

**Thema: Die Rolle des humanen Metapneumovirus bei der
Exazerbation eines Asthma bronchiale und der
ambulant erworbenen Otitis media.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Tilman Felix Geikowski
aus Darmstadt

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Schildgen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Rockstroh

Tag der Mündlichen Prüfung: 07. Juli 2008

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie
Direktor: Prof. Dr. med. A. Hörauf

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Für meine Oma

Inhaltsverzeichnis

0	Abkürzungsverzeichnis	7
1	Einleitung: Der „banale“ respiratorische Infekt im Kindesalter	9
2	Überblick	11
2.1	Einordnung des humanen Metapneumovirus (hMPV) in die Familie der Paramyxoviren	11
2.2	Aufbau des Viruspartikels der Paramyxoviren	15
2.3	Genomaufbau von Paramyxoviren.....	16
2.4	Strukturproteine.....	17
2.5	Nichtstrukturproteine	18
2.6	Replikation	18
2.7	Humanpathogene Paramyxoviren	19
2.7.1	Die Parainfluenzaviren	19
2.7.2	Das Mumpsvirus	20
2.7.3	Das Masernvirus	21
2.7.4	Das Respiratorische Synzytialvirus (RSV).....	22
2.7.5	Andere respiratorische Viren	23
2.8	Ziel der Arbeit	24
3	Material und Methoden.....	26
3.1	Material	26
3.1.1	Geräte.....	26
3.1.2	Chemikalien	26
3.1.3	Desoxyribonukleinsäure (DNS) – Längenstandard	27
3.1.4	Reagenziensysteme	27
3.1.5	Nährmedien.....	27
3.1.6	Enzyme	28
3.1.7	Nukleotide.....	28
3.1.8	Primer.....	28
3.1.9	Proben	29
3.1.9.1	Rachenspülwasser im Zeitraum 01.10.2001 – 31.03.2004 $n_{\text{ges.}} = 637$	29
3.1.9.2	Rachenabstriche.....	29
3.1.9.3	Gewebeproben der Lunge und des Gehirns.....	29
3.1.10	Schnellteste	29

3.1.11 Zellkulturen.....	29
3.1.12 Stammlösungen.....	29
3.2 Methoden	30
3.2.1 Kultivierung verschiedener Zelllinien	30
3.2.2 RNS Isolierung mit dem RNeasy Protect Kit.....	31
3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
3.2.3.1 Nested-PCR	33
3.2.3.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	34
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.5 Verwendung von QIAquick-PCR Purification Kit (Qiagen).....	37
3.2.6 Klonierung mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen).....	38
3.2.6.1 TOPO-Ligation.....	39
3.2.6.2 Hitzeschock-Transformation	40
3.2.6.3 Selektion und Kontrolle der gepickten Klone	41
3.2.6.4 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien.....	41
3.2.7 DNS-Sequenzierung	42
4 Ergebnisse.....	45
4.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	45
4.2 Neue Aspekte in der Pathogenese des hMPV	45
4.2.1 Das hMPV als Trigger einer akuten Asthma bronchiale Exazerbation.....	45
4.2.2 Enzephalitis und hMPV – neuer Subtyp.....	50
4.2.3 Akute Otitis media (AOM) und hMPV	58
5 Diskussion.....	60
5.1 hMPV und Asthma.....	60
5.2 hMPV und Otitis media	63
5.3 hMPV und Enzephalitis	64
6 Zusammenfassung und Perspektiven	66
7 Literaturverzeichnis	68
8 Danksagung.....	77

0 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AOM	akute Otitis media
APV	Avian Pneumovirus
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Zytomegalievirus
CPE	zytopathischer Effekt
CT	Computertomographie
ddNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
F-Protein	Fusions-Protein
GCS	Glasgow Coma Scale
G-Protein	Glyko-Protein
Hg	Quecksilber
hMPV	humanes Metapneumovirus
HN	Hämagglutinin-Neuraminidaseprotein
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
L	Largeprotein
LB	Luria-Bertani
M	Membranprotein
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MIBE	measles inclusion body encephalitis

MPV	Metapneumovirus
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
P-Protein	Phospho-Protein
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SSPE	Subakute sklerosierende Panenzephalitis
ST	Schnelltest
Tab.	Tabelle
tMK	tertiary monkey kidney cells
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure

1 Einleitung: Der „banale“ respiratorische Infekt im Kindesalter

Der häufigste Grund der Vorstellung eines Kindes bei einem Kinderarzt ist eine Erkrankung der oberen Atemwege. Auf dem Boden der noch nicht vollkommen ausgebildeten immunologischen Kompetenz und der funktionellen anatomischen Besonderheiten der Bronchien sowie der noch nicht vollkommen ausgereiften mukoziliären Reinigungsfunktion erkranken Kleinkinder im Schnitt sechs- bis achtmal, ein 9-Jähriger drei- bis viermal und ein 12-Jähriger ein- bis zweimal im Jahr an einem respiratorischen Infekt (Koletzko 2000, Niederman 2003). Mit einem Prozentsatz von 60-90% nehmen die viralen Infektionen (hier vor allem Adenoviren, Rhino- und Orthomyxoviren) die größte Gruppe ein. Neben diesen scheint aus der Gruppe der Paramyxoviren besonders bei Säuglingen und Kleinkindern das im Jahr 2001 von van den Hoogen und Mitarbeitern (van den Hoogen et al. 2001) erstmals beschriebene humane Metapneumovirus (hMPV) eine herausragende Rolle als Erreger von Infekten der unteren und oberen Atemwege zu spielen sowie Trigger eines Asthma bronchiale bzw. eines hyperreagiblen Bronchialsystems zu sein.

Es ist möglich, den einzelnen Virusgruppen verschiedene anatomische Prädispositionsstellen zuzuschreiben (Tabelle 1), jedoch handelt es sich meist um deszendierende Infektionen, die sich entlang der bestehenden anatomischen Strukturen ausbreiten.

Viren	„Banaler“ Infekt	Pharyngitis	Subglottische Laryngitis (Krupp)	Bronchiolitis des Säuglings	Obstruktive Bronchitis	Pneumonie
Influenza	+	+	+		+	+
Parainfluenza	++	+	+++	++	+	++
RS	++		+	+++	+	++
Rhino	+++				++	
Adeno		+++	+			
hMPV	++			++	+	

Tab. 1: Zuordnung von Virusinfektionen zu anatomischen Prädispositionsorten im Atemwegstrakt

Die anfänglichen Symptome sind ein reduzierter Allgemeinzustand, Husten, Heiserkeit, Rhinitis, Halsschmerzen und Fieber über 38°C. Beim Übergang der Infektion in Bereiche des tieferen Respirationstraktes kann sich eine Laryngotracheobronchitis, eine Bronchitis, eine Bronchiolitis, die bevorzugt bei Kleinkindern auftritt, oder eine Bronchopneumonie entwickeln. Bei komplikations-

losem Verlauf kommt es nach 5-7 Tagen zu einem deutlichen Rückgang der beschriebenen Symptomatik (Turner 1998).

Häufig auftretende Komplikationen sind Otitis media (Corbell et al. 2004, Heikkinen et al. 1999, Monobe et al. 2003) und bakterielle Superinfektionen mit *Haemophilus influenzae*, Pneumokokken oder Streptokokken, aber auch eine spätere Prädisposition zu Erkrankungen des asthmatischen Formenkreises (Parainfluenzavirus-Infektionen) (Böcker 2001).

Bei älteren Patienten kommt es teilweise zu schweren Parainfluenza-Infektionen, die einen tödlichen Ausgang nehmen können, wenn sie systemisch verlaufen.

Die Übertragung des respiratorischen Infektes erfolgt zum einen über den direkten Kontakt mit infizierten Personen, zum anderen durch Tröpfcheninfektion (Simon et al. 2006).

Nach der Besiedelung des Nasen-Rachenraumes kommt es zu einer Ausbreitung über den Kehlkopf in die Bronchien und zur Infektion des Flimmerepithels. In der Submukosa sowie im peribronchialen Bindegewebe sammeln sich durch Chemotaxis und Diapedese Entzündungszellen (mononukleäre Zellen, Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen), die wiederum Entzündungsmediatoren (Interferone, Tumornekrosefaktor, Interleukine (IL) 2, 6 und 10) bilden. Es kommt zu einem Stromaödem sowie zu einer vermehrten serös schleimigen Sekretion des Epithels. Hierbei kann bedingt durch die beschriebene Pathophysiologie eine bronchiale Obstruktion entstehen, die zu Ventilstenosen und zur reversiblen Überblähung der nachgeschalteten Lungenanteile führt (Heikkinen, Järvinen 2003).

2 Überblick

2.1 Einordnung des humanen Metapneumovirus (hMPV) in die Familie der Paramyxoviren

Die Familie der Paramyxoviren umfasst eine große Gruppe humaner und tierpathogener Subgruppen, die sich in zwei Unterfamilien einordnen lassen: Die Paramyxovirinae, deren weitere Einteilung in Respiro-, Rubula- und Avulaviren anhand der biologischen Funktion ihrer Membranproteine erfolgt, und die Unterfamilie der Pneumoviren, zu der das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) sowie das Metapneumovirus (MPV) gehören.

Unterfamilie	Genus	Mensch	Tier
Paramyxovirinae	Respirovirus	Parainfluenzavirus Typen 1 und 3	bovines Parainfluenzavirus Typ 3, Sendavirus
	Rubulavirus	Mumpsvirus, Parainfluenzavirus Typen 2 und 4a, b	Canines Parainfluenzavirus Typ 2
	Avulavirus		Newcastle-Disease-Virus, Vogelparamyxoviren Typen 2-9
	Morbillivirus	Masernvirus	Hundestaupevirus, phocine Staupeviren, Rinderpestvirus, pestes-des-petits-Ruminants-Virus
	Henipavirus	Hendravirus, Nipahvirus	Hendravirus, Menanglevirus, Nipahvirus
Pneumovirinae	Pneumovirus	Respiratorisches Synzytialvirus (RSV)	RS-Virus des Rindes
	Metapneumovirus	Humanes Metapneumovirus (hMPV)	Rhinotracheitisvirus der Pute

Tab. 2: Charakteristische Vertreter der Paramyxoviren (aus Falke et al. 2002)

So sind Respiro-, Rubula- und Avulaviren in der Lage Erythrozyten zu agglutinieren, und sie besitzen zum Teil Neuraminidaseaktivität (Tab. 2).

Das hMPV wurde 2001 aus Rachenspülwassern von 28 Kindern im Alter zwischen 0 und 5 Jahren in den Niederlanden isoliert und sequenziert (van den Hoogen et al. 2001). Die Symptomatik der Patienten entsprach der eines Infektes der oberen Atemwege. Größte genetische Ähnlichkeiten bestehen zum 1979 entdeckten tierpathogenen Metapneumovirus der Pute (APV) (Jones et al. 1996), das bei diesen Tieren zu Infekten des oberen Respirationstraktes führt. Die Einteilung des APV erfolgt in vier Serotypen (A, B, C und D), auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden kann (Makay et al. 2004). Die bestehende Ähnlichkeit des hMPV mit dem APV lässt einen aviären Ursprung vermuten (van den Hoogen et al. 2001). Dieses und das im weiteren Verlauf der Arbeit beschriebene RSV gehören mit dem hMPV zur Subfamilie der Pneumovirinae. Mittlerweile konnte das Virus weltweit nachgewiesen werden (Bastien et al. 2003, Boivin et al. 2002, Cuevas et al. 2003, Christensen et al. 2003, Ducen et al. 2005, Ebihara et al. 2004, Fodha et al. 2004, Freymouth et al. 2003, Galiano et al. 2004, Jarti et al. 2002, Ludewick et al. 2005, Madhi et al. 2003, Maggi et al. 2003, Nissen et al. 2002, Peret et al. 2002, van den Hoogen et al. 2002, Viazov et al. 2003, Werno et al. 2004, Wolf et al. 2003).

Das bei einer durch Tröpfcheninfektion auftretende Symptomspektrum reicht von milder katarhalischer Klinik über Bronchiolitis, (Broncho-) Pneumonie (van den Hoogen et al. 2004), Dyspnoe, Otitis media bis hin zu schwerer neurologischer Beeinträchtigung (Schildgen et al. 2005), jedoch ist eine klinische Unterscheidung zu anderen respiratorischen Virusinfektionen nicht möglich (Wilkesmann et al. 2006). Serologische Untersuchungen in den Niederlanden zeigten, dass 25% der Kinder im Alter zwischen 6 Monaten und 1 Jahr sowie nahezu alle Kinder mit Vervollendung des 5. Lebensjahres Kontakt mit dem Virus hatten, da bei ihnen Antikörper nachgewiesen wurden (van den Hoogen et al. 2001). Retrospektiv konnte vom niederländischen National Influenza Centre gezeigt werden, dass das hMPV seit mindestens 50 Jahren in den Niederlanden existiert (van den Hoogen et al. 2001). Ähnliche Daten bestehen weltweit. Die Hospitalisierungsrate bei hMPV-Infektionen und das Risiko von Komplikationen scheinen bei Frühgeburtlichkeit und deren Folgen, bei Patienten mit einer chronischen Lungenerkrankung (Ulloa-Gutierrez et al. 2004), bei Kindern mit hämodynamisch relevantem Herzvitium oder neuromuskulären Erkrankungen (Panitch 2004) sowie bei Patienten mit Immunsuppression nach peripherer Stammzell- oder Organtransplantation (Ison et al. 2002, Pelletier et al. 2002) höher zu sein. Nosokomiale hMPV-Infektionen sind schwer zu identifizieren, da noch kein zuverlässiger Antigen-Test zu Verfügung steht (Crowe et al. 2004).

Bei älteren Menschen kommt es durch eine hMPV-Infektion gehäuft zu einer Hospitalisierung (Boivin et al. 2002, Falsey et al. 2003, Cane et al. 2003, van den Hoogen et al. 2003). Es existiert eine klare Saisongebundenheit, die bei den meisten beschriebenen Fällen zwischen Dezember und Mai mit Saisonhöhepunkten im Dezember, Februar und April besteht (Jartti et al. 2002, Falsey et al. 2003, Freymuth et al. 2003, Maggi et al. 2003, Viazov et al. 2003, Boivin et al. 2002). Im Fernen Osten hingegen wird der Infektionshöhepunkt im Frühling und Anfang Sommer erreicht (Rawlinson et al. 2003, Peiris et al. 2003). Nachgewiesen wurde das Virus bei Patienten im Altersbereich zwischen 0 und 87 Jahren (Falsey et al. 2003). In 5-10% der Fälle konnte bei Kindern mit akutem respiratorischen Infekt hMPV nachgewiesen werden (Jartti et al. 2002, Rawlinson et al. 2003, Vincente et al. 2003, Williams et al. 2005). Bei über 30% wurden Koinfektionen gefunden (Williams et al. 2005, van den Hoogen et al. 2003), wobei Infektionen mit RSV überwogen. Auch ist die Klinik der einer RSV-Infektion sehr ähnlich, kann jedoch in ihrer Intensität stark variieren. In der 2003 in den Niederlanden durchgeführte ARIEL-Studie (Acute Respiratoire Infecties in de Eerste Lijn) konnte bei erwachsenen Patienten, die grippale Symptome zeigten, in 3% der Fälle eine hMPV-Infektion mittels Polymerasekettenreaktion (englisch: Polymerase Chain Reaktion, PCR) nachgewiesen werden. In einer New Yorker Studie hingegen zeigten 11% ein positives PCR-Ergebnis (Falsey et al. 2003). In beiden Studien konnten keine für das hMPV typischen Symptome gefunden werden. Eine geschlechtsspezifische Prävalenz wird kontrovers diskutiert. So zeigen einige Studien eine Knabenwendigkeit, die jedoch nur minimal erscheint (van den Hoogen et al. 2003, Peiris et al. 2003, Boivin et al. 2003). Bei den Laborparametern zeigen sich analog zu einer RSV-Infektion eine leichte Leukozytose sowie eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins (Wilkesmann et al. 2005). IL-6 und IL-8 sowie Procalcitonin können deutlich erhöht sein (Jartti et al. 2002, Mouli et al. 2001, Toikka et al. 2000). Fallstudien lassen auf einen Zusammenhang zwischen immunsupprimierten Patienten und Infektionen mit dem hMPV schließen (Pelletier et al. 2002), ebenso wie Triggereffekte bei Patienten mit einer akuten Exazerbation eines Asthma Bronchiale (Schildgen et al. 2004). Auch findet sich eine erhöhte Infektionsrate bei Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen, Krebs oder Herzviten (Stockten et al. 2002). Sowohl die Gruppe um Greensill als auch die um Semple lieferten Hinweise auf schwer verlaufende Bronchiolitiden bei Doppelinfektionen mit anderen respiratorischen Viren (Greensill et al. 2003, Semple et al. 2005). Die Rolle des hMPV als Kopathogen ist noch umstritten. Die Koinfektionsrate der meisten Untersuchungen lag bei 3,9-20,0% (Boivin et al. 2003, Bosis et al. 2005, Dollner et al. 2004, Maggi et al. 2003, Viazov et al. 2003). Bislang gibt es keine zuverlässigen

sigen Daten bezüglich der Inkubationszeit des hMPV beim Menschen, jedoch konnten Kuiken et al. (2004) bei experimentell infizierten Makaken ein Maximum der Virusausscheidung an Tag 4 post infectionem nachweisen. Allerdings war an Tag 10 bei keinem der Tiere mehr das hMPV nachweisbar.

Das Virus kann inzwischen in Zellkultur angezüchtet werden. Anfänglich wurde ein zytopathischer Effekt (CPE) auf tertiary monkey kidney cells (tMK) nach 10-14 Tagen gesehen. Dieser glich morphologisch stark dem des RSV. Boivin et al. (2003) zeigten einen CPE in LLC-MK₂-Zellen in einem Inkubationszeitraum von 17 Tagen. Zytopathische Effekte in anderen Zellen wie Vero-Zellen, MDCK oder A-₅₄₉ sind jedoch spärlich oder nicht zu finden. Zwar existiert ein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) des hMPV F- oder N-Proteins für spezifische hMPV-Antikörper (Hamelin et al. 2005, Ishiuga et al. 2005, Leung et al. 2005), da bei fast allen Patienten über 5 Jahren Antikörper im Serum nachgewiesen werden können, jedoch ist der momentane Goldstandard zum Nachweis einer Infektion mit hMPV die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) der viralen Gene für die Nukleokapsid-, Large- oder Fusionsproteine (N-Protein, L-Protein, F-Protein) (Cote et al. 2003, van den Hoogen et al. 2003).

Basierend auf Sequenzanalysen zeigte sich eine erhebliche Homologie des hMPV-Genoms mit dem des RSV. Allerdings fehlen Gene für die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2, die bei der Interferonantwort des Wirtes eine Rolle spielen (van den Hoogen et al. 2001). Die Auswirkungen dieses Fehlens sind Bestandteil aktueller Forschungen. Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen, negativ orientierten Ribonukleinsäure (RNS) mit einer Länge von ca. 13 Kilobasen (kb). Acht Gensequenzen kodieren für Proteine folgender Reihenfolge: 3-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5. Auf die Funktion dieser Proteine wird zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen.

Basierend auf der soliden Datenlage lassen sich bereits zwei Genotypen (A und B) des hMPV mit jeweils zwei Untergruppen (A₁, A₂ und B₁, B₂) definieren, die lediglich Unterschiede in der Sequenz, nicht jedoch in der induzierten Antikörperproduktion [Skiadopouls et al. 2004 (im Tierversuch)] oder in der Schwere der klinischen Symptomatik aufweisen (Leung et al. 2005). Peltier et al. (2002) und Wolf et al. (2003) zeigten hingegen, dass auch mehrfache Infektionen mit den unterschiedlichen Subtypen des hMPV möglich seien. Auch besteht weder eine saisonale noch eine örtliche Gebundenheit an spezifische Subtypen (Boivin et al. 2002, Mackay et al. 2004, Peret et al. 2002, Viazov et al. 2003). Eine Einteilung der Genotypen ist anhand der übereinstimmenden Aminosäurereste der einzelnen Proteine möglich: N-Protein: 96%, Phosphoprotein (P-Protein): 85%, Membranprotein (M-Protein): 97%, F-Protein: 95%, M2-1-Protein: 96%, M2-2-

Protein: 89%, SH-Protein: 59%, Glykoprotein (G-Protein): 37% und L-Protein: 94% (Biacchesi et al. 2004). Sowohl die Morphologie der Viruspartikel als auch die Replikationsmechanismen sind innerhalb der Familie der Paramyxoviren sehr ähnlich und sollen deshalb in den folgenden Abschnitten in ihrer Gesamtheit erläutert werden. Jedoch besitzt das hMPV im Gegensatz zu den restlichen Paramyxoviren keine hämagglutinierende Funktion (van den Hoogen et al. 2001).

Therapeutisch zeigte die Gruppe um Wyde, dass bei der Behandlung mit Ribavirin, das bei schweren Infektionen mit dem RSV eingesetzt wird, und mit polyklonalem, humanem Immunglobulin gegen das RSV ein inhibierender Effekt auch gegen das hMPV *in vitro* erzielt werden kann (Wyde et al. 2003). Zudem ist es gelungen, basierend auf dem F-Protein, ein rekombinantes chimeric bovine/human PIV Vakzin herzustellen, das sich protektiv gegen das hMPV bei Hamstern auswirkt (Tang et al. 2003). Darüber hinaus wurde durch das Ausschalten des M2-1-Proteins eine Antikörperproduktion angeregt, ohne jedoch eine klinische Symptomatik zu entfachen (Buchholz et al. 2005). Trotz dieser beträchtlichen Fortschritte ist der Weg auf diesem Sektor jedoch noch weitgehend unbetreten und bedarf der weiteren Erforschung.

2.2 Aufbau des Viruspartikels der Paramyxoviren

Der Durchmesser eines pleomorphen Viruspartikels beträgt 150-250nm. Die einzelsträngige, nicht segmentierte Negativ-RNS kodiert für sechs Strukturproteine: N-Protein, L-Protein, P-Protein, M-Protein, Hämagglutinin-Neuraminidaseprotein (HN-Protein) und F-Protein.

N, P und L bilden mit dem RNS-Strang einen von einer Membranhülle umgebenen Nukleoproteinkomplex helikaler Anordnung. Aufgrund der enzymatischen RNS-Polymeraseaktivität des L-Proteins in Assoziation mit dem P-Protein bildet es den replikativen Ribonukleoproteinkomplex (Blumberg et al. 1981). Das F-Protein, bestehend aus dem F₁- und dem F₂-Anteil, ist für die Membranfusion zuständig. Avulavirus und Rubulavirus besitzen Neuraminidaseaktivität und sind zur Hämagglutination fähig. Mittels dieser Proteine wird die Adsorption des Viruspartikels an die Zielzellen erreicht. Das H-Protein ist bei den Morbilliviren für die Adsorption und Hämagglutination zuständig. Dem hMPV fehlt sowohl die Neuraminidase als auch die Eigenschaft Erythrozyten zu agglutinieren. Die Adsorption an die Zielzellen wird durch ein G-Protein erreicht (MG: 84-90kD). Auf der Innenseite der Hüllmembran liegt das Matrix-Protein, das reich an basischen Aminosäuren und mit dem N-Protein assoziiert ist. Es ist für die Initiation des Assembly verantwortlich. Das Molekulargewicht des N-Proteins beträgt 29kD bei den Pneumoviren und bis zu 40kD beim Parainfluenzavirus (Blumberg et al. 1981).

2.3 Genomaufbau von Paramyxoviren

Die Paramyxoviren gehören zur Gruppe der RNS-Viren. Die RNS ist einzelsträngig und besitzt eine Negativorientierung. Sie kann nicht als Messenger-RNS (mRNS) fungieren und ist nicht infektiös. Innerhalb der Paramyxoviren besitzt das Masernvirus das längste Genom mit einer Länge von ca. 15900 Nukleotiden, gefolgt vom Parainfluenzavirus Typ 3 mit ca. 15500 Nukleotiden, dem Mumpsvirus mit 15384 und dem RSV mit 15222 Nukleotiden. Die Genomgröße des hMPV beträgt ca. 13400 Nukleotide (van den Hoogen et al. 2001). Die Genome der tierpathogenen Paramyxoviren sind im Schnitt wesentlich länger und liegen z.B. zwischen 15690 Nukleotiden beim Hundestaupevirus und ca. 18300 Nukleotiden bei den Nipahviren.

Das Nukleokapsid hat einen Durchmesser von 14-17nm und ist helikal gewunden. Das N-Protein ist in regelmäßigen Abständen mit der RNS assoziiert und fördert zum einen die für die Verpackung in die Viruspartikel nötige Flexibilität, zum anderen schützt es vor der enzymatischen Wirkung von Nukleasen. Weiterhin ist es in Wechselwirkung mit den P- und L-Proteinen für eine erfolgreiche Transkription verantwortlich.

Am 3'-Ende sowie am 5'-Ende befinden sich kurze Basensequenzen (40-54 Basen), die zum Teil lediglich transkribiert, jedoch nicht in Aminosäuren translatiert (Leader am 3'-Ende, Trailer am 5'-Ende) werden. Am 5'-Ende stellen diese Sequenzen Initialisierungseinheiten für den Start der Polymerasereaktion und der Bildung und Verpackung des Viruspartikels dar. In den Leader- und Trailer-Bereichen liegen Sequenzen, die für die Ausbildung der Sekundärstruktur der RNS verantwortlich sind. Zwischen den verschiedenen Genen befinden sich intergenische Nukleotide, deren Zusammenstellung Virus-spezifisch ist. Durch bestimmte Sequenzfolgen an den Start- und Endpunkten der intergenischen Sequenzen wird eine geordnete Transkription der Genomabschnitte gewährleistet. In 3' → 5'-Richtung findet sich bei den Paramyxoviren eine regelmäßige Abfolge der einzelnen Gene (N-P-M-F-H/HN-L). Bei den Pneumoviren hingegen sind die Bereiche der HN- und H-Proteine durch ein M2-1-Protein ersetzt (N-P-M-F-M2-1/M2-2-SH-G-L) (Stricker et al. 1994). Dieses Protein kann vor allem in der Matrixproteinschicht nachgewiesen werden (Biacchesi et al. 2003, Buchholz et al. 2005, van den Hoogen et al. 2002). Die Funktion des M2-2-Proteins ist bisher noch ungeklärt. Die kodierende Sequenz des G-Proteins ist zwischen den RNS-Sequenzen, die für das M- und F-Protein kodieren, lokalisiert. Am 3'-Ende befinden sich kodierende Bereiche für zwei Nichtstrukturproteine (NS2/NS1), deren genauere Funktionen

noch unklar sind, sowie ein SH-Gen zwischen den M- und G-Genen (Pneumoviren und Mumpsvirus).

Der Aufbau des hMPV-Genoms ist dahingehend unterschiedlich, dass sich die kodierende Sequenz des G-Proteins direkt vor dem L- und hinter den M2- und SH-Leserahmen befindet (Ludewick et al. 2005). Die kodierende Sequenz für das F-Protein ist ähnlich wie bei den anderen Genera der Paramyxoviren hinter den N-, P- und M-Proteinen positioniert. Weiterhin finden sich neben den beschriebenen Genen durch Editierung oder Kombination weitere Gene (z.B. C, Y1, Y2, X, V, W, D und I), die für Struktur- und Nichtstrukturproteine kodieren.

2.4 Strukturproteine

Zur Gruppe der Strukturproteine gehören HN, H, G und F, die in den Membranen der unterschiedlichen Vertreter der Paramyxoviren verankert sind. Sie übernehmen Aufgaben der Adsorption des Viruspartikels an die Zielzellen, sowie Erkennung, Transport und Verankerung des Translationskomplexes innerhalb des Zellmilieus. Erreicht wird dies durch hydrophobe Aminosäuresequenzen am N-terminalen Ende, die im endoplasmatischen Retikulum glykosyliert wurden und sich dann als Oligomere (vermutlich Tetramere) zusammenlagern.

Das für die Respiro- und Rubulaviren typische HN-Protein besitzt Neuraminidaseaktivität (Merz et al. 1981), aufgrund dieser eine effiziente Ausbreitung des Virus durch Zerstörung von Bindungsrezeptoren der Zelloberfläche und damit einer unnötigen Reinfektion der schon befallenen Zelle erreicht wird. Die Morbilliviren besitzen mit dem H-Protein keine Neuraminidaseaktivität, jedoch weisen HN- und H-Proteine ähnliche Sequenzen und Bindungsstellen auf (Merz et al. 1981). Dies lässt auf die funktionelle und genetische Verwandtschaft dieser beiden Genera schließen. Das F-Protein ist ein Heterodimer, dessen Komplex aus den beiden Teilen F1 und F2 besteht und aus dem Vorläuferpolypeptid F0 gebildet wird. Nach der Modifizierung des Translationsproduktes im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat kommt es zur Verankerung des F0-Proteins über hydrophobe Anteile in die Membran. Über Disulfidbrücken ist der in der Membran verankerte F1- mit dem F2-Teil verbunden. Mit Hilfe des F1-Teiles ist bei der Infektion und Adsorption eine Verschmelzung des Virions mit der Zielzelle möglich (Leung et al. 2005, Sikadopolus et al. 2004).

Das an der Innenseite der Membran liegende M-Protein ist in Wechselwirkung mit dem N-Protein für die Bildung und Umhüllung des Viruspartikels und der RNS verantwortlich.

Zu den drei viralen Proteinen, die mit der RNS komplexiert sind, gehören das N-, P- und L- Protein, die untereinander und mit weiteren Proteinen interagieren und damit am Transkriptionsvorgang und der Bildung der Nukleokapside entscheidend beteiligt sind. Bei der Untersuchung des Gens für das G-Protein des hMPV fiel auf, dass es in seiner Nukleotidsequenz sehr variabel ist. Dadurch entstehen Proteine unterschiedlicher Länge, deren Funktion jedoch noch weitgehend unbekannt ist (Bastien et al. 2004, Ishiguro et al. 2004, Peres et al. 2004, van den Hoogen et al. 2004).

2.5 Nichtstrukturproteine

Bei den Nichtstrukturproteinen handelt es sich bei einigen Paramyxoviren wie z.B. dem Mumpsvirus sowie den Pneumo- und Metapneumoviren um Proteine mit hydrophoben Eigenschaften. Sie zeigen Eigenschaften, die denen der membranassoziierten Proteinen sehr ähnlich sind. Die Funktion, die sie bei der Replikation oder der Infektion der Zellen spielen, ist bisher noch weitgehend unbekannt. So ist bislang weder ihre Identifikation als definierter Baustein des Virions noch der Nachweis einer Expression in infizierten Zellen möglich (Curran et al. 1992).

2.6 Replikation

Jeder Replikation geht die Infektion der Zielzelle und damit die Adsorption des Virions voraus. Diese wird bei den Paramyxoviren über die beschriebenen Strukturproteine HN, H und das G-Protein vermittelt. Hierbei kommt es zur Bindung an neuraminsäurehaltige Rezeptoren und an andere Komponenten wie z.B. CD46-Protein (Buchholz et al. 1997), Glykolipide oder spezifische Membranproteinsequenzen der Zielzellen. Die Fusion der Virion-Hülle mit der Plasmamembran der Zielzelle wird durch das F-Protein vermittelt, das ein Eindringen des Nukleokapsids in das Zytoplasma ermöglicht. Anschließend findet das sogenannte „uncoating“, also die Freisetzung der viralen RNS und viraler Proteine, statt. Die genomische Virus-RNS besitzt negative Polarität, d.h. sie kann nicht unmittelbar als mRNA fungieren. Daher muss für die Proteinsynthese zunächst die negativ-RNS in positiv-RNS transkribiert werden. Die Transkription wird durch einen Komplex der viralen N-, P-, L-Proteine durchgeführt (Horikami et al. 1992). Sie sind für den Ablauf einer geordneten Transkription elementar. Die Transkription beginnt mit dem L-Protein als Polymerase am 3'-Ende im Bereich der Leader-Sequenz des N-Gens. Es kommt zur Polymerisation bis zum Ende des Gens. Die zwischen den Genen liegenden intergenischen Basen werden übersprungen und es kommt zum erneuten Start der Polymerisation an der folgenden Gensequenz, bis

schließlich sechs differente mRNS-Spezies vorliegen (N, P, F, HN/H/G und L). Etwa zwei bis vier Stunden nach Beginn der ersten Transkription sind virale Proteine in der betroffenen Zelle nachzuweisen. Die Mengenverhältnisse der Proteine sind, fußend auf dem ständigen Wechsel zwischen Beginn der Polymerisation, Unterbrechung und Neustart, zu Gunsten der ersteren Polymerisationsprodukte verschoben. Zur Synthese vollständiger RNS-Genome ist jedoch eine kontinuierliche Ablesung der Sequenzen unerlässlich. Diese ist wiederum nur ab einer bestimmten Menge von N-Protein möglich, die eine Unterbrechung an den intergenischen Basen verhindert (Antitermination) und somit ein durchgehendes, mit dem N-Protein komplexiertes RNS-Molekül (Antigenom) bildet. Wechselwirkungen zwischen dem N-, P- und dem L-Protein fördern diesen Vorgang (Eisberger et al. 1990, Horikami et al. 1992). Im Zytoplasma dienen die Antigenome als Matrizen der neuen Virusgenome, während gleichzeitig die Translation der restlichen viralen Proteine erfolgt (HN/H-, G-, F₀-, M-Proteine). Nach im Golgi-Apparat durchgeführter Glycosylierung erfolgt der Transport an den jeweiligen Bestimmungsort (Zelloberfläche, innere Zytoplasmamembran etc.). Durch Interaktion der neu gebildeten viralen Proteine mit der Zytoplasmamembran und des komplexierten RNS-Produktes kommt es zur lokalisierten Ausstülpung der Membran und zur Bildung eines neuen Viruspartikels (Blumberg et al. 1981, Heikkinen et al. 1999).

2.7 Humanpathogene Paramyxoviren

2.7.1 Die Parainfluenzaviren

Die Gruppe der humanen Parainfluenzaviren lässt sich mittlerweile in vier Typen unterteilen, deren Verbreitung ubiquitär ist. Das Hauptpatientenkollektiv sind vor allem Säuglinge und Kleinkinder, die durch eine Tröpfcheninfektion bzw. durch den direkten Kontakt mit einer schon infizierten Person infiziert werden. Die Typen 1 bis 3 verursachen vor allem Infektionen der oberen Atemwege und sind als Ursache des Pseudokrupsps zu nennen (Channock et al. 2001). Übergänge in eine Bronchitis oder Bronchiolitis sind selten. Ab einem Alter von 5 Jahren ist die Durchseuchungsrate sehr hoch, das heißt, dass fast jeder Patient in diesem Alter schon einmal mit einem humanen Parainfluenzavirus Kontakt hatte. Reinfektionen sind möglich, haben allerdings eine wesentlich abgeschwächte klinische Symptomatik. Schwere Verläufe werden vor allem bei Säuglingen bei der Infektion mit Typ 3 beobachtet. Typ 4 manifestiert sich hauptsächlich im Bereich der oberen Luftwege bei Kindern und jungen Erwachsenen (Channock et al. 2001). Eine Ausscheidung ist vom Patienten auch nach der Infektion über mehrere Monate möglich. Klinik

und Pathogenese entsprechen den in der Einleitung Beschriebenen. Die Symptomatik des Pseudokrups kommt durch eine Schwellung der Kehlkopfschleimhaut zustande und tritt bevorzugt im Anschluss an eine Parainfluenzainfektion auf. Pathophysiologisch kann im Gewebe eine erhöhte Konzentration an Histamin und IgE-Antikörpern nachgewiesen werden, was die gesteigerte Prädisposition für Erkrankungen aus dem asthmatischen Formenkreis erklären könnte.

Im Verlauf der Infektion kommt es, basierend auf der Entzündungsreaktion, zu einer IgM-, IgA- und IgG-Produktion gegen spezifische Strukturproteine der viralen HN- und F-Oberflächenantigene. Die neutralisierende Wirkung führt zu einer Hemmung der Adsorption sowie der Fusion. Schutz vor Reinfektionen bietet im Erwachsenenalter das sekretorische IgA der Schleimhäute. Epitope der F- und N-Proteine führen zu Stimulation, Vermehrung und zytotoxischer Wirkung virusspezifischer T-Zellen.

Diagnostiziert wird eine Parainfluenza-Infektion durch Anzüchtung der Viren aus Sputumproben oder Rachenspülwassern in Zellkultur (LLC-MK2). Auch ist ein direkter Nachweis von Virusnukleinsäuren mittels RT-PCR möglich. Post infectionem ist auch ein ELISA, ein Hämagglutinationshemmtest oder ein Komplementbindungstest zum Nachweis von Antikörpern möglich (Brandis et al. 1994, Lamp et al. 2001).

2.7.2 Das Mumpsvirus

Im Erwachsenenalter kann bei ca. 90% der Bevölkerung ein positiver Antikörpernachweis für das weltweit vorkommende Mumpsvirus geführt werden. Auch hier ist die Tröpfchenübertragung der Hauptinfektionsweg. Von jedem Infizierten ist bis zu 7 Tage vor und bis zu 9 Tage nach dem Auftreten der ersten Symptome eine Ansteckungsgefahr zu erwarten. Die Erreger werden während der Virämie über den Speichel aber auch über den Urin ausgeschieden. Epidemische Formen treten im Schnitt alle 2-7 Jahre bevorzugt in den Wintermonaten und im Frühjahr auf.

Nach einem unspezifischen Prodromalstadium imponiert bei 95% eine Schwellung einer und bei 75% der Fälle nach 1-2 Tagen beider Ohrspeicheldrüsen (anzumerken ist, dass auch andere Speicheldrüsen mit oder alleine betroffen sein können). Die betroffenen Kinder entwickeln Fieber um 38°C, können aber auch völlig asymptomatisch sein.

Häufigste Komplikation ist eine blande verlaufende seröse Meningitis (Donohue et al. 1955, Kilham et al. 1949). Meningoenzephalitiden, eine Beteiligung des Nervus statoacusticus mit daraus entstehender Taubheit, der Befall anderer drüsiger Organe (Pankreas, Thymus Thyreoidea), eine Orchitis mit Epididymitis bei Männern (Beard et al. 1977) bzw. eine Oophoritis/Adnexitis bei

Frauen mit der Gefahr einer vorzeitigen Menopause (Morrison et al. 1975) stellen weitere Komplikationen dar. Die Fähigkeit des Mumpsvirus, die Blut-Liquor-Schranke zu überwinden, ist im Rahmen der Pathogenese des in dieser Arbeit besprochenen hMPV ein interessanter Aspekt.

Nach dem Eindringen des Virus und der Vermehrung in den Epithelzellen kommt es zur Infektion der dort angesiedelten Lymphozyten (Fleischer et al. 1982) und damit über eine weitere Vermehrung in den lokalen Lymphknoten zur systemischen Infektion (Kilham et al. 1948).

Nach einer Infektion mit dem Mumpsvirus – unabhängig davon, ob der klinische Verlauf symptomatisch oder asymptomatisch war – wird eine lebenslange Immunität hinterlassen. Auch bei dieser Infektion werden IgM, IgA und IgG gebildet, die mittels ELISA, Hämagglutinationshemmtest oder Komplementbindungsreaktion nachgewiesen werden können. Es werden Antikörper gegen NP-Protein, F- und HN-Protein gebildet, die den jeweiligen Infektionsverlauf anzeigen. Prophylaktisch ist eine Impfung mit einem attenuierten Virusstamm möglich (Afzal et al. 1993), welche gemeinsam mit der Impfung gegen Masern und Röteln durchgeführt wird.

2.7.3 Das Masernvirus

Das Masernvirus zeigt eine weltweite Verbreitung und einen sehr hohen Kontagiositäts- und Manifestationsindex. Es ist ausschließlich humanpathogen und wird durch Tröpfcheninfektion über den Nasen-Rachenraum, den direkten Kontakt, aber auch über die Bindehäute der Augen übertragen.

Nach einer Inkubationszeit von 8-11 Tagen kommt es im Prodromalstadium zu katarrhalischen Symptomen (Schnupfen, Husten Bindehautentzündung und Fieber). In bis zu 70% der Fälle bilden sich am 2.-3. Tag die spezifischen Koplik-Flecken an den Schleimhäuten. Begleitet wird das Ganze von einem Enanthem des weichen Gaumens. Nach 3-5 Tagen tritt ein großfleckiges, konfluierendes Exanthem auf, das sich von retroaurikulär absteigend über den Rumpf bis hin zu den Extremitäten ausbreitet. Die Fieberkurve gestaltet sich zweigipflig bis 40°C. Die beschriebene Symptomatik erstreckt sich über einen Zeitraum von ca. 10 Tagen (Bellini, Rota 1994, Panum et al. 1938). Infektiosität besteht 4-5 Tage vor Ausbruch und bis zu 4 Tage nach Beginn des Exanthems (Bloch et al. 1985).

Mögliche Komplikationen liegen im Bereich der unteren und oberen Atemwege, Riesenzellpneumonie, Bronchopneumonie Laryngotracheobronchitis (Arya et al. 1987, Gremillion et al. 1981, Ross et al. 1992), Otitis media (Yano et al. 2005), Diarrhoe oder eine Enzephalitis (akute/postinfektiöse Enzephalitis, measles inclusion body encephalitis (MIBE), subakute sklerosie-

rende Panenzephalitis (SSPE). Infektionen, die im Erwachsenenalter auftreten, verlaufen wesentlich komplikationsreicher und zum Teil tödlich (Zhou et al. 1991). Die akute/postinfektiöse Enzephalitis (Autoimmunenkephalitis) hat eine Häufigkeit von 1:1000/2000 und tritt vor allem bei Kindern über 2 Jahren auf. Neben dem typischen Exanthem kommt es hierbei zu einer Entmarkung der Myelinscheiden. Der Nachweis des Virus im Gehirngewebe ist aber nicht gegeben. Die akute/progressive Enzephalitis tritt nur bei immundefizienten Patienten auf und verläuft immer tödlich. Hierbei ist der Nachweis des Masernvirus im Gehirn möglich. Dawson beschrieb 1933 die SSPE. Diese tritt mit einer Häufigkeit von 1:100000 6-15 (7-10) Jahre nach einer primären Maserninfektion auf. Männliche Patienten und solche, die eine Maserninfektion bis zum 2. Lebensjahr hatten, sind bevorzugt betroffen (Nagano et al. 1991). In bis zu 50% der Fälle sind bei einer Masernenzephalitis Elektroenzephalogramm-Veränderungen zu erkennen (Gibbs et al. 1995)

Wie schon in der Einleitung beschrieben kommt es primär bei der Masernvirus-Infektion zu einer Infektion der Schleimhäute der oberen Atemwege und sekundär zu einer deszendierenden Ausbreitung in die tieferen Abschnitte des Bronchialbaumes (Sakaguchi et al. 1986). Auch hier kommt es zu einem Befall über spezifische zelluläre Rezeptoren der Endzellen der lymphatischen und myeloischen Reihe zur systemischen Infektion (Kamahora et al. 1961). Für die Eliminierung des Virus sind vor allem zytotoxische T-Lymphozyten zuständig. Eine Persistenz des Virus nach einer abgelaufenen Infektion scheint aber möglich zu sein (Rima, Duprex 2005).

Mit Beginn des Exanthems lassen sich IgM- und IgG-Antikörper gegen F-, H- und N-Proteine nachweisen. Die IgG-Antikörper gegen H- und F-Proteine vermitteln die lebenslange Immunität. Das Masernvirus lässt sich auf vielen Zelllinien anzüchten, z.B. auf Vero-Zellen, LLC-MK2 etc. Eine aktive Immunisierung, mit einem attenuierten Lebendimpfstoff, sowie eine passive Immunisierung mit Immunglobulinen sind prophylaktisch möglich.

2.7.4 Das Respiratorische Synzytialvirus (RSV)

Das RSV ist ein hochkontagiöses Virus, das sich durch den direkten Kontakt mit Infizierten oder durch Tröpfcheninfektion verbreitet. Bis zu einem Alter von 4 Jahren ist schon eine Durchseuchung von bis zu 80% erreicht. Die Herbst- und Wintermonate stellen den Hauptinfektionszeitraum dar, in dem vor allem Säuglinge im Alter zwischen 6 Wochen und 12 Monaten potentiell am gefährdetsten sind (Holberg et al. 1991, Stockton et al. 1998). Nach einer Inkubationszeit von 4-5 Tagen (Johnson et al. 1961, Kapikian et al. 1961) kann es von leichten katarrhalischen Sym-

ptomen bis hin zu schwerer Orthopnoe und Zyanose (Bronchiolitis) kommen. Superinfektionen im Sinne einer zusätzlichen bakteriellen Pneumonie oder Otitis media sind häufig (Heikinnen et al. 1999, Simon, Khurana 2003). Nach dem Eindringen und der Vermehrung des RSV im Epithel der Schleimhäute kommt es zum einen über Aspiration, zum anderen über ein kontinuierliches Ausbreiten des Virus bis hin zu den Alveolen zu einer Synzytienbildung, bei der das Alveolarepithel zerstört wird (Gardner et al. 1970). Durch das entstehende Schleimhautödem und nekrotische Zellen bilden sich Stenosen zum Teil mit Ventilfunktion, welche zu einer Überblähung des Thorax, Dyspnoe und Zyanose führen (Collins et al. 2001). Schwerste Verläufe mit tödlichem Ausgang sind vor allem in den ersten 6 Monaten zu erwarten. Es ist davon auszugehen, dass der hier noch bestehende Nestschutz ein Trigger für die Infektion darstellt (Ananaba, Anderson 1991, McIntosh et al. 1980).

Der indirekte Nachweis einer RSV-Infektion gelingt über einen Komplementbindungs- oder einen ELISA-Test, bei deren Verfahren Immunglobuline vom IgA-, IgG-, und IgM-Typ nachgewiesen werden. Antikörper gegen G- und F-Proteine wirken neutralisierend und verhindern eine virale Reinfektion. Bei Risikopatienten (z.B. Frühgeborene) ist eine passive Immunisierung mit Palivizumab möglich. Zurzeit befindet sich ein Antikörper (MEDI-524) noch in der Testphase (Venkatesh, Weisman 2006). Therapeutisch besteht neben der symptomatischen Therapie (Sauerstoffvorlage, Antipyrese) die Möglichkeit der Gabe von Ribavirin. Die dazu bestehende Datenlage über die Wirksamkeit dieser Therapie ist aber noch nicht ausreichend (Ventre, Randolph 2004).

2.7.5 Andere respiratorische Viren

Der „banale“ respiratorische Infekt ist durch eine Vielzahl von Viren bedingt, deren Erforschung und Entdeckung noch lange nicht abgeschlossen ist. Die prozentuale Verteilung der respiratorischen Viren ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie Alter und Jahreszeit. Rhinoviren sind mit einem Anteil von 30-50% die am häufigsten nachgewiesenen viralen Erreger bei Patienten mit Infekt der oberen Atemwege. In den Herbstmonaten ist sogar eine Steigerung auf bis zu 80% möglich (Arruda et al. 1997). Bislang sind mehr als 100 Serotypen identifiziert, die eine große geographische Variabilität zeigen (Monto et al. 1987). Mit 10-15% verursachen bei Erwachsenen vor allem Coronaviren Infektionen des oberen Respirationstraktes (Nicholson et al. 1997). Die Infektion mit den Influenzaviren beträgt 5-15%, Infektionen mit dem RSV und den Parainfluenzaviren machen jeweils bis zu 5% der respiratorischen Infekte aus. Adenoviren und Enteroviren

liegen beide unter 5% (Monto et al. 1987). Sämtliche der genannten Viren können die in der Einleitung beschriebene Symptomatik hervorzurufen. Dennoch sind Manifestation und Verlauf im Speziellen unterschiedlich und für das entsprechende Virus typisch (Heikkinen, Järvinen 2003). Anzumerken ist, dass 20-30% der viralen Auslöser eines Infektes der oberen Atemwege noch nicht identifiziert sind. Es ist jedoch anzunehmen, dass sich in baldiger Zukunft auf dem Sektor der Nachweismethoden, Probengewinnung und deren Aufbereitung und damit bei der Entdeckung neuer respiratorischer viraler Erreger das bestehende Potential noch weiter ausschöpfen lässt.

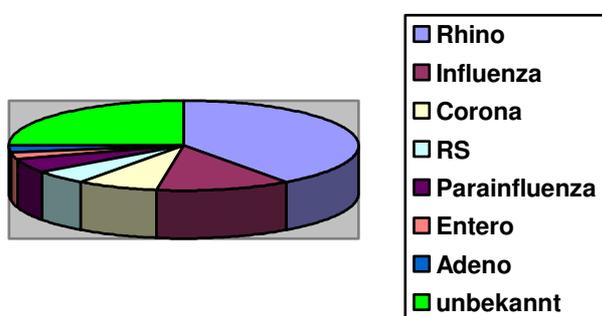


Abbildung (Abb.) 1: Prozentuale Verteilung respiratorischer Viren im Kindesalter

2.8 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, anhand verschiedener Patienten-Kohorten retrospektive Untersuchungen zur Häufigkeit des Auftretens von hMPV, primär im klinischen Einzugsgebiet Bonn, zu erörtern. Hierzu sollte ein sensitives und für die tägliche Routine praktikables Verfahren zur Gewinnung, Aufbereitung, Aufbewahrung und vor allem zum Nachweis von hMPV-RNS aus verschiedenen Probenmaterialien (Rachenspülwassern, Rachenabstrichen und unterschiedlichen Geweben) eingeführt, optimiert und etabliert werden (Dissertation Glatzel 2008), so dass eine schnelle Identifizierung von hMPV-RNS in der täglichen klinischen Arbeit ermöglicht wird. Die amplifizierten hMPV-Sequenzen sollten anschließend kloniert und sequenziert und mit den bekannten hMPV-Sequenzen verglichen werden. Dabei wurde angestrebt potenziell bestehende lokale Subtypen zu identifizieren. Zudem war es Ziel eine kulturelle Anzüchtung des Virus auf verschiedenen Zelllinien durchzuführen. Die anhand dieser Ergebnisse gewonnenen Daten sollten der klinischen Symptomatik der Patienten gegenübergestellt und ein differenziertes Symptom-

spektrum angefertigt werden. Eventuelle Auffälligkeiten bei Patienten mit einer hMPV-Infektion und der bestehenden Klinik sollten weiter analysiert und mögliche Korrelationen zwischen hMPV und häufig im Kindesalter vorkommenden Erkrankungen im Einzelfall weiter verfolgt und diskutiert werden. Diese Ergebnisse sollten dann unter der Berücksichtigung des bisher bekannten Erregerspektrums für die jeweilige Erkrankung erörtert werden. Die Möglichkeiten hinsichtlich Diagnose und Therapie sollten diskutiert werden.

Die in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen sollen helfen, die Bedeutung einer hMPV-Infektion im klinisch-pädiatrischen Alltag aufzuklären.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Brutschränke:	CO ₂ -begaster Brutschrank, Firma (Fa.) Heraeus, Düsseldorf Inkubator C200, Labotect, Meckenheim
Elektrophoresekammern:	Model B1, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen Model 41-1825, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Schüttler:	Certomat S, Sartorius BBI Systems InteRNStional GmbH Rocking Platform, Biometra GmbH, Göttingen
Sequenzierer:	3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Darmstadt
Spannungsgeräte:	Power Supply Model 500/200, Bio-Rad Laboratories, München Power Supply Model 250/2,5, Bio-Rad Laboratories, München
Sterilbänke:	Herasafe, Heraeus Instruments, Hanau STERIL-ANTARES, Biohit Deutschland GmbH, Rosbach
Thermocycler:	Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg T3 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen
Vortexer:	Vortex-Genie2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Waage:	PM 1200, Mettler, Toledo, USA
Wasserbad:	GFL 1038, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifugen:	Biofuge 13, Heraeus Instruments, Hanau Centrifuge 5415 C/5417 C, Eppendorf AG, Hamburg Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau MULTIFUGE L-R, Heraeus Instruments, Hanau TDX Centrifuge TM, Abbott Diagnostica, Wiesbaden UJ II KS, Heraeus Instruments, Hanau

3.1.2 Chemikalien

Agarose	SeaPlaque GTG Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc.; Biozym Seakem LE Agarose, Biozym, Oldendorf NuSieve GTG Agarose, Biozym, Oldendorf
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit, USA

Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Eagle's-Minimal Essential Medium	Biochrom AG, Berlin
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin

3.1.3 Desoxyribonukleinsäure (DNS) – Längenstandard

1Kb Plus DNS-Marker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNS Molecular Weight Marker VIII	Boehringer, Mannheim

3.1.4 Reagenziensysteme

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City USA
HiSpeed Midi	Qiagen GmbH, Hilden
HiSpeed Maxi	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick-PCR-Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, GmbH Hilden
Topo-TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.1.5 Nährmedien

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium):

Um 0,5l LB-Medium herzustellen wurden 2,5g Bacto Yeast-Extract, 5g Bacto-Trypton sowie 2,5g NaCl in 0,5l destilliertem Wasser gelöst. Es folgte eine 20-minütige Autoklavierung bevor

das Medium bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden konnte. Fünfzig Mikrogramm Ampicillin wurde vor Animpfung der Bakterienkultur in 0,5l LB-Medium hinzugegeben.

LB-Agarplatten mit Ampicillin:

Die Herstellung von LB-Agarplatten erfolgte aus LB-Medium unter zusätzlicher Verwendung von 6,25g Bacto-Agar, die 0,5l LB-Medium hinzugefügt wurden. Nach 20-minütiger Autoklavierzeit bei einer Temperatur von 121°C, dem Abkühlen des Mediums und der Zugabe von 50µg Ampicillin wurden jeweils 20-30ml des Mediums in Petrischalen gegossen (Durchmesser (Ø): 10cm). Diese wurden bis zum Gebrauch bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.1.6 Enzyme

Restriktionsenzyme:

EcoRI New England Biolabs, Schwalbach

DNS-Polymerase:

Thermus aquaticus DNS Polymerase Roche Applied Science, Mannheim

Thermus aquaticus DNS Polymerase Qiagen GmbH, Hilden

Reverse Transkriptase:

Omniskript, Sensiskript Reverse Transkriptase Qiagen GmbH, Hilden

3.1.7 Nukleotide

Desoxyadenosintriphosphat (dATP) (25 nM) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Desoxythymidintriphosphat (dTTP) (25 nM) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Desoxycytosintriphosphat (dCTP) (25 nM) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) (25 nM) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3.1.8 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) synthetisiert. Die Lagerung erfolgte in einer Konzentration von 25pmol/µl, gelöst in RNase-freiem Wasser. Diese Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.

3.1.9 Proben

3.1.9.1 Rachenspülwasser im Zeitraum 01.10.2001 – 31.03.2004 $n_{ges.} = 637$

01.10.2001 – 30.09.2002	n = 5
01.10.2002 – 31.03.2003	n = 300
01.10.2003 – 31.03.2004	n = 332

3.1.9.2 Rachenabstriche

Rachenabstriche von Patienten bei denen klinisch eine akute Otitis media (AOM) vorlag (Praxis Dr. Nick, Dr. Schuster, Dr. Ahl, Darmstadt).

Zeitraum

01.11.2003 – 31.03.2004	n = 104
-------------------------	---------

3.1.9.3 Gewebeprobe der Lunge und des Gehirns

Gewebeprobe 1	Gehirn
Gewebeprobe 2	Lunge

3.1.10 Schnellteste

RSV-Schnelltest (RSV-ST)	RSV Test Kit, Directigen, Sparks, USA
Influenza-Schnelltest (Influenza-ST)	Flu A+B Test Kit, Directigen, Sparks, USA

3.1.11 Zellkulturen

Vero-Zellen
 LLC-MK2-Zellen
 MS-Zellen
 MDCK-Zellen
 RD-Zellen
 HEF-Zellen

3.1.12 Stammlösungen

Ampicillin	50 mg/ml (H ₂ O)
Ethidiumbromid	10 mg/ml

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung verschiedener Zelllinien

Alle frisch eingetroffenen Proben wurden im Rahmen der täglichen Routine auf verschiedene Zelllinien ausgeimpft, welche dann und auf virusspezifische CPE untersucht wurden. Von den Zellkulturüberständen wurde spätestens nach 3 Wochen eine hMPV-PCR durchgeführt.

Material:

EMEM-Earle (Biochrom AG, Berlin)

Fötales Kälberserum (Biochrom, Berlin)

Die in der Routine verwendeten Zellen wurden in 75cm²-Gewebekulturflaschen mit Schraubverschluss angezüchtet. Diese wurden bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5%-CO₂ bebrütet. EMEM wurde unter dem Zusatz von 10% Kälberserum, L-Glutamin und Streptomycin/Penicillin G als Kulturmedium verwendet.

Um Zellen zu passagieren wurde das in den Kulturflaschen befindliche Medium abgegossen und die in der Flasche verbliebenen Zellen mit 10ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurde durch die Zugabe von 5ml Trypsin /EDTA und Inkubation im Brutschrank für 3 Minuten ein vollständiges Ablösen der Zellen vom Flaschenboden erreicht. Anzumerken ist, dass es sich bei Trypsin um ein zu den Proteasen gehörendes Enzym handelt. Es ist in der Lage, die Verbindungen der Zellen untereinander sowie die Zell-Matrix-Verbindungen zu spalten.

Die abgelösten Zellen wurden dann durch die Zugabe von 30-50ml EMEM (+10%-FKS) resuspendiert. Hiervon wurden anschließend 10ml in eine neue Flasche mit 30-50ml frischem Medium pipettiert und mit nicht vollständig zugedrehtem Deckel bei 37°C mit 5%-CO₂-Atmosphäre in den Brutschrank zurückgestellt, bis sich ein neuer konfluierender Zellrasen gebildet hatte.

Um eine Zellkultur zu beimpfen wurden 100µl der Probe in eine Zellkulturflasche (75cm²) gegeben und diese im Brutschrank mit geschlossenem Deckel bei 37°C bebrütet. Ein Mediumwechsel sowie optische Kontrollen und Dokumentation erfolgten alle 3 Tage. Wenn nach 3 Wochen kein hMPV-typischer CPE zu erkennen war und die hMPV-PCR negativ ausfiel, wurden die beimpften Zellkulturflaschen verworfen.

3.2.2 RNS Isolierung mit dem RNeasy Protect Kit

Die Isolierung der RNS aus den gesammelten Rachenspülwassern, Abstrichen und Gewebeproben erfolgte mit dem RNeasy Protect Kit (Qiagen). Um eine Stabilisierung der RNS zu erreichen wurden alle Proben entsprechend der Herstellerangaben mit RNAlater-Puffer versetzt. Hierdurch wurde eine Haltbarkeit der RNS in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur bis zu mehreren Jahren erreicht (Uhlenhaut et al. 2005).

Das Prinzip dieses Kits beruht darauf, dass die Proben mit einem Guanidin-Isothiocyanat-Puffer (GITC-Puffer) lysiert und homogenisiert sowie RNasen inaktiviert werden. Anschließend wird die RNS an eine Membran aus Silikagel gebunden, gewaschen und mit RNase-freiem Wasser eluiert. Auf diese Weise können RNS-Moleküle, die länger als 200 Nukleotide sind, sicher isoliert und angereichert werden. Kleinere RNS-Moleküle [5.8S (~160nt), 5S (~120nt), tRNAsen (~90nt)], die ca. 15-20% der gesamten RNS ausmachen, werden unter den genannten Bedingungen nicht quantitativ gebunden.

Die Vorgehensweise wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem Protokoll „Isolierung aus tierischen Geweben und Zellen“ durchgeführt, als Lysepuffer wurde RLT verwendet.

Material:

RNAlater-Puffer

RNeasy Filtersystem

Sammelröhrchen (1,5ml und 2,0ml)

RLT-Puffer

β -Mercaptoethanol (1 μ l β -Mercaptoethanol/1ml RLT Puffer)

RW1-Puffer

RPE-Puffer

96-100%-Ethanol (Mischungsverhältnis RPE-Puffer/Ethanol: 1 : 4)

70%-Ethanol

RNase-freies Wasser

Durchführung:

Vor Gebrauch des RLT-Puffers musste dieser mit β -Mercaptoethanol versetzt werden (1 μ l β -Mercaptoethanol/1ml RLT-Puffer). Bei der Vorbereitung des RPE-Puffers war das Mischungsverhältnis mit 96-100% Ethanol 1 : 4.

Das verwendete Probenvolumen betrug abhängig von der zur Verfügung stehenden Probenmenge 100 μ l oder 200 μ l. Die Probe wurde in einem 2ml-Sammelröhrchen mit 200 μ l RLT-Puffer

(GITC-enthaltender Puffer) versetzt und bei maximaler Geschwindigkeit (13.000rpm) in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette in ein neues Sammelröhrchen überführt und mit 400µl 70%-Ethanol mit Hilfe der Pipette vermischt. Anzumerken ist, dass Alkohol die selektive Bindung der RNS an das Silikagel fördert.

Anschließend wurden 700µl dieses Volumens in das RNeasy Filtersystem überführt und bei 10.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Hiernach erfolgte ein einmaliger Waschvorgang mit 700µl RW1-Puffer und 2 Mal mit 500µl RPE. Zwischen jedem dieser Schritte wurde 2min mit 10.000rpm zentrifugiert und der Durchfluss jeweils verworfen. Um ein möglichst sauberes Arbeiten zu gewährleisten wurde zwischen den Waschvorgängen mit Puffer RW1 und RPE das Sammelröhrchen gewechselt. Hiernach wurde zum Trocknen des Silikagels einmalig mit maximaler Geschwindigkeit für 1min zentrifugiert und danach das Filtersystem in ein 1,5ml-Sammelröhrchen gestellt. Zum Eluieren der RNS wurden anschließend 30µl RNase-freies Wasser auf das Filtersystem gegeben und bei 13000rpm für 1min zentrifugiert. Das gewonnene Eluat wurde direkt für die RT-PCR verwendet. Das restliche Eluat wurde bei -70°C bis nach erfolgreichem Abschluss der hMPV-PCR archiviert. Alle Vorgänge erfolgten unter Einhaltung der Herstellerangaben.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese 1983 von Mullis entwickelte Methode ermöglicht mittels einer enzymkatalysierten Reaktion die *in-vitro*-Vervielfältigung spezifischer DNS-Abschnitte innerhalb kurzer Zeit und mit hoher Kopienzahl. Bei der PCR handelt es sich um eine äußerst sensitive Methode zum Nachweis von DNS, da schon geringe Mengen Ausgangsmaterial für eine Reaktion ausreichen.

Notwendig hierfür sind Kenntnisse über die DNS-Sequenzen, die an den Enden des zu amplifizierenden Bereiches liegen. Der Reaktionsansatz enthält neben den entsprechend synthetisierten Oligonukleotidprimern, die eine Länge von 20-25 Basen haben sollten, die meistens doppelsträngige Template-DNS, alle vier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) MgCl₂ und eine hitzestabile DNS-Polymerase mit entsprechendem Reaktionsspuffer.

Die Reaktion erfolgt in drei Schritten und beginnt mit der Denaturierung des Templates bei Temperaturen zwischen 92°C und 96°C. Im Folgeschritt hybridisieren die Primer bei abgesenkter Temperatur an komplementären Abschnitten an der Matrizen-DNS (Annealing). Die Annealingtemperatur ergibt sich aus den Schmelztemperaturen der Primer, basierend auf deren Länge und Basenzusammensetzung. Im nachfolgenden Polymerisationsschritt (Elongation) erzeugt die ein-

gesetzte DNS-Polymerase vom 3'-OH-Ende der Primer einen komplementären Strang zur Matrizen-DNS. Aufgrund der hohen eingesetzten Temperaturen zur Denaturierung von 94-96°C muss das verwendete Enzym hitzestabil sein. Diese Polymerasen werden von thermophilen Bakterien exprimiert und können daher auch aus diesen gewonnen werden. Die bei der Polymerisation sehr häufig verwendete Taq-Polymerase wird aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert. Das Temperaturoptimum dieses Enzyms liegt bei 72°C und es ist in der Lage, ein Fragment von ca. 1000bp/min zu synthetisieren. Indem Denaturierung, Annealing und Polymerisation zyklisch wiederholt werden und die jeweils erzeugten DNS-Amplifikate wiederum als Matrize dienen, nimmt die Menge des PCR-Produktes exponentiell zu. Um bei der Kettenreaktion eine vollständige Denaturierung zu erreichen wird der zyklischen Vervielfältigung eine Prä-Denaturierung bei 94°C für 5min vorgeschaltet. Gleichermaßen wird zur Sicherstellung einer kompletten Elongation der Endprodukte eine finale bis zu 10-minütige Phase unter entsprechenden Bedingungen (Temperatur) der zyklischen Amplifikation nachgeschaltet. Die einzubauenden Nukleotide liegen als Desoxyribonukleotide vor und binden zur Strangverlängerung an das 3'-OH-Ende der wachsenden Kette. Durch eine Optimierung der MgCl₂-Konzentration kann die enzymatische Aktivität der Taq-Polymerase gesteigert werden. Der Einsatz von computergesteuerten PCR-Cyclern ermöglicht eine vollautomatische Durchführung und Optimierung der PCR.

3.2.3.1 *Nested-PCR*

Die Technik der Nested-PCR ermöglicht eine Erhöhung der Sensitivität und Spezifität einer PCR. Ein mit dem ersten Primerpaar erzeugtes DNS-Produkt dient als Matrize für ein zweites innerhalb des ersten Paares liegenden Primerpaares (Nested-PCR). Dadurch entsteht ein PCR-Produkt, das innerhalb des ersten liegt.

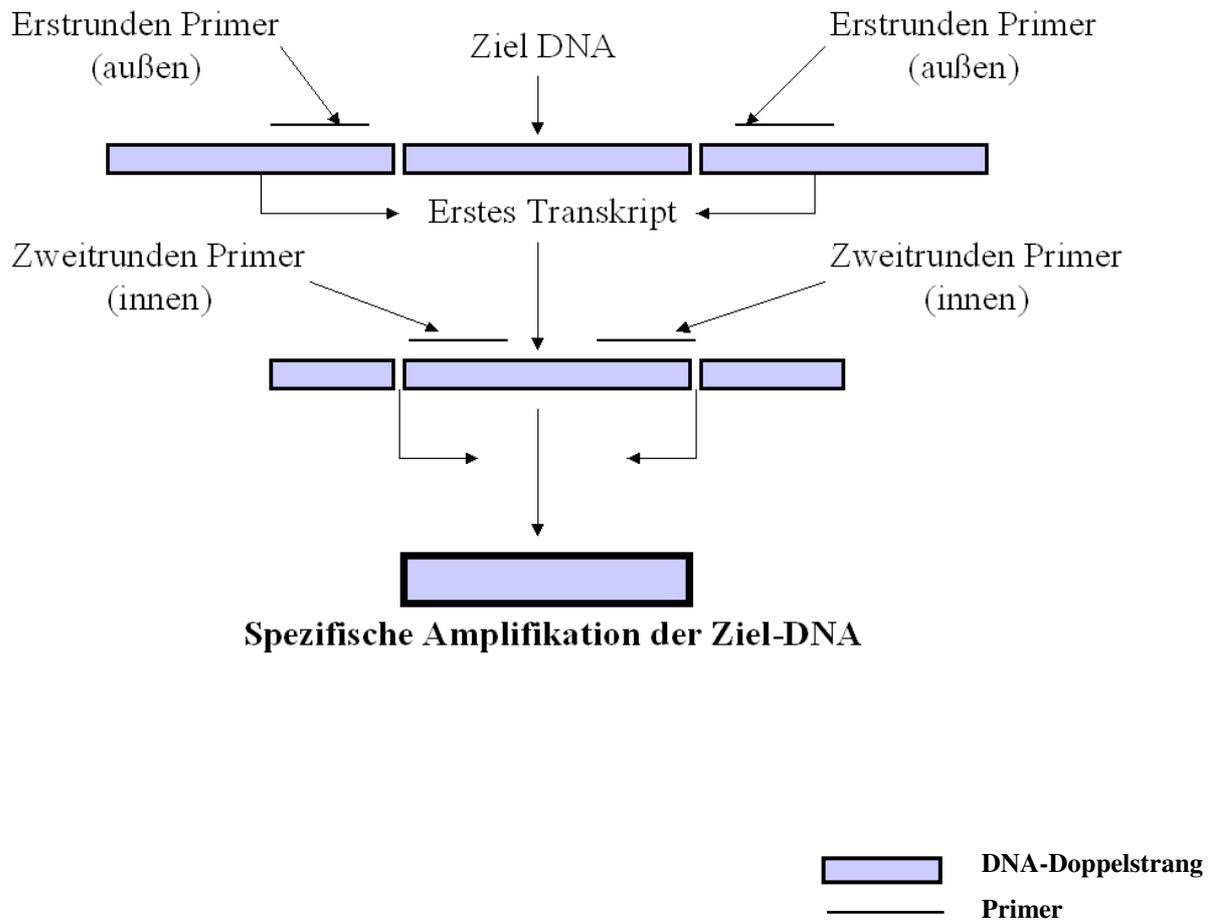


Abb. 2: Prinzip der Nested-PCR

3.2.3.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Das aus einem RNS-Transkript (z.B. mRNA) gewonnene Produkt ist die komplementäre DNS (englisch: complementary DNS, cDNS). Auch kleinste Mengen RNS werden dabei durch das Enzym Reverse Transkriptase (erstmal 1970 von Baltimore, Temin und Mitsutami in Retroviren entdeckt, Nobelpreis 1975) detektiert und umgeschrieben. Das cDNS-Produkt wird dann mit spezifischen PCR-Primern amplifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde die RT-PCR für den Nachweis der RNS-Viren mittels OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) durchgeführt. Die Herstellung des Mastermix und der Cyclerkonditionen erfolgte nach den Protokollangaben des Herstellers. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer, Reaktionsansätze und Cyclerprogramme sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt:

Primer	Oligonukleotidsequenz
111s	AGAGTCTCAGTACACAATMAAAAGAG
750as	TGCTTTGCTGCCTGTAGATGATGAG
114s	AGAGTCTCAGTACACAATMAAAAGRGATG
442as	GCCATTGTTTTYCTTGCTC

Tab. 3: Oligonukleotid-Primer (Sigma, Deisenhoven) 5'→3'-Richtung (Viazov et al. 2003)

Komponenten	Mengenangabe
dNTP (100mM)	4 µl
5×RT-PCR Puffer	10 µl
RT-PCR Enzym Mix	2 µl
111s-Primer (25pmol/µl)	2 µl
750as-Primer (25pmol/µl)	2 µl
Eluat mit RNS	5 µl
RNase-freies Wasser	25 µl
Σ	50 µl

Tab. 4: Pipettierschema für den hMPV-PCR Ansatz der 1. Runde (OneStep RT-PCR Kit, Qiagen)

Komponenten	Mengenangabe
dNTP (100mM)	3 µl
10×PCR Puffer	5 µl
Enzym-Mix	1 µl
114s-Primer (25pmol/µl)	0,5 µl
442as-Primer (25pmol/µl)	0,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1 µl
Template	5 µl
RNase-freies Wasser	34 µl
Σ	50 µl

Tab. 5: Pipettierschema für den hMPV-PCR Ansatz der 2. Runde (Expand High Fidelity PCR System, Roche)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Reverse Transkription	60 °C	30 min	1 ×
PCR Aktivierung	95 °C	15 min	1 ×
Denaturierung	95 °C	30 sec	40 ×
Annealing (Anlagerung)	52 °C	30 sec	40 ×
Elongation (Verlängerung)	72 °C	1 min	40 ×
Terminale Elongation	72 °C	5 min	1 ×
Kühlung	4 °C	∞*	1 ×

* Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben im Cycler bei 4°C gekühlt

Tab. 6: Temperaturprofil RT-PCR (1. Runde)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Denaturierung	94 °C	2 min	1 ×
Denaturierung	94 °C	30 sec	40 ×
Annealing (Anlagerung)	53 °C	30 sec	40 ×
Elongation (Verlängerung)	72 °C	45 sec	40 ×
Terminale Elongation	72 °C	5 min	1 ×
Kühlung	4 °C	∞*	1 ×

Tab. 7: Temperaturprofil Standard-PCR der 2. Runde

Durchführung:

Für die Reaktionen der ersten sowie der zweiten Runde wurde jeweils ein Mastermix erstellt, der die in den Tab. 4 und Tab. 5 aufgelisteten Reagenzien enthielt. Fünfundvierzig Mikroliter des Mastermixes wurden zuerst in 0,2ml-Reaktionsgefäße vorgelegt und dann mit dem Eluat (Produkt der RNS-Isolierung) oder dem Template (Produkt der ersten Runde) versehen und gut gemischt. Durch diese Reihenfolge konnte einerseits Material gespart und unspezifische Reaktionen bzw. RNS-Degenerationen minimiert werden. Die folgende PCR wurde nach den in den Tab. 6 und 7 beschriebenen Cyclerprogrammen durchgeführt. Das Erstellen der Mastermixe erfolgte in einem Prae-PCR-Bereich.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Material	Mengenverhältnisse
5×Tris-Borat-EDTA-Puffer (Stock) (TBE-Puffer)* 1 : 5 verdünnt mit H ₂ O	54 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 20ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) H ₂ O ad 1000ml
LE-Agarose*	1,5 g
GTG-Agarose*	0,5 g
Ethidiumbromid*	5 µl/100ml Gellösung
Längenstandard	1 kb Längenstandard
Gelladepuffer	0,25%-Bromphenolblau 40%-(w/v)-Saccharose in Aqua bidest

Tab. 8: Ansatz der Agarose-Gelelektrophorese

Durchführung:

Vom tabellarisch skizzierten Ansatz wurden die gekennzeichneten Substanzen (*) mit einem Mikrowellenherd bei 600W zum Kochen gebracht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen durch Schwenken des Becherglases auf ca. 50°C und dem Auffüllen der verdampften Wassermenge mit destilliertem Wasser wurde die Agarose-Masse luftblasenfrei in die Gelkammer gegossen. Hiernach wurde der Kamm vorsichtig eingesetzt und noch vorhandene Luftblasen mittels einer Pipettenspitze entfernt. Nachdem das Gel nach ca. 45min bei Raumtemperatur ausgehärtet war, konnte der Kamm vorsichtig entfernt und der Gelträger in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt werden. Anzumerken ist, dass auch hier eingeschlossene Luftblasen entfernt werden sollten. Die durch den Kamm entstandenen Vertiefungen konnten anschließend mit 10µl PCR-Produkt und 2µl Gelladepuffer beladen werden. Die Zuordnung der Größe der PCR-Produkte erfolgte anhand eines Vergleichs mit einem aufgetragenen Längenstandard. Die Laufzeit betrug bei 130V ca. 30-40min. Anschließend wurden die aufgetrennten und gefärbten Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Diese konnten dann fotografiert oder zur weiteren Verarbeitung ausgeschnitten werden.

3.2.5 Verwendung von QIAquick-PCR Purification Kit (Qiagen)

Zur Analyse der DNS (Sequenzierung, Klonierung) ist eine Aufreinigung der Amplifikate essentiell. Hierfür wurde das QIAquick-PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet, mit dem sich PCR-Produkte von niedermolekularen, überschüssigen Stoffen wie Primern und Desoxy-

nukleotiden befreien lassen. Das Prinzip der Aufreinigung erfolgt analog zu anderen DNS-Reinigungs-Kits von Qiagen: Die DNS wird unter Hochsalzbedingungen an eine Silikagelmembran selektiv gebunden, in mehreren Waschschrritten gereinigt und schließlich durch einen Elutionspuffer niedriger Ionenstärke eluiert. Die Arbeitsvorgänge erfolgten nach den Angaben des Herstellers. In dieser Arbeit wurde diese Methode vor allem für die DNS-Klonierung und -Sequenzierung angewendet.

Material:

QG-Puffer $\text{pH} \leq 7,5$

PE-Puffer

96-100%-Ethanol (Mischungsverhältnis PE-Puffer/Ethanol nach Herstellerangaben)

100%-Isopropanol

Ampuwa

QIAquick Filtersystem

Durchführung:

Die entsprechende Bande wurde mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, anschließend gewogen und mit der dreifachen Menge QG-Puffer in ein 2ml-Sammelröhrchen gegeben (100mg ~ 100 μ l). Dieses wurde dann für 10min bei 50°C in einem Wasserbad inkubiert, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hatte. Danach wurde der ausgeschnittenen Gelmenge entsprechend 1 Volumenanteil Isopropanol hinzugefügt und die erhaltene Suspension in ein QIAquick Filtersystem pipettiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 1min bei 13.000rpm. Der Durchfluss wurde verworfen. Zum Waschen der DNS wurden 750 μ l PE-Puffer hinzu gegeben und 2 weitere Zentrifugationsschritte bei 13.000rpm zwischengeschaltet, um letztlich mit 50 μ l destilliertem Wasser die DNS in ein neues 1,5ml-Sammelröhrchen zu eluieren.

3.2.6 Klonierung mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)

Die molekulare Klonierung ist ein Verfahren der Gentechnologie zur Selektion und Züchtung z.B. von Bakterien, die ein identisches, fremdes DNS-Fragment enthalten, das mittels eines Vektors in die Zelle integriert wurde. Bei Vektoren handelt es sich meist um zirkuläre DNS-Moleküle (Plasmide mit einer Größe von 3000-5000bp), die multiple Klonierungsstellen (englisch: Multiple Cloning Site, MCS) besitzen und sich anhand ihrer Schnittstellen für Restriktionsenzyme als Träger für die Integration fremder DNS eignen. Sie sind durch eigene Startsequenzen zur Replikation befähigt.

Der für die Klonierung vorgesehene Vektor und das DNS-Fragment werden mit Restriktionsendonukleasen an definierten Sequenzen geschnitten. Dabei entstehen entweder glatte Enden (blunt-ends) oder überhängende Enden (sticky-ends = klebrige Enden). An den überhängenden Enden können sich DNS-Stücke mit komplementären einzelsträngigen Enden über sich ausbildende Wasserstoffbrückenbindungen anlagern. Mit Hilfe einer Ligase kommt es dann zur kovalenten Bindung durch Phosphodiesterbrücken. Die Verknüpfung glatter Enden kann nur direkt mittels einer DNS-Ligase erfolgen.

Die Aufnahme des Vektors mit dem entsprechenden DNS-Fragment in ein Bakterium wird als Transformation bezeichnet. Hierzu muss das Bakterium jedoch die Fähigkeit besitzen, jenes auch aufzunehmen. Dies wird als Kompetenz bezeichnet. Die bei der Klonierung verwendeten *Escherichia coli*-Stämme (*E. coli*) sind nur in begrenztem Umfang in der Lage DNS aufzunehmen. Um diese Bakterien wirksam zu transformieren müssen die Zellen chemisch oder physikalisch behandelt werden. Chemisch geschieht dies über die Zugabe von Calciumchlorid, physikalisch werden durch elektrische Felder Poren in den Membranen erzeugt, die eine Aufnahme von DNS möglich machen. Zur Kultivierung werden die Zellen auf Agarnährböden ausplattiert, die zur Selektion mit einem Antibiotikum versetzt werden. Die Vektoren, die für die Transformation benutzt werden, enthalten mindestens ein Gen, das eine Resistenz gegen dieses Antibiotikum aufweist. Damit ist gesichert, dass nur die Bakterien wachsen können, die ein Plasmid mit dem Resistenzgen aufgenommen haben.

3.2.6.1 TOPO-Ligation

Die für die PCR verwendete Taq-Polymerase besitzt Transferaseaktivität, die unabhängig von der Matrize ist. Diese synthetisiert einen Überhang von jeweils einem A am 3'-Ende des synthetisierten Stranges. Die TOPO TA-Vektoren (Vektor pCR4 Topo) (Abb. 3) liegen linearisiert vor und haben einen Überhang von einem T (5'-CCCTT), der sich mit dem komplementären A-Überhang paaren kann.

Zur Erzeugung eines Konstruktes aus dem pCR4-TOPO-Vektor und der amplifizierten DNS wird das Enzym Topoisomerase I aus dem Vakkzinia Virus benötigt. Die Topoisomerase I ist spezifisch über einen Tyrosylrest gebunden. Die bei der Spaltung der Phosphodiesterbrücken des Stranges frei werdende Energie wird zur kovalenten Bindung zwischen einzusetzender DNS-Sequenz und Vektor genutzt. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass Vektoren ohne Insert zwar aufgenommen werden, aber nicht ligiert sind und daher Bakterien, die den Vektor ohne Insert aufgenommen

haben, nicht auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte wachsen können. Damit hat jede entstandene Kolonie auch ein Plasmid mit Insert.

Durchführung:

Vier Mikroliter des aufgereinigten amplifizierten PCR-Produktes wurden entsprechend der Herstellerangaben mit jeweils 1µl der im Kit enthaltenen Salzlösung und 1µl Vektorlösung gemischt und bei Raumtemperatur (RT: 22-23°C) für 5min inkubiert. Dieser Ligationsansatz konnte im direkten Anschluss daran zur Transformation mittels Hitzeschock im Wasserbad weiterverarbeitet werden.

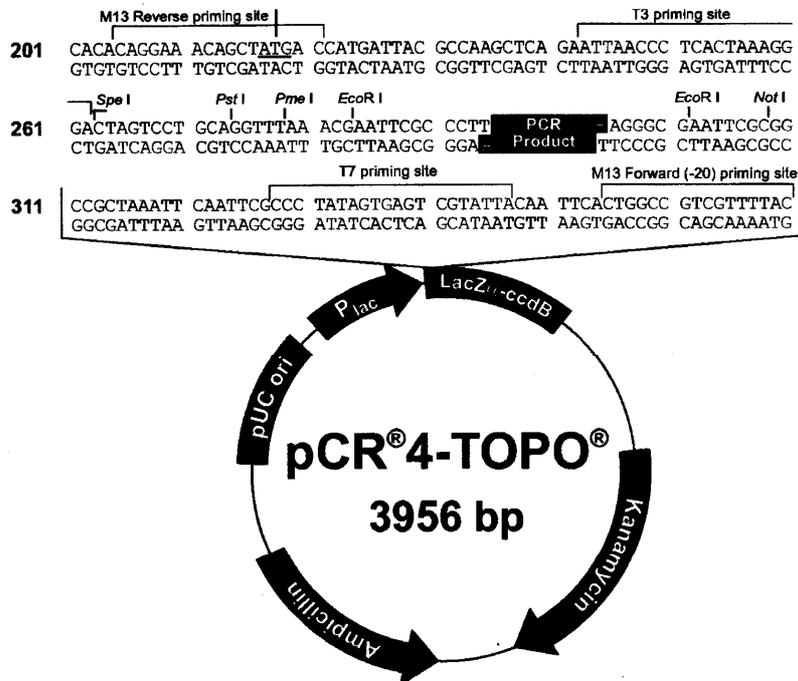


Abb. 3: Vektorkarte des pCR4 Topo-Expressionsvektors

(aus: Invitrogen, Instruction manual zum TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, 2004)

3.2.6.2 Hitzeschock-Transformation

Durchführung:

Bei dem von Invitrogen zur Transformation verwendeten Wirtsbakterium handelt es sich um kompetente *E. coli*-Bakterien des TOPO TA Cloning Kits. In einem 1,5ml-Sammelröhrchen wurden 2µl des Ligationsansatzes mit 50µl *E. coli*-Bakterien vermischt und für 30min auf Eis inkubiert. Hierbei kommt es zu einer Anlagerung der Plasmide an die Bakterien. Danach erfolgte der

Hitzeschock für 30sec bei 42°C in einem vorbereiteten Wasserbad, bei dem es zur Aufnahme der Plasmide über eine vermehrte Durchlässigkeit der Membranen in die kompetenten *E. coli*-Bakterien kommt. Unmittelbar daran anschließend wurden die Ansätze wiederum für 3min auf Eis gelegt, bevor sie mit dem auf Raumtemperatur gebrachten 250µl S.O.C.-Medium versetzt und bei 37°C 1h bei 200rpm auf einem Schüttler inkubiert wurden. Fünfzig Mikroliter dieses Ansatzes wurden auf einer auf 37°C vorgewärmten Ampicillin-haltigen Agarplatte ausplattiert. Es folgte eine Inkubation der beimpften Agarplatten im Brutschrank bei 37°C für mindestens 8h.

3.2.6.3 *Selektion und Kontrolle der gepickten Klone*

Durchführung:

Von den im Brutschrank über Nacht bebrüteten transformierten *E. coli*-Bakterien wurden von jeder Agarplatte 10 Kolonien mittels der Spitze einer sterilen Pipette aufgenommen und in 3ml mit 50µg Ampicillin versetztem, flüssigem LB-Medium über mindestens 8h bei 200rpm im Schüttler weiter kultiviert. Bei den einklonierten Sequenzen handelte es sich um hMPV-positive PCR Produkte der 2. Runde. Zur Überprüfung der durchgeführten Transformation und Identifizierung der Klone wurde jeweils eine hMPV-PCR der 2. Runde durchgeführt.

3.2.6.4 *Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien*

Die Isolierung mit dem QIAprep Spin Miniprep erlaubt eine Reinigung von ca. 15µg Plasmid-DNS pro Ansatz aus den *E. coli*-Kulturen, die das zu isolierende Plasmid enthalten. Unter alkalischen Bedingungen werden die Zellenmembranen in Anwesenheit von SDS lysiert (Puffer P2), so dass die in der Zelle enthaltenen Zellbestandteile freigesetzt und aufgrund des vorherrschenden pH-Wertes denaturiert werden. Bei der folgenden Neutralisierung mittels Puffer N3 kommt es zur Präzipitation der Proteine, der chromosomalen DNS, des SDS sowie der Zelltrümmer. Diese Bestandteile werden nach Zentrifugation mit dem entstehenden Durchfluss verworfen. Die Plasmid-DNS jedoch renaturiert aufgrund ihrer geringen Größe und verbleibt im Filtersystem. Die noch verbliebene RNS wird durch die in Puffer P1 vorhandene RNase vollständig abgebaut. Die zu isolierende Plasmid-DNS scheidet sich unter Hochsalzbedingungen an einer Silicagelmembran (QIAprep Spin Column) ab und wird durch mehrere Waschvorgänge mit Puffer PE von noch verbliebenen Verunreinigungen befreit und schließlich in einer geringen Salzkonzentration und bei alkalischem pH-Wert mittels Puffer EB eluiert.

Puffer	Zusammensetzung
Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 10mM EDTA, 100 µg/mlRNSse A
Puffer P2 (Lysepuffer)	200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)
Puffer N3 (Neutralisationspuffer)	Chaotrope Salze, Guanidinium Hydrochlorid, Essigsäure
Puffer PB (Adsorptionspuffer)	Chaotrope Salze, Guanidinium Hydrochlorid, Isopropanol
Puffer PE (Waschpuffer)	Ethanol
Puffer EB (Elutionspuffer)	10 mM Tris-Cl, pH 8,5

Tab. 9: Puffer und deren Zusammensetzung QIAprep Miniprep (Qiagen)

Durchführung:

3ml der Übernachtskulturen wurden bei 13.000rpm für 10min zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet mit 250µl Puffer P1 resuspendiert. Danach wurden 250µl Puffer P2 zur Lyse hinzu gegeben und durch Invertieren des Sammelröhrchens vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wurde dann bei Raumtemperatur für 2min inkubiert und mit 350µl Puffer N3 zur Neutralisation versehen. Direkt nach Zugabe des Neutralisationspuffers musste durch mehrmaliges Invertieren gemischt werden. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13.000rpm für 10min bevor der entstandene Überstand mit dem enthaltenen Plasmid auf eine QIAprep-Spin-Säule aufgetragen und wiederum für 1min bei 13.000rpm zentrifugiert werden konnte. Der Durchfluss wurde verworfen und es folgte die Zugabe von 500µl Puffer PB, 500µl und 750µl Puffer PE, wobei jeweils ein Zentrifugationsschritt für 1min bei 13.000rpm dazwischen geschaltet war. Der entstandene Durchfluss wurde stets verworfen. Für die Elution der Plasmid-DNS wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß überführt und 30µl Elutionspuffer aufgetragen, 1min bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum bei 13.000rpm für 1min zentrifugiert. Bis zur Weiterverwertung wurde die Plasmid-DNS bei 4°C im Kühlschrank oder bei -20°C im Eisschrank gelagert.

3.2.7 DNS-Sequenzierung

Unter der DNS-Sequenzanalyse wird die Ermittlung der Reihenfolge der Nukleotide in einem DNS-Molekül verstanden (Sanger et al. 1977).

Die durchgeführte Sequenzierung der PCR-Amplifikate erfolgte nach der enzymatischen Kettenabbruchsmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Dabei wurden unter Verwendung des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit zyklische Sequenzreaktionen mit anschließender Auftrennung der Sequenzierprodukte in einem automatischen Sequenzier-Automaten (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch bestand aus fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) A, C, G, T und unmarkierten dNTPs, einer AmpliTaq-DNS-Polymerase-FS aus der F667Y-Familie der Taq-Polymerasen sowie der aufgereinigten PCR-DNS als Basismaterial.

Bei den verwendeten Didesoxynukleotiden fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom. Dies führt bei Einbau zu einem Abbruch der Kettenverlängerung, da nur eine Phosphodiesterbindung zwischen dem eigenen 5'-Kohlenstoffatom und dem 3'-Kohlenstoffatom des vorhergehenden Nukleotids möglich ist. Ermöglicht wird dieser Einbau durch eine Mutation im aktiven Zentrum der AmpliTaq-DNS-Polymerase-Fs, aufgrund derer keine Unterscheidung zwischen dNTPs von ddNTPs möglich ist. Dadurch werden markierte ddNTP und unmarkierte dNTP gleichermaßen eingebaut.

Aufgrund des Kettenabbruchs beim Einbau der ddNTPs kommt es zu DNS-Fragmenten unterschiedlicher Länge, die jeweils am 3'-Ende mit einem für die Base spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (Tab. 10). Im Sequenzierautomaten werden diese kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und anhand der durch einen Laser induzierten Fluoreszenz detektiert.

Base	Fluoreszenzfarbstoff	Wellenlänge (Farbe)
Adenin	R6G	grün
Thymin	TAMRA	rot
Guanin	R110	schwarz
Cytosin	ROX	blau

Tab. 10: Fluoreszenzmarkierung der vier Basen am 3'-Kohlenstoffatom

Durchführung:

Die Sequenzierung mit dem Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit erfolgte pro Probe in je einer Reaktion für beide Strangrichtungen. Die Reaktion wurde entsprechend den in Tab. 11 gemachten Angaben mit den Primern der Tab. 3 in einem 0,2ml-Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Zyklussequenzierung erfolgte nach den in Tab. 12 aufgeführten Parametern. Um Lesefehler des Sequenzers durch Reaktionskomponenten zu minimieren wurden die Sequenzierprodukte mit

Hilfe von Sephadex-Platten von überschüssigen dNTPs, ddNTPs, Salzen und Polymerasen befreit. Hierfür wurden ca. 3g Sephadex G 50 in eine Multi-Screen-Platte gegeben und je Vertiefung mit 300µl RNase-freiem Ampuwa aufgegossen. Dieser Ansatz wurde zum Quellen bei 4°C im Kühlschrank für 3-4h gelagert. Um das überschüssige Wasser zu entfernen wurde nach entsprechender Inkubationszeit bei 910g für 5min zentrifugiert. Anschließend konnten die Proben auf das gequollene Sephadex aufgebracht und die Sequenzierung mit dem 3130 Genetic Analyzer begonnen werden. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen DNSDIST und NEIGHBOR, version 5.5c (Felsenstein 1993, Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA).

Komponente	Mengenangabe
Terminator Ready Reaction Mix	4 µl
gereinigtes PCR-Amplifikat/Plasmid	3 µl
Primer	3 µl
H ₂ O	ad 20 µl
Σ	20 µl

Tab. 11: Reaktionsansatz für die Sequenzierung

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94 °C	5 min	1 ×
Denaturierung	94 °C	45 sec	40 ×
Annealing (Anlagerung)	55-65 °C	30 sec	40 ×
Elongation (Verlängerung)	72 °C	45 sec	40 ×
terminale Elongation	72 °C	10 min	1 ×
Kühlung	4 °C	∞	1 ×

Tab. 12: Temperaturprofil der Sequenzierreaktion

4 Ergebnisse

4.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Isolierung der RNS aus den gesammelten Rachenspülwassern, Abstrichen und Gewebeproben erfolgte mit dem RNeasy Protect Kit von Qiagen. Um eine Stabilisierung der RNS zu erreichen wurden alle Proben entsprechend der Herstellerangaben mit RNAlater-Puffer versetzt und bei -20°C gelagert. Hierdurch wurde eine Verlängerung der Haltbarkeit der RNS in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur von bis zu mehreren Jahren erreicht. Ausgehend von dem von Viazov und seiner Arbeitsgruppe 2003 publizierten RT-PCR-Protokoll wurde in dieser Arbeit mit Hilfe eines Temperatur-Gradienten-Thermocyclers herausgefunden, dass die optimale Annealing-Temperatur für die RT-PCR bei 52°C und für die Nested-PCR bei 53°C lag. Sowohl die Denaturierungs- als auch die Elongationstemperatur für die Nested-PCR wurde von den von Viazov et al. (2003) gemachten Angaben übernommen. Bei der RT-PCR hingegen wurde die Denaturierungstemperatur auf 95°C erhöht. Durch eine Optimierung der MgCl₂-Konzentration in der Nested-PCR konnte anhand mehrerer Verdünnungsreihen die Sensitivität der Amplifikation weiter gesteigert werden. Hierdurch gelang es, die Nachweisbarkeit von hMPV-RNS bis auf eine Verdünnung von 10⁻⁶ (Kopienzahl 22/μl) zu steigern. Das zu erwartende Erstrundenprodukt hatte eine Größe von ca. 640bp, das Produkt der 2. Runde von ca. 320bp.

Im Zeitraum vom 01.10.2001- 31.03.2004 wurden 743 von in der Virologie Bonn gelagerten Rachenspülwasser der Kinderklinik der Universität Bonn aufgearbeitet, mittels PCR untersucht, teilweise kloniert und sequenziert. Zudem wurden die entsprechenden Krankendaten positiv getesteter Patienten gesichtet um mögliche Besonderheiten in Symptomatik oder Verlauf zu detektieren. Hierbei fielen zum einen ein Patient mit einer Enzephalitis unklarer Genese, zum anderen ein anderer Patient mit einer akuten Exazerbation eines Asthma bronchiale auf, die beide zuvor einen Infekt unklarer Genese der oberen Atemwege zeigten. Auf diese beiden Fälle wird im Verlauf dieser Arbeit noch genauer eingegangen. Von insgesamt 743 untersuchten Proben wurden 102 (13,7%) positiv auf hMPV-RNS getestet.

4.2 Neue Aspekte in der Pathogenese des hMPV

4.2.1 Das hMPV als Trigger einer akuten Asthma bronchiale Exazerbation

Im Jahr 2001 wurde Asthma bronchiale noch definiert als eine vorwiegend funktionelle Störung des Bronchialbaumes, bei der klinisch anfallsweise Zustände reversibler Obstruktion mit einer vorwiegend expiratorischen Dyspnoe (Giemen) und akuter Lungenblähung auftreten (Böcker

2001). Mittlerweile wird das Asthma bronchiale jedoch als eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege mit bronchialer Hyperreaktivität und variabler Atemwegsobstruktion (Global Initiative for Asthma (GINA), National Asthma Education and Prevention Program (NAEPP) 2005, reviewed by Yang 2005) angesehen. Asthma gehört wie die allergische Rhinitis und die Neurodermitis zum Formenkreis der atopischen Erkrankungen. In mehr als 90% der Fälle ist Asthma mit Allergien assoziiert, jedoch nur in 15% ausschließlich allergisch bedingt. Meist handelt es sich um ein Mischasthma, das zu fast 90% der Fälle durch virale Infektionen getriggert wird (Heymann et al. 2004, Williams et al. 2005). Eine entscheidende Rolle nehmen zudem einerseits weitere exogene Auslöser wie Pollen, Tierepithelien, Staub, Rauch, kalte Luft und Hausstaubmilben, sowie andererseits endogene Ursachen wie chemische oder physikalische Irritationen, psychischer Stress, Sport, Analgetika und familiäre Disposition ein. Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass bei Kindern im Alter von bis zu 3 Jahren ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Hauptsymptom Dyspnoe und einer viralen Infektion sowie deren Hospitalisation besteht (Heymann et al. 2004, Jartti et al. 2004, Williams et al. 2005). Beim Vergleich größerer Patientenkollektive von Patienten im Alter zwischen 3 und 18 Jahren mit dem Symptom der Dyspnoe und atypischen Charakteristika wurde von Jartti ein Zusammenhang zu vorhergehenden viralen Infektionen beobachtet (Jartti et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass bei Kindern mit bekanntem Asthma bronchiale eine Hypersensitivität des Bronchialbaumes nach einem Infekt der oberen Atemwege über 5-11 Wochen nachweisbar ist (Xepapadaki et al. 2005). Neben den bekannten respiratorischen Viren wie den RS-, hMP-, Rhino-, Influenza-, Parainfluenza- und Adenoviren wurde 2005 von Allander aus Rachenspülwassern ein den Parvoviren zuzuordnendes Virus entdeckt (Bocavirus) (Allander et al. 2005), das als Trigger einer Exazerbation eines Asthma bronchiale zu sehen ist.

Bei den auf dieser Arbeit basierenden Daten zur Prävalenz des hMPV bei Kindern mit Symptomen eines Infektes der oberen Atemwege ist es gelungen, einen neuen, noch nicht beschriebenen hMPV-Subtyp (hMPV-B1) zu identifizieren (Dissertation Glatzel 2008, Schildgen et al. 2004). Bei der Patientin handelte es sich um ein 6,5 Jahre altes Mädchen mit einem in der Vorgeschichte bekanntem Asthma bronchiale, das mit einer Dauermedikation mit Budesonid 125µg (1-0-1) behandelt wurde. Im Rahmen der Grunderkrankung kam es infolge eines Infektes der oberen Luftwege zu einer akuten Exazerbation eines Asthma bronchiale. Zum Zeitpunkt der Einlieferung in die Universitäts-Kinderklinik Bonn präsentierte sich die Patientin in reduziertem Allgemeinzustand, jedoch gutem Ernährungszustand. Die rektal gemessene Körpertemperatur betrug nach einer

30min zuvor verabreichten Gabe von 250mg Acetaminophen 39°C. Neben einem trockenen Husten und einer Tachydyspnoe von 50 Atemzügen pro Minute (Normwert: 25/min) zeigte sich ein verlängertes Expirium mit auskultatorisch deutlich hörbarem Giemen und subkostalen Einziehungen als Zeichen des Einsatzes der Atemhilfsmuskulatur. Bei der durchgeführten Pulsoxymetrie bei Raumluft zeigte sich eine Hypoxie bei einer Sättigung von 89%. Die Herzfrequenz betrug 120 Schläge pro Minute bei einem Blutdruck von 73/46mmHg, vermutlich bedingt durch eine isotone Dehydratation (Na:141mmol/l). Die unmittelbar durchgeführte kapilläre Blutgasanalyse zeigte einen normalen pCO₂ von 38,7mmHg (Normwert: 32-45mmHg) aufgrund der bestehenden Hyperventilation. Das im Rahmen der Routine abgenommene Differentialblutbild zeigte eine Leukozytose von 13400/mm³. Davon waren 3% eosinophile, 14% stabkernige und 61% neutrophile Granulozyten. Das C-reaktive Protein war mit 9,2mg/l leicht erhöht. Die im Plasma gemessene IgG-Fraktion war mit 27600IU/ml (Normwert: < 90IU/ml) deutlich erhöht. Die durchgeführte Röntgenthoraxaufnahme in zwei Ebenen zeigte perihiläre Infiltrate (Abb. 4) sowie eine Überblähung der Lunge, die als Zeichen eines infektexazerbierten Geschehens gesehen wurden. Der weitere klinische Verlauf präsentierte sich nach einer entsprechenden Rehydrierung mit HD₅, einer regelmäßigen intravenösen anti-inflammatorischen Behandlung mit Prednisolon und einer kontinuierlichen Inhalation mit bronchodilatatorischen Medikamenten (Salbutamol) über einen Zeitraum von mehreren Tagen weitgehend unauffällig. Die zusätzliche Gabe von 2l/min Sauerstoff war über 5 Tage nötig.

Nach 7 Tagen wurde die Patientin unter Fortführung ihrer Therapie in gutem Allgemein- und Ernährungszustand entlassen. Anhand der beschriebenen Befunde wurde klinisch von einer typischen RSV-Infektion ausgegangen.

Die aus den gewonnenen Rachenspülwassern durchgeführten ELISA- und Schnellteste für RSV sowie für Influenza Typ A und B waren negativ. Weiterhin wurden die in 3.1.11 beschriebenen Zellkulturen mittels der genommenen Proben beimpft. Auch diese zeigten jedoch im Überwachungszeitraum von 4 Wochen keine RSV-, Influenza- oder hMPV-typischen CPE.

Die hMPV-PCR wurde entsprechend den in dieser Arbeit in Tab. 3 bis Tab. 7 beschriebenen Protokollen durchgeführt. Die frischen Rachenspülwasser wurden sowohl direkt und bei -20°C als auch in Kombination mit dem RNAlater-Puffer (Qiagen) zur PCR eingesetzt.

Die hMPV-RNS konnte in den frisch verarbeiteten und den mit RNAlater-Puffer versehenen Proben (Lagerung bei -20°C) nachgewiesen werden. Dies war jedoch nicht bei den Proben ohne RNAlater möglich.

Bei den verwendeten Primern des N-Gens handelte es sich um die von der Arbeitsgruppe um Viazov entworfenen Sequenzen. Das bei der PCR erzeugte Amplifikat wurde in einen Plasmidvektor kloniert und anschließend sequenziert (Tab. 10, 11, 12). Bei den erhaltenen Sequenzen handelte es sich um hMPV-spezifische Nukleinsäure. Diese Nukleotidsequenzen (hMPV-Bonn-01) wurden mit allen in der Genbank zu Verfügung stehenden hMPV-Sequenzen verglichen. Jedoch wurden hierbei keine gänzlich übereinstimmenden Korrelate gefunden, so dass von einem neuen Subtyp des hMPV ausgegangen werden musste (Dissertation Glatzel 2008). Der in der vorliegenden Doktorarbeit nachgewiesene hMPV-Subtyp blieb der einzig nachweisbare mögliche Auslöser einer akuten Exazerbation eines Asthma bronchiale (Schildgen et al. 2004).

NLD00-1 ₁₂₅₋₁₇₄	TGGGTACAACAACACTGCAGTGACACCCTCATCATTGCAACAAGAAATAACA
AY355324	A C C
AY355328	A C C T A
AY355335	A C C T G G
Bonn-01	C C C A GC AC G G C
APV-C	G C A T C T G T TC GAGG G GT

NLD00-1 ₁₇₅₋₂₂₄	CTGTTGTGTGGAGAAATTCTGTATGCTAAACATGCTGACTACAAATATGC
AY355324	A A G T
AY355328	T G A T CA CA T
AY355335	T G T CA A T
Bonn-01	CCCC C A G C T CA G AA A C C C
APV-C	C A G A C G CA A T TC C

NLD00-1 ₂₂₅₋₂₇₄	TGCAGAAATAGGAATACAATATATTAGCACAGCTTTAGGATCAGAGAGAG
AY355324	C
AY355328	T G T C A
AY355335	G G T C A
Bonn-01	A G A G T T G AAC AA C A
APV-C	A T G G G CG G CA AC G G C TA

NLD00-1 ₂₇₅₋₃₂₄	TGCAGCAGATTCTGAGGAACTCAGGCAGTGAAGTCCAAGTGGTCTTAACC
AY355324	A A A T T
AY355328	A A T A T T G TC
AY355335	A A T A A T T G T G TC
Bonn-01	AA A CAGAA A GC C C G C AACG
APV-C	CA A A A T G G G CA A G

NLD00-1 ₃₂₅₋₃₇₄	AGAACGTACTCTCTGGGGAAAATTA AAAACAATAAAGGAGAAGATTTACA
AY355324	CT G C
AY355328	A A CT A GGC G G GC G
AY355335	AG A T A GG T G G G G
Bonn-01	AG A A GGCA GGC GC AAG GCAG
APV-C	AG A T GGGC GC G G G G

NLD00-1 ₃₇₅₋₄₂₆	GATGTTAGACATACACGGGGTAGAGAAGAGCTGGGTAGAAGAGATAGACAAA
AY355324	A A G
AY355328	T T A G A T A A
AY355335	A T T A G A T A
Bonn-01	A C AA C T A AG A AC A A C
APV-C	A T T A GA T A T AG T

Tab. 13: Alignment (302 Nukleotide des N-Proteins) des neuen Subtyps im Vergleich mit den vier bisher bekannten Typen sowie des APV-C

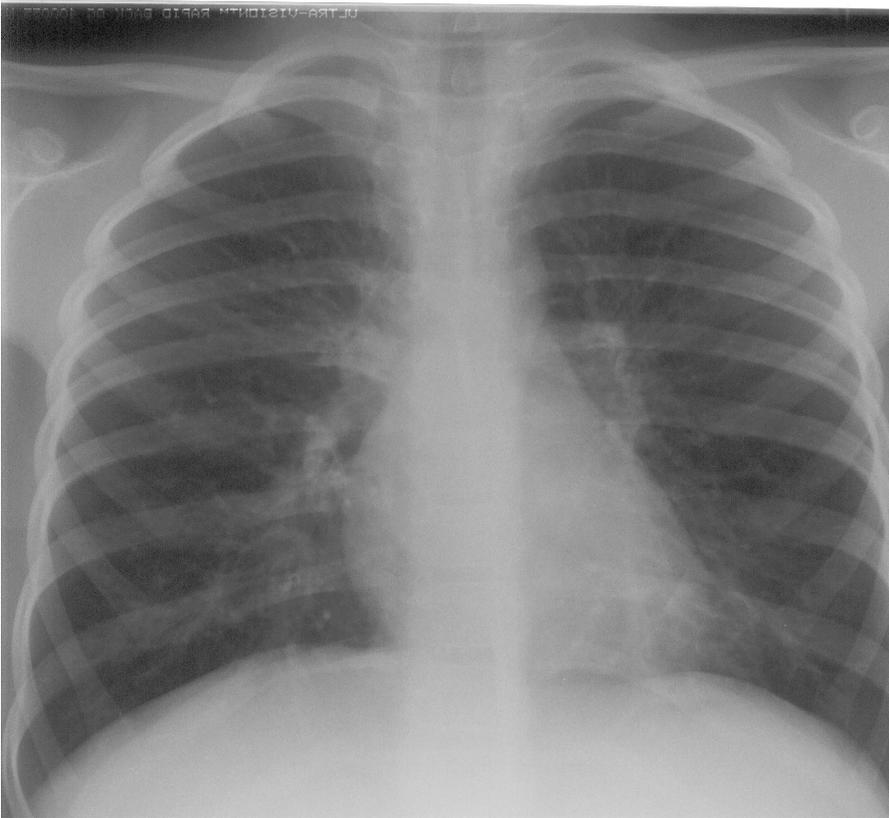


Abb. 4: Leichte Überblähung beider Lungenflügel sowie perihiläre Infiltrate im Sinne einer Bronchitis/Peribronchitis, jedoch keine Anzeichen einer Segment- oder Lobärpneumonie (Schildgen, Geikowski et al. 2004; zur Verfügung gestellt von Dr. med. A. Simon, Universitätskinderklinik Bonn)

4.2.2 Enzephalitis und hMPV – neuer Subtyp

Bei der Enzephalitis handelt es sich um eine Entzündung des Gehirns, wobei die graue Substanz (Polioenzephalitis), die weiße Substanz (Leukoenzephalitis) oder die des gesamten Gehirns (Panenzephalitis) einschließlich der Meningen (Meningoenzephalitis) betroffen sein können. Ätiologisch kann eine Enzephalitis viral, bakteriell, mykotisch, reaktiv allergisch oder immunologisch bedingt sein. Alle Entzündungen unabhängig ihrer Ätiologie führen im akuten Stadium zu einem Hirnödem, das jedoch unterschiedlich stark ausgebildet sein kann. Diese intrakranielle Volumenzunahme kann für einen Teil der akuten Symptomatik mitverantwortlich sein und bei einer Druckzunahme klinisch im Vordergrund stehen. Als Komplikationen können im Anschluss an eine Entzündung Epilepsien, Verklebungen, Hirnnervenausfälle und persistierende neurologische Defizite entstehen.

Der häufigste Infektionsweg von Viren in das Zentrale Nervensystem verläuft über den Blutweg (hämatogene Streuung). Die Viren dringen häufig über regionale Lymphabflusswege in den Blutkreislauf ein. Primäre Entzündungsquellen sind meist Infektionen des Respirations- oder

Gastrointestinaltraktes, aber auch ein perkutanes Eindringen (Zeckenstich) ist möglich. Weitere Möglichkeiten bestehen in einer zentripetalen Ausbreitung über axonalen Transport (Rabiesvirus) oder nach Primärinfektionen der Haut und Schleimhäute (Herpes-simplex-Virus).

Zur Gruppe der DNS-Viren, die eine Enzephalitis verursachen können, gehört die Familie der Herpesviren. Zu den RNS-Viren, die eine Enzephalitis auslösen können, gehört neben zahlreichen anderen die Familie der Paramyxoviridae (vgl. 2.7.2, 2.7.3).

In einem Fall handelte es sich um einen 14 Monate alten Jungen, der aufgrund eines Hirnödems im Zuge einer Enzephalitis verstorben ist. Die folgenden Daten zu Epikrise und Verlauf wurden von den behandelnden Ärzten der Universitätskinderklinik Bonn (stellvertretend Dr. med. A. Simon) erhoben und ebenso wie die Befunde und Aufnahmen des Radiologischen Institutes des Universitätsklinikums Bonn (Dr. med. M. Born) freundlicherweise für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die notfallmäßige Aufnahme in die Kinderklinik erfolgte beim ersten fieberhaften (39°C), unkomplizierten, generalisierten tonisch-klonischen Krampfanfall (Beginn: ca. 30min vor der Einlieferung), der durch 2 rektale Gaben Diazepam (5mg) nicht sistierte. Der Patient präsentierte sich in einem reduzierten Allgemein-, jedoch gutem Ernährungszustand. Er reagierte weder auf verbale noch taktile Reize. Neurologisch zeigte der Patient anfänglich eine Blickdeviation nach kranial, die sich dann in eine Blickstarre ohne jegliche Deviation wandelte. Licht- und Konvergenzreaktion waren bei fixierter Pupille (3-4mm) aufgehoben. Bei der pädiatrischen Untersuchung wurde eine gute Durchblutung der Extremitäten bei einer Pulsfrequenz von 140 Schlägen pro Minute (Normwert: 80-150) und einer Sauerstoffsättigung bei Raumluft von 93% festgestellt. Die weitere körperliche Untersuchung zeigte weder Petechien noch Zeichen der Dehydratation; die Lunge war seitengleich belüftet und ohne Rasselgeräusche. Die Herzaktion war rhythmisch, die Herztöne rein und ohne vitientypische Herzgeräusche. Das Abdomen präsentierte sich weich, ohne Abwehrspannung oder Resistenzen. Milz und Leber waren palpatorisch unauffällig. Anamnestisch bestanden seit 2 Tagen Zeichen eines leichten respiratorischen Infektes (Rhinitis, Pharyngitis, trockener Husten). Weiterhin hatte sich der Patient an diesem Morgen einmalig übergeben und danach jegliche Nahrungsaufnahme verweigert. Am Abend kam es dann zu einem raschen Fieberanstieg mit beschriebener Krampfsymptomatik.

Bei dem Patienten handelte es sich um ein ehemaliges Frühgeborenes der 34. Schwangerschaftswoche (Geburtsgewicht 2300g). Aufgrund eines frühzeitigen Blasensprungs der Mutter wurde das Kind über einen längeren Zeitraum antibiotisch behandelt. Eine Neugeboreneninfektion war

nicht aufgetreten. Die Neugeborenenperiode verlief unauffällig, bis auf eine mäßige Entzugssymptomatik (Reizbarkeit, rege Darmperistaltik), die auf einen Nikotinabusus der Mutter in der Schwangerschaft zurückzuführen war. Im 9. Monat wurde vom behandelnden Pädiater eine dezent muskuläre Hypotonie festgestellt, die jedoch nicht weiter abgeklärt wurde. Die sowohl unmittelbar als auch 2 Wochen nach der Geburt durchgeführten Hirnsonogramme zeigten einen Normalbefund.

Nach der intravenösen Gabe von Diazepam, Clonazepam, Phenobarbital und Lorazepam kam es nach ca. 2 Stunden zu einer Besserung der klinischen Symptomatik. Das Kind war kreislaufstabil und bei 2l/min Sauerstoff war die Sauerstoffsättigung bei 100%. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Glasgow coma scale (GCS) mit 10 bewertet. Die durchgeführte Lumbalpunktion zeigte eine Pleozytose, Glukose 4,6mmol/l (Normwert: 2,7-4,8mmol/l) und leicht erhöhte Proteine von 116mg/dl (Normwert: <45mg/l). Die Blutentnahme zeigte keine auffälligen Werte, die für ein entzündliches Geschehen sprachen (Tab. 14).

Parameter	Wert	Referenz
Hämoglobin	11,2 g/dl	11-14,4 g/dl
Thrombozyten	264/mm ³	286-509/mm ³
Leukozyten	5,700/mm ³	6,000-17,500/mm ³
Neutrophile	47%	55%-75%
Stabkernige	8%	2%-8%
Lymphozyten	37%	20%-40%
Monozyten	7%	0%-12%
Eosinophile	1%	0%-7%
c-reaktives Protein	1 mg/l	0-3 mg/l
Ammoniak	43 µmol/l	15-55 µmol/l

Tab. 14: Laborparameter des Patienten

Das Elektroenzephalogramm (EEG) zeigte generalisierte slow-wave-Komplexe, jedoch keine typische Anfallsaktivität.

Als Initialtherapie wurde eine antibiotische Dreiertherapie mit Ceftriaxon (3. Generation Cephalosporin), Ampicillin (Aminopenicillin) und Gentamicin (Aminoglykosid) sowie eine antivirale Therapie mit Aciclovir begonnen.

Zwölf Stunden nach Einlieferung zeigte die durchgeführte Magnetresonanztomographie (MRT) multiple kortikale und subkortikale Läsionen im Sinne einer Meningoenzephalitis (Abb. 5) noch unbekanntes Ursprungs. In den darauffolgenden 4 Stunden kam es zu einer weiteren Verschlechterung des Patienten, so dass der GCS mit 5 bewertet wurde. Die Pupillen waren lichtstarr mit einem Durchmesser von 8mm. Es erfolgte die Intubation und künstliche Beatmung. Nach insgesamt 24 Stunden kam es zur Verlegung auf die Intensivstation. Hier wurde ein externer ventrikulärer Shunt angelegt. Der Patient war nun komatös (GCS: 5), er zeigte sowohl keinerlei Reaktion auf von außen gesetzte Schmerzreize als auch fehlende Kornealreflexe sowie lichtstarre Pupillen bei einem Durchmesser von 5mm. Die rektal gemessene Temperatur betrug 32°C. Die Herzaktion war arrhythmisch mit einer Frequenz von 90 Schlägen pro Minute bei einem arteriell gemessenen Blutdruck von 29mmHg. Durch eine Röntgenaufnahme des Thorax in 2 Ebenen konnte die korrekte Lage des zentralen Venenkatheters und des Tubus bestätigt sowie pneumonische Infiltrate der Lunge ausgeschlossen werden. Auch nach Stabilisierung der Kreislaufsituation kam es zu keiner Besserung. Die 2 Tage nach dem MRT durchgeführte Computertomographie (CT) (Abb. 6) zeigte multiple hypodense Läsionen und Zeichen eines generalisierten Hirnödems sowie einer im MRT noch nicht vorhandenen hyperdensen arachnoidalen Anreicherung. Der über das externe Ventil gemessene Hirndruck war mit 90cm H₂O (Normwert: 8-14cm H₂O) dauerhaft erhöht. Die wiederholt abgenommenen Blut-, Urin- und Liquorproben sowie entnommenes Hirngewebe und die Spitze des externen Ventils zeigten weder in den angelegten Zellkulturen noch in der PCR Anzeichen für ein virales Geschehen (Tab. 15a, Tab. 15b).

Virus	Liquor	Gehirn	Leber	Milz	Niere	Lunge	Herz	Methode	Vor Todeseintritt getestet
HSV (PCR)	-	-	-	x	-	-	-	nested-PCR Zellkultur	+ Gehirn und Liquor
VZV (PCR)	-	-	x	x	x	x	x	nested-PCR Zellkultur	+ Gehirn und Liquor
Adenovirus (PCR)	x	-	-	-	-	-	-	nested-PCR	-
HHV-6 (PCR)	x	-	-	-	-	-	-	nested-PCR	-
HBV (PCR)	x	-	-	-	-	-	-	nested-PCR	-
HCV (PCR)	x	-	-	-	-	-	-	nested-PCR	-
ParvoB19 (PCR)	x	-	-	-	-	-	-	nested-PCR	-
CMV (PCR)	x	-	-	-	-	-	-	nested-PCR Zellkultur	-
Enterovirus (PCR)	x	-	-	-	x	-	x	RT-PCR Zellkultur	x
RSV (Antigen)	x	x	x	x	x	-	x	Antigen ELISA	x
RSV-Zellkultur	x	-	-	-	-	-	-	Zellkultur	-
Influenza A+B	x	-	-	-	-	-	-	Zellkultur	-
Mumps	x	-	-	-	-	-	-	Zellkultur	anamnestisch ausgeschlossen
Masern	x	-	-	-	-	-	-	Zellkultur	keine Symptome

x: wurde nicht durchgeführt

Tab. 15a: Durchgeführte virologische Untersuchungen des Probenmaterials; zur Verfügung gestellt vom virologischen Institut der Universitätsklinik Bonn

Virus	Liquor	Gehirn	Leber	Milz	Niere	Lunge	Herz	Methode	Vor Todesintritt getestet
hMPV (PCR)	-	+	x	x	x	+	x	RT-PCR	-
hMPV (PCR von Zellkul- tur- überstand)	-	+	x	x	x	+	x	RT-PCR von Vero- Zellkulturüber- stand	-

x: wurde nicht durchgeführt

Tab. 15b: Durchgeführte virologische Untersuchungen des Probenmaterials

Durch die breit angelegte Stoffwechselfdiagnostik konnte ein angeborenes metabolisches Syndrom ausgeschlossen werden. Ein Battered-child-Syndrom war auf Grund der unauffälligen radiologischen und ophthalmologischen Ergebnisse nicht anzunehmen.

Nachdem es innerhalb von 10 Tagen zu keiner klinischen Besserung der bestehenden Symptomatik kam, wurde der Patient extubiert und verstarb kurze Zeit später auf der Intensivstation. Eine Autopsie zur Klärung der Todesursache wurde durchgeführt.

In Rücksprache mit den behandelnden Ärzten, die für die Erstversorgung und für die weitere intensivmedizinische Betreuung (Neurochirurgie, Neuroradiologie, Neuropädiatrie) des Patienten verantwortlich waren, wurde eine Enzephalitis als Ursache der klinischen Symptomatik angenommen. Differentialdiagnostisch wurde aufgrund der radiologischen Ergebnisse (Abb. 4, 5, 6) ein Hirnödem in Folge eines Status epilepticus, einer Hyperpyrexie, Dehydratation oder Hypoxämie in Betracht gezogen, jedoch als unwahrscheinlich beurteilt.

Bei der Bearbeitung der Proben von Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Herz sowie Serum und Liquor konnte mittels RT-PCR (Tab. 4-7) in den Gewebeproben des Gehirns und der Lunge hMPV-RNS nachgewiesen wurden (Abb. 7) Darüber hinaus wurde die hMPV-RNS im Überstand von Vero-Zellen des Lungenpräparates nach 3 Wochen Inkubation reproduzierbar nachgewiesen. Die Vero-Zellen gehören zu den in der Routine eingesetzten Zellkulturen, die bei einem Verdacht auf virale Enzephalitis verwendet werden. Es wurde innerhalb von 3 Wochen kein für das hMPV oder ein anderes Virus typischer CPE in Zellkulturen gefunden.

Die jeweiligen Amplifikate der hMPV-RNS von Gehirn, Lunge und Zellkulturüberstand wurden entsprechend den in Kapitel 3 erläuterten Methoden aufgearbeitet und sequenziert (Tab. 16) und mit den im Labor des Virologischen Instituts der Universitätsklinik Bonn bislang ermittelten

hMPV-Alignments verglichen. Dadurch konnte eine Kontamination ausgeschlossen und die Verwandtschaft der gefundenen hMPV-RNS bewiesen werden.

NLD00-1 ₁₂₅₋₁₇₉	TGGGTACAACAACACTGCAGTGACACCCTCATCATTGCAACAAGAAATAACACTGTT
Gehirn	G
Lunge	G
Zellkultur	G

NLD00-1 ₁₈₀₋₂₃₄	GTGTGGAGAAATTCTGTATGCTAAACATGCTGACTACAAATATGCTGCAGAAATA
Gehirn	T G
Lunge	T G
Zellkultur	T G

NLD00-1 ₂₃₅₋₂₈₉	GGAATACAATATATTAGCACAGCTTTAGGATCAGAGAGAGTGCAGCAGATTCTGA
Gehirn	
Lunge	T
Zellkultur	

NLD00-1 ₂₉₀₋₃₄₄	GGAACTCAGGCAGTGAAGTCCAAGTGGTCTTAACCAGAACGTACTCTCTGGGGAA
Gehirn	C
Lunge	
Zellkultur	

NLD00-1 ₃₄₅₋₃₉₉	AATTAAAAACAATAAAGGAGAAGATTTACAGATGTTAGACATACACGGGGTAGAG
Gehirn	G
Lunge	G
Zellkultur	G

NLD00-1 ₄₀₀₋₄₂₆	AAGAGCTGGGTAGAAGAGATAGACAAA
Gehirn	A
Lunge	A
Zellkultur	A

Tab. 16: Alignment des hMPV (302 Nukleotide des N-Proteins) der Proben des Gehirns, der Lunge und des Zellkulturüberstandes der Vero-Zellen. NLD00-1 wurde als Referenzsequenz gebraucht.

Die histologische und immunhistochemische Aufarbeitung der Gewebeproben, die freundlicherweise vom Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Bonn (Prof. Dr. med. G. Knöpfle) zur Verfügung gestellt wurde, zeigte deutliche Zeichen der Inflammation. Im Lungengewebe fand sich ein bronchioalveoläres Exsudat mit Entzündungszellen, welches die Alveolen zum Teil atelektatisch verschloss. Die Wände der Bronchiolen waren verdickt und das auskleidende Epithel ödematös und teilweise destruiert. Die Meningen waren verdickt mit Fibrin- und Erythrozy-

tenauflagerungen sowie diffus durchsetzt von Neutrophilen, Granulozyten und Makrophagen. Bei der immunhistologischen Untersuchung konnten keine hMPV-Antigene nachgewiesen werden.

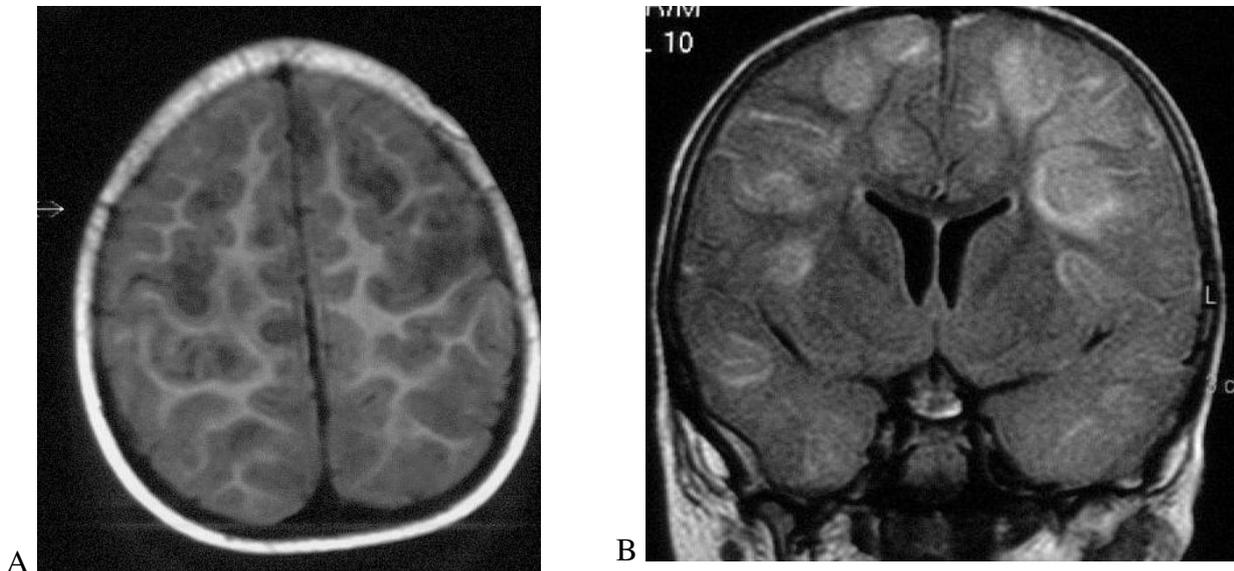


Abb. 5: Axial T1 gewichtete MRT Bild (A), coronal FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) (B); deutliche signalreiche kortikale und subkortikale Läsionen als Zeichen einer ausgeprägten Enzephalitis (Schildgen et al. 2005; zur Verfügung gestellt von Dr. med. M. Born, Radiologisches Institut des Universitätsklinikums Bonn)

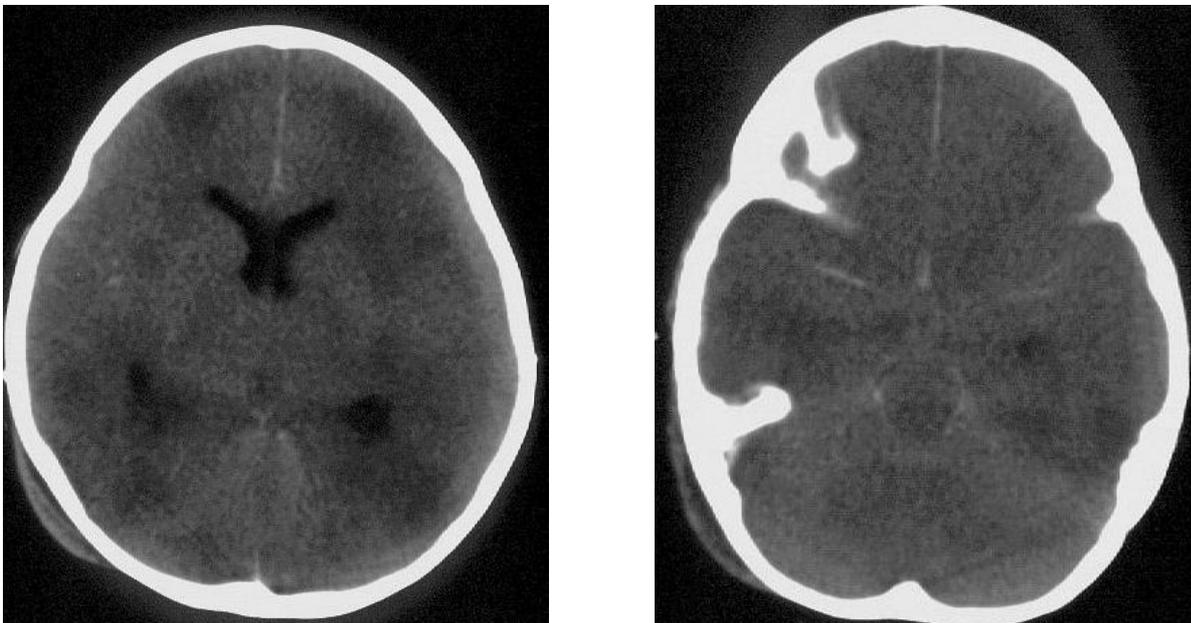


Abb. 6: CT Bilder 2 Tage nach erfolgtem MRT. Hypodense Läsionen als Zeichen eines generellen Hirnödems (Mark und Rinde); hyperdense Anreicherung im Arachnoidalraum, die im MRT noch nicht gesehen wurde (Schildgen et al. 2005; zur Verfügung gestellt von Dr. med. M. Born, Radiologisches Institut des Universitätsklinikums Bonn)

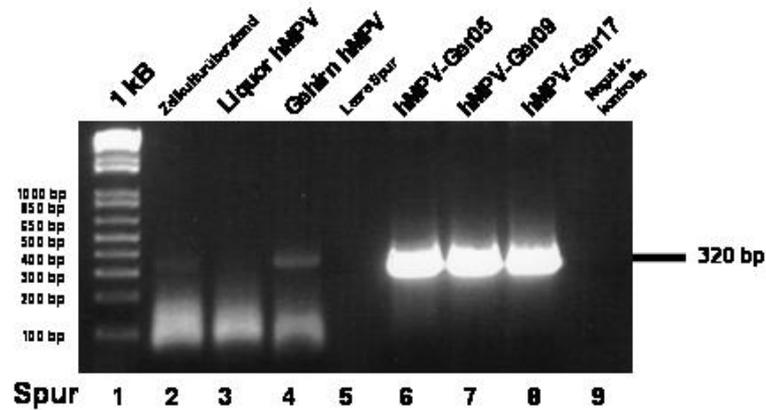


Abb. 7: Auf 2% Agarosegel aufgetragene PCR-Produkte des Vero-Zellkulturüberstandes (Spur 2), Liquor (Spur 3), Gehirn (Spur 4), sowie Plasmid-Positivkontrollen (Spur 6-8) und Negativkontrolle (Spur 9)

4.2.3 Akute Otitis media (AOM) und hMPV

Bei der Otitis media acuta handelt es sich um eine ein- oder beidseitige seröse bis eitrig-Entzündung der Mittelohrräume, die vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern bevorzugt in den Wintermonaten auftritt. Meist liegt begleitend ein Infekt der oberen Atemwege (Rhinopharyngitis) vor (Heikkinen et al. 1999). Hämatogene Infektionen dagegen sind eher selten. Ursächlich hierfür sind eine erhöhte immunologisch bedingte Infektanfälligkeit der beschriebenen Altersgruppe sowie anatomische Besonderheiten wie eine kurze und noch weite Tuba auditiva und in diesem Alter häufig vergrößerte Rachenmandeln (Adenoide), die eine aufsteigende Infektion aus dem Nasen-Rachen-Raum begünstigen. Infekte der oberen Atemwege gehen mit einem Stromaödem der Schleimhaut (vgl. Kapitel 2) der Tuba auditiva einher, was zu einer Funktions- bzw. Belüftungsstörung, dem Tubenkatarrh, führt (Corbell et al. 2004, Heikkinen et al. 1999). Dies erleichtert eine Sekundärinfektion einer primär meist viral bedingten Otitis media. Bei der eitrig-aku-

ten Form finden sich im Erregerspektrum *Streptokokken* der Gruppe A, *Pneumokokken* und *Hämophilus*. Bei der chronischen Form hingegen stehen Spezies von *Proteus*, *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* im Vordergrund. Komplikationen bestehen bei einer nicht adäquaten Behandlung in einer Fortleitung in die Schädelhöhle mit der Gefahr der Meningitis, otogenen Sepsis, Petrositis, Thrombophlebitis des Sinus sigmoideus, Labyrinthitis, Destruktion des Nervus facialis, Epidural-, Subdural- und multiplen Hirnabszessen (American Academy of Pediatrics (AAP) Subcommittee on Management of Acute Otitis Media 2004).

Die bisherigen Veröffentlichungen zu diesem Thema beschränken sich vor allem auf den Nachweis viraler Infektionen wie des RS- und Rhinovirus (Corbell et al. 2004, Heikkinen et al. 1999, Monobe et al. 2003). Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv bestand aus Rachenabstrichen (n = 104) von Patienten im Alter von 1-10 Jahren (Mittelwert: 4 Jahre), die die Symptome und klinischen Befunde einer AOM (plötzlicher Beginn, Ohrenschmerzen, Rötung und Gefäßinjektion der Membrana tympani (Trommelfell), eingeschränkte Beweglichkeit, Erguss, Spiegelbildung und Vorwölbung des Trommelfells) zeigten. Die Diagnose dieser erfolgte in einer pädiatrischen Arztpraxis (vgl. 3.1.9.2) anhand der Definition der AAP zur AOM (2004). Die Mehrheit der Patienten befand sich im Kindergartenalter zwischen 3 und 4 Jahren. 81% hatten das 5. Lebensjahr noch nicht beendet. 49 (= 47,11%) waren männlichen und 55 (= 52,89%) weiblichen Geschlechts. Die Untersuchungsmaterialien wurden im Zeitraum vom 01.11.2003 bis zum 31.03.2004 gesammelt. Der Rachenabstrich erfolgte mit einem Watteträger durch den Pädiater von der Pars oralis pharyngis. Die Lagerung des Watteträgers erfolgte in 3ml RNAlater-Puffer in einem 15ml Sammelröhrchen bei 4°C im Kühlschrank. Keiner der Patienten zeigte in seiner Krankengeschichte weder eine chronische Otitis noch ein anderes chronisches Krankheitsbild. Die RNS-Extraktion sowie die RT-PCR erfolgten nach den Herstellerangaben und den Protokollen der Tab. 3 bis 7. Jedoch wurden 15µl aus 30µl Eluat für die RT-PCR eingesetzt. Als Kontrollgruppe dienten 632 Rachen-spülwasser von Patienten mit einem respiratorischen Infekt der oberen Atemwege (Dissertation Glatzel 2008).

Insgesamt konnten bei 14 Patienten (= 13,46%) mit einer AOM hMPV-RNS nachgewiesen werden. Bei der Kontrollgruppe hingegen waren 88 Patienten (= 17,9%) positiv für hMPV-RNS, davon zeigten 13 Patienten (= 14,77%) die Symptome einer AOM.

5 Diskussion

Nach der momentan zur Verfügung stehenden Datenlage ist die häufigste Diagnose anhand der klinischen Symptomatik wie Husten, Tachypnoe, Giemen, Einziehungen, inspiratorische Rasselgeräusche und Fieber bei hMPV-positiven Patienten ein Infekt der oberen Luftwege, obstruktive Bronchitis, Bronchiolitis, Pneumonie, subglottische Laryngitis (Krupp), Asthma bronchiale mit Infektexazerbation oder eine AOM. Bei der retrospektiven Studie unserer Arbeitsgruppe (vgl. auch Dissertation Glatzel 2008) konnten unter 632 untersuchten Rachenspülwassern 88 Proben (= 17,9%) mittels RT-PCR als hMPV-positiv identifiziert werden. Dabei fielen bei Einsicht in die jeweilige klinische Symptomatik der Patienten, die im Ergebnisteil beschriebenen 2 Einzelfälle auf. Denn hier waren zum einen ein Patient mit einer Enzephalitis unklarer Genese, zum anderen eine akute Exazerbation eines Asthma bronchiale mit vorher bekanntem Infekt der oberen Atemwege beschrieben. Gleichzeitig lag der Prozentsatz an Patienten, die klinisch an einer AOM erkrankt waren, bei 14,77%. Die bisherigen Veröffentlichungen zu diesem Thema beschränkten sich vor allem auf den Nachweis viraler Infektionen wie die mit RSV und Rhinoviren (Corbell et al. 2004, Heikkinen et al. 1999, Monobe et al. 2003).

5.1 hMPV und Asthma

Virale Infektionen der Atemwege stehen in einem engen Zusammenhang mit rezidivierenden Atemwegsobstruktionen bei Klein- und Asthma bei älteren Kindern (Arruda et al. 2005). Anhand der Möglichkeiten der PCR konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der akuten Exazerbationen eines Asthma bronchiale bei Kindern und annähernd bei 50% der Erwachsenen viraler Genese sind (Nicholson et al. 1993, Johnston et al. 1995). Auch das Auslösen einer dem Asthma ähnlichen klinischen Symptomatik im Alter bis 3 Jahre mit einer daraufhin verbundenen Hospitalisation sind häufig (Heymann et al. 2004, Jartti et al. 2004, Jartti et al. 2002, Williams et al. 2005). Bei der Mehrheit der Kinder im Alter zwischen 3 und 18 Jahren mit einer obstruktiven Symptomatik zeigten sich atopische Charakteristika. Diese sind zum einen ein Risikofaktor für die Hospitalisation, zum anderen Ausdruck der antiviralen Immunantwort. Vor allem RSV und Rhinoviren scheinen für einen großen Teil der durch virale Infektionen getriggerten Episoden verantwortlich zu sein (Ogra et al. 2004, Heymann et al. 2004). So konnte bei Patienten mit einem bekannten Asthma bronchiale eine Übererregbarkeit des Respirationstraktes nach einem „banalen“ Virusinfekt noch bis zu 11 Wochen später nachgewiesen werden (Xepapadaki et al. 2005). Risikofaktoren wie Frühgeburtlichkeit und deren Folgen, kongenitale Herzfehler, chronische

Lungenerkrankungen oder Immundefekte nehmen eine weitere wichtige Rolle ein. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten einen Zusammenhang zwischen Infektionen des unteren Respirationstraktes mit RSV und einer bronchialen Hyperreagibilität, obstruktiven Bronchitis und Asthma bronchiale bei Kindern im Schulalter (Schauer et al. 2002, Sigurs et al. 1995, Sigurs et al. 2005, Stein et al. 1999). Kinder mit wiederholt obstruktiven Episoden nach der ersten RSV-Infektion zeigen erhöhte IgE-Werte gegen Respiratorische- und Nahrungsallergene (Schauer et al. 2002, Sigurs et al. 1995). Eine Assoziation von hMPV und Asthma Exazerbationen ist bisher Bestandteil kontroverser Diskussionen. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnte in einem Fall hMPV bei einem 6,5 Jahre alten Mädchen mit akuter Exazerbation eines bekannten Asthma bronchiale nachgewiesen werden (Schildgen et al. 2004). Dieser Fall dokumentiert eindrücklich, dass Klinik und Verlauf einer hMPV-Infektion nicht von denen einer RSV-Infektion zu unterscheiden sind. Deutlich wurde zudem, dass das hMPV in der Lage ist, als Trigger einer chronisch entzündlichen Lungenerkrankung zu fungieren. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen entsprechen darüber hinaus den gewonnenen Erkenntnissen.

Der Gruppe um Jartti gelang es im Jahr 2002 mittels PCR bei 10 von 132 Kindern (= 9%) im Alter von 4-13,5 Jahren mit asthma-ähnlichen Symptomen das hMPV nachzuweisen. Von diesen 10 Kindern wurde bei 5 klinisch eine Bronchiolitis beobachtet. Das Bild einer obstruktiven Bronchitis zeigten 4 Kinder und bei einem Patienten wurde die Erstdiagnose eines akuten Asthma bronchiale gestellt (Jartti et al. 2002). Bei dieser Studie galten schwere chronische Allgemeinerkrankungen – außer Asthma bronchiale – sowie die inhalative Behandlung mit Glucokortikoiden als Ausschlusskriterium. Dahingegen konnte die Gruppe um Rawlinson im Dokumentationszeitraum 2001-2002 (Sommer/Winter) keine vermehrten hMPV-Infektionen in Zusammenhang mit einem Asthma bronchiale nachweisen. Der Nachweis von Rhinoviren hingegen war deutlich signifikant ($P = 0,001$) mit Asthma korreliert, hMPV konnte lediglich vereinzelt nachgewiesen werden (Rawlinson et al. 2003). In der Studie ($n = 48$) der vorliegenden Arbeit konnten 3 Fälle nachgewiesen werden, bei denen hMPV die gesicherte Ursache der Exazerbation war. Zudem wies sie die Ähnlichkeit der klinischen Symptome einer hMPV-Infektion mit denen einer RSV-Infektion nach (Schildgen et al. 2005).

Bei der Betrachtung der Vorgänge der Pathogenese des durch das RSV hervorgerufenen Infektes der unteren Atemwege bei Kindern und Erwachsenen und in verschiedenen Tiermodellen kommt es zu einer Verschiebung der Immunantwort zu Gunsten der Th2-Leukozyten. Aufgrund der Produktion und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen des Bronchialepithels kommt es zudem

zu einer Erhöhung der Konzentrationen von IgE, α 2-Makroglobulin und IL4, IL5, IL10 und IL8 Tumornekrosefaktor α im Bronchialsekret (Contoli et al. 2005, Gern et al. 2005, Montalbano et al. 2002, Weinberger 2003, 2004). Auch die Stimulation sensorischer Nervenenden führt durch Mediatoren (Tachykinine, Neurokinine) oder durch die Interaktion mit nicht adrenergen oder cholinergen Nervenendigungen, die über Stickstoffmonoxid für eine Bronchodilatation zuständig sind, zu einer parasymphatischen Bronchokonstriktion (Contoli et al. 2005). Diese antivirale Immunantwort, initiiert von infizierten Epithelzellen, führt zum einen zur Beseitigung des infektiösen Agens, zum anderen aber zu einer Zunahme der Asthmasymptomatik und der Hyperreagibilität (James, Gern 2003). Die Arbeitsgruppe um Contoli beschrieb virusinduzierte Signaltransduktionswege über Adhäsionsproteine (ICAM-1), verschiedene intrazelluläre Produkte, die zu einer Aktivierung von Proteinkinase R, nukleärem Faktor κ B und p38 (mitogen aktivierte Proteinkinase) und letztlich zu einer vermehrten Bildung proinflammatorischer Proteine, Koloniestimulierender Faktoren und zu Adhäsionsproteinen führt (Contoli et al. 2005). Lemanske untersuchte prospektiv die Rolle von Infektionen mit Rhinoviren bei Kindern mit allergisch genetischem Hintergrund von 0 bis 3 Jahren. Hierbei zeigte sich, dass eine Rhinovirus-Infektion innerhalb des ersten Lebensjahres für weitere obstruktive Episoden prädisponiert (Lemanske et al. 2005). Es wird vermutet, dass insbesondere das RSV für einen großen Teil der akuten Episoden bei einem Asthma bronchiale (70%) verantwortlich ist (Gern 2004, Ogra et al. 2004). Ähnliche Effekte wurden auch bei der Bronchiolitis durch Rhinoviren gesehen (Jartti et al. 2005). Juntti et al. (2005) zeigten, dass Kinder mit Asthma bronchiale, die innerhalb des ersten Lebensjahres in einer Klinik auf Grund einer RSV-Infektion behandelt wurden im Vergleich mit asthmatischen Kindern, die nicht an einer RSV-Infektion erkrankt waren, unterschiedlich hohe Werte von Interferon γ und ICAM-1 (CD54) zeigten. Es wird davon ausgegangen, dass der chronische Inflammationszustand durch das epitheliale Adhäsionsmolekül ICAM 1 bei Patienten mit Asthma bronchiale zusätzlich gesteigert wird. Zudem steht die Frage offen, ob schwere Infektionen im Säuglingsalter zur Entstehung einer anhaltenden bronchialen Hyperreagibilität oder eines Asthma bronchiale im weiteren Lebensverlauf prädisponieren.

Zusammenfassend lässt sich auf Grund der bisherigen epidemiologischen Daten feststellen, dass respiratorische Viren und somit auch das hMPV die häufigsten Auslöser für Exazerbationen eines akuten Asthma bronchiale Anfalls darstellen. Experimentelle Infektionen mit respiratorischen Viren bei humanen Probanden mit und ohne Asthma-Krankengeschichte haben gezeigt, dass der Entstehungsmechanismus multifaktorieller Genese ist (Yang 2000) und zudem keine wesentli-

chen Unterschiede in der antiviralen, epithelialen Antwort zeigt. So werden in den unteren Atemwegen unterschiedliche proinflammatorische Moleküle gebildet (Zytokine, Interleukine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle), die jedoch meist nicht spezifisch für ein spezielles Virus sind, sondern bei jedem Virus ähnlich ablaufen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das hMPV genauso in der Lage ist, eine Asthma-Exazerbation auszulösen, wie es z.B. bisher bei den am häufigsten nachgewiesenen Rhinoviren oder RSV der Fall ist. Doch ob hMPV häufiger mit Asthma-Exazerbationen assoziiert ist als andere Viren, ist anhand der spärlichen Datenlage noch unklar.

5.2 hMPV und Otitis media

Die Diagnose der AOM wird zum Teil auch heute noch als eine hauptsächlich durch Bakterien ausgelöste Infektion angesehen, obwohl Studien über die letzten Jahrzehnte eine Verbindung zwischen einer AOM und viralen, respiratorischen Erregern gezeigt haben. So wurden deutliche Zusammenhänge zwischen saisonalen Höhepunkten respiratorischer Viren und Otitis media (Hendersen et al. 1986) ebenso wie Fallstudien zu viral ausgelösten Otitiden dokumentiert (Chonmaitree et al. 1986, Heikkinen et al. 1999). Der finnischen Arbeitsgruppe um Nokso-Koivisto gelang 2004 anhand zweier groß angelegter Kohortenstudien zu zeigen, dass die AOM bei 54%-67% der Patienten primär viralen Ursprungs ist. Hierbei machten Rhinoviren mit 32%-41% den größten Anteil aus. Das RSV als zweithäufigster Erreger wurde in 9%-10% der Fälle nachgewiesen. In dieser Studie war das hMPV nicht Teil der durchgeführten Diagnostik.

In dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv von n=104 konnte bei 14 Patienten (13,46%) das hMPV nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe n=637 konnte bei 88 Patienten (13,81%) das hMPV mittels RT-PCR detektiert werden. Bei dem zu untersuchenden Kollektiv hatten 81% der Patienten das 5. Lebensjahr noch nicht beendet und lagen somit im Hauptinfektionsalter für das hMPV. Der Probenzeitraum erstreckte sich vom 01.11.2003 bis zum 31.03. 2004 und lag damit im saisonalen Höhepunkt respiratorischer Infekte.

Verglichen mit den Ergebnissen der Studie von Nokso-Koivisto konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit dem hMPV in Verbindung mit einer AOM mindestens genauso häufig beteiligt ist wie eine Infektion mit dem RSV. Zudem unterstützt es die von Wilkesmann et al. (2006) anhand der in dieser Doktorarbeit präsentierten Daten aufgestellte These, dass die Symptomatik und Klinik einer RSV- und einer hMPV-Infektion nicht zu unterscheiden sind.

Weitere Studien zu diesem Themengebiet zeigten unterschiedliche Ergebnisse. So konnten bei Boivin et al. (2003) von 12 Patienten (50%) mit der epikritischen Hauptdiagnose einer AOM eine hMPV-Infektion nachgewiesen. Jedoch muss hierbei bedacht werden, dass die Fehlerrate bei einer so kleinen Probandenanzahl enorm hoch sein kann. Das Alter der Patienten in dieser Studie lag bei bis zu 3 Jahren. Die Proben wurden auch hier während des saisonalen Höhepunktes (Dezember bis April) gesammelt. McAdam et al. (2004) wiesen dagegen eine hMPV-Infektion lediglich bei 5,8% der Patienten mit einer AOM nach (n=54). Das Einschlussalter der Patienten lag hierbei jedoch bei bis zu 18 Jahren. Mullins et al. testeten 2004 mittels RT-PCR 26 von 668 Proben positiv auf hMPV (= 3,9%). Bei 4 dieser Patienten (= 15,4%) ließ sich in der Epikrise lediglich eine AOM nachweisen. Das hierbei untersuchte Patientenkollektiv zeigte die Symptome eines Infektes der oberen Atemwege, alle Patienten waren hospitalisiert und hatten das 5. Lebensjahr noch nicht überschritten. Der Probenzeitraum umfasste die Monate von August 2000 bis September 2001.

Sämtliche der hier vorgestellten und zu diesem Thema bisher veröffentlichten Daten weisen eindeutig auf einen Zusammenhang zwischen einer Beteiligung des hMPV bei der Entstehung einer primären AOM hin. Darüber hinaus lassen sich anhand der finnischen Studie von Nokso-Koivisto Rückschlüsse in Klinik und Symptomatik im Vergleich mit dem RSV ziehen.

So kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass hMPV-Infektionen bei Kindern keinesfalls milder und insbesondere im Bezug auf eine AOM weniger häufig auftreten als RSV-Infektionen.

5.3 hMPV und Enzephalitis

Der in dieser Arbeit vorgestellte Fallbericht einer letal endenden Enzephalitis, vermutlich ausgelöst durch eine Infektion mit dem hMPV, ist der erste publizierte Fall einer im Gehirn nachgewiesenen hMPV-Infektion (Schildgen et al. 2005). Neben dem Nachweis des Virus mittels RT-PCR aus Gehirn- und Lungenmaterial des Patienten bestehen noch weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer Enzephalitis und dem neu entdeckten Paramyxovirus. So zeigten Chua und auch Paton mit den jeweiligen Arbeitsgruppen sowohl eine ähnliche neurologische Klinik als auch analoge MRT-Befunde bei Patienten mit einer Infektion mit dem Nipah-Virus (Chua et al. 1999, Paton et al. 1999), das zur Unterfamilie der Paramyxoviren gehört (Tab. 2). Mittlerweile gelang es einer Arbeitsgruppe aus Japan in einer über einem Jahr angelegten hMPV-Studie einen weiteren Fall einer Enzephalitis bei einem hMPV-positiven Patienten nachzuweisen. Jedoch wurde hier hMPV nicht aus Liquor cerebrospinalis nachgewiesen sondern lediglich aus ei-

nem Rachenspülwasser (Kaida et al. 2006). Die beschriebenen Fälle weisen somit auf die Möglichkeit einer systemischen Ausbreitung des hMPV hin.

Eine endgültige Aussage über die Pathogenese des hMPV in Bezug auf eine neurologische Beteiligung und Symptomatik bedarf weiterer Studien in diesem Bereich. Bei dem bisherigen Wissen über das Virus ist zu empfehlen, bei jeglichem Verdacht auf ein enzephalitisches Geschehen unklarer Genese bei Kindern das hMPV in das Screening der neurotrophen Viren mit aufzunehmen. Diese Maßnahme könnte das Wissen über die klinischen Aspekte der Pathogenese und Therapie des hMPV wesentlich voranbringen.

6 Zusammenfassung und Perspektiven

Die Ursachen respiratorischer Erkrankungen im Kindesalter sind bei weitem noch nicht vollständig aufgeklärt. In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Viren entdeckt, deren Nachweis in Proben des Respirationstraktes mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert ist. Das humane Metapneumovirus (hMPV) wurde 2001 von der Arbeitsgruppe um van den Hoogen entdeckt (van den Hoogen et al. 2001). Es gehört zur Paramyxovirus-Familie und ist eng verwandt mit dem Pneumovirus RSV. Als weltweit verbreiteter Erreger viraler Atemwegsinfektionen vor allem im Kindes-, aber auch im Erwachsenenalter (Crowe 2004, van den Hoogen et al. 2004, Williams et al. 2004) verursacht das hMPV obstruktive Bronchitiden (Jarri et al. 2002, Schildgen et al. 2004), Bronchiolitiden und Pneumonien vor allem bei Kleinkindern in den ersten 1,5 Lebensjahren. Eine hMPV-Infektion zeigt eine ähnliche klinische Symptomatik sowie wahrscheinlich eine ähnliche Verteilung der Risikofaktoren wie RSV (Ogra 2004). Das Risiko von Komplikationen oder einer Hospitalisierung bei einer Infektion mit hMPV scheint bei Kindern mit einer zusätzlichen Belastung wie Frühgeburtlichkeit, chronischen Lungenerkrankungen (Ulloa-Gutierrez et al. 2004), hämodynamisch relevanten Herzvitien oder neuromuskulären Erkrankungen (Panitch 2004) sowie bei Patienten mit Immunsuppression auf Grund peripherer Stammzell- oder Organtransplantation (Ison et al. 2002, Pelletier et al. 2002) höher zu sein.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein sensitives und für die tägliche klinische Routine praktikables und optimiertes Verfahren zur Gewinnung, Aufbereitung und zum Nachweis von hMPV-RNS aus Rachenspülwassern, Rachenabstrichen und verschiedenen Geweben einzuführen. Die in dieser Arbeit etablierten RT-PCR Protokolle werden seit Anfang des Jahres 2006 bei Patienten mit Verdacht auf eine hMPV-Infektion in der Friedrich Wilhelms-Universitätsklinik Bonn routinemäßig und mit Erfolg verwendet.

Ein weiteres Ziel bestand darin, eine Aussage über die Häufigkeit einer hMPV-Infektion in Korrelation zur bestehenden Klinik und Symptomatik im Vergleich mit anderen respiratorischen Viren zu machen. Insgesamt wurden 743 Patienten-Proben aufgearbeitet und mittels RT-PCR analysiert und gezielt hMPV-Amplifikate sequenziert. Von diesen 743 untersuchten Proben wurden 102 (13,7%) positiv auf hMPV-RNS getestet. Bei der Gegenüberstellung der vorhandenen Klinik zeigte sich deutlich das breite Spektrum der Pathogenese einer hMPV-Infektion, das von vermehrten Apnoen bei Frühgeborenen, einer leichten katarrhalischen Symptomatik, einer AOM über segmentale und lobäre Pneumonien sowie Exazerbationen eines Asthma bronchiale bis hin zu einer fatalen Enzephalitis reichte. Deutlich wurde, dass hMPV-Infektionen sogar häufiger auf-

traten als RSV-Infektionen. Auch die Intensität der Symptomatik der hMPV-Infektion war mit der einer RSV-Infektion vergleichbar. So konnte bei einem anderen von in einer ambulanten Kinderarztpraxis gesammelten Patientenkollektiv von 104 Patienten mit einer AOM in 13,46% das hMPV nachgewiesen werden. Vergleichbare Studien zum RSV zeigten hierbei lediglich 9%-10%. Zudem wurde anhand einer Fallbeschreibung gezeigt, dass eine akute Exazerbation eines Asthma bronchiale auch durch eine Infektion mit dem hMPV ausgelöst sein kann. Erstmals ist es in dieser Arbeit gelungen, bei einem Patienten, der an einer akuten Enzephalitis verstarb, hMPV-RNS im Gehirn- und Lungengewebe nachzuweisen. Damit wird nochmals die Relevanz einer hMPV-Infektion im klinisch-pädiatrischen Alltag verdeutlicht.

Aufgrund der Tatsache, dass die ätiologische Zuordnung des hMPV und der zugehörigen Erkrankung nicht eindeutig durch klinische oder bildgebende Verfahren möglich ist, kommt der gezielten virologischen Diagnostik große Bedeutung zu. Die bisher zu hMPV-Infektionen vorliegende Datenlage beschränkt sich hauptsächlich auf retrospektive Studien. Aus diesem Grund müsste ein für jeden zugänglicher, in Sensitivität und Spezifität ausreichender Antigenschnelltest (siehe RSV, Influenza A, B) und/oder eine für jede Klinik in die tägliche Routine integrierbare hMPV-PCR entwickelt werden. Zudem ist eine Weiterentwicklung bereits bestehender Therapiemöglichkeiten wie mit Ribavirin oder mit polyklonalem humanen Immunglobulin erstrebenswert, so dass neben einer adäquaten Diagnose auch eine wirksame Therapie möglich wäre. Die Weiterentwicklung der therapeutischen Möglichkeiten würde die Dauer der stationären Behandlung verkürzen und zu einer Abmilderung hMPV-bedingter Langzeitfolgen (rezidivierende Atemwegsobstruktionen) führen. Somit könnten sowohl die Belastungen des einzelnen Patienten, als auch die immer knapper werdenden Ressourcen des Gesundheitssystems reduziert werden. Zudem würden diese Maßnahmen das Wissen über die klinischen Aspekte, die Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des hMPV wesentlich erweitern und somit die klinische Relevanz und Akzeptanz dieses Virus in der Pädiatrie weiter festigen.

7 Literaturverzeichnis

- Afzal M, Pickford A, Forsey T, Heath AB, Minor PD. The Jeryl Lynn vaccine strain of mumps virus is a mixture of two distinct isolates. *J Gen Virol* 1993; 74: 917-920.
- Arruda LK, Sole D, Baena-Cagnani CE, Nasпитz CK. Risk factors for asthma and atopy *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5: 153-159.
- Arya LS, Tanna I, Tahiri C, Saidali A, Aingh M. Spectrum of complications of measles in Afghanistan: a study of 784 cases. *J Trop Med Hyg* 1987; 90: 117-122.
- Bastien N, Ward D, van Caesele P, Brandt K, Lee SH, McNabb G, Klisko B, Chan E, Li Y. Human metapneumovirus infection in the Canadian population. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4642-4646.
- Bastien N, Liu L, Ward D, Taylor T, Li Y. Genetic variability of the G glycoprotein gene of human metapneumovirus *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3532-3537.
- Beard CM, Benson RC Jr, Kelalis PP, Elveback LR, Kurland LT. The incidence and outcome of mumps orchitis in Rochester, Minnesota, 1935 to 1974. *Mayo Clin Proc* 1977; 1: 3-7.
- Bloch AB, Orenstein WA, Ewing WM, Spain WH, Mallison GF, Herrmann KL, Hinman AR. Measles outbreak in a pediatric practice: airborne transmission in an office setting. *Pediatrics* 1985; 75: 676-683.
- Blumberg BM, Leppert M, Kolakofsky D. Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell* 1981; 23: 837-845.
- Böcker W, Denk H, Heitz U. Pathologie. München: Urban und Fischer, 2001.
- Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, Peret TC, Erdmann DD, Anderson LJ. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002; 186: 1330-1334.
- Boivin G, De Serres G, Cote S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, Bergeron MG, Dery P. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 634-640.
- Boivin G, Mackay I, Sloots TP, Madhi S, Freymuth F, Wolf D, Shemer-Avni Y, Ludewick H, Gray GC, LeBlanc E. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1154-1157.
- Bosis S, Esposito S, Niesters HG, Crovari P, Osterhaus AD, Principi N. Impact of human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease. *J Med Virol* 2005; 75: 101-104.
- Buchholz UJ, Biacchesi S, Pham QN, Tran KC, Yang L, Luongo CL, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL. Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation and immunogenicity. *J Virol* 2005; 79: 6588-6597.
- Cane PA, van den Hoogen BG, Chakrabarti S, Fegan CD, Osterhaus AD. Human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 309-310.
- Chanock RM, Murphy BR, Collins PL. Parainfluenza Viruses. In: Knipe DM, Howley PM, Hrsg. *Fields Virology Fourth Edition*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 1341-1379.

- Christensen A, Nordbo SA, Jeansson S, Slordahl S. Lower respiratory tract infection caused by human metapneumovirus in two children: the first report of human metapneumovirus in Norway. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 772-774.
- Chonmaitree T, Howie V M, Truant A. Presence of respiratory viruses in middle ear fluids and nasal wash specimens from children with acute otitis media. *Pediatrics* 1986; 77: 698-702.
- Chua KB, Goh KJ, Wong KT, Kamarulzaman A, Tan PS, Ksiazek TG, Zaki SR, Paul G, Lam SK, Tan CT. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* 1999; 354: 1257-1259.
- Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory Syncytial Virus. In: Knipe DM, Howley PM, Hrsg. *Fields Virology Fourth Edition*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 1443-1485.
- Contoli M, Caramoni G, Mallia P, Johnston S, Papi A. Mechanisms of respiratory virus-induced asthma exacerbations. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 137-145.
- Corbell L. The "wait and see" approach of acute otitis media. *Eur J Pediatr* 2004; 164: 1-2.
- Crowe JE Jr. Human metapneumovirus as a major cause of human respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 215-221.
- Curran J, Marq JB, Kolakofsky D. The Sendai virus nonstructural C proteins specifically inhibit viral mRNA synthesis. *Virology* 1992; 189: 647-656.
- Dawson JR. Cellular inclusions in cerebral lesions of lethargic encephalitis. *Am J Pathol* 1933; 9: 7-15.
- van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719-724.
- van den Hoogen BG, Doornum GJ van Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R, Osterhaus AD, Fouchier RA. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis* 2003; 188: 1571-1577.
- van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, de Swart RL, Osterhaus AD, Fouchier RA. Antigenic and genetic variability of human metapneumovirus. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 658-666.
- Dollner H, Risnes K, Radtke A, Nordbo SA. Outbreak of human metapneumovirus infection in norwegian children. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 436-440.
- Donohue WL, Playfair FD, Whitaker L. Mumps encephalitis: Pathology and pathogenesis. *J Pediatr* 1955; 47: 395-412.
- Druce J, Tran T, Kelly H, Kaye M, Chibo D, KostECKI R, Amiri A, Catton M, Birch C. Laboratory diagnosis and surveillance of human respiratory viruses by PCR in Victoria, Australia, 2002-2003. *J Med Virol* 2005; 75: 122-129.
- Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Ishiko H, Kobayashi K. Comparison of the seroprevalence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus. *J Med Virol* 2004; 72: 304-306.

- Eisberger H, Mertz R, Hofschneider PH, Neubert WJ. Purification, renaturation, and reconstituted protein kinase activity of the Sendai virus large (L) protein: L protein phosphorylates the NP and P proteins in vitro. *J Virol* 1990; 64: 4274-4280.
- Falke D, Modrow S, Truyen U. *Molekulare Virologie*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
- Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 2003; 187: 785-790.
- Fleischer B, Kreth HW. Mumps virus replication in human lymphoid cell lines and in peripheral blood lymphocytes: Preference for T-cells. *Infect Immun* 1982; 35: 309-313.
- Fodha I, Legrand L, Vabret A, Jrad T, Gueddiche N, Trabelsi AF, Freymuth F. Detection of human metapneumovirus in two Tunisian children. *Ann Trop Paediatr* 2004; 24: 275-276.
- Freymuth F, Vabret A, Legrand L, Eterradosi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, Guillois B. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 82-94.
- Galiano M, Videla C, Puch SS, Martinez A, Echavarria M, Carballal G. Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J Med Virol* 2004; 73: 299-303.
- Gardner PS, McQuillin J, Court SD. Speculation on pathogenesis in death from respiratory syncytial virus infection. *Br Med J* 1970; 1: 327-330.
- Gern JE. Viral respiratory infections and the link to asthma. *J Pediatr Infect Dis* 2004; 23: 78-86.
- Gern JE, Rosenthal LA, Sorkness RL, Lemanske RF Jr. Effects of viral respiratory infections on lung development and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 668-674.
- Gibbs FA, Gibbs EL, Carpenter PR, Soies HW. Electroencephalographic abnormality in uncomplicated childhood diseases. *JAMA* 1995; 171: 1050-1055.
- Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 372-375.
- Gremillion DH, Crawford GE. Measles pneumonia in young adults. An analysis of 106 cases. *Am J Med* 1981; 71: 539-542.
- Halsey NA, Modlin JF, Jabbar JT, Dubey L, Eddins DL, Ludwig DD. Risk factors in subacute sclerosing panencephalitis: a case-control study. *Am J Epidemiol* 1980; 111: 415-424.
- Heikkinen T, Järvinen A. The common cold. *Lancet* 2003; 361: 51-59.
- Heikkinen T, Thint M, Chonmaitree T. Prevalence of various respiratory viruses in the middle ear during acute otitis media. *N Engl J Med* 1999; 340: 260-264.
- Heymann PW, Carper HT, Murphy DD, Platts-Mills TA, Patrie J, Mc Laughlin AP, Erwin EA, Shaker MS, Hellems M, Peerzada J, Hayden FG, Hatley TK, Chamberlain R. Viral infections in relation to age, atopy and season of admission among children hospitalized for wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 239-247.
- Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 1135-1151.

- Horikami SM, Curran J, Kolakofsky D, Moyer SA. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol* 1992; 66: 4901-4908.
- Ishiguro N, Ebihara T, Endo R, Ma X, Kikuta H, Ishiko H, Kobayashi K. High genetic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3406-3414.
- Ison MG, Hayden FG. Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 355-367.
- James I, Gern MD. Mechanisms of virus-induced asthma. *J Pediatr* 2003; 142: 9-14
- Jartti T, van den Hoogen BG, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002; 360: 1393-1394.
- Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after severe early childhood wheezing. *J Med Virol* 2004; 72: 695-699.
- Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Osterback R, van den Hoogen BG, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1095-1101.
- Jartti T, Makela MJ, Vanto T, Ruuskanen O. The link between bronchiolitis and asthma. *Infect Dis Clin North Am* 2005; 19: 667-689.
- Johnson KM, Chanock RM, Rifkind D, Kravetz HM, Knight V. Respiratory syncytial virus. IV. Correlation of virus shedding, serologic response, and illness in adult volunteers. *JAMA* 1961; 176: 663-667.
- Johnston PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 5625-5629.
- Johnston SL, Pattermore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Toole S, Myint SH, Tyrrell DA. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995; 310: 1225-9.
- Juntti H, Kokkonen J, Dunder T, Renko M, Karttunen R, Uhari M. Serum concentration of interferon-gamma and intercellular adhesion molecule-1 eight years after an early respiratory syncytial virus infection. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 59-63.
- Kaida A, Iritani N, Kubo H, Shiomi M, Kohdera U, Muratami T. Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City. *J Clin Virol* 2006; 35: 394-399.
- Kamahora J, Nii S. Pathological and immunological studies of monkeys infected with measles virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 1961; 16: 161-167.
- Kapikian AZ, Bell JA, Mastrota FM, Johnson KM, Huebner RJ, Chanock RM. An outbreak of febrile illness and pneumonia associated with respiratory syncytial virus infection. *Am J Hyg* 1961; 74: 234-248.
- Kilham L. Isolation of mumps virus from the blood of a patient. *Proc Soc Exp Biol Med* 1948; 69: 99-100.
- Kilham L. Mumps meningoencephalitis with and without parotitis. *Am J Child* 1949; 78: 324-333.

Koletzko B. *Kinderheilkunde*. Berlin: Springer, 2000.

Kuiken T, van den Hoogen BG, van Riel DAJ, Laman JD, van Amerongen G, Sprong L, Fouchier RAM, Osterhaus ADME. Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. *Am J Pathol* 2004; 164: 1893-1900.

Lamp RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Hrsg. *Fields Virology Fourth Edition*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 1305-1340.

Langedijk JP, Daus FJ, van Oirschot JT. Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin. *J Virol* 1997; 8: 6155-6167.

Lemanske RF, Jackson DJ Jr, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, Kirk CJ, Reisdorf E, Roberg KA, Anderson EL, Carlson-Dakes KT, Adler KJ, Gilbertson-White S, Pappas TE, Dasilva DF, Tisler CJ, Gern JE. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 571-577.

Leung J, Esper F, Weibel C, Kahn JS. Seroepidemiology of human metapneumovirus (hMPV) on the basis of a novel enzyme-linked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1213-1219.

Ludewick HP, Abed Y, van Niekerk N, Boivin G, Klugman KP, Madhi SA: Human metapneumovirus genetic variability. *South Africa Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1074-1078.

Mackay IM, Bialasiewicz S, Waliuzzaman Z, Chidlow GR, Fegredo DC, Laingam S; Adamson P, Harnett GB, Rawlinson W, Nissen MD, Sloots TP. Use of the P gene to genotype human metapneumovirus identifies 4 viral subtypes. *J Infect Dis* 2004; 190: 1913-1918.

Madhi SA, Ludewick H, Abed Y, Klugman KP, Boivin G. Human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections among hospitalized human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected and HIV-1-uninfected African infants. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1705-1710.

Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, Lanini L, Andreoli E, Ragozzano V, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2987-2991.

McAdam AJ, Hasenbein ME, Feldmann HA, Cole SE, Offermann JT, Riley AM, Lieu TA. Human metapneumovirus at a tertiary-care hospital. *J Infect Dis* 2004; 190: 20-26.

McIntosh K, Fishaut JM. Immunopathologic mechanisms in lower respiratory tract disease of infants due to respiratory syncytial virus. *Prog Med Virol* 1980; 26: 94-118.

Merz DC, Prehm P, Scheid A, Choppin PW. Inhibition of the neuraminidase of paramyxoviruses by halide ions: A possible means of modulating the two activities of the HN protein. *Virology* 1981; 112: 296-305.

Monobe H, Ishibashi T, Nomura Y, Shinogami M, Yano J. Role of respiratory viruses in children with acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003; 72: 241-248.

Montalbano MM, Lemanske RF Jr. Infections and asthma in children. *Curr Opin Pediatr* 2002; 14: 41-46.

- Monto AS, Bryan ER, Ohmit S. Rhinovirus infections in Tecumseh, Michigan: frequency of illness and numbers of serotypes. *J Infect Dis* 1987; 156: 43-49.
- Morrison JC, Givens JR, Wiser WL, Fish SA. Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertil Steril* 1975; 7: 655-659.
- Mullins JA, Erdman DD, Weinberg GA, Edwards K, Hall CB, Walker FJ, Iwande M, Anderson LJ. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 700-705.
- Nagano I, Nakamura S, Yoshioka M, Kogure K. Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in brain lesions in subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 1991; 41: 1639-1642.
- Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbation of asthma in adults. *BMJ* 1993; 307: 982-6.
- Nicholson KG, McNally T, Silvermann M, Simons P, Zambon MC. Influenza-related hospitalizations among young children in Leicestershire. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 228-230.
- Nissen MD, Siebert DJ, Mackay IM, Sloots TP, Withers SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. *Med J Aust* 2002; 176: 188.
- Ogra PL. Respiratory syncytial virus. The virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respi Rev* 2004; 5: 119-126.
- Panitch HB. Viral respiratory infections in children with technology dependence and neuromuscular disorders. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 222-227.
- Panum P. Observations made during the epidemic of measles on the Faroe Islands in the year 1846. *Med Classics* 1938; 3: 829-886.
- Paton NI, Leo YS, Zaki SR, Auchus AP, Lee KE, Ling AE, Chew SK, Ang B, Rollin PE, Umaphathi T, Sng I, Lee CC, Lim E, Ksiazek TG. Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *Lancet*, 1999; 354: 1253-1256.
- Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee W, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003; 361: 1319-25.
- Pelletier G, Déry P, Abed Y, Boivin G. Respiratory tract reinfections by the new human metapneumovirus in an immunocompromised child. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 976-978.
- Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus AD, Erdmann DD, Anderson LJ. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis* 2002; 185: 1660-1663.
- Peret TC, Abed Y, Anderson LJ, Erdmann DD, Boivin G. Sequence polymorphism of the predicted human metapneumovirus G glycoprotein. *J Gen Virol* 2004; 85: 679-686.
- Principi N, Esposito S, Bosis S. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in children. *N Eng J Med* 2004; 350: 1788-1790.
- Rawlinson AD, Waliuzzamnn Z, Carter IV, Belessis YC, Gibert KM, Morton JR. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *J Infect Dis* 2003; 187: 1314-1318.
- Rima BK, Duprex WP. Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res.* 2005; 2: 132-147.

- Robinson JL, Lee BE, Bastien N, Li Y. Seasonality and clinical features of human metapneumovirus infection in children in Northern Alberta. *J Med Virol* 2005; 76: 98-105.
- Ross LA, Mason WH, Lanson J, Deakers TW, Newth CJ. Laryngotracheobronchitis as a complication of measles during an urban epidemic. *J Pediatr* 1992; 121: 511-515.
- Sakaguchi M, Yoshikawa Y, Yamanouchi K, Sata T, Nagashima K, Takeda K. Growth of measles virus in epithelial and lymphoid tissues of cynomolgus monkeys. *Microbiol Immunol* 1986; 30: 1067-1073.
- Schauer U, Hoffjan S, Bittscheidt J, Kochling A, Hemmis S, Bongartz S, Stephan V. RSV Bronchiolitis and risk of wheeze and allergic sensations in the first year of life. *J Eur Respir* 2002; 20: 1277-1283.
- Schildgen O, Geikowski T, Glatzel T, Simon A, Wilkesmann A, Roggendorf M, Viazov S, Matz B. New variant of the human metapneumovirus (HMPV) associated with an acute and severe exacerbation of asthma bronchiale. *J Clin Virol* 2004; 31: 283-288.
- Schildgen O, Glatzel T, Geikowski T, Scheibner B, Matz B, Bindl L, Born M, Viazov S, Wilkesmann A, Knöpfle G, Roggendorf M, Simon A. Human metapneumovirus RNA in encephalitis patient. *Emerg Inf Dis* 2005; 11: 467-470.
- Schildgen O, Geikowski T, Glatzel T, Schuster J, Simon A. Frequency of human metapneumovirus in the upper respiratory tract of children with symptoms of an acute otitis media. *Eur J Pediatr* 2005; 164: 400-401.
- Schulz B, Michaelis D, Hildmann W, Witt S, Hehmke B, Rjasanowski I. Islet cell surface antibodies (ICSA) in subjects with a previous mumps infection—a prospective study over a 4 year period. *Exp Clin Endocrinol* 1987; 90: 62-70.
- Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, Sheras P, Smyth RL, Hart CA. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005; 191: 382-386.
- Siakdopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Riggs JM, Surman SR, Amaro-Carambot E, McAuliffe JM, Elkins WR, St. Claire M, Collins PL, Murphy BR. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenetically, and the fusion (f) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J Virol* 2004; 78: 6927-6937.
- Sigurs N, Bjarnson R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Bjorksten B. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics* 1995; 95: 500-505.
- Sigurs N, Gustafsson P M, Bjarnson R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, Kjellman B. Severe respiratory syncytial virus Bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 137-141.
- Simon A, Khurana K, Wilkesmann A, Müller A, Engelhart S, Exner M, Schildgen O, Eishübinger AM, Groothuis JR, Bode U. Nosocomial respiratory syncytial virus infection: impact of prospective surveillance and targeted infection control. *Int J Hyg Environ Health* 2006; 317-324.
- Smuths HE, Kannemeyer J, Smit L, Smith T. Human metapneumovirus infection in hospital referred South African children. *J Med Virol* 2004; 73: 486-493.

- Stein RT, Sherill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, Wright AL, Martinez F D. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy at the age of 13. *Lancet* 1999; 354: 541-545.
- Stricker R, Mottet G, Roux L. The Sendai virus matrix protein appears to be recruited in the cytoplasm by the viral nucleocapsid to function in viral assembly and budding. *J Gen Virol* 1994; 75: 1031-1042.
- Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. Multiplex PCR for Typing and Subtyping Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *J of Clin Microbiol* 1998; 2990-2995.
- Symris MW, Whiley DM, Thomas M, Mackay IM, Williamson J, Siebert DJ, Nissen MD, Sloots TP. A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. *J Mol Diagn*, 2004; 6: 125-131.
- Uhlenhaut C, Kracht M. Viral infectivity is maintained by an RNA protection buffer. *J Virol Methods* 2005; 128: 189-191.
- Ulloa-Gutierrez R, Skippen P, Synnes A, Seear M, Bastien N, Li Y, Forbes JC. Life-threatening human metapneumovirus pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation in a pre-term infant. *Pediatrics* 2004; 114: 517-519.
- Venkatesh MP, Weisman LE. Prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection in infants: an update. *Expert Rec Vaccines* 2006; 5: 261-268.
- Ventre K, Randolph A. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 4: CD000181.
- Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3043-3045.
- Weinberger M. Clinical patterns and natural history of asthma. *J Pediatr* 2003; 142: 15-19.
- Weinberger M. Respiratory infections and asthma: current treatment strategies. *Drug Discov Today* 2004; 9: 831-837.
- Werno AM, Anderson TP, Jennings LC, Jackson PM, Murdoch DR. Human metapneumovirus in children with bronchiolitis or pneumonia in New Zealand. *J Pediatr Child Health* 2004; 40: 549-551.
- Wilczynski J, Litwinska B. Human metapneumovirus - new identified virus infecting human respiratory tract. *Przegl Epidemiol* 2004; 59: 129-130.
- Wilkesmann A, Schildgen O, Eis-Hübinger AM, Geikowski T, Glatzel T, Lentze MJ, Bode U, Simon A. Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *Eur J Pediatr* 2006; 165: 467-475.
- Wilkesmann A, Schildgen O, Eis-Hübinger AM, Lentze MJ, Bode U, Simon A: Das humane Metapneumovirus als Erreger von Atemwegsinfektionen bei hospitalisierten Kindern – eine Übersicht. *Klin Pädiatr* 2006; 218: 1-8.
- Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004; 5: 443-450.

- Wolf DG, Zakay-Rones Z, Fadeela A, Greenberg D, Dagan R. High seroprevalence of human metapneumovirus among young children in Israel. *J Infect Dis* 2003; 188: 1865-1867.
- Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, Boivin G, Piedra PA. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res* 2003; 60: 51-59.
- Yang KD. Childhood asthma: aspects of global environment, genetics and management. *Chang Gung Med J* 2000; 23: 641-661.
- Yang KD. Asthma management issues in infancy and childhood. *Treat Respir Med* 2005; 4: 9-20.
- Yano H, Suetake M, Endo H, Takayanagi R, Numata M, Ohyama K, Sagai S, Okitsu N, Okamoto M, Nishimura H, Kobayashi T. Isolation of measles virus from middle ear fluid of infants with acute otitis media. *J Infect* 2005; 51: 237-240.
- Zhu RN, Qian Y, Deng J, Wang F, Hu AZ, Lu J, Cao L, Yuan Y, Cheng HZ. Human metapneumovirus may associate with acute respiratory infections in hospitalized pediatric patients in Beijing, China. *Zhonghua ErKeZa Zhi* 2003; 41: 441-444.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei

Herrn Prof. Dr. med. Bertfried Matz für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie durchführen zu können.

Herrn Dipl.-Biol. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Oliver Schildgen für seine Diskussionsbereitschaft und vielfältige Unterstützung.

Den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie für die gute Zusammenarbeit und die mir entgegengebrachte Geduld, insbesondere bei Frau Prof. Dr. med. vet. Anna Maria Eis-Hübinger, Herrn Dr. rer. nat. Bernd Kupfer, Frau Bärbel Scheibner, Frau Beate Schneider, und Frau Andrea Wuttkopf.

Den Mitarbeitern der Kinderklinik, insbesondere Herrn Prof. Dr. med. Udo Bode, Herrn PD Dr. med. Lutz Bindl, Herrn PD Dr. med. Arne Simon und Frau Dr. med. Anja Wilkesmann.

Den Mitarbeitern der Radiologischen Klinik, insbesondere Herrn Dr. med. Mark Born.

Den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts, insbesondere Frau Prof. Dr. med. Gisela Knöpfle.

Herrn Dr. med. Michael Roggendorf und Herrn Dr. rer. nat. Sergei Viazov.

Herrn Dr. med. Gunter Nick, Herrn Dr. med. Rüdiger Ahl und Herrn Dr. med. Jochen Schuster.