

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. A. Rethwilm

**Infektion mit Polyomavirus WU
bei Kindern mit akuter Erkrankung des Respirationstrakts**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Franziska Ullrich

aus Rinteln

Würzburg, Dezember 2012

Referent: Prof. Dr. med. A. Rethwilm

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Romanos

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2014

Die Promovendin ist Ärztin

1. Einleitung	1
1.1. Akute respiratorische Infekte.....	1
1.1.1. Bedeutung und Ätiologie.....	1
1.1.2. Klinische Aspekte.....	1
1.1.3. Typische virale Auslöser	3
1.1.4. Antivirale Therapie	4
1.1.5. Nachweisverfahren respiratorischer Viren	4
1.2. Neue respiratorische Viren.....	5
1.3. Polyomaviren	6
1.3.1. Erstbeschreibung und Klassifikation	6
1.3.2. Genomaufbau und Replikation.....	7
1.3.3. Humane Polyomaviren.....	8
1.3.4. Entdeckung des Polyomavirus WU.....	9
1.3.5. Epidemiologie und Klinik des Polyomavirus WU.....	11
1.4. Beurteilung der klinischen Relevanz neuer respiratorischer Viren	13
1.5. Ziel der Arbeit.....	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Patientenproben.....	16
2.2. Qualitative PCR für WUPyV-DNA	17
2.2.1. WUPyV-PCR im großen T-Antigen	17
2.2.2. WUPyV-PCR zur Sequenzierung der nicht kodierenden Region	18
2.3. Sequenzierung.....	19
2.3.1. Aufreinigung der PCR-Produkte.....	19
2.3.2. Sequenzanalyse	20
2.4. Phylogenetische Analyse	21
2.5. Statistische Analysen	22
3. Ergebnisse	23
3.1. Validierung der qualitativen WUPyV-PCR im großen T-Antigen	23
3.2. Qualitative PCR-Testung der NRS auf WUPyV-DNA.....	24
3.3. Zeitliche Verteilung der positiven WUPyV-Nachweise	25
3.4. Alters- und Geschlechterverteilung	28
3.5. Mehrfachinfektionen.....	29
3.6. Klinische Daten der Kinder mit WUPyV-positiven NRS.....	31
3.7. Sequenzanalyse	34

4. Diskussion	38
4.1. Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur	38
4.2. Methodische Aspekte	42
4.3. Prävalenz, jahreszeitliche Verteilung und Saisonalität	43
4.4. Altersverteilung und Geschlechterverhältnis	44
4.5. Koinfektionen mit WUPyV	46
4.6. Klinische Symptome bei Patienten mit WUPyV-positiven NRS	48
4.7. Sequenzanalyse	51
4.8. Stellenwert der Ergebnisse	52
5. Zusammenfassung	56
6. Abkürzungsverzeichnis	58
7. Literaturverzeichnis	59
Tabellen und Abbildungsverzeichnis	66

1. Einleitung

1.1. Akute respiratorische Infekte

1.1.1. Bedeutung und Ätiologie

Akute respiratorische Infekte sind eine der häufigsten Erkrankungen beim Menschen, insbesondere bei Säuglingen und Kleinkindern, und gehen weltweit mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher (Mulholland, 2003). In Ländern der dritten Welt sind sie die häufigste Todesursache bei Kindern unter fünf Jahren (Walsh, 1989). Erwachsene machen im Durchschnitt zwei bis fünf, Kinder unter fünf Jahren sogar vier bis acht Infekte pro Jahr durch (Alexander, 1999). Arztbesuche oder stationäre Aufnahmen sind häufig durch sie begründet. Auch aus ökonomischer Sicht haben respiratorische Infekte einen erheblichen Stellenwert, da sie durch Behandlungskosten und häufig durch Arbeitsausfälle zu einer wesentlichen Belastung des Gesundheitssystems beitragen (Tregoning and Schwarze, 2010).

Auslöser einer akuten respiratorischen Erkrankung (ARE) können verschiedene Mikroorganismen sein, zu denen Viren, Bakterien oder auch Pilzinfektionen zählen. Der größte Teil der Infekte wird durch Viren verursacht und verläuft meist unkompliziert (Andersen et al., 1998). Viren können weiterhin aber auch einen schweren Verlauf einer ARE verursachen und zusätzlich eine Infektion mit Bakterien begünstigen. Häufige bakterielle Erreger einer ARE sind Pneumokokken, Haemophilus influenza und Staphylokokkus aureus (Beadling and Slifka, 2004). Auf respiratorische Viren wird im Verlauf dieser Arbeit näher eingegangen.

1.1.2. Klinische Aspekte

Klinisch treten Virus-bedingte ARE auf als Infekte der oberen Atemwege (IoL) oder Infekte der unteren Atemwege (IuL). Sie werden oft begleitet von unspezifischen Symptomen wie Fieber, Gliederschmerzen, Appetitmangel und reduziertem Allgemeinempfinden. Es kann zu Manifestationen außerhalb der Atemwege kommen wie gastrointestinalen und zentralnervösen Symptomen oder auch zu Konjunktivitis, Otitis media acuta, Exanthem und Lymphknotenschwel-

lung. Eine ausgeprägte Erhöhung von Entzündungsparametern ist selten. Bei schwerer Erkrankung kann eine Leukopenie mit relativer Lymphozytose auf eine virale Genese hinweisen. Respiratorische Viren führen allgemein aber weder bei IoL noch IuL zu spezifischen klinischen Untersuchungsbefunden (Doerr and Adrian, 2010).

IoL kommen häufiger vor als IuL und verlaufen klinisch oft milder. Zu den typischen Diagnosen eines IoL zählen unter anderem Rhinitis, Pharyngitis, Tonsillitis, Laryngitis, Laryngotracheitis oder Krupp. Die Therapie erfolgt supportiv und die Erkrankungen sind meist selbstlimitierend. Zur Genesung können, wenn notwendig, fiebersenkende und schmerzstillende Mittel, Antitussiva und Nasenspray gegeben werden. Als Komplikation gilt die Entwicklung einer obstruktiven Ventilationsstörung, die schnell erkannt und behandelt werden muss (Alexander, 1999).

Bei einer ARE mit Anzeichen eines IuL kommt es zu Tachypnoe, Atemnot oder starkem Husten. Weitere klinische Zeichen können Zyanose, Rasselgeräusche oder Zeichen einer Obstruktion bei Auskultation der Lunge sein, die bei Säuglingen auch begleitet werden können von Nasenflügeln und interkostalen Einziehungen (Speer and Gahr, 2009). Durch die klinischen Symptome zusammen mit einer radiologischen Diagnostik sind IuL als Erkrankungen der großen und kleinen Bronchien gekennzeichnet. Die Diagnosen umfassen Pneumonie (Lungeninfiltrat radiologisch bestätigt), Bronchitis, obstruktive Bronchitis und Bronchiolitis, wobei keine international standardisierten Definitionen existieren. Therapeutisch gelten für einen IuL die gleichen symptomatischen Maßnahmen wie bei einem IoL. Zusätzlich spielen je nach Krankheitsverlauf ein engmaschiges Sauerstoffmonitoring mit angepasster Sauerstoffgabe und Beatmung eine Rolle sowie Inhalation mit hypertoner Salzlösung oder Bronchodilatoren (Beta-2-Mimetika, Epinephrin, Ipratropiumbromid) (Speer and Gahr, 2009).

Prädisponiert für schwere Verläufe einer ARE sind unter anderem Frühgeborene und Menschen mit chronischen Erkrankungen oder Fehlbildungen der luftleitenden Strukturen. Bei Immunsuppression zählen viral induzierte Luftwegsinfekte zu einer der häufigen Todesursachen (Wong and Yuen, 2008). Andauernde

oder rezidivierende respiratorische Infekte können das Lungengewebe langfristig zerstören und stehen in der Diskussion eine Entwicklung von Asthma zu begünstigen (Andersen, 1998). Besonders bei Kindern mit luL, die einer stationären Behandlung bedürfen, ist es sinnvoll, schnell die Ursache einer Atemwegsinfektion zu finden, damit eine adäquate Therapie eingeleitet werden kann. Im Bezug auf nosokomiale Infektionen wird angestrebt einen Erreger zu identifizieren, um z.B. durch Isolation des infizierten Patienten eine weitere Verbreitung zu verhindern (Tregoning and Schwarze, 2010).

Viren sind im Gegensatz zu Bakterien nicht durch Antibiotika therapierbar. Um einen unnötigen Einsatz von Antibiotika zu vermeiden, ist eine rasche Erregerdiagnostik ebenfalls wichtig (Doan et al., 2009).

1.1.3. Typische virale Auslöser

Zu dem typischen Spektrum der „klassischen“ respiratorischen Viren gehören RNA-Viren wie Influenzavirus A und B, Parainfluenzaviren, Respiratory syncytial virus (RSV), Coronaviren und Rhinoviren sowie die zu den DNA-Viren zählenden Adenoviren (Alexander, 1999). Diese Viren lassen sich durch Zellkultur anzüchten und wurden mit Hilfe dieser Technik im Laufe des letzten Jahrhunderts entdeckt. Sie gehören unterschiedlichen Virusfamilien an und unterteilen sich weiter in verschiedene Spezies. Ihre Pathogenität beim Menschen als Auslöser einer ARE ist bewiesen (Hof and Dörries, 2005). In ihrer Manifestation und der Ausprägung der Krankheit können diese Viren ein breites und überlappendes Spektrum an Symptomen einer ARE zeigen. Einzelne Symptome, die speziell einer Virusspezies zuzuordnen sind, können dabei nicht eindeutig definiert werden (Denny, 1995).

Viele der respiratorischen Viren treten bevorzugt in den Wintermonaten auf. Allerdings gibt es auch saisonale Häufungen in anderen Jahreszeiten, z.B. tritt das Rhinovirus bevorzugt im Herbst und Frühling auf. Bei Influenzaviren kann endemisches oder epidemisches Auftreten beobachtet werden (Flint, 2009). Für RSV findet sich in unseren Breitengraden ein zweijähriger Zyklus, der jeweils aus einer Saison mit frühem Saisonbeginn (Oktober/November) und starker

Zirkulation gefolgt von einer Saison mit spätem Saisonbeginn (Dezember/Januar) und schwächerer Zirkulation besteht (Terletskaia-Ladwig et al., 2005). RSV ist insgesamt bei Kindern unter fünf Jahren der häufigste Erreger einer schweren lUL und ist bei Säuglingen der typische Erreger der altersspezifischen Bronchiolitis (Nair et al., 2010).

1.1.4. Antivirale Therapie

Gegen virale respiratorische Erreger stehen kaum spezifische Medikamente zur Verfügung. Im Fall der Influenza gibt es die Möglichkeit, Neuraminidaseinhibitoren oder Amantadin zu verabreichen. Durch eine Medikamentengabe innerhalb der ersten 48 Stunden nach Symptombeginn kann der Schweregrad der Erkrankung deutlich reduziert werden. Vorbeugend steht ein Impfstoff gegen Influenza zur Verfügung, der jedes Jahr nach den Antigenen der aktuell zirkulierenden Virustypen zusammengestellt wird und jährlich vor der Wintersaison appliziert werden sollte (Darai et al., 2009).

Ein oraler Impfstoff gegen verschiedene Serotypen des Adenovirus ist in den USA erhältlich und wird vorwiegend beim Militär zur Prävention einer Infektion eingesetzt (Tucker et al., 2008). Andere aktive Schutzimpfungen gegen respiratorische Virusinfektionen stehen derzeit nicht zur Verfügung.

RSV-bedingte stationäre Aufnahmen bei Frühgeborenen und chronisch lungen- und herzkranken Kleinkindern (z.B. Bronchiolitis mit schweren Apnoen) konnten reduziert werden durch prophylaktische Gabe des Antikörpers Palivizumab, der einer Infektion mit dem Virus entgegen wirkt im Sinne einer passiven Impfung (IMPact-RSV Study Group, 1998).

1.1.5. Nachweisverfahren respiratorischer Viren

Um bei einer akuten Infektion ein respiratorisches Virus in Material des Respirationstrakts nachzuweisen, gibt es die Möglichkeit des Virusdirektnachweises durch Anzucht in der Gewebekultur, durch Antigendetektion mithilfe direkter Immunassays oder durch Genomnachweis mittels Polymerasekettenreaktion

(PCR). Zur schnellen Routinediagnostik werden direkte Immunfluoreszenztests für verschiedene virale Antigene (IFA) verwendet oder eine PCR durchgeführt. Eine arbeitsintensivere und zeitaufwendige Methode ist der Virusnachweis in Zellkultur.

Serologische Untersuchungen auf humane Antikörper gegen ein Virus eignen sich allenfalls zur retrospektiven Untersuchung, z.B. im Rahmen epidemiologischer Studien oder anderen wissenschaftlichen Fragestellungen. In der Routinediagnostik spielen sie dagegen keine Rolle (Doerr and Adrian, 2010).

1.2. Neue respiratorische Viren

Bei der Untersuchung auf bekannte respiratorische Viren sowie unter Berücksichtigung bakterieller Erreger bleibt die Ursache in 40 - 60 % aller ARE bisher ungeklärt (Sloots, et al., 2008). In den letzten 10 Jahren gab es viele Versuche, neue Viren im Respirationstrakt nachzuweisen, wobei mehr als sieben zuvor unbekannte Viren identifiziert wurden. Einige der neuen Viren konnten durch Anzucht in Zellkultur und anschließender Sequenzanalyse identifiziert werden. Dabei handelt es sich um das humane Metapneumovirus (hMPV) (van den Hoogen et al., 2001) und die zwei Coronaviren (CoV) SARS-assoziiertes CoV (Ksiazek et al., 2003) und NL63 CoV (van der Hoek et al., 2004; 2006).

Bei der Entdeckung des HKU 1 CoV wurden dagegen konservierte Sequenzen bekannter CoV-Genera für die Entwicklung von Primern benutzt, um das NRS eines Indexpatienten mit Pneumonie auf bis dahin unbekannte Coronaviren zu untersuchen. Bis heute ist das CoV HKU1 nicht in Kultur isolierbar (Woo et al., 2005).

Einer neuen Methodik bediente man sich bei der Identifikation des humanen Bocavirus (hBoV) und des Polyomavirus KI (KIPyV) (Allander et al., 2005; Allander et al., 2007). Mittels einer Hochdurchsatz-Sequenzierung von Patientenproben gelang es, ohne Zellkultur oder Verwendung schon bekannter Sequenzen, das komplette Genom beider Viren zu entschlüsseln. Dafür wurde das respiratorische Material mehrerer Patienten zunächst zusammengeführt, Virus-

partikel aus diesem Pool wurden physikalisch angereichert, und anschließend wurde DNA und RNA extrahiert. Es folgte die PCR-Amplifikation mittels Zufalls-Primern. Amplikons wurden in einem Vektor ligiert und E.coli damit transformiert. Die DNA der Einzelkolonien konnte vermehrt und sequenziert werden. Durch Vergleichen der so erhaltenen Sequenzen mit Sequenzdatenbanken wurde das zuvor unbekannte Virus hBoV im Jahr 2005 und das Virus KIPyV im Jahr 2007 nachgewiesen. In ähnlicher Weise wurde in respiratorischem Material das Polyomavirus WU (WUPyV) entdeckt, auf das in dieser Arbeit näher eingegangen wird.

1.3. Polyomaviren

1.3.1. Erstbeschreibung und Klassifikation

Polyomaviren stellen in der Familie der Polyomaviridae derzeit die einzige bekannte Gattung dar, der zahlreiche Spezies zugeordnet sind, die in unterschiedlichen Säugetiergruppen auftreten. Erstmals erwähnte L. Gross 1953 die tumor erzeugende Wirkung eines damals noch unbekanntes Virus nach Übertragung von Zellextrakten auf vorher gesunde Tiere (Gross, 1953). Es handelte sich dabei um das Mauspolyomavirus, welches durch Stewart 1957 und Eddy 1958 isoliert wurde, nachdem sich zytopathische Effekte bei Beimpfung einer Mausfibroblastenkultur gezeigt hatten (Stewart et al., 1957; Eddy et al., 1958).

In weiteren Experimenten wurde eine Tumorbildung bei Tieren in verschiedenen Organen nachgewiesen und führte zum Namen dieser Virusfamilie (poly: viel, mehrere; Suffix -oma: Tumor). Zur Tumorgenese ist bisher bekannt, dass Teile der Virusproteine (T-Antigene) an Tumorsuppressor-Proteine wie p53 und Rb binden und diese in ihrer Funktion hemmen (Modrow et al., 2003).

Zu den humanen Polyomaviren zählen das BK-Virus (BKV), das JC-Virus (JCV), das WU-Virus (WUPyV), das KI-Virus (KIPyV) und das Merkelzellvirus (MCPyV). Zur phylogenetischen Einordnung tier- und humanpathogener Polyomaviren siehe Abbildung 1.

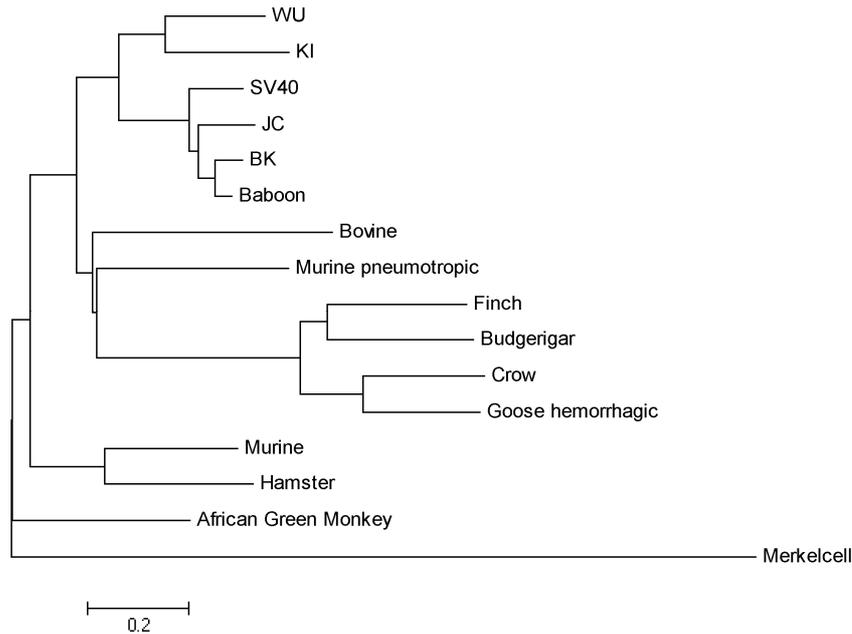


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum tier- und humanpathogener Polyomaviren auf Basis der Aminosäuresequenzen des großen T-Antigen; Sequenzen-Alignment und Erstellung des phylogenetischen Stammbaums mit MEGA 4.1 [ClustalW, Neighbor-Joining Parameter]; Referenzsequenzen aus GenBank (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov); der Maßstab gibt Unterschiede in 0.2 Aminosäuresubstitutionen pro Position an.

1.3.2. Genomaufbau und Replikation

Polyomaviren gehören zu den doppelsträngigen DNA-Viren und haben eine Größe von ca. 4700 bis 5400 bp (Modrow et al., 2003). Das Genom ist zirkulär angeordnet, wobei es mit zellulären Histonen einen chromatinähnlichen Komplex bildet und von drei ikosaedrisch angeordneten Kapsidproteinen (VP1, VP2, VP3) umhüllt wird. Die DNA kodiert für maximal sechs Gene. Funktionell sind nach dem Expressionszeitpunkt zwei Regionen zu unterscheiden. Die nicht kodierende Region kontrolliert die Transkription und umgibt den Startpunkt der bidirektionalen DNA-Replikation.

Frühe und späte Gene befinden sich jeweils auf einem entgegengesetztem Strang. Durch alternatives Spleißen der sich meist überlappenden mRNA entstehen in der replikativen Frühphase Nicht-Strukturproteine (T-Antigene), die vor allem beteiligt sind an Replikation, Transkription und Zelltransformation. In der späten Phase werden die strukturellen Kapsidproteine transkribiert. Bei manchen Spezies existiert zusätzlich ein weiteres Protein für die Virusreifung, das sogenannte Agnoprotein (Darai et al., 2009).

1.3.3. Humane Polyomaviren

Das JCV und das BKV sind Polyomaviren, deren pathogene Relevanz für den Menschen am besten belegt ist. Beide Viren wurden im Jahr 1971 isoliert, wobei die Namensgebung durch die Initialen der Patienten erfolgte, bei denen das Virus zuerst entdeckt wurde (Gardner, 1971; Padgett, 1971). Beide Polyomaviren sind bis heute weltweit nachgewiesen und besitzen untereinander eine Sequenzhomologie von etwa 75 % (Modrow et al., 2003).

Die Serumprävalenz bei Erwachsenen liegt für BKV bei 90 %, wobei eine Erstinfektion meist bis zum Alter von 10 Jahren stattfindet (Knowles et al., 2006). Für JCV liegt die Serumprävalenz bei Erwachsenen zwischen 50 % und 80 %. Die Exkretion von Viruspartikeln im Urin Gesunder wird für BKV mit 5 % und für JCV mit 20 - 40 % angegeben (Jiang, 2009).

JCV und BKV gelangen durch Inhalation in den Respirationstrakt und verbreiten sich über die Blutbahn in Organe wie Niere und Lunge (Flint, 2009). Bei Immunkompetenten verläuft eine Erstinfektion zumeist asymptomatisch, kann aber manchmal mit einem leichten Luftwegsinfekt einhergehen. Der Nachweis in respiratorischem Material gelang bisher selten (Goudsmit et al., 1982; Sundsfjord et al., 1994).

Die Polyomaviren JCV und BKV können nach langjährigem Verbleiben im Organismus besonders bei geschwächtem Immunsystem reaktivieren und schwere Erkrankungen hervorrufen (Ahsan et al., 2006). Bei dieser Persistenz ist bisher nicht geklärt, ob es sich um eine latente Infektion oder um eine andauernde Replikation handelt (Doerries et al., 2006).

Zum Krankheitsbild bei JCV zählt eine Demyelinisierung im ZNS, die zur progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) führt und in der Regel tödlich verläuft. Im Zusammenhang mit BKV stehen verschiedene Erkrankungen des Urogenitaltraktes wie eine tubuläre Nephritis oder eine hämorrhagische Zystitis, wobei ein erhöhtes Risiko vor allem für Patienten nach Organ- und Stammzelltransplantation besteht. Eine spezifische Therapie besteht weder für

BKV noch für JCV, jedoch sollte in jedem Fall eine Immunrekonstitution angestrebt werden, soweit dies möglich ist (Darai et al., 2009).

Ein anderes Polyomavirus, das bereits in den 50er Jahren mit dem Menschen in Verbindung gebracht wurde, ist das Affenvirus Simian-Virus 40 (SV40). In dieser Zeit gerieten durch SV40 verunreinigte Polioimpfstoffe in Verdacht, Pleuramesotheliome und Hirntumoren beim Menschen verursacht zu haben (Modrow et al., 2003). Einen eindeutigen Beweis für ein kausales, onkogenes Potential des Polyomavirus SV40 beim Menschen gibt es bisher jedoch nicht.

Zwei weitere Polyomaviren, WUPyV und KIPyV, konnten im Jahr 2007 in Untersuchungsmaterial aus dem Respirationstrakt des Menschen nachgewiesen werden. Das KIPyV wurde im Karolinska Institut in Schweden identifiziert und nach diesem benannt (Allander et al., 2007). Virus-DNA des KIPyV ist bisher in Nasenrachensekreten (NRS) und Stuhlproben symptomatischer Patienten mehrfach gefunden worden, nicht jedoch in Urinproben (Allander et al., 2007).

Für das KIPyV sind Prävalenzen von 0,5 bis 5 % beschrieben mit hohen Koinfektionsraten anderer respiratorischen Viren (Ren et al., 2008; Mourez et al., 2009). Einen nachgewiesenen Krankheitswert gibt es bisher nicht. Das WUPyV wird im folgenden Abschnitt behandelt.

Im Jahr 2008 gelang die Isolation eines Polyomavirus in Merkelzelltumoren (MCPyV), einem Hautkrebs des Menschen. Es konnte Virus-DNA im Genom des Tumors nachgewiesen werden, zum Teil auch in Form klonaler Vermehrungsmuster (Feng et al., 2008). Ein Zusammenhang zwischen Polyomavirus und der Tumorgenese beim Merkelzellkarzinom wird daher vermutet (Dalianis et al., 2009).

1.3.4. Entdeckung des Polyomavirus WU

Das WUPyV wurde im Jahr 2007 erstmals in einem NRS eines 3-jährigen Mädchens entdeckt (Gaynor et al., 2007). Das Kind litt an einer Pneumonie unklarer Genese und ohne weitere Symptome. Eine bakterielle Ursache der Pneumonie

konnte nicht gefunden werden. Weiterhin blieb ein Screening auf zahlreiche Viren (Rhinoviren, Adenoviren, Influenzaviren, Parainfluenzaviren, Coronaviren, hMPV, hBoV, Herpesviren) mittels PCR negativ.

Zur weiteren Analyse wurde aus Probenmaterial des Mädchens DNA extrahiert und mit Zufallsprimern amplifiziert. Die so erhaltenen Genprodukte wurden in Plasmidvektoren kloniert. Aus einer Datenbank von 384 verschiedenen Klonen ergaben sich nach Sequenzierung 37 unbrauchbare Sequenzen, 327 Sequenzen humanen Genoms, sechs Sequenzen, die eindeutig bakterieller Herkunft waren, und acht unklassifizierbare Sequenzen. Des Weiteren wurden sechs unbekannte, vermutlich virale Sequenzen, zu drei Regionen zusammengefasst. Beim Abgleich in der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) ergab sich eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von 35 % mit dem kleinen T-Antigen von JCV, 50 % mit dem großen T-Antigen von BKV und 34 % mit dem VP1-Gen von SV40. Aufgrund der geringen Übereinstimmungen wurden diese Sequenzen zunächst provisorisch einem neuen Polyomavirus zugeordnet. Namensgeber für das Polyomavirus WU war die Washington University, der Ort der Entdeckung des Virus.

Die WUPyV-Sequenzen der drei ursprünglich identifizierten Regionen waren zu 66 % bis 69 % identisch mit den Sequenzen des in etwa zeitgleich neu entdeckten KIPyV. Auf der Grundlage der gefundenen Ähnlichkeit mit Polyomaviren wurde das zirkuläre Genom des WUPyV anschließend vollständig sequenziert. Insgesamt ließen sich charakteristische Grundzüge der Polyomaviridae bestätigen. Die Größe des Genoms von 5229 bp und der Anteil an den Basen Guanin und Cytosin von 39 % waren vergleichbar mit JCV (5130 bp; 39%), BKV (5153 bp; 40 %) und SV40 (5243 bp; 40 %).

Das WUPyV-Genom kodiert für zwei frühe Proteine, kleines und großes T-Antigen, sowie für drei Kapsidproteine, VP1, VP2 und VP3 (Gaynor et al., 2007). Ein Agnoprotein-ähnliches Äquivalent konnte nicht identifiziert werden (Abb. 2).

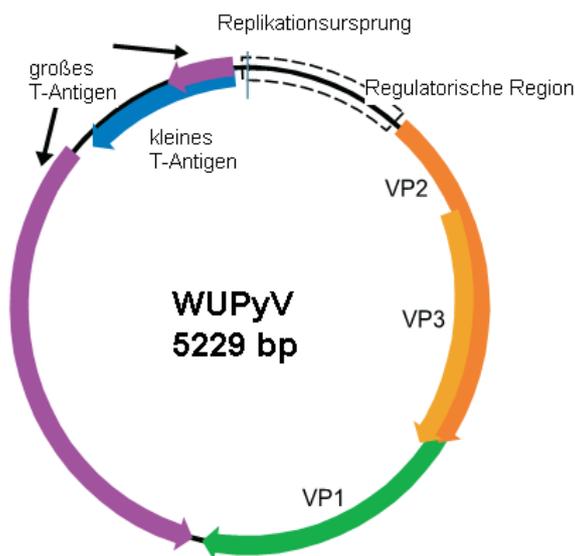


Abbildung 2: Schema der drei funktionellen Genomregionen des WUPyV, modifiziert nach Gaynor et al., 2007

Das komplette WUPyV Genom konnte aus Material von sechs verschiedenen Patienten sequenziert werden. Es zeigte sich ein Sequenzunterschied zwischen 0,08 % und 0,23 % unter den sechs Isolaten. Die Unterschiede kamen insbesondere durch stille Mutationen oder Mutationen in der nicht kodierenden Region zustande. Eine geringe Sequenzvarianz ist auch für JCV beschrieben (Agostini et al., 1997). Nach detaillierter phylogenetischer Analyse scheinen WUPyV und KIPyV unter den Polyomaviren eine neue Untergruppe zu bilden (Abb. 1).

1.3.5. Epidemiologie und Klinik des Polyomavirus WU

Im Rahmen der ersten Studie zu WUPyV wurde die Prävalenz des Virus in Rachensekreten der Bevölkerung Australiens und Nordamerikas mit Hilfe einer konventionellen PCR untersucht. Zielregion der verwendeten Primer waren das VP2-Gen und das große T-Antigen. Positive Ergebnisse wurden in einer Sequenzanalyse bestätigt. Die Prävalenzen lagen zwischen 0,7 % (Proben von Kindern und Erwachsenen, USA) und 3 % (Proben von Kindern, Australien) (Gaynor et al., 2007).

Das Probenmaterial stammte von Patienten mit ARE und war zuvor bereits in der Routinediagnostik auf verschiedene Erreger untersucht worden. Das Gesamtkollektiv umfasste hospitalisierte Kinder und Erwachsene, die entweder aufgrund einer ARE aufgenommen worden waren oder im Verlauf der stationären Behandlung eine ARE entwickelten. Eingeschlossen wurden auch Patienten, bei denen ARE bedingt durch eine Grunderkrankung schwere Verläufe zeigen können.

Gaynor et al. beschrieben in ihrer untersuchten Kohorte aus Australien, dass 89 % der WUPyV-Infektionen in der Gruppe der Kinder im Alter von drei Jahren oder jünger auftraten. Es wurde angemerkt, dass bei einigen Patienten mit WUPyV-positivem NRS auch weitere Diagnosen neben einer ARE bekannt waren. Ein drei Jahre altes Kind litt an einem Neuroblastom und eines im Alter von sechs Jahren wies eine akute lymphoblastische Leukämie auf. Bei zwei weiteren Kindern, zwei und sechs Jahre alt, war eine Grunderkrankung nicht beschrieben, jedoch hatten beide im Vorfeld eine Knochenmarktransplantation erhalten. Von vier erwachsenen Patienten mit positiver Probe hatten drei einen reduzierten Immunstatus (HIV-Infektion, Wegener Granulomatose unter Therapie, Leberzirrhose/Diabetes/Herpes simplex-Infektion unter Beatmung) und eine Patientin war schwanger. Bei zwei Patienten dieser Gruppe war außer WUPyV kein weiterer Erreger nachgewiesen worden.

Koinfektionen mit anderen Viren zeigten sich insgesamt in 68 % der WUPyV-positiven Proben. Neben NRS wurden Urinproben auf WUPyV-DNA untersucht, die jedoch negativ blieben. Weiteres Probenmaterial wie Stuhl oder Liquor wurde nicht getestet.

Positive Proben korrelierten nicht mit einer bestimmten Jahreszeit. Klinische Diagnosen umfassten unter anderem 13 Fälle mit IoL, neun Fälle mit Bronchitis, neun Fälle mit Bronchiolitis und zwei Fälle mit Pneumonien.

Die Sequenzvarianz des WUPyV in den Zielregionen des großen T-Antigen und der VP2-Region wurde zusätzlich untersucht. Beim Vergleich der Genomse-

sequenzen innerhalb der beiden Regionen konnte kaum Variabilität in der Sequenzabfolge nachgewiesen werden.

Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit war die Verbreitung des WUPyV noch weitgehend unbekannt, so dass weder epidemiologische Aspekte noch die Relevanz des Virus in der Pathogenese von respiratorischen Infekten näher definiert waren.

1.4. Beurteilung der klinischen Relevanz neuer respiratorischer Viren

Im Allgemeinen stellt sich bei jedem neu identifizierten Erreger die Frage, ob eine kausale Assoziation mit einer Erkrankung vorliegt, da der Nachweis allein noch keine Hinweise über seine Pathogenese gibt. Die Koch'schen Postulate spielen zur Klärung des Krankheitswerts von Mikroorganismen seit langem eine tragende Rolle. In ihrer ursprünglichen Version lassen sie sich auf Viren aber nur bedingt anwenden, so dass heute eine modifizierte Form als Anhaltspunkt genommen wird (Fredericks and Relman, 1996).

Eine Verbindung zwischen Mikroorganismus und Krankheit wird postuliert, wenn sieben Punkte zutreffen: (i) Virales Genom wird überwiegend während einer bestimmten Infektion und in diesen Fällen hauptsächlich im betroffenen Gewebe nachgewiesen. (ii) Es ist ein signifikant geringerer oder kein Nachweis bei Gesunden möglich. (iii) Die Viruslast sinkt bei Besserung der Symptomatik und steigt bei einem Rückfall wieder an. (iv) Ein Zusammenhang ist wahrscheinlich, wenn das Virus sich vor und zu Beginn der Symptome stark repliziert, eine spezifische Immunantwort des Kranken im Verlauf nachgewiesen wird und eine hohe Kopienzahl mit der Schwere der Krankheit korreliert. (v) Charakteristische Merkmale mit phylogenetisch verwandten Viren stimmen überein. (vi) Das Virus kann in betroffenem Gewebe auch auf zellulärer Basis nachgewiesen werden. (vii) Alle gesammelten Daten sind reproduzierbar.

Bei Entdeckung der neuen Viren ist neben ihrer Pathogenität zu klären, wie häufig sie weltweit vorkommen und ob möglicherweise geographische und saisonale Besonderheiten vorliegen. Bei potentiell respiratorischen Viren eignet

sich für diese Untersuchungen der direkte Virusnachweis aus Respirations-traktmaterial von Patienten mit ARE. Dazu wird für neue Viren in der Regel die PCR verwendet, welche eine äußerst sensitive Methode zum Virusnachweis darstellt (Sloots et al., 2008).

Unter Berücksichtigung der genannten Punkte, kann man bei einigen der neuen respiratorischen Viren ihre klinische Relevanz als gesichert bezeichnen. Zahlreiche Studien haben Prävalenzen für diese Viren beschrieben und auf klinische Besonderheiten hingewiesen. Für CoV NL63 und CoV HKU1 wurden Prävalenzen zwischen 1 - 10 % beschrieben, wobei sich ihr Erscheinungsbild vorwiegend bei Kindern und älteren Menschen in einem breiten Spektrum von IoL und IuL äußert (Principi et al., 2010; Forster et al., 2004).

Das SARS-assoziierte CoV führte bisher zu einer einmaligen Ausbruch ausgehend von der chinesischen Provinz Guangdong zwischen den Jahren 2002 und 2003. Es zeigte sich eine hohe Letalität (ca. 10% der Infizierten) in allen Altersgruppen. Die für SARS-CoV typischen Symptome einer interstitiellen Pneumonie konnten auch im Tierversuch nachgewiesen werden (Fouchier et al, 2003).

Mit einer Häufigkeit zwischen 3 - 25 % zirkuliert hMPV und wird neben respiratorischen Infekten speziell mit einer Bronchiolitis bei Kindern unter 2 Jahren in Verbindung gebracht (Williams et al, 2004; Williams et al., 2006; Kahn, 2006).

Bei hBoV sind im Zusammenhang mit respiratorischer Symptomatik Prävalenzen zwischen 1,5 und 11,3 % beschrieben, jedoch gleichzeitig mit hohen Koinfektionsraten anderer respiratorischer Viren (Neske et al., 2007). Das Virus konnte auch in Stuhlproben bei Patienten mit Gastroenteritis in 0,8 - 9,1 % nachgewiesen werden (Sloots et al., 2008). Eine Anzucht des Virus ist bisher noch nicht gelungen. Ein Antikörpertest kann eine spezifische Immunantwort nachweisen und deutet auf eine hohe Serumprävalenz bei Menschen hin (Kalar et al., 2009). Obwohl die Pathogenität von hBoV noch nicht eindeutig nachgewiesen ist, wird seine Bedeutung bei respiratorischen Erkrankungen durch die Literatur stark unterstützt (Sloots et al., 2008).

Für die Polyomaviren WU und KI standen zum Zeitpunkt der Studie keine ausreichenden Daten zur Verfügung, um Aussagen über die pathogenetische Relevanz machen zu können.

1.5. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es Material aus dem Respirationstrakt von Kindern auf das kürzlich entdeckte WUPyV zu untersuchen, um so die Prävalenz des Virus in der Region Unterfranken zu beschreiben und die wenigen zu Beginn der Arbeit vorliegenden Daten zu diesem Virus zu ergänzen. Die Proben stammten aus der Universitätskinderklinik Würzburg und gingen zwecks Routineuntersuchungen auf respiratorische Viren zwischen Januar 2002 und September 2005 sowie zwischen Januar und Juli 2007 im Virusdiagnostiklabor des Instituts für Virologie und Immunbiologie ein. Zur retrospektiven Untersuchung der Proben auf Virus-DNA wurde eine qualitative PCR entwickelt. Für die Patienten mit positivem WUPyV-Nachweis wurden epidemiologische Parameter wie Altersverteilung, Saisonalität, saisonale Häufung und Koinfektionen mit anderen respiratorischen Viren bestimmt. Zur Beschreibung der klinischen Symptomatik der Patienten standen Entlassdiagnosen aus Krankenakten zur Verfügung. Durch eine phylogenetische Analyse definierter Teilabschnitte des Genoms (großes T-Antigen, nicht kodierende Region) von WUPyV-positiven Proben wurde die Variabilität des Virusgenoms untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenproben

Für die vorliegende Studie wurden 1277 NRS von 1085 Kindern auf WUPyV-DNA untersucht. Der Studienzeitraum lag zwischen Januar 2002 und September 2005 und Januar 2007 bis Juli 2007. Die Patientenproben stammten von Kindern, die in der Kinderklinik der Universitätsklinik Würzburg stationär aufgenommen worden waren. Im Rahmen von routinediagnostischen Maßnahme zur ursächlichen Klärung einer ARE wurde NRS durch Instillation von Natriumchlorid-Lösung (0,9 %) in den Nasopharynx und anschließende Aspiration gewonnen. Alle NRS gingen im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg zur Routinediagnostik mittels Immunfluoreszenz-Antigentest (Light Diagnostics Respiratory Panel I Viral Screening and Identification IFA Kit, Chemicon, Temecula, USA) ein. Es erfolgte eine IFA-Testung auf virale Antigene von Adenovirus, RSV, Parainfluenzavirus 1, 2 und 3 sowie Influenzavirus A und Influenzavirus B.

Restmaterial der NRS wurde bei -20°C asserviert. In vorangegangenen Studien war dieses Restmaterial bereits mittels PCR auf das humane Bocavirus untersucht worden (Weissbrich et al., 2006; Neske et al., 2007). Dazu war Nukleinsäure aus 200 μl Probenmaterial mit dem Kit „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ (Roche, Mannheim, Deutschland) aufgereinigt worden. Das Elutionsvolumen von 50 μl wurde im Anschluss bei -70°C eingefroren und in dieser Studie für den Nachweis von WUPyV-DNA verwendet.

Zur retrospektiven Erfassung der klinischen Symptomatik waren Klinikakten zur Einsicht verfügbar. Jedem NRS konnte anhand des Einsendedatums ein stationärer Aufenthalt des betreffenden Kindes zugeordnet werden. Relevante Informationen bei der Datenerfassung waren Entlassdiagnosen sowie Begleiterkrankungen. Alle Angaben wurden anonymisiert weiterverwendet, wobei nur Daten der Kinder mit einer nachgewiesenen WUPyV-Infektion in die Auswertung einfließen.

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Helsinki-Deklaration durchgeführt und durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt.

2.2. Qualitative PCR für WUPyV-DNA

2.2.1. WUPyV-PCR im großen T-Antigen

Die NRS wurden mittels einer qualitativen PCR auf die Anwesenheit von WUPyV-DNA untersucht. Dazu wurden die Primer AG0048 und AG0049, beschrieben von Gaynor et. al. (Tab. 1), verwendet. Das umschriebene Amplikon besitzt eine Länge von 244 bp und liegt im Bereich des C-terminalen Endes des großen T-Antigens (Gaynor et al., 2007).

Primer	Sequenz (5' - 3')	Gen	Position ¹	Polarität	Ta
² WU5146s	agttttatccattttgccttcttagc	nicht kodierend	5146-5172	+	53°C
² WU0524a	agttttatccattttgccttcttagc	nicht kodierend	524-504	-	
² WU0355s	cagagacgtccttgggtcaa	nicht kodierend	355-375	+	53°C
² WU0965a	tgatattaagtccacctcctgg	VP2	965-942	-	
³ AG0048	tgttttcaagtatgttgcaccc	großes T-Antigen			
³ AG0049	cacccaaaagacactaaaagaaa	großes T-Antigen			

¹ Nach GenBank Zugangsnummer NC_009539

² Primer wurden mit Primer Express 2.1 Software (Applied Biosystems, USA) ausgewählt

³ Primer nach Gaynor et al., 2007

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Primer für WUPyV-PCR und Sequenzierung

Die PCR wurde gemäß dem Schema in Tabelle 2 mit einem Volumen von 50 µl in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen angesetzt. Die Reaktionen wurden im GeneAmp PCR-System 9600 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Die Amplifikation erfolgte in 50 Zyklen nach zehnminütigem Vorheizen bei 95°C zur Aktivierung der Taq-Polymerase. Die Temperaturbedingungen waren 94°C für 30 s (Denaturation), 53°C für 40 s (Annealing), 72°C für 1 min (Elongation). Abschließend erfolgte eine finale Elongation bei 72°C für 5 min. Das Amplikon wurde auf ein Ethidiumbromid enthaltendes 3 %-Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese bei 170 Volt aufgetrennt. Unter UV-Licht war bei er-

folgreicher Amplifikation eine fluoreszierende Bande in erwarteter Größe (244 bp) zu beobachten.

Material	pro Reaktion (µl)
dNTPs (200 µM) GE Healthcare	0,5
Primer AG0048 (20 µM)	0,5
Primer AG0049 (20 µM)	0,5
Hot Star Taq Polymerase 1,5 U (5 U/µl) (Qiagen, Hilden, Germany)	0,3
10x PCR Hot Star Taq Puffer (Qiagen, Hilden, Germany)	5,0
extrahierte DNA	5,0
H ₂ O	38,2
Endvolumen	50,0

Tabelle 2: Reaktionsansatz WUPyV-PCR (großes T-Antigen) mit 50 µl Endvolumen

Bereits beim Vorgang der Nukleinsäure-Extraktion aus NRS war regelmäßig auch H₂O nach jeder fünften Probe extrahiert worden. Diese Kontrollen wurden in allen PCR Läufen mitgeführt und dienten als Negativ-Kontrollen. Zusätzlich wurde in jedem PCR-Ansatz mindestens eine nicht-extrahierte H₂O-Probe als negative Kontrolle der PCR-Reagenzien mitgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Plasmid verwendet, welches das geklonte PCR-Produkt in dem Vektor pCR2.1-TOPO (Topo-TA-Cloning-Kit, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) enthielt.

2.2.2. WUPyV-PCR zur Sequenzierung der nicht kodierenden Region

Um die nicht kodierende Region im WUPyV-Genom (Nukleotid 5173 - 573) zu sequenzieren, wurde eine zusätzliche PCR durchgeführt, die 647 bp der nicht kodierenden Region (regulatorische Region) umfasste. Dazu wurden zwei überlappende WUPyV spezifische Primerpaare WU5146s/WU0524a und WU0355s/WU0965a (Tab. 1) verwendet. Das Pipettierschema ist in Tabelle 3

dargestellt. Für diese PCR wurden zum einen Proben verwendet, die in der unter 2.2.1 beschriebenen WUPyV-PCR positiv waren. Zum anderen wurden vier Proben berücksichtigt, die im Rahmen einer weiteren Würzburger Studie in einer quantitativen PCR WUPyV-positiv waren (Neske et al., 2009). Diese fünf NRS gingen in der vorliegenden Arbeit lediglich bei der Untersuchung der phylogenetischen Analyse der nicht kodierenden Region ein.

Material	pro Reaktion (µl)
dNTPs (200 µM) GE Healthcare	0,5
Primer WU5146s oder WU0355s (20 µM)	0,5
Primer WU0524a oder WU0965a (20 µM)	0,5
Hot Star Taq Polymerase 1,5 U (5 U/µl) (Qiagen, Hilden, Germany)	0,3
10x PCR Hot Star Taq Puffer (Qiagen, Hilden, Germany)	5,0
extrahierte DNA	5,0
H ₂ O	38,2
Endvolumen	50,0

Tabelle 3: Reaktionsansatz WUPyV-PCR (nicht kodierende Region) mit 50 µl Endvolumen

Die Amplifikation und anschließende Detektion der PCR-Produkte mittels Gel-elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung wurde wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt. PCR-Ansätze mit fluoreszierenden Banden in der erwartenden Größe von 607 bp (WU5146s/WU524a) beziehungsweise 610 bp (WU355s/WU965a) wurden für die Sequenzierung weiter verwendet um das positive Ergebnis zu bestätigen (siehe 2.3.).

2.3. Sequenzierung

2.3.1. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung bestand aus mehreren Teilschritten (Aufreinigung der PCR-Produkte, Ansatz der Sequenzierungsreaktion, Aufreinigung der Sequenzie-

rungsreaktion, Kapillarelektrophorese) und wurde nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Zunächst wurden alle erfolgreich amplifizierte PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit 250 (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Methode verwendete ein spezielles Röhrchen mit einem Filter, der durch eine Kieselgelmembran amplifizierte DNA von Primern, Nukleotiden, Enzymen und anderen Verunreinigungen trennt.

Es wurden folgende Materialien verwendet: PB Puffer für eine effiziente Bindung des PCR-Produkts an der Membran, PE Puffer (vor Gebrauch mit 96 – 100 % Ethanol gemischt) zur Auswaschung der unerwünschten Partikel und destilliertes Wasser mit einem pH von 7 - 8,5 zur Elution der aufgereinigten DNA. Für alle Zentrifugationsschritte wurde eine konventionelle Mikrozentrifuge verwendet mit der Einstellung 13000 Umdrehungen/min. Im Einzelnen wurden zunächst PB Puffer und PCR-Produkt im Verhältnis 5:1 gemischt. Das Gemisch wurde auf das Filterröhrchen gegeben, das in einem 2 ml Sammelgefäß steckte, und dann für 30 – 60 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Filterröhrchen wieder in das leere Sammelgefäß gesetzt. Es folgte ein Waschschrift mit Zugabe von 0,75 ml PE Puffer auf das Röhrchen. Nach Zentrifugation für 30 – 60 s wurde der Durchfluss verworfen und das Filterröhrchen mit Sammelgefäß noch einmal für 1 min zentrifugiert um Ethanolreste möglichst vollständig zu entfernen. Das Filterröhrchen wurde dann auf ein sauberes 1,5 ml großes Röhrchen gesetzt. Um das aufgereinigte PCR-Produkt zu eluieren, wurden 40 µl des destillierten Wassers direkt auf den Filter appliziert und nach kurzer Inkubation für 1 min zentrifugiert. Das Eluat von 40 µl wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.3.2. Sequenzanalyse

Nach der Aufreinigung wurden für die PCR-Produkte Sequenzierungsreaktionen in beiden Richtungen angesetzt (Tab. 4). Dafür wurden die PCR-Primer (Tab. 1) verwendet. Anschließend wurden die Sequenzierungsreaktionen im T3-Cycler (Biometra, Göttingen, Germany) gemäß folgendem Temperaturprofil inkubiert: 96°C für 10 s, 50°C für 5 s und 60°C für 4 min in 25 Zyklen. Produkte

der Sequenzierreaktion wurden am Pipettierautomaten Genesis Workstation 150 (Tecan, Crailsheim, Deutschland) mit dem „Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup“-Kit von der Sequenzier-Serviceeinheit des Instituts für Virologie und Immunbiologie nach Herstelleranweisung aufgereinigt um nicht inkorporierte BigDye-Terminatoren abzutrennen. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der Kettenabbruchprodukte erfolgte im Sequenziergerät ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Material	pro Reaktion (in µl)
DNA	2,0
Primer 5 µM (= 5 pmol/µl)	1,0
BigDye Mix (BigDye terminator 3.1 Kit, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany)	1,0
2,5 x Puffer (TrisHCl/MgCl ₂)	1,0
Endvolumen	5,0

Tabelle 4: Ansatz der Sequenzierreaktion mit 5 µl Endvolumen

2.4. Phylogenetische Analyse

Sequenzchromatogramme wurden mit dem SeqMan II Programm (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) bearbeitet. Rohdaten wurden dabei editiert, abgeglichen und störende Ergebnisse, wie qualitativ schlechte Endsequenzen oder Fremdsequenzen, eliminiert. Es erfolgte das Anordnen der komplementären Sequenzen je Patientenprobe. Durch das Programm nicht eindeutig identifizierte Basen konnten manuell entfernt, hinzugefügt oder ausgetauscht werden. Die komplettierten Konsensussequenzen wurden im fasta-Format in das Programm MEGA 4.1 Programms (The Biodesign Institute, Tampe, AZ, USA) importiert. Zur weiteren phylogenetischen Analyse wurden die Sequenzen mit dem Programm CLUSTAL W aligniert. Referenzgenotypen waren Sequenzen von WU-PyV (EF444550) und KIPyV (NC009238) aus GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Ein phylogenetischer Stammbaum wurde erstellt. Verwendete Einstellung zur Abschätzung der Relevanz der generier-

ten Stammbäume war die Bootstrapping-Analyse mit 1000 Replikaten. Bootstrapping ist ein statistischer Begriff, der aussagt mit welcher Sicherheit in Prozent die Gruppierung durch die angegebenen Daten unterstützt wird. Die weitere Topologie der Stammbäume wurde berechnet mit p-distance Parameter, Interior Branch Test, Jukes Cantor Parameter und der Neighbour-Joining-Methode.

2.5. Statistische Analysen

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 3.0c für Mac (GraphPad Software, San Diego, CA) und SPSS Version 13.01 für Windows (SPSS, Chicago, USA). Zur Bestimmung der PCR-Nachweisgrenze wurde eine Probitanalyse durchgeführt (SPSS, Chicago, USA). Weitere verwendete Teste waren Chi-Quadrat Test, Fisher's exact Test und Mann-Whitney-Test. Signifikant war ein Wert bei $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1. Validierung der qualitativen WUPyV-PCR im großen T-Antigen

Vor der Anwendung der qualitativen PCR im großen T-Antigen zum Nachweis von WUPyV-DNA aus Patientenproben wurde zur Validierung der Methode zunächst die minimale Nachweisgrenze bestimmt. Dazu wurde die DNA-Konzentration des verwendeten WUPyV-Plasmids photometrisch gemessen und anschließend in Kopien/ml umgerechnet. Auf dieser Basis wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Dabei wird die Kopienzahl bestimmt, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % durch die etablierte PCR nachgewiesen werden kann.

Für die praktische Ermittlung dieser sogenannten minimalen Nachweisgrenze der PCR diente eine Verdünnungsreihe des Plasmids unter Verwendung der in Tabelle 5 angegebenen Verdünnungsstufen in Kopien/Reaktion. Die Verdünnungsreihe im achtfachen Ansatz wurde in jeweils drei unabhängigen Läufen angesetzt (Tab. 5). Entscheidend war, ob eine Amplifikation erfolgte oder die DNA-Menge hierzu nicht ausreichte. Die 24 so gewonnenen Werte für jede Verdünnungsstufe flossen in die Probit-Analyse ein. Das Ergebnis der minimalen Nachweisgrenze lag bei 8,8 Kopien/Reaktion (95 % Konfidenzintervall 4,1 – 21,6 Kopien/Reaktion).

Konzentration (Kopien/Reaktion)	Reaktionen (n)	Pos. Reaktionen (n)	Pos. Reaktionen (%)
40	24	24	100
20	24	24	100
15	24	23	96
10	24	24	100
5	24	23	96
2,5	24	15	63
1,25	24	13	54
0,625	24	7	29

Tabelle 5: Ergebnisse der qualitativen PCR einer Verdünnungsreihe des WUPyV-Plasmids zur Ermittlung der minimalen Nachweisgrenze mittels Probit-Analyse

Bei Verwendung der Nukleinsäure-Extraktion mit High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Ausgangsvolumen 200 µl, Elutionsvolumen 50 µl) und Einsatz von 5 µl Eluat in der PCR-Testung ergibt sich ein Ausgangsvolumen-Äquivalent von 20 µl je PCR-Ansatz. Im Zusammenhang mit der Nachweisgrenze von 8,8 Kopien/Reaktion ergibt sich für die untersuchten NRS somit eine Volumenbezogene Nachweisgrenze von 440 Kopien/ml (95 % Konfidenzintervall 205 – 1080 Kopien/ml).

3.2. Qualitative PCR-Testung der NRS auf WUPyV-DNA

Nach der Validierung der WUPyV-PCR wurde bei der Studie ein Gesamtkollektiv aus 1277 NRS von Kindern mit ARE auf WUPyV-DNA untersucht. Ein repräsentatives Gel nach erfolgreicher Amplifikation ist in Abbildung 3 dargestellt.

Es wurden in allen Läufen regelmäßig Positiv- und Negativ-Kontrollen mitgeführt. Als Positiv-Kontrolle diente das WUPyV-Plasmid in der Verdünnung 10^0 und 10^1 Kopien/µl. Bei Verwendung von 5 µl je PCR-Ansatz entspricht dies 50 bzw. 5 Kopien/Reaktion. Diese Verdünnungsstufen der Kontrollen waren so ausgewählt, dass die Kopienanzahl pro Reaktion ober- und unterhalb der zuvor bestimmten minimalen Nachweisgrenze von 8,8 Kopien/Reaktion lag.

Jeder PCR-Ansatz, der in der Gelelektrophorese ein Amplikon mit der erwarteten Bandengröße zeigte, wurde einer bidirektionalen Sequenzanalyse unterzogen und zur Bestätigung eines positiven Ergebnisses mit der WUPyV-Referenzsequenz EF444550 in der Sequenzdatenbank des NCBI verglichen. Alle Sequenzen konnten sicher als WUPyV-DNA identifiziert werden (siehe Punkt 3.6.). In keiner Negativ-Kontrolle konnte WUPyV-DNA nachgewiesen werden.

Positiv für WUPyV-DNA waren 62 NRS von 1277 NRS (4,9 %). Von einigen Patienten waren zwei oder mehr Proben eingegangen, denn das Gesamtkollektiv umfasste 1277 NRS von 1085 Kindern. Von allen Patienten mit WUPyV-positivem NRS war jedoch jeweils nur eine Probe positiv für dieses Virus, d. h. die 62 WUPyV-positiven NRS stammten von 62 Kindern.

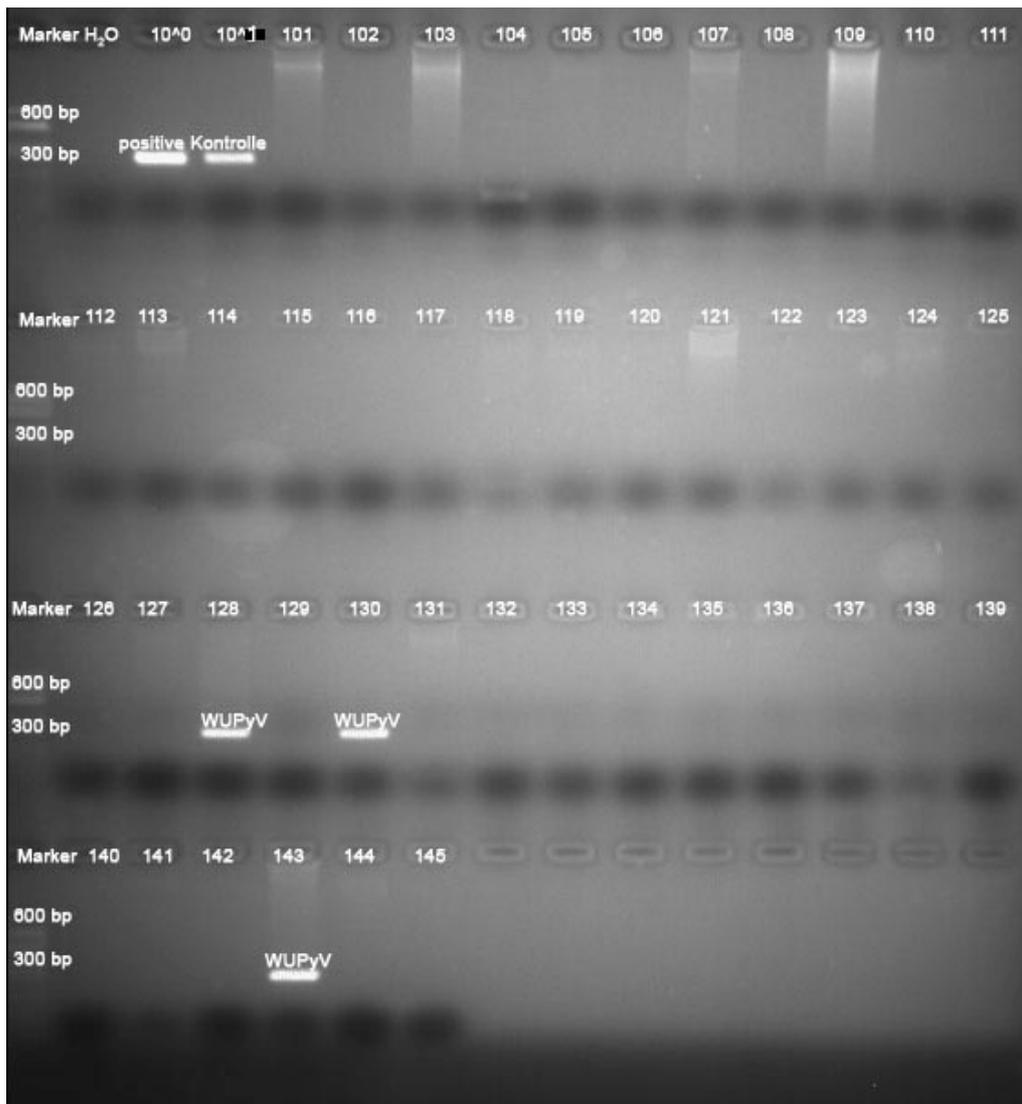


Abbildung 3: Foto der Gelelektrophorese einer WUPyV-PCR, Marker 600 bp und 300 bp; Negativ-Kontrolle H₂O; Positiv-Kontrolle des WUPyV-Plasmids in der Verdünnung 10⁰ und 10¹ Kopien/μl; je ein PCR-Produkt in Spuren 101-145; positive Reaktionen sind in Spur 128, 130 und 143 erkennbar; bp=Basenpaare

3.3. Zeitliche Verteilung der positiven WUPyV-Nachweise

Alle NRS konnten anhand des Einsendungsdatums der Probe zeitlich eingeordnet werden. NRS, die positiv für WUPyV-DNA waren, konnten bezüglich ihres zeitlichen Auftretens verglichen werden mit der Gesamtanzahl aller Proben über den gesamten Untersuchungszeitraum. Eine graphische Darstellung der untersuchten Monate zeigt Abbildung 4. Zwischen den Jahren 2002 und 2005 sowie 2007 stieg die Anzahl an untersuchten Proben insgesamt von 92 NRS im ersten auf etwa das Fünffache von 445 NRS im letzten Untersuchungsjahr an.

Die Anzahl der positiven Proben in einem Monat schwankte zwischen null und sechs, wobei die prozentuale Gewichtung im Verhältnis zur Gesamtzahl der NRS in einem Monat große Unterschiede aufwies. So waren im Februar 2007 sechs von 113 NRS positiv für WUPyV (5,3 %), im Mai 2007 sechs von 45 NRS (13,3 %), im Juli 2003 zwei von sechs NRS (33,3 %) und im August 2004 eines von fünf NRS (20%).

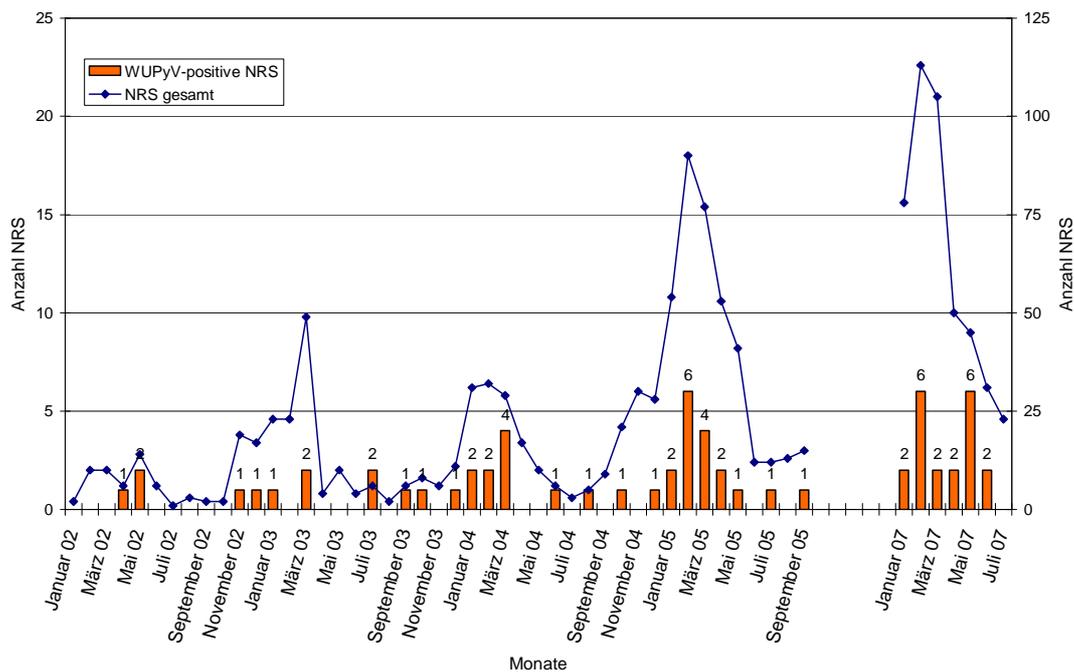


Abbildung 4: Zeitliche Verteilung der WUPyV-positiven NRS im Vergleich zur Gesamtzahl aller NRS zwischen Januar 2002 und September 2005 sowie zwischen Januar 2007 und Juli 2007

Die Anzahl der positiven Proben bezogen auf jeden Monat zeigt Abbildung 5. WUPyV-positive Proben konnten über das ganze Jahr beobachtet werden mit Anstieg in den Wintermonaten insbesondere im Februar und März. Die höchste Gesamtzahl an NRS wurde ebenfalls in diesen Monaten notiert. Der prozentuale Anteil WUPyV-positiver NRS an der Gesamtzahl aller NRS betrug im Februar 5,2 % und 4,4 % im März.

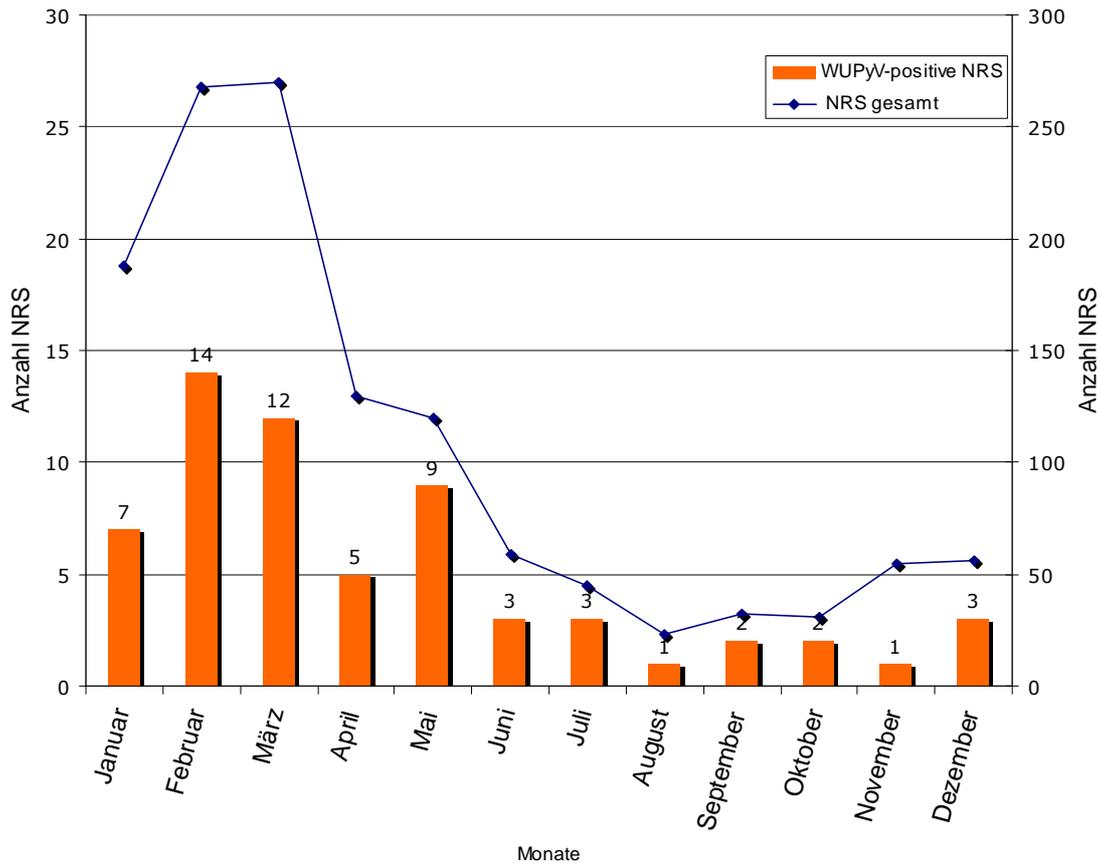


Abbildung 5: Monatliche Verteilung WUPyV-positiver NRS im Vergleich zur Gesamtzahl aller NRS zwischen Januar 2002 und September 2005 sowie zwischen Januar 2007 und Juli 2007

Zur Beurteilung der saisonalen Verteilung der NRS in den untersuchten Jahren wurde eine Saison definiert von Juli eines Jahres bis Juni des darauffolgenden Jahres. In den Jahren 2002 und 2007 stand nur für je sechs Monate der jeweiligen Saison Material zur Verfügung. Die saisonale Häufung variierte zwischen 3,2 % und 8,5 % im beobachteten Zeitraum (Tab. 6). Die Saison 2003 - 2004 hatte mit 8,5 % den größten Anteil positiver Proben, wobei eine Infektion mit WUPyV in acht von zwölf Monaten gefunden wurde. Ein signifikanter Unterschied zu anderen Saisons ließ sich aber nicht erkennen ($p=0,19$, Chi-Quadrat Test).

Saison	Alle NRS	WUPyV-positiv	Häufigkeit
Januar 02- Juni 02	47	2	4,3 %
Juli 02 -Juni 03	157	5	3,2 %
Juli 03 -Juni 04	164	14	8,5 %
Juli 04 -Juni 05 ¹	422	18	4,3 %
Januar 07 -Juni 07 ¹	423	21	5,0 %

¹ NRS ohne Zuordnung zu einer Saison: Zwischen Juli 2005 und September 2005 gingen zur Untersuchung weitere 41 NRS ein, darunter waren zwei positiv für WUPyV-DNA; 23 NRS gingen im Juli 2007 ein, darunter war keines positiv für WUPyV-DNA.

Tabelle 6: Saisonale Verteilung aller NRS im Vergleich zu WUPyV-positiven Proben

3.4. Alters- und Geschlechterverteilung

Das Gesamtkollektiv der Patienten, von denen Proben untersucht wurden, wies ein medianes Alter von 1,6 Jahren auf bei einer Altersspanne zwischen 7 Tagen und 22 Jahren. Die Altersverteilung der Kinder mit WUPyV-positiven NRS ist in Abbildung 6 dargestellt. Infektionen mit WUPyV wurden in allen Altersgruppen nachgewiesen. Das mediane Alter der Kinder mit WUPyV-positivem NRS betrug 3,0 Jahre (Durchschnittsalter 2,9 Jahre, Spanne zwischen 4 Monate und 6,3 Jahre) und war signifikant höher ($p=0,0006$; Mann-Whitney-Test) als das mediane Alter des Gesamtkollektivs (1,6 Jahre). WUPyV-positiv NRS fanden sich am häufigsten in der Gruppe der 25 – 36 und der 37 – 48 Monate alten Kinder, wobei beide Gruppen zusammen mit etwa 44 % den höchsten prozentualen Anteil aller WUPyV-positiven NRS ausmachten. Im Gesamtkollektiv dagegen war dieser Altersbereich mit nur 19 % vertreten, insgesamt stammten über 53 % der NRS von Kindern, die jünger als 24 Monate waren. Älter als sechs Jahre waren im gesamten Kollektiv 15,7 % der Kinder, während nur 3,2 % der WUPyV-positiv getesteten Kinder in diesem Alter waren.

Der Anteil der männlichen Patienten im Gesamtkollektiv betrug 58,4 %. Bei der Geschlechterverteilung der WUPyV-positiven NRS stammten 57 % der Proben von Jungen, was einem Geschlechterverhältnis m:w von 1,3:1 entsprach und sich nicht signifikant vom Gesamtkollektiv unterschied.

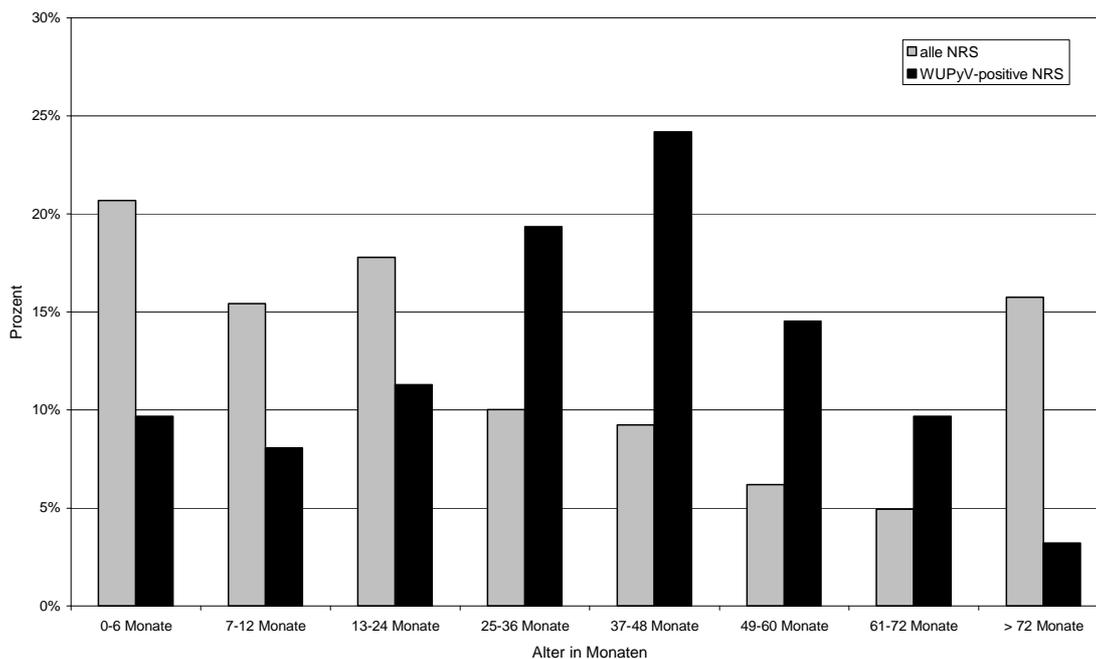


Abbildung 6: Altersverteilung der Patienten mit WUPyV-positivem NRS im Vergleich zu allen untersuchten Patienten. Angabe jeweils in Prozent. Das mediane Alter der Kinder mit WUPyV-positivem NRS betrug 3,0 Jahre.

3.5. Mehrfachinfektionen

Alle 1277 untersuchten NRS waren in der Routinediagnostik (IFA für Influenzaviren A/B, RSV, Parainfluenzaviren 1 – 3, Adenoviren) bzw. im Rahmen vorheriger Studien (hBoV-PCR) auf respiratorische Viren untersucht worden. So konnten zum einen die Prävalenzraten der untersuchten Viren im Gesamtkollektiv verglichen werden, zum anderen konnten für WUPyV-positive Proben Koinfektionen ermittelt werden. Tabelle 7a+b bildet die Prävalenzzahlen aus dieser Studie ab.

Das Ergebnis von 4,9 % WUPyV-positiver Proben war kaum geringer als die Detektionsrate von Adenovirus und hBoV im Gesamtkollektiv (6,3 %). Deutlich seltener als WUPyV wurden Influenzavirus B und Parainfluenzaviren, deutlich häufiger Influenzavirus A und RSV detektiert. Mehrfachinfektionen einer WUPyV-Infektion mit anderen respiratorischen Viren waren in 33 Fällen (53,2 %) zu beobachten. Am häufigsten traten Koinfektionen mit Influenzavirus A (n=10) und Adenovirus (n=10) auf, gefolgt von hBoV (n=9), RSV (n=5) und Pa-

rainfluenzaviren 1/2/3 (n=3), wobei vier Fälle eine Dreifachinfektion aufwiesen. In der Gruppe der WUPyV-positiven NRS waren Adenoviren signifikant überrepräsentiert (16,1 %) im Vergleich zur Gruppe der WUPyV-negativen NRS (p=0,004; Fisher's exact Test). Auch die Frequenz einer hBoV-Infektion (14,1 %) war mit einer WUPyV-Infektion signifikant häufiger als im Gesamtkollektiv (p=0,01; Fisher's exact Test).

Ergebnis

IFA-Test	Kollektivanzahl n	Positive Ergebnisse n
hBoV-PCR		
	1277	
RSV-Antigen		226 (17,7%)
Influenzavirus A-Antigen		164 (12,8 %)
Adenovirus-Antigen		80 (6,3 %)
Parainfluenza 1-/2-/3-Antigen		34 (2,7 %)
Influenzavirus B-Antigen		13 (1,2 %)
hBoV-DNA		81 (6,3 %)
Alle positiven Ergebnisse ¹	1277	592 (46,4 %)

¹ Im IFA-Test trat in 6 Fällen eine Dualinfektion auf: 3x RSV/Parainfluenzavirus 3; 1x Influenzavirus A/RSV; 1x Adenovirus/Parainfluenzavirus 3; 1x Adenovirus/RSV.

Bei hBoV-positiven NRS trat in 25 Fällen eine Dualinfektion auf: 13x Influenzavirus A/hBoV; 9x RSV/hBoV; 3x Adenovirus/hBoV. In 3 Fällen trat eine Tripelinfektion: 2x RSV/Parainfluenzavirus 3/hBoV; 1x Adenovirus /Parainfluenzavirus 3/hBoV.

Tabelle 7 a: Ergebnisse von IFA-Screening und hBoV-PCR

Ergebnis WUPyV PCR	Kollektivanzahl n	Positive Ergebnisse n
	1277	62 (4,9 %)
WUPyV-positiv + Koinfektion ²		33 (53,2 %)
Koinfektion mit		
Adenovirus		10 (16,1 %)
Influenzavirus A		10 (16,1 %)
hBoV		9 (14,1 %)
RSV		5 (8,0 %)
Parainfluenzavirus 1/2/3		3 (4,8 %)

² WUPyV-positive NRS traten in 4 Fällen als Tripelinfektion auf: 2x Influenzavirus A/hBoV/-WUPyV; 1x Adenovirus/hBoV/WUPyV; 1x RSV/hBoV/WUPyV.

Tabelle 7 b: Koinfektionen bei WUPyV-positiven NRS

3.6. Klinische Daten der Kinder mit WUPyV-positiven NRS

Klinische Informationen zu Kindern, die ein WUPyV-positives NRS aufwiesen, wurden retrospektiv den Krankenakten entnommen. Es waren für 61 der 62 WUPyV-DNA positiven NRS klinische Daten verfügbar (Tab. 8). Bei WUPyV-positiv getesteten Patienten hatten 43 % eine IoL und 57 % eine luL. Unterteilt man die luL weiter, waren Pneumonien am häufigsten, gefolgt von Bronchitis und obstruktiver Bronchitis. Neben einem respiratorischen Infekt wiesen siebzehn Kinder während ihres stationären Krankenhausaufenthaltes weitere Diagnosen auf wie Durchfall, Harnwegsinfekt, Meningitis oder Krampfanfall bei Fieber. In Hinblick auf die Art des Luftwegsinfekts zeigte die Anzahl der positiven Proben mit Mehrfachinfektion im Vergleich zur einfachen Infektion mit WUPyV keine signifikanten Differenzen im Fisher's exact Test ($p > 0,05$).

Im Mai 2007 konnten von 45 NRS sechs als WUPyV-positiv identifiziert werden. Eine zusätzliche Infektion mit einem respiratorischen Virus (hBoV) wies lediglich eine Probe auf. Alle sechs NRS waren von unterschiedlichen Patienten und wurden innerhalb von acht Tagen (Eingangsdatum 18. - 25.05.07) eingeschickt. Vier Patienten dieser NRS zeigten klinische Zeichen einer Pneumonie, ein Patient hatte eine IoL und zu einem gab es keine klinischen Angaben. Im Juli 2003 waren zwei NRS (Eingangsdatum 02.-04.07.2003) von insgesamt sechs einge-

sendeten Proben positiv für WUPyV. Beide Proben wiesen keine Koinfektion auf und bei beiden wiesen die jeweiligen Patienten die Diagnose einer IoL auf. Die beschriebene Konstellation, d.h. dass WUPyV-positive Proben in einem engen Zeitfenster während eines Monats eingingen, keine Koinfektion gefunden wurde und betroffene Patienten die gleiche klinische Diagnose aufwiesen, konnte sonst während des gesamten Studienzeitraums nicht weiter beobachtet werden.

Diagnose bei Entlassung	n mit Koinfektion	n ohne Koinfektion	Total n (%)
Infekt oberer Luftwege (IoL)	12	14	26 (43 %)
Infekt unterer Luftwege (IuL)	20	15	35 (57 %)
Bronchitis	6	4	10 (16 %)
obstruktive Bronchitis	6	3	9 (15 %)
Pneumonie	8	8	16 (26 %)
Krampfanfall bei Fieber	4	3	7 (11%)
Gastroenteritis	2	4	6 (10 %)
Meningitis	1	1	2 (3 %)
Harnwegsinfekt	2	0	2 (3 %)

Tabelle 8: Klinische Diagnose bei Entlassung der Patienten nach stationärem Aufenthalt in der Universitätskinderklinik Würzburg. Daten waren verfügbar von 61 der 62 Kinder mit WUPyV-DNA positiven NRS, Mehrfachnennungen waren möglich.

Bei 13 Kindern mit WUPyV-DNA-positivem NRS waren zusätzlich Grunderkrankungen in der Krankenakte dokumentiert (Tab. 9).

Alter (Jahre)	Koinfektion	ARE	Grunderkrankung neben einer ARE
5,0	nein	Pneumonie	Pierre Robin Sequenz
0,2	nein	Bronchitis	Neonatale Infektion, Krampfanfälle/ 4 Monate stationärer Aufenthalt bei chronischer Lungenerkrankung
0,8	nein	Pneumonie	Persistierendes Foramen ovale/ Hirnzysten/ Balkenmangel
0,3	nein	Pneumonie	Persistierendes Foramen ovale
0,7	nein	Obstr. Bronchitis	Frühgeborenes 32.SSW, Amnioninfektionssyndrom
1,6	nein	Bronchitis	Mastozytom, rezidivierende Bronchitis
3,5	nein	Pneumonie	Wiedemann Beckwith Syndrom
3,2	nein	IoL	Therapieresistentes Fieber
5,5	nein	IoL	Duchenne Muskeldystrophie
0,7	nein	Obstr. Bronchitis	Neonatale Infektion, rezidivierende Bronchitis
3,4	nein	Bronchitis	Rezidivierende hochfieberhafte Infekte und Otitiden
2,3	Influenza A	Obstr. Bronchitis	Bullöses Pemphigoid, Z.n. Dapson-Therapie
2,3	Adenovirus	IoL	Meningitis mit Sepsis durch Meningokokken

Tabelle 9: WUPyV-DNA-positive Kinder mit Grunderkrankung

In der Gruppe der Patienten mit WUPyV-positivem NRS war die Wahrscheinlichkeit hoch, dass ein Patient mit einer Grunderkrankung und ARE auch eine WUPyV-Einfachinfektion aufwies. Im Vergleich zu Patienten ohne Grunderkrankung war dieses Ergebnis signifikant ($p=0,002$; Chi-Quadrat Test) (Tab. 9 a).

	WUPyV-positiv mit Koinfektion	WUPyV-positiv ohne Koinfektion	Signifikanzniveau
ARE und Gründerkrankung	2 (15,4 %)	11 (84,6 %)	
ARE	31 (63,3 %)	18 (36,7 %)	p=0,002

Tabelle 9 a: Anzahl der Patienten mit einer ARE und einer Gründerkrankung in Verbindung mit einer WUPyV-Infektion, Vierfeldertafel zur Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Chi-Quadrat Test

3.7. Sequenzanalyse

Um ein positives Ergebnis der qualitativen PCR zu bestätigen, wurde eine Sequenzanalyse des amplifizierten Bereichs (großes T-Antigen) durchgeführt und mit der WUPyV-Referenzsequenz EF444550 verglichen. Das 244 bp lange PCR-Produkt aus dem C-terminalen Ende des großen T-Antigen zeigte nach Sequenzierung aller positiven Proben eine Ähnlichkeit von > 99 %, ohne dass zwischen verschiedenen Jahren auffällige Abweichungen auftraten. Auch beim Abgleich mit der Sequenzdatenbank des NCBI wurde eine Übereinstimmung mit veröffentlichten Sequenzen von > 99 % festgestellt.

Über die Sequenzvariabilität des WUPyV in der nicht kodierenden Region, die insbesondere regulatorische Prozesse übernimmt, gab es zu Beginn der Arbeit noch keine Daten. Diese Region ist bei humanen Polyomaviren als Region mit höherer Variabilität bekannt und geht mit unterschiedlichem Tropismus im Verlauf einer Infektion einher (Jensen et al., 2001; Gosert et al., 2008). Es stellte sich daher die Frage, ob auch für WUPyV in der nicht kodierenden Region eine höhere Sequenzvariabilität erkennbar ist. Zur näheren Beschreibung dieser Region wurde in dieser Studie bei 50 WUPyV-positiven NRS das Genom der nicht kodierenden Region sequenziert. Von weiteren der getesteten WUPyV-DNA-positiven Proben stand nicht mehr ausreichend Material für diese Untersuchung zur Verfügung. Bei dieser Untersuchung wurden auch Proben berücksichtigt, die in der quantitativen PCR, die im Rahmen einer weiteren Würzburger Studie angewendet wurde, WUPyV-positiv waren (Neske et al., 2009). Hieraus wurden drei NRS im Cluster I und ein NRS im Cluster II eingeordnet.

Die untersuchten Sequenzen wiesen untereinander und im Vergleich zur Referenzsequenz nur geringe Unterschiede der Nukleotidsequenzen auf. Die Berechnung ergab insgesamt eine Übereinstimmungsrate von 98,5 % aller verglichenen Sequenzen. Der phylogenetische Stammbaum lässt die Bildung zweier Cluster erkennen (Abb. 7).

Cluster I wurden 43 NRS zugeordnet, Cluster II 7 NRS. Es zeigten sich beim Vergleich der Cluster keine signifikanten Unterschiede bezüglich Mehrfachinfektion oder klinischer Diagnose ($p > 0,05$, Fisher's exact Test) (Tab. 10).

	Anzahl NRS n (% von 50)	Anzahl NRS n		Patienten n Diagnose	
		Einfachinfektion	Koinfektion	IoL	IuL
Cluster I	43 (86%)	19	24	19	23
Cluster II	7 (14%)	5	2	4	2

Tabelle 10: Aufteilung in Cluster I und II nach phylogenetischer Analyse der nicht kodierenden Region. Bei zwei Patienten mit WUPyV-positiven NRS waren klinische Diagnosen nicht verfügbar.

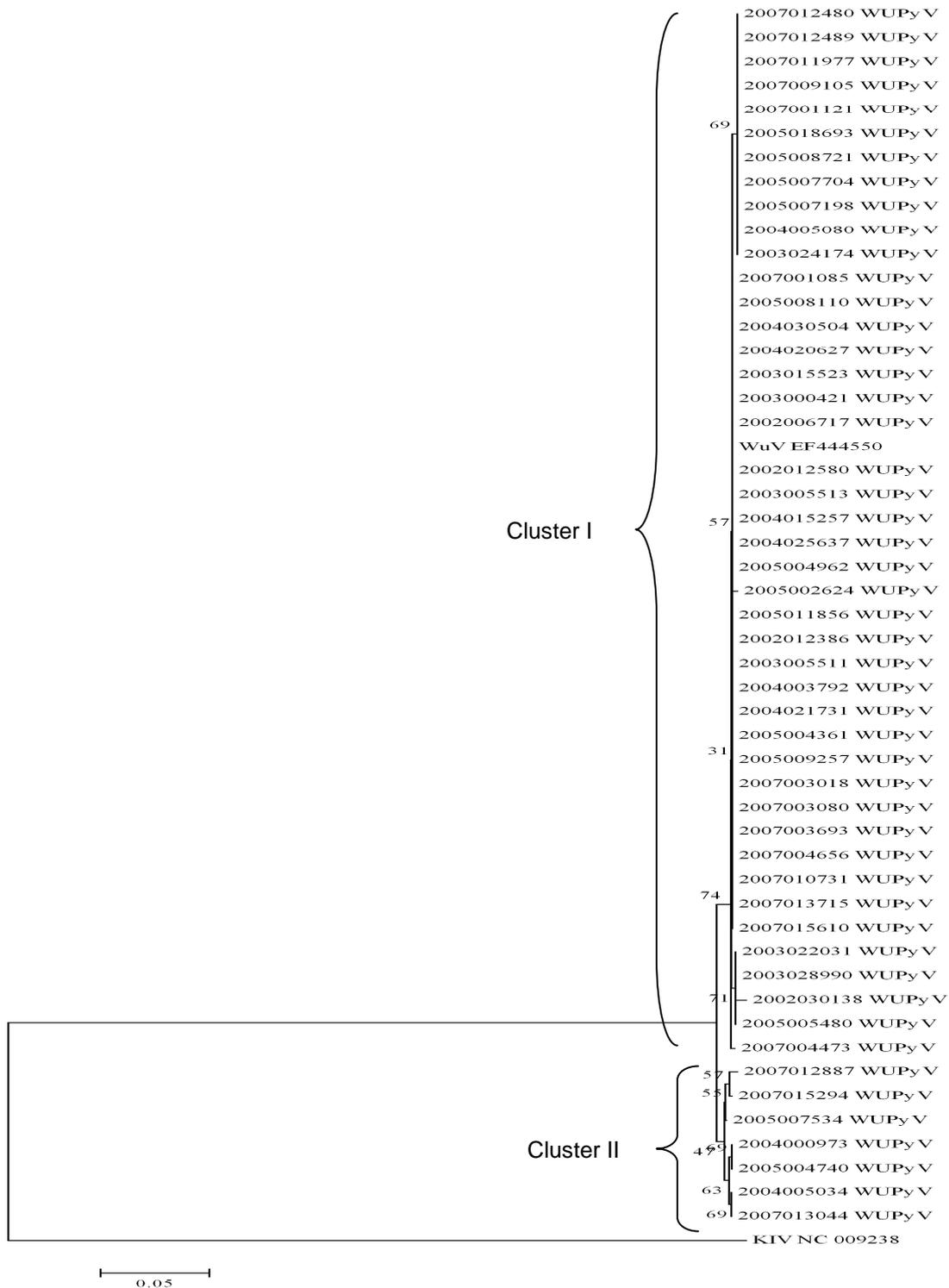


Abbildung 7: Phylogenetische Analyse einer Sequenz von 647 bp der nicht kodierenden Region des WUPyV-Genoms, erstellt mit einem Referenzstamm für WUPyV (EF444550) und KIPyV (NC009238). Die zehnstelligen Zahlen bezeichnen die laborinternen Probennummer der NRS – die Jahreszahl des Eingangsdatums zu Beginn; Bootstrapping-Werte sind an den Knotenpunkten notiert; der Maßstab gibt Unterschiede in 0.05 Nukleotidsubstitutionen pro Position an.

Die Altersverteilung der Patienten, nach Zuordnung der NRS zu einem Cluster, ist im Vergleich zur Altersverteilung des Gesamtkollektivs in Abbildung 8 dargestellt. Patienten mit WUPyV-positiven NRS, die Cluster I zugeordnet wurden, waren in allen Altersgruppen vertreten, in den Gruppen 25-36 Monate und 37-48 Monate am stärksten. Insgesamt war die Altersverteilung vergleichbar mit der Gesamtgruppe Patienten mit WUPyV-positivem NRS.

Unter den sieben Patienten mit WUPyV-positivem NRS aus Cluster II, waren dagegen nicht alle Altersgruppen repräsentiert. Vier der Patienten waren im Alter zwischen vier und fünf Jahren und drei Patienten zwischen sieben Monaten und 3 Jahren.

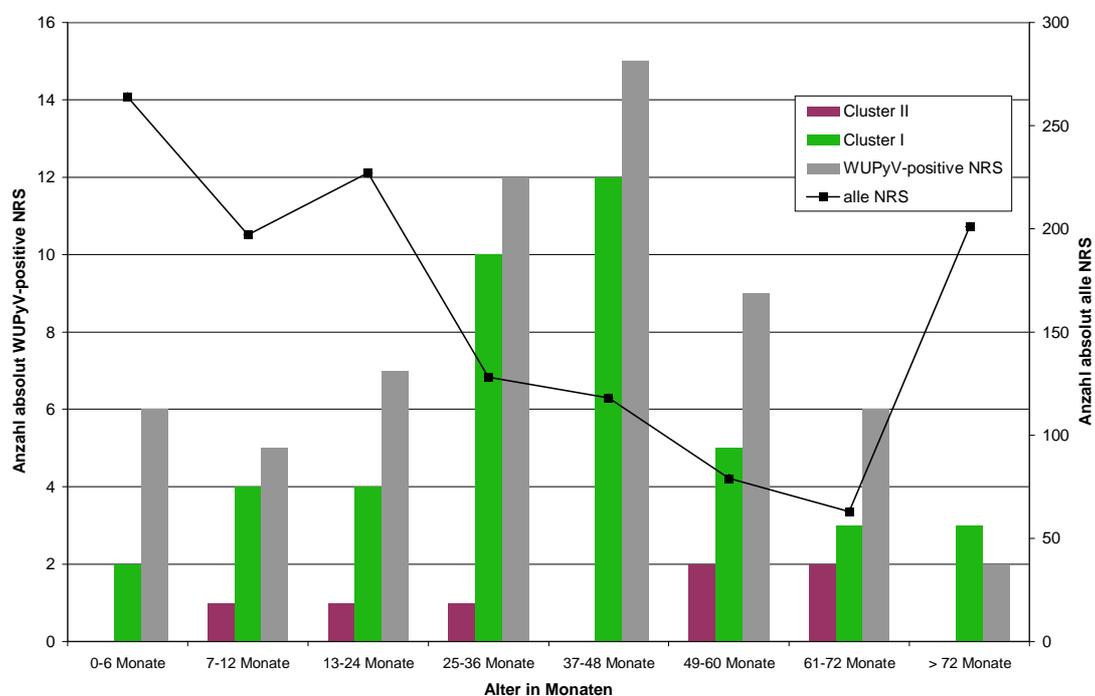


Abbildung 8: Altersverteilung der Patienten mit WUPyV-positiven NRS in absoluten Zahlen, Vergleich von Cluster I und II (=52 NRS), alle WUPyV-positiven NRS (=62 NRS) und alle NRS (=1277 NRS)

4. Diskussion

4.1. Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

Im Jahr 2007 beschrieben Gaynor et al. erstmals das WUPyV. Dabei wurde WUPyV-DNA in 3 % der untersuchten respiratorischen Proben nachgewiesen (Gaynor et al., 2007). Die vorliegende Studie wurde daraufhin noch im selben Jahr initiiert. Bis dato war die Verbreitung des WUPyV weitestgehend unbekannt und es gab nur wenige publizierte Ergebnisse.

Um die Daten über die Verbreitung und Saisonalität von WUPyV-Infektionen zu generieren, wurden retrospektiv NRS untersucht. Dabei wurde asserviertes Restmaterial von 1277 Proben verwendet, die zwischen Januar 2002 und September 2005 sowie von Januar bis Juli 2007 im Virusdiagnostiklabor des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg zu Routineuntersuchungen eingegangen waren. Die Proben stammten von Kindern, die mit einem akuten respiratorischen Infekt in der Kinderklinik des Universitätsklinikums Würzburg stationär behandelt worden waren. WUPyV-DNA konnte in 4,9 % (62/1277) der NRS detektiert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Studie lag darin epidemiologische und klinische Aspekte im Zusammenhang mit den positiven WUPyV-DNA-Nachweisen näher zu beschreiben (Saisonalität, Alter und klinische Symptome der Patienten mit WUPyV-positivem NRS).

Zwischenzeitlich befassten sich weltweit auch weitere Studien zu WUPyV mit seiner Charakterisierung. Eine Übersicht bisher veröffentlichter Studien zur Epidemiologie des WUPyV ist in Tabelle 11 dargestellt. Die Anordnung erfolgte chronologisch, basierend auf dem Jahr der Veröffentlichung in der Literaturdatenbank PubMed. In jeder der im Folgenden aufgeführten Studien dienten Proben aus dem Respirationstrakt zur Untersuchung auf WUPyV-DNA mittels einer qualitativen oder real-time PCR. Die getesteten Patientenkollektive wurden sowohl aus dem ambulanten als auch dem stationären Behandlungsrahmen rekrutiert. Der jeweils beschriebene Studienzeitraum bezieht sich auf das Jahr, in dem das Probenmaterial von den Patienten entnommen worden waren. Bei den

aufgeführten Studien handelt es sich ausschließlich um retrospektive Untersuchungen.

Die 62 NRS, die in dieser Studie für WUPyV-DNA positiv waren, stammten von 62 verschiedenen Kindern. Nur wenige Studien trennten die Anzahl der Proben eindeutig von der Anzahl der getesteten Patienten. Bei Norja et al. betrug die Gesamtanzahl Proben 983 von 612 Patienten, wobei auch hier 10 NRS positiv für WUPyV von 10 verschiedenen Patienten stammten (Norja et al., 2007). Bei Le et al. wurden sequentielle Proben von zwei Patienten bei länger anhaltender Erkrankung beschrieben. In einem Zeitraum von 6-8 Wochen waren einmal vier und einmal drei NRS des gleichen Patienten in Folge positiv für WUPyV (Le et al., 2007). Eine klare Definition der Fallprävalenz spielt insbesondere in Abgrenzung zu einer longitudinalen Studie eine Rolle. Die einzige longitudinale Analyse unter den aufgeführten Arbeiten ist aus dem Jahr 2008 von van der Zalm. Innerhalb eines 6-monatigen Zeitraums wurden von 18 Patienten je ein NRS im Abstand von zwei Wochen auf respiratorische Erreger untersucht. Das Probenmaterial wurde dabei unabhängig von einer respiratorischen Symptomatik entnommen, untersucht wurden insgesamt 230 NRS. Im Ergebnis betrug die Fallprävalenz für WUPyV 44 % (8/18), die Prävalenz des Probenkollektivs dagegen nur 9 % (21/230). Aufgrund des Studienaufbaus ist diese Arbeit daher nur bedingt mit den übrigen Daten vergleichbar. Da die Tabelle jedoch möglichst alle bis zum Jahr 2011 veröffentlichten epidemiologischen Daten repräsentieren soll, wurde auch diese Arbeit hier mit aufgeführt.

Insgesamt uneinheitlich waren Altersangaben, sowohl in Bezug auf das Gesamtkollektiv als auch bei Beschreibung der Altersverteilung von Patienten mit WUPyV-positivem Ergebnis. Ein direkter Vergleich, wie etwa das mediane Alter bei WUPyV-positiven Patienten, war daher nur eingeschränkt möglich.

In den folgenden Abschnitten werden die Daten der Tabelle und auch weitere inhaltliche Aspekte der aufgeführten Studien diskutiert.

Land	Anzahl Proben	Alter getesteter Patienten	WUPyV pos. (%)	Koinfektionsrate (%)	Altersangaben zu WUPyV pos. Pat.	Studienzeitraum	Referenz
Australien	1245	Kinder	3,0	67,6	89 % < 3 J.	01- 12/2003	(Gaynor, 2007)
USA	410 NRS; 480 BAL	Kinder; alle Altersstufen	1,2; 0,2	100,0	2 Patienten > 18 J. 4 Patienten ≤ 3 J.	2002-2003 und 2005-2006	(Gaynor, 2007)
Großbritannien	983	Kinder und Erwachsene	1,0	40,0	47 % 1-2 J.	k.A.	(Norja, 2007)
Südkorea	486 sympt./ 72 asympt.	< 6 J.	7,0/ 4,2	67,6/ k.A.	Gruppe > 24 M. 10 % Gruppe < 24 M. 6,5 %	09/ 2006 – 06/ 2007	(Han, 2007)
Kanada	79 sympt./ 78 asympt.	≤ 3 J.	2,5/ 6,4	100,0/ 0,0	sympt.: 2 Patienten 13 M. asympt.: Median 20 M.	12/ 2002 – 04/ 2003	(Abed, 2007)
USA	2637	1 T. - 88 J.	2,7	71,0	Median 12 M.	07/ 2003 – 06/ 2004	(Le, 2007)
China	278	< 5 J.	0,4	0,0	1 Patient 3 J.	02/ 2005 – 12/ 2006	(Lin, 2008)
<i>Deutschland</i>	<i>1277</i>	<i>7 T. - 22 J.</i>	<i>4,9</i>	<i>53,2</i>	<i>Median 3,0 J.</i>	<i>2002-2005; 2007</i>	<i>vorliegende Arbeit (vgl. Neske, 2008)</i>
Australien	2866	3 T. – 95 J.	4,5	79,7	93 % ≤ 5 J.	01/ 2003- 01/2004	(Bialasiewicz, 2008)
Frankreich	537	< 5 J.	2,4	30,8	Median 11,2 M.	11/ 2006 – 06/ 2007	(Foulongne, 2008)
Thailand	302	5 T. – 14 J.	6,3	42,1	Median 12 M.	02/ 2006 – 02/ 2007	(Payungporn, 2008)
Großbritannien	371	7 T. - 79 J.	1,1	75,0	Median 9 M.	10/ 2006 – 02/ 2007	(Kiasari, 2008)

Land	Anzahl Proben	Alter getesteter Patienten	WUPyV pos. (%)	Koinfektionsrate (%)	Altersangaben zu WUPyV pos. Pat.	Studienzeitraum	Referenz
China	406	Mittel 2 J.	4,2	70,5	Median 24 M.	12/ 2006 – 11/ 2007	(Yuan, 2008)
China	415/ 297	1 M. – 14 J./ 15 - 97 J.	2,4 / 0,0	100,0	Median 12,7 M.	05/2005 - 12/2007	(Ren, 2008)
USA	367 sympt./ 96 asympt.	< 2 J.	7,1/ 6,3	50,0/ k.A.	Gruppe 17 -18 M. 21 %	01-12/ 2004	(Wattier, 2008)
Niederlande	230	< 1 – 7 J.	9,0	76,2	Median 2,6 J.	11/ 2004 – 04/ 2005	(van der Zalm, 2008)
Deutschland	98	< 3 J.	3,0	33,3	Mittel 8,6 M.	11/ 2005 – 04/ 2007	(Kleines, 2009)
Schweden	637	0 - 90 J. 54 % < 15 J.	1,3	59,0	94 % < 4 J.	07/ 2004 – 06/ 2005	(Lindau, 2009)
China	674 sympt./ 202 asympt.	11 T. – 16 J.	5,6/ 1,5	60,5/ k.A.	Gruppe < 1 M. 12,5% Gruppe 6 J. 11,6% Gruppe 3 J. 7,4 %	04/ 2007 – 05/ 2008	(Zhao, 2009)
Niederlande	78 luL/ 83 keine luL	< 5 J./ < 18 J.	2,6/ 2,4	100,0/ k.A.	Median 27,5 M.	2005 – 2008	(van de Pol, 2009)
Südafrika	300 sympt./ 50 asympt.	0 – 77 J.	7,0/ 0,0	71,0/ k.A.	Median 6,5 M.	02/ 2006 – 02/ 2007	(Venter, 2009)
China	771 sympt./ 82 asymp.	Durchschnitt 22 M./ 19 M.	2,0/ 0,0	40,0/0,0	2 M. – 48 M.	07/2008 – 06/2009	(Zhuang, 2011)

Tabelle 11: Übersicht über publizierte Studien zur Epidemiologie von WUPyV aus dem Zeitraum von 2007 bis 2011, NRS = Nasenrachensekret, Pat.= Patient; BAL= Bronchoalveoläre Lavage; J.= Jahr; M.= Monat; T.= Tage; pos.= positiv; luL = Infektion der unteren Luftwege; k.A.= keine Angaben; sympt.= symptomatisch; asympt.=asymptomatisch

4.2. Methodische Aspekte

Als Nachweismethode von WUPyV-DNA in NRS wurde in dieser Studie eine PCR etabliert. Die Auswahl der Primer und Durchführung der WUPyV-PCR erfolgte analog des Protokolls von Gaynor et al. mit einem Primerpaar, das eine 244 bp lange Sequenz des 3' Endes des großen T-Antigen generierte. In der Erstpublikation wurde dieses Primerpaar zur Kontrolle benutzt, nachdem für das Screening des Probenpools auf WUPyV-DNA initial ein Primerpaar der VP2-Region verwendet worden war. Beide Primer stellten sich dabei als äquivalent heraus, wobei eine Kreuzreaktivität mit anderen Polyomaviren ausgeschlossen worden war (Gaynor et al., 2007).

Zur Validierung der qualitativen WUPyV-PCR wurde die minimale Nachweisgrenze durch Probit-Analyse ermittelt. Die Nachweisgrenze, die mit 95 % Wahrscheinlichkeit noch detektiert wird, lag in dieser Studie bei 8,8 Kopien/Reaktion, was einer hohen Sensitivität der Testung entspricht (Ratcliff et al., 2007). Bezogen auf die untersuchten NRS ließ sich daraus eine Nachweisgrenze von 440 Kopien/ml Ausgangsvolumen berechnen. In anderen bisher publizierten Studien wurden keine Angaben zur Nachweisgrenze der verwendeten Methode gemacht, so dass ein direkter Literaturvergleich hier nicht möglich war.

Zur Beschreibung der mit WUPyV auftretenden Koinfektionen flossen zusätzlich Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen ein. Alle NRS, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurden, waren zuvor mit einem Immunfluoreszenztest auf Antigene respiratorischer Viren (Influenzaviren A/B, RSV, Parainfluenzaviren 1 – 3, Adenoviren) sowie mit einer hBoV-PCR getestet worden. Von 1277 Proben war bei 40 % im IFA-Screening mindestens ein Virus gefunden worden. Dieses Ergebnis ist repräsentativ und vergleichbar mit veröffentlichten Detektionsraten bei direktem Immunfluoreszenznachweis (Brunstein et al., 2008). Für hBoV ließ sich durch PCR-Testung eine Prävalenz von 6,3 % ermitteln (Neske et al., 2007). Detektionsraten für hBoV, wie in der Literatur beschrieben, liegen zwischen 1,5 % und 11,3 % (Sloots et al., 2008).

Sowohl der Antigennachweis als auch die hBoV-PCR ergaben folglich Ergebnisse, die in der Literatur nachvollziehbar waren und auch für diese Studie verwendet werden konnten. Insgesamt muss jedoch beim Vergleich der Prävalenzen der einzelnen Viren berücksichtigt werden, dass im Unterschied zu einer PCR bei WUPyV und hBoV, die übrigen Viren mit einem Immunfluoreszenztest untersucht worden waren. Der Antigentestung wird im Vergleich zur PCR eine geringere Sensitivität bescheinigt (Herrmann et al., 2001). Die Häufigkeit der mit IFA-Screening getesteten Viren könnte demnach noch höher liegen, wenn man eine sensitivere Nachweismethode anwenden würde. Eine IFA-Testung für hBoV und WUPyV war bei Durchführung der Studie noch nicht etabliert, was aber aufgrund der höheren Sensitivität der PCR auch nicht notwendig erscheint.

In der vorliegenden Studie ist stets auf große Sorgfalt in der Durchführung geachtet worden. Trotzdem ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass es sich um eine retrospektive Studie handelt. Für die Beschreibung klinischer Symptome eines WUPyV-positiven Patienten mussten Diagnosen aus der Krankenakte herangezogen werden. Ein Vergleich klinischer Diagnosen von WUPyV-positiven und -negativen Patienten wurde nicht durchgeführt, da für das Gesamtkollektiv keine vollständigen klinischen Angaben für die Auswertung zur Verfügung standen. Weiterhin zu bedenken ist, dass nur Proben von hospitalisierten Kindern berücksichtigt wurden, was eine Auswahl an schwereren Verlaufsformen einer ARE zur Folge hat.

4.3. Prävalenz, jahreszeitliche Verteilung und Saisonalität

In der vorliegenden Studie wurde ein Probenpool von 1277 NRS untersucht, der einen Zeitraum von insgesamt fünf Jahren repräsentierte. Die Prävalenz des Virus von 4,9 % im Raum Würzburg kam Ergebnissen aus Australien, 4,5 % (Bialasiewicz et al., 2008) und China, 4,2 % (Yuan, 2008) am nächsten. Insgesamt sind weltweit deutliche Schwankungen in der Prävalenz von WUPyV zu verzeichnen, so liegen die Ergebnisse zwischen 0 % und 9 % (Tab. 10). Erklärbar ist dies durch Differenzen in: Qualität der Probengewinnung, Qualität des Materials und der Nachweismethode, Altersverteilung des untersuchten Kollektivs und tatsächlichen geographischen Unterschieden. Zu beachten sind erheb-

liche Unterschiede in der Anzahl der getesteten Proben, denn nur zwei Publikationen zu WUPyV wiesen ein Gesamtkollektiv von über 2000 Proben auf, alle weiteren bewegten sich zwischen 98 und 674 Proben (Tab. 11). Die vorliegende Studie testete die drittgrößte beschriebene Probenanzahl, so dass aus dieser Sicht eine hohe Aussagekraft angenommen werden kann.

Im Würzburger Kollektiv gelang der Nachweis von WUPyV-DNA in NRS aus jedem Kalendermonat. Insgesamt häufiger konnte das Virus in den Monaten Februar und März nachgewiesen werden, wobei hier auch die Gesamtanzahl der untersuchten NRS am höchsten war. Zur jahreszeitlichen Verteilung ist zu sagen, dass WUPyV auch in anderen Ländern in allen Kalendermonaten auftrat, wobei die Monate mit den höchsten Zahlen variieren, so sind Maxima sowohl im Februar, April, Mai und Juli als auch zwischen Oktober und Dezember beschrieben (Le, 2007; Norja et al., 2007; Wattier et al., 2009). Möglicherweise kommen diese Unterschiede durch jahreszeitliche Differenzen der Infektionswellen in den verschiedenen Länder zustande (Payungporn et al., 2008).

Die zeitliche Begrenzung der meisten Studien lag zwischen fünf bis zwölf Monaten eines Jahres und umfasste lediglich eine Saison, so dass in der Literatur über Saisonalität von WUPyV bisher keine Angaben zu finden sind. Aufgrund des langen Studienzeitraums dieser Arbeit konnten dagegen fünf Saisons definiert werden. Unterschiede im Auftreten von Saison zu Saison ließen sich über den Untersuchungszeitraum jedoch nicht beobachten.

4.4. Altersverteilung und Geschlechterverhältnis

In der vorliegenden Studie lag das mediane Alter der WUPyV-positiv getesteten Kinder bei 3,0 Jahren. Nur 3,2 % der positiven Proben wurden bei über 6-jährigen gefunden. Diese Daten stimmen überein mit der Erstpublikation. Bei Gaynor et al. stammten die meisten positiven NRS (37/43) von Kindern, die jünger als vier Jahre alt waren und sehr selten von über 6-jährigen und Erwachsenen (Gaynor et al., 2007). Auch spätere Studien konnten nachweisen, dass WUPyV in der Altersgruppe der 0-4-jährigen hohe Prävalenzraten aufweist (Tab. 11). Zu beachten ist jedoch, dass ein Großteil der Untersuchungen sich

bisher auf Material von Säuglingen und Kindern beschränkte. Einige Studien bezogen zusätzlich Patienten im Erwachsenenalter ein und wiesen gar keine positiven Proben nach oder mit Prävalenzraten von 0 % bis 1,6 % deutlich weniger als Studien, die sich allein auf Kinder beschränkten (Ren et al., 2008; Gaynor et al., 2007; Norja et al., 2007).

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für ein Auftreten von WUPyV vor allem bei Kleinkindern. Dies lässt eine Übertragung des Virus während einer Tagesbetreuung oder in der Kindergartenzeit vermuten. In dieser Altersgruppe haben viele Kinder zum ersten Mal intensiven sozialen Kontakt zu einer Gruppe Gleichaltriger und erleiden banale Infekte in hoher Frequenz. Wesentlich begründet sich dies durch eine hohe Reinfektionsgefahr mit respiratorischen Viren innerhalb der Gruppe, auch aufgrund mangelnden Hygienebewusstseins. Weiterhin spielt die immunologische Unreife junger Kinder hier eine Rolle (Speer and Gahr, 2009).

Die Vermutung, dass es in der Gruppe der Klein- und Kindergartenkinder zu einer Erstinfektion kommt, wird durch neuere Studien im Rahmen serologischer Untersuchungen gestützt. So wurde bereits bei 5-jährigen Kindern eine Seroprävalenz von ca. 90 % gegen WUPyV-Kapsidproteine nachgewiesen, was für einen Erstkontakt mit WUPyV im frühen Kindesalter spricht (Nguyen et al., 2009).

Der Unterschied zwischen der Geschlechterverteilung der WUPyV-positiven NRS (57 % männlich) und dem Gesamtkollektiv (58,4 % männlich) in unserer Studie zeigte keine Signifikanz. Nur wenige Studien gingen auf die Verteilung des Geschlechts ein. Es waren zum Teil Jungen (Foulongne et al., 2008) oder Mädchen (Gaynor et al., 2007) geringfügig überrepräsentiert, ebenfalls ohne Signifikanz. Es gibt keinen Anhalt für einen Zusammenhang zwischen Geschlecht und WUPyV-Positivität.

4.5. Koinfektionen mit WUPyV

In der vorliegenden Studie wurde bei 53,2 % der WUPyV-positiven NRS zusätzlich ein weiterer Erreger nachgewiesen, eine auffällig hohe Koinfektionsrate. In dem hier untersuchten Kollektiv kam es am häufigsten zu Koinfektionen mit Adenoviren und Influenza A-Viren, weiterhin aber auch zu Koinfektionen mit hBoV sowie mit RSV und Parainfluenzaviren. Es wurden in vier Fällen Dreifachinfektionen detektiert. Nicht erfasste Pathogene waren unter anderem Coronaviren, Rhinoviren, Enteroviren und humane Metapneumoviren. Die Anzahl an Mehrfachinfektionen wäre vermutlich noch angestiegen, wenn man das Screening um diese respiratorische Viren erweitert und statt eines IFA-Tests für Influenza-, Parainfluenza-, Adenoviren und RSV die sensitivere Methode einer PCR verwendet hätte. So kann z.B. mit einer Multiplex-PCR bei hoher Sensitivität auf verschiedene respiratorische Viren gleichzeitig getestet werden (Reijans et al., 2008).

In anderen Studien wurden Koinfektionsraten zwischen 30 % und 100 % erzielt (Tab. 11). Obwohl die zusätzlich getesteten Viren nicht überall identisch waren und keinem einheitlichen Testsystem unterlagen, tritt eine WUPyV-Infektion offensichtlich häufig mit mindestens einem anderen respiratorischen Virus gemeinsam auf. Neben den respiratorischen Viren der vorliegenden Studie wurden Rhinoviren, hMPV und Coronaviren als weitere Kopathogene einer WUPyV-Infektion erwähnt (Gaynor et al., 2007; Foulongne et al., 2008; Bialasiewicz et al., 2008).

Eine Infektion mit Adenovirus war in dieser Studie signifikant häufiger bei WUPyV-positiven als bei WUPyV-negativen NRS aufgetreten ($p=0,004$), ebenso eine Infektion mit hBoV ($p=0,01$). Eine Studie aus Großbritannien wies nach simultaner Testung von WUPyV und KIPyV zusammen ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p=0,02$) bei Polyomavirus-positiven Proben und simultaner Infektion mit Adenovirus im Vergleich zu Polyomavirus-negativen Proben nach (Norja et al., 2007). Bisher gibt es in der Literatur keine weiteren Belege für eine signifikante Häufung eines bekannten respiratorischen Virus in Kombination mit WUPyV.

Infektionen mit mehr als zwei nachweisbaren respiratorischen Viren sind nicht selten. So hatten Gaynor et al. bereits eine Vierfachinfektion und sechs Dreifachinfektionen beschrieben (Gaynor et al., 2007). Auch in Südkorea konnten bei fünf Proben Dreifachinfektionen detektiert werden (Han et al., 2007).

Hinsichtlich der hohen Koinfektionsrate bei WUPyV mit anderen respiratorischen Viren stellt sich demnach die Frage nach der Bedeutung einer Infektion mit dem neuen Virus. Gesichert ist, dass auch hBoV und KIPyV, weitere kürzlich entdeckte Viren, hohe Koinfektionsraten aufwiesen (Weissbrich et al., 2006; Allander et al., 2007; Bialasiewicz et al., 2007). Eine Erklärung für die steigende Zahl von Mehrfachinfektionen im Respirationstrakt ist der vermehrte Einsatz von sensitiven molekularbiologischen Nachweismethoden wie z. B. PCR. Ebenso hat sich die Vielfalt der nachweisbaren respiratorischen Viren in den letzten Jahren erweitert, womit die Wahrscheinlichkeit gestiegen ist Mehrfachinfektionen zu detektieren.

Es muss berücksichtigt werden, dass der Nachweis von DNA kein Beweis für eine akute Infektion sein kann. Auch Viruspartikel einer vorangegangenen Infektion oder Partikel latent persistierender Viren sind detektierbar, ohne dass es einen direkten Zusammenhang zur klinischen Symptomatik geben muss. Mit serologischen Tests, die eine spezifische Immunantwort bei Kontakt mit Virusantigenen nachweisen können, wäre die klinische Relevanz des alleinigen DNA-Nachweises, besonders bei neuen Viren in retrospektiven Untersuchungen, besser zu beurteilen.

Zur Interpretation der hohen Koinfektionsrate bei WUPyV gibt es folglich mehrere Möglichkeiten. Es könnte sein, dass das WUPyV die Rolle eines „innocent bystander“ einnimmt und zufällig mit einem anderen Virus detektiert wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass WUPyV als Opportunist in Kombination mit anderen Erregern auftritt, die ihm eine besondere Disposition bieten. Ebenso wäre es denkbar, dass WUPyV natürlicher Bestandteil der endogenen Flora ist und durch inflammatorische oder ähnliche Prozesse reaktiviert wird. Primäre Infektionen mit WUPyV könnten auch den Eintritt anderer Viren erleichtern und begünstigend für eine virale Zweitinfektion wirken (Gaynor et al., 2007).

Eine Hypothese besagt, dass insbesondere im Rahmen von Mehrfachinfektionen schwere Verläufe einer ARE zu beobachten sind, die dann zu einem stationären Aufenthalt führen. Dies würde erklären, warum es in dieser Studie eine hohe Anzahl an Koinfektionen respiratorischer Viren gab. In der Literatur gibt es bereits Hinweise darauf, dass die Ausprägung klinischer Symptome stärker bei Dual- und Tripelinfektionen ausfällt (Calvo et al., 2008).

4.6. Klinische Symptome bei Patienten mit WUPyV-positiven NRS

Neben epidemiologischen Daten wurden in dieser Studie auch klinische Angaben WUPyV-positiver Patienten erhoben. Für 61 der 62 positiven NRS waren klinische Diagnosen verfügbar, die retrospektiv ausgewertet wurden. Bei 57 % der Patienten lag eine luL und bei 43 % eine loL vor. Einige Kinder wiesen neben einem respiratorischen Infekt zusätzliche Diagnosen auf, die andere Organsysteme betrafen, wie Harnwegsinfekt, Gastroenteritis, Krampfanfall bei Fieber und Meningitis.

Wie in der vorliegenden Studie, lagen auch in Frankreich und den USA (Bundesstaat Missouri) häufig Symptome einer luL vor (Foulongne et al., 2008; Le et al., 2007). An zusätzlichen Symptomen wurden bisher ebenfalls Erbrechen, Durchfall oder Krampfanfall bei Fieber erwähnt (Gaynor et al., 2007; Ren et al., 2008; Le et al., 2007; Foulongne et al., 2008). Limitierend beim studienübergreifenden Vergleich klinischer Diagnosen waren allgemein uneinheitliche Definitionen der verschiedenen Krankheitsbilder, da hier keine äquivalenten Standards bestanden.

Die meisten Studien fokussierten zunächst den Respirationstrakt für Materialgewinnung und Virusnachweis unter der Annahme, dass WUPyV Auslöser einer ARE ist. In einigen Untersuchungen konnte Virus-DNA jedoch auch in Stuhlproben von Patienten mit Diarrhoe sowie in Serumproben detektiert werden, wogegen bisher kein PCR-Nachweis in Urin und Liquor gelang (Ren et al., 2009; Neske et al., 2009; Bialasiewicz et al., 2009). Welche Rolle der Gastrointestinaltrakt möglicherweise bei diesem Virus spielt, erfordert weitere Untersuchungen. Er könnte Replikationsort und WUPyV möglicherweise auch Auslöser

einer gastrointestinalen Symptomatik sein. Alternativ wäre denkbar, dass WUPyV im Rahmen von respiratorischen Infekten verschluckt wird, und WUPyV-DNA nach dem natürlichen Passageweg letztendlich im Stuhl nachweisbar wird.

In der vorliegenden Studie konnte bei der retrospektiven Analyse der Krankenakten festgestellt werden, dass bei dreizehn Kindern mit einer ARE und WUPyV-positivem NRS eine weitere Erkrankung, hier als „Grunderkrankung“ bezeichnet, diagnostiziert worden war. Grunderkrankungen waren u.a. genetische Fehlbildungen, Autoimmunerkrankungen sowie rezidivierende oder schwere Infektionen, die in Zusammenhang stehen könnten mit einer erhöhten Anfälligkeit für respiratorische Infekte, z.B. bei einem insgesamt reduzierten Immunstatus. Zehn dieser Patienten wiesen außer WUPyV keines der getesteten respiratorischen Viren auf. Unter den WUPyV-positiven Patienten war das Ereignis einer Einfachinfektion bei ARE plus Grunderkrankung signifikant häufiger als eine Einfach- oder Mehrfachinfektion ohne Grunderkrankung ($p= 0,002$, Chi-Quadrat Test).

Dieses Ergebnis ist sicherlich kritisch zu betrachten, da eine Vollständigkeit der Angaben aus den Krankenakten retrospektiv nicht nachzuprüfen war und es sich zum Teil um unpräzise Diagnosen handelte. Es ist nicht auszuschließen, dass eine höhere Anzahl an Patienten als angegeben eine sogenannte Grunderkrankung aufwies, dies aber nicht aus den Akten zu entnehmen war. Auch eine Evaluation des Gesamtkollektivs wurde nicht durchgeführt. Die Annahme, dass einige der genannten Patienten einen reduzierten Immunstatus haben könnten, ließ sich nicht verifizieren, d.h. es war weder der Immunstatus bei WUPyV-positiven Patienten noch bei WUPyV-negativen Patienten gesichert.

Im Kontext gesehen ist das Ergebnis insofern interessant, dass einige Studien den Immunstatus der untersuchten Patienten berücksichtigten. Eine Arbeit aus Südafrika untersuchte Kinder mit ARE auf WUPyV und testete simultan deren HIV-Status. Eine HIV-Infektion lag häufiger in der Gruppe der WUPyV-positiven Patienten vor (57 %) als im Gesamtkollektiv (33 %) (Venter et al., 2008). Nicht untersucht wurde, inwieweit das Immunsystem bereits durch die HIV-Infektion beeinträchtigt war.

In anderen Studien waren für junge Patienten mit WUPyV-positivem NRS ohne Koinfektion ebenfalls Grunderkrankungen notiert (z.B. Kongenitale Myopathie), wobei keine signifikante Häufung in dieser Gruppe beschrieben wurde (Foulongne et al., 2008; Le et al., 2007). In einer Studie konnte WUPyV in sequentiellen Proben, die von zwei Patienten stammten, über einen Zeitraum von 6-8 Wochen nachgewiesen werden. Bei beiden Patienten handelte es sich um Kinder mit prolongierter Erkrankung, wobei das eine unter einer hämophagozytischen Lymphohistiozytose litt und das andere aufgrund einer biliären Atresie eine Lebertransplantation erhielt (Le et al., 2007). Eine Reaktivierung oder eine latente Infektion des WUPyV bei diesen Patienten wird diskutiert, wobei der Bestimmung der Orte einer Viruslatenz große Aufmerksamkeit zukommt (Wattier et al., 2008).

Von einigen wenigen Erwachsenen, bei denen das Polyomavirus bisher nachgewiesen werden konnte, waren die meisten immunsupprimiert, beispielsweise in Folge einer HIV-Infektion oder Stammzelltransplantation, oder wurden intensivmedizinisch behandelt aufgrund einer akuten respiratorischen Dekompensation (Gaynor et al., 2007; Abedi Kiasari et al., 2008; Mourez et al., 2009). Eine besondere Affinität des Virus zu erwachsenen Patienten, die an einer das Immunsystem schwächenden Vorerkrankung leiden, wird nicht ausgeschlossen, wobei dies in Zusammenhang gebracht wird mit einer möglichen Reaktivierung des neuen Polyomavirus wie es für JCV und BKV bekannt ist (Norja et al., 2007; Sharp et al., 2009). In den oben genannten Studien unterlag das Kollektiv erwachsener Patienten bereits einer Selektion, da es sich primär um stationäre Fälle handelte und ein für Erwachsene ungewöhnlich schwerer Verlauf einer ARE z.B. durch die Grunderkrankung zu vermuten ist. Eine Verzerrung der Ergebnisse ist daher zu berücksichtigen.

4.7. Sequenzanalyse

Auf molekularbiologischer Ebene wurden in dieser Studie Sequenzanalysen zweier Genomabschnitte des WUPyV durchgeführt. Zum einen diente dies zur Bestätigung eines positiven Ergebnisses nach qualitativer PCR im Rahmen des Screenings, zum anderen wurde ein Teil der nicht kodierenden regulatorischen Region auf Sequenzvariabilität untersucht.

Mit Hilfe der initial verwendeten Primer, die eine 244 bp lange Sequenz des großen T-Antigens amplifizierten, konnte nach Sequenzierung dieses Abschnitts für alle positiven NRS eine Übereinstimmung in der Basenabfolge von über 99 % gezeigt werden. Dies war gemäß den Angaben aus der Literatur zu erwarten, so dass sich diese Sequenz aufgrund ihrer Stabilität bevorzugt zum Screening der NRS eignete.

Bei Gaynor et al. wiesen ebenfalls 250 bp lange Amplikons aus der VP2-Region maximal 1 % Nukleotidsubstitutionen unter allen WUPyV-positiven Proben auf. Darunter waren fünf Proben mit identischer Sequenz im Vergleich zur Referenzsequenz. Weitere 33 Sequenzen zeigten zwar Veränderungen zur Referenzsequenz, aber keine Veränderungen untereinander (Gaynor et al., 2007).

In der vorliegenden Studie wurde des Weiteren der Frage nachgegangen, ob im Gegensatz zu den hochkonservierten Abschnitten des VP2-Gens und des großen T-Antigens ein stärker variabler Bereich des WUPyV-Genoms existiert. Dazu wurde für 50 positive Proben eine 647 bp große Sequenz der nicht-kodierenden, regulatorischen Region untersucht. Bei einer Identitätsrate der Sequenzen von 98,5 % gab es keine Hinweise für eine höhere Variabilität in dieser Region. Eine Einteilung der Sequenzen erfolgte in zwei Cluster, jedoch ohne dass dabei ein Zusammenhang zwischen einer Altersgruppe, saisonalem Auftreten oder einer klinischen Diagnose erkennbar gewesen wäre.

Die Polyomaviren JCV und BKV weisen insgesamt ebenfalls geringe Sequenzvarianzen auf. Beschrieben ist jedoch eine genetische Rekombination in der regulatorischen Region im Zusammenhang mit unterschiedlichem Tropismus im Verlauf einer Infektion (Jensen et al., 2001; Gosert et al., 2008). Für das Poly-

omavirus WU und ebenso für das enger verwandte KIPyV, gibt es dafür bisher keinen Anhalt, denn beide Viren zeigten in dieser Region kaum Variabilität (Bialasiewicz et al., 2009).

Eine Studie aus Thailand konnte bei Untersuchung der kompletten Genomsequenz des WUPyV ebenfalls Übereinstimmungen in der Basenabfolge zwischen 99,6 – 99,9 % und für KIPyV zwischen 99,4 - 99,9 % nachweisen (Payungporn et al., 2008). Die nähere Charakterisierung des Genoms von WUPyV und seiner Diversität wurde weiterhin anhand von 64 vollständig bekannter Sequenzen des WUPyV im Jahr 2010 beschrieben. Es bestätigte sich insgesamt eine geringe Varianz innerhalb der Genotypen von 0 – 1,2 %. Dabei wurden jedoch kurze Abschnitte im VP1- und VP2-Gen sowie in der N-terminalen Region des großen T-Antigens beschrieben, bei denen häufig Abweichungen in der Nukleotidabfolge auftraten. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde daher ein Einteilungsschema zur Typisierung dreier Genotypen (Ia/b/c, II, IIIa/b) vorgeschlagen, basierend auf einem Abschnitt von 679 bp zwischen VP1 und VP2. Es zeigten sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen geographischem Ursprung einer Probe und dem Genotyp, eine eindeutige Korrelation zwischen Genotyp und klinischer Diagnose (IoL/IuL) ergab sich nicht (Bialasiewicz et al., 2010).

Bisher deutet vieles daraufhin, dass das Genom des neuen Polyomavirus WUPyV in allen Abschnitten hoch konserviert ist und nur sehr wenig Variabilität zeigt. Der Grund dafür könnte sein, dass das Virus erst seit kurzer Zeit beim Menschen zirkuliert.

4.8. Stellenwert der Ergebnisse

Bei WUPyV handelt es sich um ein seit dem Jahr 2007 bekanntes Polyomavirus. Generell ist bei jedem neu identifizierten Virus zunächst die Verbindung zwischen Pathogen und relevanter Erkrankung zu beweisen. Hier spielen seit langem die Koch'schen Postulate eine tragende Rolle, die bis heute in modifizierter Version angewendet werden (Fredericks and Relman, 1996). Nach aktuellen Publikationen zu WUPyV werden die Forderungen von Fredericks und

Relman nur in Teilbereichen der sieben Punkte erfüllt, was nun kurz erläutert werden soll.

Der erste Punkt fordert: (i) Virales Genom sollte überwiegend während einer bestimmten Infektion und in diesen Fällen hauptsächlich im betroffenen Gewebe nachgewiesen werden. WUPyV wurde bisher mittels PCR vorwiegend in respiratorischem Material von Patienten mit ARE untersucht und nachgewiesen, so dass im Hinblick auf ARE die Bedingung (i) erfüllt wäre.

Bisher nicht erfüllt zu sein erscheint das Kriterium (ii), wonach ein signifikant geringerer oder kein Nachweis des neuen Virus bei Gesunden möglich sein sollte. Vier Studien haben in ihren Untersuchungen zu WUPyV Kontrollgruppen im Vergleich gebildet, bei denen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Prävalenzen symptomatischer und asymptomatischer Patienten zeigten: 7 % versus 4,2 % (Han et al., 2007), 2,5 % versus 6,4 % (Abed et al., 2007), 7,1 % versus 6,3 % (Wattier et al., 2008) und 1,9 % versus 0 % (Zhuang et al., 2011). Signifikant war der Unterschied beider Gruppen bei Zhao et al. 5,6 % versus 1,5 % (Zhao et al., 2009). Die Größen der Kontrollgruppe waren relativ klein bei Han et al. (n=72), Abed et al. (n=78), Wattier et al. (n=96), Zhao et al. (n=202) und Zhuang et al. (n=82). Alle vier Studien untersuchten in der Kontrollgruppe Proben von Kindern, die ambulant behandelt oder zu einem elektiven chirurgischen Eingriff aufgenommen worden waren, aber keine Symptome einer ARE aufwiesen. Norja et al. postulieren eine höhere Prävalenz von WUPyV mit 5,4 % (5/114) in ihrer Kontrollgruppe als in der Gruppe der symptomatischen Patienten mit IoL 2,6 % (2/75) oder LuL 4,4 % (5/114) und widerlegen die Verbindung zwischen WUPyV und einer ARE (Norja et al., 2007). Die Zuordnung der Proben zu der Kontrollgruppe geschah erst bei Auswertung der Ergebnisse, wobei der größte Anteil Proben dabei von erwachsenen, immunsupprimierten Patienten stammte. Dies lässt die Auswahl der Kontrollgruppe in jener Studie nicht plausibel erscheinen. Trotzdem kann zurzeit eine signifikant höhere Infektionsrate mit WUPyV bei symptomatischen Patienten im Vergleich zu Gesunden nicht belegt werden. Weitere Studien sollten daher größere und besser definierte Kontrollgruppen einbeziehen bis Punkt (ii) abschließend zu beurteilen ist.

Punkt (iii) fordert, dass die Viruslast, die Bestimmung der Virusmenge, bei Besserung der Symptomatik sinkt und bei einem Rückfall wieder ansteigt. Auch Punkt (iv) bezieht die Quantifizierung der Virusmenge ein. Demnach ist ein Zusammenhang mit einer Erkrankung wahrscheinlich, wenn das Virus sich vor und zu Beginn der Symptome stark repliziert, eine spezifische Immunantwort des Kranken im Verlauf nachgewiesen wird und eine hohe Kopienzahl mit der Schwere der Krankheit korreliert. Beide Punkte (iii; iv) sind bisher nicht erfüllt. Die Etablierung einer real-time PCR zur Quantifizierung der Viruslast ist zur weiteren Klärung diesbezüglich notwendig. Die retrospektive Untersuchung von NRS in Hinblick auf die Viruslast wurde bereits durchgeführt, wobei eine hohe Viruslast bei Kindern mit ARE nachgewiesen werden konnten (Neske et al., 2009). Prospektive Studien, die Viruslast und Symptome in Verlaufsproben korrelieren, gibt es bisher jedoch noch nicht.

Punkt (v) betrifft charakteristische Merkmale, die bei neuen Viren verglichen mit phylogenetisch verwandten Viren übereinstimmen sollten. Bereits in der ersten Studie von Gaynor et al. konnte nachgewiesen werden, dass das WUPyV auf molekulargenetischer Ebene charakteristische Merkmale anderer Polyomaviren besitzt. Bis dahin waren bereits zwei humane Polyomaviren BKV und JCV bekannt. Parallelen zu BKV und JCV bezüglich klinischer Eigenschaften können bisher zwar nicht sicher gezogen werden, jedoch wird für BKV und JCV eine Primärinfektion auch in Zusammenhang mit respiratorischen Symptomen gebracht. Der Nachweis in respiratorischem Probenmaterial gelang jedoch selten (Goudsmit et al., 1982; Sundsfjord et al., 1994). WUPyV wurde bisher überwiegend in NRS nachgewiesen, ein Nachweis in Urin oder Liquor, der für JCV und BKV positiv ist, war bisher nicht erfolgreich (Gaynor et al., 2007). Weiterhin wird diskutiert, ob WUPyV ebenfalls eine besondere Bedeutung bei immunsupprimierten Patienten hat, insofern dass dort Mechanismen einer Reaktivierung oder einer latenten Infektion des Virus eine Rolle spielen, wie es auch für BKV und JCV bekannt ist (Le et al., 2007). Dieser Aspekt ist jedoch noch ungeklärt

Bedingung (vi) fordert, dass das Virus in betroffenem Gewebe auch auf zellulärer Basis nachgewiesen werden kann. Dies erfolgt z. B. durch immunhistochemische Untersuchungen. Daten hierzu liegen bisher noch nicht vor.

Schließlich sollten alle gesammelten Daten reproduzierbar sein damit Punkt (vii) erfüllt wird. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu WUPyV ist in Fragestellungen zu Epidemiologie und Sequenzvariabilität bisher gelungen, was inzwischen zahlreiche Studien diesbezüglich belegen. Die Beschreibung eines klinischen Bildes bei Patienten mit positivem WUPyV-DNA-Nachweis beschränkte sich in der Literatur bisher vorwiegend auf ARE, wobei von einem breiten Spektrum an Symptomen berichtet wurde.

Zusammenfassend beschreibt die vorliegende Studie grundlegende Aspekte zur Epidemiologie von WUPyV. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden durch zahlreiche inzwischen veröffentlichte Studien unterstützt. Ob WUPyV einen Krankheitswert bei respiratorischen Infekten besitzt, ist bisher ungeklärt. Die Forderungen von Frederick und Relman sind aktuell nur in wenigen Punkten vollständig erfüllt, so dass dringend weitere Studien erforderlich sind um einen möglichen Krankheitswert von WUPyV weiter abzuklären.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Das Polyomavirus WU (WUPyV) wurde erstmalig im Jahr 2007 in respiratorischem Material bei Patienten mit respiratorischem Infekt beschrieben. Charakterisierung, Epidemiologie und Beurteilung des Krankheitswerts des neuen Virus sind seither Gegenstand vieler Studien weltweit.

Material und Methoden: Retrospektiv wurde Probenmaterial aus dem Respirationsstrakt auf WUPyV mittels PCR untersucht. Das Material war zur virologischen Routinediagnostik eingegangen und stammte von in der Universitätskinderklinik Würzburg stationär behandelten Kindern, deren klinische Diagnosen anonymisiert zur Verfügung standen. Es wurden 1277 Nasenrachensekrete (NRS) berücksichtigt aus dem Zeitraum zwischen Januar 2002 und September 2005 sowie zwischen Januar und Juli 2007.

Ergebnisse: Von 1277 NRS waren 62 (4,9 %) positiv für WUPyV. Das Virus wurde in jedem Monat eines Jahres nachgewiesen, wobei Wintermonate insgesamt stärker vertreten waren. Das mediane Alter der betroffenen Patienten betrug 3,0 Jahre (4 Monate – 6,3 Jahre). Klinische Diagnosen bei WUPyV-Infektionen umfassten ein breites Spektrum an oberen und unteren Luftwegserkrankungen. Bei 33 NRS (53,2 %) waren neben WUPyV zuvor ein oder zwei weitere respiratorische Viren durch PCR oder Immunfluoreszenz-Antigentest nachgewiesen worden (Adenovirus: 10; Influenza A: 10; humanes Bocavirus: 9; RSV: 5; Parainfluenzavirus 1/2/3: 3). Die Sequenzanalyse eines 647 bp langen Abschnitts der nicht kodierenden Region bei 50 WUPyV-positiven NRS zeigte eine Übereinstimmung der Sequenzen von 98,5 %.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen bisherige Ergebnisse zur Epidemiologie und Verbreitung des WUPyV. Demnach konnte WUPyV-DNA bei akuter respiratorischer Infektion im menschlichen Respirationsstrakt, bevorzugt bei Kleinkindern, detektiert werden. WUPyV wies eine hohe Koinfektionsrate mit anderen respiratorischen Viren auf. Es zeigte sich in der phylogenetischen Analyse zweier Genomabschnitte eine geringe Variabilität des Genoms. Bei bisheriger Datenlage bleibt unklar, ob der Nachweis von WU-

PyV-DNA in NRS mit einer akuten respiratorischen Erkrankung assoziiert werden kann.

6. Abkürzungsverzeichnis

ARE	Akute respiratorische Erkrankung
NRS	Nasenrachensekret
bp	Basenpaare
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
IFA	Immunfluoreszenztest für virale Antigene
IuL	Infekt der unteren Luftwege
IoL	Infekt der oberen Luftwege
RSV	Respiratory Syncytial Virus
hMPV	Humanes Metapneumovirus
CoV	Coronavirus
SARS	Severe acute respiratory syndrome
hBoV	Humanes Bocavirus
KIPyV	KI Polyomavirus
WUPyV	WU Polyomavirus
MCPyV	Merkelzellpolyomavirus
JCV	JC Polyomavirus
BKV	BK Polyomavirus
SV 40	SV 40 Polyomavirus
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
NCBI	National Center for Biotechnology Information

7. Literaturverzeichnis

- (1998). "Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMPact-RSV Study Group." *Pediatrics* 102(3 Pt 1): 531-7.
- Abed, Y., D. Wang, et al. (2007). "WU polyomavirus in children, Canada." *Emerg Infect Dis* 13(12): 1939-41.
- Abedi Kiasari, B., P. J. Vallely, et al. (2008). "Age-related pattern of KI and WU polyomavirus infection." *J Clin Virol* 43(1): 123-5.
- Agostini, H. T., C. F. Ryschkewitsch, et al. (1997). "Five complete genomes of JC virus type 3 from Africans and African Americans." *Arch Virol* 142(4): 637-55.
- Ahsan, N. and K. V. Shah (2006). "Polyomaviruses and human diseases." *Adv Exp Med Biol* 577: 1-18.
- Alexander, K. (1999). *Thiemes Innere Medizin [Elektronische Daten]* : TIM. Stuttgart, Georg Thieme.
- Allander, T., K. Andreasson, et al. (2007). "Identification of a third human polyomavirus." *J Virol* 81(8): 4130-6.
- Allander, T., M. T. Tammi, et al. (2005). "Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(36): 12891-6.
- Andersen, P. (1998). "Pathogenesis of lower respiratory tract infections due to Chlamydia, Mycoplasma, Legionella and viruses." *Thorax* 53(4): 302-7.
- Barzon, L., L. Squarzon, et al. (2009). "Human KI and WU polyomavirus infection in immunocompromised subjects." *J Clin Virol* 45(4): 370.
- Beadling, C. and M. K. Slifka (2004). "How do viral infections predispose patients to bacterial infections?" *Curr Opin Infect Dis* 17(3): 185-91.
- Bialasiewicz, S., R. Rockett, et al. "Whole-genome characterization and genotyping of global WU polyomavirus strains." *J Virol* 84(12): 6229-34.
- Bialasiewicz, S., D. M. Whiley, et al. (2008). "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.

- Bialasiewicz, S., D. M. Whiley, et al. (2009). "Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples." *J Clin Virol* 45(3): 249-54.
- Bialasiewicz, S., D. M. Whiley, et al. (2007). "A newly reported human polyomavirus, KI virus, is present in the respiratory tract of Australian children." *J Clin Virol* 40(1): 15-8.
- Brunstein, J. D., C. L. Cline, et al. (2008). "Evidence from multiplex molecular assays for complex multipathogen interactions in acute respiratory infections." *J Clin Microbiol* 46(1): 97-102.
- Calvo, C., M. L. Garcia-Garcia, et al. (2008). "Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain." *J Clin Virol* 42(3): 268-72.
- Dalianis, T., T. Ramqvist, et al. (2009). "KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: a new era for human polyomavirus research." *Semin Cancer Biol* 19(4): 270-5.
- Darai, G., M. Handermann, et al. (2009). *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen [Elektronische Daten] : Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Denny, F. W., Jr. (1995). "The clinical impact of human respiratory virus infections." *Am J Respir Crit Care Med* 152(4 Pt 2): S4-12.
- Doan, Q., P. Enarson, et al. (2009). "Rapid viral diagnosis for acute febrile respiratory illness in children in the Emergency Department." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD006452.
- Doerr, H. W. and T. Adrian (2010). *Medizinische Virologie*. Stuttgart, Thieme.
- Doerries, K. (2006). "Human polyomavirus JC and BK persistent infection." *Adv Exp Med Biol* 577: 102-16.
- Eddy, B. E., S. E. Stewart, et al. (1958). "Cytopathogenicity in tissue culture by a tumor virus from mice." *Proc Soc Exp Biol Med* 98(4): 848-51.
- Feng, H., M. Shuda, et al. (2008). "Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma." *Science* 319(5866): 1096-100.
- Flint, S. J. and American Society for Microbiology. (2009). *Principles of virology*. Washington, DC, ASM Press.

- Forster, J., G. Ihorst, et al. (2004). "Prospective population-based study of viral lower respiratory tract infections in children under 3 years of age (the PRI.DE study)." *Eur J Pediatr* 163(12): 709-16.
- Fouchier, R. A., T. Kuiken, et al. (2003). "Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus." *Nature* 423(6937): 240.
- Foulongne, V., N. Brieu, et al. (2008). "KI and WU polyomaviruses in children, France." *Emerg Infect Dis* 14(3): 523-5.
- Fredericks, D. N. and D. A. Relman (1996). "Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates." *Clin Microbiol Rev* 9(1): 18-33.
- Gardner, S. D., A. M. Field, et al. (1971). "New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation." *Lancet* 1(7712): 1253-7.
- Gaynor, A. M., M. D. Nissen, et al. (2007). "Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections." *PLoS Pathog* 3(5): e64.
- Gosert, R., C. H. Rinaldo, et al. (2008). "Polyomavirus BK with rearranged non-coding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology." *J Exp Med* 205(4): 841-52.
- Goudsmit, J., P. Wertheim-van Dillen, et al. (1982). "The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils." *J Med Virol* 10(2): 91-9.
- 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.
- Han, T. H., J. Y. Chung, et al. (2007). "WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea." *Emerg Infect Dis* 13(11): 1766-8.
- Herrmann, B., C. Larsson, et al. (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.
- Hof, H. and R. Dörries (2005). *Medizinische Mikrobiologie: nach neuer AO - mit den Fächern: Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, klinische Infektiologie, Hygiene*. Stuttgart, Thieme.

- Jensen, P. N. and E. O. Major (2001). "A classification scheme for human polyomavirus JCV variants based on the nucleotide sequence of the noncoding regulatory region." *J Neurovirol* 7(4): 280-7.
- Jiang, M., J. R. Abend, et al. (2009). "The role of polyomaviruses in human disease." *Virology* 384(2): 266-73.
- Kahn, J. S. (2006). "Epidemiology of human metapneumovirus." *Clin Microbiol Rev* 19(3): 546-57.
- Karalar, L., J. Lindner, et al. (2009). "Prevalence and clinical aspects of human bocavirus infection in children." *Clin Microbiol Infect.*
- Kean, J. M., S. Rao, et al. (2009). "Seroepidemiology of human polyomaviruses." *PLoS Pathog* 5(3): e1000363.
- Kleines, M., S. Scheithauer, et al. (2008). "Low to medium WU-virus titers in young children with lower respiratory tract infections." *Intervirology* 51(6): 444-6.
- Knowles, W. A. (2006). "Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV)." *Adv Exp Med Biol* 577: 19-45.
- Ksiazek, T. G., D. Erdman, et al. (2003). "A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome." *N Engl J Med* 348(20): 1953-66.
- Le, B. M., L. M. Demertzis, et al. (2007). "Clinical and epidemiologic characterization of WU polyomavirus infection, St. Louis, Missouri." *Emerg Infect Dis* 13(12): 1936-8.
- Lin, F., M. Zheng, et al. (2008). "WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, China." *J Clin Virol* 42(1): 94-102.
- Lindau, C., A. Tiveljung-Lindell, et al. (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.
- Modrow, S., D. Falke, et al. (2003). *Molekulare Virologie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Mourez, T., A. Bergeron, et al. (2009). "Polyomaviruses KI and WU in immunocompromised patients with respiratory disease." *Emerg Infect Dis* 15(1): 107-9.
- Mulholland, K. (2003). "Global burden of acute respiratory infections in children: implications for interventions." *Pediatr Pulmonol* 36(6): 469-74.

- Nair, H., D. J. Nokes, et al. "Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis." *Lancet* 375(9725): 1545-55.
- Neske, F., K. Blessing, et al. (2009). "Detection of WU polyomavirus DNA by real-time PCR in nasopharyngeal aspirates, serum, and stool samples." *J Clin Virol* 44(2): 115-8.
- Neske, F., K. Blessing, et al. (2007). "Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis." *J Clin Microbiol* 45(7): 2116-22.
- Nguyen, N. L., B. M. Le, et al. (2009). "Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses." *Emerg Infect Dis* 15(8): 1199-205.
- Norja, P., I. Ubillos, et al. (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., D. L. Walker, et al. (1971). "Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy." *Lancet* 1(7712): 1257-60.
- Payungporn, S., T. Chieochansin, et al. (2008). "Prevalence and molecular characterization of WU/KI polyomaviruses isolated from pediatric patients with respiratory disease in Thailand." *Virus Res* 135(2): 230-6.
- Principi, N., S. Bosis, et al. "Effects of coronavirus infections in children." *Emerg Infect Dis* 16(2): 183-8.
- Ratcliff, R. M., G. Chang, et al. (2007). "Molecular diagnosis of medical viruses." *Curr Issues Mol Biol* 9(2): 87-102.
- Reijans, M., G. Dingemans, et al. (2008). "RespiFinder: a new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses." *J Clin Microbiol* 46(4): 1232-40.
- Ren, L., R. Gonzalez, et al. (2008). "WU and KI polyomavirus present in the respiratory tract of children, but not in immunocompetent adults." *J Clin Virol* 43(3): 330-3.
- Ren, L., R. Gonzalez, et al. (2009). "WU polyomavirus in fecal specimens of children with acute gastroenteritis, China." *Emerg Infect Dis* 15(1): 134-5.

- Sharp, C. P., P. Norja, et al. (2009). "Reactivation and mutation of newly discovered WU, KI, and Merkel cell carcinoma polyomaviruses in immunosuppressed individuals." *J Infect Dis* 199(3): 398-404.
- Sloots, T. P., D. M. Whiley, et al. (2008). "Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases?" *J Clin Virol* 42(3): 233-43.
- Speer, C. P. and M. Gahr (2009). *Pädiatrie*. Berlin, Springer.
- Stewart, S. E., B. E. Eddy, et al. (1957). "Lymphocytic choriomeningitis virus as related to chemotherapy studies and to tumor induction in mice." *Ann N Y Acad Sci* 68(2): 419-29.
- Sundsford, A., A. R. Spein, et al. (1994). "Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients." *J Clin Microbiol* 32(5): 1390-4.
- Terletskaja-Ladwig, E., G. Enders, et al. (2005). "Defining the timing of respiratory syncytial virus (RSV) outbreaks: an epidemiological study." *BMC Infect Dis* 5: 20.
- Tregoning, J. S. and J. Schwarze "Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology." *Clin Microbiol Rev* 23(1): 74-98.
- Tucker, S. N., D. W. Tingley, et al. (2008). "Oral adenoviral-based vaccines: historical perspective and future opportunity." *Expert Rev Vaccines* 7(1): 25-31.
- van de Pol, A. C., T. F. Wolfs, et al. (2009). "Human bocavirus and KI/WU polyomaviruses in pediatric intensive care patients." *Emerg Infect Dis* 15(3): 454-7.
- van den Hoogen, B. G., J. C. de Jong, et al. (2001). "A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease." *Nat Med* 7(6): 719-24.
- van der Hoek, L., K. Pyrc, et al. (2006). "Human coronavirus NL63, a new respiratory virus." *FEMS Microbiol Rev* 30(5): 760-73.
- van der Hoek, L., K. Pyrc, et al. (2004). "Identification of a new human coronavirus." *Nat Med* 10(4): 368-73.

- van der Zalm, M. M., J. W. Rossen, et al. (2008). "Prevalence and pathogenicity of WU and KI polyomaviruses in children, the Netherlands." *Emerg Infect Dis* 14(11): 1787-9.
- Venter, M., A. Visser, et al. (2009). "Human polyomaviruses, WU and KI in HIV exposed children with acute lower respiratory tract infections in hospitals in South Africa." *J Clin Virol* 44(3): 230-4.
- Walsh, J. A. (1989). "Disease problems in the Third World." *Ann N Y Acad Sci* 569: 1-16.
- Wattier, R. L., M. Vazquez, et al. (2008). "Role of human polyomaviruses in respiratory tract disease in young children." *Emerg Infect Dis* 14(11): 1766-8.
- Weissbrich, B., F. Neske, et al. (2006). "Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections." *BMC Infect Dis* 6: 109.
- Williams, J. V., P. A. Harris, et al. (2004). "Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children." *N Engl J Med* 350(5): 443-50.
- Williams, J. V., C. K. Wang, et al. (2006). "The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience." *J Infect Dis* 193(3): 387-95.
- Wong, S. S. and K. Y. Yuen (2008). "Antiviral therapy for respiratory tract infections." *Respirology* 13(7): 950-71.
- Woo, P. C., S. K. Lau, et al. (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., Y. Jin, et al. (2008). "Prevalence of human KI and WU polyomaviruses in children with acute respiratory tract infection in China." *J Clin Microbiol* 46(10): 3522-5.
- Zhao, L., Y. Qian, et al. (2009). "Identification of WU polyomavirus from pediatric patients with acute respiratory infections in Beijing, China." *Arch Virol*.
- Zhuang, W. L., X. D. Lu, et al. (2011). "WU polyomavirus infection among children in South China." *J Med Virol* 83(8): 1440-5.

Tabellen und Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildungen:</u>	<u>Seite</u>
Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum tier- und humanpathogener Polyomaviridae auf Basis der Aminosäuresequenzen des großen T-Antigens	7
Abbildung 2: Schema der drei funktionellen Genomregionen des WUPyV	11
Abbildung 3: Foto der Gelelektrophorese einer WUPyV-PCR	25
Abbildung 4: Verteilung der WUPyV-positiven NRS in Korrelation zu der Gesamtzahl aller NRS	26
Abbildung 5: Monatliche Verteilung WUPyV-positiver im Vergleich zu allen NRS	27
Abbildung 6: Altersverteilung in Prozent der WUPyV-positiven NRS im Vergleich zu allen untersuchten NRS	29
Abbildung 7: Phylogenetischer Stammbaum einer Sequenz der nicht kodierenden Region	36
Abbildung 8: Altersverteilung der Patienten mit WUPyV-positiven NRS in absoluten Zahlen, Vergleich von Cluster I und II	37
 <u>Tabellen:</u>	
Tabelle 1: Auflistung verwendeter Primer für WUPyV-PCR und Sequenzierung	17
Tabelle 2: Reaktionsansatz WUPyV-PCR großes T-Antigen	18
Tabelle 3: Reaktionsansatz WUPyV-PCR nicht kodierende Region	19
Tabelle 4: Ansatz der Sequenzierreaktion mit 5 µl Endvolumen	21
Tabelle 5: Ergebnisse der qualitativen PCR einer Verdünnungsreihe des WUPyV-Plasmids zur Ermittlung der minimalen Nachweisgrenze	23
Tabelle 6: Saisonale Verteilung aller NRS im Vergleich zu WUPyV-positiven Proben	28
Tabelle 7 a: Ergebnisse von IFA-Screening und hBoV-PCR	30
Tabelle 7 b: Mehrfachinfektionen bei WUPyV-positiven NRS	31
Tabelle 8: Klinische Diagnose bei Entlassung nach stationärem Aufenthalt in der Universitätskinderklinik Würzburg	32
Tabelle 9: Alter, ARE und Grunderkrankung von Patienten bei Infektion mit WUPyV	33
Tabelle 9 a: Anzahl der Patienten mit einer ARE und einer Grunderkrankung in Verbindung mit einer WUPyV-Infektion, Vierfeldertafel zur Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Chi-Quadrat Test	34
Tabelle 10: Aufteilung in Cluster I und II nach phylogenetischer Analyse der nicht kodierenden Region	35
Tabelle 11: Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	40

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die auf dem Weg und bei der Erstellung dieser Arbeit beteiligt waren.

Während der Arbeit im Labor der Virusdiagnostik im Institut für Virologie und Immunbiologie ist mir das ganze Team in guter Erinnerung geblieben durch eine durchweg nette Atmosphäre und gute Zusammenarbeit. So habe ich unter anderem die tatkräftige Unterstützung der Technischen Assistentinnen, die fachliche Einweisung und deren praktische Umsetzung sehr geschätzt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Benedikt Weißbrich und Florian Neske für eine intensive und kompetente Betreuung über die ganze Zeit sowie viele hilfreiche Anregungen und Ideen bis hin zu ihrer Geduld beim Korrekturlesen.

Weiterhin danke ich Kerstin Blessing für den Kontakt zur Universitätskinderklinik und die Anleitung bei der Auswertung der klinischen Daten.

Ein weiterer großer Dank gilt allen Mitstreitern insbesondere Anika Pröttel, Daniel Schneiderbanger, Friederike Ruf, Maria Thomas sowie den wissenschaftlichen Mitarbeitern Ulla Herre, Jörg Schubert und Moritz Ewald.

Danken möchte ich Prof. Dr. A. Rethwilm als Leiter des Instituts für Virologie und Immunbiologie für die Bereitstellung des Themas sowie die Übernahme des Referats.

Für die unermüdliche Motivation und humorvoll-ermunternde Begleitung danke ich meinen Geschwistern und Eltern von ganzem Herzen. Auch meine Großeltern waren stets treue Vertraute und Berater mit reichlich Lebenserfahrung, die hier zuletzt zu nennen sind.