

**Genomnachweis von
Humanem Metapneumovirus (hMPV)
bei hospitalisierten Kindern**

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

Thomas Bernd Glatzel
aus Bonn
2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Dipl.-Biol. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Oliver Schildgen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Rockstroh

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.10.2008

Aus Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie
Direktor: Prof. Dr. med. Achim Hörauf

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

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

0	Abkürzungsverzeichnis	7
1	Einleitung	9
1.1	Paramyxoviren	9
1.1.1	Einteilung	10
1.1.2	Aufbau	12
1.1.2.1	Viruspartikel	12
1.1.2.2	Genom und Genomaufbau	12
1.1.2.3	Virusproteine	14
1.1.3	Replikation	16
1.1.4	Parainfluenzaviren	17
1.1.5	Mumpsvirus	19
1.1.6	Masernvirus	20
1.1.7	Respiratory Syncytial Virus (RSV)	23
1.1.8	Humanes Metapneumovirus (hMPV)	25
1.2	Zielsetzung der Arbeit	29
2	Material und Methoden	30
2.1	Material	30
2.1.1	Geräte	30
2.1.2	Chemikalien	31
2.1.3	Medien	32
2.1.4	Zellkulturen	33
2.1.5	Stammlösungen	33
2.1.6	Puffer	34
2.1.7	Schnelltests	34
2.1.8	Reagenziensysteme	35
2.1.9	Enzyme	35
2.1.10	Nukleotide	35
2.1.11	Primer	35
2.1.12	DNA-Längenstandard	36

2.1.13	Plasmide	36
2.1.14	Proben	36
2.2	Methoden	37
2.2.1	Zellkultur	37
2.2.2	RNA-Extraktion aus Zellkulturüberstand mittels RNeasy Protect Mini Kit	38
2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
2.2.4	Gelelektrophorese	45
2.2.5	Aufreinigung der PCR-Amplifikate mittels QIAquick-PCR Purification Kit	46
2.2.6	Klonierung der PCR-Amplifikate mittels TOPO TA Cloning Kit	47
2.2.7	Sequenzierung der rekombinanten Plasmide	50
3	Ergebnisse	52
3.1	RNA-later Puffer	52
3.2	Zellkultur	53
3.3	Optimierung der PCR	53
3.4	hMPV- und RSV-Infektionen	54
3.5	Altersverteilung	55
3.6	Saisonaler Verlauf	56
3.7	Symptomatik und Diagnose	57
3.8	Koinfektionen	57
3.9	Fälle	58
3.10	hMPV und Otitis media	65
4	Diskussion	67
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	72
7	Danksagung	88

0 Abkürzungsverzeichnis:

APV	Aviäres Pneumovirus
CMV	Zytomegalie Virus
CPE	Cytopathischer Effekt
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomogramm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
FKS	Fötales Kälberserum
GCS	Glasgow coma scale
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HHV	Humanes Herpes Virus
hMPV	Humanes Metapneumovirus
HSV	Herpes simplex Virus
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton

LB	Luria-Bertani
mM	Millimolar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomogramm
ND	nicht durchgeführt
nm	Nanometer
NS	Nichtstrukturprotein
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSPE	subakute sklerosierende Panenzephalitis
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSV	respiratory syncytial virus
UV	Ultraviolett
VZV	Varizella zoster Virus
µg	Mikrogramm

1 Einleitung

Eine der häufigsten Erkrankungen im Kindesalter ist der respiratorische Infekt. Auslöser dieser Infekte sind zu einem Großteil Viren. Trotz einer Vielzahl bekannter viraler Erreger gibt es immer noch eine große Anzahl an Fällen, bei denen keines der bekannten Viren nachgewiesen werden kann. Diese Wissenslücke konnten van den Hoogen et al. 2001 mit der Entdeckung des Humanen Metapneumovirus ein Stück weit verringern (van den Hoogen et al., 2001). Beim Humanen Metapneumovirus handelt es sich um ein Paramyxovirus. Die Familie der Paramyxoviren enthält eine Reihe tier- und humanpathogener Erreger. Sie lässt sich in zwei Unterfamilien unterteilen, die Paramyxovirinae und die Pneumovirinae.

Ein besonderes Augenmerk bei der Betrachtung dieser Virusfamilie soll in der vorliegenden Arbeit auf die Pneumovirinae gelegt werden. Zum einen, weil dieser Unterfamilie das Humane Metapneumovirus zugeordnet werden kann, aber auch, da das respiratorische Syncytialvirus (RSV) und somit einer der bislang am häufigsten nachgewiesenen viralen Erreger eines Infekts der Luftwege zu dieser Unterfamilie gehört (Kim et al., 1973). Des Weiteren sollen das Mumps- und Masernvirus aus der Unterfamilie Paramyxovirinae näher besprochen werden. Bei ihnen interessiert besonders die von ihnen allerdings selten ausgelöste cerebrale Infektion. Dies erscheint vor dem Hintergrund der von uns aufgeworfenen Frage der cerebralen Infektion durch das Humane Metapneumovirus ein interessanter Aspekt.

1.1 Paramyxoviren

Paramyxoviren sind mittelgroße Viren mit einem Durchmesser von 150-350 nm und haben ein nichtsegmentiertes RNA-Genom in Negativstrangorientierung. Ihr Genom umfasst 15 bis 19 kB und kodiert für sechs bis zehn Proteine (Lamb und Kolakofsky, 2001)

Die Paramyxoviren sind wie oben erwähnt eine Reihe tier- und humanpathogener Erreger, von denen neben den oben genannten bei den humanpathogenen besonders noch die Parainfluenza-Viren zu nennen sind. Es löst das Erkrankungsbild des Pseudokrups aus, eine subglottische Laryngitis, die vor allem in den Wintermonaten eine bei Kindern häufige Erkrankung darstellt. Aus der Reihe der tierpathogenen Vertreter sind insbesondere das Hundestaube- und das Rinderpestvirus hervorzuheben.

Paramyxoviren sind über folgende fünf Eigenschaften charakterisiert:

1. Sie besitzen eine negativ-orientierte Einzelstrang-RNA, die ausschließlich in einem RNase-resistenten, helikalen Nukleocapsid gefunden wird, welches ebenfalls die virale Polymerase enthält.
2. Die Transkription wird im typischen Stop-Restart-Modus durchgeführt.
3. Die virale Replikation findet im Cytoplasma statt.
4. Die Viruspartikel bedürfen einer Lipidhülle an den Zielzellen, um dort zu binden.
5. Das Eindringen des Virus in die Zelle geschieht durch Fusion der Virus- mit der Zellmembran (Collins et al., 2001)

1.1.1 Einteilung

Die Paramyxoviren werden in zwei Unterfamilien eingeordnet: die Paramyxo- und die Pneumovirinae. Die weitere Einteilung in Genera und einige charakteristische Vertreter zeigt Tabelle 1.

Unterfamilie	Genus	Mensch	Tier
Paramyxovirinae	Respirovirus	Parainfluenzavirus Typen 1 und 3	bovines Parainfluenzavirus Typ 3, Sendaivirus
	Rubulavirus	Mumpsvirus, Parainfluenzavirus Typen 2 und 4a, b	Canines Parainfluenzavirus Typ 2,
	Avulavirus		Newcastle-Disease- Virus
	Morbillivirus	Masernvirus	Hundestaupavirus, phocine Staupeviren, Rinderpestvirus, Peste-des-Petits- Ruminants-Virus
	Henipavirus	Hendravirus Nipahvirus	Hendra Nipah Menangle
Pneumovirinae	Pneumovirus	Respiratorisches Syncytialvirus (RS- Virus)	bovines Respiratorisches Syncytialvirus, Pneumovirus der Maus
	Metapneumovirus	Humanes Metapneumovirus (hMPV)	Rhinotracheitisvirus der Pute, Aviäres Pneumovirus (APV)

Tabelle 1 Charakteristische Vertreter der Paramyxoviren eingeteilt durch das Internationale Komitee der Taxonomie von Viren im Jahre 2000

Ein weiteres Differenzierungsmerkmal der Paramyxoviren ist die Neuraminidase-Aktivität, über die einige Vertreter (Respiro- und Rubulaviren) verfügen, andere nicht. Außerdem sind manche dieser Viren zur Hämagglutination befähigt. Das Humane Metapneumovirus besitzt diese Aktivität nicht. Morbilliviren hingegen besitzen diese Fähigkeit, allerdings ohne eine Neuraminidase zu besitzen (Langedijk et al., 1997).

1.1.2 Aufbau

1.1.2.1 Viruspartikel

Die infektiösen Viruspartikel der Paramyxoviren sind meist sphärisch, selten filamentös. In der umgebenden Lipidhülle sind zwei Glykoproteine verankert – das F-Protein mit HN-, H- oder G-Protein. Diese Glykoproteine spielen bei Eintritt und Austritt des Virus aus der Wirtszelle eine entscheidende Rolle. Das Nucleocapsid umfasst drei Proteine, das P-Protein (Phosphoprotein), das L-Protein (large protein) und das N- bzw. NP-Protein (Nucleocapsidprotein), den Hauptbestandteil des Nucleocapsids.

Die drei Eigenschaften der Hämagglutination, der Adsorption und der Neuraminidase sind unter den Paramyxoviren auf unterschiedliche Proteine verteilt. Bei den Avula- und Rubulaviren vereint das HN-Protein diese drei Eigenschaften auf sich. Das HN-Protein hat ein Molekulargewicht 60-70kD. Dagegen erfüllt das H-Protein der Morbilliviren mit einem Molekulargewicht von 79kD nur die Aufgaben der Adsorption und der Hämagglutination. Über ein Protein mit Neuraminidaseaktivität verfügt dieses Virengenus nicht. Die Pneumo- und Metapneumoviren verfügen weder über ein Protein mit Neuraminidasaktivität noch über eines mit hämagglutinierenden Eigenschaften. Ihr G-Protein mit einem Molekulargewicht von 84-90kD vermittelt lediglich die Adsorption an Zellen.

1.1.2.2 Genom und Genomaufbau

Das Genom der Paramyxoviren liegt als einzelsträngige RNA in Negativstrangorientierung vor. Es umfasst zwischen 13400 und 18250 Basen. Das Genom liegt zusammen mit mehreren Proteinen als Komplex vor, der als Nucleocapsid bezeichnet wird. Zu den Proteinen zählen das P-Protein mit einem Anteil von ca. 300 Molekülen pro Partikel und das L-Protein mit ca. 30 Molekülen pro Partikel. Des

Weiteren zählt das N-Protein zu den Proteinen des Nucleocapsids. Es ist jeweils an 6 Basen des Genoms gebunden, schützt es vor Nucleasen und gibt die nötige Flexibilität zum Aufbau der linksgängigen Helix, in der das Nucleocapsid vorliegt. In Wechselwirkung mit P- und L-Protein ist das N-Protein für den Ablauf der Transkription erforderlich.

Am 3'-Ende des Genoms liegt eine 52 bis 54 Basen lange Sequenz, die als "leader" bezeichnet wird und zwar translatiert wird, aber nicht für ein bestimmtes Protein codiert.

Am 5'-Ende liegt ein nicht kodierender Abschnitt, der nicht translatiert wird. Dieser Abschnitt umfasst 40 bis 44 Basen, wird als "trailer" bezeichnet und ist das Initiationssignal für die Polymerase und für Assembly (Lamp und Kolakofsky, 2001).

Zwischen den verschiedenen Genen liegen bei den Paramyxoviren kurze, nicht transkribierte Bereiche, die sich bei den verschiedenen Vertretern unterscheiden. Beim Masernvirus lautet die Sequenz CUU CGU, beim Parainfluenzavirus GAA und beim Sendaivirus GAA GGG.

Ein weiterer Unterschied im Genomaufbau ist die Anordnung der für die Proteine codierenden Gene. Bei den Vertretern der Paramyxovirinae folgen in 3'-5'-Richtung die Proteine in folgender Reihenfolge: N-P-M-F-H/HN-L. Beim Pneumovirus weicht die Reihenfolge ab. So wird das H- bzw. HN-Protein durch 2 Proteine ersetzt und zwar zum einen durch das M2-1-Protein mit einem Molekulargewicht von 22kD, das in der Matrixproteinschicht der Viruspartikel nachgewiesen werden kann und zum anderen durch das M2-2-Protein, bei dem die Funktion noch unklar ist. Ein weiterer Unterschied des Pneumovirus im Vergleich zu Paramyxo- und Morbillivirus ist das Einfügen des G-Gens zwischen die für M- und F-Protein und die Ergänzung eines Leserahmens im 3'-Bereich für das NS1- und das NS2-Protein. Die Funktion dieser beiden Proteine ist allerdings noch nicht vollständig bekannt.

Bei RSV kennt man ihre Bedeutung aber schon sehr genau. Dort haben sie immunmodulatorische Funktion. Als Gegenspieler zu IFN- α/β blockieren sie den JAK/STAT-pathway (Kirsten et al., 2005).

Ein SH-Gen gibt es zusätzlich noch beim Pneumovirus und bei Mumpsvirus. Beim Pneumovirus codiert es für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 13 bis 40kD, beim Mumpsvirus für eines mit einem Molekulargewicht von 5kD. Im Leseraster des Metapneumovirus liegt das G-Protein-Gen vor dem L-Protein-Gen und davor wiederum

das M2- und das SH-Gen. Das F-Protein-Gen folgt auf das M-Protein-Gen (Lamp und Kolakofsky, 2001).

Das Genom des Respiro- und Morbilivirus hat die Besonderheit, dass das P-Protein per RNA-Editierung zu zwei weiteren Proteinen, dem V- und dem W-Protein, verwandelt werden kann. Beim Rubulavirus hingegen verläuft der Weg der Veränderung vom V-Protein durch Einfügen zweier Guanosin-Reste zum P-Protein (Lamp und Kolakofsky, 2001).

1.1.2.3 Virusproteine

Die Virusproteine können in Struktur- und Nichtstrukturproteine unterteilt werden, bei den Strukturproteinen unterteilt man ferner Membranproteine und Proteine des Nucleocapsids.

Bei den Membranproteinen werden Proteine mit zwei wichtigen Funktionen unterschieden. Die eine Gruppe vermittelt die Adsorption, die andere Gruppe, repräsentiert durch das F-Protein, die darauf folgende Fusion der Membranen.

Die für die Adsorption der Virenpartikel an der Zelloberfläche verantwortlichen Membranproteine sind die HN-, H- und G-Proteine. Da sie kein Signalpeptid am aminoterminalen Ende, sondern eine hydrophobe Sequenzfolge in dieser Region besitzen, werden sie als Membranproteine vom Typ II bezeichnet. Die hydrophobe Sequenzfolge vermittelt den Transport des Translationskomplexes und das Durchschleusen der Proteinkette in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums und dient als Transmembranprotein zur Verankerung des Polypeptids.

Beim HN-Protein der Respiro- und Rubulaviren handelt es sich um ein der Neuraminidase der Influenzaviren verwandtes Protein. Da N-Acetyl-Neuraminsäurereste bei vielen Paramyxoviren als zelluläre Rezeptoren dienen, erlaubt das HN-Protein über die Abspaltung dieser Reste eine effiziente Ausbreitung. Denn zum einen wird dadurch die Adsorption eines weiteren Viruspartikels an die infizierte Zelle und zum anderen die Readsorption in einer infizierten Zelle neu synthetisierter Viruspartikel verhindert. Diese beiden Funktionen des HN-Proteins werden über den pH und die Halogen-Ionen-Konzentration (Merz et al., 1981).

Die H-Proteine weisen zwar eine starke Sequenzhomologie zu den HN-Proteinen auf, verfügen aber über keinerlei Neuraminidase-Aktivität.

Das ebenfalls in der Membran der Virionen verankerte F-Protein (F=Fusion) ist ein in die Membran eingelagertes Oberflächenprotein mit einem Molekulargewicht von 60-65kD. Es besteht aus zwei Anteilen, dem F₁- und dem F₂-Anteil und induziert Membranfusionen des Virus mit anderen Membranen, insbesondere der Zellmembran bei der Infektion einer Wirtszelle. Das Vorläuferpolypeptid F₀ wird durch eine im Golgi-Bereich lokalisierte Protease in den aminoterminalen F₂-Anteil und das F₁-Protein prozessiert (Homma und Tamagawa, 1973).

Die beiden Anteile bleiben über eine Disulfidbrücke verbunden. Durch die Prozessierung wird am Aminoterminus des F₁-Proteins ein stark hydrophober Bereich von ca. 25 Aminosäuren exponiert, der die oben angesprochene Fusion der viralen und zellulären Membran vermittelt (Novick und Hoekstra, 1988).

Das M-Protein (Matrix-Protein) mit einem Molekulargewicht von 29-40kD kleidet die Innenseite der Hüllmembran aus und interagiert mit den N-Proteinen des Nucleocapsids. Dadurch ist es für die Architektur des Virus von großer Bedeutung (Stricker et al., 1994).

Das Nucleocapsid besteht aus N-, P-, und L-Protein. Dieser Komplex aus drei Proteinen ist an der Transkription des RNA-Genoms beteiligt.

Das N-Protein ist die Hauptkomponente dieses Komplexes. Der aminoterminaler Anteil dieses Proteins vermittelt das Anlagern an die Nucleinsäuren, der carboxyterminale Anteil interagiert mit P- und L-Protein. Das N-Protein erfüllt verschiedene Funktionen. Es bereitet die viruseigene RNA durch Encapsidierung zur Transkription und Replikation vor, ist während der Replikation mit P- bzw. L-Protein assoziiert und interagiert mit dem M-Protein beim Assembly. Daneben ist es ein geeigneter Marker für die Rate der Transkription und Replikation eines Virus (Blumberg et al., 1981).

Das P-Protein ist ein für die RNA-Synthese essentielles Protein (Curran et al., 1992) und ist in jeden Schritt involviert.

Das L-Protein ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die nur im Komplex mit N- und P-Protein funktioniert (Horikami et al., 1992) und zusätzlich als Proteinkinase an der Phosphorylierung der P- und N-Proteine beteiligt ist (Eisberger et al., 1990). Gemeinsam mit dem P-Protein gewährleistet das L-Protein die Synthese verschiedener RNA-Produkte, die Capping- und Methylierungsreaktion an den 5'-Enden der mRNA-Moleküle und die 3'-Polyadenylierung (Lamp und Kolakofsky, 2001).

Des Weiteren gibt es bei den Paramyxoviren Nichtstrukturproteine, für deren Synthese Sequenzen im P-Gen verantwortlich sind. In vielen Fällen ist ihre Funktion allerdings noch nicht vollständig verstanden. Dies gilt zum Beispiel für das NS1- und das NS2-Protein, die wie bereits erwähnt, bei RSV immunmodulatorische Funktion haben (Kirsten et al., 2005).

Weitere Proteine wurden beim Sendai-Virus entdeckt und sequentiell und funktionell ähnliche Proteine wird es wahrscheinlich auch bei den anderen Paramyxoviren geben. Zu den entdeckten Proteinen gehört zum Beispiel das C-Protein, bei dem die Transkriptionshemmung als mögliche Funktion diskutiert wird (Kato et al., 2004).

Die V-Proteine scheinen durch eine Hemmung des Übertritts der Zellen aus der G1- in die S-Phase die Zellproliferation zu hemmen. Weitere beim Sendai-Virus entdeckte Proteine, deren Funktion allerdings weitgehend unklar ist, gehen vom P-Gen aus. Hierbei sind z.B. das P-, X-, V- und W-Protein zu nennen.

1.1.3 Replikation

Wie bereits beschrieben, führen HN-, H- oder G-Protein zur Adsorption der Virenpartikel an die neuraminsäurederivathaltige Oberfläche von Zellen. Daneben machen sich einige Viren noch Corezeptoren zunutze, wie zum Beispiel das CD46-Protein beim attenuierten Masernvirus (Dorig et al., 1993). Im Folgenden kommt es durch das F-Protein zur Verschmelzung der Hüllmembran des Virions mit der Cytoplasmamembran und dadurch zur Aufnahme des Nucleocapsids in die Zelle.

Für diese Aufnahme muss die Interaktion zwischen M- und N-Protein beendet werden, da die stabilisierende Wirkung dieser Verbindung die Aufnahme erschweren oder behindern würde. Bei dem Orthomyxovirus Influenza A geschieht dies durch einen pH-Gradienten innerhalb der Zelle. Wie Paramyxoviren dies realisieren, ist noch nicht bekannt (Lamp und Kolakofski, 2001).

Zur nun folgenden Replikation sind sowohl viruseigene Proteine als auch die Zellorganellen der infizierten Zelle notwendig. So verfügen die Paramyxoviren über eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die in der Lage ist virale RNA in geeignete mRNA zu transkribieren.

Diese RNA-Polymerase wird auch als L-Protein bezeichnet.

Die Transkription beginnt an einer dem ersten Gen vorgeschalteten Leader-Region. Nach der dortigen Synthese von komplementärer mRNA wird der Vorgang unterbrochen und die Polymerase rückt bis zur Startregion des ersten Gens, des N-Gens, vor. Dieser Vorgang wiederholt sich analog an jedem Ende bzw. jedem neuen Anfang der Genregionen bis die Proteine N, P, M, F, HN/H/G und L vorliegen. Da die beschriebenen Stopp-Vorgänge an den jeweiligen Enden der Gene nicht immer erfolgreich sind, kommt es teilweise zum Ablösen der RNA-Polymerase an diesen Regionen. Dies führt zu einem Konzentrationsgefälle der Proteine mit zunehmendem Abstand zum 3'-Ende des Genoms. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen der Konzentration der mRNA in Zellen gestützt (Hoffman et al., 1990).

Die Funktion der ebenfalls transkribierten Leader-Sequenz ist unklar. Es wird vermutet, dass sie für die richtige Bindung der RNA-Polymerase von Bedeutung ist.

Für die für die eigentliche Replikation erforderliche komplette Neusynthese eines komplementären RNA-Stranges müssen die eben beschriebenen Stopp-Vorgänge an den Enden der jeweiligen Gene unterbunden werden. Hierfür sorgt das N-Gen. Liegt es in ausreichender Konzentration in der Zelle vor, interagiert es mit der Leader-Sequenz und leitet so die Antitermination, also den Verzicht auf die Stopps an den Enden der Gene, ein. Die so entstehenden Antigenome werden als Matrizen zur Produktion neuer Virusgenome herangezogen (Lamp und Kolakofsky, 2001).

Parallel läuft der Vorgang der Translation ab. Die Membranproteine HN/H oder G und das F₀-Protein werden am Golgi-Apparat modifiziert.

Zur Synthese neuer Viruspartikel kommt es durch die Interaktion des M-Proteins mit den Proteinen der Cytoplasma-Membran, die zur Ausstülpung der Zellmembran führt.

1.1.4 Parainfluenzaviren

Man kennt heute vier verschiedene Typen humaner Parainfluenzaviren, die per Tröpfcheninfektion übertragen werden. Die Durchseuchungsrate ist sehr hoch. So sind die meisten Kinder im Alter von vier bis fünf Jahren bereits mindestens einmal mit dem Virus infiziert worden. Alle vier Typen befallen den oberen Respirationstrakt. Typ eins bis drei lösen schwerwiegende Erkrankungen wie Bronchitis, Bronchiolitis oder den Pseudokrapp aus, während Typ vier nur für milde Erkrankungen der oberen Atemwege verantwortlich ist. Eine Zuordnung der verschiedenen Krankheitsbilder zum jeweiligen

Subtyp ist eingeschränkt möglich. So wird eine Krupp-Symptomatik am häufigsten von hPIV 1 ausgelöst, während schwerwiegenderen Verläufen mit Bronchiolitis oder Pneumonie am häufigsten eine Infektion mit hPIV 3 zugrunde liegt (Chanock et al., 2001).

Bei der klinischen Manifestation muss, abgesehen von gravierenden Verläufen bei Vorerkrankungen oder sonstiger besonderer Konstellation, zwischen dem Bild des Pseudokrups und den sonstigen Verlaufsformen unterschieden werden. Alle Infektionen beginnen mit Husten, Heiserkeit und Fieber über 38°C und gehen dann in Schnupfen, Pharyngitis, Bronchitis oder Bronchiolitis über und klingen nach fünf bis sieben Tagen ab. Beim Pseudokrupp dauert die Symptomatik länger an und wird durch den charakteristischen Husten ergänzt (Chanock et al., 2001).

Die Infektion mit Parainfluenzaviren setzt sich ausgehend von den Nasen- und Rachenschleimhäuten über den Kehlkopf, die Bronchien und die unteren Luftwege fort und infiziert das Flimmerepithel. Dort löst es eine Entzündungsreaktion aus und führt zu ödematöser Schwellung und vermehrter Schleimproduktion.

Neben dieser primären Reaktion vermutet man eine sekundäre Schädigung durch immunologische Prozesse, die zu einer Lungenentzündung führen kann. Eine weitere Möglichkeit der Entstehung einer Pneumonie ist die bakterielle Superinfektion. So weisen die in infizierter Schleimhaut vorhandenen Makrophagen eine reduzierte Phagozytoseaktivität für Streptokokken und Staphylokokken auf. Dies erleichtert eine bakterielle Superinfektion. Falls es dazu kommt, führt das durch den Streptokokken und Staphylokokken eigene Proteasen über die Spaltung des F₀-Proteins zur vermehrten Entstehung infektiöser Partikel. Die besondere Symptomatik des Pseudokrups lässt sich pathogenetisch über die starke Schwellung der Kehlkopfschleimhaut erklären.

Diagnostisch nachweisen lassen sich die Parainfluenzaviren über eine Virusisolierung und -züchtung aus Sputum oder Rachenspülwasser. Affenrienzellen (LLC-MK2) eignen sich zur Virusanzucht. Antikörpernachweise wie ELISA, der Hämagglutinationshemmtest oder die Komplementbindungsreaktion werden erst nach acht bis zwölf Tagen positiv. Auf der Ebene der Antikörper werden im Infektionsverlauf IgM, IgA und IgG gebildet. Als Schutz vor Reinfektionen gelten vor allem IgA-Antikörper in der Nasenschleimhaut. Für die Eliminierung des Virus aus dem Organismus sind vor allem cytotoxische T-Zellen von Bedeutung.

1.1.5 Mumpsvirus

Das serologisch einheitliche Mumpsvirus ist ausschließlich humanpathogen. Es hat eine hohe Seroprävalenz von ca. 90 % bei Erwachsenen. Erkrankungen, insbesondere wenn sie epidemisch verlaufen, treten vor allem im Winter und im Frühjahr auf.

Nach einer Tröpfcheninfektion kommt es während der bis zu 18-tägigen Inkubationszeit zur Vermehrung des Virus in den Epithelzellen des Hals-, Nasen- und Rachenraumes. Von da aus schreitet die Infektion über die dortigen Lymphozyten, insbesondere aktivierter T-Lymphozyten (Fleischer et al., 1982), und der lokalen Lymphknoten fort und führt so über die weitere Verteilung ins Blut des Organismus zur systemischen Infektion (Kilham, 1948).

Von dort siedelt sich das Mumpsvirus in verschiedenen Drüsen ab. Bevorzugt werden die Speicheldrüsen, vor allem die Parotis befallen.

Bis zu sieben Tage vor und neun Tage nach Ausbruch der Erkrankung wird das Virus in Speichel und Urin ausgeschieden. Die Patienten sind also in diesem Zeitraum infektiös.

In ca. 10 Prozent der Fälle kann eine Infektion mit Mumps zu einer Meningoenzephalitis führen. Dazu kommt es, wenn sich das Virus während der Virämie in den Zellen der Rückenmarks- und Gehirnhäute vermehrt (Kilham, 1949).

Nimmt man die Pleozytose als Marker für zentralen Befall, ist sogar die Hälfte aller Mumps-Infektionen von diesem begleitet (Brown et al., 1948).

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es eine Verbindung zwischen spezifischen viralen Gensequenzen und der Häufigkeit neurologischer Beteiligung gibt (Saito et al., 1996).

Typische neurologische Symptome bei einer zentralen Infektion sind die signifikanten Zeichen einer meningealen Beteiligung, so z.B. Kopfschmerzen, Fieber und Meningismus.

Das pathologische Bild einer Mumpsenzephalitis umfasst die periventrikuläre Infiltration mit mononukleären Zellen, Proliferation der Mikroglia und perivaskuläre Demyelinisierung (Donohue et al., 1955).

Die besondere Fähigkeit des Mumpsvirus die Blut-Liquor-Schranke zu überwinden und zentrale Infektionen auszulösen scheint in Zusammenhang mit der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten zentralen Infektion mit dem Humanen Metapneumovirus von besonderer Bedeutung.

Weitere Komplikationen bei einer Infektion mit dem Mumpsvirus sind in 25 Prozent der betroffenen Männer eine Hodenentzündung, bei der interstitielle Zellen befallen werden (Beard et al., 1977). Diese Komplikation tritt nur bei postpubertären Infektionen auf. Als Grund hierfür werden hormonelle Umstellungen und das Vorhandensein neuer Zellen nach der Pubertät diskutiert. In Homologie zu der hierbei zu befürchtenden Sterilität wird bei der in ein bis fünf Prozent auftretenden Eierstockentzündung die Gefahr einer vorzeitigen Menopause als mögliche Komplikation diskutiert (Morrison et al., 1975).

Des Weiteren können andere Organe wie Pankreas, Schilddrüse, Niere, Innenohr und große und kleinere Gelenke betroffen sein. Spätkomplikationen einer Mumpsinfektion sind Schwerhörigkeit und evtl. ein Diabetes mellitus Typ I. Manche Studien haben hierfür eine Assoziation aufgezeigt (Gamble, 1980), andere nicht (Schulz et al., 1987).

Der Typ II Diabetes ist aber sicher nicht mit Mumps assoziiert (Lohr et al., 1990).

Diagnostisch nachweisen lässt sich die Mumpsvirus-Infektion zum Beispiel durch PCR, ELISA, Hämagglutinationshemmtests und Komplementbindungsreaktionen.

Da keine Chemotherapie existiert, ist die prophylaktische Impfung von herausragender Bedeutung. Sie wird mit attenuierten Virusstämmen durchgeführt. In Deutschland wird hauptsächlich der Stamm Jeryl-Lynn verwandt, der einen Mix aus zwei Virusstämmen darstellt (Afzal et al., 1993).

1.1.6 Masernvirus

Die Masern sind eine weltweit verbreitete Infektion mit hohem Manifestationsindex und hoher Kontagiosität. Sie werden per Tröpfcheninfektion übertragen. Altersgipfel der Infektion ist das Kindes- und frühe Jugendalter bis zum 15. Lebensjahr.

Asymptomatische oder subklinische Verläufe sind bei Masern äußerst selten.

Meist zeigen sie nach einer neun bis 14-tägigen Inkubationszeit einen charakteristischen Verlauf (Panum, 1938). Nach einem Prodromalstadium mit Fieber, Bindehautentzündung, Lichtscheu, Husten und Schnupfen kommt es am zweiten bis dritten Krankheitstag parallel zum Fieberabfall zur Ausbildung der typischen kalkspritzerartigen Flecken in der Wangenschleimhaut, den so genannten Koplikschen Flecken (Koplik, 1896).

Der folgende zweite Fieberanstieg über 40°C ist ebenso wie die Ausbildung des typischen Exanthems Ausdruck der Virämie. Das Exanthem breitet sich hinter den

Ohren und im Nacken beginnend kraniokaudal aus. Insgesamt dauert die symptomatische Phase der Infektion ca. zehn Tage. Infektiös sind die Patienten dabei vier bis fünf Tage vor Ausbruch und bis zu vier Tage nach Ausbruch des Exanthems (Bloch et al., 1985).

Neben Exanthem und respiratorischem Erscheinungsbild löst das Masernvirus häufig Durchfall (Greenberg et al., 1991) und EKG-Veränderungen (Goldfield et al., 1994) aus. Mögliche Komplikationen einer Maserninfektion sind Pneumonie (Gremillion et al. 1981), Laryngotracheobronchitis (Ross et al. 1992), Bronchopneumonie (Arya et al., 1987), Otitis media (Yano et al., 2005) und eine postinfektiöse Autoimmunenzephalitis. In bis zu 50 Prozent der Fälle geht eine Infektion mit dem Masernvirus mit EEG-Veränderungen einher (Gibbs et al., 1959). Es ist allerdings unklar, ob dies durch eine zentrale Infektion oder über Zytokine ausgelöst wird. Ebenso wie bei Mumps wird bei einer Maserninfektion häufig eine Pleozytose beobachtet (Hanninen et al., 1980).

Ein weiterer bemerkenswerter Vorgang bei einer Maserninfektion ist die Immunsuppression. Bereits 1906 beschrieb Pirquet diesen Aspekt nach der Beobachtung, dass vorher positive Tuberkulinreaktionen bei einer Maserninfektion negativ wurden (Silverstein, 2000). Diese immunsuppressive Wirkung der Masern wird durch das SLAM-Protein (SLAM = signalling lymphocytic activation molecule) ausgelöst. Ein weiteres für die Masern wichtiges Protein ist das CD46-Protein. Bei diesem Protein handelt es sich um ein Glykoprotein menschlicher Zellen und Affenzellen, das mit dem H-Protein der Masern interagiert. Es schützt die mit dem Masernvirus infizierten Zellen vor unspezifischer Lyse durch Komplement. Bei einigen Stämmen wird das CD46-Protein bei Adsorption an menschliche Zellen und die folgende Aufnahme in die Zelle durch das Masernvirus internalisiert, was die Wirkung des Proteins verhindert. Dadurch wird die Infektionskette unterbrochen. Man vermutet, dass dieses Phänomen die attenuierte Reaktion auf Impfstämme erklärt (Buckland und Wild, 1997).

Die Ausbreitung der Masernviren geht von den Schleimhautzellen der oberen Atemwege aus, die sie nach der Tröpfcheninfektion als erstes infizieren. Von dort kann es zur Ausbreitung in den Bronchialbaum kommen und dort zu einer peribronchialen Entzündung führen (Sakaguchi et al., 1986). Ähnlich wie Parainfluenza kann es durch diese Entzündung zu bakteriellen Superinfektionen kommen. Über den Befall von Makrophagen und dendritischen Zellen kommt es aus den Geweben der Primärinfektion

zur Ausbreitung in die lokalen Lymphknoten und zu weiteren Vermehrungsorten, den Endothelzellen und den Mono- und Lymphozyten. Von den lokalen Lymphknoten geht die erste Virämie aus (Kamahora und Nii, 1961).

Durch Fusion infizierter Endothelzellen mit deren Nachbarzellen kommt es zur Ausbildung der charakteristischen Whartin-Finkeldeyschen Riesenzellen (Finkeldey, 1931; Warthin, 1931).

Die Phase der zweiten Virämie dauert drei bis fünf Tage. Während dieser Phase kommt es zur Vermehrung des Virus in vielen Organen wie Haut, Nieren, Leber, Harnblase, Gastrointestinaltrakt und Thymus. Als Zeichen der Immunreaktion bildet sich gleichzeitig das typische Exanthem aus. Bei abgeschwächter Immunreaktion, wie sie bei immunsupprimierten Patienten vorkommt, fehlt das Exanthem häufig (Kaplan et al., 1992).

Das Masernvirus scheint nach abgelaufener Infektion in der Lage zu sein im Organismus zu persistieren (Rima und Duprex, 2005). So erklärt sich auch eine Spätkomplikation, die subakute sklerosierende Panencephalitis (SSPE). Diese stellt eine der drei möglichen durch Masern ausgelösten Enzephalitiden dar. Die beiden anderen sind die akute postinfektiöse Enzephalitis und die akute progressive infektiöse Enzephalitis. Der Aspekt der zentralen Infektion hat für die Betrachtung der für diese Arbeit gewonnenen Daten - insbesondere eines klinischen Falles - besondere Bedeutung.

Die akute postinfektiöse Enzephalitis tritt mit einer Häufigkeit von eins zu 1000 bis 2000 vor allem bei Kindern über 2 Jahren auf. Sie wird auch als Autoimmunenzephalitis bezeichnet. Gleichzeitig zum Exanthem kommt es hierbei zur Entmarkung der Myelinscheiden. Unklar ist, ob dies durch eine Immunreaktion auf körpereigene Zellen oder durch eine Ähnlichkeit viraler und zellulärer Proteine zustande kommt. Bis zu 20 Prozent dieser Form der Enzephalitis verlaufen tödlich. Das Masernvirus lässt sich aber zentral nicht nachweisen.

Eine noch schlechtere Prognose bei sehr wohl möglichem Nachweis des Masernvirus aus Gehirngewebe hat die akute progressive infektiöse Enzephalitis. Diese Erkrankung betrifft nur Patienten mit Immundefekt und verläuft in allen Fällen tödlich.

Ebenso in allen Fällen tödlich verläuft die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE). Sie tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:100 000 sechs bis 15 Jahre nach

einer Masernerkrankung auf und wurde erstmals 1933 von Dawson beschrieben (Dawson, 1933). Bevorzugt sind männliche Patienten betroffen und solche, bei denen die Masernerkrankung im Alter von bis zu zwei Jahren auftrat. Die durchschnittliche Zeit bis zum Ausbruch der SSPE sind sieben bis zehn Jahre (Nagano et al., 1991).

Das typische Bild der Knötchenenzephalitis wird wahrscheinlich durch Infektion der Gehirndothelzellen durch das Virus ausgelöst. Einige Studien haben aufgezeigt, dass Exposition zu Vögeln das Risiko einer subakuten sklerosierenden Panenzephalitis erhöht. Eine Erklärung hierfür konnte allerdings noch nicht gefunden werden (Halsey et al., 1980).

Die Diagnose einer Masernerkrankung lässt sich meist klinisch stellen. Daneben gibt es die Möglichkeit eines Antikörpernachweises mittels ELISA, Hämagglutinationshemmtest, Immunfluoreszenz oder eines Komplementbindungstests und den direkten Virusnachweis aus einem Nasen-Rachen-Abstrich.

Da die therapeutischen Möglichkeiten sehr begrenzt sind, spielt auch bei den Masern die Impfung als Prophylaxe eine entscheidende Rolle. Hierfür werden attenuierte Lebendimpfstoffe, meist der Stamm Schwarz, verwandt. Bei immunsupprimierten Patienten, bei denen eine Lebendimpfung nicht möglich ist, kann passiv immunisiert werden (Graf et al., 1991).

1.1.7 Respiratory Syncytial Virus (RSV)

Das Respiratory Syncytial Virus (RSV) verdankt seinen Namen zwei Eigenschaften, zum einen der durch es verursachten Erkrankung des Respirationstraktes und zum anderen der Fähigkeit Syncytienbildung zu induzieren. Es werden zwei verschiedene Subtypen A und B unterschieden. Die Infektion mit RSV ist hochkontagiös und es besteht eine hohe Durchseuchungsrate von 80 Prozent im vierten Lebensjahr. Die Übertragung erfolgt vorwiegend über Tröpfcheninfektion (Hall und Douglas, 1981) und vereinzelt über direkten Kontakt. Bevorzugt sind Kinder im Alter zwischen sechs Wochen und fünf Monaten betroffen (Holberg et al., 1991). Die Infektionen treten vor allem in den Wintermonaten auf (Kim et al., 1973). Somit darf RSV als infektiologisches Hauptproblem der Atemwege während des ersten Lebensjahres angesehen werden.

Die Inkubationszeit von RSV beträgt vier bis fünf Tage (Johnson et al, 1961; Kapikian et al., 1961). Die typischen Symptome reichen von „banalen“ respiratorischen Infekten bis

hin zu lebensbedrohlichen Infektionen mit Fieber und Luftnot. Das typische Bild einer RSV-Infektion ist das der Bronchiolitis mit Zyanose. Daneben treten noch Pharyngitis, Tracheitis, Pneumonie und vereinzelt Pseudokrupp auf. Eine mögliche Komplikation ist die Otitis media durch bakterielle Superinfektion oder die Besiedlung des Mittelohres durch RSV bei vorbestehender Otitis media (Heikinnen et al., 1999). Bei Frühgeborenen und vereinzelt auch bei Termingeborenen innerhalb der ersten sechs Lebenswochen können Apnoen ein charakteristisches Symptom einer RSV-Infektion sein (Meert et al., 1990).

Nach der Tröpfcheninfektion, durch die das RS-Virus in den oberen Respirationstrakt gelangt, vermehrt es sich in den Zellen des dortigen Schleimhautepithels (Gardner et al., 1970) und breitet sich von dort häufig in die unteren Luftwege aus. Dieser Vorgang dauert ein bis zwei Tage. In den betroffenen Lungenabschnitten werden Bronchial- und Alveolarepithelien unter Syncytienbildung zerstört. Durch die ödematöse Aufquellung der Schleimhaut und die vermehrte Schleimproduktion kommt es zur Pfropfbildung, die den CO_2/O_2 -Austausch einschränkt und so die Zyanose auslöst (Collins et al., 2001). Obwohl das Virus auch in Granulozyten, Makrophagen und Monozyten nachgewiesen werden kann, kommt es aufgrund der fehlenden Freisetzung aus diesen Zellen nicht zur Virämie.

Interessanterweise beobachtet man bei RSV eine „Umkehr“ des Nestschutzes. Denn in den ersten sechs Lebensmonaten sind schwere Verlaufsformen besonders häufig anzutreffen. Als Ursache hierfür wird ein infektionsverstärkender Mechanismus durch Immunglobuline diskutiert (McIntosh und Fishaut, 1980).

Die Diagnose einer RSV-Infektion wird meist mittels Antigen-ELISA, PCR oder Isolierung aus Speichelsekret gestellt. Daneben sind noch Antikörpernachweise mittels ELISA und Komplementbindungsreaktion möglich. Die beiden Subtypen A und B lassen sich anhand neutralisierender Antikörper gegen die G-Proteine unterscheiden.

Da weder eine Chemotherapie noch eine aktive Impfung möglich sind, wird eine RSV-Infektion symptomatisch therapiert unter besonderer Beachtung der Sauerstoffkonzentration und eventueller Sauerstoff-Therapie. In schwerwiegenden Fällen kann eine Therapie mit Ribavirin versucht werden, wobei es noch keine ausreichende Datenlage gibt, um von einer gesicherten Wirksamkeit dieser Therapie zu sprechen (Ventre und Randolph, 2004).

Bei Kindern mit besonders hohem Infektionsrisiko ist eine passive Immunisierung mit Palivizumab möglich und ein neuer noch in der Testphase befindlicher Antikörper (MEDI-524) scheint zukünftig eine noch bessere Prophylaxe zu ermöglichen (Venkatesh und Weisman, 2006).

1.1.8 Humanes Metapneumovirus (hMPV)

Das humane Metapneumovirus stellt das erste humanpathogene Virus des Genus Metapneumovirus dar. Genetisch ist es am engsten mit dem Aviären Pneumovirus Typ C verwandt. Die große Ähnlichkeit mit APV legt die Vermutung nahe, dass hMPV aviären Ursprungs ist (van den Hoogen et al., 2001).

Serumanalysen zeigten, dass bereits in Proben aus dem Jahre 1958 eine Seropositivität bestand. hMPV existiert folglich also schon sicher mehr als ein halbes Jahrhundert (van den Hoogen et al., 2001).

Ursprünglich in den Niederlanden entdeckt konnte das Virus mittlerweile in vielen Ländern nachgewiesen werden. Zum einen in mehreren Ländern Europas (Christensen et al., 2003; Freymouth et al., 2003; Garcia-Garcia et al., 2004; Jartti et al., 2002; Maggi et al., 2003; Nicholson et al., 2003; Principi et al., 2004; Wilczynski et Litwinska, 2004; van den Hoogen et al.; 2001), ebenso wie in Nordamerika (Bastien et al., 2003; Boivin et al., 2002; Esper et al. 2003 Robinson et al., 2005), Asien (Ebihara et al., 2003; Thanasugarn et al., 2003; Zhu et al., 2003), Australien (Druce et al., 2005; Nissen et al., 2002), Neuseeland (Werno et al., 2004) Afrika (Fodha et al., 2004; Ludewick et al., 2005; Madhi et al., 2003; Smuths et al., 2004) und Südamerika (Galiano et al., 2004).

Die klinischen Symptome bei hMPV-Infektionen sind denen von RSV sehr ähnlich. Sie reichen von milden Infektionen der oberen Atemwege bis hin zu schwerwiegenden Bronchiolitiden oder Pneumonien (van den Hoogen et al., 2001). Anhand klinischer Kriterien ist allerdings keine Unterscheidung von einem Infekt anderer viraler Genese möglich. (Wilkesmann et al., 2006).

Eine große Studie in den USA hat aufgezeigt, dass blande verlaufende hMPV-Infektionen bei Kindern wohl äußerst selten sind (Williams et al., 2004), bei ansonsten gesunden Erwachsenen hingegen vorkommen (Falsey et al., 2003).

Typische klinische Manifestationen einer hMPV-Infektion sind Husten, Rhinitis, Fieber, Dyspnoe, Fütterungsprobleme beim Säugling, Hyperventilation, Tachykardie und

Zyanose. Sie variieren je nach Schwere der Infektion. Es fällt allerdings auf, dass Hypoxämie und Dyspnoe bei RSV wesentlich häufiger anzutreffen sind. Dies erklärt wohl auch die häufigere Sauerstoff-Therapie bei Patienten mit RSV-Infektion. Insgesamt darf wohl aus den bisherigen Studien der Schluss gezogen werden, dass das RSV die klinisch schwerwiegenderen Infektionen auslöst (Wilkesmann, 2006b).

Ein anderer deutlich hervortretender Unterschied ist die Assoziation von hMPV und Asthma. In einer Studie von van den Hoogen et al. aus dem Jahr 2004 zeigte sich, dass 16% der mit hMPV infizierten Kinder ein Asthma bronchiale hatten und sogar 67% der Patienten eine positive Familienanamnese für Asthma aufwiesen.

Von den RSV-Patienten in dieser Studie hatte hingegen keiner ein Asthma und nur 30% eine positive Familienanamnese (van den Hoogen et al., 2004).

hMPV-Infektionen zeigen auf den ersten Blick eine ähnliche Altersverteilung wie RSV-Infektionen mit einem deutlichen Maximum im ersten Lebensjahr. Danach fällt die Inzidenz kontinuierlich ab bis zur Altersgruppe ab 25 Jahre, bei der sie wieder leicht ansteigt. Dies erklärt sich wohl über die dort zunehmende Anzahl immunsupprimierter Patienten. Auf den zweiten Blick fällt auf, dass innerhalb des ersten Lebensjahres sehr wohl ein signifikanter Unterschied in der Verteilung von RSV und hMPV besteht. Während die ersten zwei Lebensmonate deutlich von RSV-Infektionen dominiert sind, spielt hMPV zwischen dem vierten bis sechsten Lebensmonat und auch zu Beginn des zweiten Lebensjahres eine bedeutendere Rolle (van den Hoogen et al., 2004). Im höheren Lebensalter kommt es dann noch einmal zu einer nennenswerten Anzahl manifester hMPV-Infektionen sowohl bei Patienten mit als auch bei Patienten ohne Vorerkrankungen. Es verursacht dort ebenfalls respiratorische Infekte und darf als eine Ursache für die Hospitalisierung älterer Menschen angenommen werden (Boivin et al., 2002; Falsey et al., 2003, Cane et al., 2003; van den Hoogen et al., 2003).

Zudem gibt es erste Berichte über gehäuftes Auftreten von hMPV in Altersheimen (Louie et al., 2007).

Auch über die Seroprävalenz bei hMPV gibt es schon erste Daten. So zeigten zwei Studien der Erstbeschreiber, dass ungefähr 25% der Kinder im sechsten bis zwölften Lebensmonat und ab dem fünften Lebensjahr so gut wie alle Kinder anti-hMPV Antikörper besitzen (Osterhaus und Fouchier, 2003; van den Hoogen et al., 2001).

Studien aus anderen Ländern erbrachten ähnliche Ergebnisse (Ebihara et al., 2003; Leung et al., 2005).

Sowohl RSV als auch hMPV zeigen eine deutlich steigende Fallzahl in den Wintermonaten. Bei einigen Untersuchungen fällt aber auf, dass die bei RSV mögliche Begrenzung auf Dezember und Januar als saisonaler Höhepunkt bei hMPV nicht so stark gegeben ist. Hier zeigt sich eher ein Zeitraum von November bis Mai mit Höhepunkten in Dezember, Februar und April (van den Hoogen et al., 2004). Andere Untersuchungen hingegen beobachteten ähnliche saisonale Verläufe bei RSV und hMPV (Wilkesmann et al., 2005). Ein abschließendes Urteil über die saisonale Verteilung von hMPV scheint also noch nicht möglich.

Ebenso gibt es noch nicht ausreichend Daten über Doppelinfektionen mit hMPV und anderen Viren. Bisher gibt es lediglich einen Anhaltspunkt dafür, dass die Koinfektion von RSV und hMPV besonders schwerwiegend verlaufende Bronchiolitiden auslöst (Greensill et al., 2003; Semple et al., 2005).

Studien haben gezeigt, dass an gleichen Orten in aufeinander folgenden Jahren verschiedene Subtypen dominieren (Agapov et al., 2006).

Das hMPV-Genom besteht aus einer einzelsträngigen, negativ-orientierten RNA mit ca. 13 Kb. Das Genom enthält 8 für Proteine codierende Gensequenzen in folgender Reihenfolge:

3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'. Die einzelnen Proteine sind das Nucleoprotein (N), das Phosphoprotein (P), das Matrixprotein (M), das Fusionsprotein (F), das Regulatorgen für die RNA-Synthese bzw. der Elongationsfaktor der Transkription (M2), das hydrophobe Oberflächenprotein (SH), das Glycoprotein (G) und die Polymerase (L). Das Genom von hMPV enthält im Gegensatz zu z.B. RSV keine Gene für Nichtstrukturproteine (Hamelin et al., 2004).

Des Weiteren besitzt hMPV keine haemagglutinierende Aktivität (van den Hoogen, 2001).

Auf die Funktion der Proteine von hMPV wurde bisher nur aufgrund der Strukturanalogien zu den Proteinen anderer Paramyxoviren rückgeschlossen. Eigene Untersuchungen zu ihrer Funktion gibt es kaum. Über das G-Protein sind allerdings einige bemerkenswerte Details bekannt. So fällt auf, dass es genetisch sehr variabel ist und Analysen der Nukleotidsequenz haben ergeben, dass dort durch

Leserasterverschiebungen und Veränderungen des Stop-Codons Proteine unterschiedlicher Länge produziert werden. Bisher wurden Proteine mit der Länge von 217, 219, 228, 231 und 236 Aminosäuren nachgewiesen (Bastien et al., 2004; Ishiguro et al., 2004; Peret et al., 2004; van den Hoogen et al., 2004).

Bisherige Untersuchungen haben zwei Subtypen mit jeweils zwei verschiedenen Untergruppen gefunden, für die die Erstbeschreiber van den Hoogen et al. (2001) die Bezeichnung A1, A2, B1 und B2 vorgeschlagen haben (Boivin et al., 2004). Bisher gibt es keine Anhaltspunkte dafür, dass die Schwere der Infektion bei den beiden Subtypen variiert (Leung et al., 2005; Agapov et al., 2006). Auch konnten keine geographischen oder saisonalen Unterschiede ausgemacht werden (Boivin et al., 2002; Mackay et al., 2004; Peret et al., 2002; Viazov et al., 2003). Ob die Infektion mit einem Subtyp Immunität für den anderen verschafft, scheint unklar. Denn während Tierversuche anhand des F-Proteins eines Subtyps Immunität für beide erbracht haben (Skiadopoulos et al., 2003), gibt es beschriebene Fälle von mehrzeitigen Infektionen mit hMPV (Pelletier et al., 2002; Wolf et al., 2003). Dieses mögliche Charakteristikum von hMPV, dass eine einmalige Infektion nicht unbedingt einen Schutz vor weiteren Infektionen bietet, ist ein wesentlicher Aspekt bei der Suche nach einem möglichen Impfstoff.

Obwohl es noch keinerlei Möglichkeiten einer kausalen Therapie bei hMPV gibt, sind doch erste Schritte zur Entwicklung eines Impfstoffes und erste Tests mit antiviralen Medikamenten gemacht. So entdeckten amerikanische Forscher im Tierversuch, dass bei einer Infektion mit einem veränderten hMPV-Virus zwar Antikörper gebildet wurden, es aber zu keinerlei Infektionszeichen kam. Die am Virus vorgenommene Veränderung war das Ausschalten des M2-1-Proteins (Buchholz et al., 2005). Und eine andere Gruppe fand heraus, dass Ribavirin, das bei schweren RSV-Infektionen als Therapeutikum zugelassen ist, bei hMPV eine ähnlich starke Wirkung entfaltet (Wyde et al., 2003).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Nachweisverfahrens für hMPV in der virologischen Abteilung der Universität Bonn und eine Studie über Häufigkeit, saisonale Verteilung und besondere Verlaufsformen von hMPV-Infektionen. Eine Studie von van den Hoogen et al. aus dem Jahre 2003 zeigte, dass hMPV-Patienten deutlich häufiger mit Antibiotika, Corticosteroiden und Bronchodilatoren behandelt wurden als Patienten mit RSV (van den Hoogen et al., 2003).

Der Grund hierfür scheint nicht in der Schwere der Erkrankung sondern in der unzureichenden Diagnostik zu liegen. Bei einer RSV-Infektion ist durch einen Schnelltest mit hoher Spezifität oder eine PCR ein Nachweis und somit auch die passende Therapie möglich. Bei ausbleibendem Nachweis eines viralen Erregers wird unter der Verdachtsdiagnose einer bakteriellen Infektion oft antibakteriell therapiert. Dieser unnötige Einsatz von Antibiotika und Corticosteroiden kann durch eine sensitive und zeitnahe Diagnostik eingeschränkt werden.

Diese Überlegungen geben der Etablierung eines modernen Nachweisverfahrens mittels PCR als Zielsetzung dieser Arbeit ihre Berechtigung. Gleichzeitig soll in dieser Arbeit Einblick in die Häufigkeit, den klinischen Verlauf – hier insbesondere auf einen Fall zentraler Infektion – und eventuelle Doppelinfektionen mit RSV gegeben werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschränke:	CO ₂ -begaster Brutschrank, Fa. Heraeus, Hanau Inkubator C200, Labotect, Meckenheim
Elektrophoresekammern:	Model B1, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen Model 41-1825, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Schüttler:	Certomat S, Sartorius BBI Systems International 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 Toldedo GmbH, Schweiz
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

2.1.2 Chemikalien

Firmen, deren Chemikalien verwandt wurden, sind:

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, Berlin
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin

2.1.3 Medien

Eagle´s Minimal Essential Medium

Eagle´s-MEM-Earle	Biochrom AG, Berlin
NaHCO ₃	2,2 g/l
Zusatz von:	
Glutamin	280 µg/l
Penicillin G	40 E/ml
Streptomycin	50 µg/l
Fötale Kälberserum	10% (v/v)

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) mit Ampicillin

Bacto Yeast-Extract	2,5 g
Bacto-Trypton	5 g
NaCl	2,5 g
Aqua dest.	ad 500 ml

Diese Mischung wurde 20 Minuten autoklaviert, bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und vor Animpfung mit 50 µg Ampicillin versetzt.

Luria-Bertani-Agarplatten (LB-Agarplatten) mit Ampicillin

Bacto Yeast-Extract	2,5 g
Bacto-Trypton	5 g
NaCl	2,5 g
Bacto-Agar	6,25 g
Aqua dest.	ad 500 ml

Diese Mischung wurde 20 Minuten autoklaviert, nach Abkühlen des Mediums mit 50 µg Ampicillin versetzt und jeweils 20-30 ml davon in eine Petrischale (Ø: 10 cm) gefüllt und diese dann bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

S.O.C.-Medium (6 ml)

Trypton	2%
Yeast Extract	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

2.1.4 Zellkulturen

Vero-B4-Zellen	ATCC-ACC-33
LLC-MK2-Zellen	ATCC-CCL7
MS-Zellen	nicht ATCC-gelistet
MDCK-Zellen	ATCC-CLL-34
RD-Zellen	A-204; ATCC-ACC-250

2.1.5 Stammlösungen

Ampicillin 50 mg/ml (H₂O)

EDTA (0,5M)

EDTA 186,1 g

Aqua dest.

mit NaOH auf pH 8 titriert, autoklaviert ad 1000 ml

Ethidiumbromid 10 mg/ml

Phosphate-buffered saline (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Aqua dest.	
pH mit HCl auf 7,4 titriert, autoklaviert	ad 1000 ml

2.1.6 Puffer

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer 5x)

Tris-Base	54 g
Borsäure	27,5 g
EDTA (0,5M)	20 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

2.1.7 Schnelltests

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

Mittels dieser Schnelltests wurde jede eingegangene Probe von Patienten mit einem Infekt der oberen und unteren Atemwege auf Influenza und RSV untersucht. Die Ergebnisse dieser Testungen sind in den Ergebnisteil dieser Arbeit eingeflossen.

2.1.8 Reagenziensysteme

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City USA
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HiSpeed Midi	Qiagen GmbH, Hilden,
HiSpeed Maxi	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
One Step RT-PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick-PCR-Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy Protect Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Topo-TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.9 Enzyme

Restriktionsenzyme

EcoR1 Biolabs, Schwalbach, Deutschland

DNA-Polymerase

Thermus aquaticus DNA-Polymerase Roche Applied Science, Mannheim,
Deutschland

Thermus aquaticus DNA-Polymerase Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Reverse Transkriptase

Omniskript, Sensiskript Reverse Transkriptase Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.10 Nukleotide

Desoxyadenosintriphosphat (25 nM)

Desoxythymidintriphosphat (25 nM)

Desoxycytosintriphosphat (25 nM)

Desoxyguanosintriphosphat (25 nM)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,
Deutschland

2.1.11 Primer

Die vier Primer wurden einer Veröffentlichung von Viazov et al. (2003) entnommen. Ihre Sequenzen entsprechen also einer Region des N-Gens.

Alle für diese Arbeit verwandten Primer wurden von der Firma Sigma, Deisenhoven hergestellt. Die nun folgenden Sequenzen sind in 5'→3'-Richtung notiert.

111s	AGAGTCTCAGTACACAATMAAAAGAG
705as	TGCTTTGCTGCCTGTAGATGATGAG
114s	AGAGTCTCAGTACACAATMAAAAGRGATG
442as	GCCATTGTTTTYCTTGCYTC

2.1.12 DNA-Längenstandard

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

2.1.13 Plasmide

pCR4 Topo-Expressionsvektor	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
-----------------------------	----------------------------

2.1.14 Proben

Rachenspülwasser

Rachenspülwasser aus der Universitäts-Kinderklinik Bonn vom 01.10.2001 bis 31.03.2004

01.10.2001 – 30.09.2002	n = 5	(nicht in die Studie einbezogen)
01.10.2002 – 31.03.2003	n = 300	
01.10.2003 – 31.03.2004	n = 332	
	$n_{\text{ges}} = 632$	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die oben genannten Zelllinien wurden mit den eingehenden Proben beimpft und neben dem erforderlichen Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage eine mikroskopische Betrachtung der Zellen auf der Suche nach einem cytopathischen Effekt (CPE). Nach drei Wochen erfolgte aus dem Zellkulturüberstand die im folgenden noch näher beschriebene HMPV-PCR. Bei Ausbleiben eines cytopathischen Effektes nach drei Wochen und einer negativen PCR wurden die Kulturen verworfen.

Zellmedium

Eagle´s Minimal Essential Medium (MEM-Earle)

+ 10% FSK (fötales Kälberserum)

Zusätze zur Zellkultur

L-Glutamin 0,25 mM

Streptomycin/Penicillin G 0,1 mg/ml

Die Zellkulturen wurden in Zellkulturflaschen von 75 cm² bzw. 165 cm² mit jeweils 20 bzw. 40 ml Medium kultiviert.

Zellpassage

Um die Lebensfähigkeit der Kulturzellen zu erhalten sowie zur Vermehrung der Anzahl an Zellkulturen müssen diese regelmäßig in neue Kulturflaschen überführt werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Zellpassage. Hierfür wurde das in den Kulturflaschen befindliche Medium verworfen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Das für das Überführen in eine neue Kulturflasche notwendige Lösen der Zellen von der Kulturflasche wurde durch Zugabe von 5ml Trypsin/EDTA und dreiminütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C erreicht. Dann wurde die entsprechende Menge an Medium für die Anzahl der neuen Zellkulturen hinzugegeben, die Zellen resuspendiert und auf die neuen Kulturflaschen verteilt. Zum Anwachsen der Zellen wurden die Kulturen bei 37°C in einen Brutschrank mit 10% CO₂-Anteil gelagert.

Inokulation einer Zellkultur

Zur Inokulation einer Zellkultur wurde diese mit 100 µl einer Probe beimpft und anschließend bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

2.2.2 RNA-Extraktion aus Zellkulturüberständen mittels RNeasy Protect Mini Kit

RNA-later Puffer

Dieser Bestandteil des RNeasy Protect Kits (Qiagen, Deutschland) stabilisiert und schützt laut Herstellerangaben RNA, so dass bei einer Lagerung zwischen 2° und 8°C für 4 Wochen und bei einer Lagerung zwischen -80° und -20°C für mehrere Jahre die RNA nachweisbar bleibt. Dieser RNA-later Puffer wurde allen Proben zugegeben (Uhlenhaut und Kracht, 2005).

Material des RNeasy Protect Mini Kits

β-Mercaptoethanol

Ethanol (70% und 96-100%)

RNase freies Wasser

RNeasy mini spin Säulen

RPE-Puffer

RLT-Puffer

RW1-Puffer

Sammelröhrchen á 1,5 und 2 ml

Vor Verwendung wurden der RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (Mischungsverhältnis 1000:1) und der RPE-Puffer mit 96%igem Ethanol (Mischungsverhältnis 1:4) versetzt.

Durchführung der RNA-Extraktion

Als erstes wurden 100 oder 200µl je nach vorhandener Menge der Probe mit der gleichen Menge an Gemisch aus RLT-Puffer/β-Mercaptoethanol (s.o.) in ein Eppendorfröhrchen pipettiert und in diesem bei 13000rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Der RLT-Puffer ist ein stark denaturierender Guanidin-Isothiocyanat enthaltender Puffer, der RNAsen inaktiviert und somit die Isolierung intakter RNA ermöglicht.

In einem neuen Röhrchen wurde der Überstand mit der gleichen Menge (200 oder 400µl) Ethanol 70% vorsichtig vermischt. Dieser Schritt dient der Schaffung optimierter Bindungseigenschaften, die im Folgenden für die Bindung von RNA an die Silicagel-Membran notwendig ist.

Diese Bindung wurde durch Pipettieren des Proben-Ethanol-Gemischs auf die Silicagel-Membran und anschließende Zentrifugation bei 10000rpm für 1 Minute erreicht. Der in einem Sammelröhrchen aufgefangene Durchfluss wurde verworfen und das nun an die Membran gebundene Material gereinigt.

Die Reinigung erfolgte durch Zugabe von 700µl RW1-Puffer und einer anschließenden Zentrifugation bei 10000rpm für eine Minute und in weiteren Schritten durch zweimalige Zugabe von 500µl RPE-Puffer und Zentrifugation bei 10000rpm für eine Minute. Der jeweils in einem Sammelröhrchen aufgefangene Durchfluss wurde samt Sammelröhrchen nach jedem Schritt verworfen.

Zur Trocknung des Silicagels wurde dieses erneut in ein Sammelröhrchen gestellt, für eine Minute bei 15000rpm zentrifugiert und Durchfluss und Sammelröhrchen verworfen.

Zum Auswaschen der nun gereinigten RNA wurden 30µl RNase freies Wasser auf die Silicagel-Membran pipettiert und dieses in ein neues Sammelröhrchen gestellt und bei 10000rpm für 1 Minute zentrifugiert.

Das so gewonnene Eluat wurde in der im Folgenden beschriebenen PCR eingesetzt.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Kary Mullis entwickelte 1985 diese Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen (Saiki et al., 1986). Voraussetzung für den Ablauf dieser Reaktion ist, dass man die Sequenz der benachbarten Regionen zur Ziel-DNA kennt und so in der Lage ist, die entsprechenden Primer zur PCR zuzugeben. Des Weiteren müssen im Reaktionsansatz alle vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) und eine DNA-Polymerase enthalten sein. Während Mullis diese noch nach jedem Schritt dem abgekühlten Reaktionsansatz zupipettieren musste, werden heute hitzestabile Polymerasen verwendet.

Ein PCR-Zyklus besteht, wie Abb. 2 zeigt, aus 3 Schritten.

1. *Strangtrennung*: Durch kurzzeitige Erwärmung auf 95 °C kommt es zur Denaturierung der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge.

2. *Anlagerung der Primer an komplementäre Regionen der Einzelstränge*: Durch rasches Abkühlen des Reaktionsansatzes wird eine Anlagerung der Primer an die komplementären Regionen an beiden Einzelsträngen ermöglicht. Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bezeichnet. Die theoretisch auch denkbare erneute Verbindung der beiden Einzelstränge wird durch im Überschuss zugegebene Primer und das schnelle Abkühlen verhindert.

3. *DNA-Synthese*: Durch das aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammende Enzym Taq-DNA-Polymerase werden die neu angelagerten Stränge nun durch kovalente Anbindung der im Reaktionsansatz enthaltenen dNTPs verlängert. Da die jeweilige Synthese immer in 3'-Richtung erfolgt, wird die durch die Primer flankierte Ziel-DNA mitsynthetisiert. Dieser ca. 30 Sekunden dauernde Schritt funktioniert bei 72 °C optimal.

Diese drei Reaktionsschritte können nun wiederholt werden und da die neu synthetisierten Stränge in den weiteren Reaktionen jeweils auch als Matrizen dienen, kommt es zur exponentiellen Vermehrung der DNA.

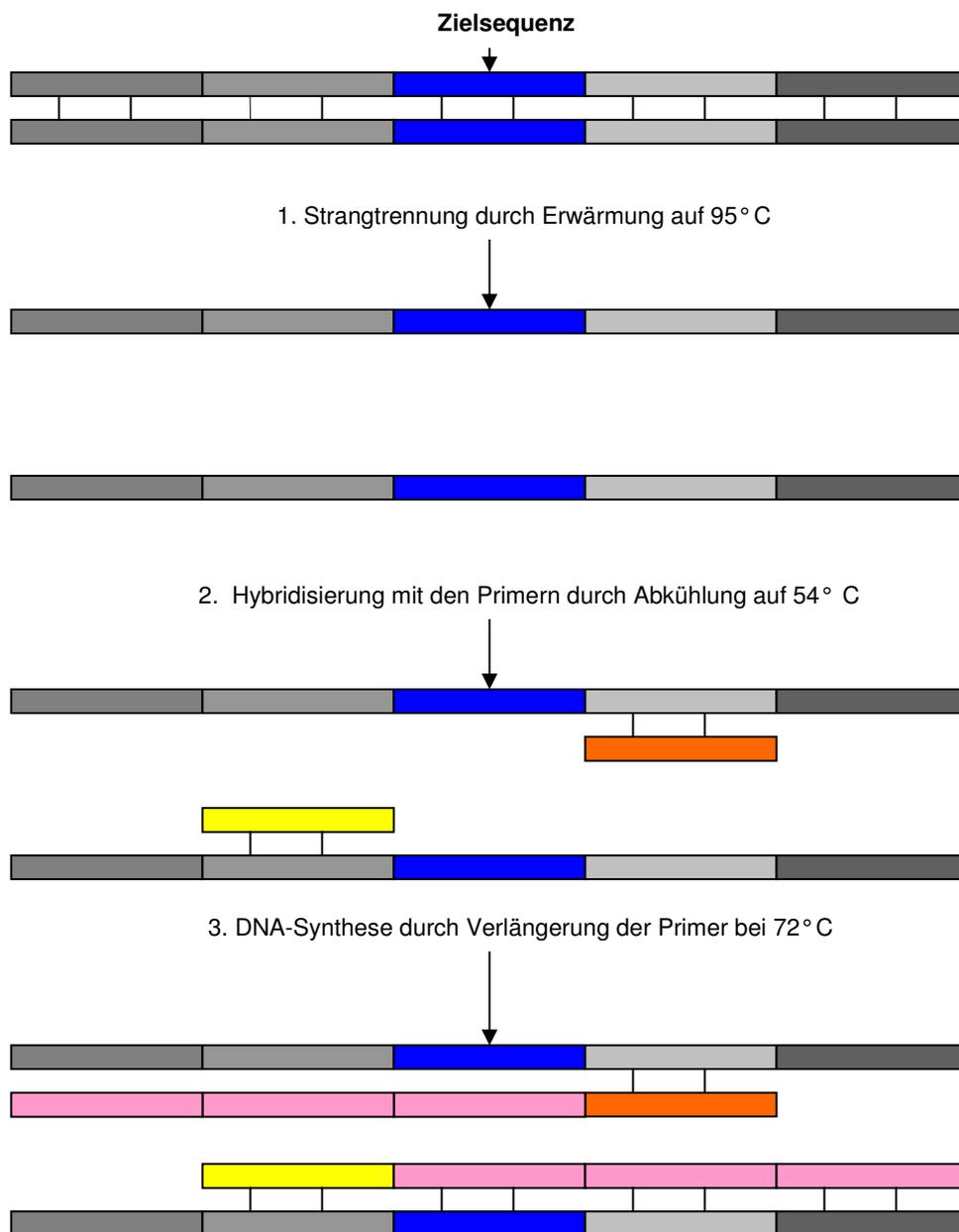


Abbildung 2 PCR-Zyklus

Zur Vermehrung der Zielsequenz - hier blau eingefärbt - wird die DNA-Doppelhelix durch Erwärmung auf 95°C in die beiden Einzelstränge geschmolzen. Um nun eine DNA-Synthese einleiten zu können, müssen sich erst die zu der Zielsequenz benachbarten Regionen komplementären Primer anlagern. Dies erfolgt bei einer Abkühlung des Reaktionsansatzes auf 54°C. Anschließend synthetisiert die DNA-Polymerase von den Primern ausgehend die komplementären Stränge zu den Einzelsträngen der Ausgangs-DNA. Dieser Reaktionsschritt erfolgt bei 72°C. Diese Schritte werden mehrfach wiederholt und die DNA-Menge steigt dabei exponentiell.

Nested-PCR

Eine Nested-PCR folgt auf eine klassische PCR. Nach der Vervielfältigung eines größeren DNA-Abschnitts, der die Ziel-DNA enthält, wird dieser Abschnitt als Matrize für die Nested-PCR eingesetzt, in der ein kleinerer ebenfalls die Ziel-DNA enthaltener Abschnitt vermehrt wird (siehe Abb. 3.2). Dieses Verfahren ermöglicht die Erhöhung der Sensitivität und Spezifität der PCR.

In dieser Arbeit wurde für die Nested-PCR das Expand High Fidelity PCR System von Roche eingesetzt.

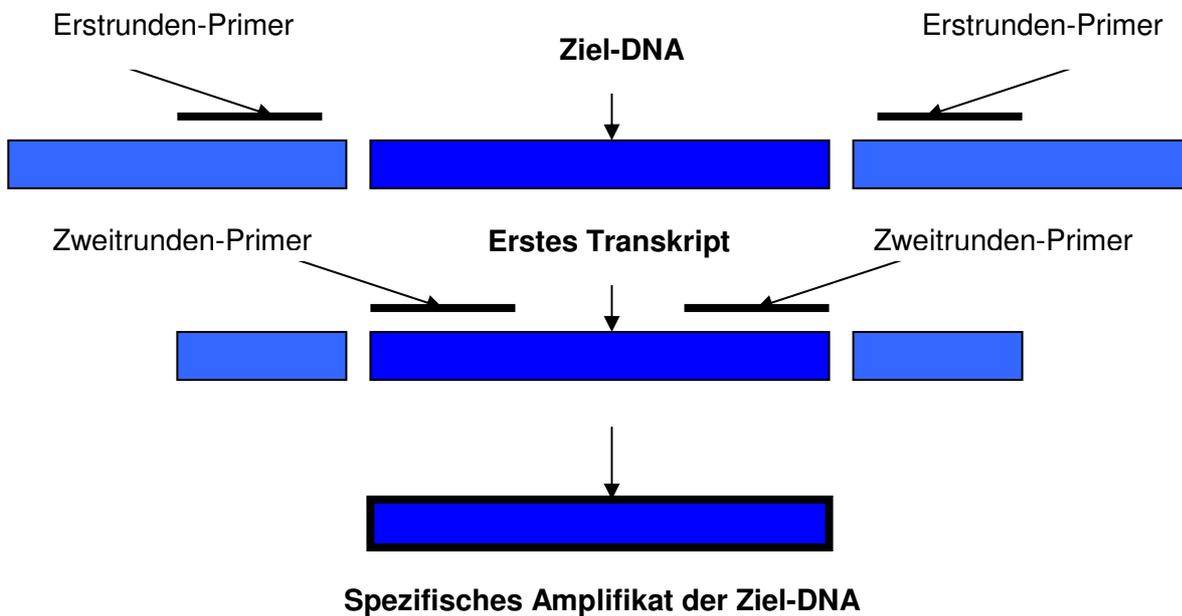


Abbildung 3 Nested-PCR

Der obere Abschnitt der Abbildung zeigt eine PCR (s.o.).

Im zweiten Abschnitt ist die eigentliche Nested-PCR dargestellt. Die mit Zweitrunden-Primern bezeichneten Primer sind die der Nested-PCR. Sie liegen der Ziel-DNA näher als die Erstrunden-Primer. Über Reaktionsschritte wie sie oben für die PCR beschrieben sind erfolgt auch hier eine Amplifikation der spezifischen DNA-Abschnitte.

PCR mittels Reverser Transkription (RT-PCR)

Wie unter 3.2.3 erläutert handelt es sich bei der PCR um ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Liegt aber nun nicht DNA sondern RNA als Ausgangsmaterial vor, so ergibt sich die Notwendigkeit der Transkription der RNA in DNA. Dies ist mittels der RT-PCR möglich. Dafür wird der eigentlichen PCR noch ein Schritt vorausgeschaltet. In diesem Schritt wird die vorhandene Minus-Strang-RNA in Einzelstrang-DNA, die so genannte copy-DNA (cDNA), umgeschrieben. Diese besondere Syntheseleistung ist mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase möglich. Die so entstandene cDNA kann dann wieder mit Hilfe der PCR vervielfältigt werden. Für die RT-PCR wurde bei dieser Arbeit das OneStep RT-PCR-Kit von Qiagen verwendet.

Reaktionsansatz der RT-PCR für hMPV

Für die RT-PCR wurde das One-Step-RT-PCR von Qiagen, Hilden verwendet.

5fach RT-PCR Puffer	10 µl
dNTPs (100 mM)	4 µl
RT-PCR Enzym Mix	2 µl
111s-Primer (25 pmol/µl)	2 µl
750as-Primer (25 pmol/µl)	2 µl
RNAse freies Wasser	25 µl
Eluat	5 µl
Σ	50 µl

Protokoll der RT-PCR

Zur Reversen Transkription wurde der Reaktionsansatz im Cycler, einem Gerät, das sich auf die für eine PCR notwendigen Temperaturänderungen programmieren lässt und diese Programme dann automatisch durchführt, einmalig für 30 Minuten auf 60°C erwärmt. Nach einer Aktivierung bei 95°C für 15 Minuten wurde folgender Zyklus 40 Mal wiederholt:

95°C	30 sec	Denaturierung
------	--------	---------------

52°C	30 sec	Annealing
72°C	1 min	Elongation

Nach diesen Zyklen erfolgte noch eine terminale Elongation bei 72°C für 5 Minuten. Nach Abschluss dieses Vorgangs wurden die Ansätze bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Reaktionsansatz der Nested-PCR für hMPV

Für die Nested-PCR wurde das Expand High Fidelity PCR System von Roche, Mannheim eingesetzt.

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

Protokoll der Nested-PCR

Nach initialer Denaturierung bei 94°C für 2 Minuten erfolgte folgender Zyklus 40 Mal:

94°C	30 sec	Denaturierung
53°C	30 sec	Annealing
72°C	45 sec	Elongation

Hiernach erfolgte wiederum eine terminale Elongation bei 72°C für 5 Minuten und eine Lagerung sowohl im Cyclyer als auch im Kühlschrank bei 4°C.

Verdünnungsreihen zur Optimierung der Nested-PCR unter Zugabe von Magnesium

Im Gegensatz zu dem von Viazov et al. (2003) vorgeschlagenen PCR-Protokoll wurde bei dieser Arbeit Magnesium bei der Nested-PCR zur Stabilisierung hinzugegeben.

Dafür wurde zu Beginn mittels mehrerer Verdünnungsreihen die optimale Magnesiumkonzentration ermittelt.

Unter Zugabe einer Positivkontrolle wurde zunächst die oben angegebene RT-PCR durchgeführt. Das entstandene Template wurde in den Reaktionsansatz der Nested-PCR überführt und das Protokoll von Viazov et al. (2003) um die Zugabe von jeweils 0,1,2,3 und 4 µl Magnesium erweitert. Dies entspricht einer Konzentration von 0, 0.5, 1, 1.5 bzw. 2mM MgCl₂.

Das entstandene PCR-Produkt wurde wie im Folgenden beschrieben mittels Gelelektrophorese beurteilt.

Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde dieses Prozedere wiederholt.

2.2.4 Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese für die Auftrennung unterschiedlicher großer DNA-Fragmente benutzt.

Um einen Anhalt für das Fortschreiten der Wanderung der DNA-Fragmente durch das Gel zu erhalten, werden sie vor dem Auftragen auf das Gel mit einem Farbstoff (Bromphenolblau) enthaltenden Gelladepuffer versetzt.

Da der Farbstoff aber unabhängig von den DNA-Fragmenten durch das Gel wandert, ist es nötig die einzelnen DNA-Banden anzufärben. Hierfür wurde in dieser Arbeit Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid interkaliert in Guanin und Cytosin-Basenpaaren der DNA und ermöglicht durch die Abgabe von Fluoreszenzlicht ein Betrachten der Banden unter UV-Licht.

Zusammensetzung des Gels

1fach TBE-Puffer	100 ml
LE-Agarose	0,75 g
GTG-Agarose	0,25 g
Ethidiumbromid	5 µg

Herstellung des Gels

Die Bestandteile des Gels bis auf das Ethidiumbromid wurden in ein Becherglas gegeben und in einer Mikrowelle bei 600 Watt aufgekocht bis die Agarose vollständig gelöst war.

Das beim Aufkochen durch Verdampfen verloren gegangene Volumen wurde durch destilliertes Wasser ersetzt. Nach Abkühlen des Gels wurde dieses mit Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die in der Gelkammer enthaltenen Kämme schufen die entsprechenden Mulden, in die später die Proben aufgetragen wurden. Aus der Gelkammer wurde das Gel nach entsprechender Aushärtungszeit in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und konnte dort nun beladen werden.

Beladung und Laufzeit des Gels

Jede Mulde wurde mit 10 µl eines PCR-Produktes und 2 µl des Gelladepuffers Bromphenolblau gefüllt. Ein Slot pro Gel wurde jeweils mit Negativ-, Positivkontrolle und dem Längenstandard (1Kb) gefüllt. Dann wurde für ca. 30-40 Minuten eine Spannung von 130 Volt angelegt. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid färbt die durch die Gelelektrophorese entstandenen Banden an, so dass sie mit UV-Licht sichtbar gemacht werden konnten. Zu diesem Zweck wurde UV-Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 312$ nm benutzt.

2.2.5 Aufreinigung der PCR-Amplifikate mittels QIAquick-PCR Purification Kit

Zur Kontrolle der Sequenz der PCR-Amplifikate wurden diese teilweise sequenziert. Dafür ist als erster Schritt eine Reinigung der Amplifikate von Nöten. Diese wurde mit dem QIAquick-PCR Purification Kit von Qiagen durchgeführt, welches analog zum verwandten Extraktions-Kit auf der Bindung der DNA an einer Silicagel-Membran, gekoppelt mit mehreren Waschvorgängen beruht. In diesem Fall wurden durch die Waschvorgänge vor allem die restlichen Bestandteile der PCR wie Primer und dNTPs herausgewaschen.

Material

Ampuwa

Ethanol 96-100%

Isopropanol 100%

QG Puffer (pH $\leq 7,5$)

QIAquick Filtersystem

PE Puffer

Vor Verwendung wurde der PE-Puffer mit Ethanol versetzt.

Durchführung

Nach Ausschneiden der betreffenden Bande aus dem Gel wurde das Gelstück gewogen und mit der dreifachen Menge QG-Puffer in ein 2 ml-Sammelröhrchen gegeben. Das Sammelröhrchen wurde zum Lösen des Gels für 10 Minuten in einem 50°C-warmen Wasserbad inkubiert und dann eine äquivalente Menge Isopropanol hinzugefügt. Der gesamte Inhalt des Sammelröhrchens wurde dann in ein QIAquick Filtersystem pipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 13000rpm für 1 Minute wurde der Durchfluss verworfen und für den Waschvorgang 750 µl PE-Puffer hinzugefügt und danach zwei Mal für 1 Minute bei 13000rpm zentrifugiert. Zur Elution der DNA von der Silicagel-Membran wurden anschließend 50 µl Ampuwa hinzupipettiert und das Filtersystem in ein neues 1,5 ml-Sammelröhrchen gestellt und erneut für 1 Minute bei 13000rpm zentrifugiert.

2.2.6 Klonierung der PCR-Amplifikate mittels TOPO TA Cloning Kit

Nach der Aufreinigung der DNA erfolgte dann die Klonierung mittels des TOPO TA Cloning Kits von Invitrogen.

Zur Klonierung der DNA macht man sich die besonderen Eigenschaften der Plasmide zunutze. Plasmide sind genetische Elemente, die in der Lage sind sich unabhängig von der chromosomalen DNA-Replikation zu replizieren. Die meisten bekannten Plasmide liegen als doppelsträngige, ringförmige DNA vor, es sind aber auch vereinzelt lineare Plasmide bekannt. Die Fähigkeit zur eigenständigen Replikation prädestiniert Plasmide zum Einsatz als Vektor. Vektoren sind genetische Vehikel, die in der Lage sind, DNA zu übertragen. In vivo sind Plasmide häufig Träger einer Antibiotikaresistenz. Das bedeutet, dass Bakterien, die solche Plasmide enthalten, einen Selektionsvorteil haben.

Zum Einbau der DNA, die vermehrt werden soll, in Plasmide werden für gewöhnlich Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese schneiden sowohl den Vektor als auch die DNA an einer definierten Stelle.

In dieser Arbeit wurden lineare Plasmide verwendet, so dass keine Restriktionsendonukleasen erforderlich waren.

Die Enden der DNA und des Vektors werden dann mit Hilfe einer Ligase verbunden und die DNA somit in das Plasmid eingebaut.

Anschließend wird der Vektor in ein kompetentes Bakterium eingebracht. Diesen Vorgang nennt man Transformation.

Die Kompetenz des Bakteriums misst sich an seiner Fähigkeit Plasmide aufzunehmen. Diese kann durch Vorbehandlung sowohl chemischer Art – über die Zugabe von Calciumchlorid – als auch physikalisch durch das Anlegen eines elektrischen Feldes oder durch Hitzeschock erhöht werden.

Durch den Hitzeschock wird die Transkription der Plasmide angestoßen.

Sind die Bakterien transfiziert, werden sie auf Agarnährböden kultiviert. Hierbei macht man sich die angesprochene Antibiotikaresistenz einzelner Plasmide zunutze. Das eingesetzte Plasmid enthält die Information für eine solche Resistenz. Gibt man nun das entsprechende Antibiotikum zum Nährboden dazu, so kann man gewährleisten, dass sich nur transfizierte Bakterien vermehren, da sie über die Transformation auch die Antibiotikaresistenz erworben haben.

Topo-Ligation

Ein Gemisch aus 4 µl Eluat aus der Aufreinigung des PCR-Amplifikats und 1 µl Salzlösung und 1 µl Vektorlösung wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert und anschließend zur Hitzeschocktransformation eingesetzt.

Hitzeschock-Transformation

Zur Anlagerung der Plasmide an die im Kit vorgesehenen E.coli-Bakterien wurden 2 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl der E.coli-Bakterien-Suspension vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde durch einen Hitzeschock induziert. Dafür wurde der Reaktionsansatz für 30 Sekunden bei 42 °C in ein Wasserbad gegeben. Danach erfolgte eine 3-minütige Inkubation auf Eis, die Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium und eine Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C bei 200rpm auf einem Schüttler. Danach wurden jeweils 50 µl dieses Ansatzes auf eine auf 37 °C angewärmte Agarplatte ausplattiert und jeweils 50 µg Ampicillin zugegeben. Die beimpften Platten wurden bei 37 °C für mindestens 8 Stunden inkubiert.

Kontrolle der Klonkolonien per PCR

Zur Identifizierung der durch die Inkubation auf dem Nährmedium entstandenen Kolonien wurden jeweils 10 Kolonien pro Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in LB-Medium suspendiert. Diese Lösung wurde bei 37°C im Schüttler bei 200rpm für 8 Stunden inkubiert. Danach wurde diese Suspension statt des Templates in die Nested-PCR eingesetzt und so die erfolgreiche und richtige Klonierung überprüft.

Präparation der Ziel-DNA aus den Plasmiden mittels QIAprep Spin Miniprep

Material:

Puffer P1	50 mM Tris-Cl
(Resuspensionspuffer)	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
	pH 8,0
Puffer P2 (Lysepuffer)	200 mM NaOH
	1% SDS (w/v)
Puffer N3	chaotrope Salze
(Neutralisationspuffer)	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

Zur Isolierung geringer Mengen Plasmid-DNA mehrerer Klone aus E.coli wurde die „Mini“-Präparation angewandt. 5 ml einer Übernachtskultur wurden für 10 Minuten zentrifugiert, die Pellets wurden in 250 µl Puffer P1 resuspendiert.

Dann wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben und der Ansatz nach kurzem Mischen 2 min inkubiert. Nach Zugabe des Neutralisationspuffers wurde die Lösung vorsichtig

vermischt und für 10 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde in die QIAprep Spin Säule pipettiert und für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und in 3 Schritten wurden jeweils 500 µl Puffer PB, 500 µl bzw. 750 µl Puffer PE zugefügt, jeweils für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Anschließend wurde die Spin Säule in ein Sammelröhrchen überführt und mit 30 µl Elutionspuffer befüllt und wiederum für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Das so gewonnene Eluat wurde bei 4°C oder bei -20°C im Eisschrank aufbewahrt, je nach weiterem Verwendungszweck.

2.2.7 Sequenzierung der rekombinanten Plasmide

Zur Sequenzierung der rekombinanten Plasmide wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Sequenzanalyse erfolgte mittels des Sequenziergeräts Abi Prism 3100 nach den Angaben des Herstellers. Der Methode liegt das Kettenabbruchverfahren von Sanger zugrunde (Sanger et al., 1977).

Bei dieser Methode wird DNA-Polymerase so modifiziert, dass sie sowohl dNTPs als auch di-dNTPs für die DNA-Synthese verwendet. In unserem Fall wurde die Ampli-Taq-DNA-Polymerase FS verwandt. Durch den Einbau der ddNTPs in die DNA-Kette erfolgt ein Kettenabbruch, da sie aufgrund einer fehlenden Hydroxylgruppe nur eine Phosphodiesterbindung eingehen können. Durch diesen Kettenabbruch entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die, aufgrund einer Markierung der di-dNTPs mit einem Fluoreszenzfarbstoff (siehe Tabelle 3) kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden und anhand ihrer durch einen Laser erzeugten Fluoreszenz bestimmt werden können.

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

Tabelle 4 Fluoreszenzmarkierung der vier Basen am 3'-Kohlenstoffatom zur Sequenzierung

Durchführung

Die Sequenzierung erfolgte mit dem Big Dye R Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit. Pro Probe wurden zwei Reaktionen für beide Strangrichtungen angesetzt. Die in Tabelle 4 beschriebenen Reaktionsansätze wurden in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert.

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

Tabelle 5 Reaktionsansatz zur Sequenzierung

Nach einer initialen Denaturierung für 5 Minuten bei 94°C wurde folgender Zyklus 40 Mal wiederholt:

94°C	45 sec	Denaturierung
55-65°C	30 sec	Annealing
72°C	45 sec	Elongation

Nach diesen Zyklen erfolgte eine terminale Elongation bei 72°C für 10 Minuten und danach eine Kühlung des Produktes bei 4°C.

Für die eigentliche Analyse wurden die Produkte auf Mikrotiter-Platten, so genannte Sephadex-Platten, aufgebracht. Zur Vorbereitung wurden ca. 3 g Sephadex G 50 in eine Multi Screen Platte gegeben und mit 300 µl RNase freiem Wasser aufgefüllt. Zum Quellen wurde der Ansatz für drei bis vier Stunden bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Danach wurde bei 910g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Produkte auf die Platten aufgebracht und die Sequenzierung mit dem 3130 Genetic Analyser begonnen. Mittels der Sephadex-Platten wurden die Proben von überschüssigen dNTP's, ddNTP's, Salzen und Polymerasen befreit und somit Lesefehler vermieden. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm DNADIST und NEIGHBOR, version 5.5c (Felsenstein, J.1993, Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA).

3 Ergebnisse

Da es am Virologischen Institut der Universität Bonn bis zum Beginn dieser Arbeit noch kein Nachweisverfahren für hMPV gab, war der erste notwendige Schritt die Etablierung eines sensitiven und spezifischen Nachweisverfahrens. Als geeignetes Verfahren erschien dabei die PCR. Nach Durchsicht der bis dato veröffentlichten PCR-Protokolle zum Nachweis von hMPV, fiel die Entscheidung für die von Viazov et al. (2003) veröffentlichte Variante. Zu Beginn wurde zur Etablierung und Verbesserung dieses Protokolls Klone von hMPV in verschiedenen Verdünnungsreihen als Template verwandt. Das daraus entwickelte PCR-Protokoll und die dabei verwendeten Primer und Reagenzien sind dem Material- und Methoden-Teil dieser Arbeit zu entnehmen.

Nach der Etablierung der PCR wurden zunächst einige wenige Rachenspülwasser aus den Wintermonaten 2001/2002 untersucht, um vor Beginn der eigentlichen Testreihe die Abläufe des Verfahrens erneut einer kritischen Überprüfung zu unterziehen und die jeweiligen Schritte zu optimieren.

3.1 RNA-later Puffer

Dieser von Qiagen angebotene Puffer ermöglicht wie im Material- und Methodenteil dieser Arbeit beschrieben die längerfristige Stabilisierung von RNA und somit den Nachweis derselben aus länger archivierten Proben. Dass der Nachweis von hMPV aus ohne RNA-later Puffer archivierten Proben wohl nicht möglich ist, wurde bereits zu Beginn dieser Arbeit festgestellt. Nach Etablierung der PCR wurden Archivproben aus der Zeit vor Verwendung des Puffers im Virologischen Institut der Uni Bonn getestet. Dabei gelang keinerlei Nachweis von hMPV. Dies ist aufgrund fehlender Vergleichsdaten sicherlich kein wissenschaftlicher Beweis der Funktionalität dieses Puffers oder der Notwendigkeit desselben, darf aber schon als deutlicher Hinweis verstanden werden. Einige der untersuchten Proben wurden ebenfalls nicht sofort beim Eintreffen verarbeitet, sondern erst archiviert und dann untersucht. Der Zeitraum der

Archivierung war hier natürlich ein anderer und dennoch scheint die Verwendung des Puffers ratsam und sinnvoll (Uhlenhaut und Kracht, 2005).

3.2 Zellkultur

Mit insgesamt 17 der 114 hMPV-positiven Rachenspülwasser, bei denen ausreichend Material vorhanden war, wurden LLC-MK2-, Vero-B4-, MS-, MDCK- und RD-Zellen inokuliert. Die inokulierten Zellkulturen wurden für 3 Wochen bebrütet und alle 3 Tage mikroskopisch beurteilt. Hierbei zeigte sich kein cytopathischer Effekt (CPE).

Nach Ablauf des Beobachtungszeitraums erfolgte eine PCR aus dem Zellkultur-Überstand.

Bei hMPV-Genom-Nachweis mittels RT-PCR aus dem Überstand der inokulierten Zellkulturen wurde eine LLC-MK2-Zellkultur mit dem Überstand der Ausgangskultur überimpft (Passage). Diese Zellkulturen wurden dann ebenfalls für 3 Wochen bebrütet und alle 3 Tage mikroskopiert, um gegebenenfalls einen cytopathischen Effekt beobachten zu können.

Des Weiteren erfolgte aus dem Überstand der LLC-MK2-Zellkulturen erneut eine RT-PCR, um die erfolgreiche Infektion mit hMPV zu sichern.

Obwohl der hMPV-Genom-Nachweis mittels PCR aus den Überständen der LLC-MK2-Zellkulturen erneut gelang, konnte kein cytopathischer Effekt beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung ist die Tatsache, dass HMPV keine oder nur verspätete CPE's auslöst.

3.3 Optimierung der PCR

Ausgehend von dem von Viazov et al. (2003) veröffentlichten PCR-Protokoll wurde ein eigenes Prozedere erarbeitet. Anhand von Verdünnungsreihen wurde festgestellt, dass unsere optimale Annealing-Temperatur bei 52°C bzw. 53°C für die Nested-PCR und nicht bei 60°C lag. Sowohl die Denaturierungs- als auch die Elongationstemperatur wurde bei den von Viazov et al. (2003) vorgeschlagenen Temperaturen belassen zumindest die Nested-PCR betreffend. Bei der RT-PCR wurde die Denaturierungstemperatur auf 95°C erhöht.

Mittels Zugabe von Magnesium zum Reaktionsansatz der PCR konnte die Sensitivität gesteigert werden. Als Optimum ergab sich eine $MgCl_2$ -Konzentration von 0,5 mM. Hierdurch wurde eine Nachweisbarkeit von hMPV-RNS bis auf eine Verdünnung von 10^6 (Kopienzahl 22/ μ l) erreicht. Das zu erwartende Erstrundenprodukt hatte eine Größe von ca. 640bp, das Produkt der 2. Runde (Nested-PCR) von ca. 320bp.

3.4 hMPV- und RSV-Infektionen

In den Winterzeiträumen 2002/2003 und 2003/2004 wurden insgesamt 632 Proben aus der Kinderklinik der Universität Bonn retrospektiv untersucht. Bei den meisten Proben handelte es sich um routinemäßig gewonnene Rachenspülwasser. Von den 632 Proben stammten 300 aus dem Zeitraum 01.10.2002 bis 31.03.2003 und 332 Proben aus dem Zeitraum 01.10.2003 bis 31.03.2004. Die jeweiligen Proben wurden bei Kindern mit einem Infekt der oberen und unteren Luftwege und einem Verdacht auf ein virales Geschehen entnommen. Es bleibt also bei der Auswertung der Daten zu berücksichtigen, dass nur eine Aussage über hospitalisierte Kinder mit einem Infekt der Luftwege gemacht werden kann. Von den 300 Proben aus dem Jahreswechsel 2002/2003 waren 41 (13,7%) der untersuchten Proben hMPV-positiv. Zum Jahreswechsel 2003/2004 waren es 73 (22,0%). Insgesamt ergibt sich somit eine Anzahl von 114 (18,0%) hMPV-positiven Proben für die Wintermonate der Jahre 2002 bis 2004.

Die jeweiligen Proben wurden ebenfalls mit dem im Material- und Methoden-Teil angegebenen Schnelltest auf RSV untersucht. Hierbei ergaben sich für die beiden Untersuchungsabschnitte folgende Ergebnisse: 2002/2003 gab es 80 (26,7%) und 2003/2004 101 (30,4%) RSV-positive Proben. Insgesamt ergeben sich somit für den Untersuchungszeitraum 181 (28,6%) RSV-positive Rachenspülwasser.

Bei all diesen Daten ist die mehrfache Einbeziehung eines Krankheitsereignisses ausgeschlossen worden.

Bei 25 der 114 hMPV-positiven Proben (21,9%) wurde eine Koinfektion mit RSV nachgewiesen. Dabei entfielen 13 auf den Winterzeitraum 2002/2003 und 12 auf den Winterzeitraum 2003/2004.

Diese Ergebnisse sind Tabelle 6 graphisch aufgearbeitet.

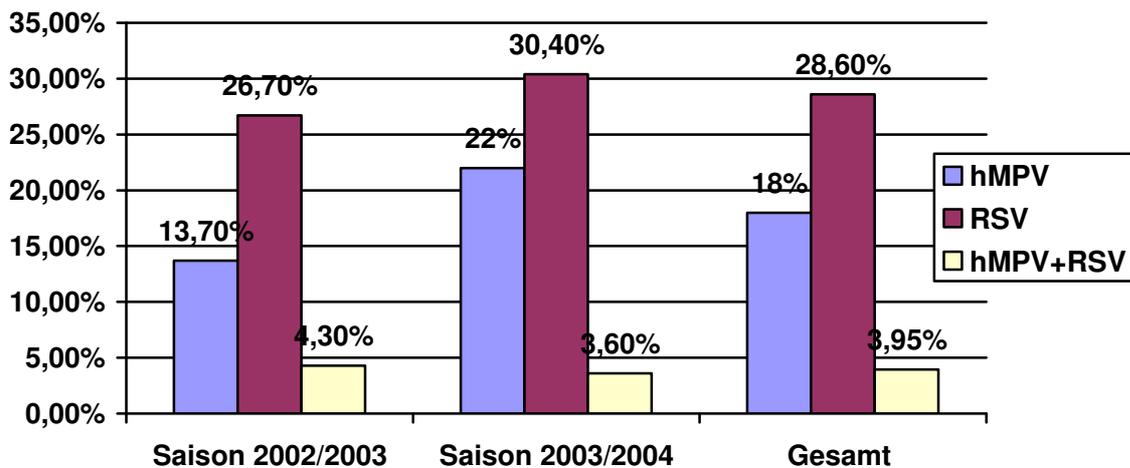


Tabelle 6 Prozentuale Anteile von RSV- und hMPV- bzw. Doppelinfektionen aus den Zeiträumen 01.10.2002 bis 31.03.2003 (Saison 2002/2003), 01.10.2003 bis 31.03.2004 (Saison 2003/2004) und für den gesamten Zeitraum (Gesamt), bezogen auf das Gesamtkollektiv von 300 bzw. 332 Patienten aus den genannten Zeiträumen.

3.5 Altersverteilung

Für die Altersverteilung der Infektionen mit hMPV ergab sich folgende Verteilung: Neugeborene (≤ 4 Lebenswochen) $n = 0$ (0%), 5 Wochen-5 Monate $n = 16$ (14,03%), 6-12 Monate $n = 20$ (17,54%), 13-24 Monate $n = 21$ (18,42%), >24 Monate $n = 31$ (27,19%). Mehr als die Hälfte der hMPV-infizierten Patienten war also älter als 12 Monate und mehr als ein Drittel der Patienten älter als 24 Monate. Bei 26 Patienten (22,8%) war das Alter nicht bekannt.

Die Altersverteilung der Daten wird in Tabelle 7 veranschaulicht.

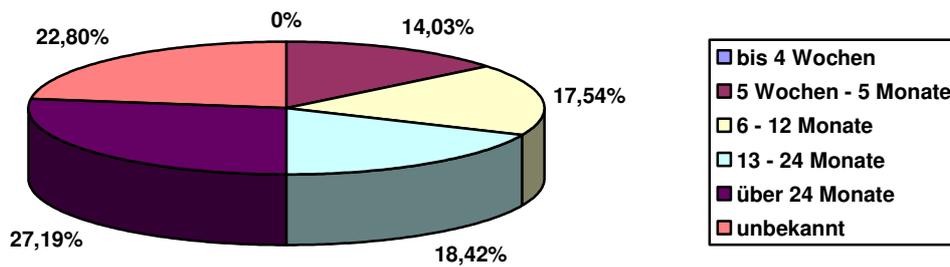


Tabelle 7 Prozentuale Altersverteilung der Patienten mit hMPV-Infektion im Zeitraum 01.10.2002 bis 31.03.2004.

3.6 Saisonaler Verlauf

Für die saisonale Verteilung der Infektionen mit hMPV ergab sich das in Tabelle 8 dargestellte Bild. Hierbei zeigt sich für den Jahreswechsel 2002/2003 keine eindeutige saisonale Häufung, während in der Saison 2003/2004 ein deutliches Maximum im Januar auffiel.

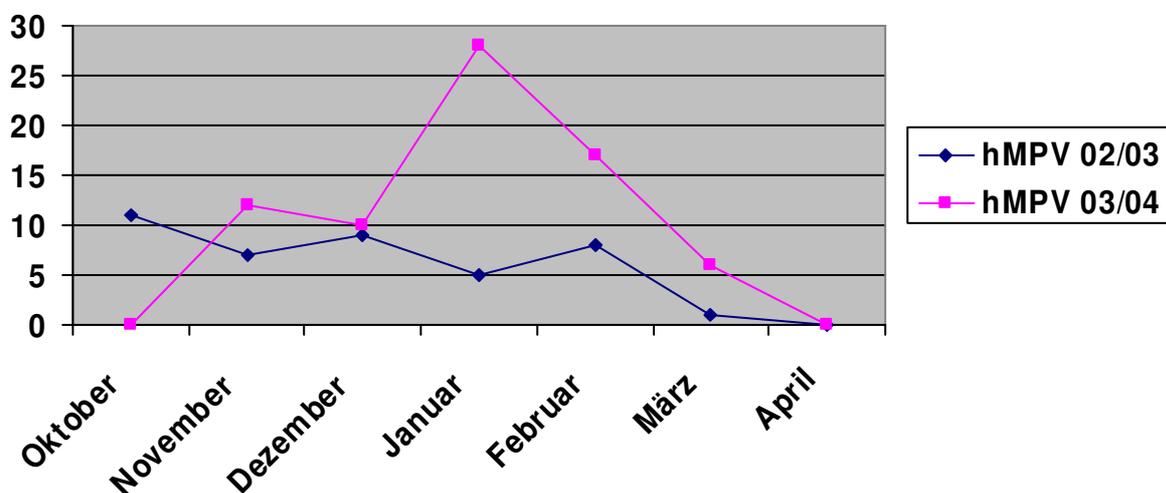


Tabelle 8 Saisonaler Verlauf der Fallzahlen von hMPV in den Winterzeiträumen 2002/2003 und 2003/2004

3.7 Symptomatik und Diagnose

Auf dem Hintergrund des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Virusgenom-Nachweises erfolgte eine Auswertung der klinischen Aspekte durch die Kollegen der Kinderklinik der Universität Bonn. Diese Ergebnisse sind bereits publiziert (Wilkesmann et al. 2006; Wilkesmann et al., 2006a; Wilkesmann 2006b) und sollen hier nur kurz angesprochen werden.

Von den 114 hMPV-positiven Proben war es in 88 Fällen möglich, weitere klinische Daten der Patienten zu erheben.

Bei der stationären Aufnahme ergaben sich ein reduzierter Allgemeinzustand, Husten, Tachypnoe, Einziehungen und Fieber als häufigste Symptome (Wilkesmann, 2006b).

Die häufigste Entlassungsdiagnose bei dem Patientenkollektiv war die der „obstruktiven Bronchitis“ mit 47,9%. Andere Entlassungsdiagnosen in absteigender Häufigkeit waren: „Infekt der oberen Luftwege“ (20,8%), „sonstige Pneumonie“ (10,4%), „Krupp“ (8,3%), „akute Otitis media“ (8,3%), „zentrale Pneumonie“ (6,3%), „Fieberkrampf“ (6,3%), „Apnoe-Bradykardie-Syndrom“ (6,3%), „Asthma bronchiale“ (6,3%), „Serositis“ (1,9%), „Harnwegsinfekt“ (1,9%) und „Enzephalitis“ (1,9%) (Wilkesmann, 2006b).

Ebenso kann dieser Schrift (Wilkesmann, 2006b) entnommen werden, dass die im Kollektiv enthaltenen Frühgeborenen eine aggravierte Verlaufsform der hMPV-Infektion zeigten. Insbesondere traten bei ca. einem Drittel der untersuchten Frühgeborenen mit hMPV Apnoen auf, was eine stationäre Überwachung dieses Kollektivs ratsam erscheinen lässt (Wilkesmann, 2006b).

Ein Unterschied in der symptomatischen Schwere der untersuchten hMPV- und RSV-Fälle konnte im Gegensatz zu vorangegangenen Studien (Boivin et al., 2002; van den Hoogen et al., 2003), die einen mildereren Verlauf bei hMPV beobachtet hatten, nicht nachgewiesen werden (Wilkesmann 2006b).

3.8 Koinfektionen

Als mögliche Koinfektionen wurden RSV und Influenza A und B abgeklärt.

Hierbei zeigte sich, dass 39 der hMPV-positiven Patienten (34,2%) mit mindestens einem weiteren viralen Erreger infiziert waren. 25 (21,9%) hatten eine Doppelinfektion mit RSV und hMPV, bei 14 (12,3%) waren hMPV und Influenza A oder B nachweisbar.

Bei diesen Doppelinfektionen gab es 2 Überschneidungen, d.h. bei 2 Patienten konnten im Winterzeitraum 2003/2004 Influenza, RSV und hMPV nachgewiesen werden.

Auf den Winterzeitraum 2002/2003 entfallen 16 Doppelinfektionen. Bei 13 Proben waren RSV und hMPV und bei 3 Proben hMPV und Influenza nachweisbar.

Im Winterzeitraum 2003/2004 traten 23 Doppelinfektionen auf. Davon entfallen 12 auf RSV und hMPV und 11 auf hMPV und Influenza.

Im Vergleich der beiden Zeiträume fällt also eine deutlich erhöhte Fallzahl von Doppelinfektionen mit hMPV und Influenza im Winterzeitraum 2003/2004 auf.

Insgesamt ergaben sich im beobachteten Kollektiv relativ viele Doppelinfektionen im Vergleich mit anderen Studien (Maggi et al., 2003; Viazov et al., 2003).

Eine charakteristisch andere Verlaufsform bei Koinfektionen ergaben die Auswertung der klinischen Daten nicht. Allerdings ergab sich ein höherer Anteil an zentralen Pneumonien bei Kindern mit Doppelinfektionen (Wilkesmann, 2006a).

3.9 Fälle

Im Rahmen der durchgeführten Screening-Untersuchung auf hMPV wurden zwei besondere Fälle aufgeklärt, die zum allgemeinen Verständnis der hMPV-Pathogenese beigetragen haben.

Beide Fälle sind bereits publiziert (Schildgen et al., 2004; Schildgen et al., 2005a).

Von den als hMPV-positiv identifizierten Proben wurde das Virusgenom abschnittsweise sequenziert. Im Rahmen dieser Sequenzierung ist uns eine von den bisherigen Subtypen-Beschreibungen des humanen Metapneumovirus abweichende Sequenz aufgefallen. Dieser von uns neu entdeckte Typ von hMPV war Auslöser einer schwerwiegenden Exazerbation eines Asthma bronchiale (Schildgen et al., 2004; Geikowski, Dissertationsschrift in Vorbereitung).

Des Weiteren war es uns möglich bei einer tragischerweise letal verlaufenen Enzephalitis hMPV in Lungen- und Hirngewebe post mortem nachzuweisen. Der Patient war ein 14 Monate alter männlicher Patient der hiesigen Universitäts-Kinderklinik, der im Rahmen eines Infektes mit hohem Fieber (Temperatur 39°C) bei 30-minütigem Krampfgeschehen, das trotz zweimaliger Gabe von je 5 mg Diazepam rektal nicht sistierte, in ein Krankenhaus der Erstversorgung eingeliefert wurde. Der dortige Aufnahmebefund zeigte einen acht Kilogramm schweren Patienten mit warmen und

rosigen Extremitäten, einem Puls von 140/min und einer Sauerstoff-Sättigung von 93%. Die klinische Untersuchung ergab keinerlei petechiale Hautveränderungen, Herz und Lunge blieben ohne pathologischen Befund, genau wie die Palpation von Leber und Milz.

Der Infekt hatte 2 Tage zuvor mit Rhinitis, leichter Pharyngitis und Husten ohne Zeichen eines Infektes des unteren Respirationstraktes begonnen. Am Tag der Aufnahme hatte er morgendlich einmal erbrochen und seitdem die Nahrungsaufnahme verweigert. Am Nachmittag des Aufnahmetages kamen zu den schon geschilderten Symptomen noch Fieber und Zuckungen der Extremitäten ohne einen begleitenden Opisthotonus. Zu Beginn der Zuckungen verdreht der Patient beide Augen. Danach waren die Pupillen starr und auf eine Größe von drei bis 4 Millimeter fixiert.

Bei dem Patienten handelte es sich um ein ehemaliges Frühgeborenes der 34. Schwangerschaftswoche mit einem Geburtsgewicht von 2300 Gramm. Nach der Geburt wurde er aufgrund eines vorzeitigen Blasensprungs für mehrere Tage antibiotisch behandelt ohne aber Zeichen eines Infektes zu entwickeln. Die weitere Neonatalzeit verlief abgesehen von einer erhöhten Irritabilität, die auf den Nikotinkonsum der Mutter während der Schwangerschaft zurückgeführt wurde, unauffällig. Im Alter von neun Monaten wurde der Verdacht einer muskulären Hypertonie bei unserem Patienten geäußert aber ohne, dass die Symptomatik als so sicher gedeutet wurde, dass eine sofortige diagnostische Abklärung erforderlich erschien. Die nach der Geburt und im Alter von zwei Wochen durchgeführte Schädel-Sonographie zeigte einen unauffälligen Befund.

Das anfänglich beschriebene Krampfgeschehen am Aufnahmetag sistierte ungefähr zwei Stunden nach der intravenösen Gabe von Diazepam, Clonazepam, Lorazepam und Phenobarbital. Der Blutdruck war ohne großvolumige Infusionsgabe oder vasopressiver Therapie stabil. Unter der Gabe von zwei Litern Sauerstoff lag die Sättigung bei 100%. Zum Zeitpunkt des Sistierens des Krampfes betrug die Glasgow coma scale (GSC) 10. Die Lumbalpunktion zeigte keine Pleozytose, die Liquor-Glucose betrug 4,6 mmol/l und das Liquoreiweiß zeigte sich mit 116 mg/dl erhöht (Normwert unter 45 mg/dl). Obwohl die Leukozytenzahl und das C-reaktive Protein (CRP) keinerlei Anhalt für eine Entzündung ergaben, wurde unverzüglich eine empirische Antibiotikatherapie mit Ceftriaxon, Ampicillin, Gentamicin und Aciclovir eingeleitet. Das

durchgeführte Elektro-Enzephalogramm zeigte slow wave-Komplexe ohne Zeichen einer Krampfaktivität.

Das zwölf Stunden nach Aufnahme durchgeführte Magnetresonanztomogramm (MRT) zeigte das Bild einer Meningoenzephalitis ohne für einen spezifischen Erreger typische Zeichen. Im Laufe der nächsten Stunden aggravierte die Glasgow coma scale (GCS) auf 5 und die Pupillen zeigten sich bei fortbestehender Starre und ausbleibender Lichtreaktion etwas weiter mit einem Durchmesser von acht Millimetern. Im Rahmen der erforderlichen Intubation zeigte der Patient keinerlei Abwehrreflex. Unter Beatmung wurde er dann zur Anlage eines zentralen Venenkatheters 24 Stunden nach Aufnahme auf die Intensivstation der Universitätskinderklinik Bonn verlegt. Bei Ankunft des Patienten zeigte er sich tief komatös (GCS 5) und ohne Schmerzreaktion. Die rektale Temperatur betrug 32°C, die Herzfrequenz betrug bei arrhythmischer Herzrätigkeit 90/min und der arterielle Druck lag bei 29 mmHg.

Der Korneal- und der Würgereflex waren erloschen und es zeigten sich keinerlei Spontanbewegungen. Die weiterhin starren Pupillen zeigten eine Größe von fünf Millimetern. Die durchgeführte Röntgen-Thorax-Untersuchung ergab keinerlei Anhalt für eine Pneumonie und bestätigte die korrekte Lage von Tubus und zentralem Venenkatheter. Nach der Stabilisierung der Kreislauf-Parameter zeigte sich keinerlei symptomatische Besserung. Ein daraufhin durchgeführtes Magnetresonanztomogramm (MRT) und ein Computertomogramm (CT) zeigen Abbildung 9 und 10.

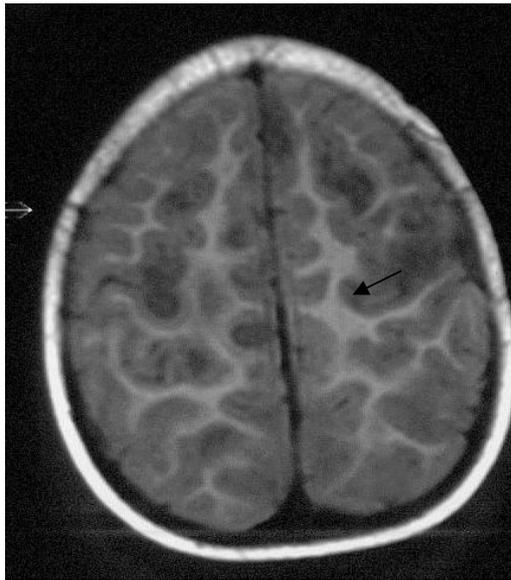


Abbildung 9 T1-gewichtetes axiales MRT Bild (A), coronal FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) (B) eines 14 Monate alten Patienten mit hMPV-Nachweis. Deutliche Signalanhebung kortikal und subkortikal; als Läsionen im Rahmen einer Enzephalitis gedeutet (Schildgen et al.2005).

Zur Verfügung gestellt durch die Radiologische Klinik der Universität Bonn.

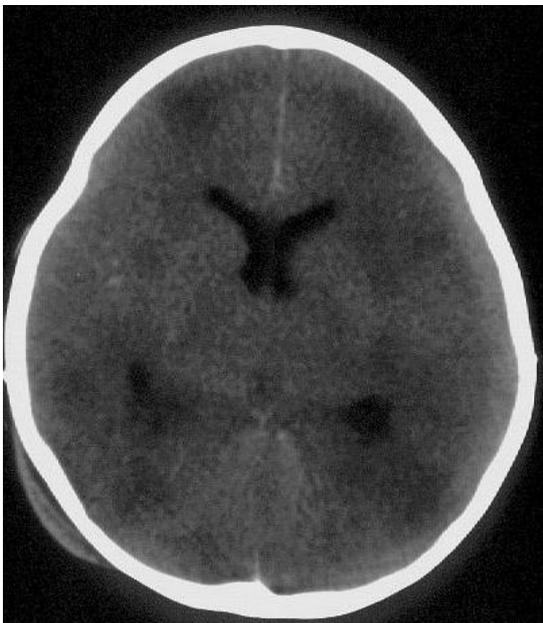


Abbildung 10 CT Bilder desselben Patienten 2 Tage nach erfolgtem MRT. Hypodense Areale; als Zeichen eines generellen Hirnödems (Mark und Rinde) gedeutet. Hyperdense Anreicherung im Arachnoidalraum, die im MRT noch nicht gesehen wurde (Schildgen et al. 2005).

Zur Verfügung gestellt durch die Radiologische Klinik der Universität Bonn

Der Hirndruck stieg trotz Anlage einer externen Ableitung auf 90 cm H₂O.

Trotz wiederholter Blutkulturen, Urin-, Liquoruntersuchungen und Entnahme von Gehirnproben konnte zunächst kein bakterielles oder virales Pathogen gefunden werden. Ebenso erfolglos blieb die Suche nach zugrunde liegenden Stoffwechselstörungen. Ein battered-child-Syndrom erschien aufgrund fehlender ophthalmologischer und radiologischer Zeichen unwahrscheinlich.

Nach zehn Tagen intensivmedizinischer Betreuung ohne Zeichen einer symptomatischen Besserung wurde das Kind, im Einklang mit der deutschen Gesetzgebung, für tot erklärt und extubiert. Der Patient verstarb kurz darauf und es wurde eine Autopsie durchgeführt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die intensivmedizinische Betreuung des Patienten insbesondere die ausreichende Hydratation und Oxygenierung betreffend suffizient war. Die wahrscheinlichste Ursache für die Symptomatik und den trotzdem nicht zu verhindernden Todes des Patienten scheint nach ausführlicher Diskussion aller Fakten mit den Intensivmedizinern, Neurochirurgen, Neuroradiologen und pädiatrischen Neurologen eine Enzephalitis zu sein. Weniger wahrscheinliche Differentialdiagnosen, die trotzdem hier aufgeführt werden sollen, waren ein postiktiales Ödem nach einem Status epilepticus, ein Hirnödem aufgrund der prolongierten Hyperthermie und eine Hypoxaemie.

Für die Überlassung und Beurteilung der medizinischen Daten sei den Kollegen der Kinderklinik der Universität Bonn, namentlich Herrn Dr. med. A. Simon herzlich gedankt. Auch die ausführlichen Untersuchungen post mortem ergaben zunächst keinerlei Hinweis für eine virale oder bakterielle Infektion. Lediglich der RT-PCR-Nachweis des HMPV-Genoms aus RNA, die post mortem aus Hirngewebe und Lunge isoliert wurde, war wiederholt positiv. So waren insbesondere alle bekannten Erreger einer Enzephalitis nicht nachweisbar (siehe Tabelle 11).

Für die Durchführung der virologischen Routinediagnostik sei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Virologischen Abteilung herzlich gedankt.

Der einzige nachweisbare Erreger war wie oben erwähnt hMPV. Dieser wurde mittels der im Material- und Methodenteil dieser Arbeit beschriebenen PCR-Protokoll in Hirn- und Lungengewebe und in einer mit Lungengewebe infizierten drei Wochen inkubierten Vero-Zellkultur nachgewiesen. Bei dieser Zellkultur war kein cytopathischer Effekt

sichtbar. Die Sequenzierung der hMPV-positiven Proben und Kulturen ergab eine große Ähnlichkeit der RNA-Sequenz von Lungen-, Hirngewebe und Zellkulturüberstand. Aufgrund der Tatsache, dass diese Sequenz sich deutlich von den bisher in unserem Labor sequenzierten hMPV-positiven Proben unterschied, kann eine Laborkontamination und damit ein falsch positives Ergebnis nahezu ausgeschlossen werden.

Die pathologischen Befunde der Lunge und des Gehirns ergaben Zeichen einer aktiven Entzündung in beiden Geweben. In der Lunge zeigte sich eine deutliche Schwellung der Alveolarwand und ein teilweise bis komplett durch eine flüssige Mischung aus Entzündungszellen verlegtes alveoläres Lumen. Die Hälfte der Alveolen im untersuchten Bereich war atelektatisch. Bei einigen Alveolen fand sich der Verlust von Epithelium. Die Meningen waren diffus verdickt aufgrund einer Ansammlung von Neutrophilen, einigen Makrophagen vermischt mit Fibrin und wenigen Erythrozyten.

Der Versuch eines spezifischen Immunnachweises von hMPV in Paraffinschnitten von Lunge und Gehirn des Patienten blieb leider erfolglos.

Für die Begutachtung des Gewebes sei Frau Prof. G. Knöpfle aus dem Institut für Pathologie der Universität Bonn herzlich gedankt.

Virus	Liquor	Gehirn	Leber	Milz	Niere	Lunge	Herz	diagnostische Methode
HSV (PCR)	-	-	-	ND	-	-	-	hausinterne nested PCR + Zellkultur
VZV (PCR)	-	-	ND	ND	ND	-	ND	hausinterne nested PCR + Zellkultur
Adenovirus (PCR)	ND	-	-	-	-	-	-	hausinterne nested PCR
HHV-6 (PCR)	ND	-	-	-	-	-	-	hausinterne nested PCR
HBV (PCR)	ND	-	-	-	-	-	-	hausinterne nested PCR
HCV (PCR)	ND	-	-	-	-	-	-	hausinterne nested PCR
Parvo B19 (PCR)	ND	-	-	-	-	-	-	hausinterne nested PCR
CMV (PCR)	ND	-	-	-	-	-	-	hausinterne nested PCR + Zellkultur
Enterovirus (PCR)	ND	-	-	-	ND	-	-	hausinterne nested PCR + Zellkultur
RSV (Antigen)	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	Antigen ELISA (siehe Mat & Methoden)
RSV (Zellkultur)	ND	-	-	-	-	-	-	Zellkultur
Influenza A+B	ND	-	-	-	-	-	-	Zellkultur
Mumps	ND	-	-	-	-	-	-	Zellkultur
Masern	ND	-	-	-	-	-	-	Zellkultur
hMPV (PCR)	-	+	ND	ND	ND	+	ND	hausinterne PCR
hMPV (PCR von Zellkulturüberstand)	-	+	ND	ND	ND	+	ND	hauseigene PCR von Verozellkultur-überständen

Tabelle 11 Durchgeführte virologische Testungen an Gewebeproben des 14 Monate alten Patienten mit HMPV-Enzephalitis unter Angabe des Nachweisverfahrens.

–, negativ; +, positiv; ND, nicht durchgeführt; PCR, Polymerasekettenreaktion; ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay; HSV, Herpes simplex Virus; VZV, Varizella zoster Virus; HHV, Humanes Herpes Virus; HBV, Hepatitis B Virus;

HCV, Hepatitis C Virus; CMV, Zytomegalie Virus; RSV, respiratory syncytial virus; hMPV, Humanes Metapneumovirus.

Vor dem Tod des Patienten wurden mittels PCR aus Liquor und Hirnbiopsie bereits HSV und VZV als mögliche, die Enzephalitis auslösende Erreger ausgeschlossen. Symptome von Masern und Mumps wurden klinisch nicht beobachtet und laut der erhobenen Anamnese war der Patient gegen beide Erreger geimpft.

Post-mortem wurden dann mehrere Testungen an Gewebeproben vorgenommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gewebeproben, Liquor und Zellkulturüberstände auf hMPV getestet und es konnte hMPV in Lungen- und Hirngewebe des Patienten nachgewiesen werden.

Bei dem hier beschriebenen Fall handelt es sich um den ersten Nachweis einer letal verlaufenden, möglicherweise durch hMPV verursachten Enzephalitis. Neben dem Nachweis von hMPV mittels PCR aus Lunge und Gehirn des Patienten sprechen noch andere Indizien für das neu entdeckte Paramyxovirus als Ursache dieser Erkrankung. So ähneln die neurologische Symptomatik und der MRT-Befund einer vorbeschriebenen Infektionen mit dem Nipah-Virus, das ebenfalls ein Vertreter der Paramyxoviren ist (Chua et al., 1999; Paton et al., 1999).

Außerdem sind inzwischen zwei weitere Veröffentlichungen erschienen, die die Möglichkeit einer Enzephalitis durch HMPV bestätigen. Die eine Arbeit befasste sich mit dem Humanen Metapneumovirus und deckte zwei Fälle von HMPV-Infektion des Respirationstraktes und Enzephalitis auf (Kaida et al., 2006). Die andere Arbeit war eine Studie über Enzephalitis-Erreger. Hier wurden insgesamt 1570 Enzephalitis-Fälle untersucht und dabei 4 mit HMPV-Assoziation gefunden (Glaser et al., 2006).

Die Veröffentlichung zu dem beschriebenen Fall einer HMPV-assoziierten Enzephalitis ist dem Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

3.10 hMPV und Otitis media

Da einige Viren, die den Respirationstrakt befallen, ebenso auch eine Otitis media acuta auslösen können, z.B. RSV und Rhinoviren (Monobe et al., 2003), sollte der Frage nachgegangen werden, wie sich dies bei hMPV verhält. Hierfür wurden 104 Rachenabstriche von Kindern im Alter zwischen einem und zehn Jahren mit klinischem

Verdacht auf eine Otitis media gesammelt. Die Proben wurden in der Kinderarztpraxis Nick – Schuster – Ahl in Darmstadt im Zeitraum von November 2003 bis März 2004 entnommen. Den Kollegen sei für die Kooperation herzlich gedankt.

Keiner der einbezogenen Patienten war chronisch krank oder mit rezidivierenden Otitiden vorbelastet. Diese Rachenabstriche wurden nach dem schon beschriebenen Verfahren auf hMPV untersucht.

Die hMPV-positiven Proben beliefen sich in diesem Fall auf 14 (13,46%). Eine Nachforschung über das klinische Erscheinungsbild der oben beschriebenen Patienten mit einem respiratorischen Infekt ergab, dass bei 13 (14,77%) der hMPV-positiv getesteten der klinische Verdacht auf eine akute Otitis media bestand. Im Vergleich zu Monobe et al. (2003) kann man somit sagen, dass hMPV möglicherweise ähnlich häufig wie RSV an der Genese einer Otitis media acuta beteiligt ist (Schildgen et al., 2005; Geikowski, Dissertation in Arbeit).

Die hier vorgestellte Untersuchung wurde ebenfalls bereits publiziert (Schildgen et al., 2005).

4 Diskussion

Die bisher erhobenen Daten über hMPV belegen, dass es einen nicht zu vernachlässigenden Stellenwert innerhalb der Gruppe der viralen Erreger von Infekten der oberen und unteren Atemwege hat. Insofern scheint es wichtig, an den betreffenden Instituten sensitive und spezifische Nachweisverfahren für hMPV zu etablieren. Im Rahmen dieser Arbeit ist dieser Schritt für das Virologische Institut der Universität Bonn gelungen. Mittels einer PCR ist hier dieser Nachweis nun möglich. Obwohl dieses Verfahren im Vergleich zu anderen möglichen Varianten wie zum Beispiel einem ELISA aufwendiger und kostenintensiver ist, scheint jedoch die beste Wahl zu sein. So wurde vor kürzerer Zeit am Virologischen Institut der Universität Bonn das Nachweisverfahren für RSV und Influenza sowie weitere neu entdeckte Erreger ergänzt. Bis dato war ein Schnelltest verwendet worden, der nun um eine PCR-Nachweis ergänzt wurde. Hintergrund dieser Umstellung sind neuere Vergleichsarbeiten zu den beiden Verfahren, die die Überlegenheit der PCR demonstrieren. Während ein positiver Schnelltest durchaus eine Aussagekraft hat, erscheint ein Ausschluss mittels eines negativen Testes nicht möglich (Alexander et al., 2005; Symris et al., 2004). Sicherlich muss bei der Bewertung solcher Untersuchungen immer bedacht werden, dass die jeweiligen Schnellteste unterschiedlicher Hersteller durchaus unterschiedliche Güte haben mögen und somit ein einmaliger Vergleich kein abschließendes Urteil erlaubt. Dennoch scheint sich anhand mehrerer Untersuchungen in diesem Rahmen die PCR als das sensitivere Nachweisverfahren herauszukristallisieren. Diese Erkenntnis haben also als Bestätigung unsere Wahl für eine PCR als hMPV-Nachweis also durchaus eine Aussagekraft auch wenn es mittlerweile Studien zu hMPV-Nachweis mittels ELISA gibt (Ebihara et al., 2005; Liu et al., 2007).

Des Weiteren muss man einen anderen Aspekt der hier durchgeführten PCR oder des gesamten Prozedere zum Nachweis von HMPV noch genauer betrachten. Es fällt auf, dass im Vergleich mit anderen Arbeiten bei der vorliegenden die Inzidenz von hMPV erkennbar höher lag. Sicherlich ermöglicht die Wahl von hospitalisierten Kindern einer Universitätsklinik mit Verdacht auf einen viralen Infekt der oberen und unteren Atemwege als Kollektiv einen Erklärungsansatz hierfür. Dennoch kann diese Tatsache wohl kaum alleiniger Grund dieser augenfälligen Diskrepanz zu anderen

Untersuchungen sein, zumal die meisten Studien an hospitalisierten Patienten durchgeführt wurden. Betrachtet man die Einzelaspekte genauer, so fällt auf, dass eine ähnlich hohe Inzidenz bei Viazov et al., 2003 beschrieben ist. Das in dieser Arbeit verwendete PCR-Protokoll war in abgewandelter Form auch Grundlage dieser Arbeit. Die dort verwendeten Primer binden in der N-Region. Diese ist hoch konservativ. Das bedeutet, dass durch die Verwendung solcher Primer deutlich mehr sich in anderen Regionen unter Umständen unterscheidende Subtypen nachgewiesen werden können. Aufgrund dieser sich von bisherigen Arbeiten unterscheidenden Grundlage war auch die Entdeckung eines neuen Subtyps möglich, der sich in anderen Regionen als der N-Region deutlich von den bisher bekannten Subtypen unterscheidet.

Ein weiteren möglichen Erklärungsansatz für die hohe Inzidenz für hMPV im Kollektiv dieser Arbeit bieten die vorliegenden Ergebnisse selber. So fällt eine Diskrepanz der Häufigkeiten in den beiden untersuchten Wintersaisons auf. Während in der Saison 2002/2003 bei 13,7% der Patienten hMPV nachgewiesen werden konnten, waren es 2003/2004 22%. Dies zeigt, dass bei hMPV offensichtlich nicht nur einer saisonalen sondern auch einer unterschiedlichen jährlichen Häufung unterlegen ist. Um hierbei von einer Epidemie in der Saison 2003/2004 sprechen zu können, sind weder die hier vorliegenden Daten noch die Kenntnisse über die Infektionswege von hMPV ausreichend.

Einschränkend muss man bei den vorliegenden Daten noch ergänzen, dass lediglich die Patienten in diese Studie aufgenommen wurden, die hospitalisiert waren und bei denen eine Rachenspülwasser-Untersuchung von den behandelnden Ärzten angeordnet wurde. Somit kann man vermuten, dass evtl. noch mehr Kinder in den betreffenden Wintermonaten an hMPV erkrankt waren ohne erfasst worden zu sein. Geht man jedoch davon aus, dass die Rachenspülwasser-Untersuchung bei Kindern mit einem Infekt der Atemwege häufig durchgeführt wird, dann dürfte die Zahl der nicht erfassten Fälle gering sein. Denn wie andere Studien gezeigt haben, ist die Zahl der asymptomatischen hMPV-Infektionen bei Kindern sehr gering (Williams et al., 2004).

Das eben angesprochene, außergewöhnliche Primerdesign erscheint noch auf einem anderen Hintergrund als diskussionswürdig. So ist es uns wie im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben möglich gewesen, einen von den bisher bekannten Sequenzen abweichenden hMPV-Typ nachzuweisen. Die möglichen Erklärungen hierfür sind

mannigfaltig. Sowohl ein geographischer Ansatz ist denkbar, denn in Bonn wurden von niemand anderem Proben auf hMPV untersucht. Ebenso ist eine saisonale Besonderheit denkbar oder eine Kombination aus den beiden genannten Erklärungsansätzen. Aber ein eben auch möglicher und interessanter Gedanke ist die Möglichkeit, dass es mittels dieser Primer möglich ist andere hMPV-Typen zu finden. Das würde sofern man davon ausgeht, dass es nicht nur andere, sondern eben auch mehr Typen sind, einen weiteren interessanten Ansatz für die Erklärung der hohen Fallzahlen der vorliegenden Arbeit ergeben. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits in Südafrika gemacht (Ludewick et al., 2005).

Die in dieser Arbeit beobachteten durch hMPV ausgelösten Krankheitsbilder decken sich weitestgehend mit bisher gemachten Beobachtungen. So scheint hMPV das klinische Erscheinungsbild betreffend RSV am nächsten zu sein. Und hMPV scheint zumindest bei den bisher untersuchten Kollektiven nach RSV der zweitwichtigste virale Erreger von Infekten des oberen und unteren Respirationstraktes zu sein (Wilkesmann, 2006b).

Ein besonders interessanter Aspekt der Klinik von HMPV soll hier aber noch kurz angerissen werden: die auffällige Verbindung zwischen hMPV und Asthma. Neben dem publizierten Fall einer Exazerbation eines bestehenden Asthma bronchiale, gab es auch im Kollektiv der vorliegenden Arbeit noch weitere Fälle, in denen eine Verknüpfung von Asthma und hMPV bestand. Auch andere Arbeiten haben den Verdacht aufgeworfen, dass bei diesem speziellen Aspekt des Respirationstraktes hMPV die größere Rolle als RSV spielen könnte (Geikowski, Dissertation in Arbeit).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Frage nach der Schwere von Koinfektionen von hMPV mit anderen respiratorischen Erregern. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Koinfektionen, insbesondere die mit RSV, keine nennenswert andere Verlaufsform zeigen (Wilkesmann, 2006a).

Da im Rahmen dieser Arbeit keinerlei Daten über die Therapie der jeweiligen Patienten gewonnen wurde, ist keine Aussage über die Wirksamkeit verschiedener Therapieoptionen möglich. Da bisher aber nur symptomatische Maßnahmen als Therapie zur Verfügung stehen, erscheint die Auswertung solcher Daten ohnehin schwierig. Allerdings gibt es schon erste Ansätze für therapeutische und prophylaktische

Maßnahmen, wie die Studie mit Ribavirin oder die ersten Schritte zu einem Impfstoff, deren weitere Entwicklung ein spannendes Feld sein dürfte (Hamelin et al., 2006).

Einen ganz neuen Aspekt hat der bereits veröffentlichte Fall einer möglichen zentralen Infektion mit hMPV aufgeworfen. Einige Vertreter der Paramyxoviren sind wie in der Einleitung beschrieben in der Lage die Blut-Liquor-Schranke zu überwinden. Für hMPV ist diese Frage noch nicht untersucht, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben aber einen ersten Hinweis darauf.

Auffällig ist allerdings, dass das wie in dieser Arbeit mehrfach erwähnt dem hMPV-Virus klinisch nächste Virus, das RS-Virus, nicht in der Lage ist, zentrale Infektionen zu verursachen. Einen interessanten Erklärungsansatz für diese Diskrepanz bietet die Beobachtung, dass hMPV im Gegensatz zu RSV nicht über die beiden Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 verfügt. Diese beiden Proteine stehen im dringenden Verdacht entscheidende Modulatoren der Immunantwort zu sein (Bossert et Conzelmann, 2002; Spann et al., 2004). Das würde bedeuten, dass sie Einfluss auf die Infektionswege des jeweiligen Virus im Körper nehmen und möglicherweise die oben erwähnte Diskrepanz zwischen RSV und hMPV erklären können. Abschließende Urteile sowohl über die Bedeutung von NS1 und NS2 als auch über zentrale Infektionen mit hMPV sind allerdings zurzeit noch nicht möglich, sind aber sicherlich ein lohnenswerteres Gebiet für weitere Forschungen.

5 Zusammenfassung

Das 2001 in den Niederlanden von van den Hoogen et al. entdeckte humane Metapneumovirus ist zweifelsohne ein bedeutender viraler Erreger von Infekten des Respirationstraktes. Diese Arbeit hat im Tandem mit Geikowski auf der Nachweismethode einer PCR beruhend 632 Proben aus zwei Wintersaisons auf hMPV untersucht. Die Daten ergaben eine hohe Inzidenz von um die 20% für hMPV und bestätigen somit seine Rolle als zweitwichtigster viraler Vertreter bei respiratorischen Infekten nach RSV. Die Klinik dieser beiden Viren ist ähnlich. RSV scheint etwas schwerwiegendere Fälle auszulösen, hMPV etwas stärker mit Asthma assoziiert zu sein. Die im Rahmen dieses Kollektivs aufgetretenen, besonderen Fälle haben zwei neue Fragen aufgeworfen. Erstens die Frage, ob hMPV in der Lage ist zentrale Infektionen auszulösen. Diese Arbeit war einer erster Hinweis auf diese Möglichkeit und die beschriebenen zwei neueren Arbeiten bestätigen dies.

Die zweite aufgeworfene Frage ist die der Überlegenheit der von Viazov et al. (2003) verwendeten Primer. Die hohen Fallzahlen und die Entdeckung eines neuen Typs von hMPV zeigen, dass es für zukünftige Nachweisverfahren von hMPV zu wissenschaftlichen oder diagnostischen Zwecken sinnvoll erscheint, sich dieser Primer oder ähnlicher, auch am N-Gen bindender Primer, zu bedienen.

6 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

Agapov E, Sumino KC, Gaudreault-Keener M, Storch GA, Holtzman MJ. Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without change in illness. *J Infect Dis* 2006; 193: 396-403

Alexander R, Hurt AC, Lamb D, Wong FY, Hampson AW, Barr IG. A comparison of a rapid test for influenza with laboratory-based diagnosis in a paediatric population. *Commun Dis Intell*, 2005; 29: 272-276

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

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, 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

Brown JW, Kirkland HB, Hein GE. Central nervous system involvement during mumps. *Am J Med Sci* 1948; 215: 434-441

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

Buckland R, Wild TF. Is CD46 the cellular receptor for measles virus? *Virus Res* 1997; 48:1-9

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 & Wilkens, 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

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

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

den Hoogen BG van, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RAM, Osterhaus ADME. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719-724

den Hoogen BG van, 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

den Hoogen BG van, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, de Swart RL, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Antigenic and genetic variability of human metapneumovirus. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 658-666

DonohueWL, Playfair FD, WhitakerL. Mumps encephalitis: Pathology and pathogenesis. *J Pediatr* 1955; 47: 395-412

Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 1993; 75: 295-305

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, Yoshioka M, Ma X, Kobayashi K. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *Med Virol* 2003; 70: 281-283

Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1138-1141

Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003; 111: 1407-1410

Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 2003; 187: 785-790

Finkeldey W. Über die Riesenzellbefunde in den Gaumenmandeln, zugleich ein Beitrag zur Histopathologie der Mandelveränderungen im Maserninkubationsstadium. *Virchows Arch* 1931; 281: 323-329

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

Freyemouth F, Vabret A, Legrand L, Etradosi 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

Gamble DR. Relationship of antecedent illness to the development of diabetes in children. *Br Med J* 1980; 281: 99-101

Garcia-Garcia ML, Calvo RC, Martin V, Lopez Huertas MR, Casas F, Diaz-Delgado IR, Perez-Brena P. Respiratory infections due to metapneumovirus in hospitalized infants. *An Pediatr (Barc)* 2004; 61: 213-218

Gardner PS, McQuillin J, Court SD. Speculation on pathogenesis in death from respiratory syncytial virus infection. *Br Med J* 1970; 1: 327-330

Gibbs FA, Gibbs EL, Carpenter PR, Soies HW. Electroencephalographic abnormality in uncomplicated childhood diseases. *JAMA* 1959; 171: 1050-1055

Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, Schnurr DP, Forghani B, Cossen CK, Schuster FL, Christie LJ, Tureen JH. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1565-1577

Goldfield M, Boyer NH, Weinstein L. Electrocardiographic changes during the course of measles. *J Pediatr* 1994; 46: 30-32

Graf N, Hille A, Jost W, Muller J. Polyvalent immunoglobulins in prevention of viral infections in children with neoplastic diseases treated with immunosuppressive therapy. *Pediatr Padol* 1991; 4: 187-191

Greenberg BL, Sack RB, Salazar-Lindo E, Budge E, Gutierrez M, Campos M, Visberg A, Leon-Barua R, Yi A, Maurutia D, et al. Measles-associated diarrhea in hospitalized children in Lima, Peru: pathogenic agents and impact on growth. *J Infect Dis* 1991; 163: 495-502

Greensill J, McNamara PS, Dove Winifred, 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

Hall CB, Douglas RG Jr. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* 1981; 99: 100-103

Halsey NA, Modlin JF, Jabbour JT, Dubey L, Eddins DL, Ludwig DD. Risk factors in subacute sclerosing panencephalitis: a case-control study. *Am J Epidemiol* 1980; 111: 415-424

Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 983-990

Hamelin ME, Prince GA, Boivin G. Effect of ribavirin and glucocorticoid treatment in a mouse model of human metapneumovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 774-777

Hanninen P, Arstila P, Lang H, Salmi A, Panelius M. Involvement of the central nervous system in acute, uncomplicated measles virus infection. *J Clin Microbiol* 1980; 11: 610-613

Heikinnen 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

Hoffman HE, Hofschneider PH, Neubert WJ. Sendai virus gene expression in lytically and persistently infected cells. *Virology* 1990; 177: 131-140

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

Homma M, Tamagawa S. Restoration of the fusion activity of L cell-borne Sendai virus by trypsin. *J Gen Virol* 1973; 19: 423-426

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

Jartti T, van den Hoogen BG, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002; 360: 1393-1394

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

Kaida A, Iritani N, Kubo H, Shiomi M, Kohdera U, Murakami T. Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan. *J Clin Virol* 2006; 35: 394-399

Kamahora J, NiiS. 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

Kaplan LJ, Daum RS, Smaron M, McCarthy CA. Severe measles in immunocompromised patients. *JAMA* 1992; 9: 1237-1241

Kato A, Cortese-Grogan C, Moyer SA, Sugahara F, Sakaguchi T, Kubota T, Otsuki N, Kohase M, Tashiro M, Nagai Y. Characterization of the amino acid residues of sendai virus C protein that are critically involved in its interferon antagonism and RNA synthesis down-regulation. *J Virol* 2004; 78: 7443-7454

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

Kim HW, Arrobio JO, Brandt CD, Jeffries BC, Pyles G, Reid JL, Chanock RM, Parrott RH. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am J Epidemiol* 1973; 98: 216-225

Kirsten MS, Kim CT Collins PL. Effects of non-structural proteins NS1 und NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF- κ B, and proinflammatory cytokines. *J Virol* 2005; 9: 5353-5362

Koplik H. The diagnosis of the invasion of measles from a study of the exanthema as it appears on the buccal mucous membrane. *Arch Pediatr* 1896; 13: 918-931

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

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

Liu L, Bastien N, Sidaway F, Chan E, Li Y. Seroprevalence of human metapneumovirus (hMPV) in the Canadian province of Saskatchewan analyzed by a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Virol*, 2007; 79: 308-313

Lohr JM, Oldstone MB. Detection of cytomegalovirus nucleic acid sequences in pancreas in type 2 diabetes. *Lancet* 1990; 336: 644-648

Louie JK, Schnurr DP, Pan CY, Kiang D, Carter C, Tougaw S, Ventura J, Norman A, Belmusto V, Rosenberg J, Trochet G. A summer outbreak of human metapneumovirus infection in a long-term-care facility. *J Infect Dis* 2007; 196: 705-708

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

Mackay IM, Bialasiewicz S, Walizzaman 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, Ragazzo 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

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

Meert K, Heidemann S, Abella B, Sarnaik A. Does prematurity alter the course of respiratory syncytial virus infection? *Crit Care Med* 1990; 18: 1357-1359

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

Morrison JC, Givens JR, Wiser WL, Fish SA. Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertil Steril* 1975; 7: 655-659

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, 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

Novick SL, Hoekstra D. Membrane penetration of Sendai virus glycoproteins during the early stages of fusion with liposomes as determined by hydrophobic photoaffinity labeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7433-7437

Osterhaus A, Fouchier R. Human metapneumovirus in the community. *Lancet* 2003; 361: 890-891

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, Umapathi T, Sng I, Lee CC, Lim E, Ksiazek TG. Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *Lancet*, 1999; 354: 1253-1256

Pelleteier 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

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

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; 324: 163-166

Saito H, Takahashi Y, Harata S, Tanaka K, Sano T, Yamada A, Yamazaki S, Marita M. Isolation and characterization of mumps virus strains in a mumps outbreak with a high incidence of aseptic meningitis. *Microbiol Immunol* 1996; 40: 271-275

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

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467

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, 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

Schildgen O, Glatzel T, Geikowski T, Scheibner B, Simon A, Bindl L, Born M, Viazov S, Wilkesmann A, Knöpfle G, Roggendorf M, Matz B. Human Metapneumovirus RNA in Encephalitis Patient. *Emerg Infect Dis* 2005a; 11: 467-470

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

Silverstein AM. Clemens Freiherr von Pirquet: explaining immune complex disease in 1906. *Nat Immunol* 2000; 1: 453-455

Skiadopoulos 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 antigenetic relatedness. *J Virol* 2004; 78: 6927-6937

Smuths HE, Kannemeyer J, Smit L, Smith T. Human metapneumovirus infection in hospital referred South African children. *J Med Virol* 2004; 73: 486-493

Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL, Collins PL. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol*, 2004; 78: 4364-4369

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

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

Thansugarn W, Samransamruajkit R, Vanapongtipagorn P, Prapphal N, van den Hoogen HB, Osterhaus AD, Poovorawan Y. Human metapneumovirus infection in Thai children. *Scand Infect Dis* 2003; 35: 754-756

Uhlenhaut C, Kracht M. Viral infectivity is maintained by an RNA protection buffer. *J Virol Methods* 2005; 128: 189-191

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

Warthin AS. Occurrence of numerous large giant cells in the tonsils and pharyngeals mucosa in the prodromal stage of measles. *Arch Pathol* 1931; 11: 864-874

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 A, 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* 2006a; 218: 1-8

Wilkesmann A. Humane-Metapneumovirus- und Respiratory-Syncytial-Virus-Infektionen. Ein Vergleich des klinischen Verlaufes bei hospitalisierten Kindern. Dissertationsschrift eingereicht bei der Universität Bonn, 2006b

Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE. Humane 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

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

7 Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Promotion beigetragen haben, sei hier herzlich gedankt. Zum einen den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Virologischen Abteilung. Stellvertretend zu nennen sind Herr Prof. Dr. med. B. Matz und Herr Dipl.-Biol. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. O. Schildgen. Des Weiteren sei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Universitätskinderklinik Bonn gedankt. Hier seien Herr Dr. med. A. Simon und Frau Dr. med. A. Wilkesmann persönlich erwähnt.

Ebenso seien die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Pathologie und der Radiologie der Universität Bonn genannt, die an diesem Projekt beteiligt waren. Hier gilt der Dank insbesondere Frau Prof. G. Knöpfle und Herrn Dr. med. M. Born.

Besonderer Dank gilt Herrn T. Geikowski für die gemeinsam geleistete Arbeit.