

**Das Humane Parechovirus**  
**bei Kindern und Jugendlichen mit Enzephalitis**

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

**Silke Vollbach**

aus Paderborn

2016

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. C. Drosten
2. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Kristiansen

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.05.2016

Aus dem Institut für Virologie  
Direktor: Prof. Dr. med. C. Drosten

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	7
1. Einleitung .....	9
1.1 Viral-bedingte Infektionen des ZNS.....	9
1.2 Familie der Picornaviridae.....	10
1.3 Parechoviren .....	10
1.3.1 Klassifikation .....	11
1.3.2 Evolution und Rekombination.....	11
1.3.3 Prävalenz und Altersverteilung.....	12
1.3.4 Übertragung und klinische Manifestation .....	12
1.4 Enteroviren.....	14
1.4.1 Evolution und Rekombination.....	14
1.4.2 Prävalenz und Altersverteilung.....	14
1.4.3 Übertragung und klinische Manifestation .....	14
1.5 Diagnostik von Parechovirus- und Enterovirus-Infektionen .....	15
2. Studienkollektiv .....	17
3. Fragestellung .....	18
4. Material und Methoden.....	19
4.1 Material .....	19
4.1.1 Geräte .....	19
4.1.2 Chemikalien und Längenstandards.....	20
4.1.3 Kits und Enzyme .....	21
4.1.4 Software.....	21
4.1.5 Sonstiges .....	22

4.2	Methoden .....	23
4.2.1	Extraktion viraler Nukleinsäure aus Liquor mittels dem QIAamp Viral RNA Mini Kit .....	23
4.2.2	Polymerase-Kettenreaktion .....	24
4.2.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	24
4.2.4	Reverse-Transkription PCR .....	25
4.2.5	Quantitative Real-time PCR .....	26
4.2.6	Untersuchung von Liquorproben .....	28
4.2.6.1	Humanes Parechovirus Real-time RT-PCR .....	28
4.2.6.2	Humanes Enterovirus Real-time RT-PCR .....	28
4.2.6.3	Real-time PCR für Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2, Varizella-Zoster-Virus, Zytomegalievirus .....	31
4.2.7	Synthese von in-vitro RNA-Transkripten .....	33
4.2.7.1	Real-time RT-PCR .....	33
4.2.7.2	Klonierungs-Ansatz und Transformation kompetenter Zellen.....	33
4.2.7.3	Aufreinigung von Plasmid-DNA mittels QIAprep Spin Miniprep Kit .....	35
4.2.7.4	Kontrolle der Plasmide .....	35
4.2.7.5	Amplifikation der Ziel-DNA und Präparation mittels Ethanol-Fällung .....	36
4.2.7.6	In-vitro RNA-Transkription .....	37
4.2.7.7	Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	38
4.2.7.8	Virus-Konzentrationsbestimmung .....	39
4.2.8	Bestimmung der Sensitivität der HPeV Real-time RT-PCR.....	44
4.2.9	Humanes Parechovirus-Typisierung .....	44
4.2.9.1	Nested VP1/VP3 One-Step RT-PCR.....	44
4.2.9.2	Sequenzierung der PCR-Produkte und phylogenetische Analyse .....	47
4.2.10	Sequenzierung des RGD-Motivs.....	48
4.2.10.1	Amplifikation der Zielsequenz .....	48
4.2.10.2	HPeV-VP1 heminested One-Step RT-PCR.....	48
4.2.10.3	HPeV-VP1 heminested two-step RT-PCR .....	49
4.2.10.4	Sequenzierung der PCR-Produkte .....	52
4.2.11	Enterovirus-Typisierung .....	53
4.2.11.1	cDNA-Synthese.....	53

4.2.11.2	Heminested PCR .....	54
4.2.11.3	Gelextraktion der Amplifikate mittels QIAEX II Gel Extraction Kit.....	55
4.2.11.4	Sequenzierung der PCR-Produkte und phylogenetische Analyse .....	56
4.3	Sonstiges .....	56
5.	Ergebnisse .....	57
5.1	Nachweis des Humanen Parechovirus, Enterovirus, Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2, Varizella-Zoster-Virus, Zytomegalievirus .....	57
5.1.1	Studienkohorte .....	57
5.1.2	Virus-Nukleinsäure-Nachweisverfahren .....	57
5.1.3	Sensitivitätsbestimmung der Nachweisverfahren .....	57
5.2	Absolute und relative Häufigkeiten von Humanem Parechovirus, Enterovirus, Herpes-Simplex-Virus Typ 1 und Typ 2, Varizella-Zoster-Virus, Zytomegalievirus .....	60
5.3	Patientencharakteristika .....	61
5.3.1	Zeitintervall zwischen dem Beginn zentralnervöser Symptome und der Lumbalpunktion .....	61
5.3.2	Altersstruktur der Patienten-Kohorte .....	61
5.3.3	Geschlechterverhältnis .....	63
5.3.4	Jährliche und saisonale Verteilung von Patienten mit positivem Virusnachweis .....	63
5.4	Genotypen-Verteilung, RNA-Konzentration und Fallstudien von Patienten mit Parechovirus-positiven Befunden .....	66
5.4.1	Humanes Parechovirus-Genotypisierung .....	66
5.4.2	Humanes Parechovirus-RNA-Konzentration .....	68
5.4.3	Fallstudie eins .....	70
5.4.4	Fallstudie zwei .....	73
5.5	Genotypen, RNA-Konzentration und Klinik der Enterovirus-Infektionen .....	78
5.5.1	Typisierung der Enteroviren .....	78
5.5.2	Enterovirus-RNA-Konzentration der Liquorproben .....	81
5.5.3	Klinische Daten .....	82

6.	Diskussion.....	85
6.1	Methodik.....	85
6.1.1	Sensitivität der HPeV-PCR-Assays.....	85
6.1.2	Vergleich der Enterovirus-PCR-Assays.....	86
6.2	Virales Erregerspektrum bei Kindern und Jugendlichen mit einer Enzephalitis/Meningitis im Raum Bonn.....	88
6.2.1	Humanes Parechovirus.....	88
6.2.2	Humanes Enterovirus.....	91
6.2.3	Herpes simplex-Virus, Varizella-Zoster-Virus, Zytomegalievirus.....	96
6.3	Vergleich der Relevanz des Humanen Parechovirus als Erreger von Enzephalitis und Sepsis bei Neugeborenen und Säuglingen mit der des Enterovirus und sich daraus ergebende Konsequenzen für Diagnostik und Therapie.....	97
6.4	Abschließende Betrachtung.....	103
7.	Zusammenfassung.....	105
8.	Literaturverzeichnis.....	107
9.	Danksagung.....	125

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
bp	Basenpaare
CPE	zytopathischer Effekt
CRP	C-reaktives Protein
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
Echo22	Echovirus 22
Echo23	Echovirus 23
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektro-Enzephalogramm
EV	Enterovirus
EV-A-D	Enterovirus Spezies A bis D
FMDV	Virus der Maul-und-Klauenseuche
FRET	Fluoreszenz- (oder Förster) Resonanz-Energie-Transfer
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
g	Gramm
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAV	Hepatitis-A-Virus
HPeV	Humanes Parechovirus
HSV-1	Herpes simplex-Virus Typ 1
HSV-2	Herpes simplex-Virus Typ 2
IRES	Internal ribosomal entry site
IVIG	intravenös zu applizierende Immunglobuline
kb	Kilobasen
LV	Ljungan-Virus
mg	Milligramm

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol	Mol
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nt	Nukleotide
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PeV	Parechovirus
PV	Poliovirus
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT-PCR	Reverse-Transkription PCR
RV	Rhinovirus
s	Sekunde
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VZV	Varizella-Zoster-Virus
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

Infektionen des zentralen Nervensystems (ZNS) sind eine häufige Ursache für Erkrankungen beim Menschen (Poeck und Hacke, 2006). Die Bandbreite der Symptome reicht von klinisch inapparenten bzw. oligosymptomatischen bis hin zu tödlichen Krankheitsverläufen. Mögliche infektiöse Ursachen sind Viren, Bakterien, Parasiten, Pilze oder Prione (Poeck und Hacke, 2006).

### 1.1 Viral-bedingte Infektionen des ZNS

Die viral-bedingte Meningitis ist die häufigste entzündliche Erkrankung des ZNS (Poeck und Hacke, 2006). Grundsätzlich ist jede Altersgruppe betroffen, es findet sich jedoch ein Schwerpunkt im Kindes- und Jugendalter (Rotbart et al., 1998). Es handelt sich hierbei in der Regel um eine seröse, also nicht-eitrige Entzündung der weichen Hirnhäute. Im Unterschied zur bakteriell-eitrigen Meningitis ist der klinische Verlauf meist wesentlich leichter. Als Symptome können Fieber, Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit, Photophobie, Übelkeit und Erbrechen auftreten.

Als Enzephalitis bezeichnet man eine Entzündung des Hirnparenchyms. Häufig besteht zusätzlich eine meningeale Beteiligung (Meningoenzephalitis). Man unterscheidet drei Formen, die sich sowohl in der Pathogenese und den Erregern als auch im zeitlichen Auftreten nach der Infektion unterscheiden. Sie werden (1) als akute, viral-bedingte Enzephalitis, (2) als postinfektiöse Enzephalomyelitis und (3) als slow-virus-Infektionen des ZNS bezeichnet. Im Folgenden wird nur auf die akute Form eingegangen, bei der es sich um ein direkt durch den Erreger verursachtes Krankheitsbild handelt (Lentze et al., 2007; Modrow et al., 2010).

Symptome einer viral-bedingten Enzephalitis können Fieber, kognitive Störungen, Verhaltensauffälligkeiten, Bewusstseinsminderung, fokal-neurologische Defizite oder epileptische Anfälle sein. Diese kommen, bis auf das Fieber, bei einer viral-bedingten Meningitis gewöhnlicherweise nicht vor. Eine Enzephalitis kann zu Folgeschäden wie postenzephalitischen Epilepsien, residuellen neurologischen bzw. neuropsychologischen Defiziten und Hörminderung führen oder sogar fatal ausgehen.

Bei Kindern sind in Mitteleuropa häufige Verursacher viral-bedingter ZNS-Infektionen die Enteroviren (EV) und das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME) (Leitlinie

Neuropädiatrie). In der immunkompetenten Bevölkerung führen die beiden Herpes simplex-Viren (HSV-1, HSV-2), das Varizella-Zoster-Virus (VZV), das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Mumpsvirus, das Masernvirus und EV weltweit zu Enzephalitiden (Davison et al., 2003; Diener und Putzki, 2008; Glaser et al., 2003; Glaser et al., 2006; Koskiniemi et al., 2001; Kupila et al., 2006). Auch Arboviren, vor allem Alphaviren und Flaviviren, sowie die Viren aus der Familie der *Bunyaviridae* sind eine weitere wichtige Ursache (Griffin, 2010; Whitley und Gnann, 2002). Die Ätiologie der ZNS-Infektion bleibt jedoch in der Mehrzahl der Fälle unbekannt (Glaser et al., 2003).

## 1.2 Familie der Picornaviridae

Die Familie der *Picornaviridae*, die eine der größten unter den RNA-Viren ist, enthält einige wichtige veterinär- und humanmedizinisch relevante Pathogene, wie z. B. das Virus der Maul-und-Klauenseuche (FMDV), die Polioviren 1-3 (PV1-3), das Hepatitis-A-Virus (HAV), die Enteroviren (EV) und das Rhinovirus (RV). Sie wird nach molekulargenetischen Charakteristika in 26 Genera unterteilt: Aphthovirus, Aquamavirus, Avihepatovirus, Avisivirus, Cardiovirus, Cosavirus, Dicipivirus, Enterovirus, Erbovirus, Gallivirus, Hepatovirus, Hunnivirus, Kobuvirus, Megrivirus, Mischivirus, Mosavirus, Oscivirus, Parechovirus, Pasivirus, Passerivirus, Rosavirus, Salivirus, Sapelovirus, Senecavirus, Teschovirus und Tremovirus (Adams et al., 2013; Knowles et al., 2012). Picornaviren besitzen ein kleines, ikosaedrisches Kapsid, das eine einzelsträngige RNA in Plusstrang-Orientierung enthält. Die Kapside werden nicht von einer Hüllmembran umschlossen. Alle Genera der *Picornaviridae* verfügen über ein gemeinsames Organisations-Muster ihres Genoms, dessen Länge zwischen 7209 und 8450 Nukleotiden (nt) variiert.

## 1.3 Parechoviren

Das Genus des Parechovirus (PeV) umfasst die beiden Spezies Humanes Parechovirus (insgesamt 16 Subtypen, HPeV1-16) und Ljungan-Virus (insgesamt vier Subtypen, LV1-4). Weitere mögliche Spezies-Kandidaten sind das Sebokele-Virus-1 sowie das Frettchen-Parechovirus (Adams et al., 2013; Knowles et al., 2012).

### 1.3.1 Klassifikation

HPEV1 und 2 wurden erstmals im Juli und August des Jahres 1956 aus Stuhlproben von Kindern isoliert, die zu diesem Zeitpunkt an einer Diarrhoe litten. Die identifizierten Viren wurden zunächst aufgrund des Echovirus-gleichen zytopathischen Effektes in der Zellkultur als Echovirus 22 und 23 (Echo22 und Echo23) klassifiziert (Wigand und Sabin, 1961). Im Folgenden zeigten sich jedoch wiederholt Abweichungen der biologischen und molekulargenetischen Eigenschaften von denjenigen anderer Enteroviren, sodass in den 1990ern verschiedene Autoren eine Reklassifizierung von Echo22 und Echo23 und die Einführung eines neuen Genus innerhalb der *Picornaviridae* postulierten (Auvinen und Hyypia, 1990; Auvinen et al., 1989; Coller et al., 1990; Ehrnst und Eriksson, 1993; Grist et al., 1978; Hyypia et al., 1992; Shaver et al., 1961; Stanway et al., 1994; Wigand und Sabin, 1961). Ein maßgeblicher Unterschied ist, dass die Kapside bei der überwiegenden Mehrzahl der anderen Picornaviren aus vier Proteinen (VP1-VP4) bestehen. PeV verfügen aufgrund der fehlenden proteolytischen Spaltung des VP0 in VP2 und VP4 jedoch ausnahmslos nur über drei Proteine (Hyypia et al., 1992; Stanway et al., 1994).

Seit dem Jahr 1997 ist das Genus Parechovirus in der Familie der *Picornaviridae* in der Virus Taxonomie des International Committee of Taxonomy of Viruses zu finden (Mayo und Pringle, 1998).

### 1.3.2 Evolution und Rekombination

HPEV-Subtypen unterscheiden sich in 30-40 % ihrer Nukleotid-Sequenz voneinander (Calvert et al., 2010). Entsprechend anderen *Picornaviridae* spielen für ihre Evolution Rekombinations-Ereignisse eine wichtige Rolle. Diese treten bei den meisten HPEV-Subtypen mit gleicher Dynamik entsprechend anderen *Picornaviridae* auf, außerdem liegen die häufigsten Bruchpunkte an den gleichen Positionen innerhalb des Genoms und flankieren die Kapsid-Region. Eine Ausnahme bildet HPEV3. Hier ist die Frequenz der Rekombinations-Ereignisse geringer. Als Ursache werden u.a. die Verwendung unterschiedlicher Rezeptoren für den Zelleintritt mit divergierendem Zelltropismus, und damit verbunden eine geringere Möglichkeit zur Rekombination, diskutiert (Benschop et al., 2010b; Benschop et al., 2008c; Calvert et al., 2010; Williams et al., 2009; Zoll et al., 2009).

### 1.3.3 Prävalenz und Altersverteilung

HPeV-Infektionen sind häufig und finden größtenteils vor Erreichen des ersten Lebensjahres statt (Benschop et al., 2006; Ehrnst und Eriksson, 1993; Grist et al., 1978; Khetsuriani et al., 2006a; van der Sanden et al., 2008; Wolthers et al., 2008). Über 90 % der Kinder werden bis zu ihrem zweiten Lebensjahr von mindestens einem HPeV-Subtyp infiziert (Joki-Korpela und Hyypia, 1998; Tauriainen et al., 2007). Eine Studie aus dem Jahr 2013 zeigte, dass HPeV-Infektionen mit zu den häufigsten Virus-Infektionen in Finnland und den Niederlanden zählen (Westerhuis et al., 2013a). Die Seroprävalenz von HPeV1 lag bei Erwachsenen bei 99 % bzw. 92 % (Finnland bzw. Niederlande), die der anderen Subtypen war niedriger. Die Seroprävalenz von HPeV3 war bei Erwachsenen mit 13 % in Finnland und mit 10 % in den Niederlanden am geringsten. Mit zunehmendem Alter nahm die Seroprävalenz aller HPeV-Subtypen zu (Westerhuis et al., 2013a). Bereits in früheren Studien waren neutralisierende Antikörper gegen HPeV1 bei bis zu 91 % und mehr der Kinder mit einem Alter von über einem Jahr in Japan sowie Finnland gefunden worden (Joki-Korpela und Hyypia, 1998; Nakao et al., 1970; Takao et al., 2001; Tauriainen et al., 2007).

HPeV1 ist weltweit verbreitet und der am häufigsten detektierte HPeV-Subtyp (Benschop et al., 2008b; Ghazi et al., 2012; Khetsuriani et al., 2006a; Kolehmainen et al., 2012; Pham et al., 2011; Tapia et al., 2008; Westerhuis et al., 2013a; Zhong et al., 2011). In Europa folgen ihm die Subtypen HPeV3, HPeV4 sowie HPeV6 (Benschop et al., 2008b; Harvala et al., 2011; Kolehmainen et al., 2012; Tapia et al., 2008; Westerhuis et al., 2013a), während sich in Asien eine andere Verteilung findet. So wurden dort die HPeV-Subtypen 8 und 10 detektiert, die bis jetzt noch nicht in Europa detektiert wurden (Westerhuis et al., 2013a).

### 1.3.4 Übertragung und klinische Manifestation

Für HPeV gelten der Gastrointestinaltrakt und der Respirationstrakt als Orte der primären Virusreplikation. Mögliche Infektionswege sind die fäkal-orale Übertragung und die Tröpfcheninfektion. Tritt eine Virämie auf, ist die generalisierte Ausbreitung des Virus über den Blutkreislauf und die Infektion anderer Organe möglich (Harvala et al., 2010). Die überwiegende Mehrzahl der HPeV-Infektionen verläuft klinisch inapparent. HPeV1-Infektionen werden vor allem mit leichten Symptomen des Gastrointestinal- und

Respirationstraktes in Verbindung gebracht (Bauer et al., 1962; Berkovich und Pangan, 1968; Calvert et al., 2010; Harvala et al., 2010; Nakao et al., 1970; Ramos-Alvarez und Sabin, 1958; Wigand und Sabin, 1961). In Einzelfällen wurde HPeV1 im Zusammenhang mit schwerwiegenden Krankheitsbildern wie der nekrotisierenden Enterokolitis, ZNS-Erkrankungen, Myokarditis und dem Hämolytisch-urämischem Syndrom beschrieben (Birenbaum et al., 1997; Figueroa et al., 1989; Koskiniemi et al., 1989; Legay et al., 2002; Maller et al., 1967; O'Regan et al., 1980; Russell und Bell, 1980; Wigand und Sabin, 1961), seine Bedeutung als Krankheitserreger wird jedoch weiterhin diskutiert (Wildenbeest et al., 2014).

HPeV3 wurde zuerst in Japan aus Untersuchungs-Proben von Kindern mit transienter Paralyse, Fieber und Diarrhoe bzw. Gastroenteritis, Exanthem und Atemwegserkrankungen isoliert (Ito et al., 2004). Weitere Fälle von neonataler Sepsis mit Fieber, Tachypnoe und Erythem, Otitis media und Konjunktivitis sowie Fälle von isolierter Ataxie und der Hämophagozytischen Lymphohistiozytose sind beschrieben (Aviner et al., 2013; Boivin et al., 2005; Felsenstein et al., 2014; Sainato et al., 2011). HPeV3 ist der im Liquor am häufigsten nachzuweisende HPeV-Subtyp und, verglichen mit anderen HPeV-Subtypen, häufiger mit schwerwiegenden Krankheitsbildern wie einer neonatalen Sepsis oder ZNS-Infektionen assoziiert (Benschop et al., 2006; Boivin et al., 2005; Harvala et al., 2011; van der Sanden et al., 2008; Wolthers et al., 2008).

Die HPeV Subtypen 2, 4, 5, 6, 8 und 10 wurden ebenfalls mit Gastroenteritiden und teilweise mit Erkrankungen des Respirationstraktes assoziiert, ihre Rolle als ursächlicher Erreger ist jedoch unklar (Drexler et al., 2009; Kim Pham et al., 2010; Pajkrt et al., 2009). Zwar werden einige Subtypen in einzelnen Fallberichten im Zusammenhang mit Krankheitsbildern wie der aseptischen Meningitis (HPeV2), der Lymphadenitis (HPeV4), dem TORCH-Syndrom (Toxoplasmosis, Other Infections, Rubella, Zytomegalievirus, Herpes-simplex-Virus) (HPeV4), akuten, schlaffen Paresen (HPeV6) und dem Reye-Syndrom (HPeV5 und 6) diskutiert (Al-Sunaidi et al., 2007; Legay et al., 2002; Schnurr et al., 1996; Watanabe et al., 2007), ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Infektionen mit nicht HPeV3-Subtypen und schwerwiegenden Krankheitsbildern wurde bisher jedoch nicht festgestellt (Pajkrt et al., 2009; Tapia et al., 2008).

## 1.4 Enteroviren

Es sind über 70 humanpathogene Vertreter des Enterovirus (EV) bekannt, die auf der Basis von Genomorganisation, Sequenzübereinstimmungen und biologischen Eigenschaften in 12 Spezies unterteilt werden: Enterovirus A–J und Rhinovirus A-C (Knowles et al., 2012). Die Spezies Enterovirus B (EV-B) ist die Spezies mit den meisten humanmedizinisch relevanten Enteroviren (Thoelen et al., 2003).

### 1.4.1 Evolution und Rekombination

Für die Evolution der EV, für ihre Verbreitung sowie Pathogenität spielen Gendrift, Mutationen und Rekombinationsereignisse eine entscheidende Rolle und sind sehr häufig. Eine wichtige Ursache für Rekombinationen ist, dass der RNA-Polymerase die Fähigkeit zur Korrekturlesung fehlt. Es zeigte sich, dass beinahe alle aktuellen EV-Isolate rekombinant zu ihren Prototyp-Stämmen sind (Benschop et al., 2008c; Lindberg et al., 2003; Lukashev, 2005; Simmonds und Welch, 2006).

Die Häufigkeit der Rekombinationsereignisse differiert zwischen den Spezies, für EV-B wurde eine deutlich höhere Frequenz, verglichen mit EV-A, festgestellt (Simmonds und Welch, 2006).

### 1.4.2 Prävalenz und Altersverteilung

EV-Infektionen treten während des gesamten Jahres auf, in den gemäßigten Breiten allerdings mit Zunahme in den Sommer- und Herbstmonaten. Prinzipiell können alle Altersgruppen betroffen sein. Infektionen werden jedoch vermehrt bei Kindern beschrieben, wobei männliche Individuen häufiger erkranken (Antona et al., 2007; Fowlkes et al., 2008; Harvala et al., 2011; Khetsuriani et al., 2006a; Maguire et al., 1999).

### 1.4.3 Übertragung und klinische Manifestation

Enteroviren werden in der Regel fäkal-oral durch Schmier- oder Tröpfcheninfektion übertragen. Perinatale Infektionen, also eine vertikale Übertragung von der Mutter auf das Kind, kommen selten vor (Verboon-Maciolek et al., 2003). EV können prinzipiell jedes Gewebe im Organismus infizieren (Sawyer, 2001).

Die meisten EV-Infektionen sind klinisch inapparent oder führen zu leichten, unspezifischen Symptomen wie Fieber, Konjunktivitis oder einer Atemwegsinfektion. Zu

den schwerwiegenderen Erkrankungen zählen u.a. die neonatale Sepsis, Meningitis, Myokarditis, Hepatitis und Enzephalitis. Diese sind typischerweise nicht einem bestimmten Subtyp zuzuordnen. Dennoch gibt es einige Krankheitsbilder, die in der Mehrzahl der Fälle durch einen kleinen Kreis an Enteroviren verursacht werden. Hierzu gehören z. B. die schlaffen Paresen, die Hand-Fuß-Mund-Krankheit, die Pleurodynie und die Herpangina.

ZNS-Infektionen stellen eines der häufigen klinischen Manifestationen einer EV-Infektion dar. In der Mehrheit dieser Fälle handelt es sich dabei um eine seröse Meningitis (Antona et al., 2007; Berlin et al., 1993; Rotbart, 1995; Trallero et al., 2000). Die Inzidenz der EV-Meningitis ist bei Kindern um das Fünf- bis Achtfache höher als bei Erwachsenen (Sawyer, 2001).

Ist der Verlauf in den meisten Fällen gutartig, so kann es bei Neugeborenen und Säuglingen zu neurologischen Komplikationen kommen (Sawyer, 2001). Die Symptome können dem klinischen Bild einer bakteriellen Sepsis entsprechen (Dagan, 1996; Rotbart et al., 1999; Verboon-Maciolek et al., 2003). Die Mehrzahl der Infektionen heilen folgenlos aus, Störungen der neurologischen Entwicklung mit Folgeschäden und tödliche Krankheitsverläufe sind jedoch beschrieben (Rotbart, 1995), vor allem im Zusammenhang mit EV71 Infektionen (Antona et al., 2007; Khetsuriani et al., 2006b; Whitley und Gnann, 2002).

### 1.5 Diagnostik von Parechovirus- und Enterovirus-Infektionen

Im Gegensatz zu den EV existieren für HPeV keine guten serologischen Typisierungsmethoden. Zusätzlich zeigt sich, dass HPeV schwierig zu kultivieren ist, nur einen geringen zytopathischen Effekt (CPE) induziert, hier sind vor allem HPeV3 und HPeV6 zu erwähnen, und verschiedene Subtypen einen unterschiedlichen Zelltropismus aufweisen (Benschop et al., 2010a; Westerhuis et al., 2013b). Die Subtypen HPeV7-16 konnten bisher noch nicht in Standard-Zelllinien kultiviert werden (Westerhuis et al., 2013b). In einer Arbeit aus dem Jahr 2013 erwies sich der Einsatz von HT29- sowie Vero-Zellen als geeignete Kombination, um HPeV1-6 zu detektieren (Westerhuis et al., 2013b).

Die Diagnose einer EV-Infektion kann durch traditionelle Nachweisverfahren wie der Virusanzucht in Zellkulturen und anschließender Typisierung durch Neutralisations-Test

mit standardisierten Antiseren erfolgen (Lim und Benyesh-Melnick, 1960; Modrow et al., 2010; Muir et al., 1998). Bei Standard Zell-Kultur-Verfahren zur Anzucht von EV kommen mindestens drei Zelllinien zum Einsatz, wobei Affennierenzellen sowie humane Fibroblasten häufig verwendet werden (Benschop et al., 2010a). Die Coxsackie-A-Viren 1, 19, 22 sowie Mitglieder der Spezies EV-C zeigen kein Wachstum in einer Zellkultur (Lukashev, 2005).

Aufgrund oben beschriebener Limitationen bei der Anzucht der Viren, des geringeren Zeit- sowie Arbeitsaufwandes und einer höheren Spezifität und Sensitivität hat der direkte Nachweis viraler Nukleinsäuren aus Probenmaterial mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für HPeV sowie EV einen höheren diagnostischen Stellenwert. Dazu wird in der Regel ein Bereich der hochkonservierten 5'-NTR des viralen Genoms amplifiziert (Benschop et al., 2010a; Benschop et al., 2008a; de Crom et al., 2013; Nix et al., 2008; Westerhuis et al., 2013b). Nachfolgend können Genomabschnitte der VP1-Region amplifiziert, sequenziert und somit das Virus typisiert werden.

## **2. Studienkollektiv**

Der vorliegenden Studie standen als Untersuchungsmaterial 349 Liquorproben von 327 Patienten aus den Jahren 1998-2008 zur Verfügung, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme in der Universitätskinderklinik Bonn stationär behandelt worden waren. Die Indikation zur Lumbalpunktion wurde von den behandelnden Ärzten im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Untersuchungen gestellt.

Angaben zur Lagerung der Proben sowie dem Geschlechterverhältnis und der Altersverteilung der Patienten werden in Abschnitt 5.3 im Ergebnisteil aufgeführt. Die jährliche sowie saisonale Verteilung der Liquorproben sind ebenfalls dem Abschnitt 5.3 im Ergebnisteil zu entnehmen.

### 3. Fragestellung

Die Zielsetzung dieser Arbeit kann in folgende vier Punkte unterteilt werden:

- In dieser Arbeit wurden für die HPeV- und EV-Detektion und -Typisierung molekulargenetische Methoden verwendet. Es standen jeweils zwei verschiedene Real-Time RT-PCR-Verfahren zur Verfügung, die hinsichtlich ihrer Sensitivität verglichen wurden.
- Es wurde das Spektrum und die Prävalenz häufiger Erreger einer viral-bedingten Meningitis und Enzephalitis in Liquorproben der Bonner Universitätskinderklinik aus den Jahren 1998-2008 bestimmt.
- Neben den typischen Erregern wurde ein besonderes Augenmerk auf das Humane Parechovirus als Erreger einer viral-bedingten Enzephalitis sowie Sepsis im Neugeborenen- und Säuglingsalter gelegt.
- Die Relevanz von HPeV als neurotropes Pathogen im Kindesalter wurde mit der von EV verglichen und die Konsequenzen, die sich für die Diagnostik und Therapie der aseptischen Meningitis und Enzephalitis im Kindesalter daraus ergeben, diskutiert. Dazu wurden die Krankheitsverläufe zweier HPeV3-Infektionen anhand von Fallstudien dargestellt und die klinische Symptomatik sowie patientenbezogene Daten von Patienten mit Virusnachweis im Liquor erhoben.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

Im Folgenden kamen unten aufgeführte Geräte, Chemikalien und Kits zur Verwendung.

#### 4.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Elektrophoresekammer</b>	41 1325	PeqLab, Erlangen
<b>Feinwaage</b>	PM1200	Mettler, Giessen
<b>Geldokumentationsdrucker</b>	P93	Mitsubishi Electric Europe, Ratingen
<b>Geldokumentationskamera</b>	N08200111	Vilber Lourmat, Eberhardzell
<b>Geldokumentationsmonitor</b>	RMB 92	Rainbow CCTV, Costa Mesa, CA, USA
<b>Multipipetten</b>	Research Variable	Eppendorf, Hamburg
<b>PCR-Cycler</b>	MasterCycler ep gradientS Thermocycler T1 Light Cycler 480 II	Eppendorf, Hamburg Biometra, Göttingen Roche, Penzberg
<b>Spectrophotometer</b>	NanoDrop 2000C	PeqLab, Erlangen
<b>Spannungsgenerator</b>	EV 202	Consort, Turnhout, B
<b>Thermomixer</b>	5436	Eppendorf, Hamburg
<b>Vortex-Mixer</b>	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
<b>Wärmeschrank</b>	Heraeus Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Zentrifugen</b>	Centrifuge 5424 Centrifuge 5430 MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg

## 4.1.2 Chemikalien und Längenstandards

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
<b>100mM dNTP Set</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Agarose</b>	Sigma, St.Louis, MO, USA
<b>Borsäure</b>	VWR Prolab, Fonteney sous Bois, F
<b>Bromphenolblau</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Bovines Serumalbumin (BSA)</b>	Roche, Penzberg
<b>DEPC-Wasser</b>	AccuGENE Lonza, Basel, CH
<b>Essigsäure</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Ethanol abs.</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Ethidiumbromid</b>	Sigma, St. Louis, MO, USA
<b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</b>	KMT Laborchemie, Darmstadt
<b>Kanamycin</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Längenstandard (100 bp DNA-Leiter)</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>LB-Agar</b>	Roth, Karlsruhe
<b>LB-Medium</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Natriumacetat</b>	Roth, Karlsruhe
<b>NuSieve GTG Agarose (low-melting Agarose)</b>	Cambrex, Charles City, IA, USA
<b>Random Primer</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Saccharose</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)</b>	Merck KGaA, Darmstadt

## 4.1.3 Kits und Enzyme

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>MegaScript 4</b>	Ambion, Austin, Tx, USA
<b>Qiagen One-Step RT-PCR Kit</b>	Qiagen GmbH, Hilden
<b>Qiagen RNeasy Mini Kit</b>	Qiagen GmbH, Hilden
<b>QIAamp viral RNA mini Kit</b>	Qiagen GmbH, Hilden
<b>QIAprep Spin Miniprep Kit</b>	Qiagen GmbH, Hilden
<b>QIAEX II Gel Extraction Kit</b>	Qiagen GmbH, Hilden
<b>SeqLab PCR Reinigunskit</b>	SeqLab, Göttingen
<b>SuperScript III One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>SuperScript III Reverse Transkriptase</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>TOPO TA Cloning Kit</b>	Invitrogen, Karlsruhe

## 4.1.4 Software

<b>Software</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller / Referenz</b>
<b>IBM SPSS Statistics</b>	IBM SPSS Statistics 22	IBM, Armonk, NY, USA
<b>Microsoft Excel</b>	Microsoft Office Excel 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA
<b>Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)</b>	Software-Version 4.0	
<b>SeqMan</b>	DNASTAR Lasergene 7	DNA-Star Inc., Madison, WI, USA
<b>Statgraphics Plus 5.1</b>	Version Centurion XV	Statgraphics StatPoint, Inc., Herndon, VA, USA.

## 4.1.5 Sonstiges

<b>Produkt</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
<b>96-well-Platten</b>	Multi-well-Platte (Anm.: Hierbei handelt es sich um eine Platte mit 96 Ver- tiefungen für PCR- Reaktionen)	Roche, Penzberg
<b>Reaktionsgefäße</b>	0,2 ml Reaktionsgefäß 1,5 ml Reaktionsgefäß 8 stripes flat cap (Anm.: Hierbei handelt es um einem Streifen von 8 aneinanderhängenden Re- aktionsgefäßen mit flachen Deckeln.)	Axygen, Union City, CA, USA Eppendorf, Hamburg Biozym, Hessisch Oldendorf
<b>Primer, Sonden</b>		TIB Molbiol, Berlin

## 4.2 Methoden

Aus den 349 Liquorproben wurden zunächst Pools mit einem Gesamtvolumen von 120 µl aus jeweils vier Liquorproben (30 µl der einzelnen Liquorprobe) erstellt. Aus diesen Liquor-Pools wurde die Nukleinsäure extrahiert und auf HPeV, EV und Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2 (HSV-1 und -2), Varizella-Zoster-Virus (VZV) und Zytomegalievirus (CMV) getestet. Ergab ein Pool ein positives Ergebnis, so wurden die Nukleinsäuren der vier Liquorproben jeweils einzeln extrahiert und erneut getestet.

### 4.2.1 Extraktion viraler Nukleinsäure aus Liquor mittels dem QIAamp Viral RNA Mini Kit

Das Prinzip des QIAamp Viral RNA Mini Kit beruht auf der Lyse viraler Partikel mittels einer chaotropen Substanz (Guanidiniumthiocyanat) und anschließenden Bindung von Nukleinsäure-Molekülen an eine Silika-Membran unter einem Hochsalzpuffer. Dort gebunden, wurden die Nukleinsäure-Moleküle in mehreren Waschschritten gereinigt und anschließend mit Niedrigsalzpuffer eluiert.

Die Durchführung der Extraktion geschah gemäß den Herstellerangaben für das QIAamp Spin Protokoll. Abweichend wurden jedoch nur 120 µl Liquor, und nicht die angegebenen 140 µl, verwendet. Die Elution erfolgte, ebenfalls abweichend von der Kit-Anleitung, mit 100 µl des im Kit enthaltenen AVE-Puffers, der zuvor auf 80 °C erwärmt worden war. Die extrahierte RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

Um das Risiko für eine Kontamination der Proben mit fremder viraler RNA oder DNA zu minimieren, fand die Extraktion ausschließlich im Prä-PCR-Labor statt (Kwok und Higuchi, 1989). Zur Reduktion des Risikos von Kreuzkontaminationen der Proben untereinander wurden nach jedem Arbeitsschritt die Handschuhe gewechselt.

#### 4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction [PCR]) ist ein von Mullis und Faloona entwickeltes Verfahren, mit dessen Hilfe sich in-vitro selektiv DNA-Abschnitte vervielfältigen (amplifizieren) lassen (Mullis et al., 1986). Für die Entwicklung dieses Verfahrens erhielt K. Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie. Das Prinzip beruht auf einer enzymatischen Vervielfältigung der DNA während zyklisch ablaufender Temperaturveränderungen. Ein PCR-Ansatz enthält folgende Komponenten:

1. die DNA-Matrize,
2. ein Paar, die DNA-Matrize flankierende Primer (Oligonukleotide),
3. ein Gemisch der vier Desoxynukleotide (dNTPs),
4. thermostabile DNA-Polymerase,
5. PCR-Puffer,
6.  $MgCl_2$ ,
7. Wasser.

**Tab. 1:** Arbeitsschritte einer Polymerase-Kettenreaktion im zeitlichen Verlauf

Schritt		Temperatur
<b>1.) Denaturierung</b>	Hitze-Denaturierung des DNA-Doppelstranges	95 °C
<b>2.) Annealing</b>	Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrize	45-60 °C
<b>3.) Elongation</b>	Synthese des Komplementärstranges durch die hitzestabile DNA-Polymerase	72 °C

In jedem Durchlauf kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des PCR-Produkts. In der Regel wird der oben beschriebene Zyklus zwischen 30 und 40 Mal wiederholt. Es wird eine Anreicherung des DNA-Abschnitts um den Faktor  $10^6$  bis  $10^7$  erreicht.

#### 4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Ob eine erfolgreiche Amplifikation der Zielsequenz stattgefunden hat, kann im Anschluss an die PCR mittels einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden. Die

Gelelektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen.

Als Fluoreszenz-Farbstoff wird der Gelmatrix Ethidiumbromid zugesetzt, das sich in DNA-Doppelstränge einlagert. Durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 266 nm fluoresziert das Ethidiumbromid und die DNA-Banden werden im Gel sichtbar. Durch den Vergleich mit einem DNA-Größenmarker können sie beurteilt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Diese Konzentrationsstufe eignet sich gut zum Auftrennen von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 0,1 bis 2 Kilobasen (kb).

**Tab. 2:** Reagenzien der Agarose-Gelelektrophorese

<b>Reagenzien</b>	
<b>TBE-Puffer; 10-fach</b>	500 mM TRIS Base, 50 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0
<b>Agarose</b>	
<b>Ethidiumbromid</b>	10 mg/ml
<b>Gelladepuffer</b>	Saccharose, EDTA, Bromphenolblau
<b>Längenstandard</b>	100 bp DNA-Leiter

4 g Agarose wurden in 200 ml 1fach TBE-Puffer bis zur vollständigen Lösung aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurden 5 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Anschließend wurde die Gellösung luftblasenfrei in einen mit mehreren Kämmen besetzten Gelträger gegossen. Bis zum Erstarren wurde das Gel horizontal und erschütterungsfrei gelagert. Nach dem Entfernen der Kämmen wurde das Gel in eine mit 1fach TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. 10 µl des PCR-Ansatzes wurden mit 2 µl Gellade-Puffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Bei einer Spannung von 100 V erfolgte anschließend die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts bzw. des molekularen Längenstandards für ca. 30 min.

#### 4.2.4 Reverse-Transkription PCR

Die Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Methode, um RNA mittels einer PCR zu vervielfältigen.

Für eine PCR sind thermostabile Enzyme (DNA-Polymerasen) essentiell. Diese existieren aber nur als DNA-abhängige DNA-Polymerasen, sie benötigen also DNA als Substrat. Handelt es sich bei dem Substrat aber um eine RNA-Sequenz, so muss die

RNA zunächst durch eine Reverse-Transkriptase in DNA umgeschrieben werden. Das Enzym Reverse-Transkriptase, eine RNA-abhängigen-DNA-Polymerase, synthetisiert an eine einzelsträngige RNA als Matrize die komplementären Desoxyribonukleotide, sodass ein RNA/DNA-Hybrid entsteht. Dieses kann nachfolgend als Substrat für die PCR eingesetzt werden. Als Primer werden Oligo-dT-Primer, randomisierte Hexamere oder Sequenz-spezifische Primer verwendet.

Es wird zwischen einer sogenannten One-Step-RT-PCR und einer Two-step-RT-PCR unterschieden. Bei einer One-Step-RT-PCR finden Reverse-Transkription und Polymerase-Kettenreaktion in einem Reaktionsgefäß statt, während es sich bei einer Two-step-RT-PCR um zwei voneinander getrennte Arbeitsschritte handelt. Letztere Variante weist eine höhere Sensitivität auf.

#### 4.2.5 Quantitative Real-time PCR

Das Prinzip der quantitativen Real-time PCR (Echtzeit-PCR) beruht auf einer während der PCR ablaufenden, kontinuierlichen Messung von lichtinduzierten Fluoreszenzsignalen. Die Vermehrung des PCR-Produktes erfolgt zunächst exponentiell, verlangsamt sich in späteren PCR-Zyklen zu einem linearen Anstieg und geht anschließend in eine Plateauphase über. Der Vorteil der Echtzeit-Messung der Real-time PCR liegt darin, dass die Quantifizierung des Produkts in der Phase der exponentiellen Produktvermehrung erfolgen kann. Hier besteht noch eine direkte Korrelation zwischen der DNA-Menge der Probe und dem gebildeten PCR-Produkt. Störende Faktoren wie die Akkumulation des Produkts, die Anhäufung von Pyrophosphat oder das Ausgehen der Primer und Desoxynukleotide spielen noch keine Rolle.

Im Gegensatz dazu wird bei der klassischen quantitativen PCR nur eine einmalige Messung des Produkts nach einer definierten Anzahl an PCR-Zyklen mittels Agarose-Gelelektrophorese praktiziert.

Der Ansatz einer Real-time PCR vom TaqMan-Format enthält neben den in Kapitel 3.3.2 aufgeführten Komponenten zusätzlich eine sogenannte Sonde, die aus 20 bis 30 Basen besteht und komplementär, das heißt spezifisch, zur Sequenz eines Stranges der DNA-Zielsequenz ist. Sie ist zwischen den beiden Oligonukleotiden lokalisiert, im Unterschied zu diesen aber an ihrem 3'Ende phosphoryliert und somit nicht verlängerbar. Die Sonde

ist mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Beide Farbstoffe unterliegen einem sogenannten Fluoreszenz- (oder Förster) Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Fluoreszenzfarbstoff 1, der sogenannte Reporter am 5'-Ende der Sonde, wird durch den Laser des Detektionsgerätes angeregt und strahlt Licht einer anderen Wellenlänge ( $\lambda$ ) (E1) ab. Am 3'-Ende befindet sich ein zweiter Fluoreszenzfarbstoff, der sogenannten Quencher, dessen Anregungsspektrum (A2) dem Emissionsspektrum (E1) des Reporters entspricht.

Die in der PCR eingesetzte Taq-Polymerase besitzt neben der Fähigkeit zur DNA-Synthese auch eine 5'-Exonuklease-Aktivität, kann also DNA abbauen. Das führt dazu, dass in der Elongationsphase die auf der DNA-Matrize gebundene Sonde verdrängt und hydrolysiert wird. Reporter und Quencher werden räumlich voneinander getrennt und unterliegen nicht mehr dem FRET, sodass nun die nach Anregung frei werdende Fluoreszenz des Reporters (E1) detektiert werden kann. Mit zunehmender Anzahl an PCR-Zyklen steigt das Fluoreszenzsignal direkt proportional zum Zuwachs des PCR-Produkts an.

Zur Quantifizierung wird für jede Probe der Zyklus ermittelt, bei dem sich das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal deutlich vom Hintergrund abhebt. Dieser Zyklus wird als  $C_T$  (cycle treshold, Schwellenzyklus)-Wert bezeichnet.

Zur Quantifizierung der Ausgangs-DNA-Menge einer Probe werden die  $C_T$ -Werte von DNA-Proben mit bekannter Konzentration bestimmt. Aus diesen wird eine Standardgerade erstellt, die zur Bestimmung der DNA-Konzentration unbekannter Proben herangezogen werden kann.

Die Vorteile der Real-time PCR gegenüber einer klassischen qualitativen PCR sind u.a. eine geringere Kontaminationsanfälligkeit, die Möglichkeit der Quantifizierung sowie die sofortige Verfügbarkeit der Ergebnisse, welche ihr breites Anwendungsspektrum in der Routinediagnostik sowie Forschung begründen.

## 4.2.6 Untersuchung von Liquorproben

### 4.2.6.1 Humanes Parechovirus Real-time RT-PCR

Es standen zwei Real-time RT-PCR-Protokolle zur Verfügung. Anhand des von Baumgarte et al. etablierten Verfahren wird ein Bereich der hochkonservierten 5´-nicht-translatierten Region (5´-NTR) im Genom aller bekannten HPeV-Typen vervielfältigt (Baumgarte et al., 2008). Die Real-time RT-PCR wurde mit den Reagenzien des Qiagen One-Step RT-PCR Kit durchgeführt. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und das PCR-Protokoll werden in den Tabellen 3 und 4 dargestellt.

Mittels des von Nix et al. etablierten Verfahren wird ein anderer Genomabschnitt der hoch-konservierten 5´-NTR aller bekannten HPeV-Typen sowie des Ljungan Virus amplifiziert (Nix et al., 2008). Es wurde das „SuperScript III One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq“ von Invitrogen verwendet. Der PCR-Ansatz sowie das PCR-Protokoll werden in den Tabellen 5 und 6 wiedergegeben. Die Sequenzen der Primer und Sonden für beide Real-time RT-PCR-Verfahren sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

### 4.2.6.2 Humanes Enterovirus Real-time RT-PCR

Für den Nachweis von Enterovirus-RNA in Liquorproben standen zwei Real-time RT-PCR-Verfahren zur Verfügung. Anhand des von Verstrepen et al. etablierten Verfahrens wird ein bei allen 2001 bekannten EV konservierter Bereich der 5´-NTR amplifiziert (Verstrepen et al., 2001). Primer und Sonde des von Dierssen et al. etablierten Verfahrens liegen in der IRES (internal ribosomal entry site) der 5´-NTR. Hiermit lassen sich, neben allen anderen im Jahr 2008 bekannten EV, auch hoch-variable Mitglieder wie das Echovirus 30 und das Echovirus 70 detektieren (Dierssen et al., 2008).

Für beide Verfahren wurde das Qiagen One-Step RT-PCR Kit verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und das PCR-Protokoll sind den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen. Die Sequenzen der Primer und Sonden sind in Tabelle 9 angegeben.

**Tab. 3:** PCR-Ansatz mit dem Qiagen One-Step RT-PCR Kit, verwendet für die HPeV1 Real-time RT PCR nach Baumgarte et al. (2008) sowie für beide HEV Real-time RT-PCR-Verfahren

Master-Mix, Komponenten	1-facher Ansatz
5 x Qiagen OneStep RT- PCR-Puffer (enthält 12,5 mM MgSO <sub>4</sub> )	5 µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (jedes 10 mM)	jeweils 0,4 mM
Vorwärtsprimer (10 µM)	600 nM
Rückwärtsprimer (10 µM)	600 nM
Sonde (10 µM)	200 nM
H <sub>2</sub> O, RNase frei	9,5 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzym Mix	1 µl
RNA-Extrakt	5 µl
	25 µl

**Tab. 4:** PCR-Protokoll für einen PCR-Ansatz mit dem Qiagen One-Step RT-PCR Kit, verwendet für die HPeV1 Real-time RT PCR nach Baumgarte et al. (2008) sowie für beide HEV Real-time RT-PCR-Verfahren

	Temperatur	Dauer	Zyklus
RT	50 °C	30 min	
DNA-Polymerase Aktivierung	95 °C	15 min	
Denaturierung	95 °C	15 s	45
Annealing und Elongation	58 °C	30 s	45 Signaldetektion

**Tab. 5:** PCR-Ansatz mit dem SuperScript III One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq, verwendet für die HPeV Real-time RT-PCR nach Nix et al. (2008)

Master-Mix, Komponenten	1-facher Ansatz
2X Reaction Mix (enthält 0,4 mM von jedem dNTP, 3,2 mM MgSO <sub>4</sub> )	12,5 µl
MgSO <sub>4</sub> (5 mM)	200 µM
Vorwärtsprimer (10 µM)	400 nM
Rückwärtsprimer (10 µM)	400 nM
Sonde (10 µM)	200 nM
DEPC-Wasser	3,5 µl
SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix	0,5 µl
RNA-Extrakt	5 µl
	25 µl

**Tab. 6:** PCR-Protokoll der HPeV Real-time RT-PCR nach Nix et al. (2008)

	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklus</b>
<b>RT</b>	50 °C	30 min	
<b>DNA-Polymerase Aktivierung</b>	95 °C	10 min	
<b>Denaturierung</b>	95 °C	15 s	} 50 Signaldetektion
<b>Annealing</b>	58 °C	30 s	
<b>Elongation</b>	72 °C	10 s	

#### 4.2.6.3 Real-time PCR für Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2, Varizella-Zoster-Virus, Zytomegalievirus

Für die Diagnostik von HSV-1, HSV-2, CMV und VZV wurde das Herpes-Panel der Diagnostik-Abteilung verwendet. In diesem werden folgende Real-time PCR-Verfahren zusammengefasst: HSV-1 und -2 (Kessler et al., 2000), CMV (Preiser et al., 2003), VZV (Stocher et al., 2003). Es wurde die Platinum Taq DNA-Polymerase von Invitrogen verwendet. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das PCR-Protokoll sind in den Tabellen 7 und 8 wiedergegeben, die Primer- und Sonden-Sequenzen in der Tabelle 9.

Für alle PCR-Protokolle wurden die Reaktionskomponenten mit Ausnahme der zu untersuchenden Probe in ein Gefäß pipettiert und zur homogenen Durchmischung der einzelnen Komponenten mit dem Vortex-Mixer gemischt. Jeweils 20 µl dieses Master-mixes wurden in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 5 µl der Nukleinsäurepräparation hinzugegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte im LightCycler 480 II.

**Tab. 7:** PCR-Ansatz mit Platinum Taq DNA-Polymerase, verwendet für die Real-time PCR-Verfahren des Herpes-Panel

Master-Mix, Komponenten	1-facher Ansatz
10× Reaction Mix (ohne Mg)	2,5 µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10 mM)	jeweils 0,2 mM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2 mM
Vorwärtsprimer (10 µM)	400 nM
Rückwärtsprimer (10 µM)	400 nM
Sonde (10 µM)	200 nM
Platinum Taq DNA-Polymerase	0,1 µl
DEPC-Wasser	13,4 µl
RNA-Extrakt	5 µl
	25 µl

**Tab. 8:** PCR-Protokoll für das Herpes-Panel mit Platinum Taq DNA-Polymerase

	Temperatur	Dauer	Zyklus
Enzym-Aktivierung	94 °C	2 min	1
Denaturierung	94 °C	15 s	45
Annealing und Elongation	60 °C	30 s	45 Signaldetektion
	4 °C	∞	

**Tab. 9:** Primersequenzen der verwendeten PCR-Verfahren zur Virusdetektion.

a) Übersetzung degenerierte Basen: R: A oder G; Y: C oder T; W: A oder T; S: C oder G

b) Fluoreszenzfarbstoffe: 6-Carboxyfluorescein (FAM), 5-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA), Black Hole Quencher 1 (BHQ1)

Primer und Sonden		Genbank-Accession-Nr./Position:
	Humanes Parechovirus 1-6 (Baumgarte et al., 2008)	HPeV1-Harris S45208
Primer <i>HPS</i>	<b>5'-GTGCCTCTGGGGCCAAAAG-3'</b>	435-453
Primer <i>HPA</i>	<b>5'-TCAGATCCATAGTGTGCTTGTAC-3'</b>	613-589
Sonde <i>HPP</i>	<b>FAM-5'-CGAAGGATGCCAGAAGGTACCCGT-3'-TAMRA<sup>b)</sup></b>	562-586
	Humanes Parechovirus 1-6, Ljungan-Virus (Nix et al., 2008)	HPeV1-Harris S45208
Primer <i>AN345</i>	<b>5'-GTAACASWWGCCTCTGGGSCCAAAG-3'<sup>a)</sup></b>	421-446
Primer <i>AN344</i>	<b>5'-TGAYACCTAGACTRGWCCCCGG-3'<sup>a)</sup></b>	615-594
Sonde <i>AN257</i>	<b>FAM-5'-CTTCCTAGGGWCTCCATGGGYRTCC-3'-TAMRA<sup>a,b)</sup></b>	556-582
	Enterovirus plus Echovirus (Dierssen et al., 2008)	CVB3 M33854
Primer <i>EQ1</i>	<b>5'-ACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCT-3'</b>	337-462
Primer <i>EQ2</i>	<b>5'-CCAAAGTAGTCGGTCCGC-3'</b>	578-560
Sonde <i>EP</i>	<b>FAM-5'-TCCGGCCCTGAATGCGGCTAAT-3'-TAMRA<sup>b)</sup></b>	475-497
	Enterovirus (Verstrepen et al., 2001)	EV71 AB550341
Primer <i>EVS</i>	<b>5'-CCCTGAATGCGGCTAATCC-3'</b>	456-474
Primer <i>EVAS</i>	<b>5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'</b>	601-582
Sonde <i>EVP</i>	<b>FAM-5'-AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-3'-TAMRA<sup>b)</sup></b>	539-566
	Herpes-Simplex-Virus Typ-1 (Kessler et al., 2000)	HSV-1 X14112
Primer <i>HSVS</i>	<b>5'-CATCACCGACCCGGAGAGGGAC-3'</b>	65866-65887
Primer <i>HSVAS</i>	<b>5'-GGGCCAGGCGCTTGTGGTGTA-3'</b>	65936-65957
Sonde <i>HSVP</i>	<b>FAM-5'-CCGCCGAAGTGAAGCAGACACCCGCGC-3'-TAMRA<sup>b)</sup></b>	65907-65932
	Herpes-Simplex-Virus Typ-2 (Kessler et al., 2000)	HSV-2 Z86099
Primer <i>HSVS</i>	<b>5'-CATCACCGACCCGGAGAGGGAC-3'</b>	66339-66360
Primer <i>HSVAS</i>	<b>5'-GGGCCAGGCGCTTGTGGTGTA-3'</b>	66409-66430
	Zytomegalievirus (Preiser et al., 2003)	CMV GU937742
Primer <i>HCMVS</i>	<b>5'-CGTTGGTGTGTAGCAACTGGC-3'</b>	138443-138464
Primer <i>HCMVAS</i>	<b>5'-TGTGCTCAAAGAGGTCGAGTTCC-3'</b>	138582-138560
Sonde <i>HCMVP</i>	<b>FAM-5'-CGCGAAGGTGTGGCGGCAG-3'-BHQ1<sup>b)</sup></b>	138540-138558
	Varizella-Zoster-Virus (Stocher et al., 2003)	VZV DQ457052
Primer <i>VZV-S</i>	<b>5'-TGTCTAGAGGAGGTTTTATCTG-3'</b>	53831-53853
Primer <i>VZV-AS</i>	<b>5'-CATCGTCTGTAAAGACTTAACCAAGT-3'</b>	54032-54009
Sonde <i>VZV-P</i>	<b>FAM-5'-AAGTTCGCGGTATAATTGTCAGTGGCGT-3'-BHQ1<sup>b)</sup></b>	53904-53930

#### 4.2.7 Synthese von in-vitro RNA-Transkripten

Von den PCR-Produkten der beiden HPeV Real-time RT-PCR-Verfahren wurde jeweils ein in-vitro RNA-Transkript synthetisiert. Da sich der RNA-Gehalt eines in-vitro Transkriptes photometrisch exakt bestimmen lässt, kann es als Standard in einer quantitativen PCR zur Virus-Konzentrations-Bestimmung der Liquorproben und zur Sensitivitätsbestimmung des Real-time RT-PCR-Verfahren eingesetzt werden.

Um DNA in RNA zu transkribieren, benötigt die DNA eine RNA-Polymerase Bindungsstelle. Da dies beim vorliegenden PCR-Produkt nicht der Fall war, wurde es zunächst in einen Vektor kloniert, der die entsprechende Sequenz enthielt. Die Klonierung erfolgte mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits entsprechend den Herstellerangaben.

##### 4.2.7.1 Real-time RT-PCR

Als Matrize für die HPeV Real-time RT-PCR nach Baumgarte et al. wurden die Verdünnungsstufen  $10^{-2}$ – $10^{-6}$  eines Zellkulturüberstandes einer mit HPeV1 (Laborstamm BNI-788St) infizierten Zellkultur verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 3 wiedergegeben, die Amplifikation fand entsprechend dem Protokoll in Tabelle 4 statt. Anschließend wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für eine erfolgreiche Klonierung sollten scharf begrenzte Banden ohne Nebenbanden zu sehen sein. Es wurde ein PCR-Produkt mit mittlerer Bandenintensität weiterverwendet.

##### 4.2.7.2 Klonierungs-Ansatz und Transformation kompetenter Zellen

Ziel der Klonierung ist die Integration der gewünschten DNA-Sequenz in einen Plasmidvektor. Wird dieser Plasmidvektor in Bakterien transformiert und durch anschließendes Bakterien-Wachstum vermehrt, erhält man eine große Anzahl rekombinanter Plasmid-Klone.

Das frisch erzeugte PCR-Produkt wird in den bakteriellen Vektor ligiert. Im nächsten Schritt wird der Vektor mit dem Insert in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert. Die transformierten Bakterien werden kultiviert. Nach Ausplattierung der Bakterien werden die Kolonien mit dem gewünschten Plasmid identifiziert und das Plasmid isoliert und gereinigt.

Der hier verwendete Plasmid-Vektor (pCR4 Topo-TA-Vektor [Invitrogen, Karlsruhe]) liegt in linearisierter Form vor und ist kovalent mit einer Topoisomerase I des Vaccinia-Virus verbunden. Dieses Enzym ligiert das PCR-Produkt mit dem Vektor. Außerdem verfügt der Vektor über einen 3'-Thymidin-Überhang. Dadurch können die Adenosin-Anlagerungen, die von der Taq-Polymerase an das 3'-Ende eines PCR-Produktes gehängt werden, eine Bindung mit dem Vektor eingehen. Zur Selektion transformierter Bakterien trägt der Vektor ein Kanamycin- und ein Ampicillin-Resistenzgen. Verwendet man Agarplatten, die eines der beiden Antibiotika enthalten, bilden nur die Bakterien mit Antibiotika-Resistenzgen Kolonien.

Außerdem enthält der verwendete pCR4 Topo-Vektor zur Selektion der rekombinanten Plasmide von nicht-rekombinanten Plasmiden das sogenannte *ccdB*-Gen. Die Expression dieses Gens ist für *E.coli* letal. Das *ccdB*-Gen ist mit dem C-Terminus des LacZ $\alpha$ -Gens verbunden. Die erfolgreiche Ligation eines PCR-Produkts unterbricht die Expression beider Gene, die Zelle lebt weiter. So können nur Bakterien mit rekombinantem Plasmid Kolonien bilden. Der Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

**Tab. 10:** Reagenzien des Ligationsansatzes, verwendet zur Synthese eines in-vitro RNA-Transkriptes

Reagenzien	Volumen
Salz-Lösung	1 $\mu$ l
PCR-Produkt	1 $\mu$ l
pCR4 Topo-Vektor	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l
	6 $\mu$ l

Die Reagenzien wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert, bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Insertion der DNA in den Vektor wurde das Plasmid in kompetente Zellen transformiert. Dazu wurden 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes in ein Reaktionsgefäß mit Mach1-T1 chemisch-kompetenten Zellen gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitze-Schock des Ansatzes für 30 s bei 42 °C, um danach umgehend wieder auf Eis gestellt zu werden. 250  $\mu$ l des im Kit enthaltenen und auf Zimmertemperatur temperierten S.O.C.-Mediums wurden dazu gegeben. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 30 °C und 200 rpm im Thermomixer inkubiert. Zeitgleich wurden Agarplatten mit LB-Medium, die Kanamycin in einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml enthielten, bei 37 °C inkubiert. Die LB-Platten wurden

mit den transformierten Bakterien beimpft und über Nacht im Inkubator bei 37 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden vier Kolonien von der Agar-Platte mit einer Impföse aufgenommen und in jeweils ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, das zuvor mit 1,25 ml flüssigem LB-Medium befüllt worden war. Das LB-Medium enthielt Kanamycin, ebenfalls in einer Konzentration von 50 µg/ml. Es folgte eine erneute Inkubation über Nacht bei 37 °C.

#### 4.2.7.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA mittels QIAprep Spin Miniprep Kit

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Das Prinzip des QIAprep Spin Miniprep Kits beruht auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen und nachfolgender Bindung der DNA-Moleküle an eine Silica-Membran in Anwesenheit eines Hochsalzpuffers. Dort gebunden, werden die DNA-Moleküle in mehreren Waschschrinen gereinigt und anschließend eluiert. Die Plasmid-DNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.7.4 Kontrolle der Plasmide

Um eine erfolgreiche Insertion des DNA-Fragments ins Plasmid zu überprüfen, wird die Plasmid-DNA der selektierten Kolonien mittels des entsprechenden Real-time PCR-Verfahrens getestet. Kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz, enthält die Kolonie die entsprechende DNA-Sequenz. Da es sich bei der eingesetzten Matrize bereits um DNA handelte, konnte auf den RT-Schritt im PCR-Protokoll verzichtet werden. Mit Ausnahme dieser Änderung entsprachen Durchführung, PCR-Ansatz und Protokoll den Tabellen 3 und 4. Die Sequenzen von Primern und Sonde sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Anschließend wurde die Orientierung des DNA-Fragments im Vektor mittels der Real-time PCR getestet. Die Screening-PCR wurde für jede Kolonie zweifach durchgeführt. Im ersten Lauf wurden der jeweilige Antisense-Primer und der Primer M<sub>13</sub>f (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), ein plasmidspezifischer Primer, verwendet. Kam es zu einem Anstieg der Fluoreszenz, so war der Einbau des DNA-Fragments in Minusstrang-Orientierung erfolgt. Dies war die erforderliche Orientierung zur späteren Herstellung

von Plusstrang-RNA-Konstrukten. In einem zweiten Ansatz wurden der jeweilige Sense-Primer und M<sub>13f</sub> eingesetzt. Kam es zu einem Anstieg der Fluoreszenz, so war der Einbau des DNA-Fragments in Plusstrang-Orientierung erfolgt. In der nachfolgenden in-vitro Transkription wurde ein dem DNA-Fragment komplementärer RNA-Strang synthetisiert, der dann die gewünschte Plusstrang-Orientierung aufweist.

#### 4.2.7.5 Amplifikation der Ziel-DNA und Präparation mittels Ethanol-Fällung

Der nächste Schritt ist die Isolierung und Präparation der Zielsequenz. Zunächst wird anhand einer qualitativen PCR mit den Plasmid-spezifischen Primern M<sub>13r</sub> und M<sub>13f</sub> (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), die die Klonierungsstelle des Plasmids flankieren, selektiv die DNA-Zielsequenz amplifiziert. Dadurch wird für die in-vitro Transkription der Anteil an Plasmid-DNA reduziert.

Der PCR-Ansatz hatte ein Volumen von 25 µl. Die Komponenten wurden in ein Gefäß pipettiert und zur homogenen Verteilung mit dem Vortex-Mixer gemischt. Anschließend wurden jeweils 20 µl des Mastermixes in ein Reaktionsgefäß pipettiert und abschließend 5 µl des DNA-Extraktes hinzugegeben. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das PCR-Protokoll sind den Tabellen 11 und 12 zu entnehmen. Es wurde das Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase Kit verwendet. Die Reaktion erfolgte im MasterCycler ep gradientS.

**Tab. 11:** PCR-Ansatz zur Amplifikation der Ziel-DNA mit dem Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase Kit; verwendet zur Synthese eines in-vitro RNA-Transkriptes

<b>Master-Mix, Komponenten</b>	<b>1-facher Ansatz</b>
<b>10x Reaction Mix</b>	2,5 µl
<b>dATP, dCTP, dGTP, dTTP ( je 10 mM)</b>	jeweils 200 µM
<b>MgCl<sub>2</sub> (50mM)</b>	2 mM
<b>Vorwärtsprimer M<sub>13f</sub> (10 µM)</b>	400 nM
<b>Rückwärtsprimer M<sub>13r</sub> (10µM)</b>	400 nM
<b>H<sub>2</sub>O, RNase frei</b>	13,9 µl
<b>Platinum TaqPolymerase</b>	0,1 µl
<b>Plasmid-DNA</b>	5 µl
	25 µl

**Tab. 12:** PCR-Protokoll zur Amplifikation der Ziel-DNA mit dem Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase Kit; Arbeitsschritt der Synthese eines in-vitro RNA-Transkriptes

	Temperatur	Dauer	Zyklen
<b>Enzym-Aktivierung</b>	94 °C	2 min	1
<b>Denaturierung</b>	94 °C	30 s	} 35
<b>Annealing</b>	55 °C	20 s	
<b>Elongation</b>	72 °C	30 s	
	4 °C	∞	

Im Anschluss wurde das PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt und beurteilt. Es folgte die Präparation des Amplifikats mittels Ethanol-Fällung. Das Prinzip wird nachfolgend erläutert:

Man versetzt eine Nukleinsäurelösung mit einem einfach-geladenen Salz (Kationen) und Alkohol. Dies führt dazu, dass die Nukleinsäuren ausfallen und durch Zentrifugation pelletiert werden können. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Anschließend werden die Nukleinsäure-Moleküle durch das Waschen mit 70%igem Ethanol vom Salz gereinigt, erneut zentrifugiert und in H<sub>2</sub>O resuspendiert.

**Tab. 13:** Reagenzien einer Ethanol-fällung

Reagenzien	Volumen
<b>Ethanol abs</b>	250 µl
<b>Ethanol, 70%ig</b>	250 µl
<b>Natriumacetat (1,2 M)</b>	10 µl
<b>H<sub>2</sub>O+PCR-Produkt</b>	100 µl

15 µl PCR-Produkt wurden mit 85 µl H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Das 2,5fache Volumen Ethanol abs. und das 0,1fache Volumen Natriumacetat (1,2 M) wurden hinzugegeben und mit dem Vortex-Mixer vermischt. Es folgte die Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl 70%igem Ethanol durch Vortexen gelöst. Es folgte die Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 Minute. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 15 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

#### 4.2.7.6 In-vitro RNA-Transkription

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit Hilfe des Megascript 4 Kits (Ambion, Austin, USA) den Herstellerangaben entsprechend in RNA transkribiert. Die DNA-Fragmente enthielten an ihrem 5'-Ende des Sense-Stranges einen sogenannten T7-Promoter, der

als Bindungsstelle für die DNA-abhängige RNA-Polymerase fungierte und ursprünglich Teil des Plasmids war. Der Reaktionsvolumen betrug 20 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

**Tab. 14:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die in-vitro RNA-Transkription; verwendet zur Synthese eines in-vitro RNA-Transkriptes

Reagenzien	Volumen
ATP, CTP, GTP, UTP (je 75 mM)	8 µl
10 X Reaktions Puffer	2 µl
Enzym-Mix	2 µl
H <sub>2</sub> O	5 µl
DNA-Matrize	3 µl

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurde dem Ansatz zum Verdau der Plasmid-DNA 1 µl der im Kit enthaltenen DNase 1 hinzugefügt und für weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Die Aufreinigung der gewonnene Transkript-RNA geschah mithilfe des Qiagen RNeasy Mini Kits entsprechend dem RNA-cleanup Protokoll.

#### 4.2.7.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Reinheitsbestimmung des Transkripts erfolgte durch spektrophotometrische Messung bei 260 nm und 280 nm.

Nukleinsäuren, sowohl DNA als auch RNA, weisen bei 260 nm ihr Absorptionsmaximum auf. Proteine und andere Kontaminationen absorbieren maximal bei 280 nm. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes lässt sich aus der optischen Dichte bei 260 nm die Nukleinsäure-Konzentration errechnen. Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt Aussagen über die Reinheit der Nukleinsäurelösung zu. Werte zwischen 1,8 und 2 zeigen an, dass die Nukleinsäuren in sehr reiner Form vorliegen. Bei kleineren Quotienten ist die Lösung verunreinigt.

#### 4.2.7.8 Virus-Konzentrationsbestimmung

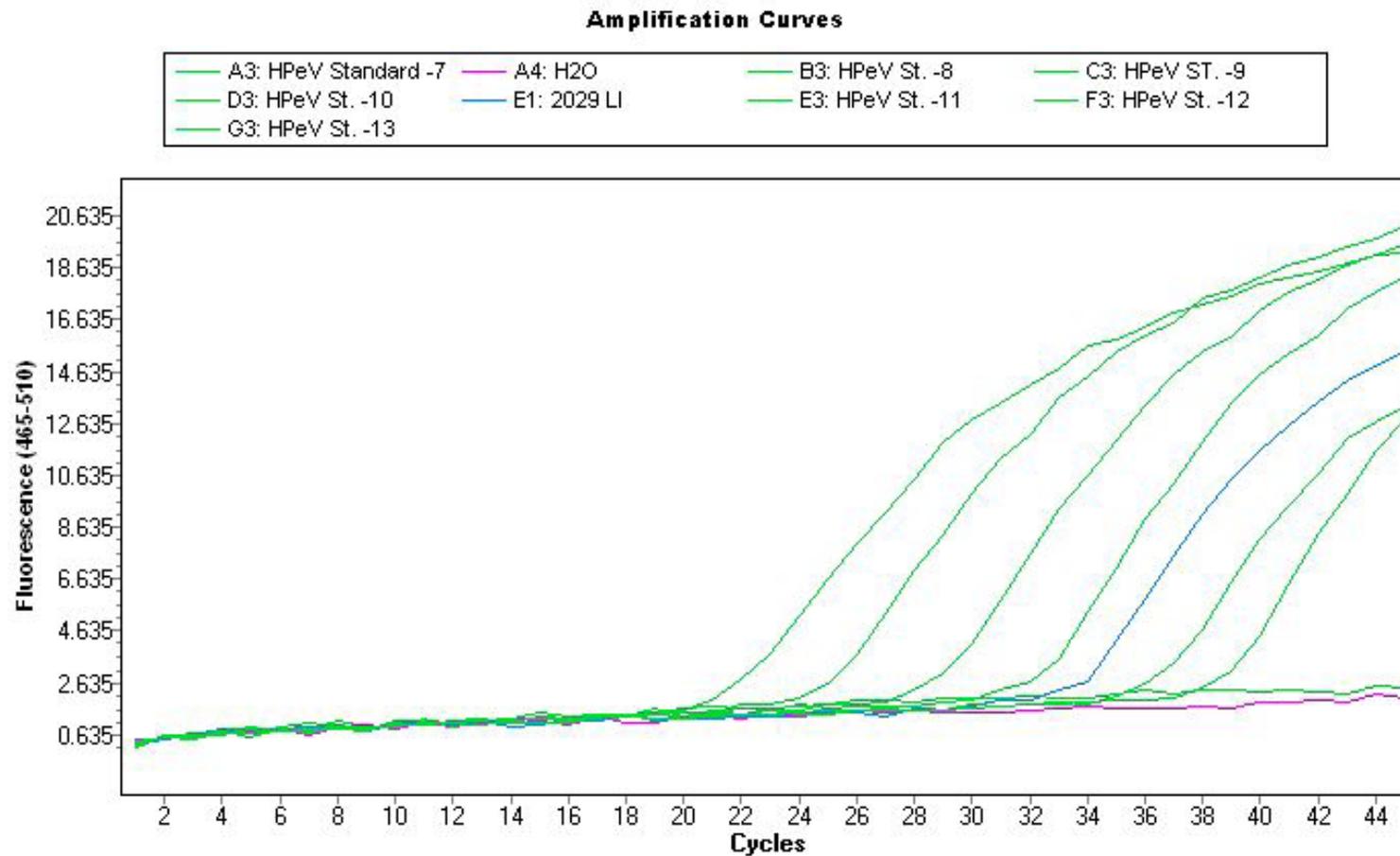
Zur Bestimmung der HPeV-Konzentration im Liquor wurde für beide PCR-Verfahren ein in-vitro Transkript in oben beschriebener Weise erstellt. Zur Konzentrationsbestimmung der EV-positiv getesteten Liquorproben stand ein in-vitro Transkript bereits zur Verfügung.

Zunächst muss die RNA-Kopienzahl pro  $\mu\text{l}$  Transkript berechnet werden. Dies ist im Folgenden anhand des Beispiels des in-vitro Transkripts für die Real-time RT-HPeV-PCR nach Baumgarte et al. erläutert:

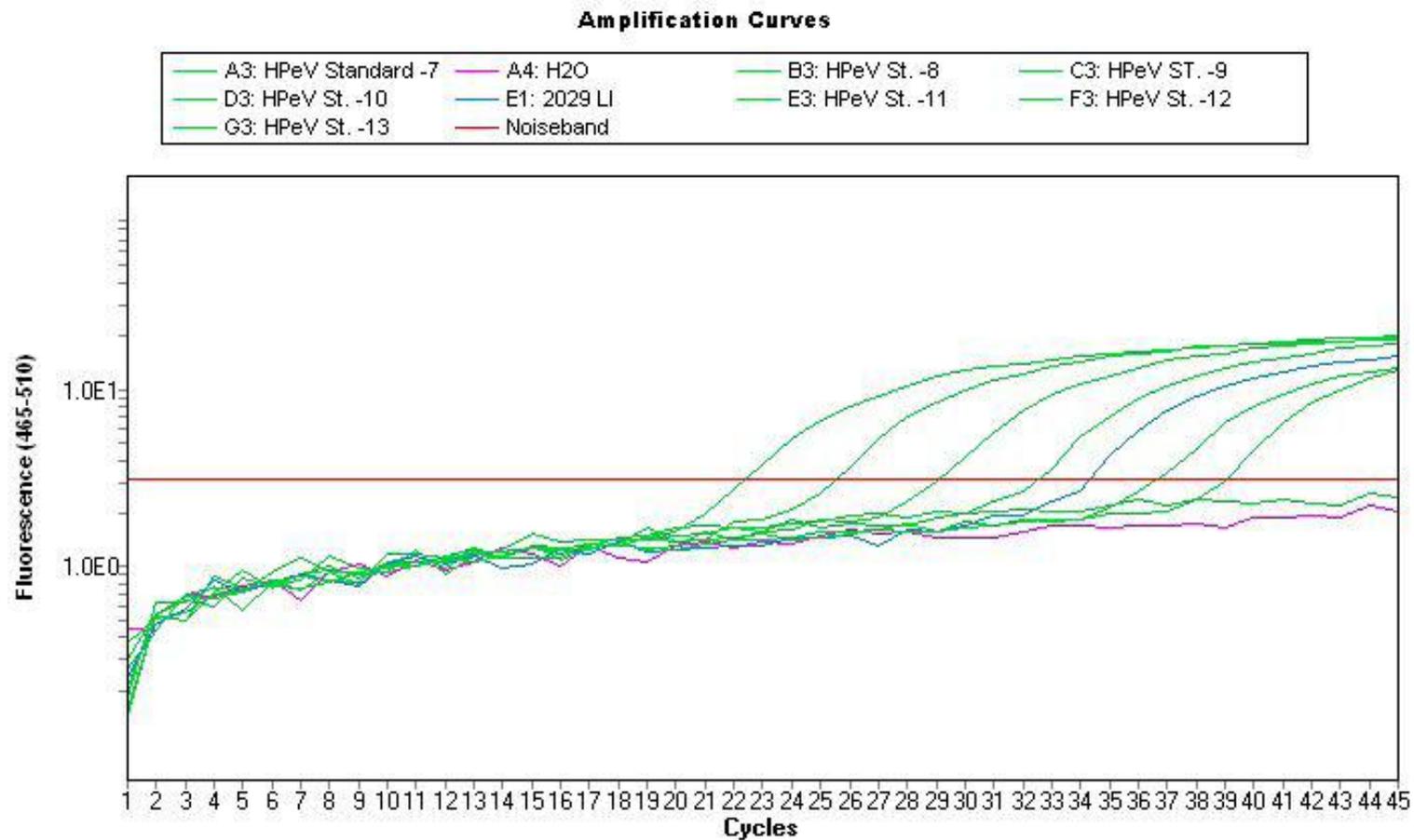
Länge des RNA-Transkripts:	327 bp
Mittlere Molmasse für einzelsträngige RNA pro Nukleotid:	330 g/Mol
Photometrisch bestimmte RNA-Konzentration des Transkripts:	747,9 ng/ $\mu\text{l}$
Avogadro-Konstante:	$6 \times 10^{23}$

Molekülmasse:	Produktgröße $\times$ Molmasse für einzelsträngige RNA $327 \times 330 \text{ g/mol}$ $107910 \text{ g/mol}$
Stoffmengenkonzentration:	Konzentration/Molekülmasse $(0,7 \text{ g/l}) / (107910 \text{ g/mol})$ $0,00000649 \text{ mol/l}$ $6 \times 10^{-12} \text{ mol}/\mu\text{l}$
Moleküle/Probenvolumen:	Stoffmengenkonzentration $\times$ Avogadro-Konstante $6 \times 10^{-12} \text{ mol}/\mu\text{l} \times (6 \times 10^{23})$ <u><b><math>3,6 \times 10^{12} \text{ Teilchen}/\mu\text{l}</math></b></u>

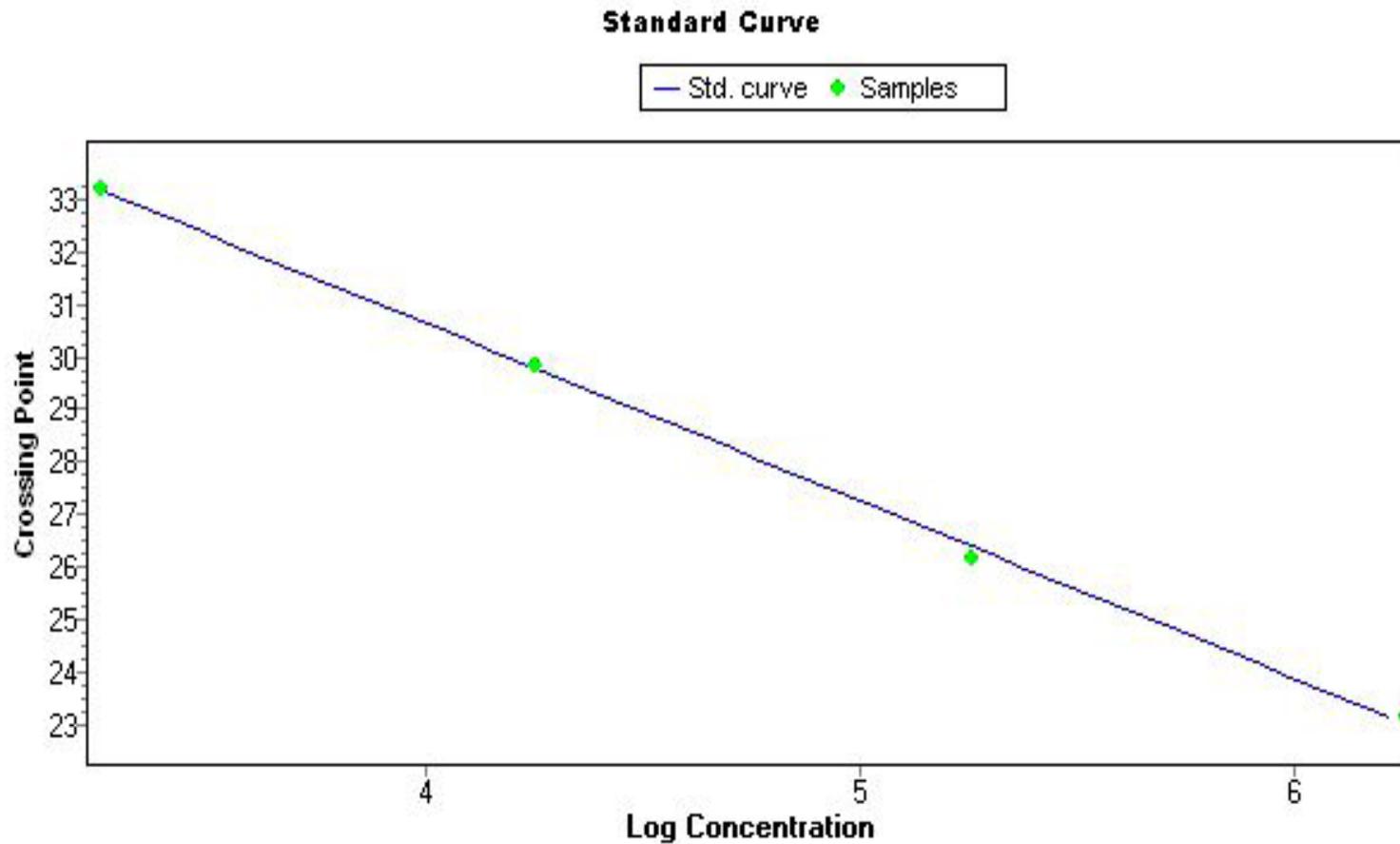
Anschließend wurden Verdünnungsreihen der in-vitro Transkripte mit carrier-RNA-haltigem  $\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \mu\text{g RNA/ml}$ ) erstellt und mittels des jeweiligen Real-time RT-PCR Verfahrens die Anzahl der viralen RNA-Kopien/ $\mu\text{l}$  RNA-Eluat bestimmt. Die Vorgehensweise wird in Abschnitt 4.2.5 erläutert und ist exemplarisch anhand einer Liquor-Probe (in der Abbildung mit der Nr. 2029LI gekennzeichnet) in den Abbildungen 1-3 dargestellt.



**Abb. 1:** Exemplarische Darstellung der Bestimmung der Anzahl von viralen Nukleinsäure-Kopien/ $\mu$ l einer unbekannt Probe mit Hilfe der Real-time PCR: Zunächst sind die Fluoreszenzkurven der Liquor-Probe mit einer unbekannt Ausgangsmenge RNA (in der Legende 2029LI; blau), der Verdünnungsstufen des Standards (grün) und der Negativ-Probe (in der Legende H<sub>2</sub>O; violett) dargestellt.



**Abb. 2:** Abbildung der gleichen Fluoreszenzkurven wie in Abbildung 1, nur mit logarithmischem Maßstab. Zur Quantifizierung wird für jede Probe der Zyklus ( $C_T$  (cycle treshold, Schwellenzyklus)-Wert) ermittelt, bei dem sich das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal deutlich vom Hintergrund abhebt. Die  $C_T$ -Werte können im geraden Bereich der Kurve ermittelt werden, in dem die Amplifikation noch exponentiell verläuft.



**Abb. 3:** Abbildung der Standardkurve, die dadurch erstellt wird, indem man die ermittelten  $C_T$  (cycle treshold, Schwellenzyklus)-Werte gegen den Logarithmus der RNA-Menge der Verdünnungsstufen des Standards aufträgt. Anhand dieser Kurve lässt sich mit dem  $C_T$ -Wert einer unbekannt Probe die Ausgangsmenge RNA in dieser Probe bestimmen.

Um die virale RNA-Kopienzahl/ml der Ausgangsprobe zu erhalten musste der Wert der viralen RNA-Kopien/ $\mu$ l RNA-Eluat mit 5 multipliziert werden, da 5  $\mu$ l Eluat in die PCR-Reaktion eingesetzt wurden, sowie mit einem Korrekturfaktor. Dieser betrug für die HPeV-haltigen Proben 71 im Fall von Liquor oder Serum, 111 für Rachenspülwasser und 63 für Stuhl. So wird nicht nur die Änderung der Maßeinheit, sondern auch die Konzentration der RNA der Ausgangsprobe während der RNA-Extraktion berücksichtigt. Der Korrekturfaktor berechnet sich aus dem in die Extraktion eingesetzten Probenvolumen, dem Elutionsvolumen und dem Einsatzvolumen in die PCR. Für die EV-haltigen Liquorproben wurde die RNA-Konzentration in gleicher Weise bestimmt. Der Korrekturfaktor betrug 167.

#### 4.2.8 Bestimmung der Sensitivität der HPeV Real-time RT-PCR

Zur Anwendung einer PCR in der Diagnostik ist es essentiell, dass sie über eine hohe analytische Sensitivität verfügt. Zur Ermittlung der Sensitivität des PCR-Verfahrens nach Baumgarte et al. wurden zunächst zweifach-Replika von Verdünnungsstufen des RNA-Transkripts angefertigt. Die Verdünnung war einmal mit und einmal ohne Carrier-RNA-haltigem H<sub>2</sub>O (1 µg/ml) durchgeführt worden. In die PCR wurden zwischen  $18 \times 10^{12}$  und 1,8 Kopien/Reaktion eingesetzt.

Später erfolgte der Nachweis der Sensitivitätsgrenzen durch das statistische Verfahren der Probit-Analyse. Die Berechnung geschah mit Hilfe des Programms Statgraphics, Version Statgraphics Centurion XV (StatPoint, Inc., Herndon, VA, USA.).

#### 4.2.9 Humanes Parechovirus-Typisierung

##### 4.2.9.1 Nested VP1/VP3 One-Step RT-PCR

Bei einer nested PCR (dt. „verschachtelte“ PCR) handelt es sich um eine Methode, mit der sich sehr geringe Mengen an DNA bzw. RNA nachweisen lassen (Mülhardt, 2009). Das Prinzip beruht darauf, dass das Produkt einer ersten PCR als Matrize für eine zweite Amplifikation verwendet wird. Das zweite Primerpaar muss dabei innerhalb des Primerpaars der ersten Reaktion liegen. Aufgrund höherer Zyklenzahlen lassen sich so sehr geringe Mengen an Matrize nachweisen. Der zweistufige Ablauf verhindert dabei Fehlhybridisierungen, die sonst ab etwa dem 40. Zyklus deutlich zunehmen und die Qualität des PCR-Produkts mindern würden (Mülhardt, 2009). Bei einer heminested PCR wird nur ein Primer versetzt, während der andere in der ersten und zweiten Runde identisch ist.

Die in den Liquores gefundene HPeV-RNA wurden durch Sequenzierung eines Genomabschnitts im Übergang von VP1 zu VP3 typisiert. Dieser wurde zuvor mittels einer nested RT-PCR amplifiziert.

Bei dem hier verwendeten Verfahren handelt es sich um eine modifizierte Version des Verfahrens nach Harvala et al. (Harvala et al., 2008). Es kann direkt auf RNA-Extrakte klinischer Proben angewendet werden. Für die erste Runde wurde Invitrogen SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq verwendet, in der zweiten Runde das Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase Kit. Die Zusammensetzung sowie

die PCR-Protokolle sind in den Tabellen 15 und 16 beschrieben, die Primer-Sequenzen sind in der Tabelle 17 dargestellt. Die Komponenten der beiden PCR-Ansätze mit einem Endvolumen von 50 µl wurden in ein Gefäß pipettiert und zur homogenen Verteilung mit dem Vortex-Mixer gemischt. In der ersten Runde wurden 44 µl, in der zweiten Runde 45 µl des Mastermixes in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurden 6 µl RNA-Matrize in der ersten bzw. 5 µl DNA-Matrize in der zweiten Runde hinzugegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte im MasterCycler ep gradientS. Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das gesuchte Fragment hatte eine Länge von 304 bp.

**Tab. 15:** PCR-Ansatz der nested HPeV VP1/VP3 One-Step RT PCR (modifiziert nach Harvala et al., 2008)

<b>Master-Mix, Komponenten</b>	<b>1-facher Ansatz</b>
<b>1. Runde</b>	
<b>2X Reaction Mix</b>	25 µl
<b>Vorwärtsprimer VP 2090 (10 µM)</b>	500 nM
<b>Rückwärtsprimer VP 2523 (10µM)</b>	500 nM
<b>H<sub>2</sub>O, RNase frei</b>	12 µl
<b>SuperScript. III RT/ Platinum <i>Taq</i> Mix</b>	2 µl
<b>RNA-Extrakt</b>	6 µl
	50 µl
<b>2. Runde</b>	
<b>10X Reaction Mix</b>	5 µl
<b>dATP, dCTP dGTP, dTTP( je 10 mM)</b>	jeweils 200 µM
<b>MgCl<sub>2</sub> (50mM)</b>	2 mM
<b>Vorwärtsprimer VP 2159 (10 µM)</b>	500 nM
<b>Rückwärtsprimer VP 2458 (10µM)</b>	500 nM
<b>H<sub>2</sub>O, RNase frei</b>	31,8 µl
<b>Platinum <i>Taq</i>Polymerase</b>	0,2 µl
<b>PCR-Produkt der 1. Runde</b>	5 µl
	50 µl

**Tab. 16:** PCR-Protokoll der nested HPeV VP1/VP3 One-Step RT PCR (modifiziert nach Harvala et al., 2008)

	Temperatur	Dauer	Zyklen
<b>RT</b>	43 °C	1 h	20
	53 °C	1 min	
	55 °C	1 min	
	70 °C	15 min	
<b>1. Runde</b>			
<b>Enzym-Aktivierung</b>	94 °C	2 min	40
<b>Denaturierung</b>	94 °C	30 s	
<b>Annealing</b>	50 °C	30 s	
<b>Elongation</b>	68 °C	105 s	
	65 °C	5 min	∞
	4 °C		
<b>2. Runde</b>			
<b>Enzym-Aktivierung</b>	94 °C	2 min	30
<b>Denaturierung</b>	94 °C	18 s	
<b>Annealing</b>	55 °C	21 s	
<b>Elongation</b>	72 °C	90 s	
	72 °C	5 min	∞
	4 °C		

**Tab. 17:** Primersequenzen der nested HPeV VP1/VP3 One-Step RT-PCR (nach Harvala et al., 2008)

a) Übersetzung degenerierter Basen: R: A oder G; Y: C oder T; W: A oder T; S: C oder G; M: A oder C; D: A, G oder T

Primer		Accession-Nr./ Position:
	Nested VP1/VP3-RT-PCR (Harvala et al., 2008)	HPeV1 L02971
1. Sense-Primer	<b>5'-GAYAATGCRYATMTAYACWATYTGTA-3<sup>a)</sup></b>	2090
1. Antisense-Primer	<b>5'-ACWGTRAARATRTCHACATTSATDG-3<sup>a)</sup></b>	2523
2. Sense-Primer	<b>5'-TTYTCMACTGGATGMGGAARAC-3<sup>a)</sup></b>	2159
2. Antisense-Primer	<b>5'-DGGYCCATCATCYTGWGCTGA-3<sup>a)</sup></b>	2458

#### 4.2.9.2 Sequenzierung der PCR-Produkte und phylogenetische Analyse

Die PCR-Produkte wurden mit dem Seqlab PCR-Reinigungs-Kit den Herstellerangaben entsprechend aufgereinigt und konzentriert. Die Sequenzierung erfolgte für beide Orientierungen des Fragments mit Hilfe von Sense- und Antisense-Primer der zweiten Runde (siehe Tabelle 17) durch die Firma Seqlab (Göttingen, Deutschland). Der Ansatz hatte ein Volumen von 7  $\mu$ l, das sich aus 4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l DNA-Extrakt und jeweils 0,5  $\mu$ l Sense- bzw. Antisense-Primer (10  $\mu$ M) zusammensetzte. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der SeqMan–Software ausgewertet. Die Phylogenese wurde mit der Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 entsprechend der neighbour-joining Methode mit den Standard-Einstellungen durchgeführt (Saitou und Nei, 1987; Tamura et al., 2007).

#### 4.2.10 Sequenzierung des RGD-Motivs

##### 4.2.10.1 Amplifikation der Zielsequenz

Des Weiteren wurde ein 850 bp langes Fragment sequenziert, das das komplette VP1 sowie den Übergang zu 2A erfasst. Sofern vorhanden, ist im Bereich des 3'-Endes von VP1 das sogenannte RGD-Motiv lokalisiert. Für die erfolgreiche Amplifikation der Zielsequenz in einer Liquorprobe pro Patient waren zwei verschiedene PCR-Protokolle bzw. zwei verschiedene Primer-Kombinationen notwendig.

##### 4.2.10.2 HPeV-VP1 heminested One-Step RT-PCR

Zunächst erfolgte die Durchführung einer HPeV-VP1 heminested One-Step RT-PCR. Für die erste Runde wurde Invitrogen SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq verwendet, in der zweiten Runde das Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase Kit. Die Komponenten beider PCR-Ansätze wurden in ein Gefäß pipettiert, zur homogenen Verteilung mit dem Vortex-Mixer gemischt und jeweils 45 µl des Mastermixes in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurden 5 µl des RNA- bzw. DNA-Extraktes hinzugegeben. PCR-Ansätze, PCR-Protokolle sowie die Primer-Sequenzen finden sich in den Tabellen 18, 19 und 20.

**Tab. 18:** PCR-Ansatz der Heminested HPeV-VP1 One-Step RT-PCR

<b>Master-Mix, Komponenten</b>	<b>1-facher Ansatz</b>
<b>1. Runde</b>	
2X Reaction Mix	25 µl
MgSO <sub>4</sub> (5 mM)	300 µM
Vorwärtsprimer (10 µM)	400 nM
Rückwärtsprimer (10µM)	400 nM
H <sub>2</sub> O, RNase frei	11 µl
SuperScript. III RT/ Platinum Taq Mix	2 µl
RNA-Extrakt	5 µl
	50 µl
<b>2. Runde</b>	
<b>1-facher Ansatz</b>	
10X Reaction Mix	5 µl
dATP, dCTP dGTP, dTTP ( je 10 mM)	jeweils 200 µM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2 mM
Vorwärtsprimer (10 µM)	200 nM
Rückwärtsprimer (10µM)	200 nM
H <sub>2</sub> O, RNase frei	34,8 µl
Platinum TaqPolymerase	0,2 µl
PCR-Produkt der 1. Runde	5 µl
	50 µl

**Tab. 19:** PCR-Protokoll der Heminested HPeV-VP1 One-Step RT-PCR

	Temperatur	Dauer	Zyklus
RT	42 °C	30 min	
<b>1. Runde</b>			
Enzym-Aktivierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	20 s	} 40
Annealing	55 °C	20 s	
Elongation	72 °C	80 s	
	4 °C	∞	
<b>2. Runde</b>			
Enzym-Aktivierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	20 s	} 45
Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	60 s	
	72 °C	60 s	
	4 °C	∞	

**Tab. 20:** Primersequenzen der Heminested HPeV-VP1 One-Step RT-PCR

a) Übersetzung degenerativer Basen: R: A oder G; Y: C oder T; W: A oder T; S: C oder G

Primer		Accession-Nr. / Position:
	heminested VP1 RT-PCR	Human parechovirus 3 strain BONN-1 JX682576
1. Sense-Primer	5'-ACAGTTCTAGTCCAATAAGGTGC-3'	2216-2239
2. Sense-Primer	5'-GTTCACAAATGGACCTTACAGATC-3'	2324-2347
Antisense-Primer	5'-CCATAGTGYTTGTAGAAGCCTCT-3' <sup>a)</sup>	3065-3039

#### 4.2.10.3 HPeV-VP1 heminested two-step RT-PCR

Da die Amplifikation der RNA-Zielsequenz einer HPeV-enhaltenden Liquorprobe eines Patienten ausgeblieben war, wurde eine HPeV-VP1 heminested two-step RT-PCR angewendet. Im ersten Schritt erfolgte die cDNA-Synthese mittels der SuperScript III Reverse Transkriptase. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze sind in den Tabellen 21 und 22 beschrieben.

**Tab. 21:** Reagenzien des ersten Schrittes der cDNA-Synthese für die HPeV-VP1 heminested two-step RT-PCR

Reagenzien Schritt 1	Volumen
H <sub>2</sub> O	6,8 µl
Random Primer	0,2 µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP ( je 10 mM)	1 µl
RNA-Extrakt	5 µl

Die angegebenen Komponenten wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit dem Vortex-Mixer vermischt. Zur Lösung von Sekundärstrukturen der RNA-Moleküle und Annealing der Primer wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

**Tab. 22:** Reagenzien des zweiten Schrittes der cDNA-Synthese für die HPeV-VP1 heminested two-step RT-PCR

<b>Reagenzien Schritt 2</b>	<b>Volumen</b>
<b>FS-Puffer</b>	4 µl
<b>DTT</b>	1 µl
<b>RNase Out</b>	1 µl
<b>SuperScript III Reverse Transkriptase</b>	0,2 µl

Die in Tabelle 22 aufgelisteten Reagenzien wurden hinzugefügt und erneut mit Hilfe des Vortex-Mixer vermischt. Das cDNA Synthese-Protokoll ist Tabelle 23 zu entnehmen.

**Tab. 23:** cDNA-Synthese Protokoll

<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
<b>22 °C</b>	10 min
<b>42 °C</b>	1 h
<b>70 °C</b>	15 min
<b>4 °C</b>	∞

Im nächsten Schritt wurde die heminested PCR mit der PlatinumTaq DNA-Polymerase von Invitrogen durchgeführt. Nach Erstellung des Mastermixes wurden jeweils 48 µl desselben in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 2 µl des cDNA- bzw. DNA-Extraktes hinzugegeben. Die PCR-Ansätze, PCR-Protokolle sowie die Primer-Sequenzen finden sich in den Tabellen 24, 25 und 26 wieder. Die PCR-Reaktion erfolgte im MasterCycler ep gradientS. Im Anschluss erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte.

**Tab. 24:** PCR-Ansatz der HPeV-VP1 two-step RT-PCR

Master-Mix, Komponenten	1-facher Ansatz
<b>1. Runde</b>	
H <sub>2</sub> O, RNase frei	37,1 µl
10x Reaction Mix	5 µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10 mM)	jeweils 200 µM
Vorwärtsprimer (10 µM)	200 nM
Rückwärtsprimer (10 µM)	200 nM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,5 mM
Platinum TaqPolymerase	0,4 µl
c-DNA	2 µl
	50 µl
<b>2. Runde</b>	
<b>1-facher Ansatz</b>	
10X Reaction Mix	5 µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10 mM)	jeweils 200 µM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2 mM
Vorwärtsprimer (10 µM)	200 nM
Rückwärtsprimer (10 µM)	200 nM
H <sub>2</sub> O, RNase frei	37,8 µl
Platinum TaqPolymerase	0,2 µl
PCR-Produkt der 1. Runde	2 µl
	50 µl

**Tab. 25:** PCR-Protokoll der HPeV-VP1 two-step RT-PCR

	Temperatur	Dauer	Zyklen
<b>1. Runde</b>			
Enzym-Aktivierung	95 °C	3 min	10
Denaturierung	94 °C	20 s	
Annealing	60 °C (Reduktion um 1 °C/Zyklus)	30 s	
Elongation	72 °C	60 s	
Denaturierung	95 °C	20 s	40
Annealing	54 °C	30 s	
Elongation	72 °C	60 s	
	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	
<b>2. Runde</b>			
Enzym-Aktivierung	94 °C	3 min	45
Denaturierung	94 °C	20 s	
Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	60 s	
	4 °C	∞	

**Tab. 26:** Primersequenzen der HPeV-VP1 heminested two-step RT-PCR

a) Über-setzung degenerativer Basen: R: A oder G; Y: C oder T; W: A oder T; S: C oder G; M: A oder C; B: C, G oder T

Primer		Accession-Nr. / Position:
	heminested VP1-HPeV two-step RT-PCR	EU716175.1 HPeV8
1. Sense-Primer	<b>5'-TTYCAGAATTCBTGGGGTTCMCAG-3<sup>a)</sup></b>	2317
2. Sense-Primer	<b>5'-CAGAATTCBTGGGGTTCMCAGATG-3<sup>a)</sup></b>	2320
Antisense-Primer	<b>5'-CCATAGTGYYTGTAGAAGCCTCT-3<sup>a)</sup></b>	3083

#### 4.2.10.4 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung und Konzentrierung der PCR-Produkte wurde mit dem Seqlab PCR-Reinigungs-Kit den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte für beide Orientierungen des Fragments mit Hilfe von Sense- und Antisense-Primer der zweiten Runde (siehe Tabellen 20 und 26) durch die Firma Seqlab (Göttingen, Deutschland). Der Ansatz hatte ein Volumen von 7 µl, das sich aus 4 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl DNA-Extrakt und jeweils 0,5 µl Sense- bzw. Antisense-Primer (10 µM) zusammensetzte. Anschließend wurden die Sequenzen mit der SeqMan-Software (DNA-Star Inc., Madison, WI, USA) ausgewertet.

#### 4.2.11 Enterovirus-Typisierung

Die in den Liquorproben detektierte EV-RNA wurde durch Sequenzierung eines hochvariablen Genomabschnitts im VP2 typisiert, nachdem dieser mittels einer heminested two-step RT-PCR amplifiziert worden war.

##### 4.2.11.1 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde mit der SuperScript III Reverse Transkriptase entsprechend den Herstellerangaben synthetisiert. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in den Tabellen 27 und 28 wiedergegeben, das c-DNA-Synthese-Protokoll in Tabelle 29.

**Tab. 27:** Reagenzien des ersten Schrittes der cDNA-Synthese für die EV-VP2 heminested two-step RT-PCR

Reagenzien Schritt 1	Volumen
H <sub>2</sub> O	6,6 µl
Random Primer	0,4 µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP ( je 10 mM)	je 0,2 mM
RNA-Extrakt	5 µl

Alle Komponenten wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit dem Vortex-Mixer vermischt. Zur Lösung von Sekundärstrukturen der RNA-Moleküle und Annealing der Primer wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

**Tab. 28:** Reagenzien des zweiten Schrittes der cDNA-Synthese für die EV-VP2 heminested two-step RT-PCR

Reagenzien Schritt 2	Volumen
H <sub>2</sub> O	0,8 µl
DTT	1 µl
BSA (1:10)	1 µl
SuperScript III Reverse Transkriptase	0,2 µl
FS-Puffer	4 µl

Die in der Tabelle 28 aufgelisteten Reagenzien wurden hinzugefügt und zur homogenen Verteilung aller Komponenten mit dem Vortex-Mixer gemischt.

**Tab. 29:** cDNA-Synthese Protokoll

Temperatur	Dauer
30 °C	10 min
50 °C	1 h
70 °C	15 min
4 °C	∞

## 4.2.11.2 Heminested PCR

Für die PCR wurde das Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase Kit verwendet. Beide PCR-Ansätze hatten ein Volumen von 50 µl. Alle Komponenten wurden in ein Gefäß pipettiert und zur homogenen Verteilung mit dem Vortex-Mixer gemischt. Jeweils 45 µl des Mastermixes wurden in eine Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurden 5 µl des cDNA- bzw. DNA-Extraktes hinzugegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte im MasterCycler ep gradientS. Zusammensetzung der PCR-Ansätze und Protokolle sind den Tabellen 30 und 31, die Primersequenzen sind der Tabelle 32 zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das gewünschte Fragment hatte eine Länge von 368 bp.

**Tab. 30:** PCR-Ansatz der EV-VP2 heminested two-step RT-PCR

Master-Mix, Komponenten	1-facher Ansatz
<b>1. Runde</b>	
10X Reaction Mix	5 µl
dATP, dCTP dGTP, dTTP (je 10 mM)	jeweils 200 µM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,5 mM
Vorwärtsprimer (je 10 µM)	jeweils 800 nM
Rückwärtsprimer (je 10µM)	jeweils 800 nM
H <sub>2</sub> O, RNase frei	28,3 µl
Platinum TaqPolymerase	0,2 µl
cDNA	5 µl
	50 µl
<b>2. Runde</b>	
10X Reaction Mix	5 µl
dATP, dCTP dGTP, dTTP (je 10 mM)	jeweils 200 µM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,5 mM
Vorwärtsprimer ( je 10 µM)	Jeweils 400 nM
Rückwärtsprimer (je 10µM)	Jeweils 400 nM
H <sub>2</sub> O, RNase frei	35,3 µl
Platinum TaqPolymerase	0,2 µl
PCR-Produkt der 1. Runde	2 µl
	50 µl

**Tab. 31:** Protokoll der EV-VP2 heminested two-step RT-PCR

	Temperatur	Dauer	Zyklus
<b>1. Runde</b>			
<b>Enzym-Aktivierung</b>	95 °C	5 min	
<b>Denaturierung</b>	94 °C	30 s	} 40
<b>Annealing</b>	48 °C	45 s	
<b>Elongation</b>	72 °C	45 s	
	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	
<b>2. Runde</b>			
<b>Enzym-Aktivierung</b>	95 °C	5 min	
<b>Denaturierung</b>	94 °C	30 s	} 30
<b>Annealing</b>	56 °C	45 s	
<b>Elongation</b>	72 °C	45 s	
	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	

**Tab. 32:** Primersequenzen der EV-VP2 heminested two-step RT-PCR

a) Übersetzung degenerierter Basen: D: G, A, oder T; R: A oder G; Y: T oder C; N: A, T, C oder G; M: A or C; I: Desoxy-Inosin

Primer		Accession-Nr./ Position
	EV-VP2 heminested two-step RT-PCR (Nasri et al., 2007)	PV1 Mahoney V01149
1. Sense-Primer M 11 + 12	<b>5'-GARGCITGYGGITAYAGYGA-3<sup>ra</sup></b>	962–981
	<b>5'-GARGARTGYGGITAYAGYGA-3<sup>ra</sup></b>	
2. Sense-Primer. M 21 + 22	<b>5'-GGITGGTGGTGAARYTICC-3<sup>ra</sup></b>	1178–1197
	<b>5'-GGITGGTAYTGGAARTTICC-3<sup>ra</sup></b>	
Antisense- Primer M 31 + 32	<b>5'-TTDATDATYTGRTGIGG-3<sup>ra</sup></b>	1545–1529
	<b>5'-TTDATCCAYTGRTGIGG-3<sup>ra</sup></b>	

#### 4.2.11.3 Gelextraktion der Amplifikate mittels QIAEX II Gel Extraction Kit

Da außer der gewünschten Bande in Höhe von 368 bp weitere Nebenbanden im Gel sichtbar waren, also eine Amplifikation mehrerer Fragmente unterschiedlicher Größe stattgefunden hatte, musste das Produkt gewünschter Länge aus dem Gel extrahiert werden.

Hierzu wurde entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 4.2.3 ein präparatives 2%iges Gel unter Verwendung von low-melting (niedrig-schmelzender) Agarose, gegossen.

Niedrig-schmelzende Agarose schmilzt bereits bei 65 °C und damit in einem Temperaturbereich, in dem DNA noch nicht denaturiert. Auch die Geliertemperatur ist sehr niedrig. Sie liegt mit 29 °C unter der Inkubationstemperatur von Restriktionsenzymen. Dies erlaubt einem u.a. DNA-Fragmente aus dem Gel auszuschneiden und aufzureinigen (Mülhardt, 2009).

40 µl PCR-Produkt wurden bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt, die entsprechenden Banden unter der UV-Lampe mit jeweils einem sterilen Skalpell pro Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Extraktion geschah mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kit den Herstellerangaben entsprechend. Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden in 20 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 4.2.11.4 Sequenzierung der PCR-Produkte und phylogenetische Analyse

Die PCR-Produkte wurden mit dem Seqlab PCR-Reinigungs-Kit den Herstellerangaben entsprechend aufgereinigt und konzentriert. Die Sequenzierung erfolgte für beide Orientierungen des Fragments mit Hilfe von Sense- und Antisense-Primer der zweiten Runde (siehe Tabelle 30) durch die Firma Seqlab. Der Ansatz hatte ein Volumen von 7 µl, das sich aus 4 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl DNA-Extrakt und jeweils 0,5 µl Sense- bzw. Antisense-Primer (10 µM) zusammensetzte.

Die Sequenzen wurden mit Hilfe der SeqMan – Software ausgewertet. Die Phylogenie wurde mit der Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 entsprechend der neighbour-joining Methode durchgeführt (Saitou und Nei, 1987; Tamura et al., 2007).

### 4.3 Sonstiges

Die Tabellen und Grafiken wurden mit Microsoft Office Excel 2007 erstellt, die Durchführung statistischer Auswertungen erfolgte mit IBM SSPS Statistics 22.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Nachweis des Humanen Parechovirus, Enterovirus, Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2, Varizella-Zoster-Virus, Zytomegalievirus

#### 5.1.1 Studienkohorte

Als Untersuchungsmaterial standen insgesamt 349 Liquorproben von 327 Patienten der Universitätskinderklinik Bonn aus den Jahren 1998 bis 2008 zur Verfügung. Es wurden alle noch verfügbaren Liquorproben untersucht, die zwischen Januar 1998 und Oktober 2008 zu diagnostischen Zwecken aus der Universitätskinderklinik Bonn in das damalige Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, später Institut für Virologie, der Universität Bonn eingeschickt worden waren. Alle Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. 11 Proben stammten aus dem Jahr 1998, 13 Proben aus 1999, 29 Proben aus 2000, 28 Proben aus 2001, 31 Proben aus 2002, 28 Proben aus 2003, 28 Proben aus 2004, 36 Proben aus 2005, 44 Proben aus 2006, 49 Proben aus 2007 und 52 Proben aus 2008. Von den 327 Patienten waren 179 männlich und 148 weiblich. Der Alters-Mittelwert betrug 7,9 Jahre, der Median 8 Jahre, die Spanne 8 Tage bis 17 Jahre.

#### 5.1.2 Virus-Nukleinsäure-Nachweisverfahren

Alle Liquorproben wurden auf HPeV, EV, HSV, VZV und CMV getestet. Zum Nachweis von HPeV wurden zwei unterschiedliche Real-time RT-PCR-Verfahren verwendet (siehe Material und Methoden). Aus der virologischen Diagnostik standen als Nachweisverfahren für EV zwei Real-time RT-PCR Verfahren und für HSV, VZV und CMV jeweils ein Real-time PCR-Verfahren zur Verfügung. Eine Diagnostik mittels Virusanzucht wurde nicht durchgeführt.

#### 5.1.3 Sensitivitätsbestimmung der Nachweisverfahren

Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Nachweisverfahren war die Sensitivität der Real-time RT-PCR nach Baumgarte et al. unbekannt.

Es wurde zunächst ein RNA-Standard des HPeV1 Isolates BNI788 in Form einer in-vitro transkribierten RNA hergestellt. Dieser enthielt  $3,6 \times 10^{12}$  Kopien/ $\mu\text{l}$  RNA-Standard. Zur Bestimmung der Sensitivität wurden zwei Verfahren verwendet. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe der  $\text{Log}_{10}$ -Stufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-13}$  des RNA-Standards erstellt. Dies

geschah einmal mit und einmal ohne den Zusatz von Carrier-RNA in einer Konzentration von 1 µg/ml H<sub>2</sub>O. Wurde mit Carrier-RNA-haltigem H<sub>2</sub>O verdünnt, so lag die Nachweisgrenze in einer Endpunktverdünnung bei 18 Kopien/Reaktion (10 bis 100 Kopien/Reaktion). Ohne Carrier-RNA-haltiges H<sub>2</sub>O lag die Nachweisgrenze um eine Log<sub>10</sub>-Stufe höher, und zwar bei 180 Kopien/Reaktion (100 bis 1000 Kopien/Reaktion).

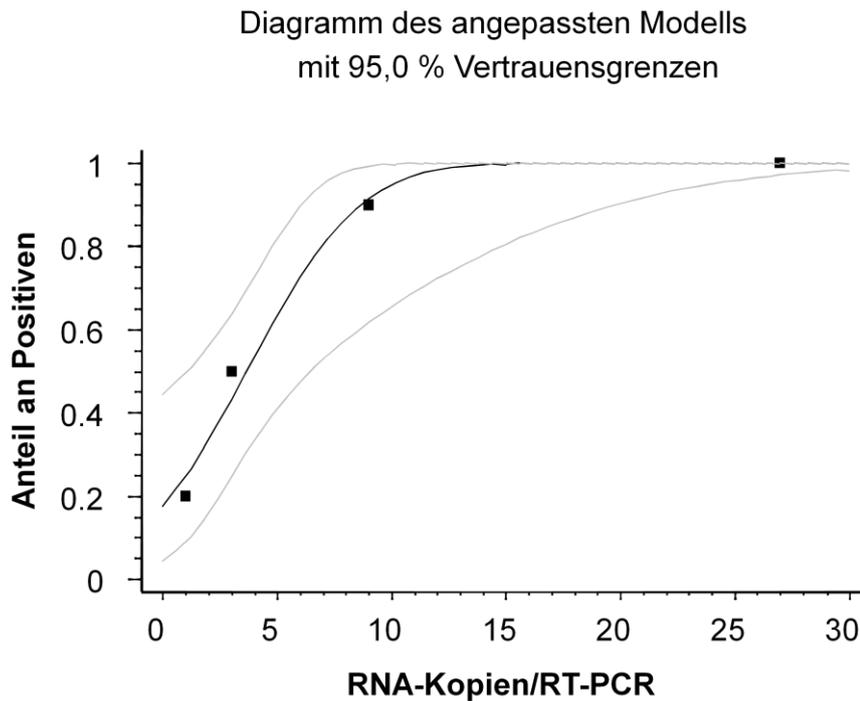
**Tab. 33:** Vergleich zweier Verdünnungsreihen des HPeV-RNA-Standards in Log<sub>10</sub> – Stufen, mit bzw. ohne Verwendung von Carrier-RNA, getestet mit dem HPeV Real-time RT-PCR Assay nach Baumgarte et al. (Baumgarte et al., 2008)  
+ steht für ein positives Ergebnis, - steht für ein negatives Ergebnis

	Log <sub>10</sub> Verdünnungsreihe des RNA-Standards												
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-11</sup>	10 <sup>-12</sup>	10 <sup>-13</sup>
<b>Mit Carrier RNA (1 µg/ml)</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>ohne Carrier RNA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Anschließend wurde die analytische Sensitivität mit Hilfe einer Probit-Analyse ermittelt. PCR-Reaktionen mit einem, drei, neun und 27 Genomäquivalenten/PCR-Reaktion wurden in jeweils zehnfacher Ausführung durchgeführt. Wie aus Tabelle 34 hervorgeht, waren bei 1 RNA-Kopie/PCR-Ansatz zwei der zehn Ansätze positiv, bei 3 RNA-Kopien/PCR-Ansatz waren es fünf Reaktionen, bei 9 RNA-Kopie/PCR-Ansatz waren es neun Reaktionen und bei 27 RNA-Kopie/PCR-Ansatz waren ebenfalls neun der zehn Reaktionen positiv. Die Probit-Analyse ergab eine 95%ige Detektionswahrscheinlichkeit von  $\geq 10,1$  Genom-äquivalente/PCR-Reaktion und eine 50%ige Nachweiswahrscheinlichkeit von 3,7 Genomäquivalenten. Das 95 % Konfidenzintervall lag bei 7-24 RNA-Kopien/PCR-Ansatz (siehe Abbildung 4).

**Tab. 34:** Darstellung der Ergebnisse der Detektion einer definierten Anzahl an RNA-Kopien/PCR-Reaktion in jeweils 10 parallelen Reaktionsansätzen zur Bestimmung der analytischen Sensitivität der HPeV Real-time RT-PCR mit Hilfe einer Probit-Analyse

Anzahl an RNA-Kopien/PCR-Ansatz	Anzahl an Positiven/Parallelansätze insgesamt
1	2/10
3	5/10
9	9/10
27	9/10



**Abb. 4:** Bestimmung der analytischen Sensitivität der HPeV Real-time RT-PCR mit Hilfe einer Probit-Analyse: Dargestellt sind die beobachteten Anteile an erfolgreichen RNA-Detektionen in parallel durchgeführten PCR-Reaktionen (Punkte), sowie die voraussichtlichen Anteile an erfolgreichen Detektionen bei anderen Ausgangs-Konzentrationen an RNA-Kopien im Reaktionsansatz (durchgezogene schwarze Linie). Die grauen Linien geben das 95 %-Konfidenzintervall wieder.

Die bereits aus der Diagnostik bekannten Ergebnisse einer Endpunktverdünnung zur Sensitivitätsbestimmung der EV-PCR nach Verstrepen et al. ergaben eine Nachweisgrenze von  $3,8 \times 10^3$  Transkripte/PCR-Ansatz, für die EV-PCR nach Dierssen et al. eine Nachweisgrenze von 12,2 Transkripte/PCR-Ansatz, für die HSV-PCR nach Kessler et al. eine Nachweisgrenze von  $10^3$  Kopien/ml, für die CMV-PCR nach Preiser et al. eine Nachweisgrenze von 40 Transkripten/PCR-Ansatz und für die VZV-PCR nach Stöcher et al. eine Nachweisgrenze von  $6,37 \times 10^2$  Transkripten/PCR-Ansatz (Dierssen et al., 2008; Kessler et al., 2000; Preiser et al., 2003; Stöcher et al., 2003; Verstrepen et al., 2001).

## 5.2 Absolute und relative Häufigkeiten von Humanem Parechovirus, Enterovirus, Herpes-Simplex-Virus Typ 1 und Typ 2, Varizella-Zoster-Virus, Zytomegalievirus

HPeV wurde mit beiden Verfahren in 2/349 Liquores (0,57 %) gefunden. Dies entsprach einer Prävalenz von 0,6 % (2/327). Der EV-Assay nach Verstrepn et al. ergab 13/349 (3,7 %) positive Liquorproben, während der EV-Assay nach Dierssen et al. 16/349 (4,6 %) positive detektierte. Die Prävalenz lag somit bei 3,4 % (11/327) für den EV RT-PCR Assay nach Verstrepn et al. und 4,3 % (14/327) für den EV RT-PCR Assay nach Dierssen et al. Reduzierte man die Proben auf solche, die von Patienten jünger fünf Jahren stammten, so ergab sich für EV eine Prävalenz von 5 % (5/100) und für HPeV von 2 % (2/100). Von den 349 Liquorproben wurde jeweils eine positiv auf HSV-1 bzw. VZV getestet. Das ergab, bezogen auf 327 Patienten, eine Prävalenz von jeweils 0,3 % (1/327); HSV-2 und CMV wurden nicht nachgewiesen. Ko-Infektionen wurden ebenfalls nicht nachgewiesen.

### 5.3 Patientencharakteristika

#### 5.3.1 Zeitintervall zwischen dem Beginn zentralnervöser Symptome und der Lumbalpunktion

Das Zeitintervall zwischen der Lumbalpunktion und dem Symptombeginn konnte, mit Ausnahme der HSV-positiven Probe, für alle positiven Liquorproben ermittelt werden. Insgesamt ergab sich ein Mittelwert von 1 Tag, eine Spannweite von 0 bis 7 Tagen und ein Median von 0 Tagen. Die Zuordnung des Zeitintervalls zu den einzelnen Patienten ergab folgende Verteilung: Die HPeV-positiven Kinder wurden zwei bzw. sieben Tage nach Auftreten der ersten zentralnervösen Symptome punktiert (Anm.: Im zweiten Fall fand an Tag 7 eine zweite Liquorgewinnung statt, da das Material der ersten Lumbalpunktion nicht mehr zur Verfügung stand). Acht der 14 Kinder, bei denen man Enterovirus-RNA im Liquor detektierte, wurden am Tag des Symptombeginns punktiert. Den Liquor der übrigen sechs Kinder entnahm man einen Tag später. Daten zu Liquorverlaufskontrollen fehlen. Das Kind mit der Varizella-Zoster-Virus-positiven Liquorprobe wurde am Tag der ersten motorischen Auffälligkeiten punktiert.

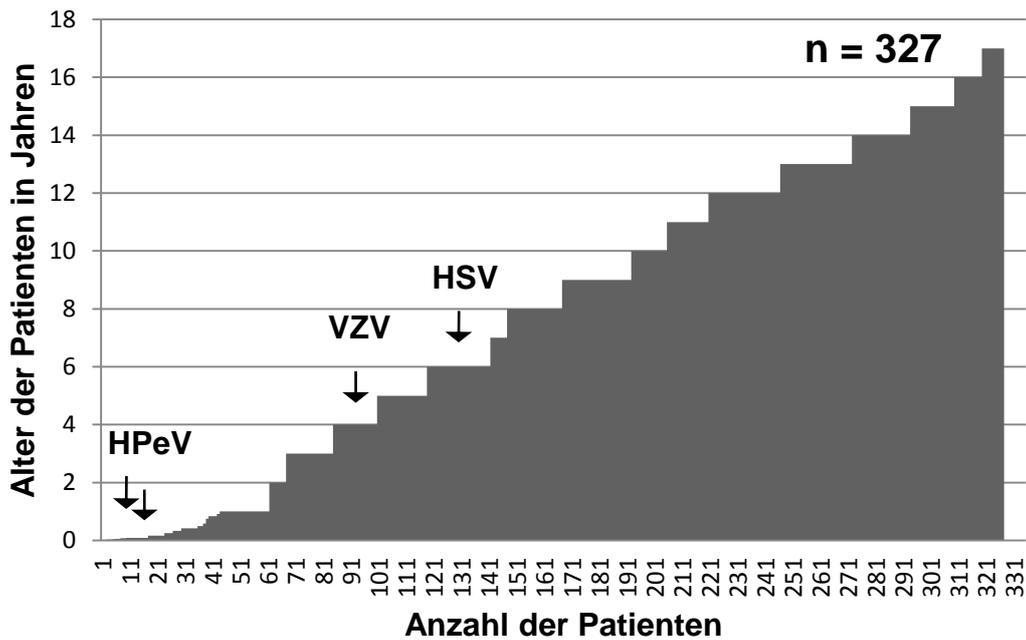
#### 5.3.2 Altersstruktur der Patienten-Kohorte

Bei den unter 15-jährigen waren alle Altersstufen weitgehend gleichmäßig vertreten. Die Gruppe der Kinder  $\leq 4$  Jahren bestand aus 100 Patienten, die der 5–9-jährigen Kinder aus 92, die der 10-14-jährigen Kinder aus 101 Patienten und die der 15-17-jährigen Kinder aus 34 Patienten. Der Mittelwert betrug 7,9 Jahre, der Median 8 Jahre und die Spannweite 8 Tage bis 17 Jahre.

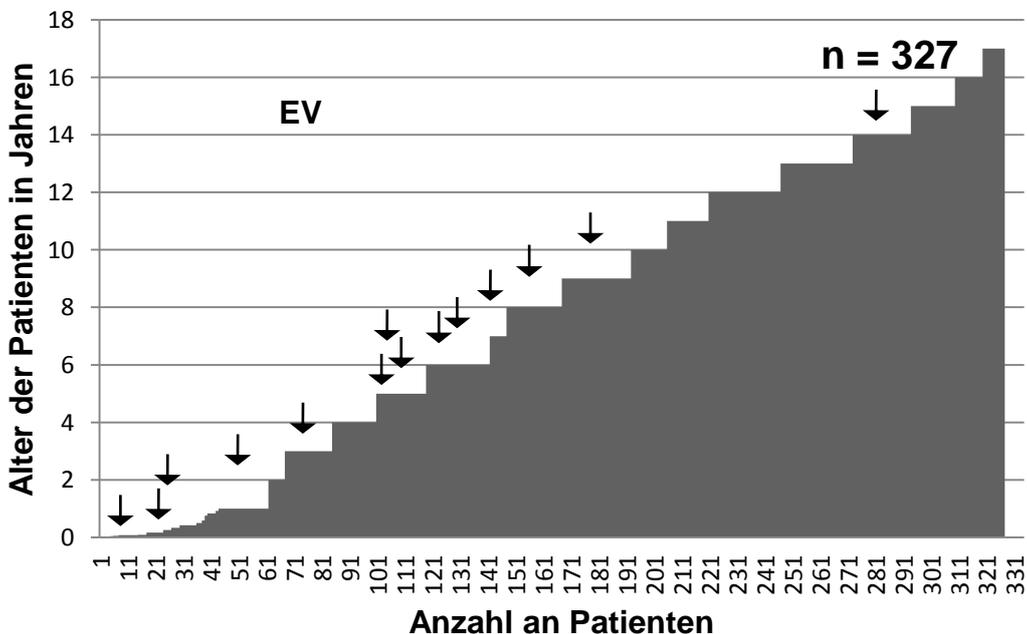
Die HPeV-positiv getesteten Proben stammten von einem Neugeborenen und einem Säugling von 6 Wochen.

Für die EV-positiven Patienten ergab sich bezüglich ihres Alters ein Mittelwert von 5 Jahren, ein Median von 5 Jahren und eine Spannweite von einem Monat bis 14 Jahren. Fünf der für EV-positiven Patienten gehörten zur Gruppe der Kinder  $\leq 4$  Jahren (5 %; 5/100), acht zur Gruppe der 5–9-jährigen Kinder (8,6 %; 8/92) und ein Patient zur Gruppe der 10-14-jährigen Kinder (1 %; 1/101). Somit war die Prävalenz mit 8,6 % bei der Gruppe 5–9-jährigen Kinder am höchsten.

Der VZV-positive Patient war 4 Jahre alt, der HSV-1-positive war 6 Jahre alt.



**Abb. 5:** Dargestellt ist die Altersstruktur der Patienten-Kohorte (Balken). Die Höhe der Balken entspricht dem Alter in Jahren, die Breite der jeweiligen Anzahl an Patienten diesen Alters. Ein Pfeil entspricht jeweils einem Patienten, bei dem HPeV, VZV oder HSV (entsprechend der Beschriftung, HPeV steht für beide Pfeile) nachgewiesen wurde. Ihre Spitze deutet auf des entsprechende Alter des Patienten.



**Abb. 6:** Dargestellt ist die Altersstruktur der Patienten-Kohorte (Balken). Die Höhe der Balken entspricht dem Alter in Jahren, die Breite der jeweiligen Anzahl an Patienten diesen Alters. Ein Pfeil entspricht jeweils einem für EV positiven Patienten. Ihre Spitze deutet auf das Alter des entsprechende Patienten.

### 5.3.3 Geschlechterverhältnis

Einige Viren werden vermehrt bei Angehörigen eines Geschlechts gefunden. Ein Beispiel hierfür sind Coxsackieviren aus dem Genus Enterovirus, die überwiegend bei Jungen detektiert werden. Bei den HPeV-positiven Patienten handelte es sich um ein Mädchen und einen Jungen. Um ein mögliches ungleiches Geschlechterverhältnis der EV-positiven Patienten herauszuarbeiten, wurde der Anteil an männlichen bzw. weiblichen Patienten an der Gesamtheit der Patienten mit dem Anteil EV-positiver, männlicher bzw. weiblicher Patienten an der Gesamtzahl der für EV positiven Patienten verglichen. Insgesamt waren 148/327 (45,3 %) Patienten weiblich und 179/327 (54,7 %) Patienten männlich. Die 14 positiven EV-Nachweise verteilten sich auf 5 weibliche und 9 männliche Patienten. Mit dem Exakten Fischer-Test wurde ein p-Wert von 0,59 errechnet, sodass es in der vorliegenden Studie keinen Hinweis für ein signifikant häufigeres Auftreten von EV-Infektionen bei Patienten eines bestimmten Geschlechts gibt.

**Tab. 35:** Geschlechterverhältnis EV-positiver Patienten

	<b>gesamt (Anteil in %)</b>	<b>EV-positiv (Anteil in %)</b>
<b>weibliche Patienten</b>	148/327 (45,3)	5/14 (35,7)
<b>männliche Patienten</b>	179/327 (54,7)	9/14 (64,3)

Die Patienten mit nachgewiesener zentralnervöser HSV- bzw. VZV-Infektion waren Jungen.

### 5.3.4 Jährliche und saisonale Verteilung von Patienten mit positivem Virusnachweis

Für viele Virusinfektionen ist eine sogenannte Saisonalität bekannt, d.h. sie treten in bestimmten Jahreszeiten gehäuft auf. In den gemäßigten Breiten verzeichnet man eine deutlich Zunahme der EV-Infektionen in der warmen Jahreszeit. Auch werden einige Viren nicht jedes Jahr in gleicher Häufigkeit detektiert. Um entsprechende Muster im Auftreten von HPeV, EV, HSV und VZV in den Bonner Liquorproben zu finden, wurden die Häufigkeiten der Infektionen mit den jeweiligen Viren pro Monat und pro Jahr ermittelt und miteinander verglichen.

Die Anzahl an Patienten pro Jahr, bei denen HPeV, EV, HSV oder VZV im Liquor nachgewiesen werden konnte, variierte stark. Alle folgenden Werte beziehen sich auf die Anzahl von 327 Patienten.

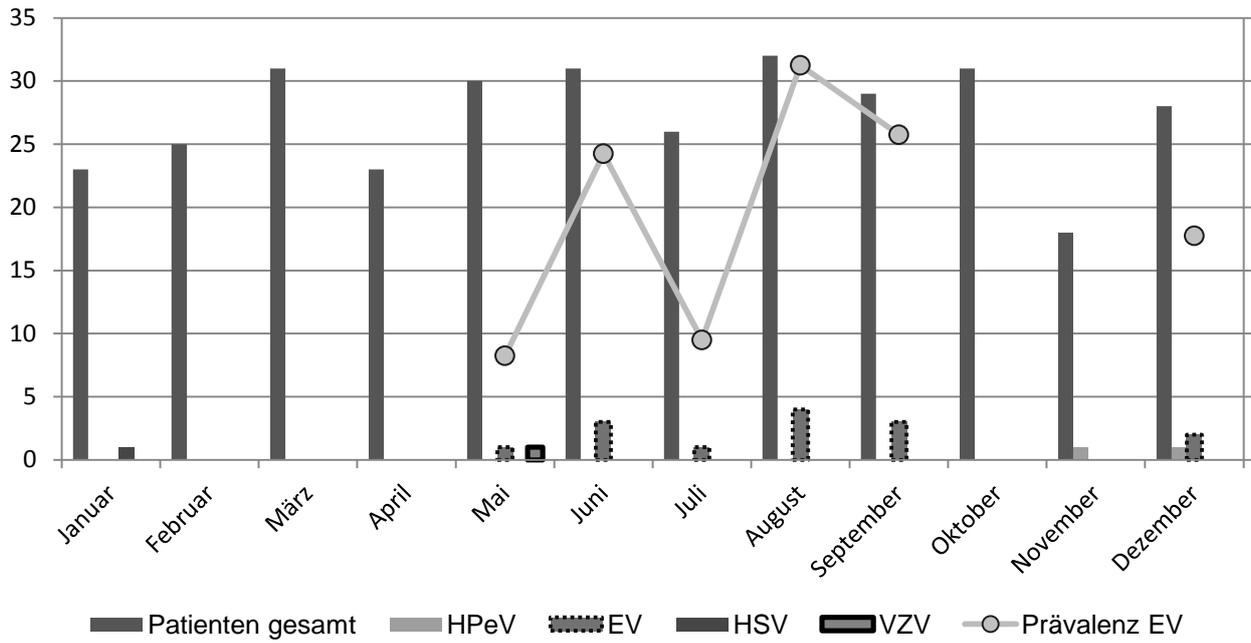
Die HPeV-positiven Liquores stammten beide aus dem Jahr 2008.

2001, 2002 und 2005 wurde EV im Liquor von jeweils einem Patienten detektiert, 2007 in zwei und 2000, 2004 und 2003 im Liquor von drei Patienten. Wie Tabelle 36 zu entnehmen ist, war in den Jahren 1998, 1999, 2003 und 2006 keine Liquorprobe positiv für EV. Allerdings standen aus dem Jahr 1998 nur noch die Liquorproben der Monate Januar bis April und aus dem Jahr 1999 lediglich die Proben der Monate Mai bis September zur Verfügung. Die Prävalenz schwankte für EV zwischen 2,9 % im Jahr 2005 und 12 % im Jahr 2004. HSV konnte bei einem Patienten im Jahr 2008 detektiert werden, VZV wurde einmal im Jahr 2007 nachgewiesen.

**Tab. 36:** Nach Jahren aufgeschlüsselte Anzahl der untersuchten Patienten bzw. Anzahl der Patienten mit positivem Virus-RNA- bzw. DNA-Nachweis (Anteil in Prozent)

Jahr	Patienten, n=	HPeV, n= (%)	EV, n= (%)	HSV, n= (%)	VZV, n= (%)
1998	11	0	0	0	0
1999	12	0	0	0	0
2000	27	0	3 (11,1 %)	0	0
2001	27	0	1 (3,7 %)	0	0
2002	31	0	1 (3,2 %)	0	0
2003	23	0	0	0	0
2004	24	0	3 (12,5 %)	0	0
2005	34	0	1 (2,9 %)	0	0
2006	42	0	0	0	0
2007	47	0	2 (4,3 %)	0	1 (2,1 %)
2008	49	2 (4,1 %)	3 (6,1 %)	1 (2 %)	0
Gesamt	327	2 (0,6 %)	14 (4,3 %)	1 (0,3 %)	1 (0,3 %)

Die saisonale Verteilung viraler ZNS-Infektion mit HPeV, EV, HSV oder VZV gibt Abbildung 7 wieder. Die für HPeV positiven Liquorproben stammten aus den Monaten Oktober und November. EV konnte von 1998 bis 2008 jeweils einmal im Mai und Juli, zweimal im Dezember und dreimal im Juni und September und viermal im August detektiert werden. Nicht detektiert wurde es von Januar bis April und im Oktober und November. Es zeigte sich eine Häufung der Nachweise in den Sommermonaten. HSV wurde im Januar einmalig im Liquor detektiert, VZV einmalig im Mai.



**Abb. 7:** Es werden die Anzahl an Detektionen von HPeV, EV, HSV und VZV sowie die Prävalenz von EV im Liquor pro Monat dargestellt. Die Werte der Jahre 1998 bis 2008 wurden hierfür zusammengefasst. Die Höhe der Balken entspricht der absoluten Anzahl an untersuchten Patienten in einem Monat, die Punkte geben die Prävalenz von EV-positiven Patienten in einem Monat an.

#### 5.4 Genotypen-Verteilung, RNA-Konzentration und Fallstudien von Patienten mit Parechovirus-positiven Befunden

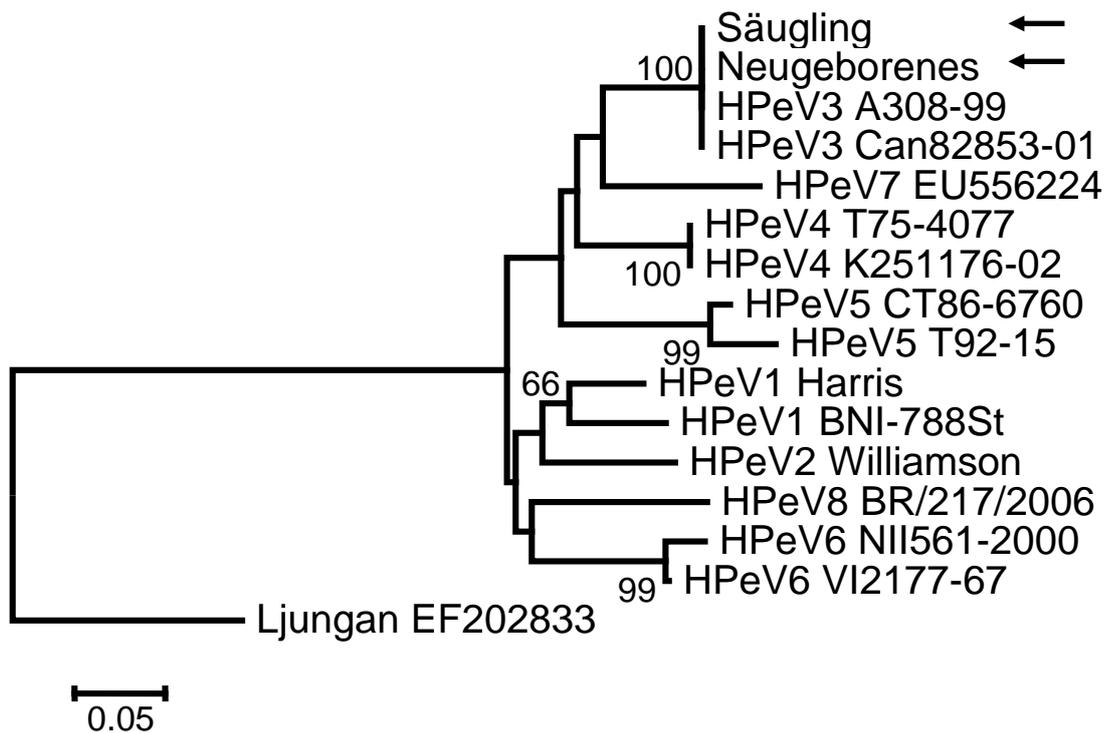
In 2/327 (0,6%) Liquorproben konnte HPeV nachgewiesen werden. Bei den Patienten handelte es sich um ein weibliches Neugeborenes und einen sechs Wochen alten männlichen Säugling. Klinische Daten wurden anhand der Arztbriefe erhoben. Neben dem Liquor standen von dem Neugeborenen zwei Stuhlproben, von dem Säugling Stuhlproben, Nasen-Rachenabstriche und Serum zur Verfügung. Diese Proben wurden ebenfalls auf das Vorhandensein von HPeV getestet und im positiven Fall wurde die RNA-Konzentration bestimmt.

##### 5.4.1 Humanes Parechovirus-Genotypisierung

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung und experimentellen Arbeiten waren insgesamt acht HPeV-Typen bekannt. Zur Typisierung von HPeV-positiven Proben wurde die VP1-Region des viralen Genoms mittels einer nested RT-PCR nach Harvala et al. amplifiziert und das Produkt in beiden Orientierungen sequenziert (Harvala et al., 2008). Als Ausgangspunkte für die Sequenzierung fungierten Sense- und Antisense-Primer der zweiten PCR-Runde (siehe auch Abschnitt 4.2.9).

Das VP1 ist das größte von der Oberfläche her zugängliche Kapsid-Protein im reifen Picornavirus-Virion und trägt viele antigenetische Eigenschaften (Oberste et al., 1999b). Es wurde bereits erfolgreich zur EV-Genotypisierung eingesetzt und fand später auch bei der Identifikation und Klassifizierung von HPeV Anwendung (Al-Sunaidi et al., 2007; Oberste et al., 1999b).

Die phylogenetische Analyse mit der Aminosäure-Sequenz des VP1 ergab, dass es sich bei beiden in den Bonner Liquores nachgewiesenen HPeV um den Subtyp 3 handelte.



**Abb. 8:** Der dargestellte Stammbaum basiert auf Aminosäuresequenzen aus dem VP1 repräsentativer HPeV-Stämme und den in den Patientenproben (Säugling und Neugeborenes) nachgewiesenen (letztere mit einem Pfeil gekennzeichnet). Diese werden anhand des Stammbaums als HPeV Typ 3 klassifiziert. Die Armlängen sind maßstabsgetreu der evolutionären Distanz entsprechend dargestellt. Die Phylogenese wurde anhand der Neighbour-joining Methode mit MEGA Version 4.0 erstellt (Saitou und Nei, 1987; Tamura et al., 2007). Die Zahlen an den Knotenpunkten entsprechen Prozentwerten, die durch eine Bootstrap-Analyse aus 1000 Datensätzen ermittelt wurden (Felsenstein, 1988).

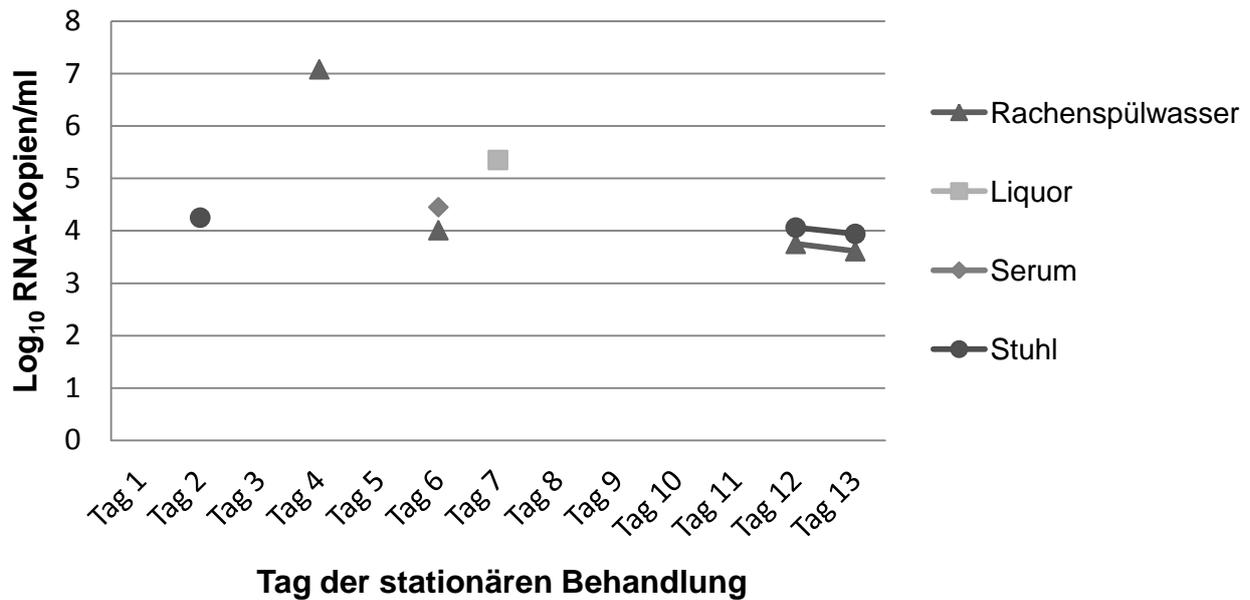
Im Bereich des Übergangs zwischen VP1 und 2A findet sich ein sogenanntes RGD-Motiv, wobei RGD für die Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat steht. Dieses Element scheint entscheidend für die Adsorption und Penetration von Picornaviren in die Wirtszelle zu sein und spielt eine essentielle Rolle für die Infektiosität des HPeV1 (Boonyakiat et al., 2001; Joki-Korpela et al., 2000). Bei den beiden HPeV-Subtypen 3 und 8 fehlt es jedoch (de Souza Luna et al., 2008; Drexler et al., 2009). Um dieses für die HPeV3 der Bonner Proben zu bestätigen, wurde ein Fragment, das das komplette VP1 sowie den Übergang zu 2A erfasst, amplifiziert und im Anschluss daran sequenziert. Das RGD-Motiv fehlte in beiden HPeV3-positiven Proben.

**Tab. 37:** Dargestellt ist ein Alignment der C-terminalen Region des VP1-Proteins der Referenzstämme der HPeV-Subtypen 1–6 sowie der in den Bonner Proben detektierten HPeV3 (fettgedruckt). Dem HPeV3-Referenzstamm sowie den in Bonner Proben detektierten HPeV3 fehlt das RGD-Motiv (siehe umrandeter Bereich). Alignment des C-Terminus des VP1-Protein, Darstellung modifiziert nach Benschop et al. (Benschop et al., 2008b)

HPeV1	P A P K - - - V T S S R A L	<b>R G D</b>	M A N L T N Q S P
HPeV2	P A P K - - - P A T - R K Y	<b>R G D</b>	L A T W S D Q S P
HPeV3	P A P K - - - P T G S R A -	- - -	- - A L S D E S P
<u>Säugling</u>	<b>P A P K - - - P T G S G A -</b>	- - -	- <b>A A L Y D E S P</b>
<u>Neugeborenes</u>	<b>P A P K - - - P T G S G A -</b>	- - -	- <b>A A L Y D E S P</b>
HPeV4	P A P K - - - P A T S R A L	R G D	M A N F S D Q S L
HPeV5	P A P K - - - E K T S R A L	R G D	L A N F I D Q S P
HPeV6	P A P K N T P R S Q S R A L	R G D	M A N L T N Q S P

#### 5.4.2 Humanes Parechovirus-RNA-Konzentration

Weiterhin wurde die virale RNA-Konzentration in den Proben bestimmt. Von dem Säugling standen mehrere Nasen-Rachen-Abstriche aus insgesamt zehn Tagen und mehrere Stuhlproben aus zwölf Behandlungstagen zur Verfügung. Hinzu kamen eine Liquorprobe, die am siebten Tag der Behandlung entnommen wurde, sowie eine Serumprobe des sechsten Tages. Die höchste RNA-Konzentration mit  $1,2 \times 10^7$  Kopien/ml wurde im Nasen-Rachen-Abstrich am vierten Behandlungstag gemessen. Insgesamt konnte HPeV3 in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Auch in den Stuhlproben war über den gesamten Zeitraum HPeV-RNA nachweisbar. Im Liquor fand sich am siebten Tag nach Auftreten der Symptome eine RNA-Konzentration von  $2,2 \times 10^5$  Kopien/ml. Im Serum wurden sechs Tage nach stationärer Aufnahme  $2,8 \times 10^4$  RNA-Kopien/ml gemessen, der Patient war somit am siebten Tag nach Beginn der Symptomatik noch virämisch.



**Abb. 9:** Darstellung der Konzentration viraler RNA-Kopien (als Log<sub>10</sub> RNA-Kopien/ml) in den HPeV3-positiven Untersuchungsproben des Säuglings und deren Entwicklung im Verlauf des stationären Aufenthalts.

Vom Neugeborenen waren eine Liquorprobe sowie zwei Stuhlproben verfügbar. Im Liquor, der zwei Tage nach Auftreten der ersten Symptome, gewonnen wurde, konnten  $2,5 \times 10^4$  RNA-Kopien/ml gemessen werden. In einer der Stuhlproben wurden  $3,3 \times 10^3$  RNA-Kopien gemessen, in der anderen erfolgte kein Nachweis von Virus-RNA.

### 5.4.3 Fallstudie eins

Ein fünf Wochen alter, männlicher Säugling wurde wegen seit dem Morgen bestehender Hypothermie von 34 °C, Trinkschwäche und trockener Lippen stationär vorgestellt. Es handelte sich um ein ehemaliges Frühgeborenes der 33. Schwangerschaftswoche mit respiratorischen Anpassungsstörungen in den ersten drei Lebenstagen und einer bekannten peripheren Pulmonalisstenose.

Zum Zeitpunkt der Aufnahme litten die Mutter und die vierjährige Schwester an einer Infektion der oberen Atemwege. Darüber hinaus hatte der Säugling Kontakt mit einer an Scharlach erkrankten Person. Bei der stationären Aufnahme präsentierte er sich in einem reduzierten Allgemeinzustand und guten Ernährungszustand. Der Hautturgor war vermindert, die Rekapillarisierungszeit lag bei drei Sekunden und die Fontanelle war leicht eingesunken. Des Weiteren hatten sich am Rücken und in den Axillae flächige Rötungen gebildet. Der übrige körperliche und neurologische Untersuchungsbefund blieb unauffällig. Die am Aufnahmetag abgenommenen Blutkulturen zeigten kein Bakterienwachstum.

Im Verlauf war die Symptomatik progredient, sodass der Säugling mit einer Hypothermie von minimal 33,8 °C, muskulärer Hypotonie, fehlender Spontanmotorik und periodischer Atmung auf die Intensivstation verlegt wurde. In einer Liquorprobe konnte mittels PCR weder HSV-DNA nachgewiesen werden, noch zeigte sich in der Liquor-Kultur ein Bakterienwachstum. Es wurde eine intravenösen antibiotische Therapie mit Ampicillin plus Sulbactam und Clindamycin, sowie eine antivirale Therapie mit Aciclovir begonnen. Bei Bekanntgabe des negativen HSV-PCR-Ergebnis wurde das Aciclovir nach zwei Tagen wieder abgesetzt.

Am zweiten Tag erfolgte nach rezidivierenden Apnoephasen und Kreislaufinsuffizienz die Intubation und Beatmung sowie eine Katecholamin- und Volumensubstitution. Zusätzlich wurde die antibiotische Therapie um Erythromycin erweitert. Die sich im weiteren Verlauf entwickelnden generalisierten Ödeme waren unter der Gabe von Furosemid rückläufig.

Mittels real-time PCR-Verfahren wurde Rachenspülwasser auf Influenzavirus, Parainfluenzavirus 1 und 2, Coronavirus NL63, 229E und OC43, Rhinovirus, Adenoviren, Humanes Metapneumovirus und Enteroviren hin untersucht. Stuhl wurde auf Adeno-, Astro-, Noro-, und Rotaviren sowie Liquor auf EV und Urin auf CMV getestet. Alle er-

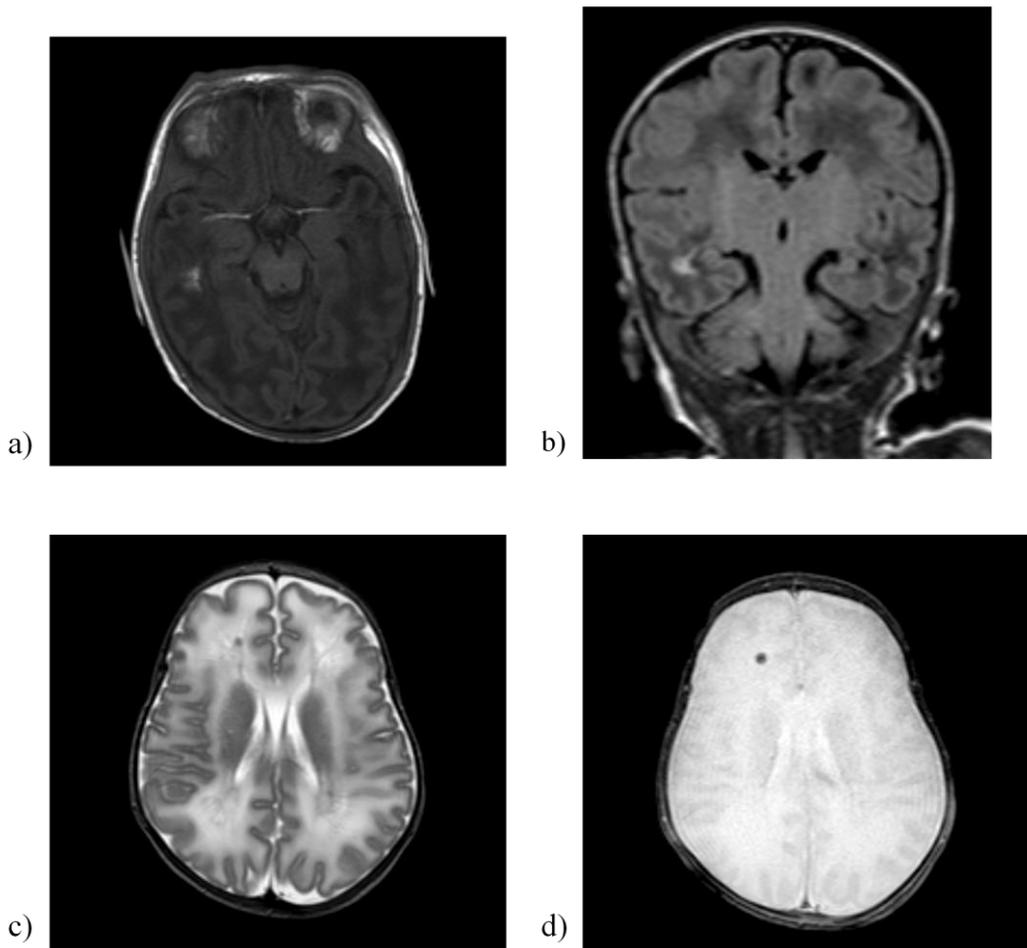
wähnten enterischen, respiratorischen und neurotrophen Viren konnten nicht nachgewiesen werden. Auch Nukleinsäuren von *Bordetella pertussis*- und *parapertussis* wurden im Rachenspülwasser nicht detektiert. Der Zustand des Säuglings stabilisierte sich soweit, dass am fünften Tag auf die Katecholamin-Gabe verzichtet werden konnte. Das Blutbild des folgenden Tages ergab keine pathologisch veränderten Werte hinsichtlich der Leukozyten-Zahl (6800/ $\mu$ l) und des mittleren korpuskulären Volumens (93 fl) sowie erniedrigte Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte (7,9 g/dl und 22,8 %) und eine Thrombozytopenie (64/nl). Das Differentialblutbild zeigte eine Monozytose (18 %). Die Hämatologie bestätigte ein auffälliges Blutbild mit Reizformen und einzelnen lymphoblastären Zellen, sehr wenigen Thrombozyten, eine Anisozytose und Poikilozytose, sodass im Anschluss eine Knochenmarkspunktion durchgeführt wurde. Dessen Befund war mit einer haemophagozytischen Lymphohistiozytose bzw. Sepsis vereinbar. Ein erhöhtes Troponin I im Serum (1,5 ng/ml) legte den Verdacht einer Multiorganbeteiligung nahe.

Am siebten stationären Tag bestand der Verdacht auf eine HPeV-Infektion, sodass wegen fehlenden Materials eine erneute Lumbalpunktion durchgeführt wurde. Proteingehalt, Erythrozyten- und Leukozytenzahl des Liquors waren aufgrund einer artifiziellen Blutung nicht aussagekräftig. Real-Time PCR-Untersuchungen auf HPeV im Blut, Liquor, Rachenspülwasser und Stuhl waren positiv, sodass die Diagnose einer schweren Sepsis im Rahmen einer HPeV-Infektion gestellt wurde. Die Genotypisierung durch Sequenzierung des VP1 zeigte, dass es sich in diesem Fall um eine HPeV-Infektion vom Typ 3 handelte. Die Serumprobe stammte von Tag 6 des stationären Aufenthalts und ließ auf eine Virämie, sieben Tage nach Beginn der Symptomatik, schließen. Die Liquorprobe war nur einen Tag später entnommen worden. Im Rachenspülwasser war HPeV für 10 Tage nachweisbar, Virusausscheidungen im Stuhl konnten über 12 Tage gemessen werden (siehe Abbildung 9).

Bei zunehmender klinischer Verbesserung erfolgte am achten Tag der stationären Behandlung die komplikationslose Extubation, die Vitalparameter zeigten sich allzeit stabil. In einer am 12. Tag durchgeführten Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) imponierten kleine, lokale Blutungen rechts-frontal sowie rechts-temporal und eine postentzündliche Läsion links-frontal (Abbildung 10). Weiterhin zeigte sich eine diffuse Signalintensitäts-

erhöhung des frontalen und occipitalen Marklagers ohne sonstigen Hinweis auf eine stattgehabte Hypoxie.

Am folgenden Tag konnte der Säugling auf eine periphere Station verlegt werden. Zu keiner Zeit der intensivmedizinischen Behandlung waren die laborchemischen Entzündungsparameter pathologisch verändert. Die empfohlene Wiedervorstellung zur Verlaufsbeobachtung fand nicht statt.



**Abb. 10:** Die Abbildung zeigt einzelne Bildebenen einer MRT des Hirns, die am 12. Tag nach Symptombeginn durchgeführt wurde. a) T1-gewichtete Aufnahme mit Kontrastmittel in der Transversalebene. b) FLAIR-Aufnahme in der Koronarebene. a+b) Ein rechts-temporales, entzündliches Residuum ist als Kontrastmittelanreicherung bzw. Signalintensitätserhöhung zu erkennen. c) T2-gewichtete Aufnahme in transversaler Schnittebene. Die Signalintensität ist im frontalen und occipitalen Marklager diffus erhöht. d) T2-gewichtete Aufnahme in Fast-Feld-Echo-Sequenz und transversaler Schnittebene. Rechts frontal ist eine Blutung als umschriebene Signalintensitätsminderung erkennbar.

#### 5.4.4 Fallstudie zwei

Ein sieben Tage altes, weibliches Neugeborenes wurde wegen Unruhe, Trinkschwäche und erhöhten Temperaturen bis 38,5°C vorgestellt. Das Kind war in der 40. Schwangerschaftswoche spontan geboren worden. Während der Schwangerschaft und postpartal traten keine Auffälligkeiten auf.

Anamnestisch ergab sich kein Hinweis darauf, dass das Neugeborene Kontakt zu Personen hatte, die an einer Infektionskrankheit litten.

Bei Aufnahme präsentierte es sich unruhig, in reduziertem Allgemeinzustand und normalem Ernährungszustand. Der körperliche und neurologische Untersuchungsbefund blieb unauffällig. Die Temperatur lag bei 38,4°C. Bei leicht erhöhtem Interleukin 6 (125 pg/ml), normalen Werten C-reaktiven Proteins (CRP) und Fieber wurde bei Verdacht auf eine bakterielle Infektion mit einer intravenösen antibiotischen Therapie mit Ampicillin und Cefotaxim sowie einer Infusionstherapie begonnen. Bedarfsweise wurde das Fieber medikamentös gesenkt.

Am ersten stationären Tag besserte sich der Allgemeinzustand, die körperliche Untersuchung zeigte weiterhin kein septisches oder meningeales Bild, das CRP blieb negativ. Aufgrund des geringen Lebensalters wurde das Neugeborene auf die Intensivstation verlegt.

In der zweiten Nacht verschlechterte sich der Zustand und es traten rezidivierende Apnoe-Phasen und generalisierte, tonisch-klonische Krämpfe auf. Es folgten Intubation, Beatmung und Lumbalpunktion, die hinsichtlich Zellzahl, Eiweiß- und Glucosekonzentrationen normale Befunde zeigte. In der Schädel-Sonographie imponierte eine verwaschene Gyrierung, Echogenitätserhöhung im Marklager beidseits sowie eine Hyperämie. Die Röntgen-Thorax-Aufnahme zeigte Belüftungsstörungen der Lunge. Mit dem Verdacht auf eine Meningoenzephalitis wurde die antibiotische Therapie um Refobacin erweitert und mit der intravenösen Gabe von Aciclovir begonnen. Trotz einer Sedierung mit Midazolam kam es zu wiederholten Krampfanfällen, die unter einer Narkose mit Thiopental-Natrium sistierten.

Im Verlauf des dritten stationären Tages traten wiederholt fokale, tonisch-klonische, rechtsbetonte Krampfanfälle auf, die teils spontan, teils nach Phenobarbital-Gabe sistierten. Entsprechende Veränderungen waren im Elektro-Enzephalogramm (EEG) zu sehen. Eine Vitamin B6-abhängige Epilepsie konnte durch dreimalige Gabe von Vitamin

B6 und Folsäure ausgeschlossen werden. Unter der Sedierung und der Thiopental-Gabe wurde das Neugeborene catecholaminpflichtig. Generalisierte Ödeme wurden mit Furosemid behandelt.

In der am fünften Tag nach Aufnahme durchgeführten MRT demarkierten sich ausgedehnte Grenzzoneninfarkte beidseits (Abbildung 11). Krampfanfälle traten nicht mehr auf und das EEG normalisierte sich. Es erfolgte die komplikationslose Extubation.

Die zur Suche eines Infektionsfokus durchgeführten Untersuchungen blieben ohne Ergebnis: sowohl Rachen- und Rektum-Abstriche und ein Abstrich der Tubusspitze als auch Blut- und Liquor-Kulturen zeigten kein Bakterienwachstum. Die Urinkultur wies *Enterococcus spp.* in niedriger Keimzahl nach. Anhand molekularbiologischer Untersuchungen wurde Stuhl auf EV und Rotavirus, Liquor auf Enteroviren und HSV-1 und -2, Urin auf CMV und Serum auf EV negativ getestet. Eine akute Infektion mit CMV, Epstein-Barr Virus (EBV), Humanem Herpesvirus 6, 7, HSV, Rubellavirus, *Toxoplasma spp.* oder *Treponema pallidum* konnte ausgeschlossen werden. Auch die laborchemischen Entzündungsparameter blieben weitgehend unauffällig.

Die antivirale Therapie mit Aciclovir wurde beendet, die antibiotische Therapie auf die intravenöse Gabe von Cefotaxim für insgesamt 10 Tage reduziert.

Die kernspintomographische Verlaufskontrolle am zehnten Tag nach Aufnahme zeigte deutliche paraventriculäre Marklagerläsionen mit beginnender Schrankenstörung und einer Parenchymdestruktion. Der Befund legte den Verdacht einer ischämischen Genese nahe, da der radiologische Verlauf für eine infektiöse oder stoffwechselbedingte Genese eher untypisch war. Der Zeitpunkt der Schädigung wurde auf einen Tag vor Aufnahme geschätzt.

Als Ursache für die Schädigung wurde zu diesem Zeitpunkt der Behandlung ein akuter Abfall des zerebralen Blutflusses im Rahmen eines protrahierten Krampfanfalls, einer supraventriculären Tachykardie oder einem Apparently Life Threatening Event (ALTE) diskutiert, da die kardiologische Diagnostik unauffällig war und es laborchemisch keinen Hinweis auf eine Stoffwechselerkrankung oder Thrombophilie gab.

Im weiteren Verlauf normalisierten sich Trinkverhalten, Nahrungsaufbau und körperlicher Untersuchungsbefund wieder.

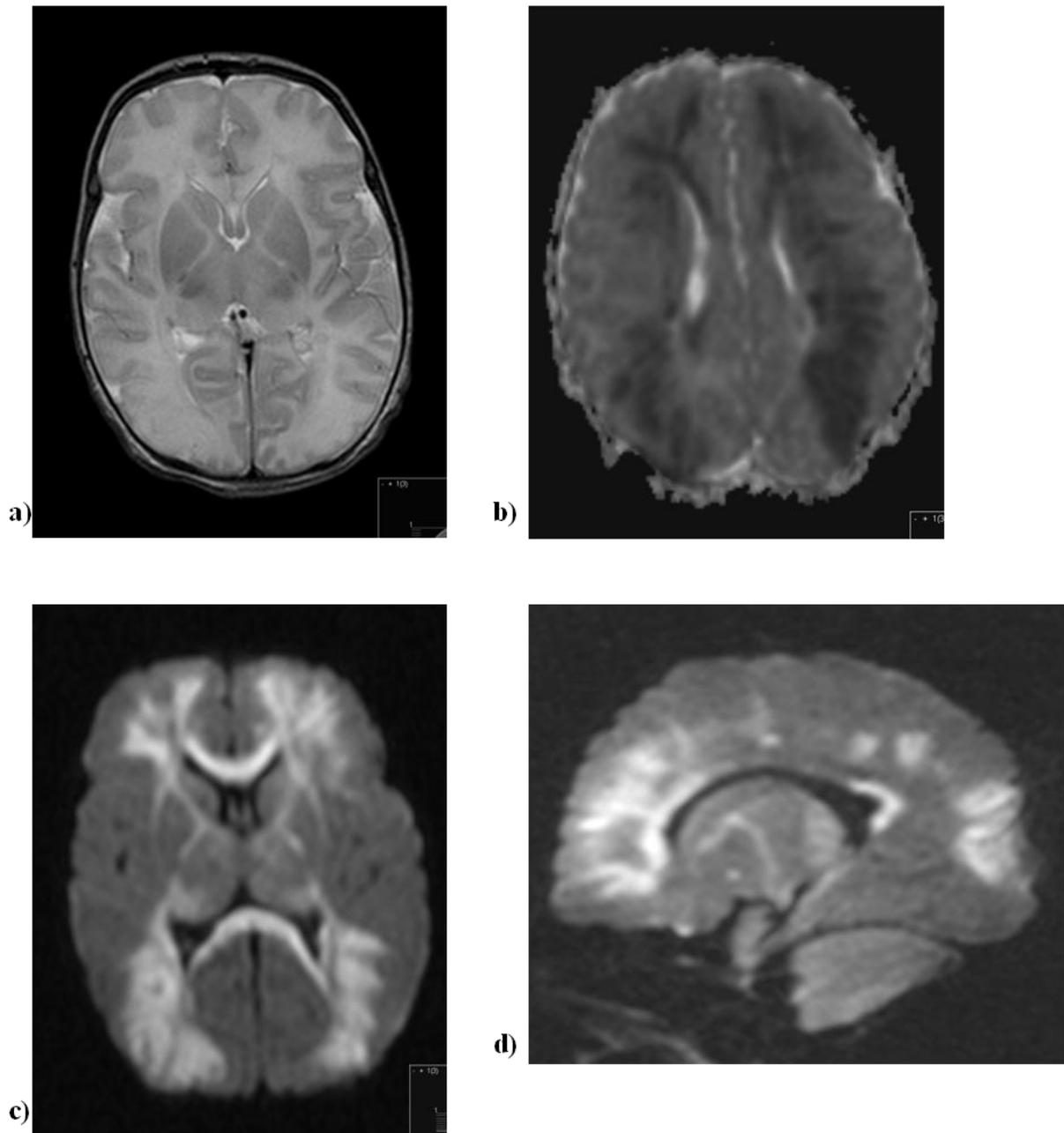
Erst nach Entlassung kam der Verdacht einer neonatalen Enzephalitis mit zerebralen Krampfanfällen im Rahmen einer Infektion mit HPeV auf. Durch eine Real-time PCR

Untersuchung von zwei Stuhlproben, der Zeitpunkt der Entnahme ist unbekannt, und einer Liquorprobe, diese wurde zwei Tage nach Symptombeginn entnommen, auf HPeV wurde die Vermutung bestätigt. Die Genotypisierung durch Sequenzierung des VP1 zeigte, dass es sich in diesem Fall um eine HPeV3-Infektion handelte.

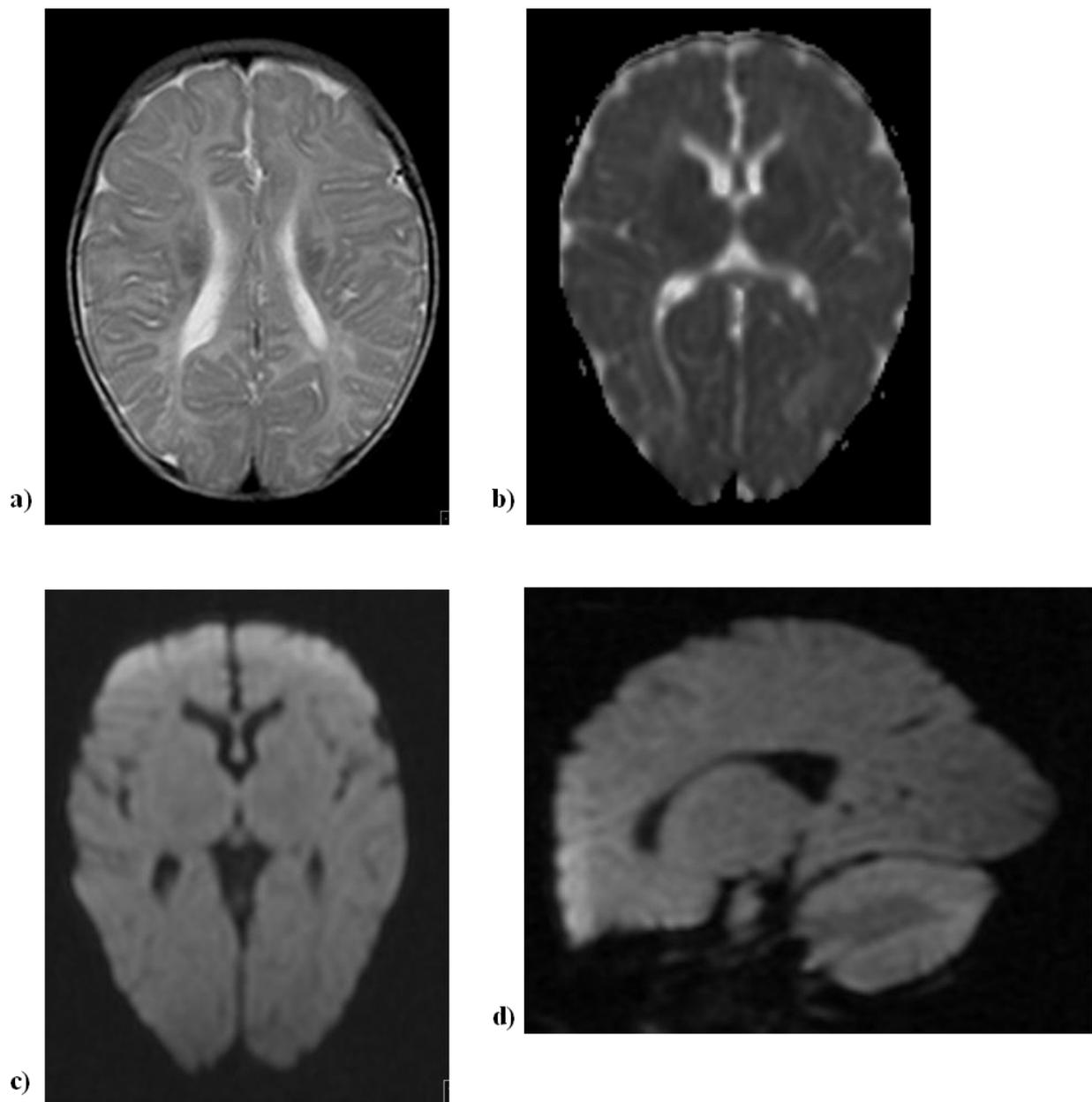
Sechs Wochen nach Entlassung war der Säugling zu einer Kontrolluntersuchung einbestellt worden. Außer einem kleinen Kopfumfang, der auf eine genetische Disposition zurückgeführt wird, waren körperlicher und neurologischer ebenso wie der sonographische Untersuchungsbefund des Schädels unauffällig.

Die im Alter von viereinhalb Monaten durchgeführte MRT-Kontrolle zeigte Residuen der ausgeprägten Marklagerveränderungen in beiden Großhirnhemisphären, am ehesten im Sinne einer Narbenbildung, sowie eine verzögerte Myelinisierung (Abbildung 12). Für eine floride Entzündung bestand kein Anhalt mehr und die arteriellen sowie venösen Gefäße waren offen. Das zur gleichen Zeit durchgeführte EEG entsprach einem normalen Wach- bzw. Einschlaf-EEG.

Im Alter von zehn Monaten entsprach die psychomotorische Entwicklung weiterhin dem Altersdurchschnitt.



**Abb. 11:** Die Abbildung gibt einzelne Schichten einer MRT des Hirns fünf Tage nach Symptombeginn wieder. a) T2-gewichtete Aufnahme in der Transversalebene. Es fallen eine beidseitige Signalanhebung im Marklager sowie eine aufgehobene Mark-Rinden-Differenzierung beidseits occipital auf. b) ADC (apparent diffusion coefficient)-Berechnung in der Transversalebene. Korrespondierend zur Signalanhebung in den diffusionsgewichteten Aufnahmen zeigt sich hier eine Signalarmut. c) Diffusionsgewichtete Aufnahme in der Transversalebene. d) Diffusionsgewichtete Aufnahme in der Sagittalebene. c+d) Auffällig sind die als Signalanhebung erkennbaren ausgedehnten Diffusionsstörungen beidseits hochfrontal im Marklager, parallel der Mantelkante im Marklager, im Bereich des Balkens sowie der Capsula interna und externa und occipital sowohl im Marklager als auch im Rindenbereich.



**Abb. 12:** Die Abbildung zeigt einzelne Schichten eines MRT des Hirns ca. 4 Monate nach Symptombeginn. a) T2-gewichtete Aufnahme in der Transversalebene. Es zeigt sich eine verzögerte Myelinisierung im Marklager beider Großhirnhemisphären in den Bereichen, die in den Voraufnahmen die ausgeprägten Diffusionsstörungen gezeigt haben. b) ADC (apparent diffusion coefficient)-Berechnung in der Transversalebene. c) Diffusions-gewichtete Aufnahme in der Transversalebene. d) Diffusions-gewichtete Aufnahme in der Sagittalebene. b-d) Es sind keine Diffusionsstörungen mehr erkennbar.

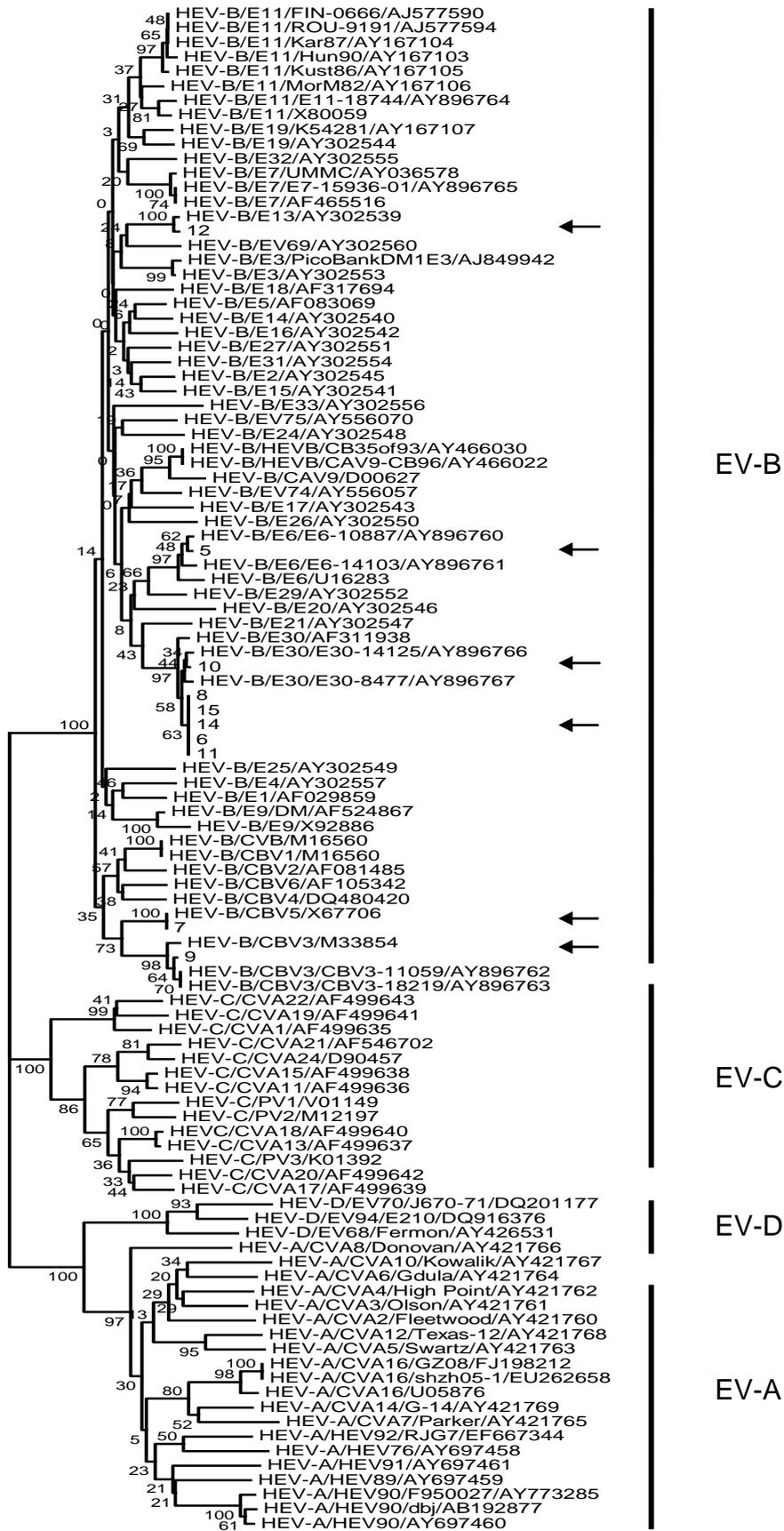
## 5.5 Genotypen, RNA-Konzentration und Klinik der Enterovirus-Infektionen

Humane Enteroviren gehören zu den häufigsten Erregern der viralen Meningitis und Enzephalitis im Kindesalter. Um das Vorkommen von humanpathogenen Enteroviren in den 349 Liquorproben zu überprüfen, wurden sie mit zwei Real-time PCR-Verfahren vom sogenannten TaqMan-Format getestet (Dierssen et al., 2008; Verstrepen et al., 2001).

Wie bereits geschildert, konnte mit Hilfe des Verfahren nach Verstrepen et al. in 13 Proben von elf Patienten EV detektiert werden. Zu diesem Ergebnis diskrepant konnten mit dem Assay nach Dierssen et al. 16 positive Proben, die von 14 Patienten stammten, nachgewiesen werden. Die Prävalenz lag bei 3,4 % (11/327 Patienten) bzw. 4,3 % (14/327 Patienten) (siehe Tabelle 36).

### 5.5.1 Typisierung der Enteroviren

Elf der 16 Proben (entsprechen 10 Patienten) konnten erfolgreich mittels Sequenzierung der Region VP2 typisiert werden. Die phylogenetische Untersuchung einer zentralen Aminosäuresequenz des VP 2 (Position 962-1529 bei PV-1) ergab, dass es sich in sechs Fällen um Echovirus 30 und jeweils einmal um Echovirus 6, Echovirus 13, Coxsackievirus B 3 und Coxsackievirus B 5 handelte. Somit gehören alle nachgewiesenen EV zur EV-Spezies B (siehe Abbildung 13). Bei 4 EV-positiven Liquorproben scheiterte die Typisierung. In einem dieser Fälle wies die virologische Diagnostik im Stuhl das Echovirus 30 nach, sodass es sich im Liquor sehr wahrscheinlich auch um das Echovirus 30 handelte. Die Anzahl der Echovirus 30-positiven Fälle würde sich damit auf 7 erhöhen, die Anzahl der nicht sequenzierten Liquorproben auf 3 verringern. Die Patienten mit einer Coxsackievirus-Infektion waren beide männlichen Geschlechts. Bei drei der vier Patienten, die in den Monaten Mai und Juni erkrankten, war das Echovirus 30 der Erreger. Bei dem vierten Patienten, der in diesem Zeitraum erkrankt war, scheiterte die Typisierung.



0.05

**Abb. 13 (vorherige Seite):** Der dargestellte Stammbaum basiert auf Aminosäuresequenzen des VP 2 (die zugrunde liegende Nukleinsäuresequenz besteht aus ca. 350 bp) repräsentativer EV-Stränge und den aus den Patientenproben (gekennzeichnet mit den Nr. 5-15), isolierten Strängen. Diese werden anhand des Stammbaums als Echovirus 30, Echovirus 13, Echovirus 6, Coxsackievirus B 3 und Coxsackievirus B 5 klassifiziert (die Position im Stammbaum wird durch die schwarzen Pfeile gekennzeichnet). Die Armlängen sind maßstabsgetreu der evolutionären Distanz entsprechend dargestellt. Die Phylogenese wurde anhand der Neighbour-joining Methode mit MEGA Version 4.0 erstellt (Saitou und Nei, 1987; Tamura et al., 2007). Die Zahlen an den Knotenpunkten entsprechen Prozentwerten, die durch eine Bootstrap-Analyse aus 1000 Datensätzen ermittelt wurden (Felsenstein, 1988).

**Tab. 38:** RNA-Konzentrationen und Subtypen der Liquorproben mit EV-RNA-Nachweis sowie Zeitpunkt der Probenentnahme. Die Daten der Tabelle sind nach der Menge an RNA-Kopien/ml Liquor, in aufsteigender Reihenfolge, angeordnet (siehe letzte Spalte). In der Spalte, die die Angaben über das Geschlecht der Patienten enthält, steht W für weiblich und M für männlich. Bei Zeilen, die mit gleicher Farbe unterlegt sind, handelt es sich um ein und denselben Patienten. In beiden Fällen bestand ein Abstand von 2 Tagen zwischen der ersten und der zweiten Liquorpunktion, wobei es sich bei der Probe mit der niedrigen Probennummer um die jeweils zuerst entnommene handelt. PCR (+Echo) steht für den PCR-Assay nach Dierssen et al., PCR (EV) steht für den Assay nach Verstrepn et al.. CVB steht für Coxsackie-Virus B, Echo für Echovirus

Probennummer	Typ	Geschlecht	Alter (Jahre)	Eingang	PCR (+Echo)	PCR (EV)	RNA-Kopien/ml Liquor
1	unbekannt	W	5	Juni	positiv	negativ	2338
2	Echo 30 im Stuhl	M	1	September	positiv	positiv	7640
3	unbekannt	W	14	Dezember	positiv	positiv	8250
4	Echo 30 im Stuhl	M	1	September	positiv	positiv	8768
5	Echo 6	W	4 Monate	August	positiv	positiv	10187
6	Echo 30	M	5	August	positiv	positiv	11440
7	CBV5	M	6	Juli	positiv	positiv	14028
8	Echo 30	M	3	Mai	positiv	positiv	19623
9	CBV3	M	1 Monat	August	positiv	positiv	25551
10	Echo 30	W	5	September	positiv	positiv	26052
11	Echo 30	M	9	August	positiv	negativ	35905
12	Echo 13	M	3 Monate	September	positiv	positiv	47261
13	Echo 30	M	6	Juni	positiv	positiv	50100
14	Echo 30	M	6	Juni	positiv	positiv	57365
15	Echo 30	W	7	Juni	positiv	positiv	261355
16	unbekannt	M	8	Dezember	positiv	negativ	885100

### 5.5.2 Enterovirus-RNA-Konzentration der Liquorproben

Auch in den für EV positiven Liquorproben wurde die Anzahl viraler RNA-Kopien bestimmt. Ein in-vitro Transkript des Amplifikats des PCR-Verfahren nach Dierssen et al. wurde durch die virologische Diagnostik zur Verfügung gestellt und die RNA-Konzentration in analoger Weise zur HPeV-RNA-Konzentration bestimmt. Der Korrekturfaktor war 167. Die RNA-Konzentration schwankte zwischen 2338 und 885100 RNA-Kopien/ml Liquorprobe (Tabelle 38). Bei vier Proben mit weniger als 10187

RNA-Kopien sowie bei der Probe mit der höchsten RNA-Konzentration konnte das zentrale Fragment des VP 2 nicht amplifiziert werden. Zwei dieser vier Proben, darunter auch die mit der höchsten RNA-Konzentration, konnten bereits durch die Real-time EV-PCR nach Verstrepen et al. nicht detektiert werden.

### 5.5.3 Klinische Daten

Um einen Überblick über die Symptomatik der EV-positiven Patienten zu bekommen, wurden die klinischen Daten anhand der Arztbriefe ausgewertet. Von 13 der 14 Patienten waren Arztbriefe vorhanden, für einen Patienten standen lediglich der Aufnahmebefund und Labor-Ergebnisse zur Verfügung.

Alle Patienten wurden im Universitätskinderklinikum Bonn stationär behandelt. 8/14 (57%) Patienten wurden am Tag des Symptombeginns lumbalpunktiert, die übrigen sechs einen Tag später (Tabelle 39). Die mittlere, stationäre Behandlungsdauer betrug fünf Tage. Insgesamt bekamen 12/13 (92 %) Patienten ein Antibiotikum verabreicht. Die Dauer der antibiotischen Behandlung betrug im Mittel sechs Tage, der Median viereinhalb Tage und die Spannweite zwei bis 14 Tage. Die beschriebenen klinischen Symptome waren bei 13/14 (93 %) Patienten Fieber, bei 9/14 (64 %) Patienten wurden positive Nervendehnungszeichen gefunden, 8/14 (57%) litten an Kopfschmerzen, 8/14 (57 %) klagten über Übelkeit und/oder Erbrechen und 3/14 (21 %) Patienten gaben eine erhöhte Lichtempfindlichkeit bzw. Berührungsempfindlichkeit an. Symptome, die für eine Enzephalitis sprechen, wie z.B. kognitive Störungen, Verhaltensauffälligkeiten, neurologische Herdsymptome oder zerebrale Krampfanfälle, wurden in 0/14 Fällen beschrieben. Es wurde lediglich in 3/14 (21 %) Fällen von einer leichten Vigilanzminderung gesprochen.

Einen pathologischen Liquorbefund hatten 12/14 (86 %) Patienten, hierbei beschränkte sich die Pathologie in 11/12 (92 %) Fällen auf eine erhöhte Zellzahl. Im Mittel lag sie bei 607 Zellen/ $\mu$ l, der Median betrug 218 Zellen/ $\mu$ l und die Spannweite 15-4654 Zellen/ $\mu$ l. Lediglich in einem Fall, mit einer für eine virale Genese ungewöhnlich hohen Liquorzellzahl von 4654 Zellen/ $\mu$ l, war der Glucose-Spiegel erniedrigt. In Liquorkulturen fand jedoch kein Bakterienwachstum statt. So wurde bei 12/14 (86 %) Patienten die Diagnose einer Aseptischen Meningitis gestellt, bei 0/14 die einer Enzephalitis. Ein septisches Krankheitsbild trat in 0/14 Fällen begleitend auf, in 7/14 (50 %) Fällen wurde

von einem Infekt der oberen Atemwege oder einer Tonsillitis im Vorfeld der Erkrankung oder begleitend berichtet. 1/14 (7 %) Patient hatte zudem ein Exanthem. 2/14 (14 %) Patienten klagten außerdem über Gliederschmerzen, in 1/14 Fall (7 %) begleitet von einem Kniegelenkserguss. Dieses waren auch die beiden Patienten, bei denen trotz des Erregernachweises im Liquor keine erhöhte Zellzahl gefunden wurde und klinisch nicht von einer aseptische Meningitis gesprochen wurde. Bei einem dieser Patienten konnte das Echovirus 30 gefunden werden, im Falle des Patienten mit dem Kniegelenkserguss konnte die Typisierung nicht durchgeführt werden.

**Tab. 39:** Übersicht der klinischen Charakteristika der Patienten mit einer zentralvenösen HPeV- bzw. EV-Infektion. \*In einem Fall erfolgte eine erneute Punktion nach sieben Tagen, da das Material der ersten Lumbalpunktion für die HPeV-Diagnostik nicht mehr zur Verfügung stand; \*\*Daten für einen Fall nicht verfügbar

Variable	Wert [Anzahl Patienten/Gesamtzahl Patienten (Anteil in Prozent)]	
	HPeV	EV
Fieber/Hypothermie	2/2	13/14 (93 %)
Meningismus/positive Nervendehnungszeichen	1/2	9/14 (64 %)
Kopfschmerzen	k.A.	8/14 (57 %)
Übelkeit/Erbrechen	k.A.	8/14 (57 %)
Photophobie	k.A.	3/14 (21 %)
Kognitive Störungen (Gedächtnisstörungen)	k.A.	0/14
Verhaltensauffälligkeiten, Desorientierung, Vigilanzminderung	Vigilanzminderung: 2/2 (100 %)	Vigilanzminderung: 3/14 (21 %)
Herdsymptome (Aphasie, Anosmie, etc.)	k.A.	0/14
Krampfanfälle	1/2	0/14
Infektion der oberen Atemwege/Tonsillitis	0/2	7/14 (50 %)
Diarrhoe	0/2	0/14
Exanthem	1/2	1/14(7 %)
Anzahl an Patienten mit erhöhter Zellzahl im Liquor	0/2	12/14 (86 %)
Erhöhte Zellzahl im Liquor [Anzahl/ $\mu$ l] Mittelwert		606,5
Median (Spannweite)		218 (15-4654)
Erhöhtes Protein im Liquor (Referenzbereich: 15-48 bzw. 153 mg/dl)	0/2	0/14
Erniedrigter Glucose-Spiegel im Liquor (Referenzbereich: 40-70 mg/dl)	0/2	1/14 (7 %)
Erhöhtes Laktat im Liquor	0/2	0/14
Ateminsuffizienz	2/2	0/14
Aseptische Meningitis	0/2	12/14 (86 %)
Enzephalitis	1/2	0/14
Septisches Krankheitsbild	2/2	0/14
Dauer des Krankenhausaufenthaltes [Tage] Mittelwert	13, >11	
Median (Spannweite)		5 5 (2-9)
Zeitraum zwischen Symptombeginn und Lumbalpunktion [Tage] Mittelwert	1 und 7*; 2	0,4
Median (Spannweite)	2 (1-7)	0 (0-1)
Anzahl an Patienten, die mit Antibiotika behandelt wurden	2/2	12/13 (92 %)**
Dauer der Antibiotika-Gabe [Tage] Mittelwert	10**	6**
Median (Spannweite)		4,5 (2-14)**

## 6. Diskussion

Die virale Meningitis und Enzephalitis sind häufige Krankheitsbilder, vor allem im Kindes- und Jugendalter. Eine Vielzahl von Viren kommen als Erreger in Betracht. Durch Einführung der PCR bzw. molekulargenetischer Verfahren in die Diagnostik hat sich diese in den letzten Jahren deutlich verbessert. In dieser Studie haben wir neue molekulare Verfahren angewandt, um die Ätiologie einer Meningitis bzw. Enzephalitis bei Patienten der Universitätskinderklinik Bonn zu klären und mögliche Konsequenzen für Diagnostik und Therapie daraus abzuleiten.

### 6.1 Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Virus-Detektion und -Typisierung molekulargenetische Methoden verwendet. Diese, und im Speziellen die Real-time PCR, bieten im Vergleich zu traditionellen Techniken der virologischen Diagnostik eine höhere Sensitivität und Spezifität, und sie liefern deutlich schneller Ergebnisse. Die Gefahr von Kontaminationen ist aufgrund eines geschlossenen Systems bei der Real-time PCR geringer als bei konventionellen, Gel-basierten PCR-Verfahren (Baumgarte et al., 2008; Benschop et al., 2008a; de Vries et al., 2008; Harvala et al., 2008; Joki-Korpela und Hyypia, 1998; Nix et al., 2008; Oberste et al., 1999c).

#### 6.1.1 Sensitivität der HPeV-PCR-Assays

Nix et al. gaben für ihr HPeV 5'-NTR Real-time Verfahren ein Detektionslimit von einer Kopie/PCR-Ansatz sowohl für ein in-vitro Transkript des HPeV1-Harris als auch des LV-SWE87-012 an (Nix et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit lag die Detektionsgrenze für das Verfahren nach Baumgarte et. al zwischen 10 und 100 Kopien/Reaktion. Die 95%ige Detektionswahrscheinlichkeit lag bei 10,1 Genomäquivalenten/PCR-Reaktion.

Für beide oben angegebenen PCR-Verfahren wurden verschiedene Arten der Sensitivitätsbestimmung, verschiedene PCR-Chemikalien sowie unterschiedliche PCR-Geräte verwendet. Auch die Referenzstämme unterschieden sich voneinander. So wurde zur Sensitivitätsbestimmung des Verfahrens nach Baumgarte et al. ein in-vitro Transkript des HPeV1-Isolates BNI788st verwendet. Für den Harris-Stamm z. B. unterscheiden sich die Bindungsstellen der Primer bzw. Sonden beider PCR-Assays. All dies kann Ursache der Unterschiede zwischen den Detektionsgrenzen bzw. Sensitivitäten sein.

Durch die hier verwendeten EV-PCR Verfahren wurden keine der HPeV positiven Proben detektiert, ebenso wie die für EV positiven Proben nicht durch einen der HPeV-PCR-Verfahren detektiert wurde. Es ist daher nötig, eine für das jeweilige Virus spezifische Primer- und Sondenkombination zu verwenden. Inzwischen hat sich gezeigt, dass beide Viren klinisch relevant sind und eine simultane Detektion sinnvoll ist, z.B. durch ein Multiplex-Verfahren (Nielsen et al., 2013).

### 6.1.2 Vergleich der Enterovirus-PCR-Assays

Zur Detektion von EV-RNA in den Liquorproben wurden zwei verschiedene Real-time RT-PCR-Verfahren verwendet. Mit dem Verfahren nach Verstrepen et al. wurde bei elf Patienten EV-RNA detektiert, mit dem Verfahren nach Dierssen et al. waren neben denselben elf Patienten drei weitere positiv für EV. Die Konzentration viraler Nukleinsäuren dieser drei Proben liegen bei 2338, 35905 und 885100 RNA-Kopien/ml Liquor. Es handelt sich dabei, im Vergleich mit allen für EV positiven Liquores, um die Proben mit der niedrigsten bzw. höchsten sowie einer mittleren RNA-Konzentration. Die Typisierung gelang lediglich für die Probe mit 35905 RNA-Kopien/ml Liquor, es handelt sich um Echovirus 30.

Von Verstrepen et al wird die 95 % Detektionsrate mit 11,8 Genomäquivalenten/PCR-Reaktion bzw. 592 Genomäquivalenten/ml Liquor angegeben (Verstrepen et al., 2001). Diese liegt um beinahe eine Zehnerpotenz höher als die von Dierssen et al. angegebene 95 % Detektionsrate von 100 Genomäquivalenten/PCR-Reaktion. Nach Extraktion entsprach dies 3800 Genomäquivalenten/ml Liquor (Dierssen et al., 2008). Zu berücksichtigen sind einige Unterschiede zwischen den beiden Sensitivitätsbestimmungen, die Einfluss auf das Ergebnis haben können. So stimmen die Versuchsabläufe nicht vollkommen überein, als Standard wurde bei Verstrepen et al. ein Fragment von Poliovirus 1 (POLIOS1-Stamm) und bei Dierssen et al. ein Fragment von CBV3 (Nancy-Stamm) verwendet. Auch wurden unterschiedliche Reagenzien verschiedener Anbieter verwendet.

Die virale Nukleinsäure-Konzentration aller drei Proben befand sich oberhalb der von den Autoren angegebenen Detektionsgrenze des Verfahren nach Verstrepen et al., die Anzahl der RNA-Kopien/ml Liquor der Probe mit der geringsten viralen RNA-Konzentration jedoch unterhalb der von Dierssen et al. angegebenen (Dierssen et al.,

2008; Verstrepen et al., 2001). Das unterschiedliche Ergebnis, bezogen auf die aus Bonn stammenden Proben, lässt sich folglich nicht nur mit der angegebenen Sensitivität der Methoden begründen.

Dierssen et al. beschreiben in ihrer Arbeit, dass sie die Position der Primer, und vor allem die der Sonde, gegenüber vorher existierenden, u.a. auch der von Verstrepen et al., veränderten. Ihre Sonde weise daher eine höhere Passgenauigkeit auf und könne somit auch hoch-divergente Subtypen wie Echovirus 30 und EV71 detektieren (Dierssen et al., 2008). Da es sich bei einem Subtyp tatsächlich um Echovirus 30 handelt und eine Probe trotz hoher RNA-Konzentration nicht typisiert werden konnte, könnte auch in der vorliegenden Studie die veränderte Position der Primer bzw. Sonde der entscheidende Faktor bzgl. der unterschiedlichen Ergebnisse der beiden PCR-Verfahren sein.

Auch in anderen Arbeiten wird mit Bezug auf das Verfahren von Dierssen et al. über ein hochsensitives Protokoll für eine effektive EV-Detektion und von einem Vorteil gegenüber anderen Primern und Sonden gesprochen (Connell et al., 2012; Wong et al., 2010). Häufig wurden die Protokolle jedoch modifiziert bzw. es werden keine konkreten RNA-Konzentrationen der Ausgangsproben genannt, sodass ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten, in denen die beiden PCR-Verfahren verwendet wurden, nicht möglich ist.

## 6.2 Virales Erregerspektrum bei Kindern und Jugendlichen mit einer Enzephalitis/Meningitis im Raum Bonn

HPeV konnte in zwei von 349 Liquorproben bzw. 0,6 % (2/327) der Fälle gefunden werden. Die Prävalenz von EV lag bei 3,4 % bzw. 4,3 % (11 bzw. 14 aus 327 Patienten), abhängig vom verwendeten PCR-Verfahren. HSV-1 und VZV wurden bei jeweils einem Patienten nachgewiesen, CMV und HSV-2 in keiner der Liquorproben.

### 6.2.1 Humanes Parechovirus

Beide in der vorliegenden Studie detektierten HPeV wurden als Subtyp 3 identifiziert. Die für HPeV positiven Liquorproben stammen von einem sechs Wochen alten Säugling sowie einem Neugeborenen.

In einer Arbeit aus Spanien, die 264 Liquorproben von Kindern unter zwei Monaten umfasst, gaben die Autoren eine Prävalenz von 3,0 % an (Pineiro et al., 2010). Für Liquorproben von Kindern unter zwei Monaten, die aus Edingburgh stammten, beschrieben Harvala et al. eine Detektionsrate von 2,9 % (Harvala et al., 2009). In Amsterdam detektierte man HPeV3 in 4,6 % der Liquores von Kindern unter fünf Jahren (Wolthers et al., 2008).

Die Prävalenz in den Bonner Proben liegt mit 0,6 % somit unter der in anderen Arbeiten gefundenen.

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten stammen die Bonner Proben jedoch von Kindern im Alter zwischen 0 und 18 Jahren, die Altersspanne ist also deutlich weiter. Berücksichtigt man lediglich die Proben aller Kinder unter fünf Jahren bzw. jünger zwei Monaten, so liegt die Prävalenz für HPeV in der vorliegenden Studie bei 2 % (2/100) bzw. 11,8 % (2/17) und damit bei den Säuglingen unter zwei Monaten deutlich höher als die bei Harvala et al. und Pineiro et al (Harvala und Simmonds, 2009; Pineiro et al., 2010). In der Altersgruppe der Kinder jünger fünf Jahre liegt die Prävalenz der Bonner Proben weiterhin unter der von Wolthers et al., die mit 4,6 % (33/716) angegeben wird (Wolthers et al., 2008). 92,5 % der Proben stammten dort jedoch von Kindern unter zwei Jahren, im Vergleich zu 61 % in der vorliegenden Studie.

Zusammenfassend lässt sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie festhalten, dass schwere Krankheitsbilder mit HPeV3 zu einem sehr frühen Zeitpunkt im Leben, meist in den ersten drei Monaten, auftreten (Benschop et al., 2006;

Harvala et al., 2009; Pineiro et al., 2010; Selvarangan et al., 2011; van der Sanden et al., 2008; Walters et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten, im Vergleich zu anderen Arbeiten jedoch geringere Prävalenz von HPeV wurde durch die Altersstruktur der untersuchten Patienten-Gruppe beeinflusst. Insgesamt sollten aber auch methodische Aspekte nicht außer Acht gelassen werden, wie im Folgenden erörtert.

Mit einer Real-time RT-PCR wurde ein schnelles und hoch-sensitives diagnostisches Verfahren benutzt. Es ist allerdings zu beachten, dass Liquorproben meist geringere virale RNA-Konzentrationen als beispielsweise Stuhlproben aufweisen und eine Detektion daher auch mittels der PCR erschwert sein kann (Kupila et al., 2005). Weiterhin wurden die Proben lediglich bei -20 °C gelagert. Bei HPeV handelt es sich aber um ein RNA-Virus. Im Vergleich zu DNA ist RNA wesentlich instabiler und sollte vorzugsweise bei -80 °C gelagert werden (Mülhardt, 2009). Auch ist nicht sicher zu sagen, ob über den Zeitraum der Lagerung, der im längsten Falle zehn Jahre betrug, eine Temperatur von -20 °C konstant eingehalten wurde.

Als eine weitere Ursache der niedrigen Prävalenz ist es möglich, dass die verwendeten PCR-Verfahren neue bzw. genetische veränderte HPeV-Subtypen nicht oder mit geringerer Effizienz amplifizieren. Diesbezüglich beschreiben allerdings Baumgarte et al., dass der von ihnen entwickelte PCR-Assay HPeV6 in einer Stuhlprobe detektierte, obwohl dieser Subtyp zum Zeitpunkt der Entwicklung der PCR noch nicht bekannt war (Baumgarte et al., 2008). Zusätzlich liegen die Primer in einer hochkonservierten Region des Genoms. Ein Alignment zeigte eine gute Konkordanz der Primer und Sonde mit allen HPeV-Subtypen. Fehlpaarungen bestanden beinahe ausschließlich aus G:T-Basenpaaren, die thermodynamisch beinahe so stabil wie reguläre Basenpaare sind (Baumgarte et al., 2008; Peyret et al., 1999).

HPeV wurde ausschließlich in Liquorproben des Jahres 2008 gefunden, diese stammten aus den Monaten Oktober und November.

In den Niederlanden und Schottland wurde für die Jahre 2000 bis 2008 ein zweijähriger Zyklus im Auftreten von HPeV3 unter Aussparung ungerader Jahre beschrieben (Benschop et al., 2008b; Harvala et al., 2011; van der Sanden et al., 2008). Für die Niederlande konnte dies über diesen Zeitraum hinausgehend bestätigt werden

(Wildenbeest et al., 2014). In anderen europäischen Ländern wie Spanien, Italien und Frankreich wurde diese Periodizität nicht gefunden (Pineiro et al., 2010; Piralla et al., 2012; Schuffenecker et al., 2012). Arbeiten aus den USA berichten ebenfalls von einem Zwei-Jahres-Zyklus, allerdings mit einer deutlichen Zunahme der Infektionen in ungeraden Jahren (Selvarangan et al., 2011). Die Ursachen für dieses Phänomen sind unbekannt. Es wird ein möglicher Zusammenhang mit dem Auftreten von neuen genetischen Linien, ähnlich wie bei Echovirus 30, diskutiert (Harvala et al., 2009; Mirand et al., 2007; Oberste et al., 1999a; Palacios et al., 2002). Weitere Möglichkeiten sind ein zyklisches Auftreten eines möglichen Ursprungswirtes oder Änderungen der Seroprävalenz. Erst eine bestimmte Anzahl an immunologisch Naiven gegenüber einem bestimmten Subtyp führt zu einem erneuten Ausbruch (van der Sanden et al., 2008).

Eine naheliegende Erklärung dafür, dass in der vorliegenden Studie in keiner Probe aus den Jahren 1998 bis 2007 HPeV detektiert wurde, ist ebenfalls der geringe Probenumfang. Schwankungen der jährlichen Prävalenz wurden aber auch, wie oben dargestellt, aus anderen europäischen Ländern sowie den USA berichtet. 2008, das Jahr in dem die HPeV3 positiven Proben aus Bonn gefunden wurden, fällt in die für die Niederlande und Schottland beschriebene Periodizität.

Bezüglich der Saisonalität von HPeV3 wird in Edinburgh ein Überwiegen der Infektionen im Frühjahr angegeben (Harvala et al., 2011), für die Niederlande eine deutliche Zunahme der Infektionen im Frühjahr und den Sommermonaten (Wolthers et al., 2008) bzw. im Sommer und Herbst (van der Sanden et al., 2008; Wildenbeest et al., 2014) beschrieben. In einer Studie aus Spanien traten HPeV3-Infektionen vor allem in den Sommer- und Herbstmonaten auf (Pineiro et al., 2010), in Italien im Herbst (Piralla et al., 2012). In der subtropischen Klimazone der USA fanden Felsenstein et al. keine Saisonalität (Felsenstein et al., 2014), für Kansas City und Chicago wird dagegen eine saisonale Häufung im Sommer und Herbst beschrieben (Selvarangan et al., 2011; Walters et al., 2011). Der Zeitpunkt der HPeV3-Detektion in den Bonner Liquorproben stimmt somit mit der Beobachtung anderer Autoren, dass sich HPeV3-Infektionen im Sommer und Herbst in den gemäßigten Breiten häufen, überein.

In der vorliegenden Arbeit war jeweils ein für HPeV3 positiver Patient männlichen bzw. weiblichen Geschlechts. Von einigen Autoren wird entsprechend den EV auch für HPeV

ein Überwiegen der Infektionen beim männlichen Geschlecht angegeben (Benschop et al., 2008a; Benschop et al., 2006; Harvala et al., 2008; Selvarangan et al., 2011; van der Sanden et al., 2008; Walters et al., 2011; Wolthers et al., 2008). Harvala et al. bzw. Pineiro et al. fanden in ihren Arbeiten aus Schottland bzw. Spanien dagegen keine Überrepräsentation männlicher Patienten unter den HPeV3-Infizierten (Harvala et al., 2011; Pineiro et al., 2010) und Verboon-Maciolek et al. zeigen einen größeren Anteil an weiblichen Betroffenen auf (Verboon-Maciolek et al., 2008). Westerhuis et al. stellten in ihrer Studie aus dem Jahr 2013 zur Seroprävalenz von HPeV in Finnland sowie den Niederlande kein Überwiegen eines Geschlechtes fest (Westerhuis et al., 2013a). Für die Frage, ob es eine geschlechtsspezifische Präferenz gibt, sind weitere Studien nötig.

### 6.2.2 Humanes Enterovirus

EV war in der vorliegenden Studie das am häufigsten detektierte Virus (11 bzw. 14/327 Patienten; 3,4 % bzw. 4,3 %). Bei 12/14 (86 %) Patienten wurde die Diagnose einer aseptischen Meningitis gestellt, in keinem Fall die einer Enzephalitis oder Sepsis. Auch in der Literatur wird die EV-Infektion als eine der primären Ursachen für die aseptische Meningitis genannt, zusätzlich zählt eine Infektion mit EV zu den häufig gefunden Ursachen für die virale Enzephalitis (Berlin et al., 1993; Glaser et al., 2006).

In den im Folgenden zitierten Studien, in denen die Prävalenz von HPeV und EV in Liquorproben verglichen wurde, waren 14 % der Patienten positiv für EV (Wolthers et al., 2008) bzw. 201 von 3739 Proben (5,4 %) (Harvala et al., 2011). Zwar liegen in beiden Fällen die Detektionsraten über der Detektionsrate dieser Arbeit, die Ergebnisse stimmen jedoch dahingehend überein, dass EV häufiger als HPeV nachgewiesen wurde.

Die Mehrheit (57,1 %) der für EV-positiven Proben stammt von Kinder zwischen fünf und neun Jahren, Mittelwert und Median liegen bei fünf Jahren und die Spannweite reicht von einem Monat bis 14 Jahre. Diese Daten bestätigend fanden Kieslich et al. während eines Ausbruchs von aseptischer Meningitis, bedingt durch Echovirus 30, im Großraum Nürnberg eine Spannweite von drei Jahren bis 11,5 Jahren und einen Mittelwert von 6,9 Jahren (Kieslich et al., 2002). Antona et al. beschreiben in ihren Enterovirus-

Surveillance-Daten aus Frankreich der Jahre 2000 bis 2004, dass zentralnervöse Symptome aufgrund von EV-Infektionen in allen Altersgruppen zu finden sind, ein Schwerpunkt allerdings bei den fünf- bis 14jährigen liegt (Antona et al., 2007). In Surveillance-Daten aus Großbritannien fielen ein Drittel aller EV-Fälle auf Kinder unter einem Jahr (Maguire et al., 1999). Ähnliches wird für die USA beschrieben. Fowlkes et al. untersuchten Liquores der Jahre 1998 bis 2005 von an einer Enzephalitis erkrankten Patienten in Californien und konnten EV in allen Altersgruppen finden, der Mittelwert des Alters von Patienten mit gesicherter Enterovirus-Enzephalitis lag jedoch bei 12 Jahren. Bezogen auf die Gesamtheit der Enterovirusinfektionen fielen 44 % auf Kinder unter einem Jahr (Fowlkes et al., 2008; Khetsuriani et al., 2006a). In Edingburgh detektierten Harvala et al. ebenfalls EV in Liquorproben, diese stammten aus den Jahren 2005 bis 2010, aller Altersgruppen mit der höchsten Detektionshäufigkeit bei jungen Erwachsenen zwischen 21 und 36 Jahren. Gleichzeitig fielen jedoch 47 % aller EV-Infektionen auf Säuglinge unter drei Monaten (Harvala et al., 2011).

Zusammenfassend wird deutlich, dass sich, anders als bei den HPeV, Infektionen mit EV nicht auf eine Altersgruppe beschränken, Kinder jedoch meist häufiger betroffen sind.

EV-Infektionen treten während des gesamten Jahres auf, in den gemäßigten Breiten mit einer Zunahme in den Sommer- und Herbstmonaten (Antona et al., 2007; Khetsuriani et al., 2006a; Trallero et al., 2000). Die EV-positiven Proben der vorliegenden Arbeit wurden analog zu dieser Beobachtung in den Monaten Mai, Juni, Juli, August, September und Dezember gefunden. Die in dieser Arbeit vorliegenden starken Schwankungen der jährlichen Prävalenz von EV von 2,9 % im Jahr 2005 und 12,5 % im Jahr 2004 bzw. die fehlenden Nachweise von EV in den Jahren 1998, 1999, 2003 und 2006 sind damit zu erklären, dass aus dem Jahr 1998 nur noch die Liquorproben der Monate Januar bis April und aus dem Jahr 1999 lediglich die Proben der Monate Mai bis September zur Verfügung standen. Mit dem geringeren Probenumfang nimmt auch die Detektionswahrscheinlichkeit ab. Desweiteren steigt, wie oben beschrieben, die Zahl zentralnervöser EV-Infektionen im Sommer und Herbst an. Für beide eben genannten Jahre fehlten allerdings die Proben dieser Jahreszeiten oder waren unvollständig.

Mit der Frage nach einer geschlechtsspezifischen Präferenz wurde die Zahl der weiblichen bzw. männlichen EV-Infizierten miteinander verglichen. Es bestand kein signifikanter Unterschied. Im Gegensatz hierzu wird in der Literatur ein Überwiegen der EV-Infektionen bei männlichen Individuen beschrieben (Antona et al., 2007; Harvala et al., 2009; Moore, 1982). Ein Grund für das hier vorliegende Ergebnisse könnte ebenfalls der geringe Probenumfang sein. Außerdem sind die Daten bezüglich einer geschlechtsspezifischen Präferenz von EV häufig auf die Gesamtheit aller Proben bezogen und nicht speziell auf ZNS-Nachweise des Virus.

Weiterhin wurde eine Typisierung der EV-positiven Liquorproben durchgeführt. Bei den typisierten Proben handelt es sich in sechs Fällen um Echovirus 30, in jeweils einem um Echovirus 6, Echovirus 13, CBV3 und CBV5. Insgesamt konnten die Proben von vier Patienten nicht typisiert werden, in einem dieser Fälle wurde jedoch Echovirus 30 im Stuhl gefunden. Bei der Identifizierung von EV in verschiedenen Körperkompartimenten (Rachenabstrich, Stuhl, Liquor etc.) handelt es sich nicht zwangsläufig um den gleichen Erreger, da EV-Infektionen häufig asymptomatisch verlaufen und es sich um eine Ko-Infektion handeln könnte (Fowlkes et al., 2008). Verschiedene Autoren halten jedoch die Diagnostik und Typisierung von EV aus Stuhlproben unter Berücksichtigung der entsprechenden Klinik für ausreichend (Beyrer et al., 2010; Kieslich et al., 2002; Kupila et al., 2006) bzw. geben die höchste Detektionsrate für Stuhlproben und damit einen diagnostischen Nutzen einer Kombination mehrerer klinischer Proben an (de Crom et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit kann eine Ko-Infektion mit zwei Enterovirus-Subtypen nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch ein EV-Nachweis im Liquor erfolgte, klinisch eine aseptische Meningitis diagnostiziert worden war und Echovirus 30, wie unten beschrieben, häufig mit dem Krankheitsbild der aseptischen Meningitis assoziiert ist, wurde die Probe in der vorliegenden Studie als typisiert eingeordnet.

Alle detektierten EV-Subtypen gehören der Enterovirus-Spezies B an, der Spezies mit den meisten humanmedizinisch relevanten Erregern (Thoelen et al., 2003).

In zahlreichen Arbeiten aus Europa und den USA wurden die hier nachgewiesenen Subtypen ebenfalls als häufige Erreger von Krankheiten, insbesondere der aseptischen Meningitis, identifiziert. Echovirus 30 ist nicht nur in Europa sondern auch in Amerika und Asien der bei aseptischen Meningitiden am häufigsten nachgewiesene Subtyp

(Antona et al., 2007; Blomqvist et al., 2008; Harvala et al., 2011; Hovi et al., 1996; Joki-Korpela und Hyypia, 1998; Khetsuriani et al., 2006a; Maguire et al., 1999; Thoelen et al., 2003; Trallero et al., 2000).

Auch in Deutschland wird Echovirus 30 seit Jahren kontinuierlich detektiert (Kieslich et al., 2002). Alle drei bis fünf Jahre kommt es zu Ausbrüchen, zuletzt 2008 sowie 2013 (RKI, 2013). Andere EV-Subtypen treten nur sporadisch auf (RKI, 2013). Laut Robert Koch-Institut waren im Jahr 1998 Coxsackievirus A9, Echovirus 25, EV71, im Jahr 1999 Echovirus 30, Echovirus 11, Echovirus 7, Echovirus 4 sowie im Jahr 2000 Echovirus 13, Echovirus 30, Echovirus 6 die vorwiegenden Erreger einer aseptischen Meningitis unter den Enteroviren (RKI, 2001). Daten aus den Jahren 2001 bis 2008 stehen leider nicht zur Verfügung. 2000 wurde während eines Ausbruchs von aseptischer Meningitis in Sachsen sowie Sachsen-Anhalt Echovirus 13 vermehrt diagnostiziert. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde es in Deutschland nur sehr selten nachgewiesen (RKI, 2001).

Trotz sehr lückenhafter Daten lassen sich Parallelen zu der vorliegenden Arbeit erkennen. Echovirus 30 ist der am häufigsten detektierte Subtyp, andere der genannten Subtypen wurden ebenfalls nachgewiesen. Erwähnenswert ist auch, dass Echovirus 13 im Jahr 2000 in der vorliegenden Studie nicht detektiert wurde, allerdings in der einzigen EV-positiven Probe des Jahres 2001.

Eine Periodizität im Auftreten eines bestimmten EV-Subtyps während der Jahre 1998-2008 in Bonn, wie sie beschrieben werden, lässt sich wegen der geringen Probenzahl nicht ableiten.

Enteroviren sind aufgrund häufiger Mutations- sowie Rekombinationsereignisse hoch divergent. Für die Evolution der Enteroviren, für ihre Verbreitung sowie Pathogenität spielt dies eine wichtige Rolle (Benschop et al., 2008c; Lindberg et al., 2003; Lukashev, 2005; Simmonds und Welch, 2006). Es ergaben sich Hinweise für eine weltweit einheitliche, molekulare Epidemiologie der Enteroviren mit Subsero- oder Genotypen, die sich innerhalb weniger Jahre weltweit verteilen, für einige Jahre zirkulieren und dann wieder verschwinden, um anderen Varianten Platz zu machen (Lukashev, 2005). Ein Beispiel hierfür ist Echovirus 30 mit seinen periodisch wiederkehrenden Ausbrüchen (Lukashev, 2005; Oberste et al., 1999a). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine sich während des Ausbruchs ausbildende Immunität der Bevölkerung sein. Nach einigen Jahren steigt die Anzahl seronegativer Individuen jedoch wieder an bzw. es haben

Änderungen der Antigene stattgefunden, sodass es zu einem erneuten Ausbruch kommen kann (Lukashev, 2005).

Diese hohe Divergenz führt zu Problemen bei der Diagnostik bzw. Typisierung der Enteroviren. Vor Verbreitung der PCR war der „Gold-Standard“ zur Typisierung von EV lange Zeit die Anzucht in Zellkulturen mit anschließenden Neutralisationstests. Nachteile hierbei waren zum einen, dass eine Anzucht einiger Serotypen in Zellkulturen missglückte. Zum anderen schlugen die Neutralisationstests aufgrund von Aggregation von Viruspartikeln oder dem Auftreten neuer Varianten, die sich antigenetisch von den Prototypen unterschieden, die zur Produktion der Antisera benutzt wurden, fehl (Muir et al., 1998; Nasri et al., 2007). Die Probleme der PCR bestehen darin, dass häufig nur eine derartig geringe Konzentration an viralen Nukleinsäuren in dem Probenmaterial vorhanden ist, die selbst unter der Nachweisschwelle der PCR liegt (Nix et al., 2008). Auch die hohe genetischen Diversität kann zu Schwierigkeiten führen. Varianten, Rekombinanten und neue Subtypen sollten, obwohl vielleicht noch nicht bekannt, ebenfalls durch einen PCR-Assay detektiert werden können (Nasri et al., 2007).

In der vorliegenden Studie zeigte sich ebenfalls, dass die zwei verwendeten EV-PCR-Protokolle eine unterschiedlich Anzahl an positiven Proben detektierten. Zur Typisierung wurden zunächst zwei verschiedene PCR-Verfahren erfolglos verwendet, ehe die Typisierung von 11 der 16 Proben mittels des PCR-Verfahrens nach Nasri et al., dessen Zielsequenz im VP2 lokalisiert ist, gelang (Nasri et al., 2007). Aus diesen Befunden ergeben sich praktische Konsequenzen für die Diagnostik von EV. So ist zu diskutieren, ob zwei PCR-Assays verwendet werden sollten, um die Sensitivität zu erhöhen und welches Probenmaterial gewählt werden sollte. Primer sollten zudem regelmäßig mit Sequenzdaten aus der GenBank aktualisiert werden.

Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der klinischen Charakteristika von Echovirus 30- und mit anderen EV-Infizierten. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass keine Korrelation zwischen EV-Subtyp und Klinik besteht. Ausnahmen sind nur einige wenige Krankheitsbilder, die in der Mehrzahl der Fälle durch einen kleinen Kreis an Enteroviren verursacht werden. Die Ursache für eine fehlende Korrelation zwischen EV-Subtyp und Klinik wird von Lukashev in den Rekombinationsereignissen innerhalb einer Spezies gesehen. Er gibt an, dass den

Subtyp zu kennen lediglich bedeutet, dass ein Drittel des Virusgenoms mehr als 70 % mit dem Prototyp-Stamm übereinstimmt (Lukashev, 2005).

### 6.2.3 Herpes simplex-Virus, Varizella-Zoster-Virus, Zytomegalievirus

Jeweils einer aus 327 Liquores war positiv für HSV-1 bzw. VZV. HSV-1 ist, auf die gesamte Bevölkerung gesehen, eine der häufigen Ursachen der viralen Meningoenzephalitis. Es wird jedoch überwiegend im Erwachsenenalter nachgewiesen (Glaser et al., 2003; Harvala et al., 2011). VZV zählte in den 1980ern noch zu den häufigen Erregern der viralen Meningoenzephalitis, nach Einführung der Varizellen-Impfung nahm seine Bedeutung jedoch ab (Glaser et al., 2003; Pahud et al., 2011). Die VZV-Meningoenzephalitis wird nun überwiegend bei Immundefekten jeglicher Art beobachtet. Die höchste Detektionsrate an VZV-positiven Liquorproben lag in einer Studie aus Edinburgh in der Altersgruppe >65 Jahren, die Patienten litten an einer Meningitis (Harvala et al., 2011). Die geringe Detektionsrate könnte dementsprechend u.a. mit der Altersstruktur der Patienten erklärt werden.

Generalisierte HSV-2 Infektionen unter Einbeziehung des ZNS sind häufig perinatale Infektionen als Folge einer genitalen Infektion der Mutter mit Übertragung auf das Kind. Eine routinemäßige Testung der Mutter und Durchführung einer Sectio caesarea wird bei positivem HSV-2 Nachweis daher erwogen. CMV-Infektionen verlaufen im Kindesalter sowie bei immunkompetenten Personen überwiegend asymptomatisch, eine Diagnostik wird nicht durchgeführt.

### 6.3 Vergleich der Relevanz des Humanen Parechovirus als Erreger von Enzephalitis und Sepsis bei Neugeborenen und Säuglingen mit der des Enterovirus und sich daraus ergebende Konsequenzen für Diagnostik und Therapie

In beiden in den Fallstudien beschriebenen Fällen ergab die Sequenzierung eine Infektion mit HPeV3. Neben Liquor wurde bei beiden Betroffenen das Virus auch im Stuhl, beim Säugling darüber hinaus auch im Rachenspülwasser und Serum nachgewiesen. Es handelte sich demnach um generalisierte Infektionen. Während der Säugling an einer Sepsis litt, wurde beim Neugeborenen zusätzlich eine Enzephalitis diagnostiziert.

Kinder mit einer HPeV3-Infektion leiden im Vergleich zu denen mit einer HPeV1 Infektion häufiger an schwerwiegenden Krankheitsbildern wie einer Sepsis oder Enzephalitis und sind im Durchschnitt deutlich jünger (Benschop et al., 2006; Boivin et al., 2005; van der Sanden et al., 2008; Verboon-Maciolek et al., 2008). Wildenbeest et al. konnten zusätzlich zeigen, dass HPeV3-Infizierte mit einem schwerwiegenden Krankheitsbild signifikant jünger als die mit einer Gastroenteritis sind (Wildenbeest et al., 2014). Als Ursache für die Unterschiede hinsichtlich dem klinischen Erscheinungsbild und Epidemiologie werden verschiedene Ursachen diskutiert (Benschop et al., 2006; Harvala et al., 2009; Ito et al., 2004; van der Sanden et al., 2008).

Biologische Eigenschaften, wie ein divergierender Zell-Tropismus von HPeV3, könnten eine Rolle spielen. Dieser wird angenommen, da die Anzucht von HPeV3 in Zellkulturen schwieriger ist bzw. HPeV3 andere Wachstumscharakteristika zeigt. HPeV3 wird auf VeroE6-Zellen gezüchtet, während andere HPeV-Subtypen am besten auf HT29-Zellen wachsen. HPeV3 verfügt nicht über das sogenannte RGD-Motiv (Abed und Boivin, 2005; Boivin et al., 2005; Ito et al., 2004; Watanabe et al., 2007; Westerhuis et al., 2013a; Westerhuis et al., 2012). Im Übergang von VP1 zu 2A findet sich bei nahezu allen HPeV-Subtypen (Ausnahmen siehe unten) das sogenannte RGD-Motiv. RGD steht für die Aminosäuren Arginin-Glycin-Aspartat (Hyypia et al., 1992). RGD-Motive sind Bestandteile von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Bei zahlreichen Viren spielen sie durch Wechselwirkungen mit Zell-Oberflächen-Integrinen eine Rolle bei der Erkennung der bzw. dem Andocken an die Wirtszelle (Hynes, 1992; Ruoslahti und Pierschbacher, 1987). Für einige Vertreter der Picornaviridae (z.B. FMDV, CAV9, CAV9) sowie dem HPeV1 hat es eine entscheidende Relevanz für die Infektiosität des Virus

(Boonyakiat et al., 2001; Joki-Korpela et al., 2000). Da HPeV3 und HPeV8 jedoch für kein RGD-Motiv kodieren und einige HPeV5-Stämme sowie ein HPeV1-Stamm mit einem anderem als dem RGD-Motiv am Ende des C-Terminus des VP1 gefunden wurden ist anzunehmen, dass ein zweiter, RGD-unabhängiger, Eintrittsweg existiert (Benschop et al., 2006; Benschop et al., 2008b; Boivin et al., 2005; Drexler et al., 2009; Ito et al., 2004). Bei den in der vorliegenden Arbeit isolierten HPeV3-Strängen wurde ebenfalls kein RGD-Motiv nachgewiesen, sodass die Literaturdaten bestätigt werden konnten.

Auch eine fehlende Protektion durch maternale Antikörper als Ursache für die schwerwiegenden HPeV3-Erkrankungen wird diskutiert (Benschop et al., 2006; Harvala et al., 2010; Wildenbeest et al., 2010). Dieser Zusammenhang wurde bereits für EV beschrieben (Abzug et al., 1995). Es wird angenommen, dass HPeV3 erst seit dem Ende des letzten Jahrhunderts in der menschlichen Bevölkerung zirkuliert, sodass die aktuelle Generation der Mütter aufgrund fehlender Exposition in ihrer Kindheit selbst keine Antikörper ausbilden konnte (Calvert et al., 2010; Harvala et al., 2010).

Darüber hinaus zeigten Westerhuis et al. in einer Arbeit aus dem Jahr 2012, dass spezifische Antikörper gegen HPeV3 in vitro eine geringe Neutralisationskapazität besitzen (Westerhuis et al., 2012). Spezifische, polyklonale Antikörper gegen den japanischen HPeV3-Prototypen (HPeV3 A308-99) führten in vitro nicht zu einer Neutralisation des niederländischen HPeV3 (HPeV3-150237), trotz effizienter Bindung und obwohl eine hohe genetische Übereinstimmung zwischen beiden HPeV besteht (97-100%). Eine Neutralisierung des japanischen HPeV3-Prototypen fand statt, wenn auch mit niedrigerem Titer als zuvor beschrieben (Westerhuis et al., 2012). Weiterhin enthielten intravenös zu applizierende Immunglobuline (IVIg) neutralisierende Antikörper gegen HPeV1, nicht jedoch gegen HPeV3, obwohl HPeV3 der zweithäufigste HPeV-Subtyp ist und die Immunglobuline zu einem Zeitpunkt gewonnen wurden als HPeV3 bereits in der Bevölkerung zirkulierte. Zusätzlich wurden im Serum von HPeV3-positiven Spendern nur niedrige Titer neutralisierender Antikörper gefunden, während hohe Titer gegen HPeV1 detektiert wurden (Westerhuis et al., 2012). Auch gab es Beobachtungen, dass HPeV3-Infektionen nicht zu einem hohen Antikörpertiter führen bzw. Westerhuis et al. beobachteten in einer Studie aus dem Jahr 2013, dass der Antikörpertiter nach einer HPeV3 Infektion nur in einem von drei Fällen über einen

längeren Zeitraum erhöht war und in einem Fall sogar gar keine neutralisierenden Antikörper detektiert werden konnten (Westerhuis et al., 2013a; Westerhuis et al., 2012). Im Gegensatz hierzu blieben die Titer neutralisierender Antikörper nach einer HPeV1-Infektion dauerhaft erhöht (Tauriainen et al., 2007; Westerhuis et al., 2013a). Insgesamt beobachteten die Autoren auch nur eine sehr geringe Seropositivität gegen HPeV3 (4 % in Finnland, 8 % in den Niederlanden) (Westerhuis et al., 2013a), anders als in Japan (68 %) (Ito et al., 2004). Als mögliche Ursache werden Schwierigkeiten der Antikörperproduktion gegen HPeV3 in Erwägung gezogen (Westerhuis et al., 2013a) und dass nicht allein das Fehlen maternaler Antikörper infolge ausgebliebener mütterlicher Infektionen entscheidend ist, sondern die unzureichende Protektion vor einer HPeV3-Infektion durch neutralisierende Antikörper ebenfalls eine wichtige Rolle spielt (Westerhuis et al., 2012). Diskutiert wird aber auch, ob es sich bei diesen Ergebnissen um ein in-vitro Testartefakt handeln könnte, z.B. wegen defekter Antikörper oder einer Beeinflussung durch die verwendete Zellkultur (Westerhuis et al., 2013a; Westerhuis et al., 2013b). Ebenso ist unklar, ob Unterschiede zwischen dem Verhalten in-vitro und in-vivo existieren (Westerhuis et al., 2012). Weitere Studien werden benötigt, um alle Faktoren zu ermitteln, die den klinischen Verlauf einer HPeV3 Infektion bestimmen (Westerhuis et al., 2012). Darüber hinaus könnten Wirtsfaktoren wie das noch nicht voll entwickelte Immunsystem des Neugeborenen eine Rolle spielen.

Beide HPeV3-positiven Kinder kamen aus dem häuslichen Umfeld zur stationären Aufnahme, wobei die Ansteckungsquelle nicht sicher zu klären war. Sowohl die Mutter als auch die ältere Schwester des Säuglings litten an einer Infektion der oberen Atemwege, es standen jedoch keine klinischen Proben der Angehörigen zur virologischen Diagnostik zur Verfügung. Für das Neugeborene konnte keine Kontaktperson mit möglicher viraler Infektion eruiert werden.

Obwohl in der Literatur einige Fälle von nosokomialen Übertragungen von HPeV diskutiert werden (Berkovich und Pangan, 1968; Birenbaum et al., 1997; Ehrnst und Eriksson, 1993; Ehrnst und Eriksson, 1996; Nakao et al., 1970), wird in Studien aus Schottland, Deutschland und den Niederlanden ein Überwiegen der ambulant erworbenen HPeV Infektionen beschrieben (Baumgarte et al., 2008; Harvala et al., 2011; Verboon-Maciolek et al., 2008). Erstmals wurden 2013 in zwei Fallstudien

Übertragungsketten nachgewiesen, wobei die Ansteckung innerhalb der jeweiligen Familie stattfand und HPeV3 von einem älteren Geschwisterkind mit leichten Symptomen einer gastrointestinalen und/oder Atemwegsinfektion auf ein Neugeborenes bzw. einen Säugling übertragen wurde, welche beide an einer Sepsis-like-illness (SLI) litten (Eis-Hübinger et al., 2013). Trotz genetischer Identität der jeweiligen HPeV3-Stämme innerhalb einer Infektionskette zeigten die Individuen in Abhängigkeit vom Alter einen unterschiedlichen klinischen Verlauf (Eis-Hübinger et al., 2013). Ein signifikanter altersbedingter Unterschied zwischen dem klinischen Verlauf von HPeV3-Infektionen konnte nun bestätigt werden (Wildenbeest et al., 2014). In Zusammenschau, auch unter Berücksichtigung der oben erwähnten Beobachtungen von Westerhuis et al. sowie der Tatsache, dass HPeV3 weniger häufig als z. B. HPeV1 zu detektieren ist, werfen die Autoren die Frage auf, ob Neugeborene und Säuglinge durch konsequente Diagnostik von HPeV3 mittels PCR bei älteren Kindern mit respiratorischen oder gastrointestinalen Symptomen vor einer Infektion geschützt werden könnten (Eis-Hübinger et al., 2013). HPeV wird über einen längeren Zeitraum im Stuhl ausgeschieden (Tapia et al., 2008). Eine Detektion von HPeV3 in Stuhlproben hat, anders als HPeV1, eine eindeutige klinische Relevanz (Wildenbeest et al., 2014). Dies sollte z.B. in Kindergärten, dem Haushalt oder auch im klinischen Setting berücksichtigt werden (Eis-Hübinger et al., 2013). Auch in dieser Studie konnte bei einem Kind (Fall 1) eine Ausscheidung von HPeV3 über mindestens 13 Tage im Stuhl gezeigt werden.

Die laborchemischen Entzündungsparameter (Leukozyten und C-reaktives Protein) waren bei beiden HPeV-positiven Kindern der hier vorgelegten Arbeit trotz Sepsis bzw. Enzephalitis normwertig. Dies stimmt mit Beobachtungen von Verboon-Maciolek et al. überein (Verboon-Maciolek et al., 2008). Zwei Tage nach Symptombeginn fanden sich im Liquor des Neugeborenen keine Veränderungen bezüglich Zellzahl, Glucose- oder Eiweißgehalt oder Laktat. Die virale RNA-Konzentration lag bei ca. 25276 RNA-Kopien/ml Liquor. Aufgrund einer artifiziellen Blutung konnten diese Parameter nicht für den Liquor des Säuglings bestimmt werden, dieser wurde sieben Tage nach Symptombeginn entnommen. Hier lag die virale RNA-Konzentration bei ca. 224360 RNA-Kopien/ml Liquor.

Die Entnahme der für EV-positiven Liquorproben fand am Tag des Symptombeginns bzw. einen Tag später statt. Entsprechend den Angaben anderer Autoren, die bei zentral-nervösen EV-Infektionen häufig eine abweichende Zellzahl und seltener ein verändertes Gesamtprotein beschreiben (Landry, 2005; Sawyer, 2001; Tavakoli et al., 2008), fanden sich bei 12 von 14 EV-positiven Proben von der Norm abweichende Werte für die Zellzahl in stark variierender Größenordnung, in keinem Fall aber eine Erhöhung des Gesamteiweißes. Die beiden normalen Liquorbefunde gehören zu Kindern, bei denen klinisch nicht von einer aseptischen Meningitis gesprochen wurde. Die beiden Betroffenen sind Kinder weiblichen Geschlechts im Alter von fünf Jahren. In einem Fall handelte es sich um die Probe mit der geringsten viralen RNA-Konzentration, positive Nervendehnungszeichen wurden verneint. Im anderen Fall lag die virale RNA-Konzentration in der oberen Hälfte, ein Meningismus wurde beschrieben. Normale Werte für den Eiweißgehalt und die Zellzahl sprechen gegen eine entzündliche Veränderung der Meningen, sodass nicht von einer Meningitis gesprochen wird. Im ersten der beiden Fällen stimmen Liquorbefund und Klinik, nämlich das Fehlen positiver Nervendehnungszeichen, somit überein. Im zweiten Fall wird jedoch ein Meningismus im Untersuchungsbefund erwähnt, was zumindest klinisch für eine meningeale Affektion spricht.

Auch andere Autoren beobachteten eine normale Zellzahl im Liquor trotz EV- oder HPeV-RNA-Detektion mittels PCR (Felsenstein et al., 2014; Graham und Murdoch, 2005; Pineiro et al., 2010; Rittichier et al., 2005; Verboon-Maciolek et al., 2008; Walters et al., 2011; Wolthers et al., 2008). Das Fehlen einer Veränderung des Zellmusters im Liquor schließt eine zentralnervöse EV- bzw. HPeV3-Infektion nicht aus. Bei Symptomen einer Sepsis bzw. Meningoenzephalitis sollte daher, unabhängig vom Liquorbefund, eine Erregerdiagnostik folgen.

Auffällig ist die deutlich unterschiedliche Länge des Intervalls zwischen Symptombeginn und Lumbalpunktion eines HPeV3-Patienten verglichen mit den EV-Patienten. EV ist nur vorübergehend im Liquor zu finden und das diagnostische Fenster nur sehr kurz (ein bis zwei Tage) (Kupila et al., 2006). Vor diesem Hintergrund ist es interessant, dass HPeV3 auch noch sieben Tage nach Symptombeginn mit deutlich höheren viralen RNA-Konzentrationen im Liquor nachweisbar war. Hier könnte ein Grund für die längere Viruspersistenz im Liquor sowie das schwerwiegendere klinische Erscheinungsbild der

Betroffenen liegen, bzw. die hohe virale RNA-Konzentration ist Ausdruck der Schwere des Krankheitsbildes. Eine Korrelation zwischen Höhe der viralen Nukleinsäure-Konzentration im Liquor und klinischem Verlauf wird in der Literatur z.B. für zentralnervöse VZV-Infektionen diskutiert (Persson et al., 2009; Rottenstreich et al., 2014). Volle et al. stellen in einer Arbeit aus dem Jahr 2014 die Vermutung auf, dass bei EV-assoziierten, aseptischen Meningitiden hingegen ein Zusammenhang zwischen der Höhe der viralen RNA-Konzentration und EV-Sero- bzw. Subserotyp besteht (Volle et al., 2014). Ob und welchen Aussage- bzw. prognostischen Wert die virale RNA-Konzentration für den klinischen Verlauf von zentralnervösen HPeV-Infektionen hat, muss weiter beobachtet werden.

Beiden Kindern mit einer HPeV3 Infektion verabreichte man mehrere Antibiotika, die stationäre Liegedauer lag bei 13 bzw. > elf Tagen. In 12/14 Fällen mit einem positiven EV-Nachweis im Liquor wurde die Diagnose einer aseptischen Meningitis gestellt. Bei den anderen zwei Kindern wurde von einer viralen Infektion gesprochen, eine Enzephalitis wurde bei keinem der für EV positiven diagnostiziert. Entsprechend dem leichteren Krankheitsbild bei den Enterovirus-Infektionen lag die durchschnittliche stationäre Liegedauer mit fünf Tagen unter der der mit HPeV3 infizierten Kinder. Zwölf von 13, für ein EV-positives Kind lag diese Information nicht vor, wurden antibiotisch behandelt. Laut unten zitierten Studien kann eine schnelle Diagnostik von EV die stationäre Liegedauer verkürzen, die Dauer der Antibiotikagabe reduzieren und damit möglicherweise zu Kosteneinsparungen führen (Lai et al., 2003; Michos et al., 2007; Robinson et al., 2002; Spicher et al., 2000). Bei dem klinischen Bild einer Sepsis bzw. Enzephalitis sollte daher auch für HPeV3 ein schnelles und effizientes Nachweisverfahren in das Standard-Diagnostik-Programm aufgenommen werden. Ein wie hier verwendetes Real-time RT-PCR-Verfahren kann eine schnelle und umfassende Diagnostik garantieren. Eine Kombination aus mehreren klinischen Proben wie Liquor, Nasen-Rachen-Spülwasser und Stuhl erhöht dabei die Detektionsrate (de Crom et al., 2013).

Weiterentwicklungen von molekularbiologischen Methoden, die auch für die Diagnostik einen Fortschritt bedeuten, sind u.a. die Multiplex-PCR, in-situ-PCR-Verfahren sowie Next-generation-Sequencing. Bei der Multiplex-PCR werden Primer und Sonden zur

Detektion verschiedener Erreger in einem Ansatz kombiniert und ermöglichen so die Diagnostik mehrerer Erreger mit nur einer PCR-Reaktion. Ein Beispiel ist das Multiplex One-Step Real-time RT-PCR-Verfahren für EV sowie HPeV von Nielsen et al. (Nielsen et al., 2013). Mithilfe der in-situ PCR kann eine Amplifikation, z.B. von viralen Nukleinsäuren, direkt auf fixierten Gewebedünnschnitten oder Zellen erfolgen (Mülhardt, 2009). Next-generation-Sequencing-Anwendungen sind eine Weiterentwicklung in der Sequenzierungstechnik und verglichen mit Anwendungen, die auf der Sanger-Methode beruhen, charakterisiert durch eine schnellere, hoch-parallele sowie kosteneffiziente Sequenzierung von Genom-Fragmenten. Große Datenmengen stehen so in kurzer Zeit zur Verfügung. Dadurch ist es möglich, Informationen über die genetische Diversität einer Population, beispielsweise derjenigen eines Virus, zu gewinnen .

#### 6.4 Abschließende Betrachtung

Das HPeV3 war nach dem EV das zweithäufigste in den Bonner Liquorproben der Jahre 1998 bis 2008 nachgewiesene Virus. Zentralnervöse Infektionen mit HPeV3 scheinen sich auf die neonatale Periode bzw. die ersten Lebensmonate zu beschränken (Benschop et al., 2006; Harvala et al., 2009; Pineiro et al., 2010; Selvarangan et al., 2011; van der Sanden et al., 2008; Walters et al., 2011). Ähnlich EV wird eine Häufung der Infektionen in den Sommer- und Herbstmonaten beschrieben, ob es auch bevorzugt ein Geschlecht infiziert, muss weiter beobachtet werden. Die beiden Patienten mit HPeV3-Nachweis im Liquor litten an einer Sepsis, ein Kind zusätzlich auch an einer Enzephalitis. Beide Kinder mussten u.a. aufgrund von Atem- und Kreislaufinsuffizienz auf einer Intensivstation behandelt werden.

Zusammenfassend muss HPeV im Neugeborenen- und Säuglingsalter als möglicher Erreger einer Sepsis bzw. zentralnervösen Infektion auch bei unauffälligem Liquorbefund in Betracht gezogen werden. Da die klinische Symptomatik nicht erregerspezifisch ist und eine Detektion von HPeV durch einen EV-PCR-Assay aufgrund genetischer Differenzen nicht stattfindet, ist es notwendig, dass eine entsprechende Primer- und Sonden-Kombination in das diagnostische Procedere aufgenommen wird. Durch eine schnelle und sichere Diagnostik könnte eine aufwendige Erregersuche wohlmöglich verkürzt und der empirische Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika reduziert werden.

HSV-1 und VZV wurden jeweils bei einem Kind detektiert, HSV-2 sowie CMV wurden in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert. Ein Grund hierfür ist u. a. die Alterstruktur der Patienten-Kohorte.

## 7. Zusammenfassung

Infektionen des Zentralen Nervensystems, insbesondere durch Viren verursacht, sind ein häufiges Krankheitsbild. Eine Vielzahl von Viren kommen als Erreger in Betracht, neue wurden beschrieben, u.a. das Humane Parechovirus (HPeV). Es gehört zur Familie der *Picornaviridae*, 16 Subtypen sind aktuell bekannt. Neben HPeV1, das im Zusammenhang mit leichten respiratorischen sowie gastrointestinalen Symptomen diskutiert wird, hat vor allem HPeV3 als möglicher Erreger einer Sepsis sowie Enzephalitis bei Neugeborenen und Säuglingen eine klinische Relevanz. In dieser Arbeit haben wir neueste molekulargenetische Verfahren angewandt, um bei Patienten der Universitätskinderklinik Bonn die Ätiologie einer Meningitis bzw. Enzephalitis zu klären und, unter Berücksichtigung der Krankheitsverläufe, mögliche Konsequenzen für Diagnostik und Therapie daraus abzuleiten.

349 Liquorproben von 327 Patienten aus den Jahren 1998 bis 2008 wurden mittels Real-time (RT)-PCR-Verfahren auf das Humane Parechovirus (HPeV), Enterovirus (EV), Herpes simplex-Virus Typ 1 und 2 (HSV-1 und -2) sowie das Varizella-Zoster-Virus (VZV) und Zytomegalievirus (CMV) getestet. RNA-Fragmente der Virusgenome positiver Proben wurden sequenziert und typisiert. Klinische Daten wurden anhand der Krankenakten erhoben.

HPeV3 war mit einer Prävalenz von 0,6 % (2/327) nach EV mit einer Prävalenz von 4,3 % (14/327) das am zweithäufigste detektierte Virus. Bei den betroffenen Patienten handelte es sich um ein Neugeborenes sowie einen Säugling von sechs Wochen, die EV-Infizierten waren im Mittel fünf Jahre alt (Spanne: ein Monat bis 14 Jahre). HSV-1 und VZV wurden jeweils einmal, HSV-2 und CMV wurden nicht detektiert. Patienten mit einer HPeV-Infektion litten an einer Sepsis bzw. Enzephalitis, die EV-Infizierten mehrheitlich an einer aseptischen Meningitis bzw. unspezifischen Symptomen. Der Liquorstatus der HPeV3-Infizierten war unauffällig, bei den EV-Infizierten wurde bei 12 von 14 abweichende Werte der Zellzahl festgestellt.

Zusammenfassend muss im Neugeborenen- und Säuglingsalter neben EV auch HPeV als möglicher Erreger einer Sepsis bzw. Infektion des ZNS in Betracht gezogen werden, auch bei unauffälligem Liquorbefund. Ein virus-spezifisches Real-time RT-PCR-Verfahren sollte bei entsprechender Symptomatik in das diagnostische Procedere

aufgenommen werden. Durch eine schnelle und sichere Diagnostik ist eine Verkürzung der diagnostischen Untersuchungen sowie die Reduktion des empirischen Einsatzes von Breitspektrum-Antibiotika möglich.

## 8. Literaturverzeichnis

Abed Y, Boivin G. Molecular characterization of a Canadian human parechovirus (HPeV)-3 isolate and its relationship to other HPeVs. *J Med Virol* 2005; 77: 566-570

Abzug MJ, Keyserling HL, Lee ML, Levin MJ, Rotbart HA. Neonatal enterovirus infection: virology, serology, and effects of intravenous immune globulin. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1201-1206

Adams MJ, King AM, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Arch Virol* 2013; 158: 2023-2030

Al-Sunaidi M, Williams C, Hughes P, Schnurr D, Stanway G. Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *J Virol* 2007; 81: 1013-1021

Antona D, Leveque N, Chomel JJ, Dubrou S, Levy-Bruhl D, Lina B. Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 403-412

Auvinen P, Hyypia T. Echoviruses include genetically distinct serotypes. *J Gen Virol* 1990; 71 ( Pt 9): 2133-2139

Auvinen P, Stanway G, Hyypia T. Genetic diversity of enterovirus subgroups. *Arch Virol* 1989; 104: 175-186

Aviner S, Sofer D, Shulman LM, Bibi H, Weitzman S. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Associated With Parechovirus 3 Infection. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013: e251-253

Bauer H, Wigand R, Globig W, Ababio AR. Säuglings-Enteritis bei Infektion mit ECHO-Virus Typ 22. *Archiv für Virusforschung* 1962; Band XII: 701-705

Baumgarte S, de Souza Luna L, Grywna K, Panning M, Drexler J, Karsten C, Huppertz H, Drosten C. Prevalence, types, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a sixth parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 242-248

Benschop K, Minnaar R, Koen G, van Eijk H, Dijkman K, Westerhuis B, Molenkamp R, Wolthers K. Detection of human enterovirus and human parechovirus (HPEV) genotypes from clinical stool samples: polymerase chain reaction and direct molecular typing, culture characteristics, and serotyping. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010a; 68: 166-173

Benschop KS, de Vries M, Minnaar RP, Stanway G, van der Hoek L, Wolthers KC, Simmonds P. Comprehensive full-length sequence analyses of human parechoviruses: diversity and recombination. *J Gen Virol* 2010b; 91: 145-154

Benschop KS, Molenkamp R, van der Ham A, Wolthers K, Beld M. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *J Clin Virol* 2008a; 41: 69-74

Benschop KS, Schinkel J, Minnaar RP, Pajkrt D, Spanjerberg L, Kraakman HC, Berkhout B, Zaaijer HL, Beld MG, Wolthers KC. Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 204-210

Benschop KS, Thomas X, Serpenti C, Molenkamp R, Wolthers K. High prevalence of human Parechovirus (HPEV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPEV variants by direct genotyping of stool samples. *J Clin Microbiol* 2008b; 46: 3965-3970

Benschop KS, Williams CH, Wolthers KC, Stanway G, Simmonds P. Widespread recombination within human parechoviruses: analysis of temporal dynamics and constraints. *J Gen Virol* 2008c; 89: 1030-1035

Berkovich S, Pangan J. Recoveries of virus from premature infants during outbreaks of respiratory disease: the relation of ECHO virus type 22 to disease of the upper and lower respiratory tract in the premature infant. *Bull N Y Acad Med* 1968; 44: 377-387

Berlin LE, Rorabaugh ML, Heldrich F, Roberts K, Doran T, Modlin JF. Aseptic meningitis in infants < 2 years of age: diagnosis and etiology. *J Infect Dis* 1993; 168: 888-892

Beyrer K, Korn K, Raab K, Schaffer A, Windorfer A. Echovirus-30-bedingte Meningitiden. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2010; 158: 273-280

Birenbaum E, Handsher R, Kuint J, Dagan R, Raichman B, Mendelson E, Linder N. Echovirus type 22 outbreak associated with gastro-intestinal disease in a neonatal intensive care unit. *Am J Perinatol* 1997; 14: 469-473

Blomqvist S, Paananen A, Savolainen-Kopra C, Hovi T, Roivainen M. Eight years of experience with molecular identification of human enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2410-2413

Boivin G, Abed Y, Boucher FD. Human parechovirus 3 and neonatal infections. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 103-105

Boonyakiat Y, Hughes PJ, Ghazi F, Stanway G. Arginine-glycine-aspartic acid motif is critical for human parechovirus 1 entry. *J Virol* 2001; 75: 10000-10004

Calvert J, Chieochansin T, Benschop KS, McWilliam Leitch EC, Drexler JF, Grywna K, da Costa Ribeiro H, Jr., Drosten C, Harvala H, Poovorawan Y, Wolthers KC, Simmonds P. Recombination dynamics of human parechoviruses: investigation of type-specific differences in frequency and epidemiological correlates. *J Gen Virol* 2010; 91: 1229-1238

Coller BA, Chapman NM, Beck MA, Pallansch MA, Gauntt CJ, Tracy SM. Echovirus 22 is an atypical enterovirus. *J Virol* 1990; 64: 2692-2701

Connell C, Tong HI, Wang Z, Allmann E, Lu Y. New approaches for enhanced detection of enteroviruses from Hawaiian environmental waters. *PLoS One* 2012; 7: e32442

Dagan R. Nonpolio enteroviruses and the febrile young infant: epidemiologic, clinical and diagnostic aspects. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 67-71

Davison KL, Crowcroft NS, Ramsay ME, Brown DW, Andrews NJ. Viral encephalitis in England, 1989-1998: what did we miss? *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 234-240

de Crom SC, Obihara CC, de Moor RA, Veldkamp EJ, van Furth AM, Rossen JW. Prospective comparison of the detection rates of human enterovirus and parechovirus RT-qPCR and viral culture in different pediatric specimens. *J Clin Virol* 2013; 58: 449-454

de Souza Luna L, Baumgarte S, Grywna K, Panning M, Drexler J, Drosten C. Identification of a contemporary human parechovirus type 1 by VIDISCA and characterisation of its full genome. *Viol J* 2008; 5: 26

de Vries M, Pyrc K, Berkhout R, Vermeulen-Oost W, Dijkman R, Jebbink MF, Bruisten S, Berkhout B, van der Hoek L. Human parechovirus type 1, 3, 4, 5, and 6 detection in picornavirus cultures. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 759-762

Diener HC, Putzki N. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Essen: Georg Thieme Verlag KG, 2008

Dierssen U, Rehren F, Henke-Gendo C, Harste G, Heim A. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol* 2008; 42: 58-64

Drexler JF, Grywna K, Stocker A, Almeida PS, Medrado-Ribeiro TC, Eschbach-Bludau M, Petersen N, da Costa-Ribeiro Jr H, Drosten C. Novel human parechovirus from Brazil. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 310-313

Ehrnst A, Eriksson M. Echovirus type 23 observed as a nosocomial infection in infants. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 205-206

Ehrnst A, Eriksson M. Epidemiological features of type 22 echovirus infection. *Scand J Infect Dis* 1993; 25: 275-281

Eis-Hübinger AM, Eckerle I, Helmer A, Reber U, Dresbach T, Buderus S, Drosten C, Muller A. Two cases of sepsis-like illness in infants caused by human parechovirus traced back to elder siblings with mild gastroenteritis and respiratory symptoms. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 715-718

Felsenstein J. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 521-565

Felsenstein S, Yang S, Eubanks N, Sobrera E, Grimm JP, Aldrovandi G. Human Parechovirus Central Nervous System Infections in Southern California Children. *Pediatr Infect Dis J* 2014; 33: e87-91

Figueroa JP, Ashley D, King D, Hull B. An outbreak of acute flaccid paralysis in Jamaica associated with echovirus type 22. *J Med Virol* 1989; 29: 315-319

Fowlkes AL, Honarmand S, Glaser C, Yagi S, Schnurr D, Oberste MS, Anderson L, Pallansch MA, Khetsuriani N. Enterovirus-associated encephalitis in the California encephalitis project, 1998-2005. *J Infect Dis* 2008; 198: 1685-1691

Ghazi F, Ataei Z, Dabirmanesh B. Molecular detection of human parechovirus type 1 in stool samples from children with diarrhea. *Int J Infect Dis* 2012; 16: e673-676

Glaser CA, Gilliam S, Schnurr D, Forghani B, Honarmand S, Khetsuriani N, Fischer M, Cossen CK, Anderson LJ. In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998-2000. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 731-742

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

Graham AK, Murdoch DR. Association between cerebrospinal fluid pleocytosis and enteroviral meningitis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1491

Griffin DE. Emergence and re-emergence of viral diseases of the central nervous system. *Prog Neurobiol* 2010; 91: 95-101

Grist NR, Bell EJ, Assaad F. Enteroviruses in human disease. *Prog Med Virol* 1978; 24: 114-157

Harvala H, McLeish N, Kondracka J, McIntyre CL, McWilliam Leitch EC, Templeton K, Simmonds P. Comparison of human parechovirus and enterovirus detection frequencies in cerebrospinal fluid samples collected over a 5-year period in edinburgh: HPeV type 3 identified as the most common picornavirus type. *J Med Virol* 2011; 83: 889-896

Harvala H, Robertson I, Chieochansin T, McWilliam Leitch EC, Templeton K, Simmonds P. Specific association of human parechovirus type 3 with sepsis and fever in young infants, as identified by direct typing of cerebrospinal fluid samples. *J Infect Dis* 2009; 199: 1753-1760

Harvala H, Robertson I, McWilliam Leitch EC, Benschop K, Wolthers KC, Templeton K, Simmonds P. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3446-3453

Harvala H, Simmonds P. Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance. *J Clin Virol* 2009; 45: 1-9

Harvala H, Wolthers KC, Simmonds P. Parechoviruses in children: understanding a new infection. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23: 224-230

Hovi T, Stenvik M, Rosenlew M. Relative abundance of enterovirus serotypes in sewage differs from that in patients: clinical and epidemiological implications. *Epidemiol Infect* 1996; 116: 91-97

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25

Hyypia T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, Kalkkinen N, Auvinen P, Kinnunen L, Stanway G. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 8847-8851

Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol* 2004; 85: 391-398

Joki-Korpela P, Hyypia T. Diagnosis and epidemiology of echovirus 22 infections. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 129-136

Joki-Korpela P, Roivainen M, Lankinen H, Poyry T, Hyypia T. Antigenic properties of human parechovirus 1. *J Gen Virol* 2000; 81: 1709-1718

Kessler HH, Muhlbauer G, Rinner B, Stelzl E, Berger A, Dorr HW, Santner B, Marth E, Rabenau H. Detection of Herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2638-2642

Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ* 2006a; 55: 1-20

Khetsuriani N, Lamonte A, Oberste MS, Pallansch M. Neonatal enterovirus infections reported to the national enterovirus surveillance system in the United States, 1983-2003. *Pediatr Infect Dis J* 2006b; 25: 889-893

Kieslich M, Acconci D, Berger A, Jarisch A, Bohles H, Bollinger M, Jacobi G, Hernaiz Driever P. [Diagnosis and outcome of neurotropic enterovirus infections in childhood]. *Klin Padiatr* 2002; 214: 327-331

Kim Pham NT, Trinh QD, Takanashi S, Abeysekera C, Abeygunawardene A, Shimizu H, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Novel human parechovirus, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 130-132

Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Lindberg M, Pallansch MA, Palmenberg AC, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell R. Picornaviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, ed. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier; 2012: 855-880

Kolehmainen P, Oikarinen S, Koskiniemi M, Simell O, Ilonen J, Knip M, Hyoty H, Tauriainen S. Human parechoviruses are frequently detected in stool of healthy Finnish children. *J Clin Virol* 2012; 54: 156-161

Koskiniemi M, Paetau R, Linnavuori K. Severe encephalitis associated with disseminated echovirus 22 infection. *Scand J Infect Dis* 1989; 21: 463-466

Koskiniemi M, Rantalaiho T, Piiparinen H, von Bonsdorff CH, Farkkila M, Jarvinen A, Kinnunen E, Koskiniemi S, Mannonen L, Mutttilainen M, Linnavuori K, Porras J, Puolakkainen M, Raiha K, Salonen EM, Ukkonen P, Vaheri A, Valtonen V. Infections of the central nervous system of suspected viral origin: a collaborative study from Finland. *J Neurovirol* 2001; 7: 400-408

Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R, Hukkanen V, Marttila RJ, Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology* 2006; 66: 75-80

Kupila L, Vuorinen T, Vainionpaa R, Marttila RJ, Kotilainen P. Diagnosis of enteroviral meningitis by use of polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid, stool, and serum specimens. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 982-987

Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-238

Lai KK, Cook L, Wendt S, Corey L, Jerome KR. Evaluation of real-time PCR versus PCR with liquid-phase hybridization for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3133-3141

Landry ML. Frequency of normal cerebrospinal fluid protein level and leukocyte count in enterovirus meningitis. *J Clin Virol* 2005; 32: 73-74

Legay V, Chomel JJ, Fernandez E, Lina B, Aymard M, Khalfan S. Encephalomyelitis due to human parechovirus type 1. *J Clin Virol* 2002; 25: 193-195

Lentze MJ, Schaub J, Schulte FJ, Spranger J. Pädiatrie. Grundlagen und Praxis. Bonn, Kiel, Hamburg, Mainz: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007

Lim KA, Benyesh-Melnick M. Typing of viruses by combinations of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (Coxsackie and ECHO). *J Immunol* 1960; 84: 309-317

Lindberg AM, Andersson P, Savolainen C, Mulders MN, Hovi T. Evolution of the genome of Human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species. *J Gen Virol* 2003; 84: 1223-1235

Lukashev AN. Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev Med Virol* 2005; 15: 157-167

Maguire HC, Atkinson P, Sharland M, Bendig J. Enterovirus infections in England and Wales: laboratory surveillance data: 1975 to 1994. *Commun Dis Public Health* 1999; 2: 122-125

Maller HM, Powars DF, Horowitz RE, Portnoy B. Fatal myocarditis associated with ECHO virus, type 22, infection in a child with apparent immunological deficiency. *J Pediatr* 1967; 71: 204-210

Mayo MA, Pringle CR. Virus taxonomy--1997. *J Gen Virol* 1998; 79 ( Pt 4): 649-657

Michos AG, Syriopoulou VP, Hadjichristodoulou C, Daikos GL, Lagona E, Douridas P, Mostrou G, Theodoridou M. Aseptic meningitis in children: analysis of 506 cases. *PLoS One* 2007; 2: e674

Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Peigue-Lafeuille H, Bailly JL. Emergence of recent echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events. *J Gen Virol* 2007; 88: 166-176

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2010

Moore M. Centers for Disease Control. Enteroviral disease in the United States, 1970-1979. *J Infect Dis* 1982; 146: 103-108

Muir P, Kammerer U, Korn K, Mulders MN, Poyry T, Weissbrich B, Kandolf R, Cleator GM, van Loon AM. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 202-227

Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 263-273

Nakao T, Miura R, Sato M. ECHO virus type 22 infection in a premature infant. *Tohoku J Exp Med* 1970; 102: 61-68

Nasri D, Bouslama L, Omar S, Saoudin H, Bourlet T, Aouni M, Pozzetto B, Pillet S. Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2370-2379

Nielsen AC, Bottiger B, Midgley SE, Nielsen LP. A novel enterovirus and parechovirus multiplex one-step real-time PCR-validation and clinical experience. *J Virol Methods* 2013; 193: 359-363

Nix W, Maher K, Johansson E, Niklasson B, Lindberg A, Pallansch M, Oberste M. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2519-2524

O'Regan S, Robitaille P, Mongeau JG, McLaughlin B. The hemolytic uremic syndrome associated with ECHO 22 infection. *Clin Pediatr (Phila)* 1980; 19: 125-127

Oberste MS, Maher K, Kennett ML, Campbell JJ, Carpenter MS, Schnurr D, Pallansch MA. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol* 1999a; 37: 3928-3933

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999b; 73: 1941-1948

Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Specific detection of echoviruses 22 and 23 in cell culture supernatants by RT-PCR. *J Med Virol* 1999c; 58: 178-181

Pahud BA, Glaser CA, Dekker CL, Arvin AM, Schmid DS. Varicella zoster disease of the central nervous system: epidemiological, clinical, and laboratory features 10 years after the introduction of the varicella vaccine. *J Infect Dis* 2011; 203: 316-323

Pajkrt D, Benschop KS, Westerhuis B, Molenkamp R, Spanjerberg L, Wolthers KC. Clinical characteristics of human parechoviruses 4-6 infections in young children. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28: 1008-1010

Palacios G, Casas I, Cisterna D, Trallero G, Tenorio A, Freire C. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages. *J Virol* 2002; 76: 4940-4949

Persson A, Bergstrom T, Lindh M, Namvar L, Studahl M. Varicella-zoster virus CNS disease--viral load, clinical manifestations and sequels. *J Clin Virol* 2009; 46: 249-253

Peyret N, Seneviratne PA, Allawi HT, SantaLucia J Jr. Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A.A, C.C, G.G, and T.T mismatches. *Biochemistry* 1999; 38: 3468-3477

Pham NT, Takanashi S, Tran DN, Trinh QD, Abeysekera C, Abeygunawardene A, Khamrin P, Okitsu S, Shimizu H, Mizuguchi M, Ushijima H. Human parechovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in Sri Lanka. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 364-366

Pineiro L, Vicente D, Montes M, Hernandez-Dorransoro U, Cilla G. Human parechoviruses in infants with systemic infection. *J Med Virol* 2010; 82: 1790-1796

Piralla A, Furione M, Rovida F, Marchi A, Stronati M, Gerna G, Baldanti F. Human parechovirus infections in patients admitted to hospital in Northern Italy, 2008-2010. *J Med Virol* 2012; 84: 686-690

Poeck K, Hacke W. Neurologie. Aachen und Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2006

Preiser W, Brink NS, Ayliffe U, Peggs KS, Mackinnon S, Tedder RS, Garson JA. Development and clinical application of a fully controlled quantitative PCR assay for cell-free cytomegalovirus in human plasma. *J Clin Virol* 2003; 26: 49-59

Ramos-Alvarez M, Sabin AB. Enteropathogenic viruses and bacteria; role in summer diarrheal diseases of infancy and early childhood. *J Am Med Assoc* 1958; 167: 147-156

Rittichier KR, Bryan PA, Bassett KE, Taggart EW, Enriquez FR, Hillyard DR, Byington CL. Diagnosis and outcomes of enterovirus infections in young infants. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 546-550

RKI. Häufungen von Echovirus-30-bedingten Meningitiden 2013. *Epid Bull* 2013; 40: 405-406

RKI. Zum Vorkommen von Enterovirus-Infektionen im Jahr 2000. Virusmeningitis besonders durch ECHO-Viren der Serotypen 13, 30 und 6. *Epid Bull* 2001; 2: 7-9

Robinson CC, Willis M, Meagher A, Gieseke KE, Rotbart H, Glode MP. Impact of rapid polymerase chain reaction results on management of pediatric patients with enteroviral meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 283-286

Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 971-981

Rotbart HA, Brennan PJ, Fife KH, Romero JR, Griffin JA, McKinlay MA, Hayden FG. Enterovirus meningitis in adults. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 896-898

Rotbart HA, McCracken GH, Jr., Whitley RJ, Modlin JF, Cascino M, Shah S, Blum D. Clinical significance of enteroviruses in serious summer febrile illnesses of children. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 869-874

Rottenstreich A, Oz ZK, Oren I. Association between viral load of varicella zoster virus in cerebrospinal fluid and the clinical course of central nervous system infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79: 174-177

Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; 238: 491-497

Russell SJM, Bell EJ. Echovirus and carditis. *Lancet* 1980; 1: 784-785

Sainato R, Flanagan R, Mahlen S, Fairchok M, Braun L. Severe human parechovirus sepsis beyond the neonatal period. *J Clin Virol* 2011; 51: 73-74

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-425

Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13: 65-69

Schnurr D, Dondero M, Holland D, Connor J. Characterization of echovirus 22 variants. *Arch Virol* 1996; 141: 1749-1758

Schuffenecker I, Javouhey E, Gillet Y, Kugener B, Billaud G, Floret D, Lina B, Morfin F. Human parechovirus infections, Lyon, France, 2008-10: evidence for severe cases. *J Clin Virol* 2012; 54: 337-341

Selvarangan R, Nzabi M, Selvaraju SB, Ketter P, Carpenter C, Harrison CJ. Human parechovirus 3 causing sepsis-like illness in children from midwestern United States. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: 238-242

Shaver DN, Barron AL, Karzon DT. Distinctive Cytopathology of ECHO Viruses Types 22 and 23. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961; 106: 648-652

Simmonds P, Welch J. Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J Virol* 2006; 80: 483-493

Spicher VM, Berclaz PY, Cheseaux JJ, Morandi PA, Suter S, Wunderli W, Siegrist CA. Detection of enteroviruses in the cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction: prospective study of impact on the management of hospitalized children. *Clin Pediatr (Phila)* 2000; 39: 203-208

Stanway G, Kalkkinen N, Roivainen M, Ghazi F, Khan M, Smyth M, Meurman O, Hyypia T. Molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a new picornavirus group. *J Virol* 1994; 68: 8232-8238

Stocher M, Leb V, Bozic M, Kessler HH, Halwachs-Baumann G, Landt O, Stekel H, Berg J. Parallel detection of five human herpes virus DNAs by a set of real-time polymerase chain reactions in a single run. *J Clin Virol* 2003; 26: 85-93

Takao S, Shimazu Y, Fukuda S, Noda M, Miyazaki K. Seroepidemiological study of human Parechovirus 1. *Jpn J Infect Dis* 2001; 54: 85-87

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 1596-1599

Tapia G, Cinek O, Witso E, Kulich M, Rasmussen T, Grinde B, Ronningen KS. Longitudinal observation of parechovirus in stool samples from Norwegian infants. *J Med Virol* 2008; 80: 1835-1842

Tauriainen S, Martiskainen M, Oikarinen S, Lonrot M, Viskari H, Ilonen J, Simell O, Knip M, Hyoty H. Human parechovirus 1 infections in young children--no association with type 1 diabetes. *J Med Virol* 2007; 79: 457-462

Tavakoli NP, Wang H, Nattanmai S, Dupuis M, Fusco H, Hull R. Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis. *J Clin Virol* 2008; 43: 207-211

Thoelen I, Lemey P, Van Der Donck I, Beuselinck K, Lindberg AM, Van Ranst M. Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J Med Virol* 2003; 70: 420-429

Trallero G, Casas I, Tenorio A, Echevarria JE, Castellanos A, Lozano A, Brena PP. Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). *Epidemiol Infect* 2000; 124: 497-506

van der Sanden S, de Bruin E, Vennema H, Swanink C, Koopmans M, van der Avoort H. Prevalence of human parechovirus in the Netherlands in 2000 to 2007. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2884-2889

Verboon-Maciolek MA, Krediet TG, Gerards LJ, de Vries LS, Groenendaal F, van Loon AM. Severe neonatal parechovirus infection and similarity with enterovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 241-245

Verboon-Maciolek MA, Nijhuis M, van Loon AM, van Maarsseveen N, van Wieringen H, Pekelharing-Berghuis MA, Krediet TG, Gerards LJ, Flier A, Diepersloot RJ, Thijsen SF. Diagnosis of enterovirus infection in the first 2 months of life by real-time polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1-6

Verstrepen W, Kuhn S, Kockx M, Van De Vyvere M, Mertens A. Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-time reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4093-4096

Volle R, Bailly JL, Mirand A, Pereira B, Marque-Juillet S, Chambon M, Regagnon C, Brebion A, Henquell C, Peigue-Lafeuille H, Archimbaud C. Variations in cerebrospinal fluid viral loads among enterovirus genotypes in patients hospitalized with laboratory-confirmed meningitis due to enterovirus. *J Infect Dis* 2014; 210: 576-584

Walters B, Penaranda S, Nix WA, Oberste MS, Todd KM, Katz BZ, Zheng X. Detection of human parechovirus (HPeV)-3 in spinal fluid specimens from pediatric patients in the Chicago area. *J Clin Virol* 2011; 52: 187-191

Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fujii M. Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 889-895

Westerhuis B, Kolehmainen P, Benschop K, Nurminen N, Koen G, Koskiniemi M, Simell O, Knip M, Hyoty H, Wolthers K, Tauriainen S. Human parechovirus seroprevalence in Finland and the Netherlands. *J Clin Virol* 2013a; 58: 211-215

Westerhuis BM, Jonker SC, Mattao S, Benschop KS, Wolthers KC. Growth characteristics of human parechovirus 1 to 6 on different cell lines and cross-neutralization of human parechovirus antibodies: a comparison of the cytopathic effect and real time PCR. *Virol J* 2013b; 10: 146

Westerhuis BM, Koen G, Wildenbeest JG, Pajkrt D, de Jong MD, Benschop KS, Wolthers KC. Specific cell tropism and neutralization of human parechovirus types 1 and 3: implications for pathogenesis and therapy development. *J Gen Virol* 2012; 93: 2363-2370

Whitley RJ, Gnann JW. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *Lancet* 2002; 359: 507-513

Wigand R, Sabin AB. Properties of ECHO Types 22, 23 and 24 Viruses. *Archiv für Virusforschung* 1961; Band XI: 224-247

Wildenbeest JG, Benschop KS, Minnaar RP, Bouma de Jongh S, Wolthers KC, Pajkrt D. Clinical relevance of positive human parechovirus (HPeV) type 1 and 3 PCR in stool samples. *Clin Microbiol Infect* 2014:

Wildenbeest JG, Harvala H, Pajkrt D, Wolthers KC. The need for treatment against human parechoviruses: how, why and when? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8: 1417-1429

Williams CH, Panayiotou M, Girling GD, Peard CI, Oikarinen S, Hyoty H, Stanway G. Evolution and conservation in human parechovirus genomes. *J Gen Virol* 2009; 90: 1702-1712

Wolthers K, Benschop K, Schinkel J, Molenkamp R, Bergevoet R, Spijkerman I, Kraakman H, Pajkrt D. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 358-363

Wong K, Onan BM, Xagorarakis I. Quantification of enteric viruses, pathogen indicators, and *Salmonella* bacteria in class B anaerobically digested biosolids by culture and molecular methods. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 6441-6448

Zhong H, Lin Y, Sun J, Su L, Cao L, Yang Y, Xu J. Prevalence and genotypes of human parechovirus in stool samples from hospitalized children in Shanghai, China, 2008 and 2009. *J Med Virol* 2011; 83: 1428-1434

Zoll J, Galama JM, van Kuppeveld FJ. Identification of potential recombination breakpoints in human parechoviruses. *J Virol* 2009; 83: 3379-3383

## 9. Danksagung

Ich möchte herzlich Herrn Professor Dr. med. C. Drost für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie Frau Professor Dr. med. vet. A.-M. Eis-Hübinger, Herrn Professor Dr. med. M. Panning, Herrn Professor Dr. med. J. F. Drexler und Herrn Dr. rer. nat. M. A. Müller für die ausgezeichnete inhaltliche und organisatorische Betreuung danken. Insbesondere danke ich für die tatkräftige Unterstützung und Geduld sowie das unermüdliche Engagement, wodurch diese Arbeit erst möglich wurde und ich viel lernen konnte.

Ich bedanke mich außerdem bei den freundlichen und hilfreichen Mitarbeitern des Institutes für Virologie des Universitätsklinikums Bonn, insbesondere seien hier Frau Monika Eschbach-Bludau und Frau Ulrike Reber genannt, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen und mich ebenfalls tatkräftig unterstützten.

Dank gebührt auch Herrn Professor Dr. med. Andreas Müller sowie Herrn Professor Dr. med. A. Simon aus dem Zentrum für Kinderheilkunde, Neonatologie und pädiatrischen Intensivmedizin des Universitätsklinikums Bonn für die hervorragende Zusammenarbeit. Weiterhin möchte ich Herrn Univ.-Professor Dr. med. H. H. Schild aus der Radiologischen Klinik des Universitätsklinikums Bonn sowie Herrn Dr. med. T. Scheffer aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Perinatal- und Stoffwechselforschungszentrum „Klinikum am Steineberg“ in Reutlingen für die Unterstützung sowie Zurverfügungstellung der verwendeten MRT-Bilder danken.

Auch danke ich meiner Familie für ihre tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen, die mir das Studium der Humanmedizin und die Anfertigung der Dissertation ermöglicht hat.