 125, 62, 31, 16, 8 und 4 pg/ml pipettiert. In die anderen wells wurden jeweils 100 µl Blocking Buffer-Tween pipettiert. Darauffolgend wurden jeweils 100 µl Nasopharynxaspirat in den Verdünnungen 1:100 und 1:200 in Blocking Buffer-Tween abwechselnd pro well pipettiert, als Negativkontrolle PBS in den wells G12 und H12. Die Platte wurde über Nacht abgedeckt bei 4 °C inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S 500 pg/ml	P1 1:100										
B	S 250 pg/ml	P1 1:200										
C	S 125 pg/ml	P2 1:100										
D	S 62 pg/ml	P2 1:200										
E	S 31 pg/ml	P3 1:100										
F	S6 16 pg/ml	P3 1:200										
G	S 8 pg/ml	...										PBS
H	S 4 pg/ml											PBS

S = Standard, P = Patientenprobe

Tabelle 8: IL8-ELISA-Test Pipettierschema

In die erste Spalte von A1 nach H1 wurde zunächst der Standard in den vorbereiteten Verdünnungen mit Beschichtungspuffer 500, 250, 125, 62, 31, 16, 8 und 4 pg/ml pipettiert. In die anderen wells wurden jeweils 100 µl Blocking Buffer-Tween pipettiert. Darauffolgand wurden jeweils 100 µl Nasopharynxaspirat in den Verdünnungen 1:100 und 1:200 in Blocking Buffer-Tween abwechselnd pro well pipettiert, als Negativkontrolle PBS in den wells G12 und H12.

Zur Testfortsetzung wurde die Platte entleert und der 2. Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml (entspricht 1:500 in Blocking Buffer-Tween) pro well pipettiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut entleert und viermal mit Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Streptavidin-HRP (entspricht 1:2000 in Blocking Buffer-Tween) pro well pipettiert und die Platte 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte entleert und fünfmal gewaschen. Das Substrat musste nach dem Ansetzen innerhalb von 20 min verwendet werden. Es wurden jeweils 100 µl Substrat pro well pipettiert und die Platte 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die konjugierte Meerrettichperoxidase der gebundenen 2. Antikörper katalysierte das Substrat je nach Konzentration der Peroxidase in der Farbe von farblos oder sehr hell blau nach deutlich blau. Danach wurden 100 µl Stopplösung pro well zugegeben. Die Reaktion wurde damit gestoppt und die Farbe wechselte von blau nach gelb. Die Extinktion wurde bei 405 nm photometrisch gemessen. Die Messergebnisse wurden anhand der vom Hersteller mitgelieferten Standardkurve automatisch vom Photometer-Software Magellan™ in pg/ml ausgegeben.

2.7 PCR zum Nachweis von Rhinovirus-RNA (Rhinovirus-PCR)

Das RNA-Genom des Rhinovirus muss vor der PCR zunächst in eine cDNA mit Hilfe eines Reverse-Transkriptase-Enzyms (RT-PCR) umgewandelt werden. Hierbei wurden das Protokoll und auch die Primer-Sequenzen aus der Arbeit von Savolainen C et al [80] unverändert angewendet. Der Forward-Primer beginnt an Base 534, der Reverse-Primer an Base 1083 des Gesamt-Genoms. Bei dem dazwischen liegenden Bereich handelt es sich um eine hypervariable Region, durch die die verschiedenen Subtypen unterschieden werden können. Für die RT-PCR wird nur der R-Primer benötigt, für die Amplifikation der cDNA der F- und R-Primer.

2.7.1 Durchführung Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR)

Der DNA-PCR musste eine Reverse-Transkriptase-PCR vorausgehen, um die virale RNA in cDNA umzuschreiben. Im PCR-Reinraum wurde ein Master-Mix hergestellt.

Nr.	Substanz	Volumen
1	RNAse freies aqua dest	7,3 µl
2	5x First strand buffer	4,0 µl
3	0,1 M DTT	2,0 µl
4	PCR-Nucleotid-Mix (je 10 mM)	1,0 µl
5	R-Primer (10 µM)	0,2 µl (= 2 pmol)
6	Super Script II Reverse Transcriptase	0,5 µl
	Gesamtvolumen pro Ansatz	15 µl

Tabelle 9: Master-Mix RT-PCR

Für die RT-PCR wurden im PCR-Reinraum je 15 µl Master-Mix in 1,5 ml-Eppendorf-Tubes pipettiert und 5,0 µl Rhinovirus-Eluat hinzugefügt. Die Ansätze wurden dann im Thermocycler für 50 min bei 42 °C inkubiert. In dieser Zeit schreibt die Super-Script II RT die RNA mit dem R-Primer in cDNA um. Im Anschluss wurden die Ansätze für 15 min bei 70 °C inkubiert, um mögliche DNA-Stränge aufzutrennen und die Reverse-Transcriptase-Reaktion zu stoppen.

2.7.2 Durchführung der DNA-PCR-Amplifikation

Für die DNA-PCR wurde ein Master-Mix im PCR-Reinraum angesetzt. Dazu wurden folgende Komponenten in einem 1,5 ml-Eppendorf-Tube auf Eis pipettiert.

Nr.	Substanz	Volumen
1	Aqua dest	34,5 µl
2	10x Puffer mit Mg^{2+}	5,0 µl
3	PCR-Nucleotid-Mix (je 10mM)	2,0 µl
4	F-Primer (10µM)	3 µl (= 30 pmol)
5	R-Primer (10µM)	3 µl (= 30 pmol)
6	PWO Polymerase	0,5 µl
	Geamtvolumen pro Ansatz	48 µl

Tabelle 10: Master-Mix PCR

Für den DNA-PCR-Ansatz wurden je 48 µl Master-Mix in die cups eines PCR-Strips pipettiert und am Arbeitsplatz im Großraumlabor 2 µl Produkt aus der RT-PCR hinzugefügt. Die PCR wurde mit den unter 2.7.4 aufgelisteten Spezifikationen durchgeführt. Zwischen den Primern bei 534 bp und 1083 bp war ein PCR-Produkt mit einer Länge von 549 bp zu erwarten. Es ist ein Fragment, welches die hypervariable Region über 5'NCR, dem gesamten VP4-Gen und dem 5'-Terminus von dem VP2-Gen überspannt [80].

2.7.3 Protokollentwicklung

Als Grundlage für die Rhinovirus-PCR diente ein Protokoll aus einer Arbeit von Savolainen C et al [80]. Bei den ersten PCR-Läufen mit ausgewählten Eluaten aus dem Kollektiv, mit bekannt hoher Viruslast, zeigte sich in der Gelelektrophorese eine zu geringe oder gar keine Produkt-Ausbeute, so dass im Verlauf systematisch die Annealing-Zeit, Temperatur und Elongationszeit verändert und die Ergebnisse verglichen wurden. Aus der theoretisch errechneten T_m von 56 °C für den F-Primer und 54 °C für R-Primer ergab sich im Mittel eine optimale Annealing Temperatur von 55 °C, die auch bei Anwendung die beste Produkt-Ausbeute im Sinne einer starken Bande in der Elektrophorese brachte. Mit den folgenden Zeiten, Temperaturen und Zyklenzahl zeigten sich in der Gelelektrophorese deutliche Banden auf Höhe des gesuchten Produktes von 549 Basenpaaren, so dass diese Einstellungen für alle weiteren PCR-Läufe verwendet wurden.

Nr.	Beschreibung	Zeit	Temp
1	Start	120 Sek.	95°C
2	Denaturierung	30 Sek.	95°C
3	Annealing	30 Sek.	55°C
4	Elongation	120 Sek.	72°C
5	Extension	10 min.	72°C
6	Pause	infinite	4°C
Schritt 2 – 4: 40 Zyklen			

Tabelle 11: Parameter Thermocycler Rhinovirus-PCR

2.7.4 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch mit Agarose-Gel nachgewiesen. Das Gel wurde aus 49,5 g Aquadest + 0,5 g Agarose + 2 µl Ethidiumbromid angesetzt. Nach dem Gießen des Gels wurde dieses bis zum völligen Erkalten kühl gelagert. Pro slot wurden 10 µl PCR-Produkt, vermischt mit 2 µl Auftragspuffer, pipettiert und eine Elektrophorese mit 50 – 60 mA durchgeführt. In den ersten slot wurde eine kb-Leiter als Referenz pipettiert. Die Auswertung erfolgte mittels Lumi Imager™ F1 (Roche). Die Bilder der UV-Gel-Auswertung wurden digital gespeichert.

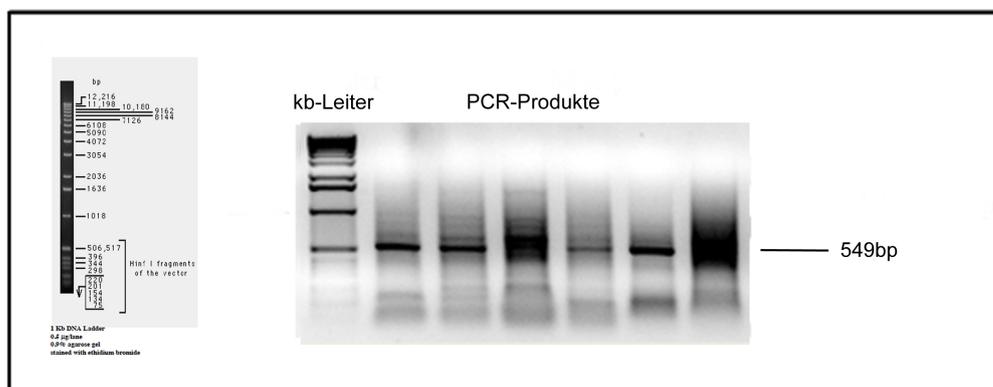


Abb. 5: Gelelektrophorese PCR Produkte (549 bp) Rhinovirus

Es zeigen sich deutliche Banden etwas oberhalb der Bande 506,517 bp, entsprechend dem zu erwartenden Produkt von 549 bp. Ganz links ist die Hersteller Beschreibung und kb-Leiter gedruckt.

2.7.5 PCR-Gel-Extraktion

Zur Sequenzierung der PCR-Produkte mussten diese zunächst nach Elektrophorese aus dem Gel extrahiert werden. Dazu wurde das kommerzielle Set QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen®) genutzt. Alle Zentrifugier-Schritte erfolgten stets mit 17,900 x g (13,000 rpm). Zur Extraktion wurde die Bande mit dem PCR-Produkt aus dem Agarose-Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und zerkleinert. Das zerkleinerte Gel wurde dann in ein Sammelröhrchen überführt und Buffer QR im Verhältnis 3 Buffer-Volumen : 1 Gel-Volumen hinzugegeben. Die Mischung wurde bei 50° C für 10 min inkubiert und dabei alle 2 - 3 min gemischt, bis sich das Gel komplett aufgelöst hatte. Ein Farbindikator zeigte den pH-Wert an, der ggf. mit Natrium-Acetat (10 µl, 3 M) korrigiert wurde. Es wurde dann in gleichem Volumen wie das gelöste Gel Isopropanol hinzugegeben. Für die Extraktion der DNA wurde eine Zentrifugier-Säule mit Membran (spin column) in ein Sammelröhrchen (Collection Tubes) gesteckt und die Mischung mit dem gelösten Gel in die Zentrifugier-Säule überführt. Die Lösung mit den DNA-Fragmenten wurde in 1 min durch die Säule zentrifugiert, wobei die DNA-Fragmente in der Membran hängen blieben. Zur besseren Reinigung von Gel-Resten wurde nach erneuter Zugabe von 0,5 ml Buffer QG für 1 min zentrifugiert. Das Sammelröhrchen wurde nach den Schritten entleert. Es erfolgte dann ein Waschschrift durch Zugabe von 0,75 ml Buffer PE und nach 5 min Einwirkzeit erneutes Zentrifugieren für 1 min. Nach Entleerung des Sammelröhrchen wurde erneut 1 min zentrifugiert, um das Ethanol des Buffer PE komplett zu entfernen. Zur DNA-Eluation wurde die Zentrifugier-Säule in ein neues Sammelröhrchen gesteckt. Es wurde dann unmittelbar auf die Mitte der Membran 50 µl Buffer EB gegeben und nach 4 min Inkubation für eine Minute zentrifugiert. Im Eluat-Volumen (ca. 48 µl) befanden sich die gelösten HRV-DNA-Fragmente. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration mittels NanoDrop™ bestimmt und für die Sequenzierung bei Bedarf auf eine Konzentration von 20 – 50 ng/µl verdünnt.

2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) an der Uni Düsseldorf durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Form von RAW-DNA-Daten (Datei-Format: .ab1, Applied Biosystems™ Sequencing Analysis Software) übermittelt und konnten mit dem Alignment-Programm BioEdit ausgelesen und weiterverarbeitet werden.

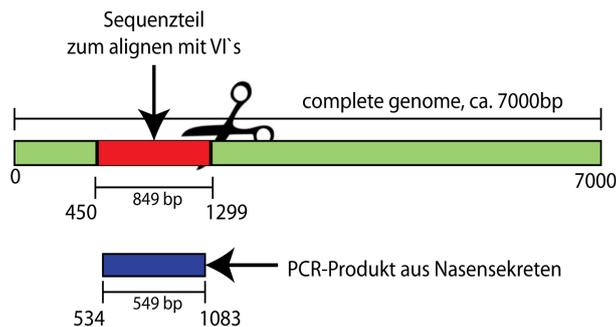


Abb. 6: Schema zur Vorbereitung der bekannten Sequenzen zum Alignment. Die bekannten Sequenzen wurden zuvor gekürzt (Rest: 450 – 1299 bp), um einerseits das Alignment mit dem HRV-PCR-Produkt zwischen 534 – 1083 bp zu beschleunigen und andererseits die Fehlerwahrscheinlichkeit zu reduzieren.

Das Alignment von den PCR-Produkten mit den Sequenzen der bekannten Rhinovirus-Subtypen [81–197] erfolgte mit unten stehenden Parametern. Die bekannten Sequenzen wurden zuvor gekürzt (Rest: 450 – 1299 bp), um einerseits das Alignment zu beschleunigen und andererseits die Fehlerwahrscheinlichkeit zu reduzieren.

Analysis:	Phylogeny Reconstruction
Scope:	All Selected Taxa
Statistical Method:	Minimum Evolution method
Test of Phylogeny:	None
Substitutions Type:	Nucleotide
Model / Method:	Maximum Composite Likelihood
Substitutions to Include:	d: Transitions + Transversions
Rates and Patterns Rates among Sites:	Uniform rates
Pattern among Lineages:	Same (Homogeneous)
Gaps / Missing Data Treatment:	Pairwise deletion
ME Heuristic Method:	Close-Neighbor-Interchange (CNI)
Initial Tree for ME:	Obtain initial tree by Neighbor-Joining

Tabelle 12: Parameter für Sequenzalignment

Es wurde nach dem Alignment mit dem Programm *MEGA5* [198] ein Stammbaum erstellt.

2.9 Nachweis von Koinfektionen

Es wurden Nachweise von CMV, EBV, HHV 6 [199–204] und HSV 1 [205–207] in den Nasopharynxaspiraten geführt.

2.9.1 Real Time Quantitative PCR

Für den Nachweis von CMV, EBV, HHV 6 und HSV 1 wurde das TaqMan-Verfahren genutzt. Das Verfahren mit der *Thermus aquaticus* DNA polymerase ist ein spezifischer Nachweis der gesuchten Zielsequenz und wurde erstmals 1991 beschrieben [208] und fand durch den Zusatz einer mit Farbstoffen markierten Sonde als sogenannte "Real-time-PCR" ca. 10 Jahre später den Einzug in die Routine-Diagnostik..

Durch eine Einwirkzeit über 2 min der UNG (Uracil-N-Glycosylase) bei 50 °C wird zunächst eine potentielle carry-over-Kontamination aus früheren Amplifikationsreaktionen eliminiert. Die sog. „Reporter-“ (FAM) und „Quenching“-Moleküle (TAMRA) werden bei 60°C getrennt, wodurch ein Fluoreszenzfarbstoff aktiviert wird. Gleichzeitig erfolgt bei 60°C das Annealing der Primer und Elongation. Der Fluoreszenzfarbstoff wird im Thermocycler nach jedem Zyklus gemessen. Da ein proportionaler Anstieg der Fluoreszenz je nach Ausgangskonzentration des Templates erfolgt, kann somit auf die Ausgangskonzentration zurückgerechnet werden. Die Nachweisgrenze der PCR liegt für HSV 1-DNA bei 5,19 K. Die Nachweisgrenze der PCR liegt für CMV, EBV und HHV-6 bei < 10 Kopien/Ansatz. Es wurden folgende Ansätze für die TaqMan-PCR im PCR-Reinraum vorbereitet. Alle Primer und Sonden sind HPLC oder FPLC-gereinigt und mit M-TE Puffer eingestellt.

Nr.	Substanz	Volumen
1	Universal Master Mix (Applied Biosystems™)	25 µl
2	R-Primer*	0,15 µl
3	F-Primer*	0,15 µl
4	Sonde*	0,05 µl
5	Aqua dest.	19,65 µl
6	Patienten-DNA-Eluat bzw. Kontrolle	5 µl
	Gesamtvolumen pro Ansatz	50 µl
*je 1 R- und F-Primer für jeden Virus		

Tabelle 13: Ansatz für CMV-, EBV- und HHV-6- Real-time-TaqMan-PCR

Es ergaben sich folgende Endkonzentrationen.

Nr.	Substanz	Volumen
1	Tris/HCl pH 8,3	10 mM
2	DTT	
3	EDTA	
4	MgCl ₂	5 mM
5	Glycerol	
6	dNTP mit UTP: dATP, dCTP, dGTP	je 200 µM + dUTP 400 µM
7	R-Primer	300 nM, jeweils für Virus
8	F-Primer	300 nM, jeweils für Virus
9	Sonde	200 nM
10	Uracyl-N-glycosylase (UNG)	0,5 U
11	AmpliTaQ Pol	1,25 U

Tabelle 14: Endkonzentrationen im Ansatz für CMV-, EBV- und HHV-6-Real-time-TaqMan-PCR

Nr.	Substanz	Volumen
1	Universal Master Mix (Applied Biosystems™)	25 µl
2	R-Primer	0,15 µl
3	F-Primer	0,15 µl
4	Sonde	0,10 µl
5	Aqua ad iniectabilia	19,60 µl
6	Patienten-DNA-Eluat bzw. Kontrolle	5 µl
	Geamtvolumen pro Ansatz	45 µl

Tabelle 15: Ansatz HSV 1-Real-time-TaqMan-PCR

Das Amplifikationsprotokoll der PCR enthielt folgende Parameter:

Nr.	Beschreibung	Zeit	Temp
1	Elimination carry-over-Kontamination	120 Sek.	50°C
2	Denaturierung	10 min.	95°C
3	Denaturierung	15 Sek.	95°C
4	Annealing	60 Sek.	60°C
5	Pause	infinite	4°C

Schritt 3 – 4: 45 Zyklen

Tabelle 16: Parameter Thermocycler Real-time-TaqMan-PCR

Die Auswertung der PCR erfolgte mit dem Gerät ABI 7500 von Applied Biosystems™.

III Ergebnisse

3.1 Bradford-Test für NPAs

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der NPAs wurde der schon bei der ELISA-Herstellung benötigte Bradford-Test durchgeführt. Dieser diente als Versuch eine Normierung des Materials zu erreichen, da die NPAs unterschiedlich viel Nasensekret enthalten können. Es zeigte sich eine große Spannweite in der Menge des Proteingehalts. Eine Normierung erfolgte nicht.

Size	Missing	Mean µg/ml	Std Dev µg/ml	Std. Error	C.I. Of mean
48	3	1071,459	1122,422	167,321	337,213
Range µg/ml	Max µg/ml	Min µg/ml	Median µg/ml	25 %	75 %
5651,812	5683,600	31,788	636,770	344,052	1392,218
Skewnes	Kurtosis	K-S Dist.	K-S Prob.	Sum	Sum of Squares
2,108	5,611	0,192	<0,001	48215,670	107093729,754

Tabelle 17: Bradford-Testergebnisse der NPAs.
Es zeigte sich eine große Spannweite in der Menge des des Proteingehalts.

3.2 Rhinovirus Immunfluoreszenztest für IgG, IgA und IgM gegen HRV

In den NPAs konnten mit dem IFT keine Immunglobuline der Gruppen A, G oder M gegen Humanes Rhinovirus nachgewiesen werden. Auch die Positiv-Kontrolle aus dem Patienten-Seren-Mix blieb negativ, was bedeutet, dass der Test invalide war. In der Diskussion dieser Dissertation wird auf die möglichen Gründe eingegangen. Die Negativkontrolle fluoreszierte nicht.

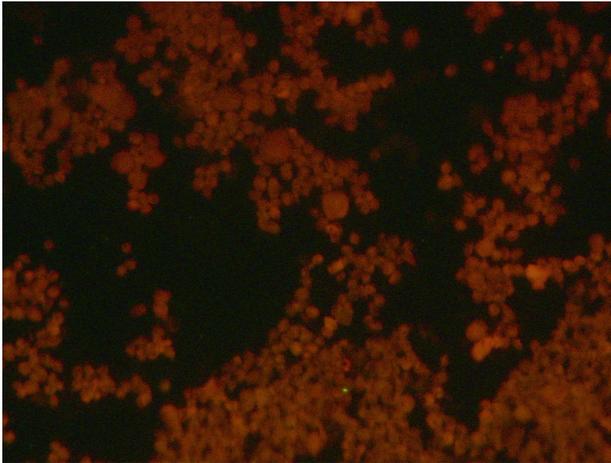


Abb. 7: MRC-5 Zellen im Immunfluoreszenz-Test (IFT) 25-fache Vergrößerung (Zeiss Neofluar). Im Test ein Patienten-Seren-Mix bei dem Vorhandensein von Antikörpern gegen HRV ausgegangen werden kann. Es zeigte sich ein negatives Ergebnis, da keine grüne Fluoreszenz zu sehen ist.

3.3 Rhinovirus-ELISA

Bei dem Versuch eines Nachweises von IgG, IgA und IgM gegen Humanes Rhinovirus mittels ELISA konnten keine Antikörper nachgewiesen werden. Es gab keine ausreichende Differenz zwischen der Proben-Konzentration und der PBS-Konzentration. Der Test war somit für alle Proben als negativ zu bewerten.

3.4 Sequenzierung der Rhinovirus-RNA

3.4.1 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde vom Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf durchgeführt und die Ergebnisse in Form von ABI-Dateien übermittelt.

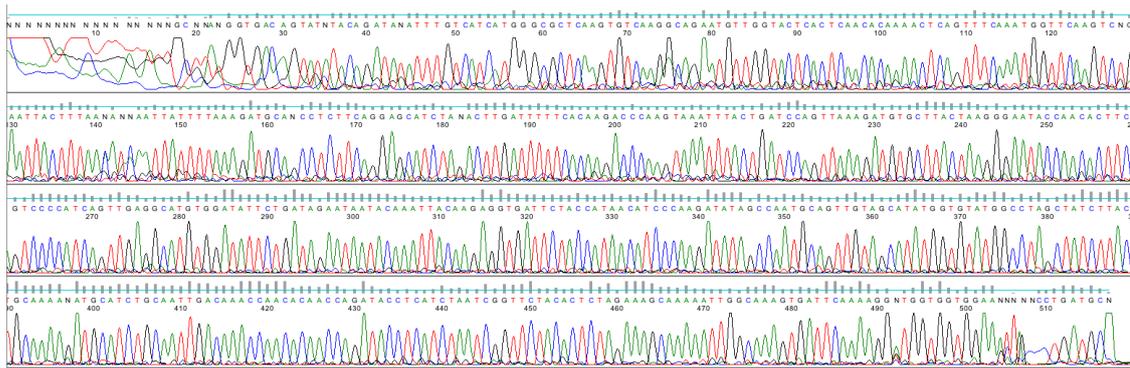


Abb. 8: Beispiel einer Sequenzierung von Rhinovirus-RNA.

Es ist eine beispielhaft eine ABI-Datei eines Rhinovirus-Produkts zu sehen (Betrachtet mit dem Programm Geospiza FinchTV for Mac).

3.4.2 Alignment und Subtypisierung

Das Alignment erfolgte zwischen den PCR-Produkten und den bekannten Rhinovirus-Subtypen. Die Evolutionsgeschichte wurde mit der Minimum Evolution-Methode erstellt [209]. Der optimale Baum mit der Summe der Astlänge = 20,27148848 wird angezeigt. Die evolutionären Abstände wurden unter Verwendung der Maximum Composite Likelihood-Methode [210] berechnet und sind in Einheiten der Anzahl der Punktmutationen pro Stelle angegeben. Der ME-Baum wurde unter Verwendung des CNI-Algorithmus (Close-Neighbor-Interchange) [211] auf einer Suche Ebene von 0 durchsucht. Der Nachbarbaum-Verbindungsalgorithmus [212] wurde verwendet, um den anfänglichen Baum zu erzeugen. Die Analyse umfasste 153 Nukleotidsequenzen. Die eingeschlossenen Codonpositionen waren 1. + 2. + 3. + Nichtcodierung. Alle mehrdeutigen Positionen wurden für jedes Sequenzpaar entfernt. Es gab insgesamt 1402 Positionen im endgültigen Datensatz. Die Evolutionsanalysen wurden mit der Software MEGA5 durchgeführt [198].

Der Subtyp A konnte bei 27 von 37 Eluaten (73 %) nachgewiesen werden, der Subtyp C bei 10 von 37 Eluaten (27 %). Der Subtyp B trat in den untersuchten Eluaten nicht auf.

3.5 Jahreszeitliches Auftreten

Über das ganze Jahr betrachtet trat das Rhinovirus bevorzugt in den Herbst- und Wintermonaten auf. Von insgesamt 37 Rhinovirusinfektionen im Kollektiv traten in den Monaten September bis Februar 26 Fälle, von März bis August 11 Fälle auf. Infektionsspitzen zeigten sich zu Herbstbeginn und im Frühjahr. Betrachtet man das Auftreten der Subtypen über das Jahr, zeigt sich, dass der Subtyp C im Kollektiv ausschließlich im Frühjahr und Herbst auftrat. Der Subtyp A findet sich dagegen über das ganze Jahr, gehäuft im Herbst und Winter.

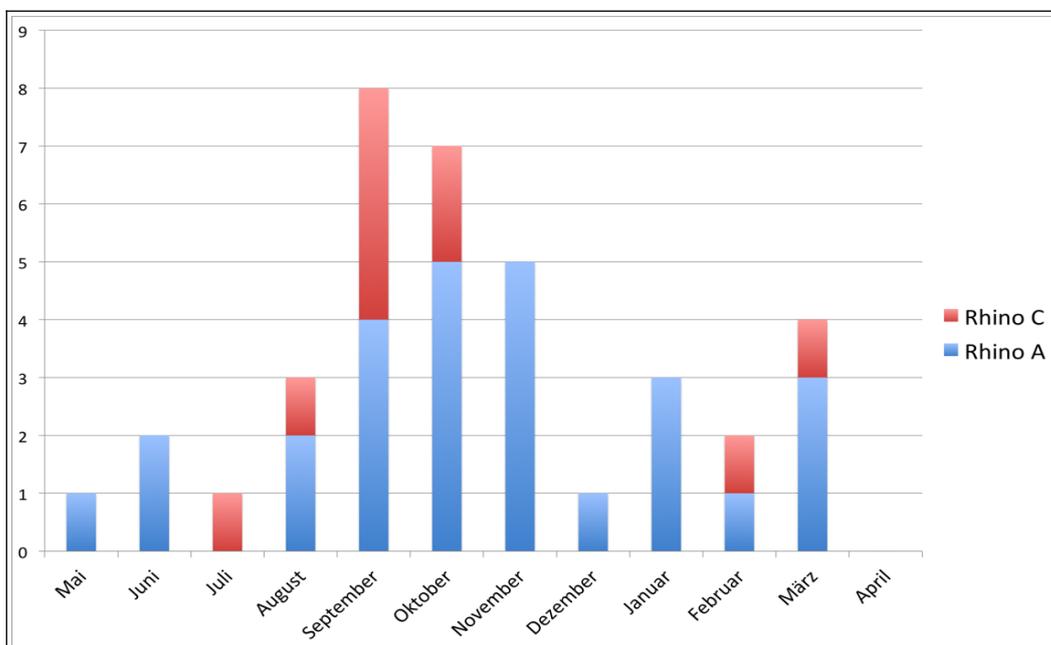


Abb. 10: Jahreszeitliches Auftreten HRV-A versus HRV-C.

Über das ganze Jahr betrachtet traten Rhinoviren bevorzugt in den Herbst- und Wintermonaten auf. Von insgesamt 37 Rhinovirusinfektionen im Kollektiv traten in den Monaten September bis Februar 26 Fälle, von März bis August 11 Fälle auf. Infektionsspitzen zeigten sich zu Herbstbeginn und im Frühjahr. Der Subtyp C trat im Kollektiv ausschließlich im Frühjahr und Herbst auf. Der Subtyp A fand sich über das ganze Jahr, gehäuft im Herbst und Winter.

3.6 Statistische Auswertung

Es erfolgte mit dem Programm SigmaPlot [213] eine statistische Auswertung aller Untersuchungsergebnisse im Bezug auf Unterschiede zwischen den Subtypen HRV-A und HRV-C. Weiterhin wurde nach Co-Faktoren gesucht, die eine Pneumonie bei einer HRV-Infektion begünstigen.

3.6.1 Veränderung Viruslast 1. vs. 2 NPA

Die Viruslast zwischen erster und zweiter NPA änderte sich nicht signifikant.

Eigenschaft	n Gesamt	HRV A	HRV C	Test*	p
Kollektiv	37	27	10		
Viruslast Differenz 1. zu 2. NPA – Median (%)	37	-77,85	-71,85	Rank Sum ¹	0,945
- Viruslast Differenz – Max		4.121,18	13.639,10		
- Viruslast Differenz – Min		-100	-100		
- Viruslast Differenz – 25 %		-99,5	-100		
- Viruslast Differenz – 75 %		69,5	-34,9		

¹ Anstatt t-test, da Normality-Test failed (P < 0,050)

Tabelle 18: Veränderung der Viruslast zwischen 1. und 2. NPA (Nasopharynxaspirat) bei HRV-A vs. HRV-C. Mit einem p = 0,945 zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Viruslast zwischen 1. zu 2. NPA.

3.6.2 Koinfektionen

Es besteht kein Unterschied in der Prävalenz von Koinfektionen jedweder Art bei HRV-A vs. HRV-C.

Eigenschaft	n Gesamt	HRV A	HRV C	Test*	p
Kollektiv	37	27	10		
Koinfektionen alle**	16	11	5	Fisher	0,716
CMV-Koinfektion	8	6	2	Fisher	1,000
EBV-Koinfektion	8	4	4	Fisher	0,174
HHV-6-Koinfektion	7	5	2	Fisher	1,000
HSV 1-Koinfektion	0	0	0	-	-
Koinfektionen mit einem Virus**	10	7	3	Fisher	1,000
Koinfektionen mit zwei Viren**	5	4	1	Fisher	1,000
Koinfektionen mit drei Viren**	1	0	1	Fisher	0,270

* Fisher = Fisher Exact Test ** Koinfektion mit einem oder mehreren Viren (CMV, EBV und / oder HHV-6)

Tabelle 19: Koinfektionen HRV-A vs. HRV-C.

Die Tabelle zeigt die Koinfektion mit einem oder mehreren Viren (CMV, EBV und / oder HHV-6). Im Auftreten war kein signifikanter Unterschied zwischen HRV-A vs. HRV-C festzustellen. Nach HSV 1-Koinfektion wurde gesucht, jedoch nicht gefunden.

3.6.3 Klinische Verlaufparameter

Zur Beurteilung der klinischen Schwere des Verlaufs wurden verschiedene Parameter genutzt, die bereits in einer vorausgegangenen Dissertation (Johanna Weis: Immunantwort und klinisches Erscheinungsbild bei Infektionen mit dem Humanen Metapneumovirus, Respiratory Syncytial Virus und Rhinovirus im Kindesalter, 2014) mit den Nasopharynxaspiraten und nachgewiesener HRV-Infektion erfasst wurden. Dazu zählen in erster Linie die Entwicklung einer Pneumonie, weiterhin Fieber-Höhe, die Laborparameter CRP und Leukozyten, als direkter Hinweis auf die Immunantwort, die angewandte medikamentöse Therapie und die Erstellung eines Röntgenbildes. Letzteres kann als indirekter Hinweis auf eine schwere Infektion gedeutet werden, da im klinischen Alltag der Kinderklinik ein Röntgenbild eher bei schweren Verläufen erstellt wird. Es ergibt sich bei keinem der o.g. Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen HRV-A vs. HRV-C. Insbesondere besteht kein signifikanter Unterschied in der Auftretenswahrscheinlichkeit einer Pneumonie bei Infektionen mit HRV-A vs. HRV-C.

Eigenschaft	n Gesamt**	HRV-A	HRV-C	Test*	p
Kollektiv	37	27	10		
Dauer der Symptomatik (Tage) Median	33	2	1,5	Rank Sum ¹	0,139
Pneumonie	12	11	1	Fisher	0,119
Temperatur max. (Grad Celsius) Median	37	37,8	37,4	Rank Sum ¹	0,139
- Temperatur max. (Grad Celsius) 25 %		37,4	37,2		
- Temperatur max. (Grad Celsius) 75 %		39,1	38,4		
CRP (max) Median	37	1,3	0,5	Rank Sum ¹	0,104
- CRP (max) 25 %		0,5	0		
- CRP (max) 75 %		2,9	2,6		
Leukozyten max (Tsd/ μ l) mean	36	14,6	15,3	t-Test	0,630
- Leukozyten max (Tsd/ μ l) Std dev.		3,8	0,7		
- Leukozyten max (Tsd/ μ l) SEM		3,8	1,3		
Salbutamol Dauer (Tage) Median	35	4,0	3,5	Rank Sum ¹	0,468
- Salbutamol Dauer (Tage) 25 %		3	2		
- Salbutamol Dauer (Tage) 75 %		6	5		
Ibatropium Dauer (Tage) Median	16	0	0,5	Rank Sum ¹	0,622
- Ibatropium Dauer (Tage) 25 %		0	0		
- Ibatropium Dauer (Tage) 75 %		3	5		
Antibiotika- Gabe	12	11	1	Fisher	0,121
Prednisolon- Anwendung	14	9	5	Fisher	0,454
Röntgen- Thorax- Erstellung	18	15	3	Fisher	0,269

* Fisher = Fisher Exact Test; Rank Sum = Mann-Whitney Rank Sum Test

** Anzahl der Patienten, bei denen die vorausgenannten Eigenschaften erfasst und statistisch ausgewertet wurden.

¹ Rank Sum anstatt t-test, da Normality-Test failed ($P < 0,050$)

Tabelle 20: Klinische Verlaufsparemeter HRV-A vs. HRV-C.

Die Tabelle listet verschiedene klinische Verlaufsparemeter im Vergleich zwischen HRV-A und HRV-C auf. Dazu zählen die Entwicklung einer Pneumonie, die Fieber-Höhe, die Laborparameter CRP und Leukozyten als direkter Hinweis auf die Immunantwort, die angewandte medikamentöse Therapie (Salbutamol und Ibatropium, sowie Antibiotika) und die Erstellung eines Röntgenbildes. Letzteres diente jedoch nur als indirekter Hinweis auf die Schwere der Infektion, da im klinischen Alltag der Kinderklinik ein Röntgenbild nur bei eher schweren Verläufen erstellt wird. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen.

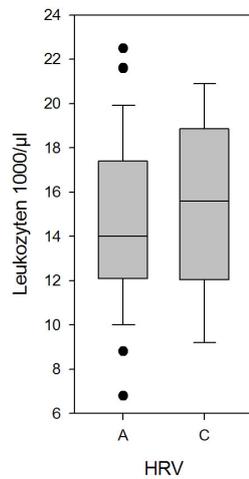


Abb. 11: Leukozytose bei HRV-A vs. HRV-C. Das Diagramm zeigt den mean der maximalen Leukozytenzahl (Tsd/µl). Bei HRV-A lag die Leukozytenzahl bei 14,6 und bei HRV-C bei 15,3. Es ergab sich damit kein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen.

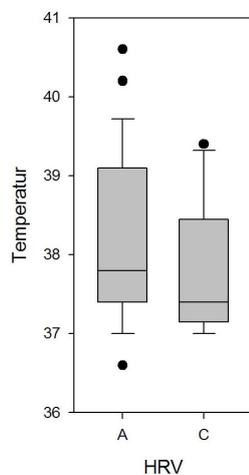


Abb. 12: Fieber bei HRV-A vs. C. Das Diagramm zeigt die Mediane der maximalen Temperatur. Bei HRV-A lag das Temperatur-Maximum bei 37,8°C und bei HRV-C bei 37,4°C. Es ergab sich damit kein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen.

3.6.4 IL-8 und ECP-Messung

Es besteht kein Unterschied zwischen HRV-A und HRV-C, in Bezug auf die IL-8- und ECP-Konzentrationen. Ebenso besteht kein Unterschied zwischen den Differenzen der IL-8 und ECP-Konzentrationen zwischen der 2. und 1. NPA.

Eigenschaft	n Gesamt	HRV A	HRV C	Test*	p
Kollektiv	37	27	10		
IL-8- ELISA Gesamt (pg/ml) Median	6.387,35	7.061	4.770	Rank Sum ¹	0,806
- IL-8- ELISA (pg/ml) 25 %		2.415,15	24.147,90		
- IL-8- ELISA (pg/ml) 75 %		2.526,33	25.596,23		
IL-8- ELISA Differenz** Median	-181,600	1.039,890	-3.547,297	t-test	0,518
- IL-8- ELISA Differenz** Std Dev		18.677	16.320		
- IL-8- ELISA Differenz** SEM		3.662,86	5.439,87		
ECP-ELISA Gesamt (ng/ml) Median	872,10	662,72	974,32	Rank Sum ¹	0,876
- ECP-ELISA (ng/ml) 25 %		401,04	567,35		
- ECP-ELISA (ng/ml) 75 %		2.878,35	1.418,60		
ECP-ELISA Differenz** Median	106,497	267,660	-212,800	Rank Sum ¹	0,542
- ECP-ELISA Differenz** 25 %		-510,125	-911,681		
- ECP-ELISA Differenz** 75 %		2.126,475	972,895		

* Fisher = Fisher Exact Test; Rank Sum = Mann-Whitney Rank Sum Test;

** 2. vs. 1. NPA

¹ Rank Sum anstatt t-test, da Normality-Test failed (P < 0,050)

Tabelle 21: IL-8 und ECP-Messergebnisse im Vergleich HRV-A vs. HRV-C.

Die Tabelle listet die Konzentrationen von IL-8 und ECP in den Nasopharynxaspiraten auf. Dabei wurden die beiden Subtypen verglichen im Hinblick auf die Gesamtkonzentration, als auch auf die Differenz zwischen erstem und zweitem Nasopharynxaspirat (NPA). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen.

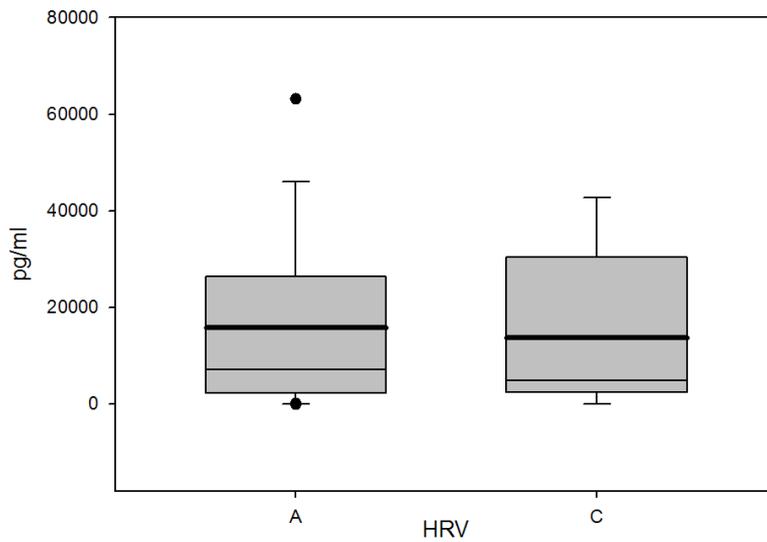


Abb. 13: IL8-ELISA HRV-A vs. -C
 Es ergab sich bei der IL-8-Konzentration in den Nasopharynxaspiraten kein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen HRV-A (n=26) und HRV-C (n=8).

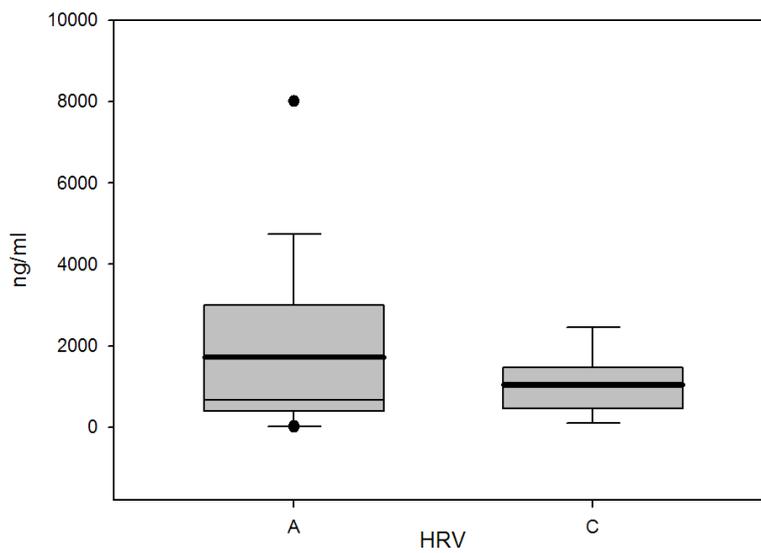


Abb. 14: ECP-ELISA HRV-A vs. -C
 Es ergab sich bei den ECP-Konzentrationen in den Nasopharynxaspiraten kein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen HRV-A (n=26) und HRV-C (n=9).

3.6.5 Co-Faktoren bei der Entwicklung einer Pneumonie

Um Co-Faktoren, die eine Pneumonie bei einer HRV-Infektion begünstigen, zu identifizieren, wurde nach signifikanten Korrelationen von bestimmten Eigenschaften der Patienten bzw. der Proben und dem Auftreten einer Pneumonie gesucht. Dabei war bei den untersuchten Eigenschaften einzig signifikant, dass die Patienten im Kollektiv mit Pneumonie älter waren, als jene ohne Pneumonie ($p = 0,013$). Alle weiteren untersuchten Eigenschaften sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Eigenschaft	n Gesamt	Pneumonie	Keine Pneumonie	Test*	p
Kollektiv	37	12	25		
Alter in Jahren (Median)	1,578	3,547	1,356	Rank Sum ¹	0,013
Männliches Geschlecht	26	8	18	Fisher	1,000
IL-8- ELISA Median (pg/ml)	6387,35	3159,8	7061,0	Rank Sum ¹	0,098
ECP-ELISA Median (ng/ml)	872,10	768,91	872,10	Rank Sum ¹	0,533

* Fisher = Fisher Exact Test; Rank Sum = Mann-Whitney Rank Sum Test;

¹ Rank Sum anstatt t-test, da Normality-Test failed

Tabelle 22: Co-Faktoren bei der Entwicklung einer Pneumonie bei einer Rhinovirus-Infektion
Bei den untersuchten Eigenschaften war einzig signifikant, dass die Patienten im Kollektiv mit Pneumonie älter waren, als jene ohne Pneumonie ($p = 0,013$). Bei Alter, Geschlecht, IL-8- und ECP-Konzentration ergaben sich keine Unterschiede bei Patienten mit einer Pneumonie oder ohne einer Pneumonie im Rahmen einer HRV-Infektion.

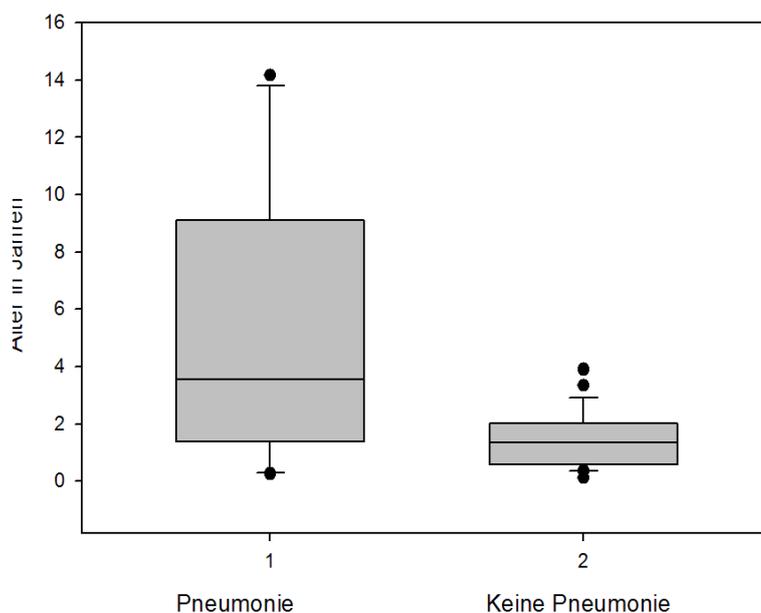


Abb. 15: Patienten-Alter bei Pneumonie vs. keiner Pneumonie
Beim Patienten-Alter (Median) von Kindern mit Pneumonie ($n=12$, 3,547 Jahre) vs. derer ohne Pneumonie ($n=25$, 1,356 Jahre) im Rahmen einer HRV-Infektion, ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,013$).

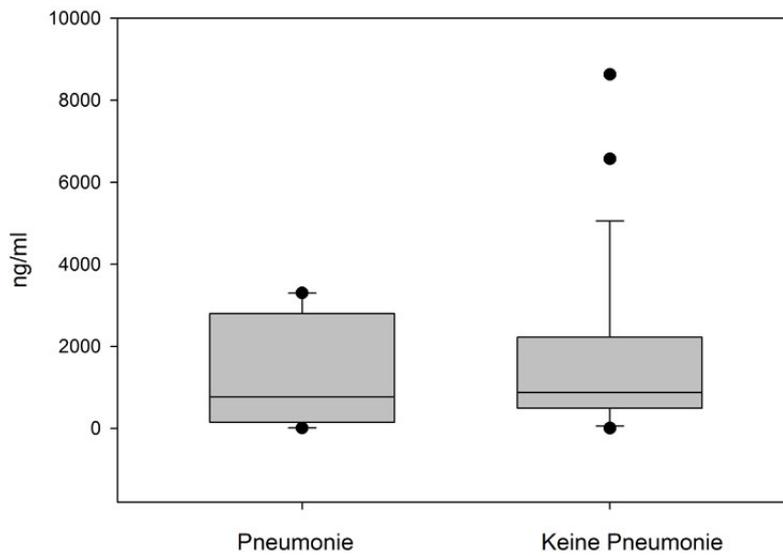


Abb. 16: ECP-Titer bei Pneumonie vs. keiner Pneumonie
 Es ergab sich beim ECP-Titer in den Nasopharynxaspiraten kein signifikanter Unterschied zwischen denen von Patienten mit Pneumonie (n=12) vs. keiner Pneumonie (n=25).

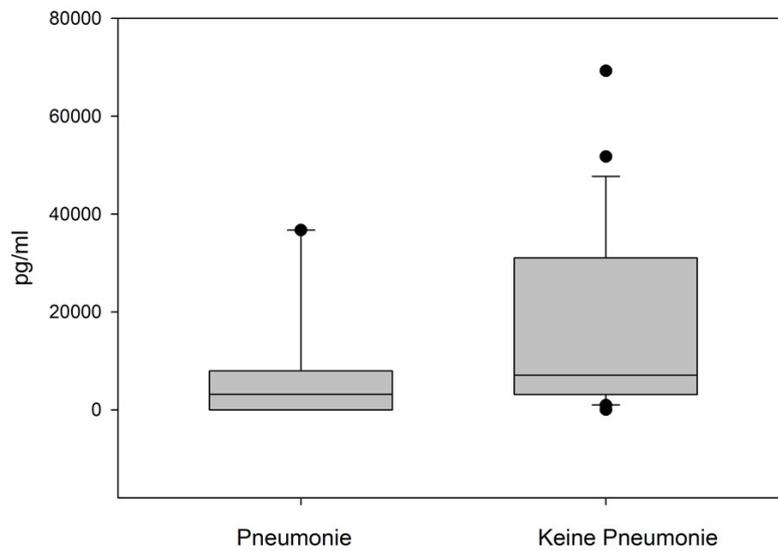


Abb. 17: IL-8-Titer bei Pneumonie vs. keiner Pneumonie
 Es ergab sich beim IL-8-Titer in den Nasopharynxaspiraten kein signifikanter Unterschied zwischen denen von Patienten mit Pneumonie (n=12) vs. keiner Pneumonie (n=25).

IV Diskussion

4.1 Subtypen im Kollektiv

Zur Subtypenanalyse der gefundenen Rhinoviren in dem Kollektiv erfolgte vor der PCR zunächst eine Reverse-Transkriptase-PCR nach einem Protokoll von Savolainen C et al. Anschließend wurden die Proben amplifiziert und, wie oben beschrieben, nach einem modifiziertem Protokoll von Savolainen C et al [80] sequenziert. Es wurde dann ein Rhinovirus-Stammbaum mit dem Programm *MEGA5* [198] erstellt, bei dem zum Vergleich alle bis dahin bekannten Subtypen (HRV-A, -B, -C) enthalten waren.

Im untersuchten Kollektiv konnte neben HRV-A der HRV-Subtyp C nachgewiesen werden. HRV-B wurde nicht gefunden. Der Stammbaum zeigt, dass die genetische Diversität sich jeweils in einem Bereich der Subtypen konzentrierte und keine weite Streuung vorlag.

Gehäuft ist dabei auch eine zeitliche Nähe zu finden. Beim gefundenen Subtyp HRV-C waren 5 von 11 Proben HRV-C NAT045, wobei 3 Proben davon (VI 31589, VI 32702 und VI 36218) zwischen den 18.09.07 – 24.10.07 gewonnen wurden. Ähnliche Phänomene findet sich beim Subtyp HRV-A. Beispielsweise die Proben VI 30919 und 32528 (HRV-18), wurden im Abstand von nur 11 Tagen abgenommen.

Unklar bleibt eine mögliche Infektionskette, ob also die Patienten außerhalb des Krankenhauses Kontakt hatten. Da die Symptome eines respiratorischen Infekts zur Aufnahme führten und Rhinoviren gefunden wurden, ist eine nosokomiale Infektion bei einer Inkubationszeit von zwei bis vier Tage und einem Symptombeginn zwischen dem 1. und 9. Tag [17] eher unwahrscheinlich, wenn auch nicht gänzlich auszuschließen.

Es konnte zudem bereits in einer Studie gezeigt werden, dass die HRV-Subtypen kozyklisieren und das einzelne Subtypen in sehr kurzen Zeiträumen bis 6 Wochen gehäuft auftraten [214].

4.2 Jahreszeitliches Auftreten

Bei der Häufigkeit von Krankenhaus-Aufenthalten mit Rhinovirus-Infektionen der unteren Atemwege gab es einen Peak im Herbst und einen kleineren Peak im Frühling. Diese Verteilung entspricht den Beobachtungen früherer Untersuchungen [38–41]. HRV-A konnte nahezu in jedem Monat, HRV-C jedoch nur im Spätsommer und Herbst (Juli bis Oktober) und im Frühjahr (Februar bis März) nachgewiesen werden. Für einen tatsächlichen Unterschied des Auftretens der Subtypen gibt es jedoch keine Signifikanz. Das Kollektiv ist für eine solche Aussage zu klein. Die Replikation von Rhinoviren erfolgt

optimal zwischen 33°C - 37°C [12]. In der kalten Jahreszeit kommt es häufiger zu Infektionen, die mit einer Krankenhaus-Aufnahme verbunden sind. Die Ursachen sind multifaktoriell. Die kältere Witterung allein, scheint keine Ursache zu sein [37]. Die saisonale Belastung auch durch andere virale Infektionen im Allgemeinen, mag in der kalten Jahreszeit höher sein, wodurch sich auch eine größere Anfälligkeit für Rhinoviren ergibt. Zudem sind die Schleimhäute und Konjunktiven durch den vermehrten Aufenthalt in Innenräumen mit trockener Heizungsluft und den häufigen Wechsel von unterschiedlicher Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit beansprucht. Dadurch bedingtes Reiben mit kontaminierten Händen [32] oder die direkte Exposition gegenüber rhinovirushaltigem Aerosol begünstigen eine Infektion [30,31]. Rhinoviren persistieren auch länger als andere Viren in der Nase: Rhinoviren sind bis 4-5 Wochen nach Infektion mittels PCR nachweisbar [215].

4.3 Klinischer Verlauf

Rhinoviren sind nach RSV die am häufigsten gefundenen Viren bei Kindern mit ambulant erworbener Pneumonie, wenn auch die Rolle der Rhinoviren nach einer kontrollierten Studie als überbewertet gilt, zumal Rhinoviren häufiger bei gesunden Kindern, als bei jenen mit ambulanter Pneumonie gefunden wurden [216]. Es besteht bisher in der Literatur Grund zur Annahme, dass der Subtyp HRV-C virulenter und für schwerere klinische Verläufe verantwortlich ist [6,20,26,43,44]. Die Schwere der Erkrankung, wobei das Auftreten einer Pneumonie als schwerer Erkrankungsverlauf zu werten ist, wurde zwischen den verschiedenen HRV-Subtypen verglichen. Statistisch ergab sich dabei kein Zusammenhang zwischen Schwere der Erkrankung und Subtyp. Es wurden neben dem Auftreten einer Pneumonie zudem weitere Parameter, nämlich die Dauer der Symptome, Fieber-Höhe, die Laborparameter CRP und Leukozyten, die Dauer und Häufigkeit der angewandten medikamentösen Therapie und die Erstellung eines Röntgenbildes zur Definition der Schwere des Verlaufs genutzt und diese im statistischen Vergleich zwischen HRV-A und HRV-C betrachtet. Auch hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied. Wenn auch nicht signifikant, deuten die Ergebnisse eher darauf hin, dass HRV-A virulenter ist. In einer jüngeren Studie von Ko FW, Chan PK, Chan RWY, et al. aus 2019 mit insgesamt 21 HRV-A, 4 HRV-B und 12 HRV-C-Nachweisen wurde kein Unterschied zwischen HRV-A und HRV-C im klinischen Outcome, inklusive der Krankenhaus-Aufenthaltsdauer, Wiederaufnahme-Rate und Mortalität gesehen. Entgegen oben genannter Annahme war in dieser Gruppe bei einer Asthma Exazerbation sogar häufiger HRV-A als HRV-C detektiert worden [217]. Das Kollektiv dieser Arbeit ist zu klein, um eine

Aussage darüber zu treffen, ob ein Subtyp schwerere Verläufe verursacht.

4.4 Höheres Alter bei Pneumonie

Das Alter der Kinder mit Pneumonie war signifikant höher als das Alter der Kinder ohne Pneumonie ($p = 0,013$). Dies widerspricht einer Meta-Analyse von Wang aus 2015 [218], die zeigte, dass die gepoolte Inzidenz von Rhinovirus-assoziierten Pneumonien im Kindesalter in den drei dort definierten Altersgruppen (≤ 1 Jahr, 2 – 5 Jahre, ≥ 6 Jahre) gleich war. Die Inzidenz von RSV-assoziierten Pneumonien sank sogar mit dem Alter. Andere Untersuchungen zeigten, dass die Antikörper gegen HRV mit zunehmenden Alter ansteigen [219,220]. Es ist nicht auszuschließen, dass das signifikante Ergebnis der vorliegenden Arbeit auf das kleine Kollektiv zurückzuführen ist und die Ergebnisse der Meta-Analyse nicht in Frage zu stellen sind.

4.5 Viruslast

Die Viruslast zwischen erster und zweiter NPA änderte sich nicht signifikant. Dies entspricht den Ergebnissen einer Arbeit der pädiatrischen Klinik, Universitätsklinikum Düsseldorf und der Virologie der Heinrich Heine Universität 2010. In dieser wird ebenso beschrieben, dass sich die Viruslast bei Rhinoviren (und humanem Bocavirus) zwischen erster und zweiter NPA nicht signifikant ändert [221].

4.6 Koinfektionen

Es wurde nach Koinfektionen mit den Herpesviridae CMV, EBV, HHV-6 und HSV 1 gesucht. Eine Koinfektion lag in 43 % aller Fälle vor, es bestand jedoch kein Unterschied in der Prävalenz zwischen HRV-A vs. HRV-C. Es gab keinen Hinweis darauf, dass ein bestimmtes Virus bevorzugt bei einem HRV-Subtyp auftritt. Rhinoviren werden in bis zu 30% zusammen mit anderen Viren gefunden [221] jedoch gab es bislang keinen Hinweis auf einen bestimmten Subtyp, der bevorzugt zu Koinfektionen neigt. Somit ergeben sich keine neuen Erkenntnisse.

4.7 Dauer der Infektion und spezifische Immunantwort

Um die Fragen beantworten zu können, ob es sich im Kollektiv um frische oder schon länger bestehende Infektionen bzw. um Reinfektionen handelte und ob eine spezifische Immunantwort vom Rhinovirus-Subtyp abhängt, wurde versucht, Immunglobuline verschiedener Klassen nachzuweisen. Dazu wurde ein Immunfluoreszenztest und ein Rhinovirus-ELISA hergestellt und durchgeführt. Die Test-Herstellung erfolgte nach dem allgemeinen IFT-Labor-Protokoll, da im Labor keine explizite Erfahrung mit der Herstellung eines Rhinovirus-IFT vorlagen. Mit dem so hergestellten Immunfluoreszenztest konnten keinerlei Immunglobuline nachgewiesen werden. Die Zellen, die zur Herstellung benutzt wurden, zeigten einen deutlichen CPE, so dass eine mangelnde Expression viraler Antigene als Ursache dafür unwahrscheinlich erscheint. Lichtmikroskopisch konnte eine korrekte Fixierung der Zellen gezeigt werden. Somit kann der fehlende Nachweis bedeuten, dass in den Nasensekreten tatsächlich keine Immunglobuline vorhanden waren. Allerdings war auch die Positivkontrolle negativ, wofür mehrere Gründe in Frage kommen. Die Positivkontrolle war ein Mix von verschiedenen Patienten-Seren. Es wurde über kein anderes Test-Verfahren, weder im Vorfeld noch anschließend, das Vorhandensein von Immunglobulinen in dem Mix überprüft. Es bleibt aber anzunehmen, dass sich Antikörper in dem Seren-Mix befunden haben müssen, da die Prävalenz von neutralisierenden HRV-Antikörper mit dem Alter ansteigt [219,220], was auf eine hohe Durchseuchung und rezidivierende Infektionen zurückzuführen ist. Obwohl es somit unwahrscheinlich ist, dass sich in dem Seren-Mix keine spezifischen Immunglobuline befanden, bleibt unklar, ob der Test fehlerhaft war, eine zu geringe Sensitivität aufwies oder die Positivkontrolle keine oder zu geringe Titer von Immunglobulinen enthielt.

Mit dem Rhinovirus-ELISA konnten in den NPAs keine Immunglobuline nachgewiesen werden. Durch eine Vortestung konnte jedoch gezeigt werden, dass der Nachweis von IgGs gegen Rhinoviren grundsätzlich funktioniert. Die Vortestung und der Test mit NPA liefen gegen PBS als Negativ-Kontrolle. Die im Vortest benutzten Proben wurden nicht erneut mit den NPAs getestet. Es bleibt daher unklar, ob die Antikörpertiter in den NPAs des Kollektivs zu niedrig waren und das Signal im Rauschen des Tests unterging oder der Test nach der Herstellung fehlerhaft wurde. Daher kann die Frage nach einer spezifischen Immunantwort nicht beantwortet werden, so dass weitere Untersuchungen erforderlich sind.

Zur Unterscheidung der Dauer einer Infektion wurde die Viruslast zwischen erster und zweiter NPA verglichen. Ein Unterschied zwischen den Subtypen könnte als

unterschiedliche Persistenz gedeutet werden. Im statistischen Vergleich war die Viruslast-Veränderung im zeitlichen Verlauf zwischen den Subtypen jedoch nicht signifikant. Auch im Vergleich der Viruslasten ergab sich kein Hinweis auf eine unterschiedliche Persistenz der verschiedenen Subtypen.

4.8 ECP-ELISA

Es konnte in Studien bereits gezeigt werden, dass es bei einer Asthma-Exazerbation durch HRV zu einem signifikanten Anstieg von ECP im Serum kam [75,222]. Im Unterschied dazu wurden in dieser Arbeit die Konzentrationen von ECP in Nasopharynxaspiraten gemessen. Weiterhin sollte überprüft werden, ob unterschiedliche ECP-Konzentration zwischen verschiedenen Subtypen von HRV auftreten. Bei der statistischer Auswertung des ECP-ELISA konnte kein Unterschied der ECP-Konzentrationen (Median) zwischen HRV-A und HRV-C gezeigt werden ($p = 0,876$). Ebenso bestand kein signifikanter Unterschied der ECP-Konzentration zwischen der 1. und 2. NPA ($p = 0,542$). Es konnte kein Unterschied bei den ECP-Konzentrationen zwischen Patienten mit Pneumonie und ohne Pneumonie gezeigt werden ($p = 0,533$). Es ergeben sich somit im Vergleich der verschiedenen HRV-Subtypen keine Hinweise auf eine unterschiedliche Ausschüttung von ECP oder Dynamik der ECP-Konzentrationen im Verlauf eines Infekts. Es bleibt unbeantwortet, ob es sich gleichermaßen mit den ECP-Konzentrationen und Verläufen im Serum verhält, so dass weitere Untersuchungen erforderlich sind.

4.9 IL-8-ELISA

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den IL-8-Konzentrationen bei HRV-A vs. HRV-C nachgewiesen werden. Statistisch zwar nicht signifikant ($p = 0,098$), aber zu beachten ist, dass die IL-8 Konzentration bei Kindern ohne Pneumonie im Median mehr als doppelt so hoch war als bei denen mit Pneumonie. Das deutet schwach auf eine negative Korrelation der IL-8-Konzentration mit der Schwere der Erkrankung hin. Ein hoher IL-8-Titer korreliert mit einem milderem Verlauf. Dies entspricht der Schlussfolgerung einer Arbeit aus 1999 von Greiff et al., in der bei Menschen mit Erkältungs-Symptomen der direkte Effekt von einem Allergen-Kontakt auf IL-8, ECP und Alpha2-macroglobulin-Konzentrationen in den nasalen Atemwegen untersucht wurde. In dieser Arbeit wurde geschlussfolgert, dass hohe IL-8 und MPO-Konzentrationen, sowie

eine Hypersekretion und Exsudation ins Bronchiallumen protektiv gegen Infektionen wirken. Der Zusammenhang zwischen Erkältungen und nasalem IL-8 und ECP, insbesondere die beobachteten Konzentrationen in nasalen Spülungen nach akuter Allergen-induzierter Ausschüttung ins Plasma, legten zudem die Beteiligung von IL-8 bei der Exazerbation von eosinophiler Aktivität in Mukosa der Atemwege nahe [56]. Die IL-8-Ergebnisse wurden in einer Arbeit aus 2015 von Adams et al., mit denen von HMPV und RSV verglichen [223]. Dabei zeigten sich die IL-8-Titer bei HMPV und RSV signifikant höher als bei Rhinoviren (IL-8-Titer: HMPV 25.1 mg/ml, RSV 12.02 mg/ml, Rhinovirus 6.33 mg/ml, $p = <0.05$ - HMPV/RSV vs. Rhinovirus). Allerdings konnte mit dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied bei Exazerbationen oder Auftreten einer Pneumonie bei einer HMPV, RSV vs. Rhinovirus-Infektion gezeigt werden. Die kontroversen Ergebnisse erlauben daher nicht die einfache Schlussfolgerung, dass hohe IL-8-Titer vor Exazerbation und Pneumonie schützen. Es scheinen weitere, bislang unbekannte, Co-Faktoren eine Rolle zu spielen, so dass weitere Untersuchungen erforderlich sind.

V Schlussfolgerung

Es konnte der erst vor einigen Jahren entdeckte Subtyp HRV-C in dem hier untersuchten Kollektiv von 37 Naso- Pharynx- Aspiraten von an Rhinovirus-erkrankten Kindern nachgewiesen werden. Zusammenfassend ergab sich bei allen bestimmten Parametern kein signifikanter Unterschied zum häufiger gefundenen Subtyp HRV-A, insbesondere ergab sich kein Hinweis auf eine größere Virulenz oder einen schwereren klinischen Verlauf. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine unterschiedliche Ausschüttung von ECP oder Dynamik der ECP-Konzentrationen im Vergleich der verschiedenen HRV-Subtypen. Eine Pneumonie im Rahmen der HRV-Infektion ergab keine signifikant veränderten ECP- oder IL-8-Titer. Es gab Hinweise darauf, dass niedrige IL-8-Titer im Kollektiv eher mit einer Pneumonie einhergehen und hohe IL-8-Titer eher mit einem milderen Verlauf korrelieren. Eine Pneumonie trat bei einer HRV-Infektion signifikant häufiger bei älteren Kindern auf. Dies widerspricht jedoch einer Metaanalyse und ist am ehesten auf das zu kleine Kollektiv der vorliegenden Arbeit zurück zu führen.

VI Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Rhinovirus Aufbau.....	1
Abb. 2: Rhinovirus Genomstruktur.....	2
Abb. 3: ECP Struktur [224,225].....	6
Abb. 4: MRC-5 Zellen mit typischem CPE (Lyse).....	19
Abb. 5: Gelelektrophorese PCR Produkte (549 bp) Rhinovirus.....	32
Abb. 6: Schema zur Vorbereitung der bekannten Sequenzen zum Alignment.....	34
Abb. 7: MRC-5 Zellen im Immunfluoreszenz-Test (IFT).....	38
Abb. 8: Beispiel einer Sequenzierung von Rhinovirus-RNA.....	39
Abb. 9: Rhinovirus-Stammbaum.....	40
Abb. 10: Jahreszeitliches Auftreten HRV-A versus HRV-C.....	41
Abb. 11: Leukozytose bei HRV-A vs. HRV-C.....	45
Abb. 12: Fieber bei HRV-A vs. C.....	45
Abb. 13: IL8-ELISA HRV-A vs. -C.....	47
Abb. 14: ECP-ELISA HRV-A vs. -C.....	47
Abb. 15: Patienten-Alter bei Pneumonie vs. keiner Pneumonie.....	48
Abb. 16: ECP-Titer bei Pneumonie vs. keiner Pneumonie.....	49
Abb. 17: IL-8-Titer bei Pneumonie vs. keiner Pneumonie.....	49

VII Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika des Probenkollektivs.....	8
Tabelle 2: Eigenschaften Rhinovirus Laborstamm.....	10
Tabelle 3: Rhinovirus-PCR Primer Spezifikationen.....	14
Tabelle 4: TaqMan™-Primer Spezifikationen.....	16
Tabelle 5: Bradford-Test Pipettierschema.....	24
Tabelle 6: ELISA-Test Pipettierschema.....	25
Tabelle 7: ECP-ELISA-Test Pipettierschema.....	27
Tabelle 8: IL8-ELISA-Test Pipettierschema.....	29
Tabelle 9: Master-Mix RT-PCR.....	30
Tabelle 10: Master-Mix PCR.....	31
Tabelle 11: Parameter Thermocycler Rhinovirus-PCR.....	32
Tabelle 12: Parameter für Sequenzalignment.....	34
Tabelle 13: Ansatz für CMV-, EBV- und HHV-6- Real-time-TaqMan-PCR.....	35
Tabelle 14: Endkonzentrationen im Ansatz für CMV-, EBV- und HHV-6-Real-time-TaqMan-	

PCR.....	36
Tabelle 15: Ansatz HSV 1-Real-time-TaqMan-PCR.....	36
Tabelle 16: Parameter Thermocycler Real-time-TaqMan-PCR.....	36
Tabelle 17: Bradford-Testergebnisse der NPAs.....	37
Tabelle 18: Veränderung der Viruslast zwischen 1. und 2. NPA (Nasopharynxaspirat) bei HRV-A vs. HRV-C.....	42
Tabelle 19: Koinfektionen HRV-A vs. HRV-C.....	42
Tabelle 20: Klinische Verlaufparameter HRV-A vs. HRV-C.....	44
Tabelle 21: IL-8 und ECP-Messergebnisse im Vergleich HRV-A vs. HRV-C.....	46
Tabelle 22: Co-Faktoren bei der Entwicklung einer Pneumonie bei einer Rhinovirus- Infektion.....	48

VIII Literaturverzeichnis

1. Mäkelä MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, et al. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol.* **1998**;36:539–42.
2. Gern JE. How Rhinovirus Infections Cause Exacerbations of Asthma. *Clinical & Experimental Allergy.* **2014**;n/a-n/a.
3. Imakita M, Shiraki K, Yutani C, Ishibashi-Ueda H. Pneumonia caused by rhinovirus. *Clin Infect Dis.* **2000**;30:611–2.
4. Krilov L, Pierik L, Keller E, Mahan K, Watson D, Hirsch M, et al. The association of rhinoviruses with lower respiratory tract disease in hospitalized patients. *J Med Virol.* **1986**;19:345–52.
5. Louie JK, Roy-Burman A, Guardia-Labar L, Boston EJ, Kiang D, Padilla T, et al. Rhinovirus associated with severe lower respiratory tract infections in children. *Pediatr Infect Dis J.* **2009**;28:337–9.
6. Mak RKY, Tse LY, Lam WY, Wong GWK, Chan PKS, Leung TF. Clinical spectrum of human rhinovirus infections in hospitalized Hong Kong children. *Pediatr Infect Dis J.* **2011**;30:749–53.
7. ICTV Taxonomy History [Internet]. [cited **2013** Oct 22]. Available from: http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20125902&taxa_name=Rhinovirus%20A
8. Gern JE, Busse WW. Association of rhinovirus infections with asthma. *Clin Microbiol Rev.* **1999**;12:9–18.
9. ICTV Virus Taxonomy **2013** [Internet]. [cited 2014 Dec 4]. Available from: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
10. McLean GR, Walton RP, Shetty S, Peel TJ, Paktiawal N, Keadze T, et al. Rhinovirus infections and immunisation induce cross-serotype reactive antibodies to VP1. *Antiviral Res.* **2012**;95:193–201.
11. Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. *Viruses.* **2016**;8.
12. Jacobs SE, Lamson DM, St. George K, Walsh TJ. Human Rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews.* **2013**;26:135–62.
13. Palmenberg AC, Rathe JA, Liggett SB. Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* **2010**;125:1190–9.
14. Lamson D, Renwick N, Kapoor V, Liu Z, Palacios G, Ju J, 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.* **2006**;194:1398–402.

15. Briese T, Renwick N, Venter M, Jarman RG, Ghosh D, Köndgen S, et al. Global Distribution of Novel Rhinovirus Genotype. *Emerging Infectious Diseases*. **2008**;14:944–7.
16. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). [cited **2020** Aug 23]. Available from: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=19991256&src=NCBI&ictv_id=19991256
17. Lessler J, Reich NG, Brookmeyer R, Perl TM, Nelson KE, Cummings DA. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *The Lancet infectious diseases*. **2009**;9:291–300.
18. Pappas DE, Hendley JO, Hayden FG, Winther B. Symptom Profile of Common Colds in School-Aged Children: The Pediatric Infectious Disease Journal. **2008**;27:8–11.
19. McErlean P, Shackelton LA, Andrews E, Webster DR, Lambert SB, Nissen MD, et al. Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, human rhinovirus C (HRV C). *PLoS ONE*. **2008**;3:e1847.
20. Lau SKP, Yip CCY, Lin AWC, Lee RA, So L, Lau Y, et al. Clinical and Molecular Epidemiology of Human Rhinovirus C in Children and Adults in Hong Kong Reveals a Possible Distinct Human Rhinovirus C Subgroup. *The Journal of Infectious Diseases*. **2009**;200:1096–103.
21. Xiang Z, Gonzalez R, Wang Z, Xiao Y, Chen L, Li T, et al. Human rhinoviruses in Chinese adults with acute respiratory tract infection. *J Infect*. **2010**;61:289–98.
22. Xiang Z, Gonzalez R, Xie Z, Xiao Y, Chen L, Li Y, et al. Human Rhinovirus Group C Infection in Children with Lower Respiratory Tract Infection. *Emerging Infectious Diseases*. **2008**;14:1665–7.
23. Tapparel C, L’Huillier AG, Rougemont A-L, Beghetti M, Barazzzone-Argiroffo C, Kaiser L. Pneumonia and pericarditis in a child with HRV-C infection: A case report. *Journal of Clinical Virology*. **2009**;45:157–60.
24. Piralla A, Rovida F, Campanini G, Rognoni V, Marchi A, Locatelli F, et al. Clinical severity and molecular typing of human rhinovirus C strains during a fall outbreak affecting hospitalized patients. *Journal of Clinical Virology*. **2009**;45:311–7.
25. Jin Y, Yuan X-H, Xie Z-P, Gao H-C, Song J-R, Zhang R-F, et al. Prevalence and clinical characterization of a newly identified human rhinovirus C species in children with acute respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*. **2009**;47:2895–900.
26. Linsuwanon P, Payungporn S, Samransamruajkit R, Posuwan N, Makkoch J, Theanboonlers A, et al. High prevalence of human rhinovirus C infection in Thai children with acute lower respiratory tract disease. *J Infect*. **2009**;59:115–21.
27. Han T-H, Chung J-Y, Hwang E-S, Koo J-W. Detection of human rhinovirus C in children with acute lower respiratory tract infections in South Korea. *Arch Virol*. **2009**;154:987–91.
28. Miller EK, Khuri-Bulos N, Williams JV, Shehabi AA, Faouri S, Al Jundi I, et al. Human rhinovirus C associated with wheezing in hospitalised children in the Middle East. *Journal of Clinical Virology*. **2009**;46:85–9.

29. Khetsuriani N, Lu X, Teague WG, Kazerouni N, Anderson LJ, Erdman DD. Novel Human Rhinoviruses and Exacerbation of Asthma in Children¹. *Emerging Infectious Diseases*. **2008**;14:1793–6.
30. Hendley JO, Gwaltney JM. Mechanisms of transmission of rhinovirus infections. *Epidemiol Rev*. **1988**;10:243–58.
31. Jennings LC, Dick EC. Transmission and control of rhinovirus colds. *Eur J Epidemiol*. **1987**;3:327–35.
32. Gwaltney JM, Moskalski PB, Hendley JO. Hand-to-hand transmission of rhinovirus colds. *Ann Intern Med*. **1978**;88:463–7.
33. Savolainen-Kopra C, Korpela T, Simonen-Tikka M-L, Amiryousefi A, Ziegler T, Roivainen M, et al. Single treatment with ethanol hand rub is ineffective against human rhinovirus—hand washing with soap and water removes the virus efficiently. *J Med Virol*. **2012**;84:543–7.
34. Hendley JO, Wenzel RP, Gwaltney JM. Transmission of rhinovirus colds by self-inoculation. *N Engl J Med*. **1973**;288:1361–4.
35. Stott EJ, Killington RA. Rhinoviruses. *Annual Reviews in Microbiology*. **1972**;26:503–24.
36. Papadopoulos NG, Sanderson G, Hunter J, Johnston SL. Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperatures. *J Med Virol*. **1999**;58:100–4.
37. Douglas RG, Lindgren KM, Couch RB. Exposure to Cold Environment and Rhinovirus Common Cold: Failure to Demonstrate Effect. *N Engl J Med*. **1968**;279:742–7.
38. Gwaltney JM, Hendley JO, Simon G, Jordan WS. Rhinovirus infections in an industrial population. I. The occurrence of illness. *N Engl J Med*. **1966**;275:1261–8.
39. Winther B, Hayden FG, Hendley JO. Picornavirus infections in children diagnosed by RT-PCR during longitudinal surveillance with weekly sampling: Association with symptomatic illness and effect of season. *J Med Virol*. **2006**;78:644–50.
40. Miller EK, Lu X, Erdman DD, Poehling KA, Zhu Y, Griffin MR, et al. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. *J Infect Dis*. **2007**;195:773–81.
41. Vesa S, Kleemola M, Blomqvist S, Takala A, Kilpi T, Hovi T. Epidemiology of documented viral respiratory infections and acute otitis media in a cohort of children followed from two to twenty-four months of age. *Pediatr Infect Dis J*. **2001**;20:574–81.
42. Holgate ST, Roberts G, Arshad HS, Howarth PH, Davies DE. The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis. *Proc Am Thorac Soc*. **2009**;6:655–9.
43. Huang T, Wang W, Bessaud M, Ren P, Sheng J, Yan H, et al. Evidence of recombination and genetic diversity in human rhinoviruses in children with acute respiratory infection. *PLoS ONE*. **2009**;4:e6355.
44. Smuts HE, Workman LJ, Zar HJ. Human rhinovirus infection in young African children with acute wheezing. *BMC Infect Dis*. **2011**;11:65.

45. Yamaya M, Nishimura H, Nadine L, Kubo H, Nagatomi R. Formoterol and budesonide inhibit rhinovirus infection and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Respiratory Investigation*. **2014**;52:251–60.
46. Kirkpatrick GL. The common cold. *Prim Care*. **1996**;23:657–75.
47. Hayden FG, Herrington DT, Coats TL, Kim K, Cooper EC, Villano SA, et al. Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. *Clin Infect Dis*. **2003**;36:1523–32.
48. Pevear DC, Hayden FG, Demenczuk TM, Barone LR, McKinlay MA, Collett MS. Relationship of pleconaril susceptibility and clinical outcomes in treatment of common colds caused by rhinoviruses. *Antimicrob Agents Chemother*. **2005**;49:4492–9.
49. Hayden FG, Turner RB, Gwaltney JM, Chi-Burris K, Gersten M, Hsyu P, et al. Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Studies of Rupintrivir Nasal Spray 2-Percent Suspension for Prevention and Treatment of Experimentally Induced Rhinovirus Colds in Healthy Volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2003**;47:3907–16.
50. Feil SC, Hamilton S, Krippner GY, Lin B, Luttick A, McConnell DB, et al. An Orally Available 3-Ethoxybenzisoxazole Capsid Binder with Clinical Activity against Human Rhinovirus. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. **2012**;3:303–7.
51. Hayden FG, Gwaltney JM. Intranasal interferon alpha 2 for prevention of rhinovirus infection and illness. *J Infect Dis*. **1983**;148:543–50.
52. Douglas RM, Hemila H, D'Souza R, Chalker EB, Treacy B. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst Rev*. **2004**;CD000980.
53. Mastromarino P, Capobianco D, Cannata F, Nardis C, Mattia E, De Leo A, et al. Resveratrol inhibits rhinovirus replication and expression of inflammatory mediators in nasal epithelia. *Antiviral Research*. **2015**;123:15–21.
54. Papi A, Contoli M. Rhinovirus vaccination: the case against. *Eur Respir J*. **2011**;37:5–7.
55. Glanville N, McLean GR, Guy B, Lecouturier V, Berry C, Girerd Y, et al. Cross-serotype immunity induced by immunization with a conserved rhinovirus capsid protein. *PLoS Pathog*. **2013**;9:e1003669.
56. Greiff L, Andersson M, Svensson C, Linden M, Myint S, Persson CG. Allergen challenge-induced acute exudation of IL-8, ECP and alpha2-macroglobulin in human rhinovirus-induced common colds. *Eur Respir J*. **1999**;13:41–7.
57. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*. **1989**;84:1045–9.
58. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine*. **1989**;1:2–13.
59. Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. **1987**;149:755–61.

60. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1987**;84:9233–7.
61. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*. **2000**;18:217–42.
62. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol*. **1994**;56:559–64.
63. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. **1992**;258:1798–801.
64. Smyth MJ, Zachariae CO, Norihisa Y, Ortaldo JR, Hishinuma A, Matsushima K. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. *J Immunol*. **1991**;146:3815–23.
65. Boix E, Carreras E, Nikolovski Z, Cuchillo CM, Nogués MV. Identification and characterization of human eosinophil cationic protein by an epitope-specific antibody. *J Leukoc Biol*. **2001**;69:1027–35.
66. Hamann KJ, Ten RM, Loegering DA, Jenkins RB, Heise MT, Schad CR, et al. Structure and chromosome localization of the human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein genes: evidence for intronless coding sequences in the ribonuclease gene superfamily. *Genomics*. **1990**;7:535–46.
67. Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol*. **1986**;39:177–253.
68. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. **2006**;24:147–74.
69. Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ, Gleich GJ. Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J Immunol*. **1986**;137:2913–7.
70. Young JD, Peterson CG, Venge P, Cohn ZA. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature*. **1986**;321:613–6.
71. Venge P, Byström J, Carlson M, Håkansson L, Karawacjzyk M, Peterson C, et al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy*. **1999**;29:1172–86.
72. Olszewska-Pazdrak B, Pazdrak K, Ogra PL, Garofalo RP. Respiratory syncytial virus-infected pulmonary epithelial cells induce eosinophil degranulation by a CD18-mediated mechanism. *J Immunol*. **1998**;160:4889–95.
73. Harrison AM, Bonville CA, Rosenberg HF, Domachowske JB. Respiratory syncytial virus-induced chemokine expression in the lower airways: eosinophil recruitment and degranulation. *Am J Respir Crit Care Med*. **1999**;159:1918–24.
74. Tomassini M, Magrini L, De Petrillo G, Adriani E, Bonini S, Balsano F, et al. Serum levels of eosinophil cationic protein in allergic diseases and natural allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol*. **1996**;97:1350–5.

75. Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y. Differential effects of corticosteroids on serum eosinophil cationic protein and cytokine production in rhinovirus- and respiratory syncytial virus-induced acute exacerbation of childhood asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* **2011**;155 Suppl 1:77–84.
76. Hughes PJ, North C, Jellis CH, Minor PD, Stanway G. The nucleotide sequence of human rhinovirus 1B: molecular relationships within the rhinovirus genus. *J Gen Virol.* **1988**;69 (Pt 1):49–58.
77. BioMath - Tm Calculations for Oligos [Internet]. [cited **2012** Mar 10]. Available from: <http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm>
78. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature.* **1970**;227:168–70.
79. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **1976**;72:248–54.
80. Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J Gen Virol.* **2002**;83:333–40.
81. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 1 strain ATCC VR-1559, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445111.1 GI:217316352 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445111.1>
82. Skern, T. Human rhinovirus 2, complete sequence - Nucleotide - NCBI - X02316.1 GI:61098 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/61098>
83. Kistler, A.L. Human rhinovirus 3, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473485.1 GI:95102485 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ473485.1>
84. Kistler, A.L. Human rhinovirus 4, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473490.1 GI:95102495 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102495>
85. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 5 strain ATCC VR-485, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445112.1 GI:217316354 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316354>
86. Kistler, A.L. Human rhinovirus 6, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473486.1 GI:95102487 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102487>
87. Kistler, A.L. Human rhinovirus 7, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473503.1 GI:95102521 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ473503.1>
88. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 8 strain ATCC VR-1118, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445113.1 GI:217316356 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316356>

89. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 9 isolate F01, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445114.1 GI:217316358 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445114.1>
90. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 9 isolate F02, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445115.1 GI:217316360 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445115.1>
91. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 9 strain ATCC VR-489, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445177.1 GI:217316484 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445177.1>
92. Kistler, A.L. Human rhinovirus 10, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473498.1 GI:95102511 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ473498.1>
93. Tapparel,C. Human rhinovirus 11, complete genome - Nucleotide - NCBI - EF173414.1 GI:134284362 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/134284362>
94. Tapparel,C. Human rhinovirus 12, complete genome - Nucleotide - NCBI - EF173415.1 GI:134284364 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/134284364>
95. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 13 isolate F03, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445117.1 GI:217316364 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445117.1>
96. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 13 strain ATCC VR-1123, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445116.1 GI:217316362 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445116.1>
97. Callahan,P.L. Human rhinovirus 14, complete genome - Nucleotide - NCBI - NC_001490.1 GI:9626735 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001490.1
98. Kistler, A.L. Human rhinovirus 15, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473493.1 GI:95102501 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102501>
99. Tapparel,C. Human rhinovirus 17, complete genome - Nucleotide - NCBI - EF173420.1 GI:134284374 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/134284374>
100. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 18 strain ATCC VR-1128, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445118.1 GI:217316366 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316366>
101. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 19 strain ATCC VR-1129, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445119.1 GI:217316368 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316368>
102. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 20 strain ATCC VR-1130, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445120.1 GI:217316370 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/217316370>

103. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 21 strain ATCC VR-1131, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445121.1 GI:217316372 [Internet]. [cited 2011 Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/217316372>

104. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 22 strain ATCC VR-1132, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445122.1 GI:217316374 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/217316374>

105. Kistler, A.L. Human rhinovirus 23, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473497.1 GI:95102509 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/95102509>

106. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 24 strain ATCC VR-1134, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445190.1 GI:217316510 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/FJ445190.1>

107. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 25 strain ATCC VR-1135, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445123.1 GI:217316376 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/217316376>

108. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 26 strain ATCC VR-1136, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445124.1 GI:217316378 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/217316378>

109. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 27 strain ATCC VR-1137, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445186.1 GI:217316502 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/FJ445186.1>

110. Kistler, A.L. Human rhinovirus 28, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473508.1 GI:95102531 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/95102531>

111. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 29 strain ATCC VR-1139, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445125.1 GI:217316380 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/217316380>

112. Kistler, A.L. Human rhinovirus 30, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473512.1 GI:95102539 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/DQ473512.1>

113. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 31 strain ATCC VR-506, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445126.1 GI:217316382 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/217316382>

114. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 32 strain ATCC VR-1142, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445127.1 GI:217316384 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/217316384>

115. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 33 strain ATCC VR-330, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445128.1 GI:217316386 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/217316386>

116. Kistler, A.L. Human rhinovirus 34, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473501.1 GI:95102517 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ473501.1>
117. Kistler, A.L. Human rhinovirus 35, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473487.1 GI:95102489 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ473487.1>
118. Kistler, A.L. Human rhinovirus 36, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473505.1 GI:95102525 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102525>
119. Tapparel, C. Human rhinovirus 37, complete genome - Nucleotide - NCBI - EF173423.1 GI:134284380 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/134284380>
120. Kistler, A.L. Human rhinovirus 38, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473495.1 GI:95102505 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ473495.1>
121. Harris, J.R. Human rhinovirus 39, complete genome - Nucleotide - NCBI - AY751783.1 GI:53987041 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/53987041>
122. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 40 strain ATCC VR-341, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445129.1 GI:217316388 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316388>
123. Kistler, A.L. Human rhinovirus 41, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473491.1 GI:95102497 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102497>
124. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 42 strain ATCC VR-338, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445130.1 GI:217316390 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316390>
125. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 43 strain ATCC VR-1153, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445131.1 GI:217316392 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316392>
126. Kistler, A.L. Human rhinovirus 44, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473499.1 GI:95102513 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102513>
127. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 45 strain ATCC VR-1155, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445132.1 GI:217316394 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316394>
128. Kistler, A.L. Human rhinovirus 46, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473506.1 GI:95102527 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102527>
129. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 47 strain ATCC VR-1157, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445133.1 GI:217316396 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316396>

130. Kistler, A.L. Human rhinovirus 48, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473488.1 GI:95102491 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102491>
131. Kistler, A.L. Human rhinovirus 49, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473496.1 GI:95102507 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ473496.1>
132. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 49 isolate F04, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445134.1 GI:217316398 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445134.1>
133. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 50 strain ATCC VR-517, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445135.1 GI:217316400 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316400>
134. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 51 strain ATCC VR-1161, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445136.1 GI:217316402 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316402>
135. Tapparel, C. Human rhinovirus 52, complete genome - Nucleotide - NCBI - EF173424.1 GI:134284382 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF173424.1>
136. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 52 isolate F10, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445137.1 GI:217316404 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445137.1>
137. Kistler, A.L. Human rhinovirus 53, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473507.1 GI:95102529 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102529>
138. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 54 isolate F05, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445139.1 GI:217316408 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445139.1>
139. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 54 strain ATCC VR-1164, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445138.1 GI:217316406 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445138.1>
140. Kistler, A.L. Human rhinovirus 55, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473511.1 GI:95102537 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102537>
141. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 56 strain ATCC VR-1166, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445140.1 GI:217316410 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316410>
142. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 57 isolate fs ship#1-hrv-57, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445141.1 GI:217316412 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316412>

143. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 58 strain ATCC VR-1168, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445142.1 GI:217316414 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316414>
144. Kistler, A.L. Human rhinovirus 59, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473500.1 GI:95102515 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102515>
145. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 60 strain ATCC VR-1473, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445143.1 GI:217316416 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316416>
146. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 61 strain ATCC VR-1171, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445144.1 GI:217316418 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316418>
147. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 62 strain ATCC VR-1172, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445145.1 GI:217316420 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316420>
148. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 63 strain ATCC VR-1173, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445146.1 GI:217316422 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316422>
149. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 64 strain ATCC VR-1174, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445181.1 GI:217316492 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445181.1>
150. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 65 strain ATCC VR-1175, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445147.1 GI:217316424 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316424>
151. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 66 strain ATCC VR-1176, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445148.1 GI:217316426 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316426>
152. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 67 strain ATCC VR-1177, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445149.1 GI:217316428 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316428>
153. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 68 strain ATCC VR-1178, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445150.1 GI:217316430 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316430>
154. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 69 strain ATCC VR-1179, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445151.1 GI:217316432 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316432>
155. Kistler, A.L. Human rhinovirus 70, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473489.1 GI:95102493 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102493>
156. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 71 strain ATCC VR-1181, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445152.1 GI:217316434 [Internet]. [cited **2011** Aug 28]. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316434>

157. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 72 strain ATCC VR-1182, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445153.1 GI:217316436 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445153.1>

158. Kistler, A.L. Human rhinovirus 73, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473492.1 GI:95102499 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102499>

159. Kistler, A.L. Human rhinovirus 74, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473494.1 GI:95102503 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102503>

160. Kistler, A.L. Human rhinovirus 75, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473510.1 GI:95102535 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102535>

161. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 76 strain ATCC VR-1186, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445182.1 GI:217316494 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445182.1>

162. Human rhinovirus 77 strain ATCC VR-1187, complete genome - Nucleotide - NCBI [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316438>

163. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 77 strain ATCC VR-1187, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445154.1 GI:217316438 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316438>

164. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 78 strain ATCC VR-1188, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445183.1 GI:217316496 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445183.1>

165. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 79 strain ATCC VR-1189, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445155.1 GI:217316440 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316440>

166. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 80 strain ATCC VR-1190, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445156.1 GI:217316442 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316442>

167. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 81 isolate F06, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445158.1 GI:217316446 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445158.1>

168. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 81 isolate F07, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445159.1 GI:217316448 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445159.1>

169. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 81 strain ATCC VR-1191, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445157.1 GI:217316444 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445157.1>

170. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 82 strain ATCC VR-1192, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445160.1 GI:217316450 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316450>
171. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 83 strain ATCC VR-1193, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445161.1 GI:217316452 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316452>
172. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 84 strain ATCC VR-1194, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445162.1 GI:217316454 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316454>
173. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 85 strain ATCC VR-1195, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445163.1 GI:217316456 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316456>
174. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 86 strain ATCC VR-1196, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445164.1 GI:217316458 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316458>
175. Kistler, A.L. Human rhinovirus 88, complete genome - Nucleotide - NCBI - DQ473504.1 GI:95102523 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95102523>
176. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 89 isolate F08, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445166.1 GI:217316462 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445166.1>
177. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 89 isolate F09, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445165.1 GI:217316460 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445165.1>
178. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 89 strain ATCC VR-1199, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445184.1 GI:217316498 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445184.1>
179. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 90 strain ATCC VR-1291, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445167.1 GI:217316464 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316464>
180. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 91 strain ATCC VR-1292, complete genome - Nucleotide - NCBI - J445168.1 GI:217316466 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316466>
181. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 92 strain ATCC VR-1293, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445169.1 GI:217316468 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445169.1>
182. Tapparel, C. Human rhinovirus 93, complete genome - Nucleotide - NCBI - EF173425.1 GI:134284384 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/134284384>
183. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 94 strain ATCC VR-1295, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445185.1 GI:217316500 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ445185.1>

184. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 95 strain ATCC VR-1301, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445170.1 GI:217316470 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316470>

185. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 96 strain ATCC VR-1296, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445171.1 GI:217316472 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316472>

186. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 97 strain ATCC VR-1297, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445172.1 GI:217316474 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316474>

187. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 98 strain ATCC VR-1298, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445173.1 GI:217316476 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316476>

188. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 99 strain ATCC VR-1299, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445174.1 GI:217316478 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316478>

189. Palmenberg, A.C. Human rhinovirus 100 strain ATCC VR-1300, complete genome - Nucleotide - NCBI - FJ445175.1 GI:217316480 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/217316480>

190. Lau, S.K. Human rhinovirus C strain 024, complete genome - Nucleotide - NCBI - EF582385.1 GI:156254956 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF582385.1>

191. Lau, S.K. Human rhinovirus C strain 025, complete genome - Nucleotide - NCBI - EF582386.1 GI:156254958 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/156254958>

192. Faux, C.E. Human rhinovirus C strain HRV-C026 VP1 (1D) gene, partial cds - Nucleotide - NCBI - EU935601.1 GI:197725489 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/197725489>

193. Lamson, D. Human rhinovirus C strain NY-074 polyprotein gene, complete cds - Nucleotide - NCBI - DQ875932.2 GI:255115692 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ875932.2>

194. Kistler, A.L. Human rhinovirus NAT001 polyprotein gene, complete cds - Nucleotide - NCBI - EF077279.1 GI:146269430 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/146269430>

195. Kistler, A.L. Human rhinovirus NAT045 polyprotein gene, complete cds - Nucleotide - NCBI - EF077280.1 GI:147868570 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/147868570>

196. McErlean, P. Human rhinovirus QPM polyprotein gene, complete cds - Nucleotide - NCBI - EF186077.1 GI:138362527 [Internet]. [cited 2011 Aug 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/138362527>

197. Lee, W.M. Human rhinovirus type 16 polyprotein gene, complete CDS - Nucleotide - NCBI - L24917.1 GI:409463 [Internet]. [cited **2011** Aug 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/409463>
198. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739. **2011**.
199. Piiparinen H, Lautenschlager I. Quantitative TaqMan assay for the detection and monitoring of cytomegalovirus infection in organ transplant patients. *Methods Mol Biol.* **2006**;335:147–56.
200. Loginov R, Aalto S, Piiparinen H, Halme L, Arola J, Hedman K, et al. Monitoring of EBV-DNAemia by quantitative real-time PCR after adult liver transplantation. *J Clin Virol.* **2006**;37:104–8.
201. Savolainen H, Lautenschlager I, Piiparinen H, Saarinen-Pihkala U, Hovi L, Vetterranta K. Human herpesvirus-6 and -7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* **2005**;45:820–5.
202. Härmä M, Loginov R, Piiparinen H, Halme L, Höckerstedt K, Lautenschlager I. HHV-6-DNAemia related to CMV-DNAemia after liver transplantation. *Transplant Proc.* **2005**;37:1230–2.
203. Piiparinen H, Höckerstedt K, Grönhagen-Riska C, Lautenschlager I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *J Clin Virol.* **2004**;30:258–66.
204. Piiparinen H, Höckerstedt K, Grönhagen-Riska C, Lappalainen M, Suni J, Lautenschlager I. Comparison of plasma polymerase chain reaction and pp65-antigenemia assay in the quantification of cytomegalovirus in liver and kidney transplant patients. *J Clin Virol.* **2001**;22:111–6.
205. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol.* **2004**;42:5189–98.
206. Weidmann M, Meyer-König U, Hufert FT. Rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* **2003**;41:1565–8.
207. Aberle SW, Puchhammer-Stöckl E. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol.* **2002**;25 Suppl 1:S79-85.
208. Holland, P M et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **1991**;88:7276–80.
209. A Simple Method for Estimating and Testing Minimum-Evolution Trees. *Molecular Biology and Evolution* [Internet]. **1992** [cited 2020 Nov 14]; Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/9/5/945/1009241/A-Simple-Method-for-Estimating-and-Testing>

210. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2004**;101:11030–5.
211. Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford ; New York: Oxford University Press; **2000**.
212. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. **1987**;4:406–25.
213. SigmaPlot [Internet]. Systat Software Inc.; **2006**. Available from: <http://www.sigmaplot.com>
214. Phillips CA, Riggs S, Melnick JL, Grim CA. RHINOVIRUSES ASSOCIATED WITH COMMON COLDS IN A STUDENT POPULATION. *JAMA*. **1965**;192:277–80.
215. Winther B, Hayden FG, Hendley JO. Picornavirus infections in children diagnosed by RT-PCR during longitudinal surveillance with weekly sampling: Association with symptomatic illness and effect of season. *J Med Virol*. **2006**;78:644–50.
216. Spichak TV, Yatsyshina SB, Katosova LK, Kim SS, Korppi MO. Is the role of rhinoviruses as causative agents of pediatric community-acquired pneumonia over-estimated? *Eur J Pediatr*. **2016**;175:1951–8.
217. Ko FW, Chan PK, Chan RWY, Chan K-P, Ip A, Kwok A, et al. Molecular detection of respiratory pathogens and typing of human rhinovirus of adults hospitalized for exacerbation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* [Internet]. 2019 [cited **2020** Jun 21];20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6743175/>
218. Wang M, Cai F, Wu X, Wu T, Su X, Shi Y. Incidence of viral infection detected by PCR and real-time PCR in childhood community-acquired pneumonia: A meta-analysis: Viral infections in childhood CAP. *Respirology*. **2015**;n/a-n/a.
219. Gwaltney JM Jr. *Rhinoviruses. Viral infections of humans: epidemiology and control*. 2nd ed. New York: Plenum Medical Book Co, **1982**:491-517. 1982;
220. Hamparian VV, Conant RM, Thomas DC. Rhinovirus Reference Laboratory, Annual Contract Progress Report to the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Contract no. 69- 2062. **1969**;
221. Franz A, Adams O, Willems R, Bonzel L, Neuhausen N, Schweizer-Krantz S, et al. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *J Clin Virol*. **2010**;48:239–45.
222. Öhrmalm L, Malinovschi A, Wong M, Levinson P, Janson C, Broliden K, et al. Presence of rhinovirus in the respiratory tract of adolescents and young adults with asthma without symptoms of infection. *Respir Med*. **2016**;115:1–6.
223. Adams O, Weis J, Jasinska K, Vogel M, Tenenbaum T. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and Rhinovirus respiratory tract infections in young children admitted to hospital: HMPV, RSV and RV in Young Children. *Journal of Medical Virology*. **2015**;87:275–80.

224. Mallorquí-Fernández G, Pous J, Peracaula R, Aymamí J, Maeda T, Tada H, et al. Three-dimensional crystal structure of human eosinophil cationic protein (RNase 3) at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol.* **2000**;300:1297–307.

225. ViralZone: Picornaviridae [Internet]. [cited **2016** Feb 14]. Available from: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/33.html

IX Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen, insbesondere meinem Doktorvater und der technische Assistentin Iris Herrmann, meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Meiner Ehefrau danke ich für ihre Ermutigungen während der Arbeit an dieser Dissertation.

Ich widme diese Arbeit meinem Opa Horst van Hees, der mich in meinem Leben sehr geprägt und immer unterstützt hat.