

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

**Nachweis humaner WU-Polyomavirus-DNA mittels
real-time Polymerase Kettenreaktion in Nasenrachensekreten, Serum- und
Stuhlproben von Kindern mit akuten respiratorischen Erkrankungen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anika Pröttel

aus Nienburg/Weser

Würzburg, September 2011

Referent: Prof. Dr. Axel Rethwilm

Korreferentin: Prof. Dr. Dr. Marianne Abele-Horn

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2012

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Viren als Erreger respiratorischer Infektionen.....	1
1.2 Polyomaviren	1
1.2.1 Entdeckung und Einteilung der Polyomaviren.....	1
1.2.2 Krankheitsbilder der humanpathogenen Polyomaviren BK und JC	3
1.3 Die Polyomaviren WU und KI.....	4
1.3.1 Erstbeschreibung der Polyomaviren WU und KI	4
1.3.2 Aufbau und Funktion des WUPyV-Genom.....	4
1.3.3 Epidemiologie des WUPyV	6
1.3.4 Klinische Relevanz des WUPyV	7
1.4 Ziele der Arbeit.....	11
2 MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1 Patientenproben.....	12
2.2 Nachweis von WUPyV-DNA mittels real-time-PCR	13
2.2.1 DNA-Extraktion.....	13
2.2.2 Ansatz und Auswertung der WUPyV-real-time-PCR	13
2.2.3 Überprüfung der Amplifikationseffizienz in Stuhlproben	16
2.4 Abklärung von Diskrepanzen zwischen real-time-WUPyV-PCR und Voruntersuchungen mit qualitativer konventioneller WUPyV-PCR	16
2.5 Qualitative WUPyV-PCR in der nicht-kodierenden Genomregion.....	18
2.5.1 Ansatz der qualitativen WUPyV-PCR	18
2.5.2 Sequenzanalyse zum Spezifitätsnachweis der qualitativen PCR	19
2.6 Statistische Analysen	20
3 ERGEBNISSE	22
3.1 Validierung der quantitativen WUPyV-real-time-PCR	22
3.2 Vergleich der Ergebnisse der WUPyV-real-time-PCR und der konventionellen WUPyV-PCR	26
3.3 Quantitative WUPyV-real-time-PCR der Nasenrachensekrete	32

3.4 Krankheitsbilder und Koinfektionen bei Kindern mit WUPyV-Nachweis.....	32
3.5 WUPyV-real-time-PCR von Serum- und Stuhlproben.....	36
3.6 WUPyV-Last in NRS und Infektionsalter	39
3.7 WUPyV-Last in NRS und jahreszeitliche Verteilung	40
4 DISKUSSION.....	42
4.1 Vergleich der quantitativen WUPyV-real-time-PCR mit der qualitativen WUPyV-PCR.....	42
4.2 Vergleich der WUPyV-Prävalenz mit anderen WUPyV-Arbeiten	43
4.3 Vergleich mit anderen WUPyV-real-time-PCR-Arbeiten	44
4.4 WUPyV-real-time-PCR und Viruslast	49
4.5 WUPyV-Nachweis in NRS und klinische Diagnose	50
4.6 WUPyV und Koinfektionen	51
4.7 WUPyV-Nachweis in Serum- und Stuhlproben.....	52
4.8 WUPyV-Last, Altersverteilung und jahreszeitliche Verteilung	53
4.9 WUPyV und Onkogenese?	54
4.10 Bedeutung der WUPyV-real-time-PCR für den Kausalitätsnachweis zwischen Virus und Erkrankung.....	55
4.11 Bedeutung des WUPyV-Nachweises in NRS-Proben für den Menschen	56
5 ZUSAMMENFASSUNG	58
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	60
7 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	67
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	69

1 Einleitung

1.1 Viren als Erreger respiratorischer Infektionen

Infektionen des Respirationstraktes sind ein Hauptgrund für Erkrankungen des Menschen. Dabei stellen Viren neben einer Vielzahl bakterieller Erreger mit Abstand die häufigste Ursache dieser respiratorischen Infektionen dar. Die respiratorischen Viren können in die „klassischen“ pathogenetisch bereits gut untersuchten respiratorischen Viren sowie in die mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden in den letzten Jahren entdeckten „neuen“ respiratorischen Viren unterteilt werden (Fouchier *et al.*, 2005). Zu ersteren zählen die Influenzaviren A und B, die Parainfluenzaviren 1 - 4, das Respiratory-Syncytial-Virus (RSV), Adenoviren, Rhinoviren und Coronaviren. Zu letzteren zählen das humane Metapneumovirus (van den Hoogen *et al.*, 2001), das SARS-Coronavirus (Ksiazek *et al.*, 2003), das Coronavirus NL63 (van der Hoek *et al.*, 2004), das Coronavirus HKU1 (Woo *et al.*, 2005), das humane Bocavirus (hBoV) (Allander *et al.*, 2005) sowie die beiden zuletzt neu entdeckten Polyomaviren, das KI-Polyomavirus (KIPyV) (Allander *et al.*, 2007 a) und das WU-Polyomavirus (WUPyV) (Gaynor *et al.*, 2007). Während ein humanpathogenes Potenzial für die „klassischen“ respiratorischen Viren und auch für einige der „neuen“ respiratorischen Viren gesichert ist, besteht diesbezüglich für hBoV sowie für WUPyV und KIPyV noch Unkenntnis. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Epidemiologie und der möglichen klinischen Relevanz des WUPyV.

1.2 Polyomaviren

1.2.1 Entdeckung und Einteilung der Polyomaviren

Die Polyomaviren werden der Familie der Polyomaviridae zugeordnet. Sie besteht aus dem Genus Polyomavirus, welches unter anderem die menschlichen Polyomaviren BK (BKV) und JC (JCV) sowie mehrere tierische Polyomaviren enthält, wie zum Beispiel die Typ-Spezies Simian Virus 40 (SV40).

Das zuerst entdeckte Mitglied der Familie der Polyomaviridae war das Mauspolyomavirus. Es wurde 1953 von Ludwik Gross beschrieben, damals noch als „Parotistumorvirus“ (Gross 1953, 1976). Er stellte fest, dass die aus den leukämischen Organen von Mäusen gewonnenen Extrakte nicht nur ein Leukämievirus enthielten, sondern noch ein weiteres Virus, das Parotistumoren und andere Neoplasien verursacht. Sarah Stewart und Bernice Eddy beschrieben 1957 bis 1959 in einer Reihe von Veröffentlichungen das hohe onkogene Potential des Mauspolyomavirus und die Möglichkeit der Entstehung verschiedener Tumore nach Einbringen dieses Virus in neugeborene Hamster oder Ratten. Sie bezeichneten dieses Virus 1958 bei der Beschreibung des zytopathischen Effekts des Mauspolyomavirus in Mausembryonenzellen als Polyomavirus (Eddy *et al.*, 1958 a, b, c; Eddy *et al.*, 1959 a, b, c; Stewart *et al.*, 1957, 1958, 1959 a, b).

Die bisher am umfangreichsten untersuchte Spezies der Familie der Polyomaviridae ist das SV40, dessen natürlicher Wirt asiatische Makaken, vor allem Rhesusaffen, sind. Es war zwischen 1955 und 1963 unwissentlich in Form eines kontaminierten Impfstoffes gegen Kinderlähmung auf Millionen von Menschen übertragen worden (Modrow 2003, b). Erst 1960 isolierten B. Sweet und M. Hilleman das SV40 aus der Nierenzelllinie eines Rhesusaffen und lösten Spekulationen über eine mögliche Induktion von Tumorerkrankungen durch das SV40 aus, die sich jedoch nicht bestätigten (Sweet and Hilleman 1960).

Die beiden bisher bekannten humanpathogenen Polyomaviren JC und BK wurden im Jahr 1971 isoliert (Gardner *et al.*, 1971; Padgett *et al.*, 1971). Das JC-Virus (JCV) wurde aus dem menschlichen Gehirn eines Patienten mit progressiver multifokaler Leukoencephalopathie, das BK-Virus (BKV) hingegen aus dem Urin eines nierentransplantierten Patienten isoliert. Die Buchstaben BK und JC stehen für die Initialen der Patienten, aus denen das jeweilige Virus isoliert worden war. Das BKV und das JCV haben eine Sequenzidentität von ca. 75%.

Kurz nach der Erstbeschreibung von WUPyV und KIPyV im Jahr 2007 wurde in Gewebeproben des Merkelzell-Karzinoms (MCC) ein weiteres humanes Polyomavirus nachgewiesen, das Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) (Feng *et al.*, 2008).

1.2.2 Krankheitsbilder der humanpathogenen Polyomaviren BK und JC

Die Übertragung des BKV und des JCV erfolgt nach heutigem Wissensstand schon im Kindesalter, wahrscheinlich oral, mit anschließendem Befall und Vermehrung in den Tonsillen (Modrow, 2003 a). Es wird angenommen, dass durch eine nachfolgende lymphohämatogene Verbreitung und der Infektion von B-Lymphozyten im Infektionsverlauf der Transport und die Ansiedelung der Viren in einer Vielzahl von Organen wie der Niere, der Lunge, der Milz, den Lymphknoten, der Leber, der Darmschleimhaut und dem Gehirn erfolgt (Modrow, 2003 a). Dabei stellt die Niere das Hauptorgan der Persistenz dar (Modrow, 2003 a). Eine Erstinfektion mit dem BKV kann, im Gegensatz zum JCV, das nicht zu einer Erkrankung führt, bei immunkompetenten Kindern Infektionen der Atemwege und eine Zystitis verursachen (Modrow, 2003 a).

Nach der Erstinfektion persistieren das BKV und das JCV im menschlichen Organismus. Sie weisen eine Seroprävalenz von etwa 70% bis 80% bei Erwachsenen auf und können in Folge einer Immunsuppression reaktiviert und im Urin ausgeschieden werden (Modrow, 2003 a). So können immundefiziente Patienten (z.B. Knochenmark- und Nierentransplantierte) nach der Transplantation eine BKV-assoziierte hämorrhagische Zystitis und eine Ureterstenose entwickeln (Modrow, 2003 a). Das JCV ist bei Immunsupprimierten, vor allem bei AIDS-Erkrankten, an der Entstehung der progressiven multifokalen Leukoencephalopathie beteiligt (Modrow, 2003 a; Ahsan and Shah, 2006). Wie das SV40 zeigen das BKV und das JCV ein hohes onkogenes Potential im Tierversuch (Modrow, 2003, a). Die Rolle dieser Viren bei der Entwicklung von Tumoren beim Menschen wird immer wieder diskutiert,

konnte aber bisher, genau wie beim SV40, nie bewiesen werden (Poulin and DeCaprio, 2006; Martini *et al.*, 2007; Modrow, 2003, b).

1.3 Die Polyomaviren WU und KI

1.3.1 Erstbeschreibung der Polyomaviren WU und KI

Die Entdeckung des KIPyV gelang T. Allander *et al.* aus Nasenrachensekreten (NRS) durch ein molekulares Screeningsystem zur Erfassung unbekannter Viren (Allander *et al.*, 2007 a). Das WUPyV wurde von Gaynor *et al.* im NRS eines drei Jahre alten australischen Kindes mit Pneumonie entdeckt, bei dem keine bekannten respiratorischen Erreger nachgewiesen werden konnten (Gaynor *et al.*, 2007). Hierfür wurde eine neu entwickelte Mikroarray-Methode zur Detektierung noch unentdeckter respiratorischer Viren von Wang *et al.* verwendet (Wang *et al.*, 2003). Das WUPyV und das KIPyV bilden vermutlich eine neue Subgruppe in der Familie der Polyomaviridae, da ihre Aminosäuresequenzen in 64% bis zu 71% identisch sind, während ihre Sequenzidentität mit den beiden bekannten humanpathogenen Polyomaviren BKV und JCV und mit dem SV40 nur 15% bis 49% beträgt (Gaynor *et al.*, 2007).

1.3.2 Aufbau und Funktion des WUPyV-Genom

Die Polyomaviren sind nicht behüllte Viren mit ikosaedrischem Kapsidaufbau und zirkulärem doppelsträngigen DNA-Genom. Dieses liegt mit einer Länge von ca. 5200 Basenpaaren (bp) im Virion als Superhelix vor, mit der zelluläre Histone in Nukleosomenstrukturen assoziiert sind. Die Abbildung 1 zeigt die WUPyV-Genomstruktur mit einer Länge von 5229 bp.

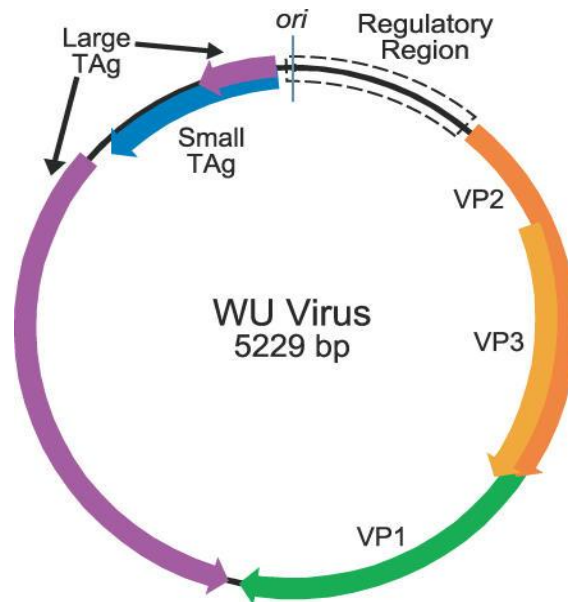


Abbildung 1: WUPyV-Genomschema

Das zirkuläre WUPyV Genom mit den Leserastern der frühen Region (großes und kleines T-Antigen) und der späten Region (Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3). Zwischen der frühen und späten Region liegt die regulatorische Region mit dem Ori (origin of replication). (Quelle: Gaynor *et al.*, 2007)

Man geht davon aus, dass die Proteine der humanpathogenen Polyomaviren ähnliche Funktion bei der Replikation haben, wie die des SV40, das als ein gut untersuchtes Modellvirus gilt (Modrow, 2003 c). Deshalb beziehen sich die Funktionsangaben der Proteine in diesem Abschnitt auf die bekannten Daten über das SV40 (Modrow, 2003 c) und die Angaben zum Genomaufbau auf die Ergebnisse des WUPyV-Erstbeschreibers Gaynor (Gaynor *et al.*, 2007).

Die frühe Region auf dem einen Strang, die für regulatorische Proteine kodiert, besteht aus den T-Antigenen, die nach ihrem Molekulargewicht in das große T- und das kleine T-Antigen eingeteilt werden. Die Aufgabe der T-Antigene stellt die Virusreplikation in der Zelle dar, wobei das große T-Antigen hierfür von größter Bedeutung ist. Es initiiert die Replikation, reguliert die Transkription der frühen und späten Gene, stimuliert die zelluläre DNA- und rRNA-Synthese und übt Apoptosehemmung aus. Als Funktion des kleinen T-Antigens wird die Akkumulation der viralen DNA angenommen. Weitere regulatorische Proteine,

die von anderen Polyomaviren bekannt sind, wie das mittlere T-Antigen (Mauspolyomavirus), das tiny T-Antigen (Mauspolyomavirus) und das early leader protein (SV40, BKV, JCV), wurden im WUPyV-Genom bisher nicht nachgewiesen.

Die späten Proteine auf dem entgegengesetzten Strang des WUPyV sind die Kapsidproteine, die als Virusprotein (VP) 1, 2, 3 bezeichnet werden. Das VP1 stellt den Hauptbestandteil des Kapsids, das auch die Adsorption an definierte Rezeptoren der Zelloberfläche vermittelt. Alle Kapsidproteine besitzen Kernlokalisierungssignale. Sequenzen, die für das als LP1 oder Agnoprotein bezeichnete Nichtstrukturprotein codieren, das bei einigen Polyomaviren vorkommt (SV40, BKV und JCV), wurden bisher nicht im WUPyV Genom nachgewiesen. Der Genombereich der nicht kodierenden regulatorischen Region mit einer Länge von circa 400 bp befindet sich zwischen den Ausgangspunkten der Transkription der frühen und der späten Region. Zu den regulatorischen Sequenzen zählen der Replikationsursprung, die Promotoren, das Glukocorticoid-responsive-Element und die Enhancer-Region. Sie dienen als Bindestellen der viralen T-Antigene und von zellulären Transkriptionsfaktoren zur Regulation und Verstärkung der Transkription.

1.3.3 Epidemiologie des WUPyV

Bei der Erstbeschreibung des WUPyV im Mai 2007 durch Gaynor *et al.* war WUPyV-DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) in 37 (3%) von 1245 Proben australischer Kinder und Erwachsener mit akuter Infektion des Respirationstraktes und in sechs von 890 (0,7%) respiratorischen Proben US-amerikanischer Kinder und Erwachsener nachgewiesen worden (Gaynor *et al.*, 2007). Dabei waren die meisten der WUPyV-positiven Probanden jünger als vier Jahre (86%) und die Koinfektionsrate aller positiv detektierten Patientenproben betrug 72%. In den auf WUPyV getesteten Urinproben konnte keine WUPyV-DNA nachgewiesen werden. Nach der Erstbeschreibung in Australien und den USA wurden WUPyV-DNA-positive NRS nochmals in

Australien und den USA, sowie in Schottland, in Südkorea, in Kanada, in China und in Deutschland mit einer Prävalenz von 0,4% bis 10,5% detektiert (Abed *et al.*, 2007; Bialasiewicz *et al.*, 2007 a, b; Han *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2007; Norja *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Neske *et al.*, 2008).

1.3.4 Klinische Relevanz des WUPyV

Da WUPyV-DNA auch in Kontrollgruppen ohne respiratorische Symptome detektiert wurde (Norja *et al.*, 2007; Abed *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2007), wurde die klinische Relevanz der WUPyV-DNA-Nachweise bei Patienten mit respiratorischen Symptomen in Frage gestellt. So könnten WUPyV-DNA-positive Ergebnisse im Respirationstrakt auch zufällige Nachweise eines persistierenden Virus sein.

Klassischerweise wurden die nach Rivers modifizierten Henle-Koch-Postulate zum Nachweis einer ursächlichen Beziehung zwischen Erreger und Krankheit genutzt (Rivers, 1937). Den ursprünglichen Henle-Koch-Postulaten (Koch, 1891) liegen drei Bedingungen für die Ermittlung eines Erregers als Krankheitsursache zu Grunde.

Henle-Koch-Postulate:

1. Optischer Nachweis: Der Erreger muss mikroskopisch regelmäßig nachweisbar sein; beim Gesunden muss er stets fehlen.
2. Kultureller Nachweis: Der Erreger muss sich vom Kranken auf ein Nährmedium übertragen und unter Beibehaltung der charakteristischen Eigenschaften über Generationen hinweg fortzüchten lassen.
3. Pathogenitätsnachweis: Die so fortgezüchteten Erreger müssen bei einem Versuchstier eine typische Krankheit erzeugen, die der natürlich vorkommenden gleicht. Im Organismus des Versuchstiers müssen die betreffenden Erreger wiederum mikroskopisch und kulturell nachweisbar sein.

Quelle: Pschyrembel, 259. Auflage

Rivers erkannte, dass sich die Henle-Koch-Postulate nicht allgemein auf durch Viren verursachte Infektionen anwenden lassen, unter anderem weil sich nicht alle Viren anzüchten lassen. Die Modifikationen der Henle-Koch-Postulate nach Rivers berücksichtigen daher auch latente und persistierende Virusinfektionen (Rivers, 1937).

Rivers Modifikationen der Henle-Koch-Postulate:

1. Ein spezifisches Virus und eine Erkrankung müssen mit einem gewissen Maß an Regularität miteinander assoziiert gefunden werden.
2. Es muss gezeigt werden, dass ein Virusnachweis in einem erkrankten Individuum kein Zufallsbefund ist, sondern die Ursache der betreffenden Krankheit darstellt.

Zum Nachweis einer Beziehung zwischen Virus und Krankheit gilt dabei für Rivers, dass es erstens nicht obligat ist die Gegenwart eines Virus in jedem Erkrankungsfall den es auslöst nachzuweisen, zweitens asymptomatische Virusträger existieren und drittens keine Notwendigkeit besteht, Viren in leblosen Medien oder in modifizierten Zellkulturen anzuzüchten. Als eine wichtige Methode zum Kausalitätsnachweis sah Rivers Antikörperbestimmungen an. So spricht das Fehlen von Antikörpern zu Krankheitsbeginn und der Nachweis von Antikörpern im Krankheitsverlauf für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Virus und Erkrankung (Rivers, 1937).

Letztendlich kann jedoch weder mit den Henle-Koch-Postulaten, noch mit den Modifikationen nach Rivers in allen Fällen bewiesen werden, dass eine bestimmte Erkrankung durch eine Infektion mit einem spezifischen Virus verursacht wird. Daher wurden als Ergänzung und Erweiterung der Henle-Koch-Postulate und ihrer Modifikationen nach Rivers die „Evans-Postulate“ beschrieben. Dieses Kausalitätskonzept stammt aus der Epidemiologie und war für die Anwendung bei akuten und chronischen Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie gedacht (Evans, 1976; Modrow, 2003, d).

Evans Postulate:

1. Der Anteil der erkrankten Individuen muss in einer exponierten Region größer sein als in einer nicht exponierten.
2. Erkrankte Individuen sollten häufiger dem Erreger exponiert gewesen sein als nicht erkrankte.
3. In prospektiven Studien muss die Zahl der Neuausbrüche in exponierten Populationen signifikant höher sein als in nicht exponierten Populationen.
4. In einer Region mit Exposition des Erregers sollten die Inkubationszeiten einer Normalverteilung folgen.
5. Alle exponierten Individuen sollten mit einer Immunantwort reagieren, die eine biologische Varianz aufweisen kann.
6. Einer Exposition sollte regelmäßig eine messbare Immunantwort folgen, entweder als neue Antwort in vorher negativen Individuen oder in Form einer Erhöhung der bestehenden Parameter.
7. Die experimentelle Reproduktion der Krankheit soll mit einer größeren Häufigkeit in solchen Tieren gelingen, die entsprechend der vermeintlich natürlichen Route infiziert wurden.
8. Die Eliminierung des Erregers sollte zu einer signifikanten Reduktion der Wirtsantwort führen.
9. Ebenso sollte eine Impfung zu einer Verringerung des Auftretens der Krankheit in der Population führen.
10. Das Gesamtbild der Postulate muss sowohl aus biologischer als auch aus epidemiologischer Sicht plausibel sein.

Zur Aufklärung eines kausalen Zusammenhangs zwischen Erkrankung und Virus sind die oben genannten Kriterien von Evans sicherlich ein guter Ansatzpunkt. Die in den letzten Jahren weiterentwickelten virologischen und immunchemischen Nachweisverfahren ermöglichen es, zusätzliche Kriterien zum Nachweis der Beziehung zwischen Virus und Wirt heranzuziehen. Dazu gehören der Nachweis einer spezifischen humoralen (IgM- und IgG-Antikörper) oder zellulären Immunantwort gegen den Erreger, der Nachweis von viralen Proteinen, Enzymaktivitäten und viralen Nukleinsäuren (z.B. durch PCR oder

Sequenzanalyse) (Modrow, 2003, e).

Fredricks und Relman formulierten Gedanken und Leitlinien zur Etablierung der kausalen Beziehung zwischen Mikroorganismen und Krankheit im Hinblick auf neue sequenzbasierte Nachweisverfahren (Fredricks and Relman, 1996). In ihren Kriterien zur sequenzbasierten Evidenz der Kausalität bezogen sie sich unter anderem auf die Erregeranzahl. Beispielsweise sollten die zu den pathogenen Mikroorganismen gehörenden Nukleinsäuresequenzen in den meisten Fällen einer bestimmten Erkrankung nachweisbar sein, wiederum aber nur eine geringe oder gar keine Kopienanzahl bei Gesunden. Hierbei sollte die Kopienanzahl der Pathogen-assoziierten Nukleinsäuresequenzen während der Krankheit ansteigen und sich mit dem Abklingen der Krankheit wieder entsprechend vermindern, beziehungsweise undetektierbar werden. Korreliere die Nukleinsäure-Kopienanzahl mit der Schwere des Krankheitsbildes, sei eine Nukleinsäure-Krankheits-Assoziation somit eher wahrscheinlich. Der Nachweis einer speziellen Nukleinsäuresequenz und des Mikroorganismus, von dem sie stammt, solle im Hinblick auf eine bestimmte Erkrankung konsistent und im Zusammenhang mit bereits vorliegenden Erkenntnissen plausibel sein. Letztendlich gelangen Fredericks und Relman zu dem Schluss, dass wahrscheinlich nicht jedes Kriterium für die sequenzbasierende Evidenz der Kausalität erfüllt werden muss, um einen Mikroorganismus als wahrscheinlich krankheitsursächlich zu belasten. Jedoch könne die Erfüllung einiger oder aller Kriterien eine starke Evidenz hinsichtlich einer klinisch wichtigen Beziehung zwischen Mensch und Erreger vermitteln.

So können sich der Nachweis und die Quantifizierung von WUPyV-DNA mittels einer real-time-PCR in Bezug auf die pathogenetische Relevanz des WUPyV als wichtig erweisen, wie es für das hBoV der Fall war. Für hBoV konnte mittels real-time-PCR ein Zusammenhang zwischen einer hohen hBoV-Last im NRS bei gleichzeitig vorliegender Virämie und respiratorischen Symptomen nachgewiesen werden, während eine alleinig im NRS nachgewiesene niedrige Viruslast im NRS keine Relevanz besaß (Allander *et al.*, 2007 b). Weiterhin

scheint es einen Zusammenhang zwischen hoher NRS-Viruslast und einer hBoV-Erstinfektion sowie niedriger NRS-Viruslast und einer möglichen persistierenden hBoV-Infektion zu geben (Allander *et al.*, 2007 b). Solche mittels quantitativer real-time-PCR erzielten Ergebnisse können auf einen möglichen kausalen ätiologischen Zusammenhang zwischen dem Virus und Menschen hindeuten - ihn aber nicht endgültig beweisen - und bilden den Grundstein für weitere Studien und Untersuchungsansätze. Im Fall einer klinischen Relevanz des Virus können sich daraus Ansätze zur Therapie beziehungsweise Prävention der Erkrankung entwickeln.

1.4 Ziele der Arbeit

In den ersten erschienenen WUPyV-Studien wurde hauptsächlich die qualitative PCR zur Detektierung der WUPyV-DNA benutzt. Um den Nachweis von WUPyV-DNA zu erleichtern und WUPyV-DNA in klinischen Proben zu quantifizieren, wurde in dieser Arbeit eine WUPyV-real-time-PCR entwickelt. Das Ziel dieser Arbeit war es, eine WUPyV-real-time-PCR zu evaluieren und damit WUPyV-DNA in NRS hospitalisierter Kinder mit akuten respiratorischen Infektionen zu detektieren und zu quantifizieren. Im Anschluss wurden Stuhl- und Serumproben der Kinder mit positiven WUPyV-NRS auf vorhandene WUPyV-DNA untersucht. Anhand der ermittelten Ergebnisse der WUPyV-Lasten wurde versucht, einen Bezug des WUPyV zur Epidemiologie und zur möglichen klinischen Relevanz zu ermitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenproben

In der vorliegenden Studie wurde retrospektiv Restmaterial von unselektierten NRS untersucht, die im Zeitraum von Januar 2002 bis September 2005 und von Januar 2007 bis Juli 2007 von stationär behandelten Patienten der Universitätskinderklinik Würzburg zum Routinenachweis respiratorischer Viren an das Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg gesendet wurden. Die Nasenrachenspülung erfolgte in der Kinderklinik durch die Instillation von Natriumchlorid (0,9%) in den Nasopharynx und anschließende Absaugung.

Die NRS wurden im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg mittels Immunfluoreszenztest auf das Vorhandensein von Antigenen von Adenoviren, Influenzaviren A und B, Parainfluenzaviren 1, 2, und 3 sowie von RSV getestet. HBoV wurde in den Proben mittels PCR-Verfahren untersucht wie zuvor beschrieben (Weissbrich *et al.*, 2006). Von den Kindern mit positivem WUPyV-DNA-Nachweis im NRS wurde vorhandenes Restmaterial von Serum- und Stuhlproben, die nicht länger als 14 Tage vor oder nach dem entsprechenden NRS in der Kinderklinik entnommen worden waren, ebenfalls mittels der WUPyV-real-time-PCR getestet. Insgesamt wurden 1232 NRS und jeweils 14 Serum- und Stuhlproben im Rahmen der Studie untersucht. Das Material wurde im Anschluss an die virologische Routineuntersuchung bis zur Verwendung in dieser Studie bei $< -20^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt.

An Hand eines standardisierten Formulars wurden die Krankenakten der Patienten mit WUPyV-positivem DNA-Nachweis aus der Universitätskinderklinik unter Einschluss der Symptome, klinischen Untersuchungsergebnisse und der Radiologie erfasst und die Enddiagnose übernommen.

2.2 Nachweis von WUPyV-DNA mittels real-time-PCR

2.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte ausgehend von 200 µl der NRS und der Serumproben mit Hilfe des High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) und von 140 µl der Stuhlsuspensionen mit Hilfe des QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), das RNA und DNA aufreinigen kann (Weissbrich *et al.*, 1995). Die beiden Kits für die Nukleinsäure-Extraktion wurden dabei streng nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die NRS und Serumproben wurden in 50 µl und die Stuhlsuspensionen in 60 µl eluiert. Wenn nicht genügend Restmaterial zur Verfügung stand, wurde in Ausnahmefällen weniger als das genannte Ausgangsmaterial für die Nukleinsäure-Extraktion verwendet. Nach jeweils fünf Patientenproben wurde eine Negativkontrolle extrahiert. Die extrahierte DNA wurde bis zur Verwendung in der PCR bei -70°C gelagert.

2.2.2 Ansatz und Auswertung der WUPyV-real-time-PCR

Primer und Sonde für die WUPyV-real-time-PCR-Methode wurden mittels des Programms Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) aus der konservierten Region des C-terminalen Endes des großen T-Antigens ermittelt. Diese wurde auch für die zuvor durchgeführte qualitative WUPyV-PCR benutzt (Neske *et al.*, 2008). Die Sequenzierung von 62 WUPyV-positiven NRS hatte eine hohe Sequenzkonservation in dieser Region gezeigt. Der Abgleich der Primer und der Sonde mit GenBank zum Ausschluss unspezifischer Bindungen zeigte keine signifikanten Sequenzidentitäten mit Nukleinsäuren anderer Organismen. Die Sequenzen der Primer (WU2865a und WU2958s) sowie der Sonde (WU2925s-TM) sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Als Standardkurve und als Positivkontrolle wurde ein WUPyV-Plasmid (pWU1) verwendet, welches das PCR-Produkt der Primer AG0048 und AG0049 enthielt (Gaynor *et al.*, 2007; Neske *et al.*, 2008). Die DNA-Konzentration des Plasmids war photometrisch bestimmt und daraus die Kopienanzahl des Standards

berechnet worden.

Tabelle 1: Primer und Sonde

Primer/ Sonde	Sequenz	Verwendung
WU2958s	5'-CCTGTTAGTGATTTTCACCCATGTA	real-time-PCR
WU2865a	5'-TGTCAGCAAATTCAGTAAGGCCTATATAT	
WU2925s -TM	6FAM-AAAGTTGTGTATTGGAAAGAACTGTTAGACA-TAMRA	
AG0048	5'-TGTTTTTCAAGTATGTTGCATCC	Plasmidherstellung für die Positivkontrolle
AG0049	5'-CACCCAAAAGACACTTAAAAGAAA	
WU355s	5'-CAGAGACGTCCTTGGGTTCAA	konventionelle PCR in der NCR zur Diskrepanz- analyse
WU965a	5'-TGGATATTAAGTCCACCTCCTTGG	
WU5146s	5'-AGTTTTATCCATTTTGCCTTCTTTAGC	konventionelle PCR in der NCR zur Diskrepanz- analyse
WU524a	5'-CGAGACGGTAGCACCAATACC	

NCR: Nicht-kodierende Region (Kontrollregion)

Für die Amplifikation von WUPyV-DNA in der real-time-PCR wurde ein Endvolumen von 20 µl pro Reaktion verwendet, bestehend aus 5 µl der extrahierten NRS-DNA, den Primern WU2865a und WU2958s mit einer Endkonzentration von 400 nM, der Sonde WU2925s-TM mit einer Endkonzentration von 100 nM und 10 µl des Quantitect Probe Mastermix (Qiagen) (Tabelle 2).

In jedem Lauf wurde eine Standardkurve im Doppelansatz mit getestet, die aus folgenden Verdünnungen des Plasmids pWU1 bestand: 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 5×10^1 , 5×10^0 Kopien pro µl (Kopien/µl). Außerdem wurde eine Laufkontrolle, bestehend aus der Verdünnung des Plasmids pWU1 mit folgender Konzentration 5×10^5 Kopien/µl, eingefügt. Die Negativkontrollen bestanden aus einem Doppelansatz der Negativkontrolle (Wasser) und den

extrahierten Wasserproben. Die Amplifikation wurde mit dem 7500 real-time-PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: 15 min bei 95°C zur Aktivierung der Taq-Polymerase, dann 50 Zyklen mit jeweils 30 s bei 95°C und 60 s bei 60°C.

Die Auswertung und Quantifizierung der real-time-PCR-Analysen erfolgte mit der Sequence Detection Software 1.4 (Applied Biosystems) durch Festlegung eines Schwellenwerts, aus dessen Schnittpunkt mit der Amplifikationskurve von positiven Reaktionen sich der sogenannte „Threshold cycle“-Wert (Ct-Wert) festlegen ließ. Durch Bezug auf die in jedem Lauf mitgeführte Standardkurve ergaben sich aus dem Ct-Wert für positive Proben jeweils quantitative Werte. Diese wurden für NRS und Serum in Kopien pro ml (Kopien/ml) angegeben.

Tabelle 2: Pipettierschema der WUPyV-real-time-PCR

Reagenz	Endkonzentration	Pro Reaktion in µl
Quantitect Probe Mastermix	1x	10,0
Primer WU2865a (20 µM)	400 nM	0,4
Primer WU2958s (20 µM)	400 nM	0,4
WU2925s-TM (20 µM)	100 nM	0,1
Wasser		4,1
Zwischenvolumen		15,0
Patientenprobe, Positiv- bzw. Negativkontrolle *		5,0
Endvolumen		20,0

* Patientenprobe (DNA-Extraktion aus NRS, Serum- oder Stuhlprobe), Positivkontrolle (pWU1) oder Negativkontrolle (extrahiertes Wasser oder nicht extrahiertes Wasser)

2.2.3 Überprüfung der Amplifikationseffizienz in Stuhlproben

Zur Überprüfung der Amplifikationseffizienz in Stuhlproben wurden Spikeexperimente mit dem Plasmid pWU1 in der Konzentration 1×10^5 Kopien pro Reaktion (Kopien/Reaktion) durchgeführt. Dazu wurde in dem in Tabelle 2 beschriebenen PCR-Ansatz 1 μ l Wasser durch pWU1-DNA ersetzt (Tabelle 3). Die Amplifizierung erfolgte im 7500 real-time-PCR System wie unter 2.2.2 beschrieben.

Tabelle 3: Pipettierschema des Spikeexperimentes

Reagenz	Endkonzentration	Pro Reaktion in μ l
Quantitect Probe Mastermix	1x	10,0
Primer WU2865a (20 μ M)	400 nM	0,4
Primer WU2958s (20 μ M)	400 nM	0,4
WU 2925s-TM(20 μ M)	100 nM	0,1
Wasser		3,1
pWU1 1×10^5 Kopien/ μ l		1,0
Zwischenvolumen		15,0
Stuhlprobe		5,0
Endvolumen		20,0

2.4 Abklärung von Diskrepanzen zwischen real-time-WUPyV-PCR und Voruntersuchungen mit qualitativer konventioneller WUPyV-PCR

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten NRS waren in einer vorhergehenden Studie mittels einer qualitativen konventionellen WUPyV-PCR, d. h. einer PCR mit gelelektrophoretischem Nachweis der Amplifikation, getestet worden (Neske *et al.*, 2008). Dazu wurden so wie für die real-time PCR

Primer aus der C-terminalen Region des großen T-Antigens (LTA) verwendet. Diese PCR wird im Folgenden „konventionelle LTA-PCR“ genannt. Im Rahmen der Validierung der real-time-PCR wurden die Ergebnisse der real-time-PCR mit den bereits vorhandenen Ergebnissen der qualitativen konventionellen LTA-PCR verglichen.

Zur Abklärung von diskrepanten Ergebnissen zwischen beiden PCR-Methoden wurde folgende Strategie angewendet (Tabelle 4). Zunächst wurden die Proben mit diskrepanten Ergebnissen ein zweites Mal mit der real-time-PCR getestet. Bestätigte sich dabei das Ergebnis der ersten Durchführung der real-time-PCR, so wurde dieses Ergebnis als Endergebnis der real-time-PCR festgelegt. Waren die Ergebnisse der zwei Bestimmungen mittels real-time-PCR unterschiedlich, wurde eine dritte Testung durchgeführt und anschließend das Endergebnis der real-time-PCR nach der 2:1-Regel festgelegt (Tabelle 4). Das heißt, als WUPyV-positives Ergebnis mit der real-time PCR galt letztlich das NRS, das mindestens in zwei von drei WUPyV-real-time-PCR-Testansätzen als positiv nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 4: Strategie zur Abklärung diskrepanter Ergebnisse zwischen konventioneller WUPyV-LTA-PCR NRS und quantitativer WUPyV-real-time-PCR

qualitative WUPyV-LTA-PCR	real-time-WUPyV-PCR	real-time-WUPyV-PCR				
		Vorgehen	Ergebnis Testung 2	Vorgehen	Ergebnis Testung 3	End-ergebnis
Ergebnis initial (Testung 1)						
+	+	keine weitere Testung				+
-	-	keine weitere Testung				-
+	-	weitere Testung	+	weitere Testung	+	+
			+		-	-
			-	keine weitere Testung		-
-	+	weitere Testung	+	keine weitere Testung		+
			-	weitere Testung	+	+
			-		-	-

+: positiv -: negativ

Alle Proben, für die das Endergebnis der real-time-WUPyV-PCR im Vergleich zur konventionellen WUPyV-LTA-PCR diskrepant war, wurden mit zwei zusätzlichen WUPyV-Primerpaaren aus der nicht-kodierenden Region mittels qualitativer WUPyV-PCR untersucht.

2.5 Qualitative WUPyV-PCR in der nicht-kodierenden Genomregion

2.5.1 Ansatz der qualitativen WUPyV-PCR

Um Diskrepanzen der Ergebnisse zwischen der WUPyV-real-time-PCR und der zuvor durchgeführten qualitativen konventionellen WUPyV-LTA-PCR (Neske *et al.*, 2008) weiter abzuklären, wurden zwei weitere Primerpaare WU355s/WU965a und WU5146s/WU524a aus der nicht-kodierenden Genomregion (NCR) benutzt (Tabelle 1). Diese PCR wird im Folgenden „konventionelle NCR-PCR“ genannt.

Für die Amplifikation von WUPyV-DNA in dieser PCR wurde ein Endvolumen von 50 µl pro Reaktion verwendet, bestehend aus 5 µl der extrahierten NRS-DNA, 1x Qiagen HotStar Puffer (Qiagen), dNTPs mit jeweils einer Endkonzentration von 200 µmol/L, 200 pmol der jeweiligen Primer WU355s/WU965a beziehungsweise WU5146s/WU524a und der HotStar Taq-Polymerase (Tabelle 5). In jedem Lauf wurden eine Standardkurve im Doppelansatz (siehe oben), ein Doppelansatz der Negativkontrolle (Wasser) und die extrahierten Wasserproben mit getestet. Die Amplifikation wurde mit dem Thermozykler RoboCycler 40 (Agilent, Waldbronn) unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: 10 min bei 95°C zur Aktivierung der Taq-Polymerase, dann 50 Zyklen mit jeweils 30 s bei 94°C, 40 s bei 53°C (WU5146s/WU524a) beziehungsweise 54°C (WU355s/WU965a) und 60 s bei 72°C. Anschließend erfolgte eine Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromidanfärbung. Reaktionen mit Banden der erwarteten Größe von 607 bp (WU5146s/WU524a) beziehungsweise 610 bp (WU355s/WU965a) wurden als initial positiv angesehen. Zur endgültigen Bestätigung des positiven Ergebnisses wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt (siehe unter 2.5.2).

Tabelle 5: Pipettierschema der qualitativen PCR

Reagenz	Endkonzentration	Pro Reaktion in μl
Qiagen HotStar Puffer	1x	5,0
Primer WU355s / WU965a oder Primer WU5146s / WU524a	je 200 pmol	je 0,5
dNTPs	200 $\mu\text{mol/L}$	0,5
HotStar Taq Polymerase		0,3
Wasser		38,2
Zwischenvolumen		45,0
Patientenprobe, Positiv- bzw. Negativkontrolle *		5,0
Endvolumen		50,0

* Patientenprobe (DNA-Extraktion aus NRS, Serum- oder Stuhlprobe), Positivkontrolle (pWU1) oder Negativkontrolle (extrahiertes Wasser oder nicht extrahiertes Wasser)

2.5.2 Sequenzanalyse zum Spezifitätsnachweis der qualitativen PCR

Für die Sequenzanalyse wurden die PCR-Produkte aus Reaktionen mit Banden der erwarteten Größe mittels QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) gemäß Hersteller-Anleitung auf gereinigt. Dazu wurde der PCR-Ansatz (50 μl) mit 250 μl Binde-Puffer PB gemischt und anschließend auf eine QiaQuick-Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 60 s bei 15.000 x g wurde der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde anschließend zweimal mit 750 μl Waschpuffer PE beladen und für 60 s bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 60 s bei 15.000 x g zum Entfernen von Ethanolresten. Schließlich wurde das an die Säule gebundene PCR-Produkt durch Zugabe von 40 μl Puffer EB und erneuter Zentrifugation für 60 s bei 15.000 in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit 2 μl des Eluats durchgeführt.

Der Ansatz der Sequenzierreaktion nach der Kettenabbruch-Methode erfolgte mit dem BigDye Terminator Kit v1.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) in einem Endvolumen von 5 µl. Jedes PCR-Produkt wurde mit den PCR-Primern in beiden Richtungen sequenziert. Eine Reaktion bestand aus 1,0 µl Primer (Konzentration 5 µM), 0,5 µl 5x Puffer (Applied Biosystems), 0,5 µl H₂O, 1,0 µl BigDye Terminator Mix v1.1 (Applied Biosystems) und 2 µl des auf gereinigten PCR-Produkts. Die Amplifikation der Kettenabbruchprodukte erfolgte in einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) in insgesamt 25 Zyklen bestehend jeweils aus 10 s bei 96°C, 5 s bei 50°C und 4 min bei 60°C.

Anschließend wurden die Sequenzierungsreaktionen durch die Sequenziereinheit am Institut für Virologie und Immunbiologie zunächst „aufgereinigt“ (Entfernen von nicht-inkorporierten BigDye Terminatoren) und danach auf dem Gerät Genetic Analyzer Prism 3100 (Applied Biosystems) kapillarelektrophoretisch aufgetrennt.

Die so erhaltenen Sequenzen für beide Richtungen eines PCR-Produkts wurden mit Hilfe des Programms Seqman aus dem Softwarepaket Lasergene (DNA Star, Madison USA) zu einer Konsensus-Sequenz zusammengefügt, welche sodann im fasta-Format gespeichert wurde. Zur Überprüfung der Identität mit WUPyV-Sequenzen wurde von den Konsensus-Sequenzen der PCR-Produkte eine Blast-Analyse durchgeführt (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), bei der die Konsensus-Sequenzen mit in GenBank hinterlegten Sequenzen verglichen werden.

2.6 Statistische Analysen

Zur Durchführung der statistischen Analysen wurde die GraphPad Prism Version 3.0c für Mac verwendet (GraphPad Software, San Diego, USA). Die Probit-Analyse zur Berechnung der 95%-Nachweisgrenze der WUPyV-Kopienanzahl im NRS erfolgte mittels der SPSS-Version 15 für Windows

(SPSS, Chicago, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der quantitativen WUPyV-real-time-PCR

Vor der Verwendung zur Untersuchung von klinischem Probenmaterial wurde die WUPyV-real-time-PCR zunächst validiert. Dazu wurden die Linearität der Methode, die Nachweisgrenze, die Variation und die Spezifität untersucht.

Zur Bestimmung der Linearität wurde das Plasmid pWU1 in 10er-Verdünnungsschritten im Bereich von 5 bis 5×10^8 Kopien/Reaktion getestet. Die Amplifikation war über den gesamten Bereich der Verdünnungsreihe linear (Abbildung 2). Im Rahmen der Studie wurden insgesamt 21 Läufe durchgeführt. Der Slope-Mittelwert der Standardkurven im Bereich von 5 bis 5×10^5 betrug -3,53 bei einer Standardabweichung von 0,12. Der Mittelwert des Korrelationskoeffizienten betrug 0,992 bei einer Standardabweichung von 0,0014.

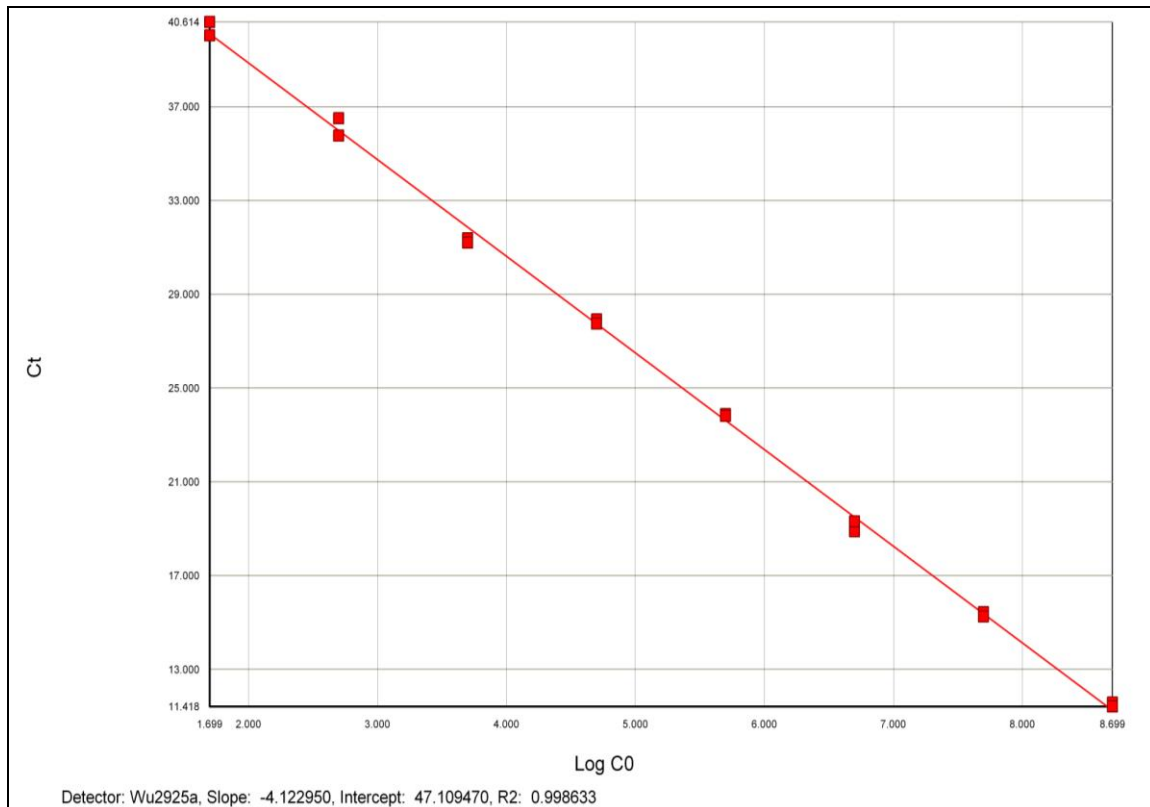


Abbildung 2: Linearität der WUPyV-real-time-PCR

Darstellung der Linearität der Amplifikation innerhalb der Verdünnungsstufen des Plasmids pWU1 von 5 bis 5×10^8 Kopien/Reaktion als repräsentativer Lauf. Die X-Achse zeigt die Kopienanzahlen logarithmisch auf. Auf der Y-Achse sind die Ct-Werte aufgetragen.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Dabei wird die DNA-Konzentration bestimmt, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% nachgewiesen werden kann. Dazu wurde das Plasmid pWU1 in Verdünnungen abnehmender Konzentrationen im Bereich von 40 bis 0,75 Kopien/Reaktion in jeweils acht Proben gleicher Konzentrationen in insgesamt drei Läufen amplifiziert (Tabelle 6). Eine Konzentration von 7,1 Kopien/Reaktion (95%-Konfidenzintervall: 4,8 – 20,4 Kopien/Reaktion) wurde mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit nachgewiesen. Das entspricht bezogen auf das Ausgangsmaterial von Serum und NRS 360 Kopien/ml.

Tabelle 6 : Probit-Analyse zur Bestimmung der 95%-Nachweisgrenze

pWU1-Konzentration (Kopien/Reaktion)	Gesamtanzahl der Reaktionen*	Anzahl der positiven Reaktionen
40	24	24
20	24	24
15	24	24
10	24	23
5	24	22
2,5	24	15
1,25	24	10
0,75	24	3

* Anzahl der Proben aus insgesamt 3 Läufen (je 8 Proben/Lauf und Konzentration)

Um die Zuverlässigkeit der WUPyV-real-time-PCR zu analysieren, wurde der Intra- und Interassay-Variationskoeffizient bestimmt. Zur Untersuchung der Variabilität innerhalb eines Laufes wurden die Ct-Werte eines Dreifachansatzes einer Verdünnungsreihe des Plasmids pWU1 von 5×10^5 bis 5×10^1 Kopien/Reaktion bestimmt. Dabei betrug der Intraassay-Variationskoeffizient der Ct-Werte 1,32% oder weniger (Tabelle 7).

Tabelle 7: Intraassay-Variation der WUPyV-real-time-PCR für unterschiedliche Konzentrationen des Plasmids pWU1

Konzentration	Ct ¹			Mittelwert	Std- Abw. ²	Vk ³
$5,00 \times 10^5$	20,22	20,29	20,46	20,32	0,12	0,61%
$5,00 \times 10^4$	23,77	23,31	23,58	23,55	0,23	0,98%
$5,00 \times 10^3$	27,68	27,83	27,58	27,70	0,13	0,45%
$5,00 \times 10^2$	30,55	31,17	31,32	31,01	0,41	1,32%
$5,00 \times 10^1$	35,64	34,91	34,78	35,11	0,46	1,32%

¹ Ct: Threshold-Cycle

³Vk: Variationskoeffizient

² Std-Abw.: Standardabweichung

Zur Bestimmung der Werte für den Interassay-Variationskoeffizienten wurde in jedem der insgesamt 21 Läufe das Plasmid pWU1 in einer Konzentration von 5×10^5 als Laufkontrolle eingesetzt. Der Mittelwert der berechneten Viruslasten für die Laufkontrolle betrug $5,4 \times 10^5$ Kopien/Reaktion (siehe Tabelle 8). Es ergab sich ein Interassay-Variationskoeffizient mit einem Wert von 15,1% bei einer Standardabweichung von $8,1 \times 10^4$.

Tabelle 8: Interassay-Variation der Laufkontrolle der WUPyV-real-time-PCR

Lauf	Laufkontrolle in Kopien/Reaktion	Lauf	Laufkontrolle in Kopien/Reaktion	Lauf	Laufkontrolle in Kopien/Reaktion
1	$4,35 \times 10^5$	8	$6,03 \times 10^5$	15	$6,43 \times 10^5$
2	$3,98 \times 10^5$	9	$7,18 \times 10^5$	16	$5,35 \times 10^5$
3	$5,02 \times 10^5$	10	$4,63 \times 10^5$	17	$7,11 \times 10^5$
4	$4,80 \times 10^5$	11	$5,48 \times 10^5$	18	$5,14 \times 10^5$
5	$5,68 \times 10^5$	12	$5,56 \times 10^5$	19	$4,71 \times 10^5$
6	$6,09 \times 10^5$	13	$5,12 \times 10^5$	20	$4,61 \times 10^5$
7	$4,89 \times 10^5$	14	$5,73 \times 10^5$	21	$5,23 \times 10^5$

Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung der Primer WU2865a und WU2958s und der Sonde WU2925s–TM an andere DNA-Viren wurde eine WUPyV-real-time-PCR mit Proben durchgeführt, die zuvor positiv für JCV, BKV, KIPyV, hBoV oder Adenovirus getestet worden waren. Bei keiner dieser Proben wurde eine unspezifische Amplifikation nachgewiesen.

3.2 Vergleich der Ergebnisse der WUPyV-real-time-PCR und der konventionellen WUPyV-PCR

Zur klinischen Evaluation der WUPyV-real-time-PCR wurden 1232 NRS von insgesamt 1134 Kindern aus dem Zeitraum von Januar 2002 bis September 2005 und von Januar 2007 bis Juli 2007 auf vorhandene WUPyV-DNA untersucht. Von den 1232 NRS konnte bei 72 Proben mittels der quantitativen real-time-PCR WUPyV-DNA nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden Studie verwendeten NRS waren zuvor mittels einer qualitativen konventionellen WUPyV-LTA-PCR auf WUPyV-DNA getestet worden (Neske *et al.*, 2008). Dabei war in 58 Proben WUPyV-DNA nachgewiesen worden. Allerdings stimmten nach der initialen Testung nur bei 47 Patienten die positiven Ergebnisse beider Studien überein. Für 36 NRS ergaben sich diskrepante Ergebnisse. Zur weiteren Abklärung wurden von diesen Proben wie im Methodenteil unter 2.4 beschrieben zunächst weitere Testansätze mittels real-time-PCR durchgeführt.

Im Flussdiagramm in Abbildung 3 ist das genaue Vorgehen zur Abklärung der diskrepanten NRS aufgezeigt. Von den initial 36 diskrepanten NRS stand von einer Probe nicht mehr genügend Material für Wiederholungstestungen zur Verfügung. Bei dieser Probe wurde das initiale Ergebnis als Endergebnis verwendet. Von den übrigen 35 Proben wurden Wiederholungstestungen der WUPyV-real-time-PCR gemäß Tabelle 4 durchgeführt. Dabei bestätigte sich das initiale Ergebnis der WUPyV-real-time-PCR-Testung und damit die Diskrepanz zur konventionellen WUPyV-LTA-PCR für 12 Proben. Für 23 NRS war das Ergebnis der initialen WUPyV-real-time-PCR-Testung nicht reproduzierbar, so dass sich gemäß Tabelle 4 die Notwendigkeit zur Durchführung einer dritten Testung ergab. Mit den so erhaltenen Endergebnissen für die real-time-PCR konnte WUPyV-DNA schließlich in 64 (5,2%) der 1232 untersuchten NRS-Proben nachgewiesen werden.

Insgesamt blieben nach der dritten Testung mit der WUPyV-real-time-PCR bei 19 der 35 nachgetesteten NRS die Diskrepanzen zwischen konventioneller WUPyV-LTA-PCR und real-time-PCR bestehen. Davon waren 12 Proben in der WUPyV-LTA-PCR negativ und in der real-time-PCR positiv. Umgekehrt waren 7 Proben in der WUPyV-LTA-PCR positiv und in der real-time-PCR negativ. Diese 19 NRS wurden daraufhin mittels konventioneller WUPyV-NCR-PCR unter Verwendung der beiden Primerpaare WU355s/WU965a und WU5146s/WU524a weiter abgeklärt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt. Für 7 Proben konnte WUPyV-DNA mit mindestens einem Primerpaar der NCR-PCR nachgewiesen werden. In 10 Fällen waren beide Primerpaare negativ. Von drei Proben stand nicht mehr genügend Material (z.w.M.) für eine WUPyV-NCR-PCR zur Verfügung.

Abbildung 3: (siehe Folgeseite): Vorgehen zur Abklärung von Diskrepanzen zwischen der quantitativen WUPyV-real-time-PCR und den Vorergebnissen mit der konventionellen WUPyV-LTA-PCR

Bei Diskrepanzen zwischen dem Vorergebnis der konventionellen WUPyV-LTA-PCR und der real-time-PCR wurden Wiederholungen der real-time-PCR gemäß Tabelle 4 durchgeführt. Qual. PCR: konventionelle WUPyV-LTA-PCR. Real-time-PCR pos./neg./pos.: 1. Bestimmung positiv, 2. Bestimmung negativ, 3. Bestimmung positiv. Das Endergebnis der real-time-PCR ist unterstrichen.

(1) Von einer Probe stand nicht mehr genügend Material für Nachtestungen zur Verfügung

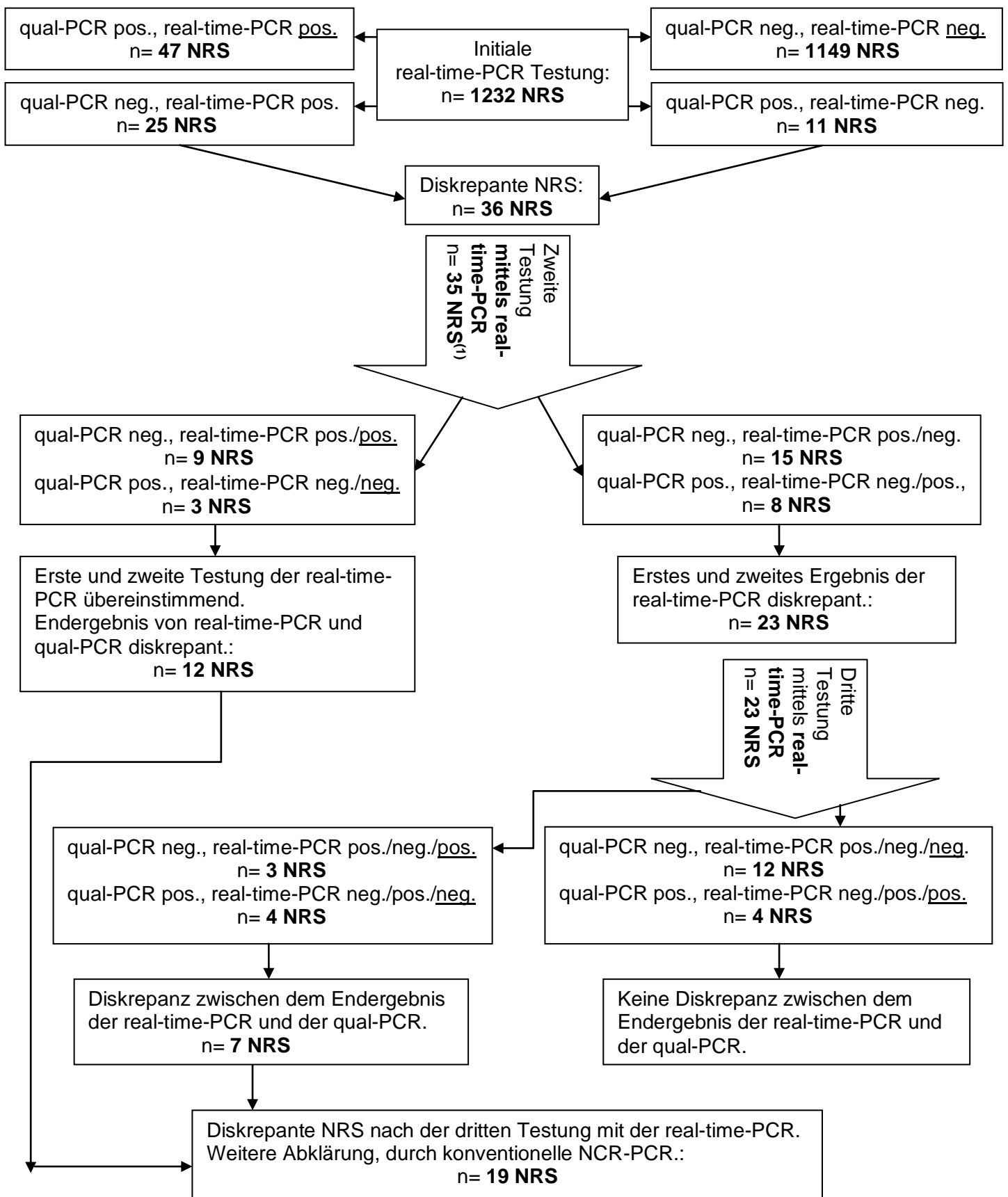


Tabelle 9: Abklärung der Diskrepanzen zwischen konventioneller WUPyV-LTA-PCR und real-time-PCR mittels konventioneller NCR-PCR

Material-nummer	Qual -LTA PCR	1. real-time PCR		2. real-time PCR		3. real-time PCR		Real-time PCR	WU5146s/ WU524a	WU355s/ WU965a	NCR PCR
	Ergebnis	Ergebnis	Viruslast in K/ml	Ergebnis	Viruslast in K/ml	Ergebnis	Viruslast in K/ml	Endergebnis	Ergebnis	Ergebnis	Endergebnis
2002006717	neg.	pos.	6,40 x 10 ⁻¹	neg.		neg.		neg.			
2002012462	neg.	pos.	3,37 x 10 ⁻²	pos.	3,12 x 10 ⁻²			pos. 1	z.w.M.	z.w.M.	z.w.M.
2002021572	neg.	pos.	3,21 x 10 ⁻¹	pos.	3,90 x 10 ⁻¹			pos. 2	neg.	pos.	pos.
2003006129	neg.	pos.	4,80 x 10 ⁰	neg.		neg.		neg.			
2003029030	neg.	pos.	7,70 x 10 ⁻¹	neg.		neg.		neg.			
2004002401	neg.	pos.	1,65 x 10 ⁻¹	neg.		neg.		neg.			
2004027522	neg.	pos.	1,74 x 10 ⁻²	neg.		pos.	9,70 x 10 ⁻¹	pos. 3	neg.	neg.	neg.
2005002625	neg.	pos.	3,08 x 10 ⁻¹	neg.		neg.		neg.			
2005005472	neg.	pos.	2,25 x 10 ⁻²	neg.		neg.		neg.			
2005007247	neg.	pos.	1,09 x 10 ⁻²	pos.	9,15 x 10 ⁻¹			pos. 4	neg.	neg.	neg.
2005007480	neg.	pos.	1,39 x 10 ⁻²	neg.		neg.		neg.			
2005007531	neg.	pos.	8,20 x 10 ⁻¹	neg.		neg.		neg.			
2005011742	neg.	pos.	1,41 x 10 ⁻²	pos.	8,70 x 10 ⁻¹			pos. 5	neg.	neg.	neg.
2005024472	neg.	pos.	1,93 x 10 ⁻²	pos.	2,48 x 10 ⁻²			pos. 6	pos.	neg.	pos.
2007001639	neg.	pos.	1,18 x 10 ⁻²	z.w.M.		z.w.M.		pos.	z.w.M.	z.w.M.	z.w.M.
2007003693	neg.	pos.	7,23 x 10 ⁻²	pos.	9,32 x 10 ⁻²			pos. 7	pos.	pos.	pos.
2007003801	neg.	pos.	2,80 x 10 ⁻¹	neg.		neg.		neg.			
2007003963	neg.	pos.	1,31 x 10 ⁻²	neg.		neg.		neg.			
2007004472	neg.	pos.	1,58 x 10 ⁻²	neg.		neg.		neg.			
2007006174	neg.	pos.	3,60 x 10 ⁻¹	neg.		pos.	6,00 x 10 ⁻¹	pos. 8	neg.	fraglich	neg.
2007006799	neg.	pos.	9,90 x 10 ⁻¹	neg.		neg.		neg.			
2007007438	neg.	pos.	2,60 x 10 ⁻¹	pos.	4,23 x 10 ⁻²			pos. 9	neg.	neg.	neg.
2007009165	neg.	pos.	1,28 x 10 ⁻²	neg.		pos.	8,65 x 10 ⁻¹	pos. 10	neg.	pos.	pos.
2007012785	neg.	pos.	7,70 x 10 ⁻¹	pos.	1,23 x 10 ⁻²			pos. 11	neg.	pos.	pos.
2007015294	neg.	pos.	3,41 x 10 ⁻¹	pos.	2,99 x 10 ⁻¹			pos. 12	pos.	neg.	pos.
2002007851	pos.	neg.		pos.	2,30 x 10 ⁻¹	pos.	5,55 x 10 ⁻¹	pos.			
2003015523	pos.	neg.		pos.	1,79 x 10 ⁻⁴	pos.	1,37 x 10 ⁻³	pos.			
2003024174	pos.	neg.		pos.	1,36 x 10 ⁻¹	pos.	1,74 x 10 ⁻²	pos.			
2004000278	pos.	neg.		neg.				neg. 13	z.w.M.	z.w.M.	z.w.M.
2004005079	pos.	neg.		pos.	1,18 x 10 ⁻²	neg.		neg. 14	z.w.M.	pos.	pos.
2005000499	pos.	neg.		neg.				neg. 15	neg.	neg.	neg.
2007003942	pos.	neg.		neg.				neg. 16	neg.	neg.	neg.
2007004656	pos.	neg.		pos.	2,86 x 10 ⁻³	pos.	3,06 x 10 ⁻³	pos.			
2007005282	pos.	neg.		pos.	9,55 x 10 ⁻¹	neg.		neg. 17	neg.	neg.	neg.
2007006569	pos.	neg.		pos.	5,45 x 10 ⁻¹	neg.		neg. 18	neg.	neg.	neg.
2007012510	pos.	neg.		pos.	2,62 x 10 ⁻²	neg.		neg. 19	neg.	neg.	neg.

Um die Ursache für die diskrepannten Ergebnisse weiter abzuklären, wurden die WUPyV-Lasten in Abhängigkeit von der Übereinstimmung zwischen qualitativem Status der real-time-PCR und der konventionellen WUPyV-LTA-PCR verglichen (Abbildung 4). Dabei war ersichtlich, dass die Viruslasten für Proben, die in der real-time-PCR initial positiv waren und ein negatives Ergebnis in der Voruntersuchung mittels konventioneller WUPyV-LTA-PCR hatten, insgesamt niedrig waren (Maximum 720 Kopien/ml, Median 99 Kopien/ml). Demgegenüber lag der Viruslast-Median für alle Proben, die sowohl in der real-time-PCR als auch in der Voruntersuchung positiv waren, bei 3500 Kopien/ml.

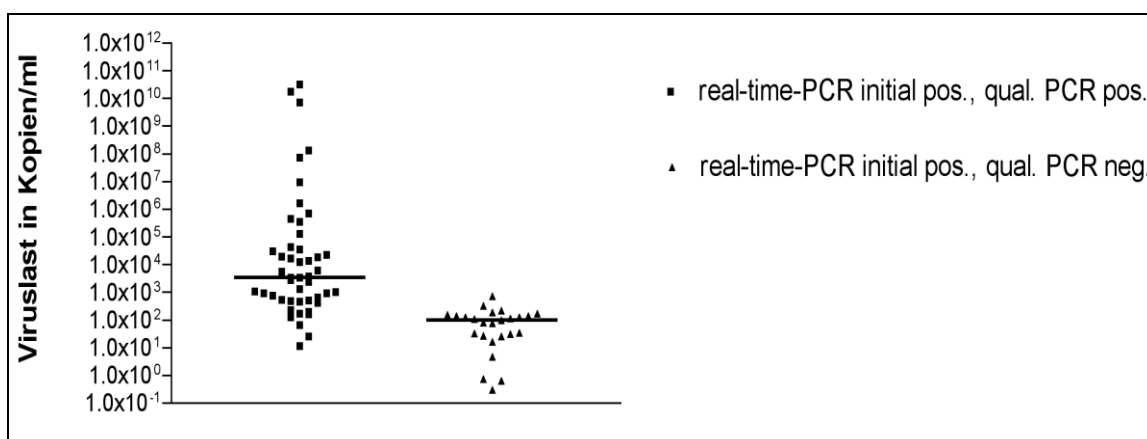


Abbildung 4: Vergleich der WUPyV-Lasten in NRS in Abhängigkeit vom qualitativen WUPyV-DNA-Status in der Voruntersuchung mittels konventioneller WUPyV-LTA-PCR

Qual. PCR: konventionelle WUPyV-LTA-PCR. Die horizontalen Balken stellen den Median dar.

Die folgende Vierfelder-Tafel (Tabelle 10) zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der Voruntersuchungen mittels konventioneller WUPyV-LTA-PCR (Neske *et al.*, 2008) und die qualitativen Ergebnisse der real-time-PCR für die untersuchten 1232 Patientenproben. Insgesamt war eine sehr gute Übereinstimmung zwischen beiden Methoden erkennbar. Wie in Abbildung 4

gezeigt, traten Diskrepanzen zwischen beiden Methoden hinsichtlich positiver Ergebnisse nur bei niedriger Viruslast auf, die überwiegend unterhalb der mittels Probit-Analyse ermittelten 95%-Nachweisgrenze lagen. In diesem Bereich ist ein in jedem Ansatz regelmäßig positives Testergebnis aus stochastischen Gründen nicht zu erwarten. Dennoch gelang es, einen Teil der diskrepant positiven Ergebnisse durch zusätzliche Untersuchungen mittels WUPyV-NCR-PCR zu bestätigen. Da zudem alle negativen Kontrollen stets negativ waren, wurde für die weiteren Auswertungen davon ausgegangen, dass es sich bei allen 64 positiven Endergebnissen der real-time-PCR um spezifische Amplifikationen von WUPyV-DNA handelte. Bei zweifach oder dreifach getesteten Proben wurde im Folgenden der Viruslast-Mittelwert der positiven Bestimmungen verwendet.

Tabelle 10: Vergleich der real-time-PCR und der konventionellen WUPyV-LTA- PCR zum qualitativen Nachweis von WUPyV-DNA in NRS

	konventionelle WUPyV-LTA- PCR positiv	konventionelle WUPyV-LTA- PCR negativ	Gesamt
real-time-PCR positiv	51 (47)	13 (25)	64 (72)
real-time-PCR negativ	7 (11)	1161 (1149)	1168 (1160)
Gesamt	58 (58)	1174 (1174)	1232 (1232)

Die Werte in Klammern entsprechen den Ergebniswerten nach der initialen Testung. Die Werte ohne Klammern entsprechen den Endergebnissen nach Wiederholung der diskrepanten Ergebnisse mit der WUPyV-real-time-PCR-Methode.

3.3 Quantitative WUPyV-real-time-PCR der Nasenrachensekrete

Die 64 NRS, die in der WUPyV-real-time-PCR ein positives Endergebnis hatten, stammten von insgesamt 61 Kindern. Von drei Kindern lagen zwei WUPyV-DNA-positive NRS vor, welche im Abstand von zwei Tagen, neun Tagen, beziehungsweise von acht Monaten entnommen wurden. Der Viruslast-Median der 64 Proben betrug $9,5 \times 10^2$ Kopien/ml. Dabei lag die maximal detektierte WUPyV-Last bei $3,4 \times 10^{10}$ Kopien/ml. Insgesamt wies ein kleiner Anteil der WUPyV-positiven NRS (4,7%) hohe Viruslasten über 10^9 Kopien/ml und ein größerer Anteil der NRS (51,6%) niedrige Viruslasten mit weniger als 1000 Kopien/ml auf. In 34,4% (n= 22) der Fälle lag die Viruslast der WUPyV-positiven Proben unter der 95%-Nachweisgrenze von 360 Kopien/ml (Abbildung 5). In Bezug auf die drei Kinder mit zweimaliger NRS-Entnahme zeigte sich eine abnehmende Viruslast bei den Kindern mit einem NRS-Entnahmeabstand von zwei und neun Tagen (von 10^3 auf 10^1 und von 10^5 auf 10^4) und eine Viruslastzunahme im Fall des achtmonatigen Entnahmeabstandes (von 10^2 auf 10^4).

3.4 Krankheitsbilder und Koinfektionen bei Kindern mit WUPyV-Nachweis

In der vorangegangenen Studie, in der die NRS mittels konventioneller qualitativer PCR auf WUPyV-DNA getestet wurden, war ein breites Spektrum verschiedener respiratorischer Erkrankungen der WUPyV-positiven Kinder ermittelt worden, wobei kein bestimmtes Krankheitsbild auffallend häufig auftrat (Neske *et al.*, 2008).

Um mögliche klinische Manifestationen einer WUPyV-Infektion weiter zu untersuchen wurden die NRS-Viruslasten der 64 WUPyV-positiven Patienten mit Bezug auf ihre Krankheitsbilder verglichen. Dies geschah unter der Annahme, dass hohe WUPyV-NRS-Lasten eine hohe pathogenetische Relevanz besitzen könnten. Hierzu wurden die respiratorischen Krankheitsbilder in insgesamt fünf Gruppen (obere Atemwegsinfektionen, Pneumonie, Bronchitis, obstruktive Bronchitis, Fieberkrampf) unterteilt. Die

Viruslasten mit den entsprechenden Viruslast-Medianen der einzelnen Gruppen sind in Abbildung 5 dargestellt. Die klinische Diagnose „Krampfanfall bei Fieber“ wurde dabei als separate Gruppe angesehen, obwohl sie nie als alleinige Diagnose sondern immer im Zusammenhang mit einem anderen Krankheitsbild gestellt worden war (z. B. obere Atemwegsinfektion, Gastroenteritis, Bronchitis, Pneumonie). Die Viruslast-Mediane waren sehr ähnlich und lagen zwischen $6,8 \times 10^2$ Kopien/ml (obstruktive Bronchitis) und $3,0 \times 10^3$ Kopien/ml (Pneumonie). Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied der Viruslasten in Relation zum Krankheitsbild nachgewiesen werden ($p=0,98$; Kruskal-Wallis-Test).

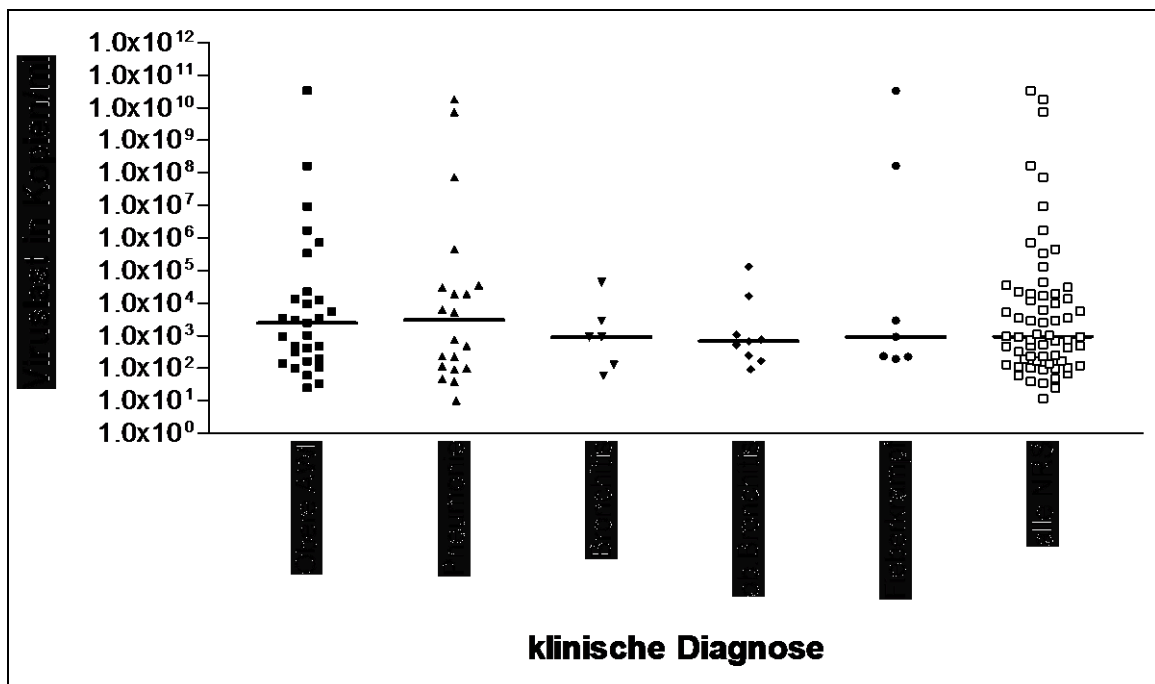


Abbildung 5: WUPyV-Last der NRS mit Bezug auf die klinische Diagnose

Darstellung der WUPyV-Last in NRS mit Bezug auf die klinische Diagnose. Die Medianwerte (horizontale Balken) betragen für alle WUPyV-positiven NRS $9,5 \times 10^2$ Kopien/ml, für die obere Atemwegsinfektion (obere AWI) $2,5 \times 10^3$ Kopien/ml, für die Pneumonie $3,0 \times 10^3$ Kopien/ml, für die Bronchitis $9,3 \times 10^2$ Kopien/ml, für die obstruktive (ob.) Bronchitis $6,8 \times 10^2$ Kopien/ml und für den Fieberkrampf $9,3 \times 10^2$ Kopien/ml. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ($p=0,98$; Kruskal-Wallis-Test).

Wie unter 2.1 beschrieben waren alle Proben mittels Immunfluoreszenztest routinemäßig auf Antigen von respiratorischen Viren (Influenza A/B-Viren, RSV, Parainfluenzaviren 1 – 3, Adenoviren) sowie mittels PCR auf hBoV-DNA getestet worden. Aus der vorangegangenen Studie von Neske et al. war bereits eine hohe Koinfektionsrate der WUPyV-positiven Proben bekannt (Neske *et al.*, 2008). Bezogen auf die mit der real-time-PCR ermittelten WUPyV-Nachweise ergaben sich Koinfektionen für 32 (50%) der WUPyV-positiven NRS (7 x Adenoviren, 5 x RSV, 5 x Influenza A-Virus, 4 x hBoV, 4 x Adenoviren/hBoV, 2 x Parainfluenzavirus 3, 2 x Influenza A-Virus/hBoV, 1 x Parainfluenzavirus 2, 1 x RSV/hBoV, 1 x Adenoviren/Parainfluenzavirus 3/hBoV). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Koinfektionen und der Höhe der WUPyV-Last in NRS zu untersuchen, wurden die entsprechenden WUPyV-Lasten verglichen (Abbildungen 6). Dabei zeigte sich zwischen den Viruslast-Medianen der NRS mit Koinfektionen ($9,5 \times 10^2$ Kopien/ml) und der NRS ohne Koinfektionen ($8,6 \times 10^2$ Kopien/ml) kein signifikanter Unterschied ($p= 0,6414$; Mann-Whitney-Test). Auch nach Auftrennung der Gruppe mit Koinfektionen in die einzelnen Erreger ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p= 0,99$; Kruskal-Wallis-Test; Abbildung 6).

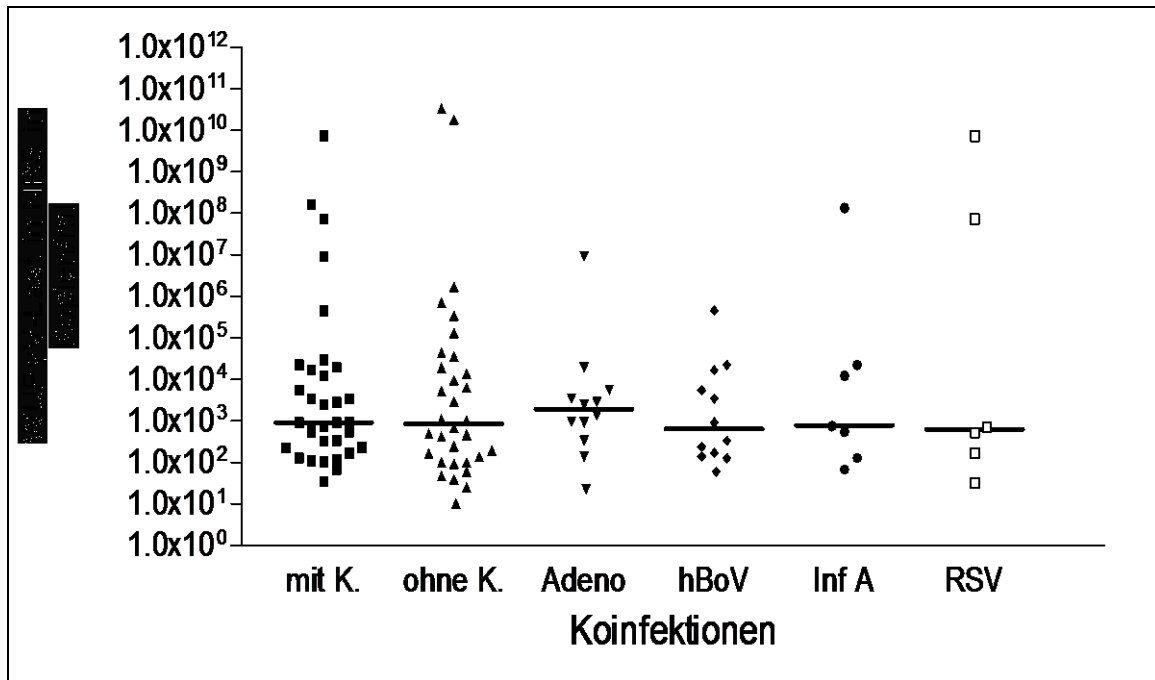


Abbildung 6: WUPyV-Last in NRS der Kinder mit und ohne spezifische respiratorische Koinfektionen

Darstellung der WUPyV-Lasten in NRS in Abhängigkeit von Koinfektionen (K.). Die horizontalen Balken stellen die Viruslast-Mediane dar. Die Medianwerte der Viruslasten mit Koinfektion und ohne Koinfektion betragen $9,5 \times 10^2$ Kopien/ml bzw. $8,6 \times 10^2$ Kopien/ml. Zusätzlich sind Koinfektionen mit spezifischen Erregern abgebildet, die mehr als fünfmal neben WUPyV auftraten: Adenovirus (Adeno), hBoV, Influenza A-Virus (Inf A), RSV. Für keine der untersuchten Gruppen ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede der Viruslast-Mediane.

Die Untersuchung der WUPyV-Lasten der fünf oben beschriebenen Krankheitsbilder (siehe Abbildung 5) in Abhängigkeit vom Koinfektionsstatus zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Medianwerte ($p= 0,88$; Kruskal-Wallis-Test; Abbildung 7).

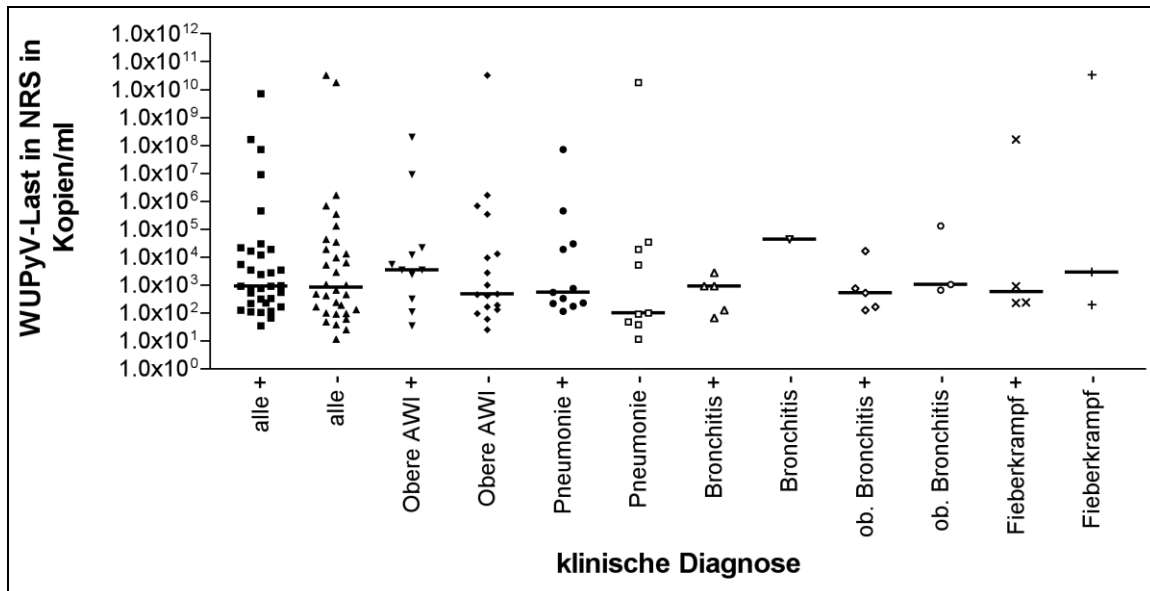


Abbildung 7: WUPyV-Lasten in NRS in Abhängigkeit von klinischer Diagnose und dem Koinfektionsstatus WUPyV-positiver Kinder

Darstellung der WUPyV-Lasten in NRS aller WUPyV-positiven Kinder sowie aufgeteilt nach Krankheitsbildern, jeweils mit (+) bzw. ohne (-) Koinfektion. Die horizontalen Balken stellen die Viruslast-Medianwerte dar. Für keine der untersuchten Gruppen ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede der Viruslast-Mediane.

3.5 WUPyV-real-time-PCR von Serum- und Stuhlproben

Um Informationen über die Ausbreitung der WUPyV-Infektionen zu erhalten, wurden – soweit verfügbar – Stuhl- und Serumproben von Kindern mit WUPyV-positiven NRS ebenfalls auf das Vorhandensein von WUPyV-DNA untersucht. Es wurden nur solche Stuhl- und Serumproben verwendet, die nicht länger als 14 Tage vor oder nach dem NRS entnommen worden waren. Insgesamt waren von vier Kindern sowohl Serum als auch Stuhlproben und von jeweils zehn Kindern nur Stuhlproben beziehungsweise nur Serumproben zusätzlich zu den NRS vorhanden (Tabelle 11).

Tabelle 11: WUPyV-Last in NRS, Serum- und Stuhlproben

NRS			Serum		Stuhl	
Kind	Alter in Jahren	NRS-VL	Serum-VL Kopien/ml	Zeitabstand zum NRS in Tagen	Stuhl-VL in Kopien/Reaktion	Zeitabstand zum NRS in Tagen
1	3,2	$1,9 \times 10^8$	----	----	$5,8 \times 10^0$	+1
2	1,3	$3,4 \times 10^{10}$	$5,8 \times 10^3$	+7	$8,7 \times 10^3$	+3
3	2,4	$7,5 \times 10^9$	$1,8 \times 10^2$	+3	----	----
4	2,5	$6,1 \times 10^1$	$2,9 \times 10^2$	+8	negativ	0
5	1,2	$3,2 \times 10^2$	----	----	negativ	-1
6	2,2	$2,0 \times 10^4$	----		negativ	0
7	5,4	$3,5 \times 10^5$	----	----	negativ	0
8	4,4	$9,2 \times 10^2$	----	----	negativ	0
9	1,5	$9,7 \times 10^2$	----	----	negativ	0
10	4,7	$2,7 \times 10^3$	----	----	negativ	0
11	3,7	$5,6 \times 10^3$	----	----	negativ	-2
12	4,7	$9,9 \times 10^1$	----	----	negativ	-1
13	1,3	$1,9 \times 10^2$	----	----	negativ	0
14	2,8	$6,8 \times 10^1$	negativ	+5	----	----
15	3,9	$2,4 \times 10^3$	negativ	+9	----	----
16	3,2	$4,8 \times 10^1$	negativ	+2	----	----
17	4,7	$4,2 \times 10^2$	negativ	+3	negativ	0
18	2,1	$4,6 \times 10^5$	negativ	+10	----	----
19	2,1	$3,6 \times 10^4$	negativ	+3	----	----
20	4,5	$6,4 \times 10^3$	negativ	-5	negativ	0
21	5,6	$4,9 \times 10^2$	negativ	+5	----	----
22	0,7	$6,8 \times 10^2$	negativ	+4	----	----
23	4,4	$9,4 \times 10^3$	negativ	+1	----	----
24	4,4	$2,5 \times 10^1$	negativ	-1	----	----

Serum-VL: Serum-Viruslast; Stuhl-VL: Stuhl-Viruslast

Um für Stuhlproben-Testungen eine Probenmaterial-bedingte Inhibition als Ursache von WUPyV-negativen Reaktionen auszuschließen, wurden Spike-Experimente durchgeführt. In Abbildung 8 sind die entsprechenden Amplifikationskurven abgebildet. Die Amplifikationskurven des Spike-Experiments traten im erwarteten Zyklus-Bereich (ca. 22. bis 25. Zyklus) auf und verliefen parallel zueinander. Für keine der Stuhlproben konnte eine relevante Inhibition der PCR festgestellt werden.

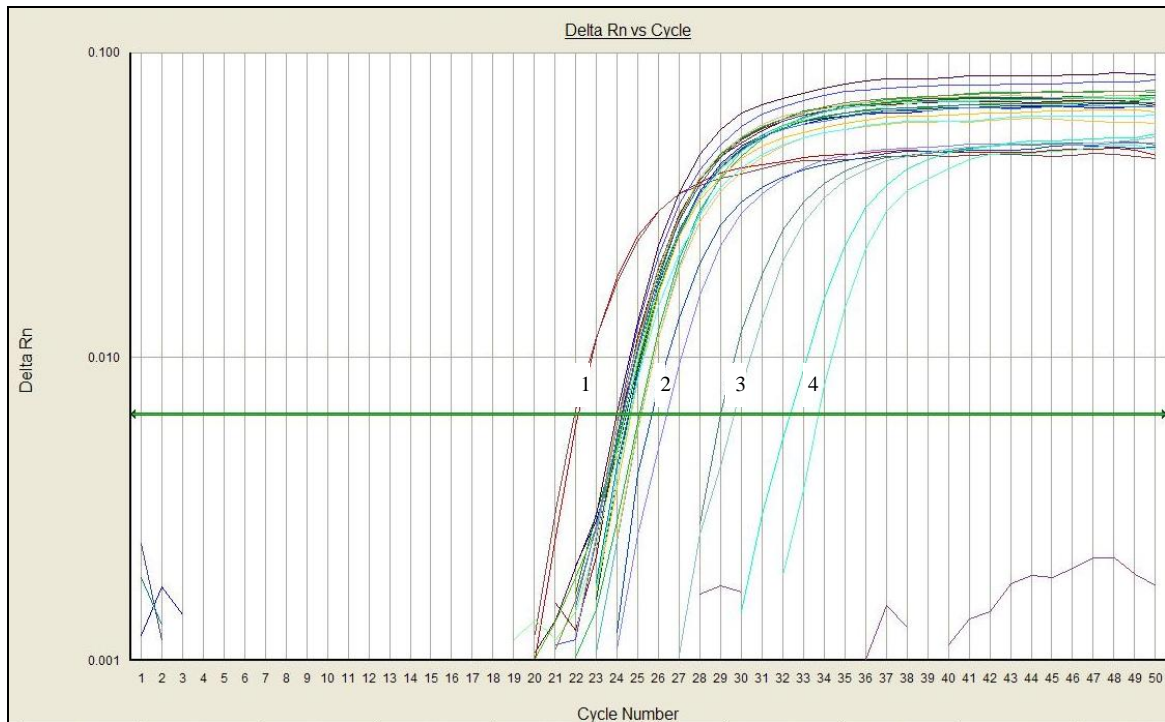


Abbildung 8: Amplifikationskurven zum Ausschluss einer PCR-Inhibition durch Stuhlproben

Die Amplifikationskurven der Standardkurve (WUPyV-Plasmid) sind mit 1, 2, 3, 4 (5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 Kopien/Reaktion, jeweils im Doppelansatz) bezeichnet, die der Stuhlproben sind unbezeichnet.

Von den jeweils 14 untersuchten Serum- und Stuhlproben wurden drei Serum- (21,4%) und zwei Stuhlproben (14,3%) positiv für WUPyV-DNA getestet (Tabelle 11). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen WUPyV-DNA in NRS und in Stuhl- bzw. Serumproben zu ermitteln, wurde die WUPyV-Last in den NRS in Abhängigkeit vom WUPyV-Status der zugehörigen Serum- bzw. Stuhlproben analysiert. Wie in Abbildung 9 zu sehen, traten tendenziell höhere WUPyV-Last-Mediane der NRS bei Kindern mit WUPyV-positiven Serumproben ($7,5 \times 10^9$ Kopien/ml versus $5,0 \times 10^2$ Kopien/ml; $p = 0,09$ Mann-Whitney-Test) oder WUPyV-positiven Stuhlproben ($1,7 \times 10^{10}$ Kopien/ml versus $9,4 \times 10^2$ Kopien/ml; Anzahl zur Berechnung des p-Wertes zu klein) auf. Das Kind mit der höchsten NRS-Viruslast ($3,4 \times 10^{10}$ Kopien/ml; Tabelle 11, Kind 2), wies jeweils auch WUPyV-DNA in der Serum- und Stuhlprobe auf.

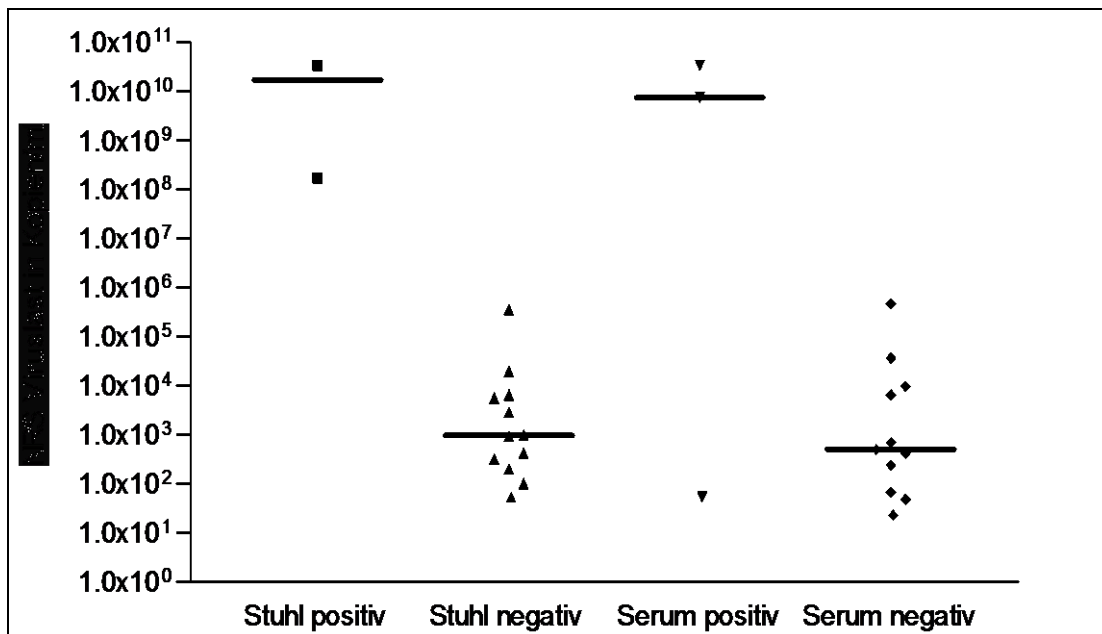


Abbildung 9: WUPyV-Last in NRS in Abhängigkeit vom WUPyV-Status zugehöriger Stuhl- bzw. Serumproben

Die Medianwerte der jeweiligen Viruslasten sind als horizontale Balken dargestellt. Die Unterschiede der Viruslast-Mediane waren nicht signifikant. Stuhl: $p=0,09$ (Mann-Whitney-Test), Serum: p -Wert nicht zu berechnen da Anzahl zu klein.

3.6 WUPyV-Last in NRS und Infektionsalter

In der vorangegangenen Studie zur qualitativen WUPyV-PCR war als Altersmedian für WUPyV-positive Kinder 3,0 Jahre ermittelt worden (Neske *et al.*, 2008). Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der WUPyV-Last und dem Alter der Kinder gibt, wurden die Viruslasten in NRS mit Bezug auf acht Altersgruppen untersucht (Abbildung 10). So könnte beispielsweise eine sehr hohe WUPyV-Last auf eine Erstinfektion und niedrigere Viruslasten in höheren Altersgruppen auf Reinfektionen oder Viruspersistenz hinweisen.

Die höchsten WUPyV-Lasten wurden in den Altersgruppe der drei- und fünfjährigen Kinder detektiert. Signifikante Unterschiede der Viruslast-Mediane in den verschiedenen Altersgruppen ergaben sich jedoch nicht ($p= 0,3343$; Kruskal-Wallis-Test).

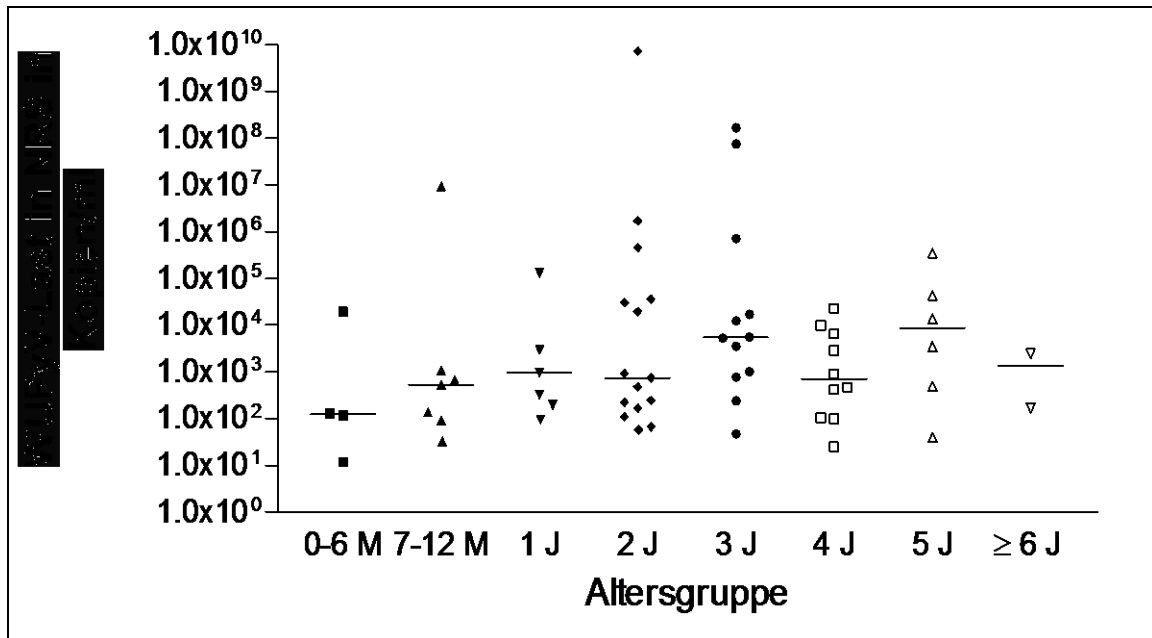


Abbildung 10: WUPyV-Last in NRS in Abhängigkeit vom Alter

Die horizontalen Balken stellen die Viruslast-Medianwerte dar. Die Unterschiede der Viruslast-Mediane waren nicht signifikant ($p= 0,3343$; Kruskal-Wallis-Test).

3.7 WUPyV-Last in NRS und jahreszeitliche Verteilung

Die Saisonalität von WUPyV wurde in der vorangegangenen Studie von Neske *et al.* untersucht (Neske *et al.*, 2008). WUPyV-Infektionen konnten ganzjährig nachgewiesen werden, vor allem jedoch in den Wintermonaten (Neske *et al.*, 2008). Um zu untersuchen, ob es Anhaltspunkte für jahreszeitliche Einflüsse auf die Viruslast gibt (z.B. Nachweis von Erstinfektionen mit hohen Viruslasten in den Wintermonaten und Nachweis von persistierenden WUPyV-Infektion mit

niedrigen Viruslasten in den Sommermonaten), wurden die WUPyV-Lasten in Abhängigkeit vom Entnahmemonat miteinander verglichen (Abbildung 11).

Sehr hohe WUPyV-Lasten in NRS ($> 10^7$ Kopien/ml) wurden nur in den Monaten Januar bis Mai nachgewiesen. Es konnte jedoch keine signifikante Assoziation der Höhe der WUPyV-Last im NRS mit einem bestimmten Monat nachgewiesen werden ($p= 0,85$; Kruskal-Wallis-Test).

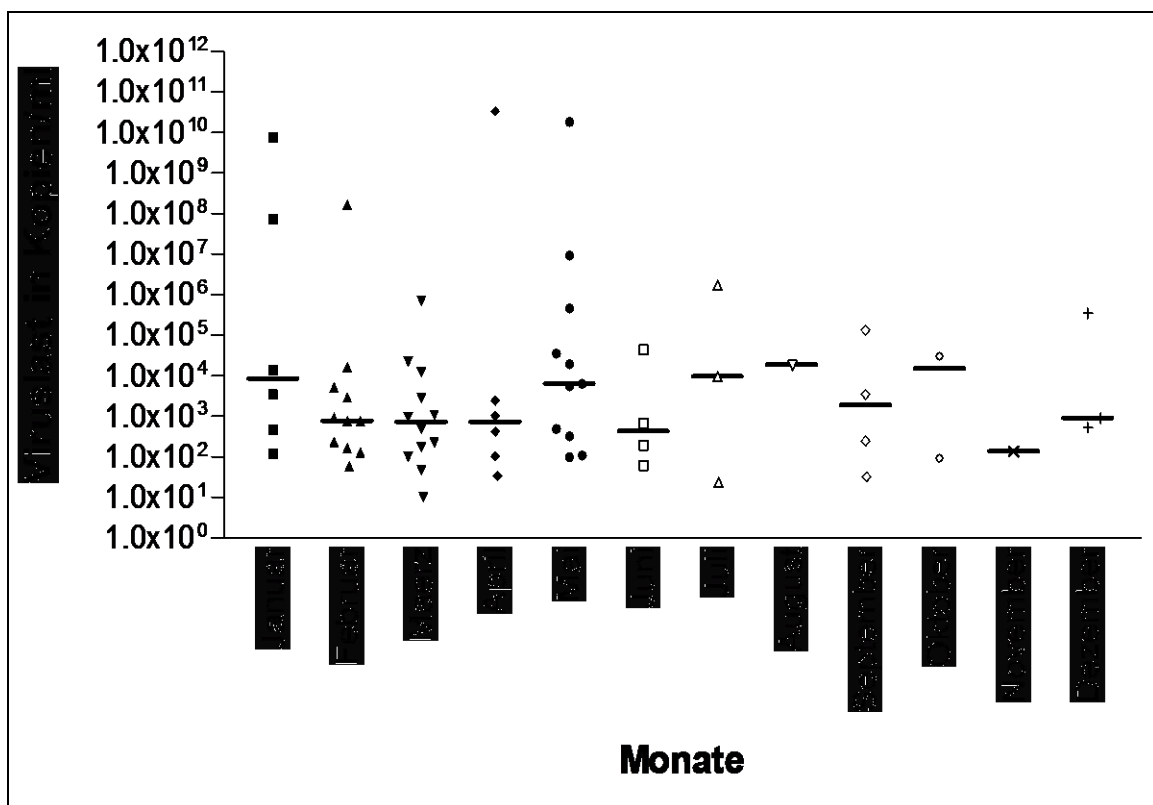


Abbildung 11: WUPyV-Last in NRS in Abhängigkeit vom Entnahmemonat

Der Untersuchungszeitraum umfasste Januar 2002 bis September 2005 und Januar 2007 bis Juli 2007. Die horizontalen Balken stellen die Viruslast-Medianwerte dar. Es ergaben sich keine signifikante Unterschiede der Viruslast-Mediane ($p= 0,85$; Kruskal-Wallis-Test).

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Diagnosemethode des neu entdeckten WUPyV aus der Familie der Polyomaviridae in NRS zu verbessern, das WUPyV auch in Serum- und Stuhlproben nachzuweisen und eventuell vorhandene Assoziationen im Hinblick auf die klinische Relevanz zu ermitteln. Dazu wurde eine WUPyV-real-time-PCR-Methode für den quantitativen Nachweis von WUPyV-DNA in NRS etabliert. Die Ergebnisse der Validierung zeigten, dass WUPyV-DNA mit der entwickelten WUPyV-real-time-PCR sensitiv, spezifisch, zuverlässig und über einen breiten linearen Bereich nachgewiesen werden konnte. Letztendlich wurde in 5,2% (n= 64) der 1232 NRS von insgesamt 1134 pädiatrischen Patienten aus der Universitätskinderklinik Würzburg mit akuten Erkrankungen des Respirationstraktes im Zeitraum von Januar 2002 bis September 2005 und Januar 2007 bis Juli 2007 WUPyV-DNA detektiert.

4.1 Vergleich der quantitativen WUPyV-real-time-PCR mit der qualitativen WUPyV-PCR

Der Vergleich der Probit-Analyse der WUPyV-real-time-PCR (7,1 Kopien/Reaktion) mit dem Ergebnis der Probit-Analyse einer zuvor verwendeten konventionellen qualitativen WUPyV-LTA-PCR (8,8 Kopien/Reaktion) zeigte eine ähnliche Sensitivität für beide Testverfahren (Neske *et al.*, 2008). Für 36 NRS ergaben sich jedoch diskrepante WUPyV-Ergebnisse im Vergleich beider Methoden. Diese Diskrepanzen wurden zunächst durch Wiederholungstestungen mit der WUPyV-real-time-PCR weiter abgeklärt. Die anschließend verbleibenden 19 NRS mit weiterhin diskrepanten Ergebnissen wurden mit zwei zusätzlichen Primerpaaren mittels konventioneller qualitativer WUPyV-NCR-PCR untersucht. Dadurch konnte ein Teil der positiven real-time-PCR-Ergebnisse bestätigt werden. Allgemein traten Diskrepanzen zwischen der real-time-PCR und der konventionellen qualitativen WUPyV-LTA-PCR hinsichtlich positiver Ergebnisse nur bei niedriger Viruslast

im Bereich der mittels Probit-Analyse ermittelten 95%-Nachweisgrenze oder darunter auf. Daher war anzunehmen, dass die beobachteten Diskrepanzen auf den stochastisch bedingten inkonstanten Nachweis geringer WUPyV-DNA-Mengen zurückzuführen sind.

Insgesamt wurden mit der WUPyV-real-time-PCR im Gegensatz zur konventionellen qualitativen WUPyV-LTA-PCR mehr WUPyV-DNA-positive NRS detektiert (64 versus 58). Da das mit der real-time-PCR amplifizierte und detektierte DNA-Fragment kürzer als das der konventionellen qualitativen PCR ist (93 bp versus 196 bp), wird die extrahierte WUPyV-DNA mit der real-time-PCR-Methode möglicherweise sensitiver nachgewiesen.

Abgesehen von der geringfügig besseren Sensitivität ist der entscheidende Vorteil der WUPyV-real-time-PCR gegenüber der konventionellen qualitativen PCR die Möglichkeit der quantitativen Viruslastbestimmung. Weitere Vorteile der WUPyV-real-time-PCR sind der geringere Aufwand im Vergleich zur konventionellen PCR, da das Auftrennen der amplifizierten PCR-Fragmente mittels Gelelektrophorese entfällt, woraus sich auch eine geringere Kontaminationsgefahr ergibt. Ein Nachteil besteht in den höheren Kosten dieser Methode (z.B. WUPyV-Sonde, Mastermix, Geräte) sowie in einem höheren Validierungsaufwand. Die Auswahl der Methode für die WUPyV-DNA-Detektion ist somit unter anderem von der Fragestellung, der Praktikabilität sowie von der Geräteausstattung des Labors abhängig.

4.2 Vergleich der WUPyV-Prävalenz mit anderen WUPyV-Arbeiten

Vergleicht man die ermittelte WUPyV-DNA-Prävalenz in NRS (5,2%) mit den Ergebnissen anderer WUPyV-Publikationen, lag diese innerhalb der bisher beschriebenen WUPyV-NRS-Prävalenzraten (0,4% bis 10,5%). Eine Übersicht mit den wichtigsten Daten anderer WUPyV-Prävalenz-Untersuchungen ist in Tabelle 12 dargestellt. Die Studien stammten aus Australien (Bialasiewicz *et al.*, 2007 a, b; Gaynor *et al.*, 2007), den USA (Gaynor *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2007; Wattier *et al.*, 2008), aus Großbritannien (Norja *et al.*, 2007; Abedi Kiasari *et al.*,

2008), Südkorea (Han *et al.*, 2007), Kanada (Abed *et al.*, 2007), China (Lin *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008), Deutschland (Neske *et al.*, 2008; Kleines *et al.*, 2008), Frankreich (Foulongne *et al.*, 2008), den Niederlanden (van der Zalm *et al.*, 2008), Schweden (Lindau *et al.*, 2008) und Thailand (Payungporn *et al.*, 2008 a, b). Der WUPyV-DNA-Nachweis auf den verschiedenen Kontinenten, wie Europa, Nordamerika, Asien und Australien, bestätigt die schon bei der Erstbeschreibung vermutete weltweite Verbreitung des WUPyV.

Wie stark der Einfluss regionaler Faktoren die Prävalenz der WUPyV-Infektion beeinflusst, ist bislang nicht bekannt. Die unterschiedlich hohen WUPyV-Infektionsraten könnten neben der unterschiedlichen regionalen Detektierung auch durch die verschiedenen Untersuchungszeiträume, die unterschiedliche Anzahl und das Alter der untersuchten Probanden, die Auswahl der Patienten (z. B. symptomatisch, asymptomatisch, immunsupprimiert) sowie die Art und Weise der Durchführung des WUPyV-Nachweises (Primer, Mastermix, Zyklusbedingungen) und der verwendeten Methode (qualitative PCR oder quantitative real-time-PCR) erklärt werden (Tabelle 12, 13).

4.3 Vergleich mit anderen WUPyV-real-time-PCR-Arbeiten

Zu Beginn dieser Arbeit lagen zwei Publikationen vor, die ebenfalls die real-time-PCR zur WUPyV-DNA-Detektion verwendeten (Bialasiewicz *et al.*, 2007 a; Le *et al.*, 2007). Im Verlauf erschienen seitdem weitere WUPyV-real-time-PCR-Publikationen, die NRS-Proben von Probanden mit respiratorischen Infektionen untersuchten (Lindau *et al.*, 2008; Kleines *et al.*, 2008; Payungporn *et al.*, 2008 b; van der Zalm *et al.*, 2008). WUPyV-DNA konnte dabei in 1,3% (Lindau *et al.*, 2008) bis 10,5% (Bialasiewicz *et al.*, 2007 a) der NRS nachgewiesen werden. Zusätzlich zur Studienübersicht in Tabelle 12 sind methodische Aspekte der real-time-PCR-Publikationen in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 12: Vergleich der WUPyV-Arbeiten

Arbeit von	Er-schienen	Land	Methode	Material	Anzahl der Proben	Untersuchte Population	Alter Positive	Positiv	AS	KI-Rate	Zeitraum der Untersuchung	KH
Gaynor et al.	05/2007	Australien USA	Qual. PCR für WUPyV	Australien: NRS, USA: NRS, BAL	Australien: 1245 USA: 890	Kinder und Erwachsene v.a. < 3 J	Australien: 4 M - 53 J USA: 4 M - 51 J	Australien: 3% USA: 0,7%		Australien: 67% USA: 100%	Australien: 01 - 12/2003 USA: 2006	akute OWI UWI GI
Bialasiewicz et al. a	07/2007	Australien	Quant. PCR für WUPyV, KIPyV	NRS	200	k. A.	k. A.	10,5%		k. A.	06-11/2003	akute AWI
Norja et al.	09/2007	Groß-britannien	Qual. PCR für WUPyV, KIPyV	NRS, BAL, Sputum, Tracheal-sekrete	983	Kinder und Erwachsene, Immunsupprimierte, keine resp. Infektion	sy: UWI, Median: 1J OWI, Median: 14 J as: Median: 5 J	1,6%	5,3%	40%	k. A.	akute UWI OWI
Bialasiewicz et al. b	11/2007	Australien	Qual. PCR für WUPyV, KIPyV	NRS, BAL, Bronchail-spülungen, Endotracheal-aspirate	2866	3 d – 95 J Median: 1,38 J	19 d – 52 J v.a. < 5 J	4,5%		80%	01/2003 - 01/2004	akute AWI UWI OWI
Abed et al.	12/2007	Kanada	Qual. PCR für WUPyV	NRS	157 sy: 79 as: 78	3 J und jünger, KG ohne resp. Infektion	sy: 13 M as: 13 – 24 M	2,5%	6,4%	100%	12/2002 - 04/2003	akute AWI
Le et al.	12/2007	USA	Quant. PCR für WUPyV	NRS	2637	1 d - 88 J < 4 J: 2263 > 4 J: 374; Immunsupprimierte	1 d – 15 J älteste Immunsup.: 12, 14, 15 J	2,7%		71%	07/2003 - 06/2004	akute UWI OWI
Han et al.	11/2007	Süd-Korea	Qual. PCR für WUPyV	NRS	558 sy: 486 as: 72	sy: Median 9 M, as: Median 14 M	k. A.	7,0%.	4,2%	68%	11/2006 - 06/2007	UWI
Lin et al.	12/2007	China	Qual. PCR für WUPyV	NRS	278	< 5 J	3 J	0,4%		0%	02/2005 - 12/2006	UWI
Neske et al.	01/2008	Deutsch-land	Qual. PCR für WUPyV	NRS	1277	7 d - 22 J Median 1,6 Jahre	4 M - 6,3 J Median: 3 J	4,9%		55%	01/2002 - 11/2005 01-2007- 07/2007	akute AWI

Foulogne et al.	03/2008	Frankreich	Qual. PCR für WUPyV, KIPyV	NRS	537	< 5 J	2 – 48 M Median: 11,2 M	2,4%		31%	11/2006 - 06/2007	akute AWI UWI
Payungporn et al. a	03/2008	Thailand	Qual. PCR für WUPyV, KIPyV	NRS	302	5 d – 14 J	3 M – 9 J Median: 1 J	6,3%		42%	02/2006 - 02/2007	UWI OWI
Abedi Kiasari et al.	05/2008	Großbritannien	Qual. PCR für WUPyV, KIPyV	NRS	371	7 d – 79 J Median: 8 M	5 M - 14 J Median: 9 M	1,08%		75%	10/2006 - 02/2007	UWI OWI
Payungporn et al. b	06/2008	Thailand	Quant. PCR für WUPyV	NRS	302	k.A.	k.A.	6,3%		k.A.	2006 - 2007	akute AWI
Ren et al.	08/2008	China	Qual. PCR für WUPyV, KIPyV	Kinder: NRS Erwachsene: Nasen- u. Rachenabstriche	Kinder: 415 Erwachsene: 297	Kinder: 1 M -14 J Median: 8,2 M Erwachsene: 15 J – 97 J; Median: 43 J	Kinder: 2 M -7 J; Erwachsene: 12,7 M	Kinder: 2,4% Erwachsen 0%		100%	Kinder: 03/2007 - 12/2007 Erwachsene: 05/2005 - 12/2007	UWI
Kleines et al.	08/2008	Deutschland	Quant. PCR für WUPyV	NRS, Trachealsekrete, BAL	98	< 36 M	Median: 7 M	3%		33%	11/2005 - 04/2007	UWI
Lindau et al.	09/2008	Schweden	Quant. PCR für WUPyV, KIPyV	NRS	637	0 – 90 J Median: 7 J	< 4 J; 1 x 26 J	1,3%		59%	06/2004 - 07/2005	akute AWI
Yuan et al.	10/2008	China	Qual. PCR für WUPyV, KIPyV	NRS	406	Median: 2 J	3 d – 9 J Median: 24 M	4,2%		71%	12/2006 - 11/2007	akute AWI OWI UWI
van der Zalm et al.	11/2008	Niederlande	Quant. PCR für WUPyV, KIPyV	Rachenabstriche	230 von 18 Kindern	Median: 3,4 J sy und as	Median: 2,6 J	9%	3,0%	52%	11/2004 - 04/2005	akute AWI
Wattier et al.	11/2008	USA	Qual. PCR für WUPyV, KIPyV	Rachenprobe	sy: 367 as: 96	< 2 J sy. und as.	v.a. 17-18 M	7,1%	6,3%	50%	01 - 12/2004	OWI UWI

Qual. PCR: qualitative PCR; **Quant. PCR:** quantitative PCR; **as:** asymptomatisch; **sy:** symptomatisch; **BAL:** bronchoalveoläre Lavage; **J:** Jahre (e); **M:** Monat (e); **d:** Tag (e); **k. A.:** keine Angaben; **KG:** Kontrollgruppe; **KI-Rate:** Koinfektionsrate; **KH:** Krankheiten; **OWI/UWI:** obere-/untere Atemwegsinfektion; **akute AWI:** akute Atemwegsinfektion; **GI:** gastrointestinale Infektion; **v.a.:** vor allem, d.h. in der Arbeit wurden nur Angaben zu Altersgruppen mit dem größten Anteil an der Studienpopulation gemacht und k.A. zu Medianwerten.

Die verwendeten Primerpaare stammten entweder – so wie in dieser vorliegenden Studie – aus der Region des großen T-Antigens (Kleines *et al.*, 2008; Bialasiewicz *et al.*, 2007 a), aus der VP1 Region (Lindau *et al.*, 2008; Payungporn *et al.*, 2008 b) oder aus der regulatorischen Region (Bialasiewicz *et al.*, 2007 a) (Tabelle 13). Die untere Nachweisgrenze betrug bei Lindau *et al.* und Kleines *et al.* 500 Kopien/ml und bei Bialasiewicz *et al.* 10 Kopien/Reaktion (Lindau *et al.*, 2008, Kleines *et al.*, 2008, Bialasiewicz *et al.*, 2007 a). Diese Werte liegen im 95%-Konfidenzintervall für die 95%-Nachweisgrenze der verwendeten real-time PCR, so dass für die genannten Arbeiten von einer sehr ähnlichen Sensitivität wie in der vorliegenden Studie ausgegangen werden kann. Auffallend war die sehr hohe untere Nachweisgrenze von 10.000 Kopien/ml in der Publikation von Payungporn *et al.* (Payungporn *et al.*, 2008 b). Eine Ursache hierfür war aus der beschriebenen Methode nicht ersichtlich (Tabelle 13). In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass WUPyV-DNA dennoch in 6,3% der untersuchten Proben nachgewiesen wurde (Tabelle 12).

Angaben zu den detektierten WUPyV-Lasten sind nur in der Arbeit von Kleines *et al.* enthalten (Kleines *et al.*, 2008). In drei respiratorischen Proben (ein NRS, zwei Trachealsekrete) von Kindern im Alter von unter 36 Monaten wurde WUPyV-DNA mit folgenden WUPyV-Lasten nachgewiesen: 5×10^2 ; $3,7 \times 10^3$; 1×10^4 (Tabelle 12,13). Die WUPyV-Lasten erstreckten sich somit über ein deutlich kleineres Spektrum als die WUPyV-Lasten der vorliegenden Arbeit, welche Werte von 10^1 bis 10^{10} umfasst. Dies dürfte vor allem auf das wesentlich kleinere Probenkollektiv (98 versus 1232 Proben) und die daraus resultierende geringe Anzahl an positiven Proben (3 versus 64 Proben) bei Kleines *et al.* zurückzuführen sein.

Tabelle 13: Methodische Aspekte der WUPyV-real-time-PCR Arbeiten

Arbeit	Targetregion	Amplifikat-Länge	Nachweisgrenze	Zyklusbedingungen	Mastermix-Hersteller	Plasmidvektor	Amplifikationsgerät	WUPyV-Last
Diese Studie	C-terminale Region des großen T-Antigen	93 bp	360 Kopien/ml	15 min bei 95°C (Aktivierung Taq-Polymerase) → 50 Zyklen mit jeweils 30 s bei 95°C → 60 s bei 60°C	Qiagen Quantitect Probe Master Mix (Qiagen)	pCR2.1-TOPO (Invitrogen)	ABI 7500 real-time-PCR System (Applied Biosystems)	64 WUPyV-positive: Median: $9,5 \times 10^2$ Kopien/ml
Bialasiewicz et al., 2007 a	Terminale Ende des großen T-Antigen; regulatorische Region	Keine Angaben	10 Kopien/Reaktion	15 min bei 95°C (Aktivierung Taq-Polymerase) → 55 Zyklen mit jeweils 15 s bei 95 °C → 60 s bei 60°C	Qiagen Quantitect Probe Master Mix (Qiagen)	pGEM-T-Easy vector system (Promega)	RotorGene 3000 (Corbett Robotics)	Keine Angaben
Le et al., 2007	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben	ABI 7500 Real-Time Thermozykler (Applied Biosystems)	Keine Angaben
Lindau et al., 2008	VP1-Region	142 bp	500 Kopien/ml	15 min bei 95°C (Aktivierung Taq-Polymerase) → 40 Zyklen mit jeweils 15 s bei 94 °C → 20 s bei 57°C → 20 s bei 72°C	Quanti-Tect SYBR Green PCR master mix (Qiagen)	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben
Kleines et al., 2008	große T-Antigen Region	Keine Angaben	500 Kopien/ml	10 min bei 95°C (Aktivierung Taq-Polymerase) → 45 Zyklen mit jeweils 1 s bei 95°C → 10s bei 56°C → 10 s bei 72°C	LightCycler FastStart DNA Master mix (SYBR green I; Roche Applied Science)	pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen)	Keine Angaben	3 WUPyV-positive 5×10^2 ; $3,7 \times 10^3$; 1×10^4 Kopien/ml
Payungporn et al., 2008 b	VP1-Region	198 bp	10.000 Kopien/ml	3 min bei 95°C (Aktivierung Taq-Polymerase) → 40 Zyklen mit jeweils 10 s bei 95°C → 20 s bei 58°C → 20 s bei 72°C	Eppendorf MasterMix (Eppendorf)	pGEM-T Easy Vector (Promega)	Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research)	Keine Angaben
van der Zalm et al., 2008	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben	ABI 7500 System (Applied Biosystems)	Keine Angaben

4.4 WUPyV-real-time-PCR und Viruslast

Die NRS zeigten insgesamt ein breites Spektrum in der Höhe der quantitativ detektierten WUPyV-Last. Diese reichte von $1,2 \times 10^1$ Kopien/ml bis zu $3,4 \times 10^{10}$ Kopien/ml. Auffallend war, dass nur ein kleiner Anteil der WUPyV-positiven NRS (4,7%) hohe Viruslasten über 10^9 Kopien/ml aufwies, während der größte Anteil der WUPyV-positiven NRS (51,6%) niedrige Viruslasten mit weniger als 1000 Kopien/ml aufwies. In 34,4% (n= 22) der Fälle lag die Viruslast unter der 95%-Nachweisgrenze von 360 Kopien/ml. Die Ct-Werte dieser Proben lagen im Bereich von 37,6 bis 44,6 (Ct-Median: 41,4; Ct-Mittelwert 41,3).

Bei Ct-Werten über 40,0 ist davon auszugehen, dass eine real-time-PCR nicht mit hoher Effektivität abgelaufen ist. Eine reduzierte Effektivität kann z. B. durch inhibitorische Substanzen im Eluat der Extraktion hervorgerufen werden. Da in den Untersuchungen der NRS keine interne Kontrolle mitgeführt wurde, ist eine Aussage über mögliche Inhibition für die untersuchten NRS nicht möglich. Bei der Untersuchung der Stuhlproben wurde eine Inhibition durch Spike-Experimente ausgeschlossen. Bei reduzierter Amplifikationseffizienz und daraus resultierenden hohen Ct-Werten können sich durch Extrapolation der Standardkurve rechnerisch WUPyV-Lasten ergeben, die praktisch nicht messbar sind. Diese Ergebnisse werden daher in der Regel ohne konkreten Messwert als „schwach positiv“ angegeben. Für Median-Berechnungen im Rahmen der statistischen Auswertungen dieser Studie wurden quantitative Werte unterhalb der Nachweisgrenze jedoch verwendet.

Insgesamt ist die Aussagekraft der NRS-Viruslastergebnisse wegen der nicht standardisierten NRS-Gewinnung limitiert (z.B. betrug das NRS-Volumen 1 ml bis 10 ml bei Laboreingang). Allerdings unterschieden sich die gemessenen NRS-Viruslasten um den Faktor 10^8 , ein Bereich der zu groß ist, um durch die variierenden NRS-Volumina bedingt zu sein.

Nimmt man eine Analogie zwischen WUPyV und hBoV in Hinblick auf die klinische Relevanz der Viruslasthöhe an (Allander *et al.*, 2007 b), deutet die ermittelte Viruslastverteilung mit hohen Viruslasten bei wenigen Kindern auf WUPyV-Erstinfektionen und die niedrigen Kopienanzahlen bei vielen Kindern auf „zufällig“ nachgewiesene WUPyV-DNA ohne klinische Relevanz z. B. im Rahmen einer Viruspersistenz hin.

Von insgesamt drei Kindern lagen zweite NRS-Proben vor, die in verschiedenen Zeitabständen zur ersten entnommen waren. Bei zwei Kindern mit kurzen NRS-Entnahmeabständen von zwei und neun Tagen kam es zu einer Viruslast-Abnahme (von 10^3 auf 10^1 und von 10^5 auf 10^4). Im dritten Fall mit achtmonatigem Entnahmeabstandes war ein Viruslast-Anstieg zu beobachten (von 10^2 auf 10^4). Dieses könnte bei den Kindern mit abnehmender WUPyV-Last auf eine abklingende vorangegangene WUPyV-Infektion und im Fall des Kindes mit zunehmender WUPyV-Last auf eine Reaktivierung bei Viruspersistenz oder auf eine mögliche Reinfektion hindeuten.

4.5 WUPyV-Nachweis in NRS und klinische Diagnose

Um eine mögliche klinische Manifestation einer WUPyV-Infektion zu ermitteln, wurde die NRS-Viruslast mit Bezug auf die klinische Diagnose untersucht. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den WUPyV-Last-Medianen der verschiedenen Krankheitsbilder. Auch die Untersuchung der WUPyV-Last der NRS bei verschiedenen Krankheitsbildern unter Berücksichtigung von Koinfektionen ergab keinen Anhalt für eine Assoziation des WUPyV mit einem spezifischen Krankheitsbild. Die Aussagekraft dieser Auswertung ist jedoch eingeschränkt durch das retrospektive Studiendesign, den hohen Anteil an Koinfektionen und dadurch, dass die klinischen Diagnose nur aus den Krankenakten WUPyV-positiver Kinder erhoben wurde, so dass ein Vergleich mit dem WUPyV-negativen Kollektiv nicht möglich war. Des Weiteren sind in der vorliegenden Arbeit nur

Säuglinge, Kinder und Jugendliche mit akuten Infektionen des Respirationstraktes und keine asymptomatischen Kinder untersucht worden.

In anderen Publikationen wurde bei Kindern ohne respiratorische Symptome WUPyV-DNA mittels PCR nachgewiesen (Norja *et al.*, 2007, Abed *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2007; Wattier *et al.*, 2008; van der Zalm *et al.*, 2008) (Tabelle 12). In zwei der fünf Arbeiten wurde eine höhere Anzahl WUPyV-positiver-NRS in der Kontrollgruppe asymptomatischer Patienten als in der Gruppe mit respiratorischen Infektionen detektiert (Abed *et al.*, 2007; Norja *et al.*, 2007). Durch die Arbeitsgruppen von Le *et al.* und von Norja *et al.* wurden WUPyV- positive-Proben des Respirationstraktes in immunsupprimierten Kontrollgruppen ohne respiratorische Erkrankung beschrieben (Le *et al.*, 2007; Norja *et al.*, 2007) (Tabelle 12). Diese Ergebnisse lassen eine mögliche pathogene Relevanz des WUPyV im Respirationstrakt fraglich erscheinen, unterstützen jedoch die Hypothese einer WUPyV-Persistenz. Die Beteiligung der Polyomaviren bei der Entstehung bestimmter Krankheiten immuninkompetenter Menschen ist bei den beiden bisher bekannten humanpathogenen Polyomaviren BK und JC bewiesen und setzt eine Persistenz voraus. Ob dies auch für das WUPyV und das KIPyV zutrifft, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden.

4.6 WUPyV und Koinfektionen

Bei 50% der WUPyV-DNA-positiven NRS in dieser Studie waren zuvor andere respiratorische Viren nachgewiesen worden. Aus der vorangegangenen Studie von Neske *et al.* war bereits eine hohe Koinfektionsrate der WUPyV-positiven Proben bekannt (Neske *et al.*, 2008). Dies deckt sich mit der hohen Koinfektionsrate (40% bis 100%), die auch in anderen Publikationen beschrieben wurde (Abed *et al.*, 2007; Bialasiewicz *et al.*, 2007 b; Gaynor *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2007; Norja *et al.*, 2007; Abedi Kiasari *et al.*, 2008; Foulongne *et al.*, 2008; Kleines *et al.*, 2008; Lindau *et al.*, 2008;

Payungporn *et al.*, 2008 a; Ren *et al.*, 2008; van der Zalm *et al.*, 2008; Wattier *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008) (Tabelle 12).

Die tatsächliche Häufigkeit der Koinfektionen im hier untersuchten Probenkollektiv ist wahrscheinlich höher als 50%, da zum einen die Untersuchung auf Influenzaviren A und B, RSV, Adenoviren und Parainfluenzaviren 1 bis 3 mittels Immunfluoreszenztest erfolgte und diese Methode die genannten Viren weniger sensitiv nachweist als die PCR-Methode (Herrmann *et al.*, 2001). Zum anderen war das Vorhandensein weiterer pathogener respiratorischer Viren (wie das humane Metapneumovirus, Coronaviren, Enteroviren, Rhinoviren) nicht untersucht worden.

Signifikante Unterschiede der WUPyV-Last-Mediane in NRS bei Kindern mit und ohne Koinfektion ergaben sich weder für alle WUPyV-DNA-positiven NRS noch im Bezug auf die untersuchten Krankheitsbilder. Diese Auswertung ist dadurch eingeschränkt, dass Koinfektionen vermutlich wie oben ausgeführt untererfasst wurden. Zudem waren trotz des insgesamt großen Probenkollektivs die Untergruppen bei der Analyse nach Krankheitsbild und Koinfektionen nur klein, so dass die statistische Aussagekraft gering ist.

4.7 WUPyV-Nachweis in Serum- und Stuhlproben

Von einigen Kindern mit WUPyV-DNA-positiven NRS standen zusätzlich Serum- und Stuhlproben zur Untersuchung auf WUPyV-DNA zur Verfügung. In 2 von 14 Stuhlproben konnte WUPyV-DNA nachgewiesen werden. Bei beiden Kindern wurde eine sehr hohe WUPyV-Last im NRS nachgewiesen, während die WUPyV-Lasten in NRS bei Kindern mit WUPyV-negativen Stuhlproben niedrig waren. Die zwei WUPyV-positiven Stuhlproben sind möglicherweise auf eine Replikation des WUPyV im Darmepithel zurückzuführen. Aufgrund der Viruslast-Ergebnisse in den zugehörigen NRS erscheint jedoch ein Hinunterschlucken des WUPyV während eines respiratorischen WUPyV-Infekts wahrscheinlicher. Um dies abzuklären, sind weitere Untersuchungen

erforderlich, die insbesondere systematische Stuhluntersuchungen beinhalten sollten.

In 3 von 14 Serumproben konnte WUPyV-DNA nachgewiesen werden, darunter auch bei einem Kind mit WUPyV-positiver Stuhlprobe. Zwei dieser Kinder hatten eine sehr hohe WUPyV-Last im NRS. Der Nachweis einer WUPyV-Virämie ist in Anlehnung an für hBoV beschriebene Resultate möglicherweise ein Hinweis auf das Vorliegen einer WUPyV-Erkrankung und/oder -Erstinfektion (Allander *et al.*, 2007 b). Die sehr hohe WUPyV-Last im NRS bei zwei dieser Kinder unterstützt diese Hypothese. Auch für die Abklärung dieser Frage sind weitere Studien erforderlich, die u. a. serologische Untersuchungen auf WUPyV-Antikörper beinhalten sollten, um den Zeitpunkt der WUPyV-Erstinfektion einzugrenzen.

4.8 WUPyV-Last, Altersverteilung und jahreszeitliche Verteilung

Der Altersmedian für WUPyV-positive Kinder lag in der vorangegangenen Studie zur qualitativen WUPyV-PCR bei 3,0 Jahre (Neske *et al.*, 2008). Allerdings ist unklar, ob zum Zeitpunkt des WUPyV-Nachweises tatsächlich die WUPyV-Primärinfektion stattfindet. Vor dem Hintergrund, dass hohe WUPyV-Lasten in NRS wie ausgeführt möglicherweise für das Vorliegen von klinisch relevanten WUPyV-Erstinfektionen sprechen, wurden die WUPyV-Lasten in Abhängigkeit vom Alter untersucht. Würden beispielsweise hohe WUPyV-Lasten überwiegend bei jungen Kindern nachgewiesen, könnte dies auf Erstinfektionen in dieser Altersgruppe hindeuten. Andererseits könnten niedrige Viruslasten ab einem bestimmten Alter auf persistierendes WUPyV bei bereits früher infizierten Kindern hinweisen. Die statistische Auswertung ergab jedoch keinen Hinweis auf einen diesbezüglichen Zusammenhang.

Analog wurden auch die WUPyV-Lasten in Abhängigkeit vom Entnahmemonat ausgewertet um zu untersuchen, ob es Hinweise auf WUPyV-Erstinfektionen zu

einer bestimmten Jahreszeit gibt. Doch auch in dieser Hinsicht ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge.

4.9 WUPyV und Onkogenese?

Ein in dieser Arbeit nicht untersuchter aber im Zusammenhang mit den Polyomaviren doch wichtiger Punkt ist die Frage nach dem onkogenem Potential des WUPyV im menschlichen Organismus. Diese Frage basiert auf der Tatsache, dass das WUPyV-Genom wie alle Polyomaviren das große T-Antigen besitzt, dem transformatorische Eigenschaften zugeschrieben werden und das eine Tumorentwicklung induzieren kann. Diese Eigenschaft konnte in Tiermodellen anderer Mitglieder der Familie der Polyomaviridae nachgewiesen werden und ist beim Menschen stark umstritten.

Die Arbeitsgruppe von Feng *et al.* konnte erstmals die Integration des neu entdeckten MCPyV in MCC-DNA nachweisen (Feng *et al.*, 2008). Initial blieb jedoch unklar, ob MCPyV auch an der Entstehung des MCC, eines seltenen, schnell metastasierenden Tumors der Merkelzellen der Haut, der vor allem bei älteren und immunsupprimierten Menschen auftritt, verantwortlich ist. Mittlerweile wurde in weiteren Studien die Präsenz des MCPyV in Merkelzelltumoren beschrieben, aber auch in normalem Gewebe und Gewebsflüssigkeiten wie beispielsweise dem Gastrointestinaltrakt, Urogenitaltrakt und Speichel (Gandhi *et al.*, 2009, Loyo *et al.*, 2009). Weiterhin konnten experimentelle Daten die Beteiligung des MCPyV an der Onkogenese des MCC nachhaltig belegen (Gandhi *et al.*, 2009; Sastre-Garau *et al.*, 2009; Shuda *et al.*, 2008).

Mit Bezug auf die beiden anderen neu entdeckten Polyomaviren WUPyV und KIPyV wurde in der Arbeit von Sharp *et al.* untersucht, ob WUPyV und KIPyV möglicherweise wie das BKV und JCV persistieren, mutieren und in immunsupprimierten Personen reaktivieren können (Sharp *et al.*, 2008). Es konnten Punktmutationen und Insertionen in der T-Antigen-Region

nachgewiesen werden, die bei immunkompetenten Personen nicht nachgewiesen werden konnten. Es wurde gefolgert, dass diese Veränderungen in der T-Antigen Region potenzielle transkriptionelle Dysregulation hervorrufen und somit pathologische Konsequenzen für immunsupprimierte Personen nach sich ziehen könnten (Sharp *et al.*, 2008). Auch hier sind weitere Untersuchungen erforderlich, um diese Beobachtung zu bestätigen.

4.10 Bedeutung der WUPyV-real-time-PCR für den Kausalitätsnachweis zwischen Virus und Erkrankung

Die Anwendung der klassischen Kausalitätsprinzipien an Hand der Henle-Koch-Postulate ist wegen des Fehlens eines *in vitro* Kultursystems und eines Tiermodells für das WUPyV nicht anwendbar (Koch, 1891). Auch die Modifikationen nach dem Kausalitätskonzept von Evans (Evans, 1976; siehe auch 1.3.4) sind zumindest im Moment nicht zu erfüllen. Letztendlich scheinen die alternativen Kausalitätskriterien von Fredricks und Relman, die für die molekularen sequenzbasierenden diagnostischen Verfahren entwickelt wurden, gute Ansatzpunkte zum Nachweis einer Beziehung zwischen Mikroorganismus und Krankheit zu sein, bei denen die Bestimmung der WUPyV-Last zur Anwendung kommen kann (Fredricks and Relman, 1996; siehe auch 1.3.4).

Die hier etablierte WUPyV-real-time-PCR kann beispielsweise verwendet werden, um gemäß der Kriterien von Fredricks und Relman bei Verlaufspollen ein mögliches Ansteigen oder Abfallen der WUPyV-Last zum Krankheitsbeginn bzw. in der Rekonvaleszenzphase zu untersuchen. Auch ein möglicher Zusammenhang zwischen WUPyV-Last und Schwere des Krankheitsbildes kann mit der real-time-PCR untersucht werden. Hierzu ist jedoch ein retrospektives Studiendesign ungeeignet, bei dem eine standardisierte Erfassung von Diagnose und Schweregrad in der Regel nicht gewährleistet ist.

Das Kriterium, dass die Nukleinsäuresequenzen, die zu dem pathogenem Mikroorganismus gehören, bei dem zugehörigen Krankheitsbild nachweisbar

sein sollten, wiederum aber nur eine geringe oder gar keine Kopienanzahl bei Gesunden, könnte durch eine langfristige Verlaufsbeobachtung einer zuvor nach bestimmten Kriterien (z.B. Alter, immunsupprimiert, nicht-immunsupprimiert) ausgewählten Probandengruppe untersucht werden. Hierzu sollten zusätzliche Probenentnahmen erfolgen, wenn Symptome außerhalb des regulären Entnahme-Zeitraumes auftreten.

Neben der Bestimmung der WUPyV-Last mittels real-time-PCR in NRS sollten auch WUPyV-Nachweise in Stuhlproben erfolgen, um durch Korrelation von Viruslastverlauf und gegebenenfalls vorhandenen Symptomen eine mögliche klinische Relevanz im Gastrointestinaltrakt näher zu untersuchen.

4.11 Bedeutung des WUPyV-Nachweises in NRS-Proben für den Menschen

Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergeben sich hinsichtlich einer möglichen klinischen Bedeutung des WUPyV mehrere Erklärungsmodelle. Ein WUPyV-DNA-Nachweis in NRS bei akuter respiratorischer Erkrankung kann zurückzuführen sein auf:

1. eine WUPyV-Erstinfektion als Ursache der Erkrankung.
2. WUPyV als prädisponierenden bzw. verschlimmernden Faktor bei Infektionen mit anderen respiratorischen Viren.
3. eine persistierende WUPyV-Infektion, die durch Reaktivierung eine respiratorische Erkrankung verursacht.
4. eine latent persistierende WUPyV-Infektion, welche zufälligerweise im entzündlichen NRS detektiert wurde (WUPyV als ein „unbeteiligter Zuschauer“).
5. eine WUPyV-Reinfektion.

Welche(r) der genannten Punkte zutreffend ist/sind und damit einhergehend die klinische Relevanz von WUPyV-Infektionen ist gegenwärtig noch nicht

beurteilbar und sollte daher in weiteren Studien untersucht werden. In Analogie zu BKV und JCV ist dabei vor dem Hintergrund einer möglichen Persistenz mit Reaktivierung unter Immunsuppression das Mitführen einer Kontrollgruppe von Gesunden und einer Kontrollgruppe von immunsupprimierten Probanden ohne Symptome empfehlenswert. So kann eine mögliche klinisch relevante Erkrankung des Menschen durch WUPyV identifiziert und die sich daraus unter Umständen ergebende gefährdete Patientengruppe für die WUPyV-Infektion definiert werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine WUPyV-real-time-PCR etabliert und WUPyV-DNA damit erfolgreich nachgewiesen werden. Die quantitative WUPyV-DNA-Bestimmung zeigte, dass in den untersuchten NRS überwiegend sehr niedrige, vereinzelt aber auch sehr hohe Viruslasten nachgewiesen werden konnten. Letztere sind möglicherweise ein Hinweis auf eine mit respiratorischen Symptomen einhergehende WUPyV-Primärinfektionen. Zusätzlich zu den NRS konnte WUPyV-DNA in Serum- und Stuhlproben nachgewiesen werden. Die klinische Relevanz des WUPyV bleibt hinsichtlich des Respirationstrakts und des Gastrointestinaltraktes offen und bedarf weiterer Untersuchungen, bei denen die etablierte real-time-PCR zur Anwendung kommen kann.

5 Zusammenfassung

Das humane WU-Polyomavirus (WUPyV) wurde im Jahr 2007 als ein neues Virus in Proben des Respirationstraktes beschrieben. Es gehört der Familie der Polyomaviridae an, besitzt ein doppelsträngiges DNA-Genom (5229 Basenpaare) und bildet wahrscheinlich mit einem weiteren im Jahr 2007 in respiratorischen Proben neu beschriebenen Polyomavirus KI (KIPyV) eine neue Gruppe in dieser Familie. Die beiden bisher bekannten humanpathogenen Polyomaviren BK und JC persistieren nach der Erstinfektion in verschiedenen Organen und lösen durch ihre Reaktivierung bei immuninkompetenten Patienten klinisch relevante Erkrankungen aus.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine WUPyV-real-time-PCR zu etablieren und zu evaluieren und mit dieser neuen Methode WUPyV-DNA in Nasenrachensekreten (NRS) zu detektieren und zu quantifizieren.

Insgesamt wurden 1232 NRS von 1134 Patienten mit akuten Erkrankungen des Respirationstraktes, die an der Kinderklinik der Universitätsklinik Würzburg im Zeitraum von Januar 2002 bis September 2005 und Januar 2007 bis Juli 2007 stationär behandelt worden waren, auf WUPyV-DNA getestet. Zusätzlich wurden 14 Serum- und 14 Stuhlproben von Kindern mit WUPyV-DNA-positivem NRS getestet, die innerhalb von 14 Tagen vor oder nach dem NRS entnommen worden waren.

Mit der quantitativen real-time-PCR wurde WUPyV-DNA in 64 (5,2%) der 1232 NRS detektiert. Der Viruslast-Median aller WUPyV-DNA-positiven NRS betrug $9,5 \times 10^2$ Kopien/ml. Neben einigen sehr hohen Viruslasten (4,7% $> 10^9$ Kopien/ml) wurden vor allem niedrige Viruslasten (51,6% < 1000 Kopien/ml) mit der WUPyV-real-time-PCR nachgewiesen. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen der Viruslast und der Koinfektionen mit anderen respiratorischen Viren, mit klinischer Diagnose, mit dem Alter der

infizierten Kinder und mit dem jahreszeitlichen Auftreten. In 3 der 14 Serum- und 2 der 14 Stuhlproben konnte WUPyV-DNA detektiert werden.

Die ungleiche Verteilung der WUPyV-Viruslasten in NRS ist möglicherweise auf eine Erstinfektion mit hoher WUPyV-Viruslast bei wenigen Kindern und eine zufällig detektierte persistierende WUPyV-Infektion mit niedriger WUPyV-Viruslast bei der Mehrzahl der Kinder zurückzuführen. Virämische Kinder hatten eine Tendenz zu höherer Viruslast im NRS, was in der Gesamtkonstellation ebenfalls auf das Vorliegen einer Erstinfektion hindeuten kann.

Die Aussagekraft der Auswertung in dieser Arbeit ist eingeschränkt durch das retrospektive Studiendesign, durch die Auswertung der klinischen Diagnose nur WUPyV-positiver Kinder, sowie durch die fehlende Untersuchung von Probanden ohne respiratorische Erkrankungen. Weitere Studien sind notwendig, um die pathogenetische Relevanz des WUPyV für den Menschen zu untersuchen. Die in dieser Arbeit etablierte real-time-PCR zur WUPyV-Quantifizierung kann dabei zur Anwendung kommen.

6 Literaturverzeichnis

- Abed, Y., Wang, D., Boivin, G. (2007). "WU polyomavirus in children, Canada." Emerg Infect Dis 13(12): 1939-41.
- Abedi Kiasari, B., Vallely, P. J., Corless, C. E., Al-Hammadi, M., Klapper, P. E. (2008). "Age-related pattern of KI and WU polyomavirus infection." J Clin Virol 43(1): 123-5.
- Ahsan, N. and Shah, K. V. (2006). "Polyomaviruses and human diseases." Adv Exp Med Biol 577: 1-18.
- Allander, T. (2008). "Human bocavirus." J Clin Virol 41(1): 29-33.
- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M.A., Dalianis, T., Ramqvist, T., Andersson, B. (2007 a). "Identification of a third human polyomavirus." J Virol 81(8): 4130-6.
- Allander, T., Jartti, T., Gupta, S., Niesters, H.G., Lehtinen, P., Osterback, R., Vuorinen, T., Waris, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., van den Hoogen, B.G., Hyypia, T., Ruuskanen, O. (2007 b). "Human bocavirus and acute wheezing in children." Clin Infect Dis 44(7): 904-10.
- Allander, T., Tammi, M. T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., Andersson, B. (2005). "Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples." Proc Natl Acad Sci U S A 102(36): 12891-6.
- Bialasiewicz, S., Whiley, D. M., Lambert, S. B., Gould, A., Nissen, M.D., Sloots, T.P. (2007 a). "Development and evaluation of real-time PCR assays for the detection of the newly identified KI and WU polyomaviruses." J Clin Virol 40(1): 9-14.
- Bialasiewicz, S., Whiley, D. M., Lambert, S. B., Jacob, K., Bletchly, C., Wang, D., Nissen, M. D., Sloots, T. P. (2007 b). "Presence of the newly discovered human polyomaviruses KI and WU in Australian patients with acute respiratory tract infection." J Clin Virol 41(2): 63-8.
- Eddy, B. E., Stewart, S. E., Berkeley, W. (1958 a). "Cytopathogenicity in tissue culture by a tumor virus from mice." Proc Soc Exp Biol Med 98(4): 848-51.

- Eddy, B. E., Rowe, W. P., Hartley, J. W., Stewart, S. E., Huebner, R. J. (1958 b). "Hemagglutination with the SE polyoma virus." Virology 6(1): 290-1.
- Eddy, B. E., Stewart, S. E., Young, R., Mider, G.B. (1958 c). "Neoplasms in hamsters induced by mouse tumor agent passed in tissue culture." J Natl Cancer Inst 20(4): 747-61.
- Eddy, B. E. and S. E. Stewart (1959 a). "Characteristics of the SE polyoma virus." Am J Public Health Nations Health 49: 1486-92.
- Eddy, B. E., Stewart, S. E., Kirschstein, R.L., Young R.D. (1959 b). "Induction of subcutaneous nodules in rabbits with the SE polyoma virus." Nature 183(4663): 766-7.
- Eddy, B. E., Stewart, S. E., Stanton, M.F., Marcotte, J.M. (1959 c). "Induction of tumors in rats by tissue-culture preparations of SE polyoma virus." J Natl Cancer Inst 22(1): 161-71.
- Evans, A. S. (1976). "Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited." Yale J Biol Med 49(2): 175-95.
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., Moore, P.S. (2008). "Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma." Science 319(5866): 1096-100.
- Fouchier, R. A., Rimmelzwaan, G. F., Kuiken, T., Osterhaus, A.D. (2005). "Newer respiratory virus infections: human metapneumovirus, avian influenza virus, and human coronaviruses." Curr Opin Infect Dis 18(2): 141-6.
- Foulongne, V., Brieu, N., Jeziorski, E., Chatain, A., Rodiere, M., Segondy, M. (2008). "KI and WU polyomaviruses in children, France." Emerg Infect Dis 14(3): 523-5.
- Fredricks, D. N. and Relman, D. A. (1996). "Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates." Clin Microbiol Rev 9(1): 18-33.
- Gandhi, R. K., Rosenberg, A. S., Somach, S. C. (2009). "Merkel cell polyomavirus: an update." J Cutan Pathol 36(12): 1327-9.

- Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D.V., Hulme, B. (1971). "New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation." Lancet 1(7712): 1253-7.
- Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D.M., Mackay, I.M., Lambert, S.B., Wu, G., Brennan, D.C., Storch, G.A., Sloots, T.P., Wang, D. (2007). "Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections." PLoS Pathog 3(5): e64.
- Gross, L. (1953). "A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice." Proc Soc Exp Biol Med 83(2): 414-21.
- Gross, L. (1976). "The fortuitous isolation and identification of the polyoma virus." Cancer Res 36(11 Pt 1): 4195-6.
- Han, T. H., Chung, J. Y., Koo, J.W., Kim, S.W., Hwang, E.S. (2007). "WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea." Emerg Infect Dis 13(11): 1766-8.
- Herrmann, B., Larsson, C., Zwegberg, B. W. (2001). "Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA)." J Clin Microbiol 39(1): 134-8.
- Jiang, M., Abend, J. R., Johnson, S. F., Imperiale, M. J. (2009). "The role of polyomaviruses in human disease." Virology 384(2): 266-73.
- Kleines, M., Scheithauer, S., Hengst, M., Honnef, D., Ritter, K., Muhler, E., Hausler, M. (2008). "Low to medium WU-virus titers in young children with lower respiratory tract infections." Intervirology 51(6): 444-6.
- Koch, R. (1891). "Über bakteriologische Forschung." Verhandlungen des X Internationalen Medicinischen Congresses, Berlin, 1890, 1, 35. August Hirschwald, Berlin.
- Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A.E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J. Y., Cox, N., Hughes, J. M.,

- LeDuc, J. W., Bellini, W. J., Anderson, L. J. (2003). "A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome." N Engl J Med 348(20): 1953-66.
- Le, B. M., Demertzis, L. M., Wu, G., Tibbets, R. J., Buller, R., Arens, M. Q., Gaynor, A.M., Storch, G. A., Wang, D. (2007). "Clinical and epidemiologic characterization of WU polyomavirus infection, St. Louis, Missouri." Emerg Infect Dis 13(12): 1936-8.
- Lin, F., Zheng, M., Li, H., Zheng, C., Li, X., Rao, G., Wu, F., Zeng, A. (2008). "WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, China." J Clin Virol 42(1): 94-102.
- Lindau, C., Tiveljung-Lindell, A., Goh, S., Ramqvist, T., Allander, T. (2009). "A single-tube, real-time PCR assay for detection of the two newly characterized human KI and WU polyomaviruses." J Clin Virol 44(1): 24-6.
- Loyo, M., Guerrero-Preston, R., Brait, M., Hoque, M. O., Chuang, A., Kim, M. S., Sharma, R., Liegeois, N. J., Koch, W. M., Califano, J. A., Westra, W. H., Sidransky, D. (2009) "Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission." Int J Cancer 126(12): 2991-6.
- Martini, F., Corallini, A., Balatti, V., Sabbioni, S., Pancaldi, C., Tognon, M. (2007). "Simian virus 40 in humans." Infect Agent Cancer 2: 13.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Ed. (2003 a). Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, Kapitel 19.2.5, S. 485-488
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Ed. (2003 b). Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, Kapitel 19.2.6, S. 488-491
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Ed. (2003 c). Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, 19.2.1;19.2.2; 19.2.3; 19.2.4 S. 474-485.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Ed. (2003 d). Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, Kapitel 11.4, S. 107-108
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Ed. (2003 e). Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, Kapitel 1.3, S. 8-9

- Neske, F., Blessing, K., Ullrich, F., Pröttel, A., Wolfgang Kreth, H., Weissbrich, B. (2008). "WU polyomavirus infection in children, Germany." Emerg Infect Dis 14(4): 680-1.
- Neske, F., Blessing, K., Tollmann, F., Schubert, J., Rethwilm, A., Kreth, H. W., Weissbrich, B. (2007). "Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis." J Clin Microbiol 45(7): 2116-22.
- Norja, P., Ubillos, I., Templeton, K., Simmonds, P. (2007). "No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease." J Clin Virol 40(4): 307-11.
- Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J., Dessel, B. H. (1971). "Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy." Lancet 1(7712): 1257-60.
- Payungporn, S., Chieochansin, T., Thongmee, C., Samransamruajkit, R., Theamboolers, A., Poovorawan, Y. (2008 a). "Prevalence and molecular characterization of WU/KI polyomaviruses isolated from pediatric patients with respiratory disease in Thailand." Virus Res 135(2): 230-6.
- Payungporn, S., Chieochansin, T., Thongmee, C., Panjaworayan, N., Samransamruajkit, R., Theamboolers, A., Poovorawan, Y. (2008 b). "Detection and discrimination of WU/KI polyomaviruses by real-time PCR with melting curve analysis." J Virol Methods 153(1): 70-3.
- Poulin, D. L. and DeCaprio, J. A. (2006). "Is there a role for SV40 in human cancer?" J Clin Oncol 24(26): 4356-65.
- Pschyembel, Ed. 2002, 259. Auflage. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 259. Auflage. Walter de Gruyter, Seite 673.
- Ren, L., Gonzalez, R., Xie, Z., Zhang, J., Liu, C., Li, J., Li, Y., Wang, Z., Kong, X., Yao, Y., Hu, Y., Qian, S., Geng, R., Yang, Y., Vernet, G., Paranhos-Baccala, G., Jin, Q., Shen, K., Wang, J. (2008). "WU and KI polyomavirus present in the respiratory tract of children, but not in immunocompetent adults." J Clin Virol 43(3): 330-3.
- Rivers, T. M. (1937). "Viruses and Koch's Postulates." J Bacteriol 33(1): 1-12.
- Sastre-Garau, X., Peter, M., Avril, M. F., Laude, H., Couturier, J., Rozenberg, F., Almeida, A., Boitier, F., Carlotti, A., Couturaud, B., Dupin, N. (2009).

- "Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis." J Pathol 218(1): 48-56.
- Sharp, C. P., Norja, P., Anthony, I., Bell, J. E., Simmonds, P. (2008). "Reactivation and mutation of newly discovered WU, KI, and Merkel cell carcinoma polyomaviruses in immunosuppressed individuals." J Infect Dis 199(3): 398-404.
- Shuda, M., Feng, H., Kwun, H. J., Rosen, S. T., Gjoerup, O., Moore, P. S., Chang, Y. (2008). "T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus." Proc Natl Acad Sci U S A 105(42): 16272-7.
- Stewart, S. E., Eddy, B. E., Gochenour, A. M., Borgese, N. G., Grubbs, G. E. (1957). "The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture." Virology 3(2): 380-400.
- Stewart, S. E., Eddy, B. E., Borgese, N. (1958). "Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture." J Natl Cancer Inst 20(6): 1223-43.
- Stewart, S. E., Eddy, B. E., Stanton, M. F. (1959 a). "Neoplasms in rodents induced by SE polyoma virus." Acta Unio Int Contra Cancrum 15: 842-51.
- Stewart, S. E. and Eddy, B. E. (1959 b). "Tumor induction by SE polyoma virus and the inhibition of tumors by specific neutralizing antibodies." Am J Public Health Nations Health 49: 1493-6.
- Sweet, B. H. and Hilleman, M. R. (1960). "The vacuolating virus, S.V. 40." Proc Soc Exp Biol Med 105: 420-7.
- van den Hoogen, B. G., de Jong, J. C., Groen, J., Kuiken, T., de Groot, R., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D. (2001). "A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease." Nat Med 7(6): 719-24.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-van Dillen, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B. (2004). "Identification of a new human coronavirus." Nat Med 10(4): 368-73.

- van der Zalm, M. M., Rossen, J. W., van Ewijk, B. E., Wilbrink, B., van Esch, P. C., Wolfs, T. F., van der Ent, C. K. (2008). "Prevalence and pathogenicity of WU and KI polyomaviruses in children, the Netherlands." Emerg Infect Dis 14(11): 1787-9.
- Wang, D., Urisman, A., Liu, Y. T., Springer, M., Ksiazek, T. G., Erdman, D. D., Mardis, E. R., Hickenbotham, M., Magrini, V., Eldred, J., Latreille, J. P., Wilson, R. K., Ganem, D., DeRisi, J. L. (2003). "Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays." PLoS Biol 1(2): E2.
- Wattier, R. L., Vazquez, M., Weibel, C., Shapiro, E. D., Ferguson, D., Landry, M. L., Kahn, J. S. (2008). "Role of human polyomaviruses in respiratory tract disease in young children." Emerg Infect Dis 14(11): 1766-8.
- Weissbrich, B., Neske, F., Schubert, J., Tollmann, F., Blath, K., Blessing, K., Kreth, H. W. (2006). "Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections." BMC Infect Dis 6: 109.
- Weissbrich, B., Harms, F., ter Meulen, V., 1995. Detection of enterovirus RNA and herpes virus DNA in CSF by multiplex PCR. Quiagen News 2/95.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., Huang, Y., Wong, B. H., Poon, R. W., Cai, J. J., Luk, W. K. (2005). "Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia." J Virol 79(2): 884-95.
- Yuan, X. H., Jin, Y., Xie, Z. P., Gao, H. C., Xu, Z. Q., Zheng, L. S., Zhang, R. F., Song, J. R., Hou, Y. D., Duan, Z. J. (2008). "Prevalence of human KI and WU polyomaviruses in children with acute respiratory tract infection in China." J Clin Microbiol 46(10): 3522-5.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: WUPyV-Genomschema	5
Abbildung 2: Linearität der WUPyV-real-time-PCR.....	23
Abbildung 3: (siehe Folgeseite): Vorgehen zur Abklärung von Diskrepanzen zwischen der quantitativen WUPyV-real-time-PCR und den Vorergebnissen mit der konventionellen WUPyV-LTA-PCR.....	27
Abbildung 4: Vergleich der WUPyV-Lasten in NRS in Abhängigkeit vom qualitativen WUPyV-DNA-Status in der Voruntersuchung mittels konventioneller WUPyV-LTA-PCR	30
Abbildung 5: WUPyV-Last der NRS mit Bezug auf die klinische Diagnose	33
Abbildung 6: WUPyV-Last in NRS der Kinder mit und ohne spezifische respiratorische Koinfektionen	35
Abbildung 7: WUPyV-Lasten in NRS in Abhängigkeit von klinischer Diagnose und dem Koinfektionsstatus WUPyV-positiver Kinder	36
Abbildung 8: Amplifikationskurven zum Ausschluss einer PCR-Inhibition durch Stuhlproben.....	38
Abbildung 9: WUPyV-Last in NRS in Abhängigkeit vom WUPyV-Status zugehöriger Stuhl- bzw. Serumproben	39
Abbildung 10: WUPyV-Last in NRS in Abhängigkeit vom Alter	40
Abbildung 11: WUPyV-Last in NRS in Abhängigkeit vom Entnahmemonat	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer und Sonde	14
Tabelle 2: Pipettierschema der WUPyV-real-time-PCR	15
Tabelle 3: Pipettierschema des Spikeexperimentes	16
Tabelle 4: Strategie zur Abklärung diskrepanter Ergebnisse zwischen konventioneller WUPyV-LTA-PCR NRS und quantitativer WUPyV- real-time-PCR	17

Tabelle 5: Pipettierschema der qualitativen PCR	19
Tabelle 6 : Probit-Analyse zur Bestimmung der 95%-Nachweisgrenze	24
Tabelle 7: Intraassay-Variation der WUPyV-real-time-PCR für unterschiedliche Konzentrationen des Plasmids pWU1	24
Tabelle 8: Interassay-Variation der Laufkontrolle der WUPyV-real-time-PCR ..	25
Tabelle 9: Abklärung der Diskrepanzen zwischen konventioneller WUPyV-LTA- PCR und real-time-PCR mittels konventioneller NCR-PCR	29
Tabelle 10: Vergleich der real-time-PCR und der konventionellen WUPyV- LTA- PCR zum qualitativen Nachweis von WUPyV-DNA in NRS	31
Tabelle 11: WUPyV-Last in NRS, Serum- und Stuhlproben	37
Tabelle 12: Vergleich der WUPyV-Arbeiten	45
Tabelle 13: Methodische Aspekte der WUPyV-real-time-PCR Arbeiten	48

8 Abkürzungsverzeichnis

Adeno	Adenovirus
Akute AWI	akute Atemwegsinfektion
as	asymptomatisch
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BKV	humanes Polyomavirus BK
bp	Basenpaar
Ct-Wert	Threshold cycle-Wert
d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-Genom	Desoxyribonukleinsäure-Genom
DNA-Extraktion	Desoxyribonukleinsäure-Extraktion
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
GI	Gastrointestinale Infektion
hBoV	humanes Bocavirus
hBoV-Erstinfektion	humane Bocavirus-Erstinfektion
hBoV-Infektion	humane Bocavirus-Infektion
hBoV-Last	humane Bocavirus-Last
Inf. A	Influenza A-Virus
J	Jahr(e)
JCV	humanes Polyomavirus JC
k.A.	keine Angaben
KG	Kontrollgruppe
KH	Krankheit(en)
KIPyV	KI-Polyomavirus
KI-Rate	Koinfektionsrate
Kopien/μl	Kopien pro μl
Kopien/ml	Kopien pro ml
Kopien/Reaktion	Kopien pro Reaktion

Konventionelle NCR-PCR	konventionelle nicht-kodierende Genomregion-Polymerase Kettenreaktion
Konventionelle WUPyV-LTA-PCR	konventionelle WU-Polyomavirus-großes-T- Antigen-Polymerase Kettenreaktion
Large TAg	großes T-Antigen
LTA	großes T-Antigen
M	Monat(e)
MCC	Merkelzell-Karzinom
MCPyV	Merkelzell-Polyomavirus
NCR	nicht-kodierende Genomregion
NRS	Nasenrachensekret(e)
NRS-Viruslast	Nasenrachensekret-Viruslast
Ori	origin of replication
OWI	obere Atemwegsinfektion
PCR	Polymerase Kettenreaktion
real-time-PCR	real-time-Polymerase Kettenreaktion
pWU1	WU-Polyomavirus-Plasmid 1
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
Serum-VL	Serum-Viruslast
Stuhl-VL	Stuhl-Viruslast
Small TAg	kleines T-Antigen
Std-Abw.	Standardabweichung
SV 40	Simian Virus 40
sy	symptomatisch
UWI	untere Atemwegsinfektion
Qual. PCR	qualitative Polymerase Kettenreaktion
Quant. PCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
v.a.	vor allem
Vk	Variationskoeffizient
VL	Viruslast

VP1, VP2, VP3	Virusprotein 1, 2, 3
WUPyV	WU-Polyomavirus
WUPyV-DNA	WU-Polyomavirus-Desoxyribonukleinsäure
WUPyV-Infektion	WU-Polyomavirus-Infektion
WUPyV-Last	WU-Polyomavirus-Last
WUPyV-real-time-PCR	WU-Polyomavirus-real-time-Polymerase Kettenreaktion

Danksagung

Hiermit möchte ich allen Danken, die am Gelingen der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Dem Vorstand des Lehrstuhls für Virologie Herrn Prof. Dr. A. Rethwilm für die Möglichkeit eine Doktorarbeit im Institut für Virologie zu erstellen und für die Bereitschaft zur Übernahme des Referates.

Vor allem danke ich meinen Betreuern, Dr. B. Weißbrich, Dr. F. Neske und M. Ewald, für die stete Bereitschaft zur Diskussion, die Anregungen und Ideen während der Durchführung, Auswertung und des Niederschreibens der Studienergebnisse sowie zum Korrekturlesen der Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei dem gesamten Team der Virusdiagnostik für die gute Zusammenarbeit, für die praktische und fachliche Einweisung in die Labordiagnostik, sowie bei meiner Mitstreiterin Franziska Ullrich bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Kinderklinik der Universität Würzburg für die Überlassung der Patientenproben, insbesondere bei Frau Dr. K. Blessing für die Unterstützung bei der Auswertung der Krankenakten.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Prof. Dr. Dr. M. Abele-Horn die sich zur Übernahme des Koreferates bereit erklärte.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für Ihre Unterstützung und Geduld während des gesamten Studiums und der Zeit der Entstehung der vorliegenden Arbeit.