

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Lars Dölken

EVALUIERUNG DES RESPLEX-TESTSYSTEMS ZUM NACHWEIS DES
RESPIRATORISCHEN SYNZYTIALVIRUS UND VON ADENOVIREN BEI
KINDERN MIT AKUTEN RESPIRATORISCHEN ERKRANKUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Christine Hampel
aus Königsberg in Bayern

Würzburg, September 2015



Referent: Professor Dr. med. Michael Klein

Korreferent: Priv.- Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Christoph U. Schoen

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2016

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Bedeutung respiratorischer Virusinfektionen im Kindesalter.....	1
1.2	Adenoviren	2
1.2.1	Aufbau und Klassifikation der ADV.....	2
1.2.2	Übertragungswege und Erkrankungsspektrum von ADV-Infektionen..	5
1.2.3	Epidemiologie und Bedeutung der Typisierung von ADV	6
1.2.4	ADV-Nachweismethoden der Routinediagnostik	9
1.2.5	Methoden zur Typisierung von ADV	9
1.3	Respiratorisches Synzytialvirus	11
1.3.1	Aufbau und Klassifikation des RSV	11
1.3.2	Übertragungswege und Erkrankungsspektrum von RSV-Infektionen	13
1.3.3	Epidemiologie und Bedeutung der Typisierung von RSV	15
1.3.4	RSV-Nachweismethoden in der Routinediagnostik	17
1.3.5	Methoden zur Typisierung von RSV	18
1.4	Multiplex-Nachweise von respiratorischen Viren	18
1.4.1	Methoden zum Multiplex-Nachweis	19
1.4.2	Prinzip von Resplex.....	20
1.4.3	Evaluation von Multiplex-PCRs	22
1.5	Fragestellung.....	25
1.5.1	Evaluierung des Resplex-Testsystems.....	25
1.5.2	Erhebung der epidemiologischen Typenverteilung von ADV und RSV.....	26
2	Material und Methoden	28
2.1	Patientenproben	28
2.1.1	ADV-Proben	28
2.1.2	RSV-Proben	30
2.2	ADV-Typisierung	30
2.2.1	Strategie	30
2.2.2	Extraktion.....	31
2.2.3	PCR.....	32
2.2.4	Sequenzierung	34
2.2.5	Sequenzauswertung.....	35
2.3	RSV-Typisierung	36
2.3.1	Strategie	36
2.3.2	Extraktion.....	37
2.3.3	PCR.....	37
2.3.4	Sequenzierung	38
2.3.5	Sequenzauswertung.....	38
2.4	Statistische Auswertung	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	ADV	40
3.1.1	Vergleich des ADV-Nachweises mittels IFT und Resplex I Panel	40
3.1.2	Vergleich des ADV-Nachweises mittels IFT und Sequenzierung	40
3.1.3	Prävalenz der Typen	44

3.1.4	Vergleich des ADV-Nachweises mittels Resplex I Panel und Sequenzierung	45
3.1.5	Untersuchung von Ringversuchsproben mittels Resplex	45
3.1.6	Epidemiologische Hintergrundinformation	47
3.1.6.1	Verteilung des Spezies im Jahresverlauf.....	47
3.1.6.2	Patientenkollektiv und Prävalenz der Typen in unterschiedlichem Patientenalter	48
3.1.6.3	Monatliche Verteilung der ADV-Typen im Patientenkollektiv.....	51
3.1.6.4	Klinische Manifestation der Typen.....	52
3.2	RSV	53
3.2.1	Vergleich des RSV-Nachweises mittels IFT und Resplex II Panel	53
3.2.2	Vergleich des RSV-Nachweises mittels IFT und Sequenzierung	56
3.2.3	Prävalenz der Typen	56
3.2.4	Vergleich des RSV-Nachweises mittels Resplex II Panel und Sequenzierung bzw. IFT	58
3.2.5	Epidemiologische Hintergrundinformation	61
3.2.5.1	Patientenkollektiv.....	61
3.2.5.2	Monatliche Verteilung der RSV-Subtypen im Patientenkollektiv.....	62
3.2.5.3	Prävalenz der Subtypen in unterschiedlichem Patientenalter.....	63
3.2.5.4	Klinische Manifestation der Subtypen.....	63
4	Diskussion	65
4.1	Beurteilung der Anwendbarkeit des Resplex I Panels für ADV im vorliegenden Kollektiv.....	66
4.2	Beurteilung der Anwendbarkeit des Resplex II Panels für RSV im vorliegenden Kollektiv.....	68
4.3	ADV-Epidemiologie	72
4.4	RSV-Epidemiologie	76
4.5	Limitierungen der Studie.....	79
4.6	Ausblick	80
5	Zusammenfassung.....	83
6	Abkürzungsverzeichnis.....	85
7	Abbildungsverzeichnis.....	87
8	Tabellenverzeichnis.....	88
9	Literaturverzeichnis	89

1 Einleitung

1.1 Bedeutung respiratorischer Virusinfektionen im Kindesalter

Atemwegsinfektionen treten im Kindesalter ausgesprochen häufig auf. Gerade Kinder unter fünf Jahren erkranken im Verlauf eines Jahres mehrfach daran (Kusel *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2007), wobei sie insbesondere während der ersten zwölf Lebensmonate betroffen sind (Ostroff, 2000). Das Spektrum der klinischen Manifestationsformen ist dabei breit. Atemwegsinfektionen können als banale Rhinitis auftreten, sind im Kindesalter aber auch die häufigste infektiöse Todesursache (Bryce *et al.*, 2005; Ostroff, 2000). Üblicherweise erfolgt die Einteilung anhand der Glottis als trennende anatomische Struktur in Infektionen des oberen und unteren Respirationstrakts (ORTI bzw. URTI). Zu den ORTI zählen Rhinitis, Sinusitis, Pharyngitis, Tonsillitis, Laryngitis. Subglottisch im unteren Respirationstrakt sind Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie lokalisiert.

Die häufigsten Erreger von Atemwegsinfektionen im Kindesalter sind Viren. Diese sogenannten „respiratorischen“ Viren umfassen unter anderem das humane respiratorische Synzytialvirus (RSV), Influenza-A- und Influenza-B-Viren, Parainfluenzaviren, Adenoviren (ADV), Rhino- und Enteroviren, Coronaviren, das humane Metapneumovirus und das humane Bocavirus (Mahony *et al.*, 2011; Schmitt-Grohé, 2011; Weigl *et al.*, 2003).

Im Rahmen der Evaluierung des Resplex-Testsystems der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) zum Multiplex-Nachweis respiratorischer Viren war eine Untererfassung von ADV und RSV durch das Resplex-Testsystem beobachtet worden. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Ursache für diese Untererfassung abzuklären. Dies beinhaltete die Typisierung von ADV und RSV sowie die Erhebung von epidemiologischen Daten zu Infektionen mit diesen Erregern.

Im Folgenden werden zunächst die ADV und RSV, anschließend das Resplex-Testsystem genauer beschrieben.

1.2 Adenoviren

1.2.1 Aufbau und Klassifikation der ADV

ADV wurden im Jahre 1953 erstmalig aus adenoidem Gewebe isoliert (Rowe *et al.*, 1953) und ein Jahr später erneut bei Rekruten mit akuten respiratorischen Infektionen nachgewiesen (Hilleman and Werner, 1954; Huebner *et al.*, 1954). Im Laufe der Jahre wurden mehr als 50 verschiedene ADV aus unterschiedlichen humanen Geweben, Sekreten des Respirationstrakts, Tränenflüssigkeit und Stuhlproben angezüchtet. Die humanen ADV gehören zur Familie der *Adenoviridae*, innerhalb der sie dem Genus der Mastadenoviren (siehe **Abbildung 1**) zugeordnet sind (Cherry, 2004b; Modrow, 2003a).

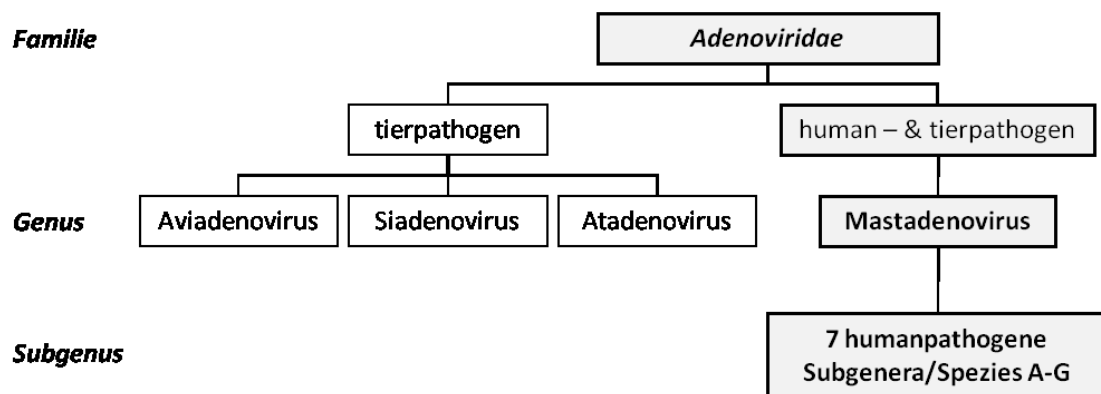


Abbildung 1, Einteilung der *Adenoviridae*

Sie messen etwa 70 - 90 nm im Durchmesser (Berk, 2007; Robinson and Echavarría, 2007). Ihr Genom besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA, die von einer Proteinhülle, dem Kapsid, umgeben wird. Dieses ist aus 252 Baueinheiten, sogenannten Kapsomeren, aufgebaut, welche eine ikosaedrische Struktur schaffen (siehe **Abbildung 2**). 240 Kapsomere, die Hexone, dienen als sechseckige Bausteine der Seitenflächen. Die von nur fünf Nachbarbausteinen umgebenen Eckpunkte des Ikosaeders heißen Pentone. An den 12 Pentonen sind stäbchenförmige Fiberproteine befestigt, deren Enden zu

knöpfchenförmigen Strukturen aufgetrieben sind (Baum, 2000; Cherry, 2004b; Modrow, 2003a; Robinson and Echavarría, 2007). Die Viren besitzen keine Lipidhülle, was sie besonders umweltresistent macht (Cherry, 2004b; Dermody and Tyler, 2000).

Die oberflächlichen Strukturproteine weisen unterschiedliche Morphologie und Antigenität auf. Hexone besitzen antigenische Komponenten, die allen humanen ADV gemein sind. Diese macht man sich in Screening-Tests, wie dem Immunfluoreszenztest (IFT), zu Nutze (Wold and Horwitz, 2007). In den hypervariablen Regionen der Hexone sind außerdem typenspezifische Antigene lokalisiert. Da gegen diese Antigene neutralisierende Antikörper gebildet werden, legen sie den Serotyp fest. Sie sind außer für die humorale auch ein wichtiger Angriffspunkt für die zelluläre Immunantwort (Baum, 2000; Robinson and Echavarría, 2007; Russell, 2009).

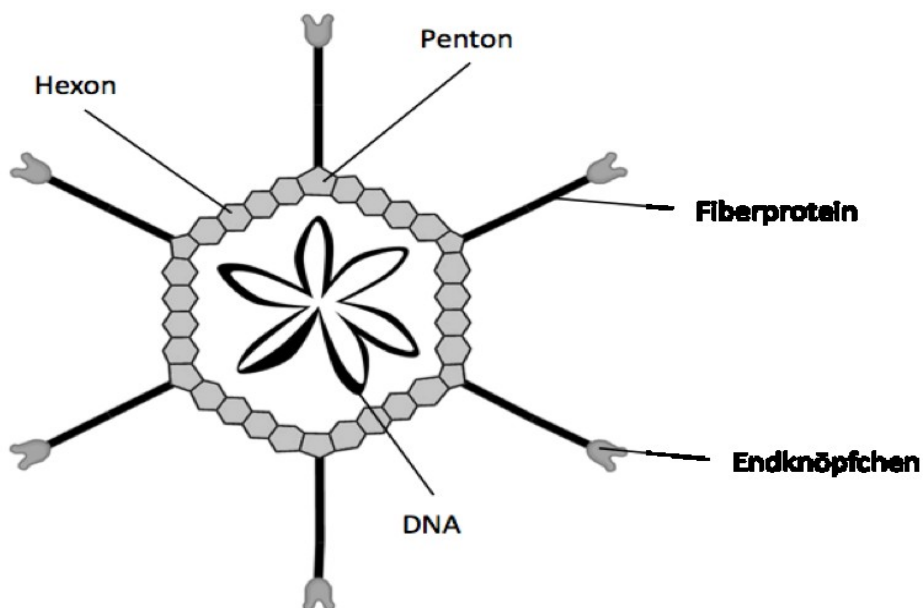


Abbildung 2, Hauptstrukturkomponenten eines ADV – Modifiziert nach Glasgow *et al.* (Glasgow *et al.*, 2006)

Die meisten Epitope, gegen die sich neutralisierende Antikörper richten, befinden sich im Fiberprotein (Baum, 2000). Diese typenspezifischen Antikörper

richten sich dort vor allem gegen die knöpfchenförmigen Auftreibungen (Modrow, 2003a). Der Aufbau des Fiberproteins ist entscheidend für den Gewebetropismus und dementsprechend für die mit dem Virus assoziierten Krankheitsbilder (Russell, 2009).

Spezies	Typen	Zielorgan
A	ADV 12, 18, 31	Gastrointestinaltrakt
B1	ADV 3, 7, 16, 21, 50	Respirationstrakt
B2	ADV 11, 14, 34, 35	Urogenitaltrakt
C	ADV 1, 2, 5, 6	Respirationstrakt
D	ADV 8 - 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 - 30, 32, 33, 36 - 39, 42 - 49, 51, 53, 54, 55, 56	Auge
E	ADV 4	Respirationstrakt
F	ADV 40, 41	Gastrointestinaltrakt
G	ADV 52	Gastrointestinaltrakt

Tabelle 1, Die verschiedenen ADV-Spezies und deren bevorzugter Gewebetropismus modifiziert nach Jones *et al.*, Liesbeth Lenaerts *et al.*, Walsh *et al.* (Jones *et al.*, 2007; Liesbeth Lenaerts, 2008; Robinson *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2010)

Eben dieser Antigenität der Oberflächenproteine bediente man sich ursprünglich bei der Einteilung der ADV in Untergruppen. Sie basierte auf der Neutralisierung der Oberflächenproteine durch spezifische Antiseren (Cherry, 2004b). Derzeit sind über 50 humanpathogene Serotypen bekannt (Jones *et al.*, 2007; Russell, 2009; Walsh *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2010; Wold and Horwitz, 2007). Diese kann man in 7 Subgruppen oder Spezies von A bis G einteilen, wobei Typ B sich weiter in B1 und B2 unterscheiden lässt (siehe **Tabelle 1**).

Diese Serotypisierung wiederum erfolgte ursprünglich nach der Eigenschaft Erythrozyten von Mensch bzw. von Maus und Affe zu agglutinieren (Wold and Horwitz, 2007). Das morphologische Korrelat für diese Unterscheidung nach Hämagglutination stellt die knöpfchenförmige Struktur an der Spitze des

Fiberproteins dar, die innerhalb einer Spezies ähnlich ist (Russell, 2009; Wold and Horwitz, 2007). In den letzten Jahren werden vermehrt Eigenschaften wie die Homologie der DNA-Sequenz und deren Gehalt an Guanin- und Cytosin-Bausteinen zur Subgruppierung verwendet, weshalb die ursprüngliche Bezeichnung „Serotyp“ besser durch „Typ“ ersetzt werden sollte (Louie *et al.*, 2008; Walsh *et al.*, 2010).

1.2.2 Übertragungswege und Erkrankungsspektrum von ADV-Infektionen

Das breite Spektrum der ADV verursacht eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsbilder, allen voran Atemwegsinfekte, sowie Infektionen des Gastrointestinaltraktes, der Horn- und Bindehaut des Auges (Cherry, 2004b; Modrow, 2003a; Robinson and Echavarria, 2007; Wold and Horwitz, 2007). Bei Immunsupprimierten können sie zu systemischen Infektionen führen (Echavarria, 2008).

In Abhängigkeit vom ADV-Typ erfolgt die Übertragung durch Tröpfchen- oder Schmierinfektionen (Modrow, 2003a; Russell *et al.*, 2006a). Für eine Infektion scheint enger Kontakt eine notwendige Voraussetzung zu sein (Cherry, 2004b). Bei respiratorischen ADV-Infekten steht die Tröpfcheninfektion im Vordergrund. Erleichtert wird die Verbreitung der ADV durch die hohe Viruslast im Atemsekret ($10^6 - 10^7$ /ml). Schon die Inhalation von fünf Viruspartikeln ermöglicht die Infektion ungeschützter Individuen (Musher, 2003).

Nach einer ADV-Infektion bleibt eine Immunität, die zwar lange andauert, jedoch virustypspezifisch ist. Dabei ist eine Persistenz der Viren in den Tonsillen mit wiederkehrender Virusausscheidung häufig (Modrow, 2003a). Die bei respiratorischen Infekten von Kleinkindern häufig vorkommenden ADV 1, 2, 5 und 6 können gerade im Stuhl über Monate ausgeschieden werden und so möglicherweise zur endemischen Verbreitung über den fäkal-oralen Weg führen (Berk, 2007; Wold and Horwitz, 2007).

Mindestens die Hälfte aller ADV-Infektionen verläuft unbemerkt (Baum, 2000; Modrow, 2003a; Robinson and Echavarria, 2007; Wold and Horwitz, 2007).

Wenn respiratorische ADV-Infekte symptomatisch werden, gehen sie üblicherweise mit Fieber und häufig mit einer Pharyngitis einher. So ist die fieberhafte Pharyngitis im Kindesalter die insgesamt häufigste klinische ADV-Manifestation (Cherry, 2004b).

Das pharyngokonjunktivale Fieber hat große Bedeutung bei Epidemien in Gemeinschaftseinrichtungen (Cherry, 2004b). Am häufigsten beschrieben wurde es im Zusammenhang mit ADV 1, 2, 3, 5 und 7. Es geht neben Pharyngitis und Temperaturen bis 38°C mit Rhinitis, zervikaler Lymphadenopathie und Konjunktivitis einher (Baum, 2000).

Neben der Erkältungssymptomatik kommen bei Infektionen des Respirationstraktes durch ADV häufig Durchfall und Erbrechen hinzu (Modrow, 2003a). Die respiratorischen Beschwerden dauern gewöhnlich bis zu einer Woche, wobei vor allem Infektionen mit ADV 3, 4, 7, 21 in die tiefen Atemwege absteigen können (Baum, 2000; Modrow, 2003a; Robinson and Echavarria, 2007). Schwere Verläufe sind bei Kindern unter zwei Jahren häufiger als bei Erwachsenen (Modrow, 2003a; Robinson and Echavarria, 2007). In den ersten beiden Lebensjahren sind Bronchitiden häufig mit ADV assoziiert (Chapman *et al.*, 1981; Cherry, 2004a). Auch für Bronchiolitiden von Säuglingen können sie verantwortlich sein (Bordley *et al.*, 2004; Cherry, 2004b; Hall and McBride, 2000; Mansbach *et al.*, 2008; Welliver 2004). ADV-assoziierte Pneumonien sind selten, dennoch wurden schwerwiegende Fälle sowohl beim Kind als auch beim Erwachsenen beschrieben (Boyer, 2004; CDC, 2007b; Cherry, 2004b; Hall, 2004).

1.2.3 Epidemiologie und Bedeutung der Typisierung von ADV

Die meisten epidemiologischen Daten stammen aus den USA und sind aufgrund geografischer Prävalenzunterschiede nur bedingt auf Deutschland übertragbar. In den USA wurden landesweit von 2004 bis 2006 mehr als 2000 ADV-positiver Proben typisiert und vor ihrem klinischen Hintergrund analysiert (Gray *et al.*, 2007).

Unterschiedliche ADV-Spezies sind in der Regel mit bestimmten Krankheitsbildern assoziiert (Cherry, 2004b; Modrow, 2003a; Russell, 2009; Wold and Horwitz, 2007). Auch wenn ein bestimmter Typ nicht zwingend nur zu einem bestimmten Krankheitsbild führt, finden sich auch im Kindesalter generelle Assoziationen von Subgruppen mit Krankheitsbildern (vergleiche **Tabelle 2**).

Klinische Manifestation	Häufig assoziierte Typen	Altersgruppe
Akute fieberhafte Pharyngitis (ORTI)	1 - 3, 5 - 7	Kleinkinder, junge Kinder
Pharyngokonjunktivales Fieber (ORTI)	3, 7, 14	Schulkinder
Pneumonie (URTI)	1 - 3, 7	Kleinkinder, junge Kinder
Epidemische Keratokonjunktivitis	8, 11, 19, 37	Alle Altersgruppen
Gastroenteritis	40, 41	Kinder

Tabelle 2, Klinische Manifestationsformen und häufig assoziierte ADV modifiziert nach Wold und Horwitz (Wold and Horwitz, 2007)

Mehrere Studien dokumentierten eine Korrelation zwischen einer typischen klinischen Manifestation und einem bestimmten Typ (Erdman *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2005; McCarthy *et al.*, 2009). Die Typisierung zeigte mehrfach die Assoziation neuer genotypischer Varianten mit schwereren Ausbrüchen und Krankheitsverläufen (Erdman *et al.*, 2002; Gray, 2006; Gray *et al.*, 2005; Landry *et al.*, 2009; Louie *et al.*, 2008)

Beispielsweise waren in einem epidemiologisch gut auf fieberhafte Atemwegsinfekte überwachtem Kollektiv, dem US-Militär, jahrelang bis zu 95% der ADV-Infektionen durch ADV 4 verursacht worden. Im Jahr 2005 fiel erstmalig ein verstärktes Auftreten von ADV 14 auf (Gray and Chorazy, 2009; Metzgar *et al.*, 2007). Zwei Jahre später dominierte dieser Typ mit 78% einen

langandauernden Ausbruch schwerer respiratorischer Infektionen unter Rekruten, bei dem eine 19jährige verstarb (Tate *et al.*, 2009). Dieses zur Subspezies B2 gehörende Virus war bis dahin nur selten im Zusammenhang mit respiratorischen Infekten (Binn *et al.*, 2007; Metzgar *et al.*, 2007), sondern vielmehr bei Nieren- und Harnwegsinfektionen beschrieben worden (Liesbeth Lenaerts, 2008). Es verbreitete sich über mehrere Bundesstaaten, auch in der Zivilbevölkerung. Nur in Kenntnis der Ausgangslage konnte durch Typisierung der Inzidenzanstieg des Typ 14 rasch bemerkt und eine neue Variante des Virus, 14a, identifiziert werden. Wenn auch die Mehrzahl der Infektionen nicht zu schwerwiegenden Erkrankungen führte, kann ADV 14a, häufiger als andere Typen, schwere, gelegentlich fatale respiratorische Infekte verursachen (CDC, 2007b; Gray and Chorazy, 2009; Lewis *et al.*, 2009; Tate *et al.*, 2009). Neben dem Auftreten bei Rekruten, wurden auch bei Kindern schwerwiegende Fälle in Assoziation mit ADV 14a beschrieben (CDC, 2007b).

In Europa gibt es keine derartigen Studien und deswegen weitaus weniger Kenntnis über die örtliche und zeitliche Verteilung von ADV-Typen. Für die Gemeinschaft ist es wichtig die regionale Verbreitung der ADV-Typen, ihre assoziierte Klinik, ihre epidemischen Häufungen und ihren Wandel über die Zeit zu kennen. Nur wenn die epidemiologische Ausgangssituation bekannt ist, kann schnell das Auftreten neuer Typen erkannt und eingeordnet werden (Jones *et al.*, 2007; Landry *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2009).

Die Kenntnis der Typenverteilung ist auch von klinischer Relevanz, weil sie die Grundlage gezielter therapeutischer und prophylaktischer Interventionen darstellt. Derzeit mangelt es an einer kausalen Therapie gegen ADV-Infektionen. Es ist wichtig zu wissen, welcher Typ besonders schwerwiegende Krankheitsverläufe verursacht oder besonders häufig auftritt und somit klinisch bedeutsam ist, um gezielt sinnvolle virostatistische Therapien oder Impfungen entwickeln zu können.

Von 1971 bis 1999 stand für US-Militärrekruten eine erfolgreiche Schluckimpfung gegen zwei ADV-Typen zur Verfügung. Da nach Sistieren der Produktion eine deutliche Zunahme an ADV-assozierten Erkrankungen

verzeichnet wurde, wurde 2011 die Impfung wieder eingeführt (FDA, 2011; Russell *et al.*, 2006b). Um die Zielgruppe dieser Vakzine gegebenenfalls sinnvoll auf Gruppen ziviler Bevölkerung zu erweitern, bzw. für diese eine Impfung gegen andere Typen entwickeln zu können, sind konkrete epidemiologische Daten zur Typenverteilung notwendig.

1.2.4 ADV-Nachweismethoden der Routinediagnostik

Anhand ihrer klinischen Manifestation können durch unterschiedliche Erreger hervorgerufene Atemwegsinfekte nicht sicher differenziert werden. Nur im Labor ist eine eindeutige Diagnosestellung möglich. Gerade wegen der Vielzahl der respiratorischen Erreger stellt die Entwicklung eines sensitiven und umfassenden Screeningtests, welcher für die Routinediagnostik praktikabel ist, eine große Herausforderung dar.

Als Nachweis von ADV in respiratorischen Proben ist die Detektion ihrer Oberflächenantigene mittels immunchromatografischem Schnelltest, „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) oder IFT weit verbreitet, da sie einen einfachen, kostengünstigen Nachweis ermöglicht (Robinson and Echavarria, 2007). Allerdings sind Antigennachweise gerade für ADV vergleichsweise insensitive (Fox, 2007; Mahony, 2008; Mahony *et al.*, 2011).

Deswegen finden in den letzten Jahren in der Routinediagnostik zunehmend sensitivere Polymerase-Kettenreaktion-Verfahren (PCR) Anwendung, deren Primer sich zumeist gegen konservierte Regionen des Hexongens richten (Fox, 2007; Mahony, 2008). Singleplex PCRs, welche Material auf nur einen einzelnen Erreger untersuchen, sind für ADV die derzeit sensitivste Nachweismethode (Mahony, 2008).

1.2.5 Methoden zur Typisierung von ADV

Es stehen Antigen-Nachweise und PCR-Methoden zu Verfügung, die das breite Spektrum der ADV erkennen, jedoch keine Differenzierung aller Typen

ermöglichen (Heim *et al.*, 2003; Mahony, 2008). In den wenigsten Routinelaboratorien werden ADV-positive Patientenproben standardmäßig typisiert (Wold and Horwitz, 2007). Es gibt Multiplex-PCRs, welche versuchen nicht nur das breite Spektrum der ADV-Typen zu erkennen, sondern einzelne ADV-Spezies zu differenzieren (Brunstein and Thomas, 2006; Kim *et al.*, 2009; Mahony *et al.*, 2007; Nolte *et al.*, 2007). Durch diese könnte sich die Möglichkeit ergeben die Typisierung durch die PCR irgendwann der Routinediagnostik zugänglich zu machen.

Der ursprüngliche Goldstandard der Serotypisierung von ADV beruht auf dem Virus-Neutralisationsassay (Cherry, 2004b). Als Voraussetzung hierfür benötigt man ein Virusisolat, also zuerst eine Anzucht des Virus in Zellkultur, sowie verfügbare Antikörper gegen alle bekannten Serotypen. Schon die Kultur kann mit mehreren Tagen bis Wochen viel Zeit in Anspruch nehmen (Robinson and Echavarria, 2007), und gerade die Identifizierung neuer ADV mittels Neutralisationsassay ist ausgesprochen aufwändig, da mehr als 100 Reaktionen zur exakten Einteilung notwendig sind (De Jong *et al.*, 2008).

Aufgrund dieser Nachteile der klassischen Serotypisierung wurden in den letzten Jahren schnellere, molekulare Typisierungsmethoden etabliert (Adhikary *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Lu and Erdman, 2006; Madisch *et al.*, 2005; Madisch *et al.*, 2006; McCarthy *et al.*, 2009; Sarantis *et al.*, 2004; Xu and Erdman, 2001). Die Serologie ist nicht mehr länger alleine ausschlaggebend für die ADV-Klassifikation (De Jong *et al.*, 2008). Molekulare Methoden sind zeitsparend, denn sie können auch ohne vorherige kulturelle Anreicherung der Viren angewendet werden und verzichten auf Antiseren (Robinson and Echavarria, 2007). Eine erfolgreiche molekulare Typisierungsmöglichkeit ist die Ermittlung genetischer Unterschiede mittels Sequenzierung und Zuordnung der Sequenzen zu einem Stammbaum oder deren Vergleich mit bekannten Sequenzen einer Datenbank (Lu and Erdman, 2006; Madisch *et al.*, 2005; Madisch *et al.*, 2006; McCarthy *et al.*, 2009; Sarantis *et al.*, 2004).

Gerade für die Vielzahl der ADV stellt die Etablierung einer Methode, welche die Identifizierung der über 50 Typen ermöglicht, eine Herausforderung dar.

Madisch *et al.* gelang es, eine erfolgreiche Methode zu entwickeln (Madisch *et al.*, 2005; Madisch *et al.*, 2006). Dabei werden die ADV-Proben zur Speziesidentifikation zuerst mittels einer generischen Typisierungs-PCR sequenziert. Für die beiden Spezies B und D, denen jeweils eine Vielzahl von Typen zugeordnet wird, kann die endgültige Typisierung nach einer zweiten speziesspezifischen-PCR erfolgen (**siehe 2.2.1**). Die Identifikation der Typen erfolgt bei dieser Methode durch den Vergleich der Patientenproben-Sequenzen mit bekannten Sequenzen der Genbank (National Center for Biotechnology Information, 2008).

Weitere Methoden zur Typisierung auf Basis von Restriktionsenzymanalysen wurden publiziert (Lu and Erdman, 2006; McCarthy *et al.*, 2009; Sarantis *et al.*, 2004).

1.3 Respiratorisches Synzytialvirus

1.3.1 Aufbau und Klassifikation des RSV

Das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) wurde erstmalig im Jahre 1956 aus Schimpansen isoliert und dann ein Jahr später bei Kindern mit schwerer Erkrankung der tiefen Atemwege detektiert (Blount *et al.*, 1956; Chanock and Finberg, 1957).

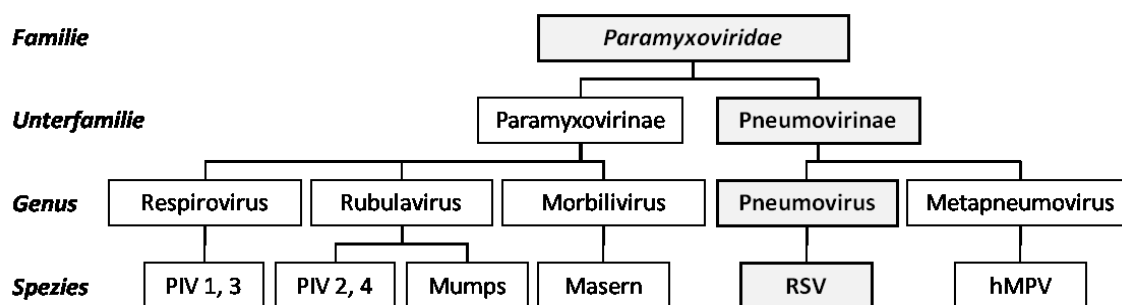


Abbildung 3, Einteilung der *Paramyxoviridae*

Es gehört zur Familie der *Paramyxoviridae* und wird zusammen mit dem Metapneumovirus der Unterfamilie der Pneumovirinae zugeordnet (siehe **Abbildung 3**). Die zweite Unterfamilie sind die Paramyxovirinae, welcher Masern, Mumps und Parainfluenzaviren angehören (Collins and Crowe, 2007; Modrow, 2003b).

RSV misst etwa 120 - 300 nm im Durchmesser (Hall and McCarthy, 2000). Sein Genom besteht aus einzelsträngiger, nicht segmentierter, negativ orientierter RNA, welche im Komplex mit den N-, P-, und L-Proteinen ein helikales Nukleokapsid bildet (siehe **Abbildung 4**) (Hall and McCarthy, 2000; Tang and Crowe, 2007). Dieses wird von einer doppelschichtigen Lipid-Hülle, einem Fragment aus der Plasmamembran der Wirtszelle, umgeben. Ihre Innenseite wird vom nicht-glykosylierten M-Protein ausgekleidet, welches die Morphogenese mit beeinflusst (Collins and Crowe, 2007; Modrow, 2003b). In die Lipiddoppelschicht sind die drei Oberflächenglykoproteine SH, G und F eingelagert (Collins and Crowe, 2007).

Die Funktion des „small hydrophobic“ (SH)-Proteins ist noch unklar. Die beiden anderen transmembranen Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese (Collins and Crowe, 2007; Hall, 2004; Hall and McCarthy, 2000): Glykoprotein G vermittelt die Anheftung an Wirtszellen und Glykoprotein F initiiert die Infektion der respiratorischen Epithelzelle durch Fusion von Virus- und Wirtszellenmembran (Collins and Crowe, 2007; Hall and McCarthy, 2000; Modrow, 2003b). Im weiteren Infektionszyklus bewirkt Glykoprotein F die Verschmelzung bereits infizierter Zellen mit gesunden Nachbarzellen. Dies ermöglicht eine Infektionsausbreitung per continuitatem durch die Verschmelzung von Epithelzellen zu Synzytien, welche dem Virus seinen Namen gaben (Collins and Crowe, 2007; Hall and McCarthy, 2000).

Es existiert nur ein RSV-Serotyp, der aufgrund von Unterschieden im Oberflächen-Glykoprotein G in die zwei antigenischen Untergruppen RSV A und RSV B eingeteilt wird (Collins and Crowe, 2007; Hall, 2004; Hall and McCarthy, 2000; Modrow, 2003b). Diese beiden sogenannten Subtypen lassen sich durch monoklonale Antikörper voneinander unterscheiden (Mufson *et al.*,

1985) und jeweils in weitere Genotypen unterteilen (Hall and McCarthy, 2000; Peret *et al.*, 1998). Die deutlichen Unterschiede von RSV A und RSV B in antigenischen und genetischen Eigenschaften deuten darauf hin, dass es sich bei diesen beiden Subtypen nicht nur um zwei Varianten mit wenigen abweichenden Eigenschaften, sondern um zwei phylogenetische Stämme handelt, die sich seit geraumer Zeit getrennt voneinander entwickelt haben (Collins and Crowe, 2007; Mufson *et al.*, 1985; Sullender, 2000). Die größten genetischen Unterschiede finden sich im für die Anheftung verantwortlichen G-Protein (Collins and Crowe, 2007; Hall, 2004; Hall and McCarthy, 2000; Mufson *et al.*, 1985). Seine Aminosäuresequenz stimmt zwischen den beiden Subtypen nur in 55% überein. Das F-Protein hingegen weist für beide Stämme eine Homologie von mehr als 90% auf (Hall, 2004).

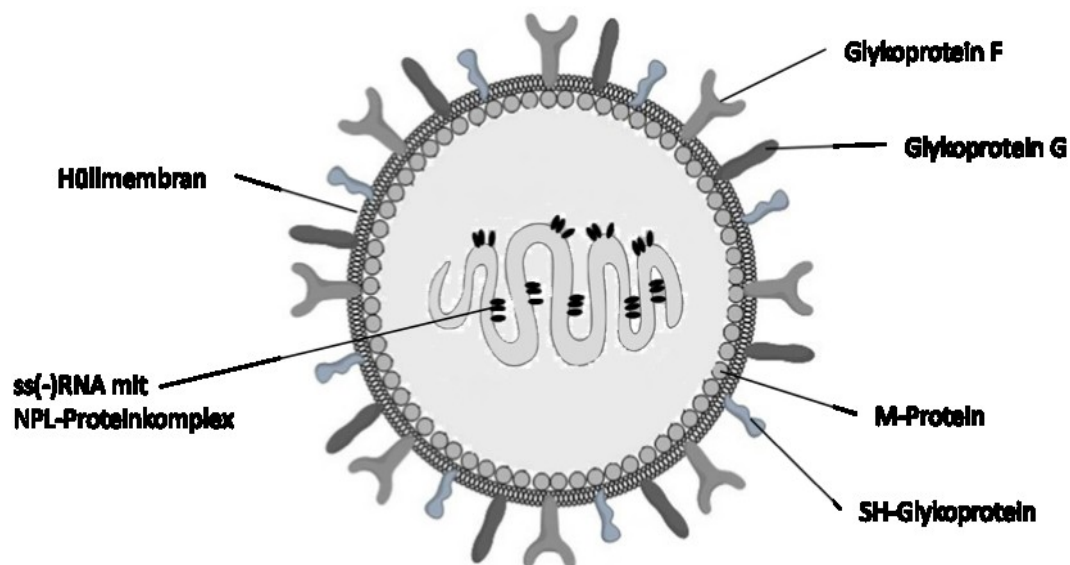


Abbildung 4, Hauptstrukturkomponenten eines RSV – Modifiziert nach Hall *et al.* (Hall, 2001)

1.3.2 Übertragungswege und Erkrankungsspektrum von RSV-Infektionen

RSV wird meist durch Tröpfchen- oder Schmierinfektionen übertragen (Modrow, 2003b). Da die Viren behüllt und somit empfindlich gegenüber Austrocknung sind, führt ein feines Aerosol seltener zu einer Infektion. Enger

zwischenmenschlicher Kontakt, wie beispielsweise in Kindertagesstätten, ist Voraussetzung zur Übertragung von RSV durch große Tröpfchen oder direkten Kontakt mit respiratorischen Sekreten (Collins and Crowe, 2007; Dermody and Tyler, 2000; Hall, 2004; Musher, 2003; Tang and Crowe, 2007). In Kinderkliniken kommt es nicht selten zu nosokomialen Infektionen (Hall and McCarthy, 2000).

Da die sich an eine Infektion anschließende Immunität nur partiell ist, sind Reinfektionen häufig (Hall and McCarthy, 2000). Diese verlaufen meist weniger schwerwiegend als die Primärinfektion (Hall, 2004). Nach Abklingen der Symptome wird RSV in der Regel rasch eliminiert und findet sich daher nur selten bei Kindern ohne respiratorischen Infekt (Hall, 2004). Bei Immungesunden konnten bislang keine persistierenden Infektionen nachgewiesen werden (Collins and Crowe, 2007).

Die Mehrheit der Primärinfektionen erfolgt bereits in den ersten Lebensjahren (Hall and McCarthy, 2000; Modrow, 2003b). Nahezu alle Zweijährigen hatten bereits Kontakt mit RSV (Collins and Crowe, 2007; Hall, 2004; Tang and Crowe, 2007). Das Erkrankungsspektrum erstreckt sich von leicht bis schwerwiegend, von Rhinitis über Pharyngitis, Bronchitis und Bronchiolitis bis Pneumonie (Hall, 2004; Modrow, 2003b). RSV ist bei Infektionen der tiefen Atemwege von Kleinkindern der häufigste virale Erreger (Hall and McCarthy, 2000). Gerade Primärinfektionen manifestieren sich oftmals als Entzündung der Bronchien oder Pneumonie. Bei Kindern unter drei Jahren kann RSV, ausgehend von oberen Atemwegsinfekten, besonders leicht in die unteren Atemwege absteigen (Hall, 2004; Hall and McCarthy, 2000; Modrow, 2003b).

Nicht nur bei Kleinkindern, sondern auch bei älteren Kindern leistet RSV einen beträchtlichen Beitrag zur Morbidität durch Infekte der oberen und unteren Atemwege. Auch bei älteren Kindern sind RSV-Infektionen tendenziell schwerwiegender und länger andauernd als andere respiratorische Virusinfektionen (Hall and McCarthy, 2000). Lebensbedrohliche Infektionen ereignen sich jedoch vorwiegend als Erstinfektionen von Säuglingen und Kleinkindern, insbesondere bei Frühgeborenen mit bronchopulmonaler

Dysplasie (Hall, 2004; Hall and McCarthy, 2000). Des Weiteren wurden fatale Verläufe insbesondere bei Abwehrgeschwächten und Immunsupprimierten beschrieben, allen voran bei Patienten nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen, bei denen die Immunsuppression besonders ausgeprägt ist (Collins and Crowe, 2007).

Die Risikokollektive der Frühgeborenen und Immunsupprimierten sind unumstritten. Weitaus unklarer ist, ob RSV A oder RSV B mit schwereren Erkrankungen assoziiert ist (Hall, 2001). Es gibt Studien, die vermuten lassen, dass Infektionen mit RSV A schwerwiegender verlaufen (Sullender, 2000; Walsh *et al.*, 1997). Andere wiederum finden keine Korrelation zwischen antigenischem Subtyp und Schweregrad (Kneyber *et al.*, 1996; Martinello *et al.*, 2002; Sullender, 2000). Zusätzliche Studien zu Prävalenz und assoziiertem Erkrankungsbild der beiden Typen sind erforderlich um die Frage nach einer Korrelation zu beantworten.

1.3.3 Epidemiologie und Bedeutung der Typisierung von RSV

Als RNA-Virus unterliegt RSV weitaus mehr Mutationen als das DNA-Genom enthaltende ADV (Sullender, 2000). Im internationalen Vergleich ist die genauere Einteilung von RSV A und RSV B in Genotypen wegen des raschen Wandels der Nukleinsäuresequenzen uneinheitlich. Eine endgültige Einteilung ist wenig wahrscheinlich oder sinnvoll, weil durch Selektionsdruck neue Genotypen entstehen und andere wiederum verschwinden (Cane, 2001; Sullender, 2000). Zur Identifikation der wechselnden RSV-Genotypen ist die Dokumentation der genetischen Sequenzen unabdingbar. Gerade weil RSV sich ständig genetisch verändert, wird es immer wichtig sein die Prävalenz der Virustypen zu kennen, um einen Wandel der Verteilung beobachten zu können.

In den USA wurde die Verbreitung der RSV-Infektionen im Rahmen des New Vaccine Surveillance Network (NVSN) vom Center for Disease Control and Prevention (CDC) prospektiv dokumentiert (Hall *et al.*, 2009). Auf eine weitere Differenzierung der Subtypen wurde hier allerdings verzichtet. Für Deutschland

existiert kein vergleichbares, nationales webbasiertes Frühwarnsystem. Das 1999 initiierte „Web & Warnsystem“ im Rahmen des „Pediatric Infectious Disease Network on Acute Respiratory Tract Infections“ war auf die Universitätskliniken Mainz, Freiburg und Kiel beschränkt und wurde mittlerweile eingestellt (Weigl and Schmitt, 2007).

RSV-Infektionen kommen typischerweise in jährlich wiederkehrenden Epidemien vor. Es ist bekannt, dass diese bezüglich ihrer Intensität und ihres zeitlichen Verlaufes variieren. Für die gemäßigten Breiten der USA, wie auch für Deutschland, ist ein epidemisches Auftreten von Spätherbst bis Frühling beschrieben. Die Ausbrüche dauern etwa 20 Wochen im Zeitraum von November bis Mai. Ein Inzidenzmaximum findet sich häufig zu Beginn des Jahres in den Monaten Januar und Februar (Hall, 2004; Reiche and Schweiger, 2009).

Weiterhin zeigt sich eine Tendenz zu einem dualen Rhythmus, einem abwechselnden Auftreten von starken saisonalen Epidemien mit frühzeitigem Beginn (September - Oktober) und hohen Fallzahlen und schwächeren Epidemien mit niedrigeren Fallzahlen bei späterem Beginn (Dezember - Februar) (Reiche and Schweiger, 2009; Weigl *et al.*, 2002b).

Den Beginn der Epidemie abschätzen zu können ist wichtig, weil die bislang einzige spezifische Therapie der RSV-Infektion, die bei Hochrisikopatienten zur Anwendung kommt, in der prophylaktischen passiven Impfung besteht. Es handelt sich dabei um Palivizumab, einen humanisierten monoklonalen Antikörper der Maus, der an das Fusions-Protein bindet (siehe **Abbildung 4**) (Reinhardt and Wirth, 2009; Weigl *et al.*, 2002b). Wegen der kurzen Halbwertszeit dieses monoklonalen Antikörpers muss dieser rechtzeitig einmal monatlich verabreicht werden (Abbott, 2011; Forster *et al.*, 2012). Auch wegen immenser Kosten (1218,70 € für 100 mg, Dosierung 15 mg Palivizumab pro kg KG, (RoteListe, 2013)) sollte möglichst ein zeitlich gezielter Einsatz erfolgen.

Trotz erheblicher Anstrengung der letzten Jahrzehnte ist es noch nicht gelungen einen effektiven aktiven Impfstoff gegen RSV zu entwickeln. Ein

solcher sollte bereits im Säuglingsalter verabreicht werden, um diese Hochrisikogruppe schützen zu können. Außerdem müsste er im Idealfall eine der natürlichen Immunantwort überlegene Immunität erzeugen, also rezidivierende Infektionen unterbinden (Hall, 2001; Sullender, 2000).

1.3.4 RSV-Nachweismethoden in der Routinediagnostik

Steigende Zahlen von Bronchiolitis und kindlicher Pneumonie, sowie vermehrte Krankenhauseinweisungen wegen URTI können Hinweis auf eine RSV-Epidemie sein (Hall and McCarthy, 2000). In einem solchen Kontext liegt im Falle eines an Bronchiolitis erkrankten Kleinkindes der Verdacht einer RSV-Infektion nahe (Hall, 2004). Die sichere Diagnose kann jedoch in jedem Fall nur die virologische Diagnostik liefern.

Die klassische Methode zum Nachweis von RSV-Infektionen ist die Virusanzucht. Gerade weil die Empfindlichkeit des RSV den Erfolg der kulturellen Anzucht stark von Qualität und Transport der Patientenprobe abhängig macht (Hall, 2004), sind alternative Detektionsmethoden wie Antigennachweise oder PCR in der Routinediagnostik von RSV unersetzlich. Der Antigennachweis kann mittels immunchromatographischer Schnelltests, ELISA oder IFT erfolgen. Besonders im Kindesalter weisen die RSV-Antigenschnelltests eine akzeptable Sensitivität und Spezifität auf (Hall, 2001). Auch der in der Routinediagnostik häufig eingesetzte IFT ist nicht nur einfacher und schneller, sondern auch sensitiver als die kulturelle Anzucht (Mahony, 2008).

Wie für eine Vielzahl respiratorischer Erreger wurde auch für die Detektion von RSV in den letzten Jahren vermehrt die PCR eingesetzt. Molekulare Ansätze haben sich zur Validierung neuer RSV-Tests mittlerweile als „zweiter Goldstandard“ neben der zeitaufwändigen Zellkultur durchgesetzt (Sefers *et al.*, 2011; Tang and Crowe, 2007).

1.3.5 Methoden zur Typisierung von RSV

Historisch war eine Unterscheidung von RSV A und RSV B nur mit monoklonalen neutralisierenden Antikörpern gegen die jeweiligen G-Proteine möglich. Hierzu muss als Voraussetzung ein Virusisolat vorliegen. Um auf die zeitaufwändige Zellkultur verzichten zu können, wurden in den vergangenen Jahren neue molekulare Methoden zur Differenzierung der Subtypen etabliert (Ostlund *et al.*, 2008; Peret *et al.*, 2000; Peret *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2005; Venter *et al.*, 2001; Zambon *et al.*, 2001; Zlateva *et al.*, 2005; Zlateva *et al.*, 2007). Mittels Sequenzierung und phylogenetischer Analyse kann zwischen RSV A und RSV B unterschieden, sowie eine Vielzahl von Genotypen differenziert werden (Ostlund *et al.*, 2008; Peret *et al.*, 2000; Peret *et al.*, 1998; Venter *et al.*, 2001; Zlateva *et al.*, 2005). Auch wenn zunehmend molekulare Typisierungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen, verzichtet die Routinediagnostik häufig auf genaue Typisierung.

Neben Singleplex-PCRs sind auch Multiplex-PCRs in Entwicklung, die in der Lage sind zwischen RSV A und RSV B zu unterscheiden (Brunstein and Thomas, 2006; Brunstein *et al.*, 2008; Mahony *et al.*, 2007; Nolte *et al.*, 2007). Wenn eine Multiplex-PCR die beiden RSV-Typen sicher identifizierte, wäre sie eine Möglichkeit die Typisierung der Routinediagnostik zugänglich zu machen.

1.4 Multiplex-Nachweise von respiratorischen Viren

Selbst wenn durch den klinischen Kontext ein bestimmtes Virus als Krankheitsursache unter Verdacht steht, müssen zahlreiche andere Erreger differentialdiagnostisch berücksichtigt werden, da klinisch ähnliche Atemwegsinfektionen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Erreger verursacht werden können (Fox, 2007; Merante *et al.*, 2007). Die Routinediagnostik steht dadurch vor dem Problem, dass es sehr aufwändig ist, auf alle potentiellen respiratorischen Erreger mit jeweils einem spezifischen Nachweis zu testen (Fox, 2007; Li *et al.*, 2007).

1.4.1 Methoden zum Multiplex-Nachweis

Auf der Suche nach zeit- und ressourcensparenden Methoden wurden Multiplex-PCRs entwickelt (Brice *et al.*, 2007; Brunstein and Thomas, 2006; Brunstein *et al.*, 2008; Fox, 2007; Mahony *et al.*, 2007; Mahony, 2008; Nolte *et al.*, 2007). Diese versuchen die hohe Sensitivität und Spezifität der Singleplex-PCR mit der Bandbreite eines sogenannten „Catch-all“-Testes zu vereinen. Mit Hilfe mehrerer spezifischer Primer und Sonden testen sie Material gleichzeitig auf verschiedene Erreger. Weil dabei viele verschiedene Primer in einem Ansatz notwendig sind, ergeben sich für herkömmliche Multiplex-PCRs zwei grundlegende Probleme: Zum einen besitzen die Primer teilweise unterschiedliche Temperaturoptima, zum anderen kommt es wegen der hohen Primer-Konzentration im Ansatz leichter zu unspezifischer Amplifikation und Dimerisierung der Primer (Li *et al.*, 2007; Qiagen-Handbook, 2010; Quan *et al.*, 2008). Daraus resultiert, dass Multiplex-Ansätze zwar oft dem IFT überlegen sind, aber nicht die Sensitivität einer Singleplex-PCR erreichen können (Brice *et al.*, 2007; Brunstein and Thomas, 2006).

Für die Detektion von respiratorischen Erregern gibt es zahlreiche neue Multiplex-PCRs. Zum einen Realtime-PCRs, bei welchen zeitgleich zur Amplifikation ein Spezifitätsnachweis mittels fluoreszenzmarkierter Sonden stattfindet (Rheem *et al.*, 2012; Sakthivel *et al.*, 2012).

Zum anderen konventionelle Multiplex-Assays, welche die Amplifikation und Detektion in zwei Schritte trennen (Brunstein and Thomas, 2006; Fox, 2007; Mahony *et al.*, 2007; Nolte *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2008). Einigen von diesen ist die zur Detektion verwendete xMap-Technologie gemeinsam, welche den simultanen Nachweis von bis zu hundert verschiedenen Erregern in einer Patientenprobe ermöglicht, indem sie sich farbcodierter Mikrokügelchen („Beads“) bedient. Diese sind für jeweils einen Erreger spezifisch. Ihre quantitative Auswertung mittels Durchflusszytometrie ergibt den sogenannten „Beadcount“, also die Zahl positiver Ereignisse pro Erreger. Anhand eines vom Hersteller festgelegten Cut-off-Wertes kann damit abschließend jede Probe als

positiv bzw. negativ für den fraglichen Erreger festgelegt werden (Multimetrix, 2012; Sefers *et al.*, 2011).

Der xTAG-Multiplex-Assay (xTAG respiratory viral panel RVP, Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Kanada) ist von der Food and Drug Administration (FDA) zur Diagnostik von Atemwegsinfektionen zugelassen (FDA, 2008). Andere kommerzielle Testkits, wie das Resplex Panel (Qiagen Hilden, Deutschland) oder MultiCode-PLx-Panel (EraGen Bioscience, Madison, Wisconsin, USA) dienen bislang nur Forschungszwecken (Balada-Llasat *et al.*, 2011). Die Resplex-Methode wird im Folgenden genauer beschrieben.

1.4.2 Prinzip von Resplex

Das Resplex Panel (Qiagen) besteht aus einem Amplifikationsschritt mittels „Qiaplex“-Multiplex-PCR und einem Detektionsschritt mittels xMap-Technologie (Balada-Llasat *et al.*, 2011; Qiagen-Handbook, 2010).

Bei der Amplifikation erfolgt in den ersten Zyklen zunächst eine virusspezifische Amplifikation mittels kurzer, virusspezifischer Primer, welche in niedriger Konzentration vorliegen. Diese Primer sind mit „Tag“-Sequenzen versehen, welche durch universelle „Superprimer“ erkannt werden (Caliendo, 2011). Eine anschließende Erhöhung der Annealing-Temperatur ermöglicht eine weitere Amplifikation durch längere, alle Produkte anhand der Tag-Sequenzen erkennende, Super-Primer (vergleiche **Abbildung 5**). Deren 5'-Ende ist biotinyliert (Caliendo, 2011; Qiagen-Handbook, 2010; Sefers *et al.*, 2011).

Zur Detektion schließt sich an die Amplifikation zunächst ein Hybridisierungsschritt an (Miller and Tang, 2009): Nach Denaturierung der PCR-Produkte können an diese erregerspezifische Sonden binden. An diese Sonden wiederum sind mikroskopisch kleine durch Farbkodierung virusspezifische Polystyren-Kügelchen gebunden. Die Kügelchen sind mit je einem infrarotem und einem rotem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt.

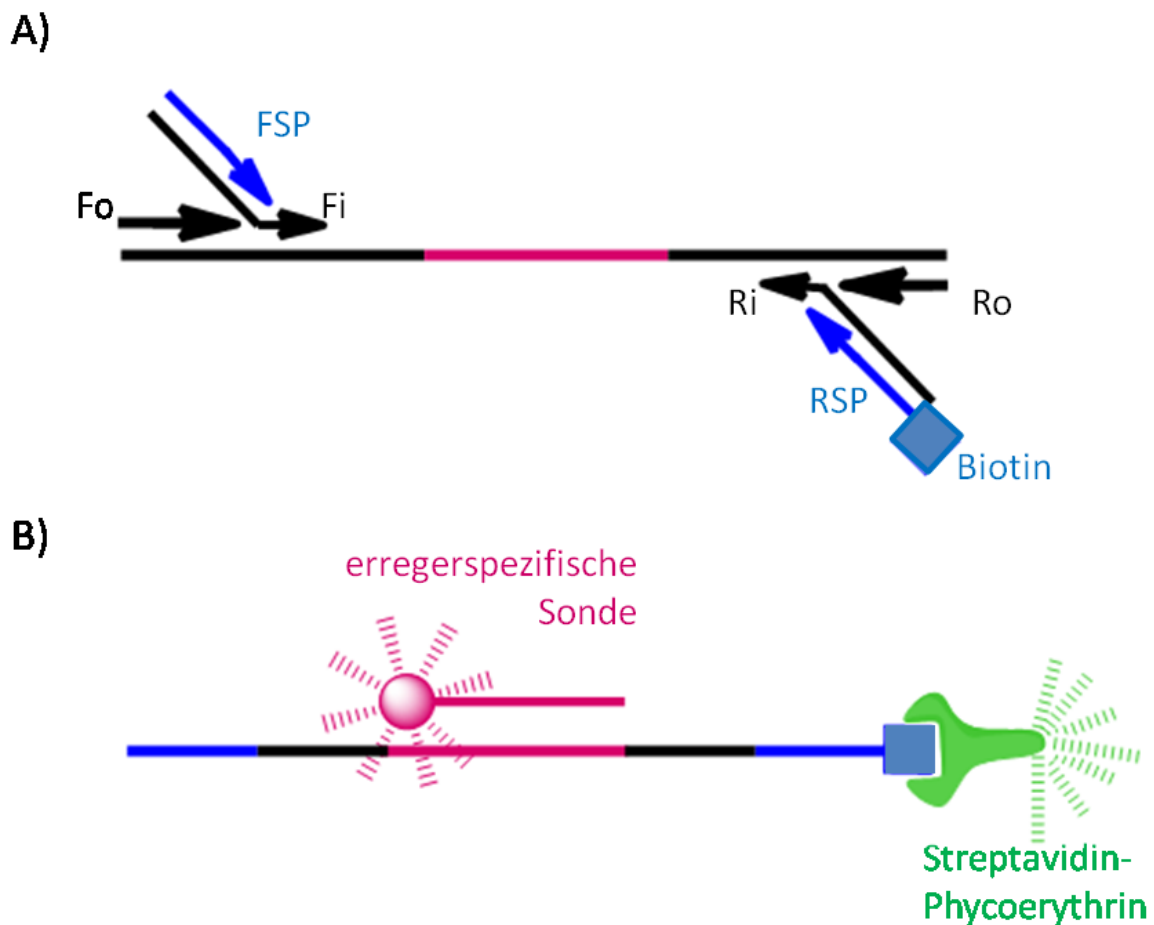


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Resplex-Prinzips – A) Primer-Bindungsstellen: Forward und Reverse Super Primer (FSP und RSP), wobei RSP biotinyliert ist; Forward und Reverse inner Primer (Fi und Ri); Forward und Reverse outer Primer (Fo und Ro). B) Detektion mittels Durchflusszytometrie: Hierbei wird das Polystyren-Kügelchen, an das die erregerspezifische Sonde gekoppelt ist, durch einen Rot-Laser erkannt. Ob an die Sonde amplifizierte Virus-Nukleinsäure gebunden wurde, wird durch einen Grün-Laser mittels des über Streptavidin an die biotinylierten Enden des Primers gebundenen Phycoerythrins detektiert. Diese Signale ergeben pro Erreger einen gewissen „Beadcount“. - modifiziert nach Präsentation QIAplex Workshop (Dannenberg, 2007)

Dadurch, dass diese beiden Farbstoffe in jeweils 10 verschiedenen Konzentrationen vorliegen können, sind Kombinationen aus 10^2 Schattierungen, also eine Kodierung für 100 verschiedene Erreger möglich. Kodierung bedeutet, dass jedem Erreger eine „Beadregion“, eine Kombination aus zwei Schattierungen zugeordnet ist (Multimetrix, 2012).

Des Weiteren werden die biotinylierten PCR-Produkte durch das Hinzufügen von Streptavidin-Phycoerythrin farbkodiert: Man macht sich die chemische

Eigenschaft des Streptavidins zu Nutze, welches das Biotin mit hoher Affinität bindet (Weber *et al.*, 1989). An das Streptavidin wiederum ist Phycoerythrin gekoppelt, dessen Absorptionsspektrum im Grünlichtbereich liegt. So wird eine Detektion aller „biotinylierten“ PCR-Produkte mittels „Grün“-Laser ermöglicht (Caliendo, 2011; Miller and Tang, 2009).

Die Detektion erfolgt nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie, welche zur Detektion der Mikrokügelchen und der gebundenen Zielsequenzen zwei unterschiedliche Laser des LiquiChip (Qiagen) verwendet: Ein „Rot“-Laser regt die roten und infraroten Farbstoffe der Mikrokügelchen zur Fluoreszenz an (Wellenlängenbereich 645 - 669 nm und > 712 nm). Diese wird zur Detektion auf entsprechende Photodioden geleitet. Ein „Grün“-Laser (YAG-Laser 532 nm) dient zur Differenzierung, ob an die an die Mikrokügelchen gebundenen Sonden wiederum ein PCR-Produkt angelagert ist, indem er das Phycoerythrin zur grünen Fluoreszenz anregt (Dunbar, 2006; Mahony *et al.*, 2011; Multimatrix, 2012; Qiagen-Handbook, 2010; Sefers *et al.*, 2011).

Durch diese Technik wird also für jeden Erreger erfasst, wie häufig es zum „positiven“ Signal des grünleuchtenden PCR-Produktes kommt. Dieser „Beadcount“ ergibt in der Summe dann für jeden Erreger eine mediane Fluoreszenzintensität (Sefers *et al.*, 2011), welche anhand des Cut-Offs eine Unterscheidung in für einen Erreger positive bzw. negative Proben ermöglicht (Sefers *et al.*, 2011).

1.4.3 Evaluation von Multiplex-PCRs

Dieser xMap-Technologie bedienen sich konventionelle Multiplex-Assays, die in den letzten Jahren zunehmend entwickelt wurden mit dem Ziel, den für respiratorische Viren als Standard etablierten Antigennachweis als Screeningtest zu ersetzen. Auch wenn es Studien gibt, die belegen, dass neue Multiplex-PCRs trotz der gleichzeitigen Testung auf zahlreiche Erreger kaum eingeschränkte klinische Sensitivität für die jeweils einzelnen Erreger beklagen, sind sie bislang noch kein etablierter diagnostischer Standard (siehe **Tabelle 3**).

	Zahl der Proben	Referenz	bei Diskrepanz	Sensitivität	Spezifität	Autoren
xTAG RVP	294	Kultur, IFT	Realtime	96,1%	k.A.	(Mahony <i>et al.</i> , 2007)
	29 RSV 17 ADV			96,6% 100%	k.A. k.A.	
	1530	Realtime		91,2%	99,7%	(Pabbaraju <i>et al.</i> , 2008)
	92 RSV 62 ADV			84,8% 58,1%	100% 100%	
	286	Realtime		78,8%	99,6%	(Gadsby <i>et al.</i> , 2010)
	38 RSV 21 ADV			94,7% 61,9%	99,2% 100%	
	202	Kultur		100%	91%	(Balada-Llasat <i>et al.</i> , 2011)
	750	Kultur, IFT, Multiplex		k.A.	k.A.	(Gharabaghi <i>et al.</i> , 2011)
	144 RSV 21 ADV			88,2% 85,7%	100% 99,9%	
Resplex	1742	IFT		k.A.	k.A.	(Brunstein <i>et al.</i> , 2008)
	360	Kultur, Realtime		k.A.	k.A.	(Li <i>et al.</i> , 2007)
	30 RSV			73,3%	100%	
	202	Kultur		89%	94%	(Balada-Llasat <i>et al.</i> , 2011)
		xTAG		73%	99%	
	750			k.A.	k.A.	(Gharabaghi <i>et al.</i> , 2011)
	144 RSV 21 ADV	Kultur, IFT, Multiplex		84% 71,4%	100% 99,9%	
Multi code-PLx RVP	354	Kultur, IFT	Realtime	k.A.	k.A.	(Nolte <i>et al.</i> , 2007)
	13 RSV 1 ADV			91,7% k.A.	99,4% k.A.	
	687	Kultur, IFT		99%	87%	(Marshall <i>et al.</i> , 2007)
	19 RSV 12 ADV			63,2% 100%	99,3% 99,1%	
	410	Kultur, IFT	Realtime	k.A.	k.A.	(Arens <i>et al.</i> , 2010)
	33 RSV 30 ADV			100% 100%	99% 98%	
	202	Kultur		89%	87%	(Balada-Llasat <i>et al.</i> , 2011)
		xTAG		81%	95%	

	Zahl der Proben	Referenz	bei Diskrepanz	Sensitivität	Spezifität	Autoren
Seplex RV15	750			k.A.	k.A.	(Gharabaghi <i>et al.</i> , 2011)
	144 RSV		Kultur, IFT, Multiplex	100%	97,7%	
	21 ADV			100%	98,1	

Tabelle 3, Multiplex-PCRs mit xMAP-Technologie für respiratorische Erreger – bei der Auflistung handelt es sich um eine Auswahl an aktuell verfügbaren Multiplex-PCRs, welche sich der xMAP-Technologie bedienen. Die jeweiligen Sensitivitäten beziehen sich auf die Referenztestung ggf. nach Abgleich der diskrepananten Ergebnisse. Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass die Studien sehr heterogen konzipiert sind, weswegen manche Werte für einige Studien nicht verfügbar sind („k.A.“).

Der xTAG-Assay ist von der FDA zur Detektion zwölf respiratorischer Erreger zugelassen; darunter auch RSV A und B, sowie ADV (FDA, 2008). Mahony *et al.* entwickelten den Test und publizierten 2007 erstmals eine prospektive Studie mit insgesamt 294 respiratorischen Proben (Mahony *et al.*, 2007). In dieser verglichen sie seine Detektionsfähigkeiten gegenüber dem weitverbreiteten Standard (Kultur und IFT). Verglichen mit diesem Standard erkannte der xTAG-Assay 96,1% der positiven Proben. Allerdings erkannte der xTAG-Assay auch im Standard negative Proben als positiv. Daher erfolgte ein Abgleich der diskrepananten Proben mittels Singleplex-PCR. Die so ermittelten „echt positiven“ Proben erkannte der xTAG-Assay mit einer Sensitivität von 97,8% und war damit den Standardmethoden überlegen (Sensitivität 91,9%). Dabei erkannte er ADV mit einer Sensitivität von 100% (Mahony *et al.*, 2007). Für RSV war die Sensitivität mit 96,6% etwas niedriger (Mahony *et al.*, 2007). Weitere Studien verglichen die Leistungsdaten des Assays mit denen der jeweiligen Singleplex-Realtime-PCR (Gadsby *et al.*, 2010; Pabbaraju *et al.*, 2008). Pabbaraju *et al.* testeten dabei 1530 Proben. Die Sensitivität des xTAG Assays (91,2%) lag unter der der als Goldstandard verwendeten Singleplex-PCR und die Detektionsfähigkeit des Tests war insbesondere für RSV und ADV enttäuschend. Die Sensitivität lag im Vergleich bei 84,8% bzw. 58,1%. Auch in einer neuen Version (RVP Fast), konnten die Leistungsdaten des Testes für ADV mit einer Sensitivität von 61,9% nicht überzeugen (Gadsby *et al.*, 2010). Für RSV wurde eine Sensitivität von 94,7% erreicht.

Weitere Multiplex-PCRs, die sich der xMAP Technologie bedienen, werden bislang nur für Forschungszwecke verwendet (siehe **Tabelle 3**).

Das in den USA entwickelte Resplex I Panel zur Detektion von respiratorischen DNA-Erregern weist neben Bakterien (*Chlamydia* und *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* 1 und 2) auch ADV nach. Für ADV beschränkt sich sein Spektrum auf zwei der sieben Spezies, ADV B und E, die getrennt erfasst werden. In einer kanadischen Studie war eine deutliche Diskrepanz (< 10% Übereinstimmung) zwischen den Ergebnissen des Panels und des IFT für ADV beobachtet worden (Brunstein *et al.*, 2008). Brunstein *et al.* äußerten den Verdacht, dass das Spektrum der detektierten Spezies für Ihr Kollektiv eventuell unzureichend gewesen war.

Das Resplex II Panel detektiert ausschließlich RNA-Viren (Influenza-A- und Influenza-B-Viren, Parainfluenzaviren 1 - 4, RSV A und B, humanes Metapneumovirus, Rhinoviren, Enteroviren). Gemäß Herstellerangaben kann es die beiden Subtypen RSV A und RSV B differenzieren. In jüngeren Studien zur praktischen Anwendbarkeit des Resplex II Panels für die Routinediagnostik, war für RSV eine, verglichen mit anderen RNA-Viren, verminderte Sensitivität aufgefallen (Balada-Llasat *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2007). Da in keiner der Studien eine Sequenzierung der Subtypen vorgenommen wurde, konnte jedoch nicht beurteilt werden, ob die Primer oder Sonden der Multiplex-PCR einer generellen Verbesserung bedürfen, oder ob beispielsweise lediglich ein Subtyp schlechter erkannt wird.

1.5 Fragestellung

1.5.1 Evaluierung des Resplex-Testsystems

Für die Routinediagnostik viraler Atemwegsinfektionen wurden lange Zeit IFT und konventionelle Kultur angewandt. Diese traditionelle Diagnostik wird in den letzten Jahren zunehmend durch molekulare Verfahren, wie PCR, ergänzt, weil

diese sich durch bessere Sensitivität und Spezifität auszeichnen (Fox, 2007; Weinberg *et al.*, 2004).

Mit der Verfügbarkeit des Resplex-Testsystems wurde dieses retrospektiv für den Nachweis von respiratorischen Erregern laborintern evaluiert (Salamano, Manuskript in Vorbereitung). Dabei war eine verminderte Sensitivität des Resplex Panels für ADV und RSV im Vergleich zum IFT aufgefallen.

Ziel dieser Arbeit war es die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse von IFT und Resplex in einem Kollektiv hospitalisierter Kinder zu finden. Es galt zu klären, ob die Ursache auf generell für alle Virussubtypen unzureichend optimierte Bestandteile des Assays, wie Primer oder Sonden zurückzuführen ist. Diese könnte folglich durch deren Optimierung behoben werden.

Alternativ wäre es möglich, dass der Assay einzelne zirkulierende Subtypen nicht erkennt. So wäre es für das genetisch variabelere RSV möglich, dass durch Mutationen im Zeitverlauf Primer unpassend werden. Weiterhin wäre es gerade bei der Vielzahl unterschiedlicher ADV denkbar, dass sich die Diskrepanzen durch das Zirkulieren unzureichend detektierter Typen erklären lassen. Von allen ADV-Spezies erkennt das Resplex Panel nur zwei, ADV B und E. Eine häufige Zirkulation der restlichen Spezies (ADV A, C, D, F, G) in Deutschland könnte die mangelnde Sensitivität des Testes für ADV erklären.

1.5.2 Erhebung der epidemiologischen Typenverteilung von ADV und RSV

Die Typisierung der respiratorischen Viren dokumentiert die aktuelle Situation vor Ort und die Veränderung der Viren über die Zeit. Sie ermöglicht es, neue Virusvarianten mit möglicherweise veränderter Pathogenität zu erkennen und schafft eine Grundlage für therapeutische und prophylaktische Ansätze.

Weil es in Deutschland keine fundierten epidemiologischen Daten für die Prävalenz der ADV- sowie der RSV-Subtypen gab, war es daher weiterhin Ziel dieser Arbeit, dem Bedarf epidemiologischer Daten zur Subtypenprävalenz

beider Viren in einem Kollektiv hospitalisierter Kinder nachzukommen. Dabei galt es, die generelle Verteilung der Typen bzw. Subtypen von ADV und RSV zu klären und dominante Typen zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenproben

Im Vorfeld dieser Arbeit waren Atemwegssekrete von Patienten aus der Universitäts-Kinderklinik Würzburg und der Kinderklinik der Missionsärztlichen Klinik Würzburg aus den Zeiträumen von August 2006 bis März 2007 sowie September 2007 bis Februar 2008 im Rahmen einer Evaluierungsstudie retrospektiv mit dem Resplex Panel untersucht worden.

Alle Proben waren zur Routinediagnostik auf respiratorische Viren an das Virusdiagnostik-Labor des Instituts für Virologie und Immunbiologie geschickt worden. Die Routinediagnostik erfolgte mit einem IFT (Respiratory Panel IFA Kit, Chemicon), welcher Antigenen von ADV, Influenza A- und Influenza B-Virus, Parainfluenzaviren 1, 2 und 3, sowie RSV nachweist. Verbleibendes Restmaterial aus der Routinediagnostik wurde bis zur Testung mit dem Resplex Panel bei -20°C aufbewahrt. Die Ergebnisse des Vergleichs von IFT und Resplex-PCR-Ergebnissen werden in einer separaten Dissertationsarbeit dargestellt (Salamano, Manuskript in Vorbereitung).

Wegen deutlicher Diskrepanzen der Ergebnisse von IFT und Resplex-PCR für ADV und RSV, wurden alle für ADV-DNA oder RSV-RNA positiven oder fraglich positiven Proben in der vorliegenden Arbeit einer weiteren Evaluation unterzogen.

2.1.1 ADV-Proben

Die für Adenovirus-Untersuchungen verwendeten Proben sind in **Tabelle 4** zusammengefasst. Insgesamt wurden ADV-Typisierungen aus 71 Patientenproben durchgeführt. Dabei handelte es sich um 25 Proben der initialen Resplex-Studie, die aus den Zeiträumen von August 2006 bis März 2007 (n=15) und September 2007 bis Februar 2008 (n=10) stammten und im Rahmen der Routinediagnostik auf respiratorische Viren mittels IFT positiv oder fraglich positiv für ADV-Antigen getestet worden waren. Zusätzlich wurden aus

anderen Zeiträumen weitere Patientenproben aus der Routinediagnostik identifiziert und untersucht, die mittels IFT als ADV-Antigen positiv vorgetestet worden waren. Es handelte sich dabei um 27 Proben aus dem Zeitraum von Mai 2004 bis Juli 2005, um 4 zusätzliche Proben aus den Zeiträumen der initialen Resplex-Studie, sowie um 15 Proben aus dem Zeitraum von April bis November 2007. Diese zusätzlichen Proben wurden retrospektiv im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mit dem Resplex Panel untersucht.

	Zeitraum des Probeneingangs	Proben-Charakterisierung	Zahl der Proben
1. Zeitraum	05/2004 - 07/2005	ADV-Antigen positiv mittels IFT	27
2. Zeitraum	08/2006 - 03/2007	Initiale RESPLEX-Studie ADV-Antigen positiv mittels IFT	15 3
3. Zeitraum	04/2007 - 07/2007	ADV-Antigen positiv mittels IFT	15
4. Zeitraum	09/2007 - 02/2008	Initiale RESPLEX-Studie ADV-Antigen positiv mittels IFT	10 1
Gesamt			71

Tabelle 4, Zur Typisierung rekrutierte ADV-Proben – Die Proben stammten aus den Jahren 2004 bis 2008, wobei keine Proben von August 2005 bis Juli 2006 vorlagen. Der Zeitraum gliedert sich in 4 Abschnitte: Bei Zeitraum 2 und 4 handelt es sich um die Zeiträume, aus denen die Proben der initialen Resplex-Studie stammten. Die Proben aus den Zeiträumen 1 und 3 wurden für die vorliegende Studie neu hinzugenommen.

Die insgesamt 71 verwendeten Patientenproben setzen sich zusammen aus 66 Nasenrachensekreten (NRS), vier Rachenspülwasser und einem Trachealsekret. Für klinische Hintergrundinformation wurde auf Patientenakten zurückgegriffen. Zusätzlich zu den Proben der Routinediagnostik wurden

Proben zur externen Qualitätskontrolle von „Quality Control for Molecular Diagnostics“ (QCMD; Glasgow, Schottland) mit dem Resplex I Panel untersucht. Es handelte sich dabei um das „QCMD 2007 Adenovirus DNA Proficiency Programme“, welches aus insgesamt 12 Proben bestand.

2.1.2 RSV-Proben

Für die RSV-Typisierung wurden 68 Proben verwendet. Bei diesen handelte es sich ausschließlich um NRS aus der initialen Resplex-Studie, welche im Resplex II Panel getestet worden waren. Die Proben stammten also aus den Zeiträumen August 2006 bis März 2007 sowie September 2007 bis Februar 2008. Für klinische Hintergrundinformation wurde auf Patientenakten zurückgegriffen.

2.2 ADV-Typisierung

2.2.1 Strategie

Für die Typisierung der ADV wurde das vorbeschriebene Schema von Madisch *et al.* (Madisch *et al.*, 2006) verfolgt (siehe **Abbildung 6**).

Alle 71 im IFT auf ADV-Antigen positiven oder fraglich positiven Proben wurden zuerst mit der Adhex1_2deg-PCR amplifiziert. PCR-Produkte aus positiven Reaktionen wurden anschließend mit den gleichen Primern sequenziert. Anschließend erfolgte ein Sequenzvergleich mit ADV-Prototypen. Wenn sich dabei die Zugehörigkeit zur Spezies ADV B oder D ergab, wurde eine B-/D-Typ-spezifische PCR und Sequenzierung angeschlossen um eine vollständige Typisierung der Typen der Spezies B bzw. D zu erreichen. Wenn sich im Sequenzvergleich eine Einordnung zur Spezies A, C, E oder F ergab, konnte bereits mittels dieser Sequenz eine exakte Differenzierung der Typen erfolgen. Für Proben der Spezies A, C, E oder F, für die mit der Methode von Madisch *et al.* keine eindeutige Zuordnung möglich war, wurde eine weitere speziesspezifische PCR angeschlossen.

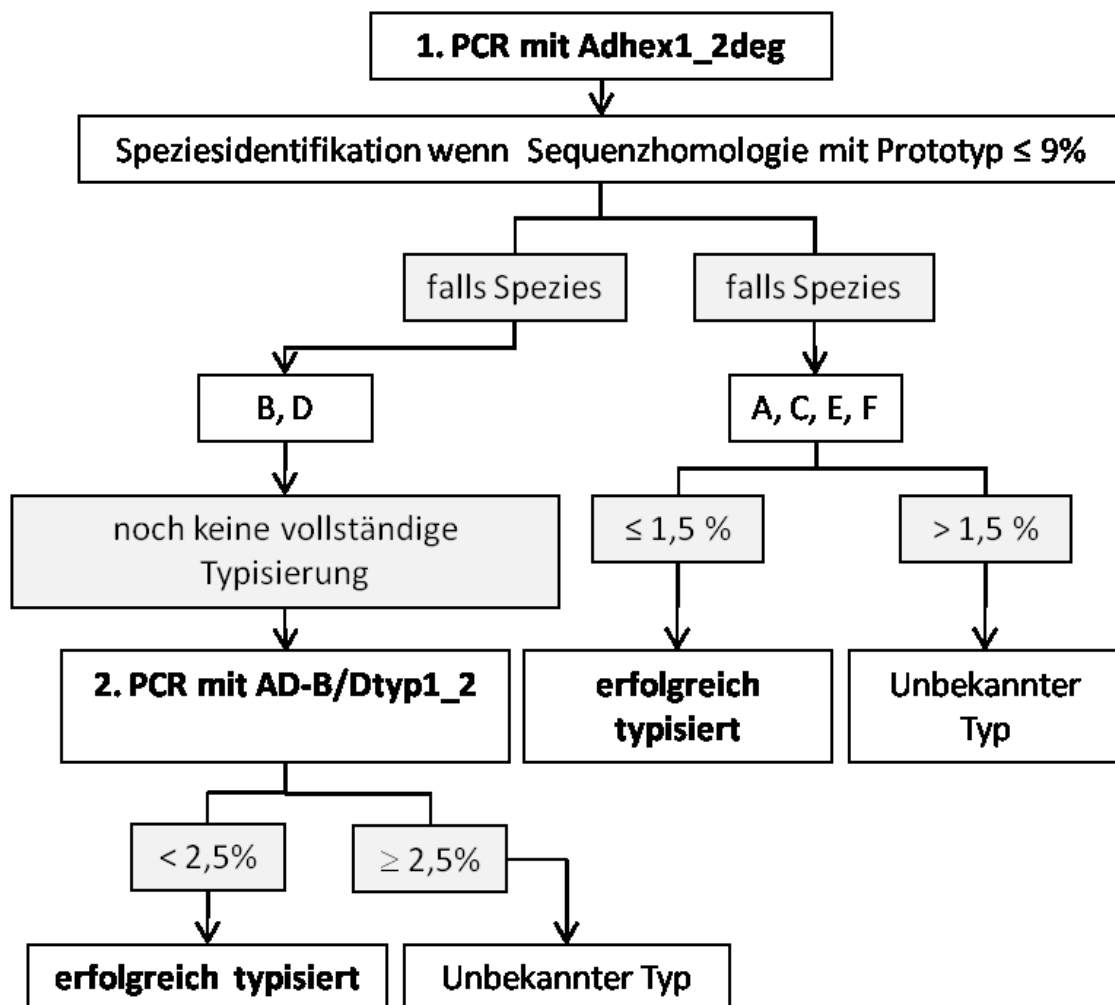


Abbildung 6, Flussdiagramm des Schemas zur Typisierung von ADV in zwei Schritten modifiziert nach Madisch *et al.* (2006) – Die Prozentwerte geben Unterschiede der Nukleotidsequenzen im Vergleich zu Sequenzen der Prototypen an. In einer ersten generischen Typisierungs-PCR nach Allard *et al.* (2001) kann die Spezieszugehörigkeit bestimmt werden. Für ADV A, C, E, F ist in diesem ersten Schritt zusätzlich eine endgültige Zuordnung zum Typ möglich. Bei Zugehörigkeit zur Spezies B oder D ist ein zweiter Schritt mit einer speziesspezifischen PCR zur endgültigen Typisierung notwendig (Madisch *et al.*, 2005).

2.2.2 Extraktion

Zur Extraktion der Virus-Nukleinsäure aus dem Proben-Restmaterial wurden der QIAcube (QIAGEN, Hilden, Deutschland) und das QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet, welches laborintern im Rahmen der Routinediagnostik für die Extraktion von RNA und DNA validiert wurde. Zur Lyse wurden je 140 µl der Proben mit 560 µl AVL-Puffer inkubiert, welcher zuvor mit 5,6 µl Carrier-RNA versetzt worden war. Nach 10 min Inkubation bei

Raumtemperatur erfolgten die weiteren Schritte automatisiert durch den QIAcube: Initial wurden 560 μl Ethanol hinzugefügt. Zur Bindung der Nukleinsäure wurden anschließend in zwei Schritten je 630 μl des Ansatzes auf eine QIAamp Mini Säule pipettiert und jeweils 60 s zentrifugiert. Zur Beseitigung von Rückständen wurde die Membran anschließend durch zwei Waschschriffe gereinigt. Dabei wurde zuerst 500 μl AW1-Puffer auf die Säule übertragen und 60 s zentrifugiert. Im zweiten Schritt wurde 500 μl AW2-Waschpuffer zugefügt und 180 s zentrifugiert. Mit Hilfe des Elutionspuffers AVE wurde abschließend durch Zentrifugieren 60 μl Eluat gewonnen, welches bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert wurde.

2.2.3 PCR

Die ADV-DNA wurde mit Hilfe des forward (fw)-Primers ADhex1deg und des reverse (rev)-Primers ADhex2deg (siehe **Tabelle 5**) amplifiziert, wie von Allard *et al.* (2001) beschrieben.

Die Primersequenzen finden sich am 5'-Ende des Hexogens in einer konservierten Region, welche an die L1-codierende Region angrenzt. Als Enzym diente die HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Entsprechend den Herstellerangaben wurde ein Mastermix angesetzt. Dieser bestand für eine einzelne Reaktion aus 5 μl 10x QIAGEN HotStar Puffer, 0,5 μl dNTPs (Konzentration jeweils 20 mM), 1,0 μl der beiden Primer (Konzentration jeweils 10 μM), 0,3 μl der HotStar Taq Polymerase (Konzentration 5 U/ μl) und 38,2 μl H_2O . Die PCR-Ansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 50 μl bestehend aus 5 μl extrahierter DNA und 45 μl Mastermix durchgeführt. Das PCR-Programm im Thermocycler GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) begann mit 10 min bei 95°C zur Aktivierung der HotStar Polymerase, gefolgt von 50 Zyklen mit 30 s bei 94°C zur Denaturierung und 45 s Primer-Annealing bei 53°C . Die Elongation bei 72°C begann mit 60 s und wurde pro Zyklus um 1 s verlängert. Abschließend erfolgte ein finaler Extensionsschritt bei 72°C für 10 min.

Name	Sequenz des Oligonukleotids	Polarität	Amplicon (in bp)	Referenz
ADhex1deg	5'-GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT C- 3'	Fw	ca. 300	Allard, Albinsson <i>et al.</i> 2001
ADhex2deg	5'-CAG CAC SCC ICG RAT GTC AAA-3'	Rev	ca. 300	Allard, Albinsson <i>et al.</i> 2001
AD-Btyp1	5'-TTG ACT TGC AGG ACA GAA A-3'	Fw	ca. 590	Madisch, Harste <i>et al.</i> 2005
AD-Btyp2	5'-C TT GTA TGT GGA AAG GCA C-3'	Rev	ca. 590	Madisch, Harste <i>et al.</i> 2005
AD-CDtyp1	5'-GTT GAC TTG CAA GAC AGA AA-3'	Fw	ca. 322	Madisch, Harste <i>et al.</i> 2005
AD-CDtyp2	5'-AAA CTC YTC CAY AGG TTG GC-3'	Rev	ca. 322	Madisch, Harste <i>et al.</i> 2005
RSV fw1	Sequenz unbekannt	Fw	ca. 700	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RSV rev1	Sequenz unbekannt	Rev	ca. 700	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RSV rev2	5'AAACACACGTCTAT TGAATTAG-3'	Rev	ca. 700	Eigendesign (entsprechend Sequenzalignement RSV B)
RSV rev3	5'ATTAGACTAAACAT AATTCATG-3'	Rev	ca. 620	Eigendesign (entsprechend Sequenzalignement RSV B)

Tabelle 5, Liste der für PCR und Sequenzierung verwendeten Primer – Bezeichnungen für Nukleotid-Gemische in den Primer-Sequenzen (S, W, R, Y, I), sogenannte „Wobbles“, wurden entsprechend der Nomenklatur der International Union of Biochemistry and Molecular Biology verwendet (IUBMB, 1984)

Im Anschluss an die Vervielfältigung der Nukleinsäure wurde eine Gelelektrophorese der PCR-Produkte (jeweils 5 µl) auf einem ethidiumbromidhaltigen 3%igen Agarosegel über 20 min bei 170 V und 400 A durchgeführt. Ein PCR-Ansatz wurde als positiv gewertet, wenn unter UV-Licht

eine Bande mit der erwarteten Produktgröße (ca. 300 bp) zu sehen war. Als Negativkontrollen der PCR diente das Extraktionsprodukt von Wasser.

Von allen als ADV-B-Typ identifizierten Proben wurde, wie in **2.2.1** beschrieben, eine speziesspezifische PCR mit dem Primern AD-Btyp1 und AD-Btyp2 (siehe **Tabelle 5**) durchgeführt. Sie binden in der L2-Region des Hexon-Gens. Eine D-typ-spezifische PCR war nicht notwendig, weil keine ADV-D-Typ-Proben auftraten. Für die B-Typ-PCR wurde wie obenstehend verfahren. Ein PCR-Ansatz wurde als positiv gewertet, wenn unter UV-Licht eine Bande mit der erwarteten Produktgröße (ca. 590 bp) zu sehen war.

Für Proben, denen nach dem Schema von Madisch *et al.* zwar die Spezies C, jedoch kein eindeutiger Typ zugeordnet werden konnte, wurde eine speziesspezifische PCR mit den Primern AD-CDtyp1 und AD-CDtyp2 angeschlossen (siehe **Tabelle 5**). Es wurde wie im oberen Abschnitt beschrieben verfahren. Ein PCR-Ansatz wurde als positiv gewertet, wenn unter UV-Licht eine Bande mit der erwarteten Produktgröße (ca. 320 bp) zu sehen war.

2.2.4 Sequenzierung

Alle als positiv gewerteten Amplifikate wurden mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Hierzu wurden die nach Gelelektrophorese verbleibenden 45 µl des PCR-Produktes mit 250 µl Binde-Puffer PB gemischt, auf die QIAquick-Säule gegeben und anschließend zur Bindung der DNA an die Silica-Membran der Säule 60 s zentrifugiert. Zur Beseitigung von Rückständen wurde die Membran anschließend zweimalig durch Zugabe von 750 µl Waschpuffer und nachfolgender Zentrifugation (jeweils 60 s) gereinigt. Mit Hilfe des Elutionspuffers (10 mM TrisCl, pH 8,5) wurde abschließend durch Zentrifugieren 40 µl Eluat gewonnen. Zur Kontrolle der Aufreinigung erfolgte eine Gelelektrophorese mit 2 µl der gereinigten DNA, wie unter **2.2.3** beschrieben.

Von den aufgereinigten PCR-Amplifikaten wurden zur Sequenzierung Reaktionen mit BigDye v1.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von 5,0 µl angesetzt. In jedes Reaktionsgefäß wurden jeweils 1,0 µl 2,5x Puffer TrisHCl/MgCl₂ (5 µM), 1,0 µl BigDye Mix, und 1,0 µl des entsprechenden forward bzw. reverse-Primers vorgelegt und anschließend 2,0 µl aufgereinigte DNA zugefügt. Als Primer dienten ADhex1deg sowie ADhex2deg bzw. AD-Btyp1 und AD-Btyp2 bzw. AD-CDtyp1 und AD-CDtyp2 (siehe **Tabelle 5**).

Die Sequenzierungs-Reaktion wurde im T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) in insgesamt 25 Zyklen zu je 10 s bei 96°C, 5 s bei 50°C und 4 min bei 60°C durchgeführt. Durch das Sequenzier-Service-Labor des Instituts für Virologie und Immunbiologie wurden anschließend die nicht inkorporierten Nukleotide mit dem „Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup“-Kit (Millipore, Schwalbach, Deutschland) von den Sequenzierprodukten entfernt. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierprodukte erfolgte im Sequenziergerät 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

2.2.5 Sequenzauswertung

Die forward- und reverse-ADV-Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe des Programms Seqman aus dem Softwarepaket LaserGene (DNA Star, Inc., Madison, Wisconsin, USA) in einer Konsensus-Sequenz, dem sogenannten Contig, verbunden und wenn notwendig manuell editiert. Diese Konsensus-Sequenz jeder Patientenprobe wurde anschließend im fastA-Format gespeichert und einem Sequenzvergleich mit Adenovirus-Prototyp-Sequenzen unterzogen. Wie von Madisch *et al.* beschrieben (Madisch *et al.*, 2005; Madisch *et al.*, 2006), ist eine Identifizierung der ADV-Spezies möglich, wenn die Sequenzen der klinischen Proben um ≤ 9% von den Sequenzen der Spezies-Prototypen abweichen (siehe **Abbildung 6**).

Bei den Spezies A, C, E und F kann man zusätzlich den Typ identifizieren, wenn die Sequenz in $\geq 98,5\%$ mit einer ADV-Prototyp-Sequenz übereinstimmt und die Sequenzdifferenz zum nächsthomologen Typ innerhalb der gleichen Spezies mehr als $1,5\%$ beträgt.

Für die Typisierung von ADV Spezies B wurde, wie unter **2.2.3** beschrieben, eine PCR mit anschließender Sequenzierung mit B-Typ-spezifischen Primern angeschlossen. Eine exakte Zuordnung ist möglich, wenn die B-Typ-Sequenz eine Sequenzidentität von $> 97,5\%$ mit einer ADV-Prototyp-Sequenz aufweist und die nächsthomologe Prototyp-Sequenz der gleichen Spezies mindestens einen Unterschied von $\geq 2,5\%$ aufweist.

2.3 RSV-Typisierung

2.3.1 Strategie

Die RSV-Proben wurden zunächst mit zwei Primern sequenziert, dem forward-1-Primer (fw1) und reverse-1-Primer (rev1; siehe **Tabelle 5**), welche von der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Initial waren einige rev1-Sequenzen wegen überlagerter Elektropherogramme nicht verwertbar. Um eine Zuordnung zu RSV A bzw. B zu erreichen, wurden zunächst die uneditierten fw1-Sequenzen als fastA-Datei zum Vergleich mit Prototypsequenzen in einen phylogenetischen Baum eingeordnet (vergleiche Sequenzauswertung **2.3.5**). Dieser zeigte, dass es sich bei allen rev1-Sequenzen mit Überlagerungen um RSV B handelte. Anhand der vorliegenden Sequenzen wurde deutlich, dass der zur Typisierung verwendete rev1-Primer für RSV B-Sequenzen ungeeignet ist. Durch die Analyse der Sequenzen mittels LaserGene (vergleiche **2.2.5**) wurden alternative Regionen ermittelt, die sich zur Sequenzierung der RSV B-Sequenzen besser eignen. Auf dieser Grundlage wurden zwei alternative rev-Primer (rev2 und rev3) entworfen (vergleiche **Tabelle 5**).

Alle weiteren Proben wurden fortan zunächst nur mit dem fw1-Primer sequenziert und je nach Zuordnung zum Subtyp durch die entsprechenden

reverse-Sequenzen vervollständigt. Dabei wurde für alle RSV A-Sequenzierungen der rev1-Primer und für die von RSV B der alternative Primer rev2 verwendet. Falls auch dieser keine verwertbare Sequenz lieferte, wurde auf den Primer rev3 (siehe **Tabelle 5**) zurückgegriffen. Abschließend wurden die vollständigen Sequenzen mit den Prototypsequenzen in den phylogenetischen Baum eingefügt und somit typisiert.

2.3.2 Extraktion

Zur Extraktion der Virus-RNA aus dem respiratorischen Restmaterial wurde der QIAcube und das QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland), wie unter **2.2.2** beschrieben, verwendet.

2.3.3 PCR

Die Amplifikation der RSV-RNA erfolgte mittels forward-Primer fw1 und reverse-Primer rev1 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; siehe **Tabelle 5**). Da es sich bei RSV um ein RNA-Virus handelt, war vor der Amplifikation mittels PCR ein Umschreiben in cDNA mittels reverser Transkription notwendig. Dieser Schritt wurde in eine „OneStep RT-PCR“ integriert. Nach Herstellerangaben wurde mit dem QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (QIAGEN, Hilden, Deutschland) ein Mastermix angesetzt. Dieser bestand für eine einzelne Reaktion aus 10 µl 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer, 2 µl dNTPs (Konzentration jeweils 10 mM), 2,5 µl der beiden Primer (Konzentration jeweils 10 µM), 2,0 µl Enzymmix und 28,5 µl H₂O. Die PCR-Ansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl bestehend aus 5 µl extrahierter RNA und 45 µl Mastermix durchgeführt. Hierbei bestanden die Zyklusbedingungen aus 30 min bei 50°C zur reversen Transkription und folgender Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase für 15 min bei 95°C. Die anschließenden 50 Zyklen setzten sich aus 30 s bei 94°C zur Denaturierung und 45 s Primer-Annealing bei 45°C zusammen. Die Elongation bei 72°C begann mit 60 s und wurde pro Zyklus um

1 s verlängert. Abschließend erfolgte ein finaler Extensionsschritt bei 72°C für 7 min.

Die Gelelektrophorese erfolgte wie unter **2.2.3** beschrieben, wobei ein PCR-Ansatz als positiv gewertet wurde, wenn eine Bande bei ca. 700 bp zu sehen war.

2.3.4 Sequenzierung

Die RSV-Amplifikate wurden wie im Punkt **2.2.4** beschrieben sequenziert. Alle Proben wurden zuerst nur mit dem fw1-Primer sequenziert. Anschließend wurden diese fw-Sequenzen in einen phylogenetischen Baum mit Referenz-Subtypen eingefügt. Ergab sich dadurch eine Zuordnung zum RSV A-Subtyp, wurden die fw1-Sequenzen durch eine rev1-Sequenz ergänzt. Im Falle einer Zuordnung zum RSV B-Subtyp erfolgte eine Sequenzierung mittels rev2- bzw. rev3-Primer.

2.3.5 Sequenzauswertung

Für jede Patientenprobe wurde aus den forward- und reverse-RSV-Nukleotidsequenzen, wie für ADV unter **2.2.5** beschrieben, ein Contig erstellt und soweit notwendig manuell editiert. Diese vollständige Konsensus-Sequenz wurde anschließend zur phylogenetischen Analyse im fastA-Format in das Programm MEGALIN Version 3.1 (DNASStar, Inc., Madison, Wisconsin, USA) exportiert. Die Alinierung der Sequenzen erfolgte nach der Clustal W-Methode (Thompson *et al.*, 1994). Es wurde ein phylogenetischer Baum generiert. Zur Zuordnung der Konsensus-Sequenzen zum Subtyp RSV A bzw. RSV B wurden jeweils ein Prototyp, RSV A Melbourne Australia/2/1961 (GenBank M74568) bzw. RSV B1 WestVirginia/14617/1985 (GenBank AF013254) aus der GenBank (National Center for Biotechnology Information, 2008) zum direkten Vergleich eingefügt (siehe **Abbildung 15**).

2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test bzw. der Chi-Quadrat-Test verwendet. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 ADV

3.1.1 Vergleich des ADV-Nachweises mittels IFT und Resplex I Panel

Im Rahmen der Resplex-Evaluierung wurden insgesamt 71 Proben untersucht, für die zuvor der IFT ein positives (n=68) oder fraglich positives (n=3) Ergebnis für ADV-Antigen ergeben hatte. Im Resplex-Testsystem werden zum Nachweis von Adenoviren zwei verschiedene Mikrokügelchen verwendet, die für die Detektion von ADV B und ADV E vorgesehen sind. Das Testsystem liefert für beide Mikrokügelchen „Beadcounts“, so dass sich daraus für ADV zwei quantitative Resplex-Messwerte ergeben. Diese beiden quantitativen Ergebnisse wurden für den Testvergleich als ein qualitatives Ergebnis zusammengefasst (siehe **Tabelle 6**). Von den insgesamt 71 Proben ergaben sich mit Resplex nur 38 (54%) positive ADV-DNA-Ergebnisse, die alle durch die ADV B-Mikrokügelchen angezeigt wurden. Alle „Beadcounts“ mit ADV E-Mikrokügelchen lagen unterhalb des Cut-offs (siehe **Tabelle 6**).

Um die Anwendbarkeit des Resplex I Panels im vorliegenden Kollektiv besser beurteilen zu können, wurde eine Ursachensuche für die deutliche Diskrepanz zwischen den ADV-Ergebnissen mittels IFT und den qualitativen ADV-Ergebnissen mit Resplex durchgeführt. Dazu wurden zunächst ADV-Typisierungen aus den 71 Proben durchgeführt.

3.1.2 Vergleich des ADV-Nachweises mittels IFT und Sequenzierung

Von den 71 IFT-positiven Proben wurden 65 (92%) in der Typisierungs-PCR als positiv bestätigt und weiter analysiert (siehe **Abbildung 7** für ein repräsentatives Beispiel).

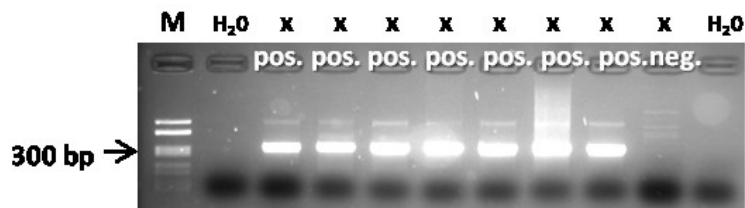


Abbildung 7, Foto einer repräsentativen Gelelektrophorese der Produkte der Adhex1_2deg-PCR (Allard *et al.*, 2001) nach Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht – Die erwartete Produkt-Größe von ca. 300 bp ist mit Pfeil markiert; „pos.“ markiert die als positiv gewerteten Produkte, „neg.“ markiert die als negativ gewerteten Produkte; Spur 1: „M“ markiert den Marker zur Identifikation des Molekulargewichts, Spur 3 - 10: „X“ markiert Patientenproben, Spur 2 und 11: „H₂O“ markiert die Negativkontrollen.

Für die sechs Proben, die mittels IFT positiv (n=4) oder fraglich positiv (n=2) getestet worden waren, aber in der Sequenzierungs-PCR negativ waren, erfolgte eine weitere Abklärung durch Testung in der Routine-ADV-PCR des Virusdiagnostik-Labors. Dabei handelt es sich um eine Realtime-PCR zum qualitativen und quantitativen Nachweis aller ADV-Typen wie von Heim *et al.* publiziert (Heim *et al.*, 2003), deren Nachweisgrenze gemäß laborinterner Validierung ca. 300 Kopien/ml beträgt. In dieser Realtime-PCR wurden fünf der sechs Proben als negativ bestätigt, darunter die zwei fraglich positiven IFT-Ergebnisse. Bei einer Probe konnte eine sehr niedrige Viruslast im Bereich der Nachweisgrenze der Routine-ADV-PCR (ca. 300 Kopien/ml) nachgewiesen werden (vergleiche **Tabelle 6**).

Von den 68 Proben, die initial im ADV-IFT als positiv getestet worden waren, konnte das positive Ergebnis somit in drei Fällen mit der Typisierungs- und Routine-Realtime-PCR nicht bestätigt werden. Diese drei Proben wurden daher als falsch positiv im IFT eingestuft. Richtig positiv im IFT waren 65 von 68 Proben. Somit lag der positive Vorhersagewert des IFT für die hier untersuchten Patientenproben bei 95,6%. Die Sensitivität und Spezifität des IFT konnte nicht berechnet werden, da die Anzahl der im IFT falsch bzw. richtig negativen Proben nicht bekannt war.

Material-nummer	IFT	Resplex			Sequenzierung		Routine-PCR
		quant. ADVB	quant. ADVE	qual.	Spezies	Typ	
2004012314	positiv	1098	6	positiv	B	3	n.d.
2004021285	positiv	922	15	positiv	C	2	n.d.
2004021731	positiv	2	10	neg.	C	2	n.d.
2004025378	positiv	11	1	neg.	C	5	n.d.
2004025638	positiv	1253	0	positiv	B	3	n.d.
2004025852	positiv	1470	28	positiv	B	3	n.d.
2004026653	positiv	1464	10	positiv	B	3	n.d.
2004028362	positiv	6	7	neg.	C	1	n.d.
2004031198	positiv	1658	0	positiv	B	3	n.d.
2004031446	positiv	1419	19	positiv	B	3	n.d.
2005001034	positiv	1212	9	positiv	B	3	n.d.
2005002002	positiv	10	12	neg.	C	1	n.d.
2005005644	positiv	2252	0	positiv	B	3	n.d.
2005007534	positiv	3	10	neg.	C	2	n.d.
2005007844	positiv	2111	20	positiv	B	3	n.d.
2005008110	positiv	1047	4	positiv	B	3	n.d.
2005008721	positiv	1920	18	positiv	B	3	n.d.
2005008837	positiv	1986	12	positiv	B	3	n.d.
2005010112	positiv	9	32	neg.	C	1	n.d.
2005010230	positiv	14	26	neg.	C	2	n.d.
2005010720	positiv	2479	30	positiv	B	3	n.d.
2005011742	positiv	2046	5	positiv	B	3	n.d.
2005013355	positiv	26	5	neg.	C	2	n.d.
2005013410	positiv	1994	5	positiv	B	3	n.d.
2005014833	positiv	1747	15	positiv	B	3	n.d.
2005015648	positiv	1402	0	positiv	B	3	n.d.
2005018502	positiv	2065	0	positiv	B	3	n.d.
2006023634	positiv	12	11	neg.	neg.	neg.	positiv
2006024126	fragl.	17	24	neg.	C	n.d.	n.d.
2006027336	fragl.	26	14	neg.	neg.	neg.	neg.
2006027775	positiv	21	17	neg.	C	2	n.d.
2006028268	positiv	31	16	neg.	C	2	n.d.
2006028392	fragl.	8	18	neg.	neg.	neg.	neg.
2006030233	positiv	11	7	neg.	C	2	n.d.
2006030876	positiv	878	4	positiv	B	3	n.d.
2007000236	positiv	16	8	neg.	C	2	n.d.
2007000984	positiv	5	0	neg.	C	1	n.d.
2007001531	positiv	2	0	neg.	C	2	n.d.
2007001815	positiv	10	0	neg.		5	n.d.
2007003941	positiv	26	5	neg.	C	1	n.d.
2007004464	positiv	19	12	neg.	neg.	neg.	neg.
2007005896	positiv	1756	21	positiv	B	3	n.d.
2007006517	positiv	18	23	neg.	C	2	n.d.

Material- nummer	IFT	Resplex			Sequenzierung		Routine- PCR
		quant. ADVB	quant. ADVE	qual.	Spezies	Typ	
2007006916	positiv	5	0	neg.	C	1	n.d.
2007006918	positiv	11	1	neg.	C	2	n.d.
2007008937	positiv	1975	34	positiv	B	3	n.d.
2007009104	positiv	1501	9	positiv	B	3	n.d.
2007009163	positiv	1473	20	positiv	B	3	n.d.
2007009827	positiv	1446	11	positiv	B	3	n.d.
2007010952	positiv	19	9	neg.	C	1	n.d.
2007011083	positiv	6	8	neg.	C	2	n.d.
2007011364	positiv	1557	22	positiv	B	3	n.d.
2007011629	positiv	17	18	neg.	C	2	n.d.
2007012031	positiv	1315	14	positiv	B	3	n.d.
2007012242	positiv	1742	14	positiv	B	3	n.d.
2007013154	positiv	0	13	neg.	C	2	n.d.
2007013632	positiv	22	12	neg.	C	2	n.d.
2007014108	positiv	1547	5	positiv	B	3	n.d.
2007016045	positiv	1959	13	positiv	B	3	n.d.
2007016727	positiv	1236	8	positiv	B	3	n.d.
2007026064	positiv	1143	1	positiv	B	7	n.d.
2007030226	positiv	845	21	positiv	B	7	n.d.
2008000448	positiv	1494	7	positiv	B	3	n.d.
2008001291	positiv	878	8	positiv	B	3	n.d.
2008001619	positiv	2152	19	positiv	B	3	n.d.
2008002261	positiv	0	2	neg.	neg.	neg.	neg.
2008002287	positiv	1936	0	positiv	B	3	n.d.
2008002553	positiv	3053	4	positiv	B	3	n.d.
2008003927	positiv	19	20	neg.	C	1	n.d.
2008003928	positiv	20	5	neg.	C	2	n.d.
2008004044	positiv	10	1	neg.	neg.	neg.	neg.

Tabelle 6, Vergleich des ADV-Nachweises mittels IFT, Resplex I Panel, Sequenzierung und Routine-PCR - Bei den Materialnummern handelt es sich um Nummern, welche im Rahmen der Routinediagnostik jeder Probe bei Eingang ins Labor zugeordnet wurden. Die im IFT auf ADV-Antigene positiv getesteten Proben sind mit „positiv“ gekennzeichnet, die als fraglich getesteten Proben mit „fragl.“. Bei den quantitativen („quant.“) Resplex-Ergebnissen handelt es sich um die „Beadcounts“ (vgl. 1.4.2) getrennt nach ADVB und ADVE. Der „cut off“ für die „Beadcounts“ wurde laborintern bei 100 festgelegt, d. h. Proben mit ≥ 100 „Beadcounts“ wurden als ADV-positiv gewertet. Die qualitativen („qual.“) Resplex-Ergebnisse beziehen sich auf ADVB und ADVE. Sofern die Typisierungs-PCR erfolgreich war, wurde eine Sequenzierung und damit Einteilung in Spezies bzw. Typ möglich. In der Sequenzierungs-PCR negative Proben konnten nicht typisiert werden und sind somit mit „neg.“ bezüglich Spezies und Subtyp gekennzeichnet. Bei einer Probe (2006024126) war die Zuordnung des Typs wegen fehlenden Materials nicht möglich. Diese wird daher mit „n.d.“ gekennzeichnet. Die Ergebnisse der ADV-Routine-PCR sind mit „neg.“ für negative Ergebnisse, sowie „positiv“ für positive PCR-Ergebnisse gekennzeichnet, wobei „n.d.“ die Proben kennzeichnet, bei denen keine Routine-PCR durchgeführt wurde.

3.1.3 Prävalenz der Typen

Alle 65 in der Typisierungs-PCR positiven Proben wurden sequenziert und erfolgreich einer ADV-Spezies zugewiesen. Insgesamt 57% (n=37) wurden der Spezies B zugeordnet (siehe **Tabelle 7**). Spezies B waren ausschließlich B1-Typen, darunter 35 ADV 3 und zwei ADV 7 (vergleiche **Tabelle 1**). Die restlichen 43% (n=28) wurden als C-Spezies identifiziert. Davon wurden acht als ADV 1 und 17 Sequenzen als ADV 2 eingeordnet. Die übrigen drei Sequenzen der Spezies C konnten nach dem Prinzip von Madisch *et al.* (Madisch *et al.*, 2006) nicht eindeutig typisiert werden, da sich die Sequenz zu wenig vom nächsthomologen Prototyp unterschied ($\leq 1,5\%$; siehe **Abbildung 6**). Von diesen Sequenzen wurden zwei deswegen in einer zusätzlichen Reaktion mit C-Typ-Primern sequenziert, welche beide als ADV 5 identifizierte. Bei einer Sequenz war dies wegen fehlenden Restmaterials nicht möglich. Diese Sequenz wurde deswegen als „ADV 1/2/5/6-Typ“ in **Tabelle 7** aufgeführt und in der Auswertung bezüglich der Typen nicht berücksichtigt.

Spezies/ Serotyp	05 – 12/ 2004	01 – 07/ 2005	08 – 12/ 2006	01 – 12/ 2007	01 – 02/ 2008	Gesamt
	n	n	n	n	n	n
B	6 60%	12 71%	1 20%	13 50%	5 71%	37 57%
ADV 3	6	12	1	11	5	35
ADV 7	0	0	0	2	0	2
C	4 40%	5 29%	4 80%	13 50%	2 29%	28 43%
ADV 1	1	2	0	4	1	8
ADV 2	2	3	3	8	1	17
ADV 5	1	0	0	1	0	2
ADV1/2/5/6	0	0	1	0	0	1
Gesamt	10 15%	17 26%	5 8%	26 40%	7 11%	65 100%

Tabelle 7, Relative sowie absolute Verteilung der typisierten ADV-Spezies sowie deren Typen in den Jahren 2004 - 2008 – Die genaue Typ-Zuordnung einer ADV C-Probe war wegen fehlenden Materials nicht möglich. Diese wird hier als „ADV 1/2/5/6“ aufgeführt. Für die gesamte Tabelle gilt zu beachten, dass im Zeitraum 2004 bis 2008 keine Proben von August 2005 bis Juli 2006, sowie von August 2007 typisiert wurden.

3.1.4 Vergleich des ADV-Nachweises mittels Resplex I Panel und Sequenzierung

Der Vergleich der Sequenzierungs- mit den Resplex-Ergebnissen zeigte, dass es sich bei 37 der 38 von Resplex als ADV B erkannten Proben um Spezies B handelte (siehe **Tabelle 8**). Somit wurden alle als ADV B sequenzierten Proben auch von Resplex als ADV B erkannt. Allerdings verkannte es ein ADV C als ADV B (Probe 2004021285, siehe **Tabelle 6**). Die Sensitivität und Spezifität von Resplex für den Nachweis von ADV B, verglichen mit der Typisierung durch Sequenzierung, lag im hier untersuchten Kollektiv somit bei 100% bzw. 96,4%.

Weiterhin zeigte der Vergleich, dass es sich bei den restlichen 27 Proben, welche mittels Resplex negativ waren, um Spezies C handelt. Für die Detektion dieser Spezies ist das Resplex Panel nicht ausgelegt. Bis auf den Nachweis der ADV C-Probe 2004021285 durch die ADV B-Mikrokügelchen von Resplex war eine kreuzreaktive Erfassung von Nicht-ADV B-Typen durch die ADV B-Mikrokügelchen von Resplex nicht erkennbar. Ebenso war keine kreuzreaktive Erfassung von Nicht-ADV E-Typen durch die ADV E-Mikrokügelchen erkennbar.

Resplex \ Seq.	Spezies B	Spezies C	neg.	Gesamt
ADV B	37	1	0	38
ADV E	0	0	0	0
neg.	0	27	6	33
Gesamt	37	28	6	71

Tabelle 8, Gegenüberstellung der detektierten Spezies im Probenkollektiv mittels Resplex bzw. Sequenzierung - Das Resplex Panel erkennt alle 37 ADV-Proben, welche als Spezies B sequenziert wurden.

3.1.5 Untersuchung von Ringversuchsproben mittels Resplex

Um die Erfassung von ADV E-Proben durch das Resplex I Panel exemplarisch zu untersuchen, wurden zusätzlich zu den Proben der Routinediagnostik

Proben zur externen Qualitätskontrolle getestet. Dabei handelte es sich um die 12 Proben des „QCMD 2007 Adenovirus DNA Proficiency Programme“. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 9** dargestellt.

Materialnummer	Name	Adenovirustyp	Quantitativer Zielwert (Kopien/ml)	Resplex		
				quant. ADVB	quant. ADVE	qual
2007024156	ADV07-01	ADV B Typ 3	5.000	951	31	positiv
2007024157	ADV07-02	ADV E Typ 4	2.500	26	107	positiv
2007024158	ADV07-03	ADV B Typ 3	50.000	1448	22	positiv
2007024159	ADV07-04	ADV C Typ 1	10.000	18	21	neg.
2007024160	ADV07-05	ADV A Typ 31	100	21	21	neg.
2007024161	ADV07-06	ADV A Typ 31	2.000	21	8	neg.
2007024162	ADV07-07	ADV B Typ 3	500	540	18	positiv
2007024163	ADV07-08	ADV C Typ 1	100.000	20	23	neg.
2007024164	ADV07-09	ADV E Typ 4	2.500	30	94	neg.
2007024165	ADV07-10	negativ	0	30	26	neg.
2007024166	ADV07-11	ADV C Typ 1	100	33	30	neg.
2007024167	ADV07-12	ADV E Typ 4	250	31	18	neg.

Tabelle 9, Untersuchung von Proben zur externen Qualitätskontrolle mit Resplex I Panel - Bei den externen Qualitätskontroll-Proben handelt es sich um das „QCMD 2007 Adenovirus DNA Proficiency Programme“. Bei den quantitativen („quant.“) Resplex-Ergebnissen handelt es sich um die „Beadcounts“ (vgl. 1.4.2) getrennt nach ADVB und ADVE. Der „cut off“ für die „Beadcounts“ wurde laborintern bei 100 festgelegt, d. h. Proben mit ≥ 100 „Beadcounts“ wurden als ADV-positiv gewertet. Werte mit < 100 „Beadcounts“ sind als negativ („neg“) gekennzeichnet. Die qualitativen („qual.“) Resplex-Ergebnisse beziehen sich auf ADVB und ADVE.

Die untersuchten Qualitätskontroll-Proben enthielten vier verschiedene ADV-Typen aus den ADV-Spezies A, B, C und E in unterschiedlichen Mengen. Alle drei ADV B Typ 3-Proben wurden von Resplex gut erkannt mit ADV B-„Beadcounts“ deutlich oberhalb des Cut-offs auch für die Probe mit dem niedrigsten quantitativen Zielwert (Probe ADV07-07, Zielwert 500 Kopien/ml). Demgegenüber lieferten die beiden ADV E Typ 4-Proben nur ein schwach

positives bzw. ein negatives Ergebnis knapp unterhalb des Cut-offs, obwohl der quantitative Zielwert mit 2.500 Kopien/ml deutlich höher als für die ADV B-Probe ADV07-07 lag. Eine Erfassung der ADV A- und ADV-C-Proben durch Resplex war weder mit den ADV B- noch mit den ADV E-Mikrokügelchen erkennbar.

3.1.6 Epidemiologische Hintergrundinformation

3.1.6.1 Verteilung des Spezies im Jahresverlauf

Im Rahmen der Typisierungsuntersuchungen konnten insgesamt 65 Patientenproben einer Spezies zugeordnet werden. Sie stammten aus dem Zeitraum von 2004 bis 2008. Die absolute Zahl der einzelnen Typen, sowie deren zeitliche Verteilung zeigt **Abbildung 8**.

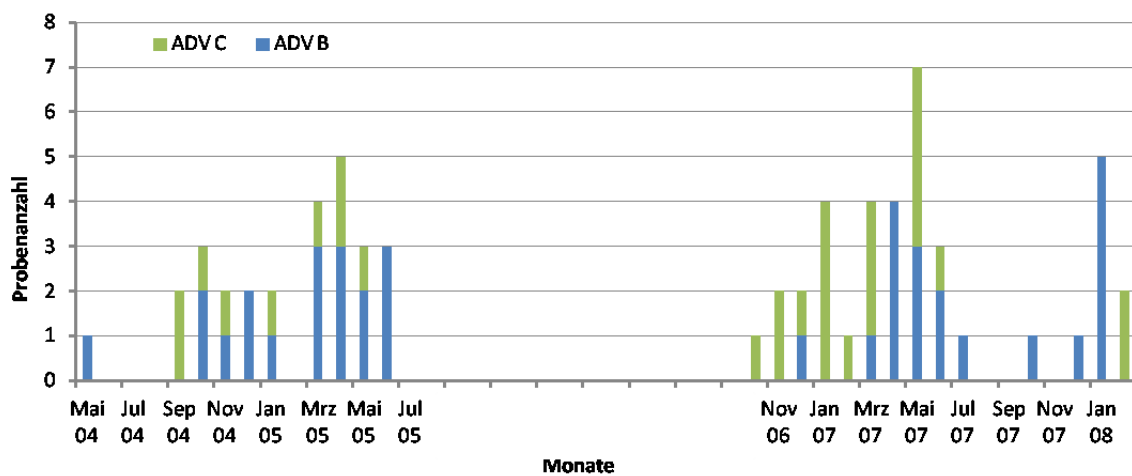


Abbildung 8, Monatliche ADV-Spezies-Verteilung der typisierten ADV-Proben im Zeitraum 2004 bis 2008 - Dabei gilt es zu beachten, dass keine Proben von August 2005 bis Juli 2006 typisiert wurden.

Aus den Monaten März bis Mai 2005 stammten 18% der Proben. Die meisten ADV-Proben (23%) stammten aus dem Monaten März bis Mai 2007.

Spezies B dominierte drei der fünf untersuchten Jahre. Im Jahr 2007 war das Verhältnis zwischen Spezies B und C ausgeglichen. Spezies C wurde lediglich

im Jahr 2006 am häufigsten detektiert (80%; siehe **Abbildung 9**). In diesem Jahr lagen jedoch nur sehr wenige Proben (n=5) vor, die ausschließlich von Kindern unter drei Jahren stammten.

In den vier anderen Jahren stammten bis zu 71% der Sequenzen aus der Spezies B. Seine Dominanz wurde durch ADV 3 (n=35) verursacht, welches 95% der Spezies B ausmachte und mit 54% der am häufigsten detektierte Typ überhaupt war; gefolgt von ADV 2 (n=17; 26%) und ADV 1 (n=8; 12%; siehe **Tabelle 7**), die allerdings Spezies C zugeordnet werden.

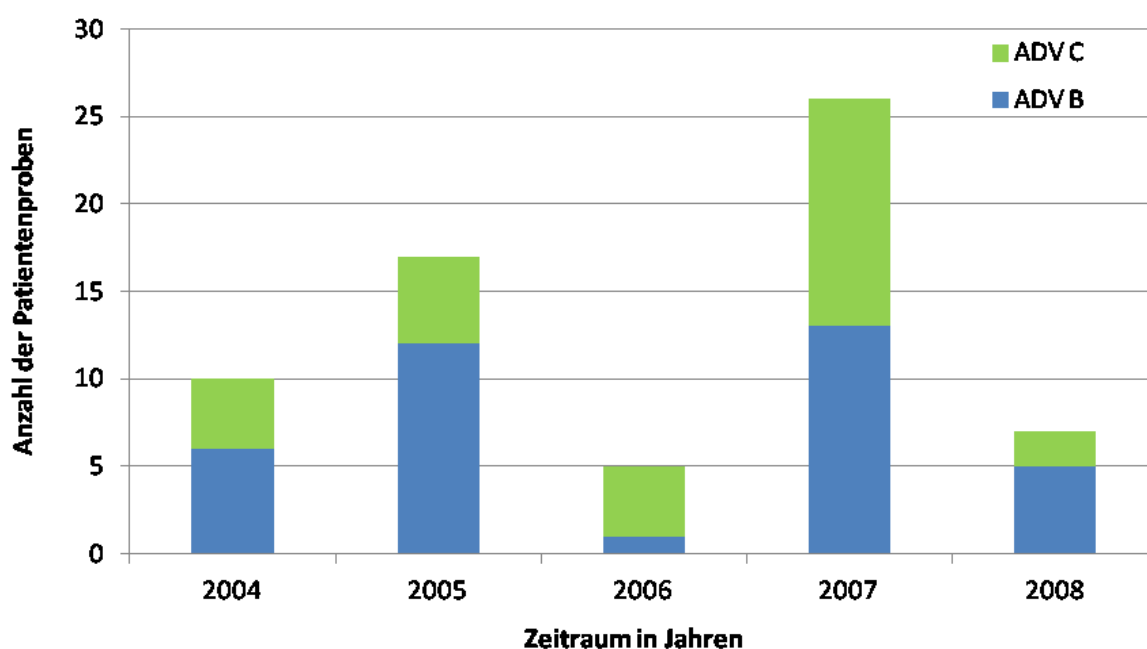


Abbildung 9, Anzahl der ADV-Spezies in den Jahren 2004 bis 2008 – Dabei gilt es zu beachten, dass im gesamten Zeitraum (von 2004 bis 2008) keine Proben von August 2005 bis Juli 2006 typisiert wurden.

3.1.6.2 Patientenkollektiv und Prävalenz der Typen in unterschiedlichem Patientenalter

Die 65 typisierten ADV-positiven Proben stammten von 64 Patienten. Von einem Patienten lagen zwei Proben aus dem gleichen Klinikaufenthalt vor. Diese 64 Patienten waren zu 59% männlich (n=38; siehe **Tabelle 10**). Das mediane Alter lag bei 2,28 Jahren, wobei der jüngste Patient 16 Wochen, der älteste 18 Jahre alt war. Zur Analyse des Kollektivs wurden die Kinder in

Anlehnung an die Einteilung früherer Studien (Gray *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2009) in vier Altersgruppen eingeteilt (siehe **Tabelle 10**). Dabei stammten 72% aller Proben von Kindern unter fünf Jahren.

Lebensjahr	Probenzahl		M		W		ADV B		ADV C	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1.	7	11	2		5		1		6	
2.-3.	29	45	21		8		12		17	
4.-7.	20	31	11		9		16		4	
> 7.	8	13	4		4		7		1	
Gesamt	64	100%	38	59%	26	41%	36	56%	28	44%

Tabelle 10, Verteilung der an ADV erkrankten Patienten in vier Altersgruppen nach Geschlecht und typisierter ADV-Spezies

Nur ein Patient war jünger als sechs Monate und weitere sechs Patienten waren Säuglinge, also jünger als ein Jahr alt. Die größte Altersgruppe (n=29) der Patienten waren Kleinkinder im zweiten und dritten Lebensjahr.

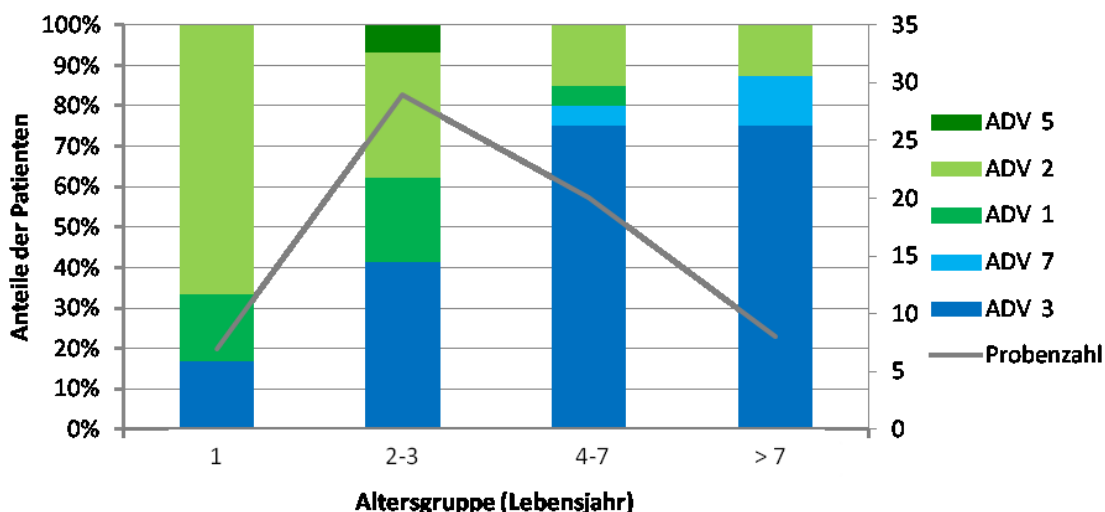


Abbildung 10, Verteilung der ADV-Typen in den vier Altersgruppen – Bei der Typenverteilung handelt es sich um relative Anteile in der jeweiligen Altersgruppe; bei der Probenzahl um absolut detektierte ADV-Proben in der jeweiligen Altersgruppe.

Das mediane Alter der Patienten, bei denen ADV C detektiert wurde, lag bei 1,26 Jahren, das der an ADV B erkrankten bei 4,76 Jahren (siehe **Abbildung 11**). Für ADV C und ADV B ist die Altersverteilung signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

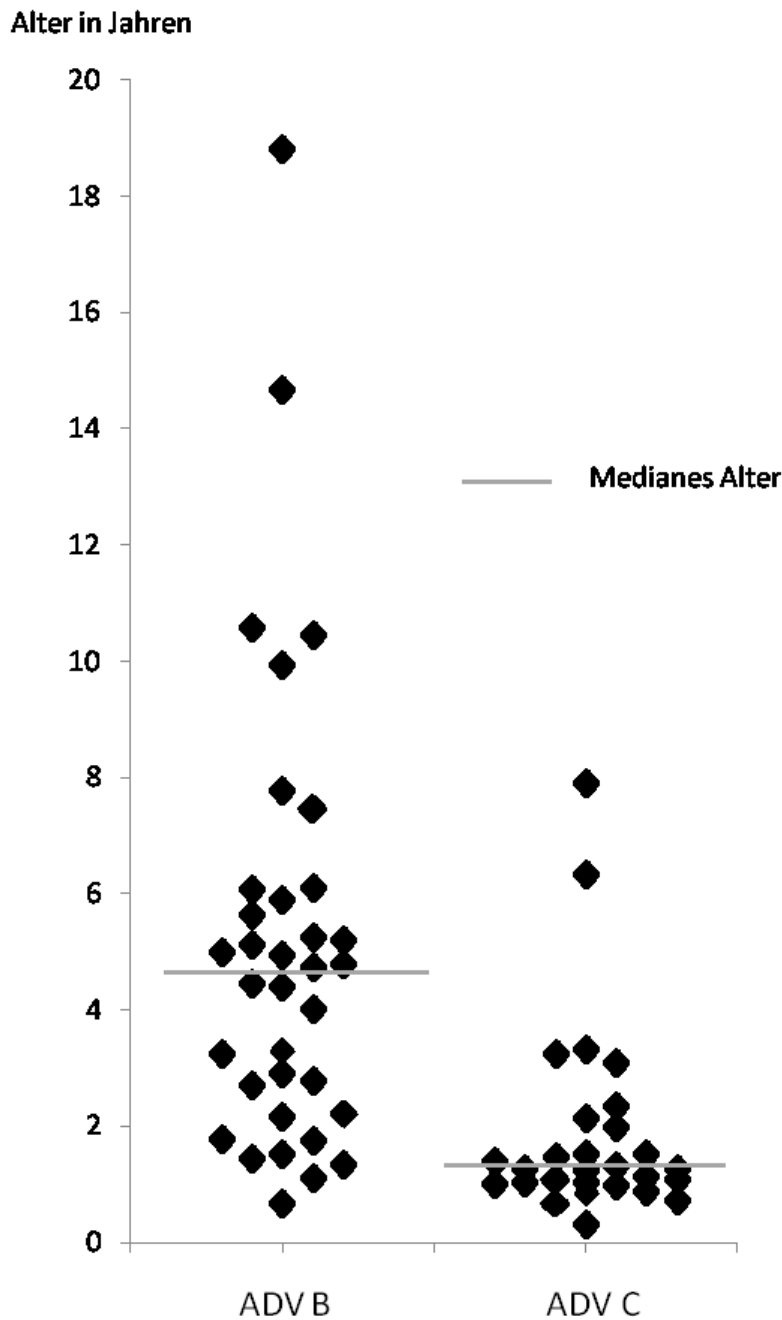


Abbildung 11, Altersverteilung der detektierten ADV-Spezies– Jeder Datenpunkt gibt Alter eines Patienten sowie die Zugehörigkeit seiner typisierten Probe zur ADV-Spezies an.

Dies spiegelt sich in der Verteilung der Infektionen mit ADV B und ADV C in den vier Altersgruppen wieder. Während im ersten Lebensjahr ADV C noch 86% (n=6) der positiven Patientenproben ausmachte, nahm seine relative Häufigkeit gemessen an der Gesamtzahl der positiven Proben mit zunehmendem Alter ab. Dementsprechend nahmen die als ADV B typisierten Proben zu, um bei Kindern über sieben Jahren 88% (n=7) zu erreichen (siehe **Abbildung 10**).

3.1.6.3 Monatliche Verteilung der ADV-Typen im Patientenkollektiv

Die erfolgreich typisierten Isolate stammten aus dem Zeitraum Mai 2004 bis Februar 2008 (siehe **Abbildung 8**). ADV-Infektionen ereigneten sich über das ganze Jahr verteilt außer im Monat August (siehe **Abbildung 12**). ADV B wurde von Oktober bis Januar und von März bis Juli detektiert; ADV C von September bis Juni. Die meisten Isolate stammten aus den Monaten Januar (17%) und Mai (17%), gefolgt von April (14%).

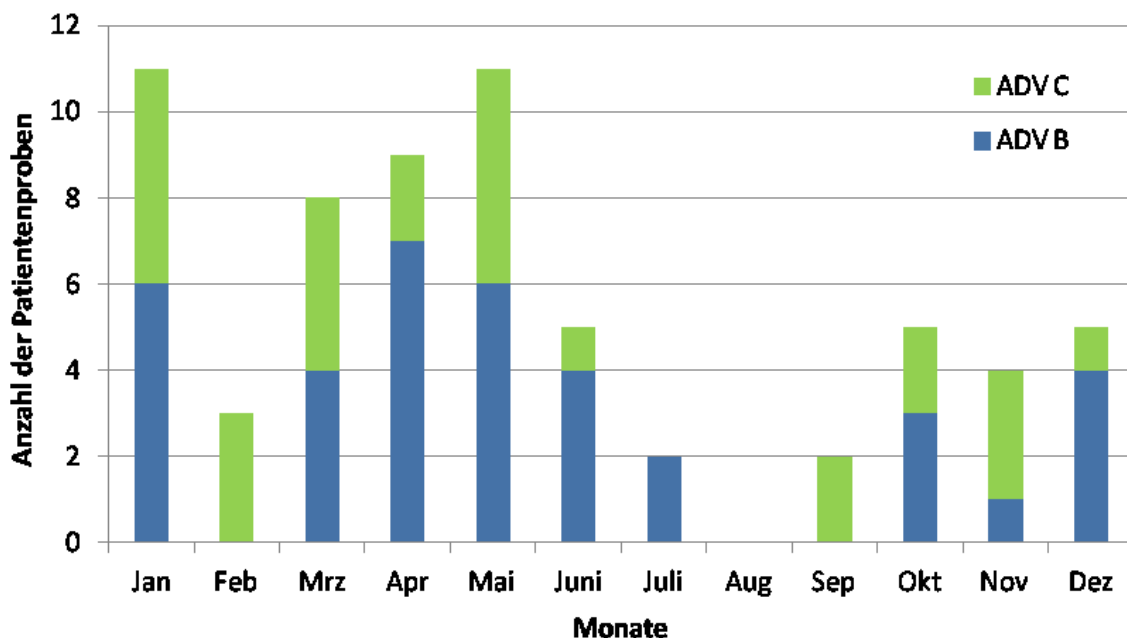


Abbildung 12, Verteilung der detektierten ADV-Spezies im Jahresverlauf in absoluten Werten – Bei der Zahl der typisierten Proben handelt es sich um kumulative Absolut-Werte aus dem gesamten Zeitraum von 2004 bis 2008. Die Gesamtzahl der Proben liegt bei n=65.

3.1.6.4 Klinische Manifestation der Typen

Für 59 der 65 ADV-positiven Patientenproben standen Patientenakten zur Auswertung zur Verfügung. Davon litten 22 (37%) an einer ORTI und 37 (63%) an einer URTI. URTI waren sowohl bei ADV B (n=23; 68%) als auch etwas weniger häufig bei ADV C (n=14; 56%) die gegenüber ORTI überwiegende klinische Manifestation.

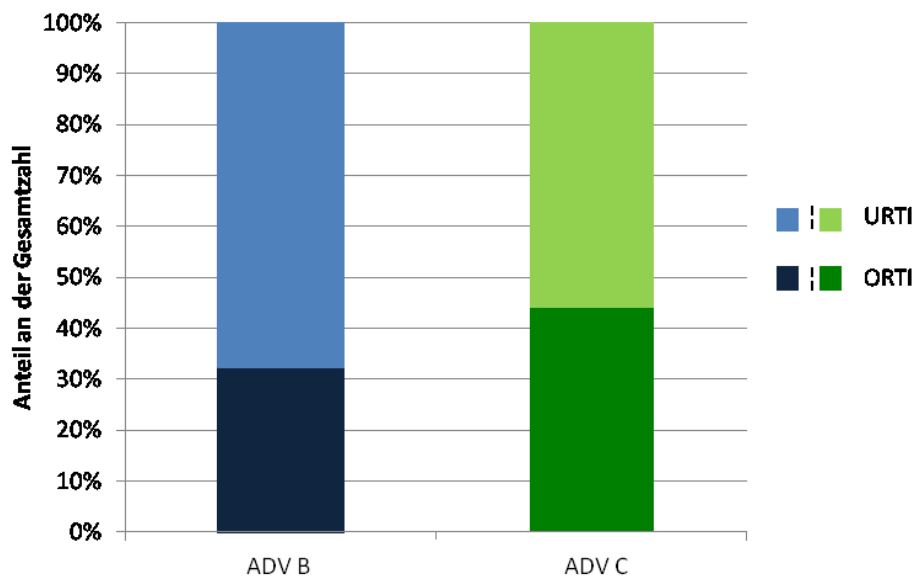


Abbildung 13, Assoziation der ADV-Spezies mit Infektionen des oberen Respirationstrakts (ORTI) bzw. des unteren Respirationstraktes (URTI) – Bei der Anzahl der Spezies handelt es sich um relative Anteile.

Dabei waren unter allen an URTI erkrankten Patienten etwas mehr mit ADV B infiziert. Dies wurde jedoch nicht weiter durch einen Hypothesentest untersucht, da im Overalltest kein Zusammenhang zwischen klinischer Manifestation (URTI bzw. ORTI) und dem Virustyp nachgewiesen werden konnte ($p = 0,84$; Chi-Quadrat-Test).

3.2 RSV

3.2.1 Vergleich des RSV-Nachweises mittels IFT und Resplex II Panel

Im Rahmen der initialen Resplex-Studie, die mit respiratorischen Routineproben aus der Saison 2006/2007 und dem Winter 2008 durchgeführt worden waren, waren 68 Proben getestet worden, für die sich im IFT ein positives Ergebnis für RSV-Antigen ergeben hatte. Im Resplex-Testsystem werden zum Nachweis von RSV zwei verschiedene Mikrokügelchen verwendet, die für die Detektion von RSV A und RSV B vorgesehen sind. Das Testsystem liefert für beide Mikrokügelchen „Beadcounts“, so dass sich daraus für RSV zwei quantitative Resplex-Messwerte ergeben. Diese beiden quantitativen Ergebnisse wurden für den Testvergleich mit dem IFT als ein qualitatives Ergebnis zusammengefasst (siehe **Tabelle 11**).

Bei der initialen Resplex-Studie war eine deutliche Diskrepanz der Testergebnisse von IFT und Resplex aufgefallen: Von den 68 im IFT RSV-positiven Proben konnte das Resplex II Panel nur 28 (41%) bestätigen (siehe **Tabelle 11**). Um diese Diskrepanz weiter abzuklären, wurden die 68 Proben hinsichtlich RSV genauer untersucht. Dazu wurde die Firma Qiagen kontaktiert, welche die Primer fw1 und rev1 zur Verfügung stellte. Diese Primer sollten die Amplifikation und Sequenzierung der RSV-Primer-Bindungsregion des Resplex-Assays ermöglichen. Jedoch wurden von der Firma Qiagen weder Informationen über die genaue Lage der Primerbindungs-Region noch Sequenzdaten zu fw1 und rev1 und zu den Primern und Sonden im Resplex-Assay zur Verfügung gestellt.

Material- nummer	IFT	Resplex				Sequenz- ierung		Routine-PCR	
		quant RSV A	quant. RSV B	qual.	Typ	Typ (fw1/rev1)	qual.	Typ	
2006025508	positiv	35	20	neg.	neg.	B	n.d.		
2006025763	positiv	25	1317	positiv	B	B	n.d.		
2006027921	positiv	5	39	neg.	neg.	B	n.d.		
2006028018	positiv	2	72	neg.	neg.	B	n.d.		
2006028268	positiv	0	393	positiv	B	B	n.d.		
2006028366	positiv	15	1397	positiv	B	B	n.d.		
2006029757	positiv	0	394	positiv	B	B	n.d.		
2006030343	positiv	4	136	positiv	B	B	n.d.		
2006030373	positiv	15	48	neg.	neg.	B	n.d.		
2006030545	positiv	4	6	neg.	neg.	neg.	positiv	B	
2006030868	positiv	32	0	neg.	neg.	A	n.d.		
2006030920	positiv	0	33	neg.	neg.	neg.	positiv	B	
2007000130	positiv	16	13	neg.	neg.	A	n.d.		
2007000157	positiv	0	21	neg.	neg.	neg.	positiv	B	
2007000237	positiv	12	0	neg.	neg.	A	n.d.		
2007000273	positiv	16	91	neg.	neg.	B	n.d.		
2007000349	positiv	979	2	positiv	A	A	n.d.		
2007000448	positiv	0	33	neg.	neg.	neg.	positiv	B	
2007000534	positiv	7	351	positiv	B	B	n.d.		
2007001121	positiv	1	0	neg.	neg.	B	n.d.		
2007001794	positiv	6	15	neg.	neg.	neg.	positiv	B	
2007001795	positiv	2	124	positiv	B	B	n.d.		
2007001936	positiv	19	291	positiv	B	B	n.d.		
2007002163	positiv	21	82	neg.	neg.	B	n.d.		
2007002205	positiv	11	13	neg.	neg.	A	n.d.		
2007002282	positiv	10	20	neg.	neg.	neg.	positiv	B	
2007002340	positiv	0	50	neg.	neg.	neg.	positiv	B	
2007002344	positiv	61	6	neg.	neg.	A	n.d.		
2007002368	positiv	718	0	positiv	A	A	n.d.		
2007002656	positiv	5	27	neg.	neg.	neg.	positiv	A	
2007002657	positiv	13	0	neg.	neg.	A	n.d.		
2007002755	positiv	19	18	neg.	neg.	neg.	positiv	B	
2007002776	positiv	66	2611	positiv	B	B	n.d.		
2007002971	positiv	190	5	positiv	A	A	n.d.		
2007003550	positiv	12	28	neg.	neg.	neg.	positiv	B	
2007003692	positiv	47	1492	positiv	B	B	n.d.		
2007003854	positiv	26	17	neg.	neg.	neg.	positiv	A	
2007003988	positiv	34	51	neg.	neg.	B	n.d.		
2007004100	positiv	238	22	positiv	A	A	n.d.		
2007004245	positiv	11	16	neg.	neg.	A	n.d.		
2007004387	positiv	20	228	positiv	B	B	n.d.		
2007004567	positiv	24	33	neg.	neg.	neg.	positiv	B	

Materialnummer	IFT	Resplex		qual.	Typ	Sequenzierung	Routine-PCR	
		quant RSV A	quant. RSV B			Typ (fw1/rev1)		
2007005262	positiv	0	114	positiv	B	B		n.d.
2007005521	positiv	119	13	positiv	A	A		n.d.
2007005647	positiv	1361	0	positiv	A	A		n.d.
2007005774	positiv	20	1213	positiv	B	B		n.d.
2007005775	positiv	22	17	neg.	neg.	A		n.d.
2007006050	positiv	609	7	positiv	A	A		n.d.
2007006083	positiv	12	25	neg.	neg.	neg.	positiv	B
2007006518	positiv	11	15	neg.	neg.	neg.	positiv	B
2007006915	positiv	8	13	neg.	neg.	neg.	positiv	B
2008001132	positiv	365	1192	positiv	A/B	B		n.d.
2008001738	positiv	637	1726	positiv	A/B	B		n.d.
2008001890	positiv	5	5	neg.	neg.	neg.	positiv	B
2008002314	positiv	12	1223	positiv	B	B		n.d.
2008002676	positiv	2652	32	positiv	A	A		n.d.
2008002677	positiv	2132	12	positiv	A	A		n.d.
2008002908	positiv	12	494	positiv	B	B		n.d.
2008002909	positiv	38	83	neg.	neg.	neg.	positiv	B
2008002951	positiv	13	15	neg.	neg.	neg.	positiv	B
2008003281	positiv	13	68	neg.	neg.	B		n.d.
2008003472	positiv	1	96	neg.	neg.	neg.	positiv	B
2008003476	positiv	112	598	positiv	A/B	B		n.d.
2008003804	positiv	29	63	neg.	neg.	B		n.d.
2008003805	positiv	37	11	neg.	neg.	A		n.d.
2008004044	positiv	0	313	positiv	B	B		n.d.
2008004281	positiv	10	13	neg.	neg.	neg.	positiv	B
2008004282	positiv	2	66	neg.	neg.	B		n.d.

Tabelle 11, Vergleich des RSV-Nachweises mittels IFT, Resplex II Panel, Sequenzierung und Routine-PCR - Bei den Materialnummern handelt es sich um Nummern, welche im Rahmen der Routinediagnostik jeder Probe bei Eingang ins Labor zugeordnet wurden. Alle Proben waren im IFT positiv auf RSV-Antigen getestet worden und sind deswegen mit „positiv“ gekennzeichnet. Bei den quantitativen („quant.“) Resplex-Ergebnissen handelt es sich um die „Beadcounts“ (vgl. 1.4.2) getrennt nach RSV A und RSV B, wobei der „cut off“ laborintern bei 100 festgelegt wurde, also Proben mit ≥ 100 „Beadcounts“ als RSV-positiv gewertet wurden. Die qualitativen („qual.“) Resplex-Ergebnisse beziehen sich auf RSV A und RSV B. Sofern die Typisierungs-PCR mit den Primern fw1/rev1 erfolgreich war, wurde eine Sequenzierung und damit eine Typisierung in RSV A bzw. RSV B möglich. In der Typisierungs-PCR mit fw1/rev1 negative Proben sind mit „neg.“ gekennzeichnet. Diese Proben wurden in der Routine-semi-nested-RSV-PCR untersucht. Proben, bei denen die Routine-semi-nested-RSV-PCR nicht durchgeführt wurde, sind mit „n.d.“ gekennzeichnet. Für positive Proben in der Routine-semi-nested-PCR wurde der RSV-Subtyp durch Sequenzierung des Amplifikats bestimmt.

3.2.2 Vergleich des RSV-Nachweises mittels IFT und Sequenzierung

Von den 68 im IFT positiven Proben waren 48 (71%) in der Typisierungs-PCR mit den Primern fw1/rev1 positiv (siehe **Abbildung 14** für ein repräsentatives Beispiel). Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert.



Abbildung 14, Foto einer repräsentativen Gelelektrophorese der Produkte der RSVfw1_rev1-PCR nach Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht – Die erwartete Produkt-Größe von ca. 700 bp ist mit Pfeil markiert; „positiv“ markiert die als positiv gewerteten Produkte, Spur 1: „M“ markiert den Marker zur Identifikation des Molekulargewichts, Spur 3 - 10: „X“ markiert Patientenproben, Spur 2 und 11: „H₂O“ markiert die Negativkontrollen.

Die 20 in der Typisierungs-PCR mit den Primern fw1/rev1 negativen Proben waren alle auch mit Resplex II Panel negativ getestet worden. Für diese 20 Proben erfolgte eine weitere Abklärung durch Testung in der Routine-RSV-PCR des Virusdiagnostik-Labors. Dabei handelt es sich um eine semi-nested-PCR mit Primern im F-Gen (Henkel *et al.*, 1997). Die Amplifikat-Größe der externen PCR und internen-PCR beträgt 243 bp bzw. 176 bp. In dieser PCR waren alle 20 Proben positiv für RSV-RNA. Somit konnten alle im RSV-IFT positiven Proben mittels PCR als RSV-positiv bestätigt werden. Die höhere Sensitivität der Routine-semi-nested-PCR im Vergleich zur Typisierungs-PCR mit fw1/rev1 sind unter anderem durch das „semi-nested“-PCR-Format sowie durch die deutlich geringere Amplifikat-Länge zu erklären.

3.2.3 Prävalenz der Typen

Alle 48 Proben, die in der Typisierungs-PCR mit fw1/rev1 positiv waren, wurden erfolgreich sequenziert und anschließend einem Sequenzvergleich mit den Prototypen RSV A Melbourne Australia/2/1961 (GenBank M74568) und RSV B1 West Virginia/14617/1985 (GenBank AF013254) aus der GenBank unterzogen (siehe **Abbildung 15**).

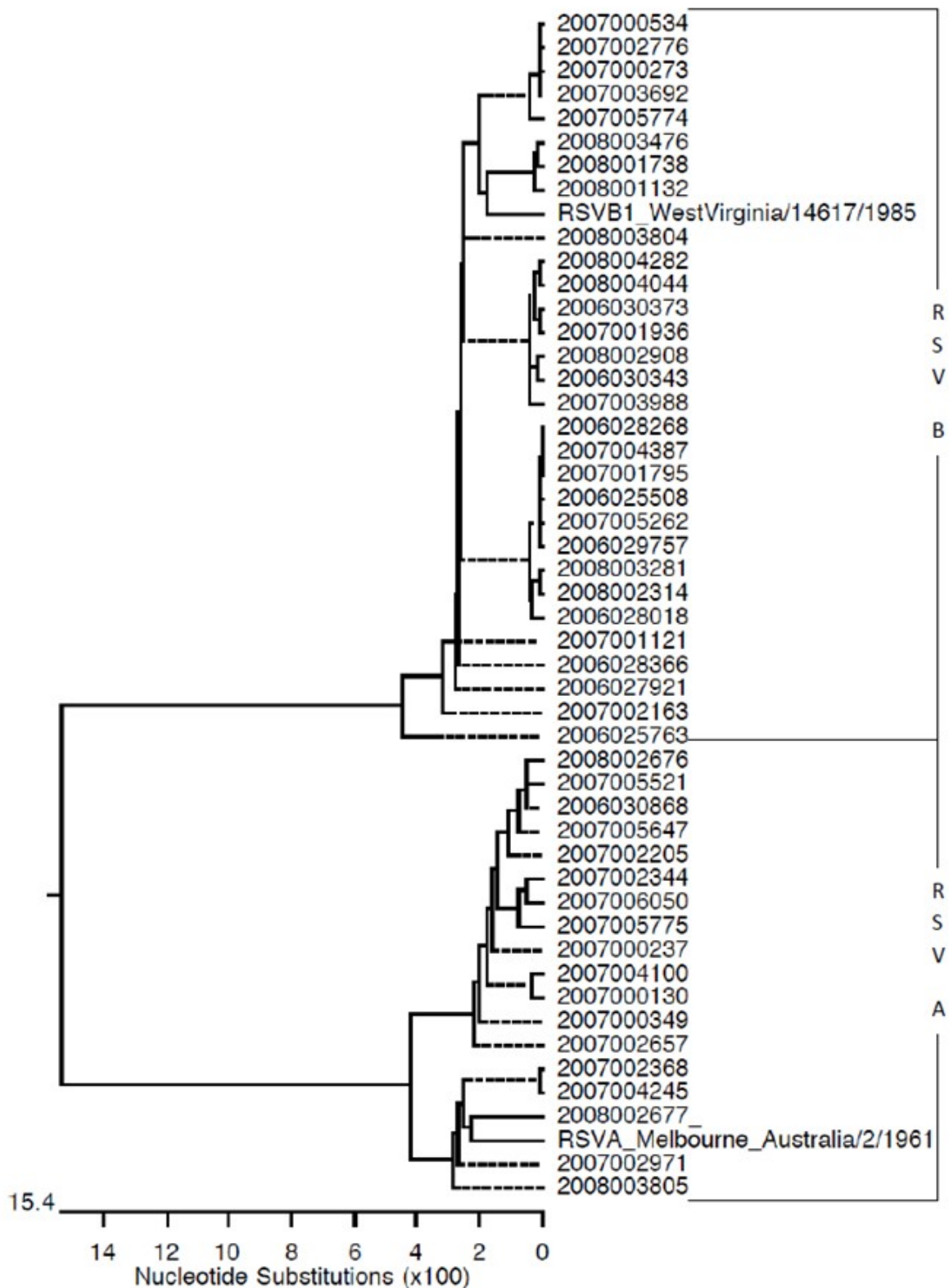


Abbildung 15, Phylogenetischer Baum RSV – Die Einteilung in die beiden Subtypen RSV A (unterer Zweig des Baumes) bzw. RSV B (oberer Zweig) erfolgte durch das Hinzufügen zweier Referenz-Subtypen, RSV A Melbourne Australia/2/1961_M74568 bzw. RSV B1 WestVirginia/14617/1985_AF013254 aus der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>)

Dadurch wurde festgestellt, dass es sich bei der durch die Primer fw1/rev1 amplifizierten Region um das NS1-Gen des RSV handelte. Durch den Sequenzvergleich konnten 37,5% (n=18) der Proben dem Subtyp RSV A und 62,5% (n=30) dem Subtyp RSV B zugeordnet werden (**Tabelle 11**). Für die 20 Proben, die mittels Routine-semi-nested-PCR untersucht wurden, konnte der RSV-Subtyp ebenfalls durch Sequenzierung und Sequenzvergleich festgestellt werden. Es ergab sich RSV A in 10% (n=2) und RSV B in 90% der Fälle. Für alle 68 Proben zusammengenommen wurde somit RSV A in 29,4% (n=20) und RSV B in 70,6% (n=48) der Fälle nachgewiesen.

Aus der Saison 2006 – 2007 (Oktober bis März) stammten 75% aller typisierten Proben (n=51). RSV A war mit 33,3% (n=17) und RSV B mit 66,7% (n=34) vertreten. Im Winter (Januar und Februar) 2008 stellte RSV A 17,6% (n=3) und RSV B 82,4% (n=14) der positiven Proben. Die Verteilung der Subtypen in den beiden Saisons lässt sich in **Tabelle 12** ablesen. RSV B dominierte mit 70,6% (n=48) aller Sequenzen beide saisonale Abschnitte.

Subtyp	10/2006 -03/2007	01/2008 -02/2008	Gesamt
	n	n	n
RSV A	17 33,3%	3 17,6%	20 29,4%
RSV B	34 66,7%	14 82,4%	48 70,6%
Gesamt	51	17	68 100%

Tabelle 12, Anzahl der typisierten RSV-Proben und deren Zugehörigkeit zum Subtyp RSV A bzw. RSV B in der jeweiligen Saison

3.2.4 Vergleich des RSV-Nachweises mittels Resplex II Panel und Sequenzierung bzw. IFT

Das Resplex II Panel liefert getrennte Messwerte für RSV A und RSV B und ist daher dafür konzipiert beide RSV-Subtypen differenziert zu erkennen. Von den

28 Proben, die in der Resplex II-Testung RSV-positiv waren, ergab sich bei 25 Proben eine eindeutige Unterscheidung zwischen RSV A und RSV B. Bei neun Proben waren nur die RSV A „Beadcounts“ positiv, bei 16 Proben waren nur die RSV B „Beadcounts“ positiv (**Tabelle 11**). Bei drei Proben waren sowohl für RSV A als auch für RSV B die „Beadcounts“ oberhalb des Cut-offs und damit positiv. Allerdings war der RSV B-Messwert jeweils deutlich höher als der RSV A-Messwert. In der Annahme, dass die RSV A-Signale auf eine Kreuzreaktion der verwendeten Primer und/oder Sonden zwischen RSV A und RSV B zurückzuführen sein könnten, wurden die Proben für die folgende Auswertung nur als RSV B-positiv gewertet. Interessanterweise stammten alle drei Proben aus dem Zeitraum Januar/Februar 2008.

Resplex \ Seq.	RSV A	RSV B	Gesamt
RSV A	9	0	9
RSV B	0	19	19
neg.	11	29	40
Summe	20	48	68

Tabelle 13, Gegenüberstellung der detektierten RSV-Subtypen im Kinderkollektiv mittels Resplex II bzw. Sequenzierung

Von den 20 Proben, für die sich als Sequenzierungsergebnis RSV A ergeben hatte, waren 45,0% (n=9) auch bei der Resplex II-Testung RSV A-positiv. Von den 48 Proben, die gemäß Sequenzierung RSV B enthielten, waren 39,6% (n=19) bei der Resplex II-Testung RSV B-positiv. Der Unterschied bei der Detektion von RSV A- und RSV B-Proben war statistisch nicht signifikant. Es wurden keine falschen Subtyp-Zuordnungen mit Resplex II beobachtet (siehe **Tabelle 13**).

Aus der Saison 2006/2007 stammten 75,0% (n=51) der Proben (siehe **Tabelle 14**). Von diesen erkannte das Resplex II Panel 39,2% (n=20). Die anderen 60,8% (n=31) der Proben waren falsch negativ. Dabei war ein Unterschied zwischen RSV A- und RSV B-Proben nicht erkennbar (RSV A: 58,8% falsch negativ; RSV B: 61,8% falsch negativ).

Aus dem Zeitraum Januar bis März 2008 stammten 25,0% (n=17) der Proben. Von diesen wurden 47,1% (n=8) mit Resplex als RSV-positiv getestet. Die übrigen waren für RSV A 33,3% (n=1) und für RSV B 57,1% (n=8) der Proben falsch negativ. Dabei ist zu beachten, dass für RSV A die Gesamtfallzahl in diesem Zeitraum sehr klein war (n=3). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeiträumen 2006/2007 und 2008 in der RSV-Nachweisbarkeit durch Resplex war nicht erkennbar.

Resplex II saisonabhängig	Sequenzierung					
	RSV gesamt		RSV A		RSV B	
Gesamt	68		20		48	
2006/2007	51		17		34	
RII positiv	20	39,2%	7	41,2%	13	38,2%
RII neg.	31	60,8%	10	58,8%	21	61,8%
2008	17		3		14	
RII positiv	8	47,1%	2	66,7%	6	42,9%
RII neg.	9	52,9%	1	33,3%	8	57,1%

Tabelle 14, Nachweis von RSV A und RSV B mit dem Resplex II Panel in der Saison 2006/2007 (Oktober bis März) sowie im Winter 2008 (Januar und Februar)

3.2.5 Epidemiologische Hintergrundinformation

3.2.5.1 Patientenkollektiv

Die 68 typisierten RSV-Proben stammten zu 64,7% (n=44) von männlichen Patienten (siehe **Tabelle 15**). Das niedrigste und höchste Alter aller Patienten betrug 24 Tage bzw. acht Jahre. Das mediane Alter lag bei 6,8 Monaten. Dabei waren an RSV A erkrankte Patienten im Median 7,4 Monate, an RSV B erkrankte Patienten 6,6 Monate alt. Anhand des Mann-Whitney-U-Testes konnte die Nullhypothese, dass die Altersverteilung von an RSV A und RSV B erkrankten Patienten gleich ist, nicht abgelehnt werden ($p = 0,62$).

Alter in Lebensmonaten	M	W	RSV A	RSV B	Gesamtzahl	in %
1.-6.	18	13	8	23	31	45,6%
7.-12.	7	5	4	8	12	17,6%
13.-24.	9	2	4	7	11	16,2%
> 24.	10	4	4	10	14	20,6%
Gesamt	44	24	20	48	68	100%

Tabelle 15, Verteilung der an RSV erkrankten Patienten in den vier Altersgruppen nach Geschlecht und RSV-Subtyp

Zur Analyse des Kollektivs wurden die Kinder in von Zlateva *et al.* vorgeschriebene vier Altersgruppen eingeteilt (siehe **Tabelle 15**) (Zlateva *et al.*, 2007).

Die größte Gruppe (n=31; 45,6%) waren Säuglinge im ersten Lebenshalbjahr. Neben diesen jüngsten Patienten stammten weitere 12 Proben (17,6%) von

Kindern aus dem ersten Lebensjahr. Von Kindern aus dem zweiten Lebensjahr stammten 11 Proben (16,2%). Weitere 14 Proben stammten von Kindern jenseits des zweiten Lebensjahres. Insgesamt stammten 63,2% (n=43) aller Proben von Säuglingen im ersten Lebensjahr. Nur eine Probe stammte von einem Kind, das älter als fünf Jahre alt war.

3.2.5.2 Monatliche Verteilung der RSV-Subtypen im Patientenkollektiv

In der monatlichen Verteilung stammten 51 RSV-Patientenproben aus der Saison Oktober 2006 bis März 2007, mit einem Peak im Monat Januar (siehe **Abbildung 16**).

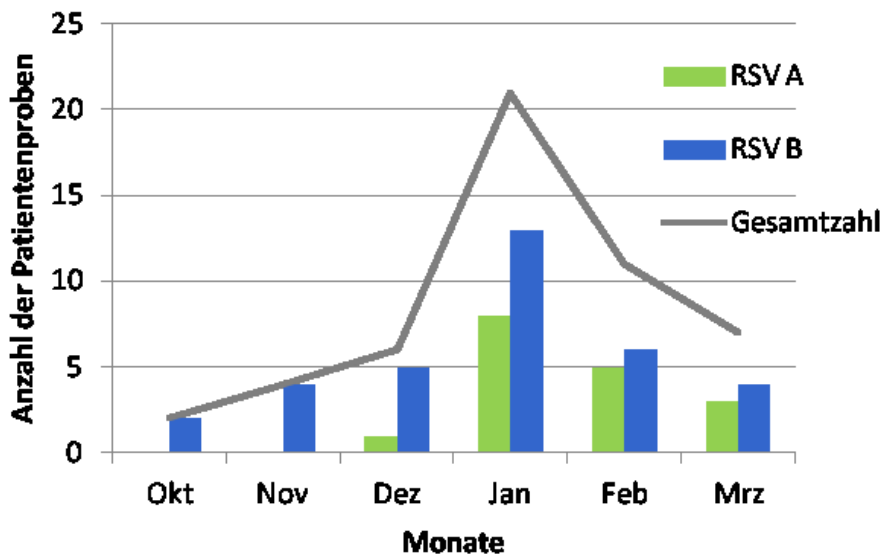


Abbildung 16, Monatliche Prävalenz der RSV-Subtypen in der Saison 2006/2007 – Bei der Zahl der Patientenproben handelt es sich um absolute Werte. Die Gesamtzahl schließt sowohl die detektierten RSV A, als auch RSV B ein.

Subtyp A war in Proben von Dezember bis März vertreten, Subtyp B von Oktober bis März. Aus dem Jahr 2008 standen 17 RSV-positive Proben aus den Monaten Januar und Februar zur Untersuchung zur Verfügung (siehe **Tabelle 12**).

3.2.5.3 Prävalenz der Subtypen in unterschiedlichem Patientenalter

Die Verteilung von Infektionen mit RSV A bzw. B zwischen den vier Altersgruppen variierte nur geringfügig (siehe **Tabelle 15** und **Abbildung 17**). In allen Altersgruppen dominierte RSV B. Der Anteil von RSV B schwankte zwischen 74% bei Kindern im ersten Lebenshalbjahr und 64% bei Kindern im zweiten Lebensjahr.

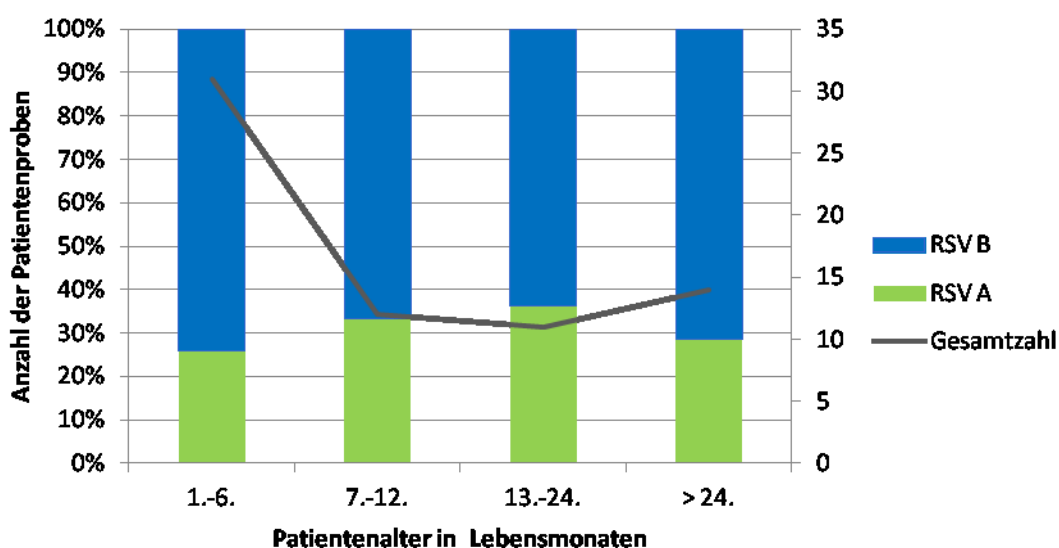


Abbildung 17, Anteile der als RSV A bzw. B typisierten Proben in den vier Altersgruppen – Es handelt sich dabei um relative Anteile der Typen in den vier Altersgruppen. Zur Orientierung ist die absolute Zahl der RSV-Proben in der jeweiligen Altersgruppe als Gesamtzahl integriert.

3.2.5.4 Klinische Manifestation der Subtypen

Zu 37 der 68 Patientenproben aus den Kinderkliniken standen Patientenakten zur Auswertung zur Verfügung. Bei 62% (n=23) von diesen konnte RSV B nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der Kinder (n=33; 89%) waren an einer URTI erkrankt (siehe **Abbildung 18**). Von diesen waren 13 durch RSV A und 20 durch RSV B verursacht. URTI manifestierten sich am häufigsten unter dem Bild einer Pneumonie (n=26; 79%), seltener als Bronchitis bzw. Bronchiolitis (n=7; 21%).

Eine solche Erkrankung der tiefen Atemwege war mit einem durchschnittlichen Klinikaufenthalt von neun Tagen verbunden, wobei die Aufenthaltsdauer von

zwei Tagen bis knapp sieben Wochen variierte. Dabei war die mediane Aufenthaltsdauer von sieben Tagen für Kinder mit RSV A bzw. RSV B identisch.

Die Mediane von CRP und Leukozyten lagen bei 0,90 mg/dl beziehungsweise 11290/ μ l. Von 94% der Kinder war bekannt, dass sie neben supportiver Therapie eine Antibiotikatherapie erhielten. Bei der Mehrzahl (53%) der Kinder, von denen eine Körpertemperatur bekannt war (n=27), lag diese > 38,5°C.

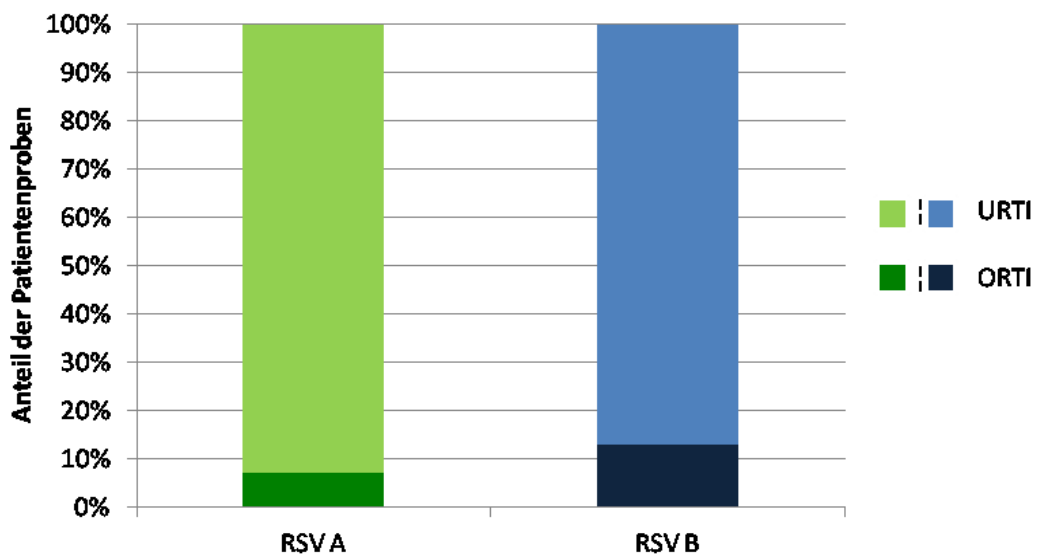


Abbildung 18, Dominanz der Infektionen des unteren Respirationstraktes (URTI) für beide RSV-Subtypen – Es handelt sich dabei um relative Anteile der Infektionen des unteren bzw. des oberen Respirationstrakts (ORTI) in den beiden Spezies.

4 Diskussion

In jüngerer Zeit wurden weltweit vermehrt Anstrengungen unternommen, die infektionsepidemiologische Überwachung verschiedener humanpathogener Krankheitserreger mittels neuer molekularer Detektionsmethoden zu intensivieren. Viele etablierte Methoden sind für die Routinediagnostik zu zeit- und kostenintensiv. In der alltäglichen Diagnostik ist das vorrangige Ziel die Vielzahl der respiratorischen Erreger schnell, präzise und ressourcenarm nachzuweisen. So ist beispielsweise die Anwendung der Zellkultur dadurch eingeschränkt, dass die Anzucht der Viren mehrere Tage bis Wochen in Anspruch nimmt (Robinson and Echavarria, 2007). Molekulare Verfahren, wie PCR, können Erreger wesentlich rascher nachweisen. Allerdings ist es ebenso nicht praktikabel, auf jeden differentialdiagnostisch in Betracht kommenden Erreger mit einer spezifischen molekularen Reaktion zu testen. Denn auch das Durchführen einzelner PCRs für eine Vielzahl von Erregern ist arbeitsintensiv, und die verwendeten Reagenzien sind teuer. Daher ist es notwendig, die spezifischen Reaktionen zu einem breiten molekularen Screeningtest zu vereinen. Vor diesem Hintergrund wurden in den letzten Jahren zahlreiche Multiplex-Panels entwickelt.

Auf der Suche nach einem für das Kinderklinik-Kollektiv geeigneten Screeningtest war im Vorfeld der vorliegenden Arbeit das Resplex Panel im Vergleich zum aktuellen Standard, dem IFT, getestet worden. Die Ergebnisse für ADV und RSV waren dabei deutlich diskrepant: Das Resplex Panel erkannte nur 54% bzw. 41% der im IFT für ADV bzw. RSV-positiven Proben und schien damit im getesteten Kollektiv als Screeningtest ungeeignet (vergleiche **Tabelle 6** und **Tabelle 11**). Zur Klärung der Ursachen dieser Diskrepanz wurde in vorliegender Arbeit eine Sequenzierung der Proben vorgenommen.

4.1 Beurteilung der Anwendbarkeit des Resplex I Panels für ADV im vorliegenden Kollektiv

Das Resplex I Panel ist vom Hersteller für die Detektion der ADV Spezies B und C vorgesehen. Bei der Beurteilung der Anwendbarkeit dieses Testes in der Routine-Diagnostik zeigte sich, dass das Resplex I Panel unter den typisierten Proben zuverlässig (Sensitivität 100%) die ADV Spezies B erkennt. Da unter den 65 typisierten ADV-positiven Proben keine Probe mit ADV Spezies E enthalten war, wurden zum exemplarischen Nachweis von ADV E-Proben kommerzielle Proben zur externen Qualitätskontrolle von QCMD eingesetzt. Dabei handelte es sich um insgesamt 12 Proben, von denen drei gemäß QCMD-Angaben ADV E in enthielten, zweimal mit einem quantitativen Zielwert von 2500 Kopien/ml und eine Probe mit einem quantitativen Zielwert von 250 Kopien/ml. Von den beiden stärker konzentrierten Proben lieferte eine mit Resplex I ein schwach positives Ergebnis knapp oberhalb des Cut-offs, die andere lag knapp unterhalb des Cut-offs (vergleiche **Tabelle 9**). Die dritte Probe lieferte ein klar negatives Ergebnis. Die QCMD-Proben zeigten auch, dass ADV Spezies B sehr gut und ADV A und C nicht durch Resplex I erkannt wurde.

Unter Berücksichtigung der von QCMD angegebenen Zielwerte war erkennbar, dass Resplex I bezogen auf die Kopienzahl ADV B vergleichsweise sensitiver erkennt als ADV E. Für eine unzureichende Optimierung von Primern und Sonden des Resplex I Panels hinsichtlich ADV E oder B als Ursache der Diskrepanz zwischen den IFT- und Resplex-ADV-Ergebnissen ergab sich in der vorliegenden Studie jedoch kein Anhalt. Die Diskrepanz war viel eher auf das limitierte Spektrum des Resplex Panels zurückzuführen: Durch die auf die beiden Spezies ADV B und ADV E beschränkte Detektion erwies sich das Resplex I Panel im vorliegenden Kollektiv (n=65) für die Diagnostik von respiratorischen Infektionen als ungeeignet, da dieses zu 43% (n=28) aus ADV C-Patientenproben bestand (vergleiche **Tabelle 7**). Dies wurde am deutlichsten bei Kindern unter drei Jahren, welche besonders häufig durch ADV C infiziert waren und deren Proben dementsprechend zu 64% (23 ADV C von 36 ADV) falsch negativ waren (vergleiche **Tabelle 10**).

Auch in anderen Kollektiven war eine mangelnde Sensitivität des Resplex I Panels für den Nachweis von ADV in respiratorischen Proben beschrieben worden (siehe **Tabelle 3**). Gharabaghi *et al.* testeten das Resplex Panel im Vergleich zu anderen verfügbaren Multiplex-PCRs, sowie dem Standard, bestehend aus Kultur und IFT an 750 Proben eines Kinderkollektives (Gharabaghi *et al.*, 2011). In dieser Studie wurde für ADV im Vergleich zum Standard eine Sensitivität von nur 71,4% erreicht. Eine andere Untersuchung von Brunstein *et al.* ergab im Vergleich des Resplex Panels gegenüber dem IFT eine Übereinstimmung von weniger als 10% (Brunstein *et al.*, 2008). In beiden Studien wurde die Diskrepanz nicht durch weitere Testung im Sinne einer Typisierung abgeglichen. Allerdings liegt gerade wegen der überwiegend pädiatrischen Kollektiven beider Studien (100% bzw. 80%) die Vermutung nahe, dass die Ursache wahrscheinlich durch das Vorkommen der bei Kindern häufigen Spezies ADV C oder anderen nicht detektierten Spezies zu erklären ist (Brunstein *et al.*, 2008; Gharabaghi *et al.*, 2011).

Für ADV scheint es im Rahmen eines respiratorischen Multiplex-Screeningtests nicht unbedingt notwendig alle Typen zu identifizieren. Vielmehr ist es bedeutsam, die typischen respiratorischen Spezies (vergleiche **Tabelle 1**), insbesondere die im Kollektiv als häufig erwarteten Spezies zu erkennen. Alle im untersuchten Kollektiv nachgewiesenen ADV konnten Spezies B1 und C zugewiesen werden. Sie sind bei Kindern als häufigste respiratorische Erreger bekannt (Cherry, 2004b). Auf dieser Grundlage kann man davon ausgehen, dass ein Multiplex-Panel zur ADV-Typisierung in einem jungen pädiatrischen Kollektiv, wie dem vorliegenden, zuverlässig ADV B und ADV C entdecken müsste, um eine akzeptable Sensitivität bezogen auf alle ADV erreichen zu können. Dieses Spektrum ist jedoch durch das Resplex I Panel nicht gegeben. Eine darüberhinausgehende Ausdehnung des Spektrums zur Detektion der verbleibenden ADV-Spezies (ADV A, D, E, F, G) ist im Kinderklinik-Kollektiv bei respiratorischen Erkrankungen eher zu vernachlässigen, weil diese nicht auftraten.

Neben dem Resplex Panel wurden weitere Multiplex Assays entwickelt (siehe **Tabelle 3**). Von der FDA wurde der xTAG Assay (xTAG respiratory viral panel RVP, Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Kanada) für zwölf respiratorische Viren, darunter RSV und ADV, zugelassen. Für den xTAG Assay hatten Mahony *et al.* für ADV eine Sensitivität von 100% beschrieben (Mahony *et al.*, 2007). Diese konnte allerdings in anderen Studien nicht bestätigt werden (Gadsby *et al.*, 2010; Gharabaghi *et al.*, 2011; Pabbaraju *et al.*, 2008). Auch die weiterentwickelte Variante des von der FDA zugelassenen xTAG-Assays zeigte sich für ADV insensitiv. Ohne dass eine niedrige Viruslast dafür verantwortlich gemacht werden konnte, erkannte die weiterentwickelte Variante ADV mit einer Sensitivität von nur 61,9% bzw. 52,4% (Gadsby *et al.*, 2010; Gharabaghi *et al.*, 2011).

Eine weitere in Entwicklung befindliche Multiplex-PCR, das MultiCode-PLx-Panel (EraGen Bioscience, Madison, Wisconsin, USA; vergleiche **Tabelle 3**), erkennt von ADV neben den Spezies B und E, welche auch vom Resplex Panel detektiert werden, die im Kinderkollektiv so häufige Spezies ADV C. Vorangegangene Studien attestierten diesem Test für ADV eine Sensitivität von 100% (Arens *et al.*, 2010; Marshall *et al.*, 2007). Er könnte damit im vorliegenden Kollektiv eine gute alternative Möglichkeit zur Detektion der ADV-positiven Proben zu sein.

4.2 Beurteilung der Anwendbarkeit des Resplex II Panels für RSV im vorliegenden Kollektiv

Für RSV schien das Resplex II Panel als Screeningtest im Kinderklinikkollektiv noch weniger geeignet, weil es weniger als die Hälfte (n=28 von insgesamt 68; 41%) der im IFT für RSV-positiven Proben erkannte (siehe **Tabelle 11**). Das Resplex II Panel ist darauf ausgelegt, beide Subtypen differenziert zu erkennen und sollte daher alle RSV-positiven Proben erkennen können.

RSV hatte sich schon in früheren Resplex-Studien mehrfach als schwer zu detektierender Erreger präsentiert (vergleiche **Tabelle 3**). In einer Studie von

Brunstein *et al.* hatte sich im Vergleich zwischen Resplex II Panel und IFT eine generell akzeptable Übereinstimmung (> 90%) für die meisten Erreger, jedoch eine schlechtere Konkordanz für RSV gezeigt (84%) (Brunstein *et al.*, 2008). Eine andere Arbeit von Li *et al.* testete 360 Proben mittels Resplex II Panel sowie einer weiteren Multiplex-PCR im Vergleich zum Referenzstandard (Singleplex-Realtime-PCR und Kultur). Für beide Multiplex-Assays wurde eine akzeptable Sensitivität für andere respiratorische Erreger nachgewiesen. Allerdings deklarierten Li *et al.* die Sensitivität für RSV als verbesserungswürdig (Li *et al.*, 2007), weil das Resplex II Panel im Vergleich zur Detektionsrate einer Singleplex-Realtime-PCR lediglich 73,3% der Proben als RSV-positiv detektierte. Da in diesen Studien keine Typisierung der Proben zur Klärung der Ursachen unternommen wurde, blieben Gründe für die unzureichende Detektion von RSV unklar.

In vorliegender Arbeit wurde auf der Suche nach Ursachen der Diskrepanz zwischen IFT und Resplex II Panel eine Sequenzierung der Region durchgeführt, in der die Primer und Sonden des Resplex II-Testes binden. Die dazu verwendeten Primer fw1 und rev1 wurden von der Firma Qiagen zur Verfügung gestellt. Mit diesen Primern konnte ein ca. 700 bp großes Fragment amplifiziert werden, welches die NS1-Region sowie die 5'-terminale NS2-Region umfasste. Leider stellte die Firma Qiagen in der Folge keine weiteren Informationen über die Primer und deren Sequenzen zur Verfügung. So blieb letztendlich unklar, ob die Primer fw1/rev1 den in Resplex II enthaltenen RSV-Primern entsprachen, oder durch die Primer ein größeres Genom-Fragment amplifiziert wurde.

Bei der PCR mit den Primern fw1/rev1 war auffallend, dass von den 68 im IFT positiven Proben nur 48 in der fw1/rev1-PCR positiv waren. In der anschließenden Kontrolle der 20 diskrepanten Proben mittels einer semi-nested-PCR zum RSV-RNA-Nachweis zeigten sich diese als positiv. Aufgrund des semi-nested-Formats und weil das Amplifikat mit 243 bp (externe PCR) bzw. 176 bp (interne PCR) deutlich kleiner als das Amplifikat der fw1/rev1-PCR war, ist anzunehmen, dass die semi-nested-PCR sensitiver als die fw1/rev1-

PCR ist. Eine zusätzliche RSV-Realtime-PCR zur Quantifizierung der RSV-RNA war wegen fehlenden Restmaterials nicht möglich. Eine Quantifizierung könnte den Nachweis erbringen, dass es sich bei den 20 Proben, die mittels fw1/rev1-PCR negativ waren, um Proben mit niedriger Viruslast handelt.

Ein Teil der Unterdetektion der RSV-Proben durch das Resplex II Panel ist also möglicherweise auf eine niedrige Viruslast zurückzuführen. Allerdings verbleiben auch abzüglich der Proben mit möglicherweise niedriger Viruslast weitere 20 Proben, die mittels fw1/rev1-PCR erfolgreich amplifiziert werden konnten und dennoch durch das Resplex II Panel nicht erkannt wurden. Damit ist die niedrigere Viruslast als alleinige Erklärung für die schlechte RSV-Detektionsrate (28 von 68 Proben) nicht hinreichend.

So stellte sich die Frage, ob von der Unterdetektion besonders ein Subtyp betroffen ist. In der vorliegenden Arbeit wurden 41% der RSV-Proben durch das Resplex II Panel erkannt, wobei sich dabei für RSV A und RSV B sehr ähnliche Werte (45,0% bzw. 39,6%) ergaben, die nicht auf einen Unterschied zwischen RSV A und RSV B hindeuteten. Damit ist das Resplex II Panel im untersuchten Kollektiv für die Detektion beider Subtypen wegen unzureichender Sensitivität gleichermaßen nicht geeignet.

Als weitere Ursache wären Mutationen im Zeitverlauf denkbar, zumal RSV als RNA-Virus eine weitaus höhere Mutationsrate hat als DNA-Viren, wie z. B. ADV. (Sullender, 2000). Diese Mutationen könnten sich in einer unterschiedlichen Detektionsrate in verschiedenen Saisons bemerkbar machen. Aus der vorliegenden Studie ergab sich jedoch kein Anhalt dafür, dass sich aufgrund dieses sogenannten Antigendrifts die Nachweisbarkeit von RSV durch Resplex II veränderte, denn zwischen den Leistungsdaten des Resplex II Assays im Vergleich zum IFT in beiden saisonalen Abschnitten gab es keine signifikanten Unterschied (60,8% falsch negative Proben in 2006/2007; 52,9% falsch negative Proben in 2008). Allerdings ist diese Studie zur Beurteilung einer durch Neumutationen möglicherweise veränderten Detektionsrate nur eingeschränkt geeignet, da der Untersuchungszeitraum nur zwei aufeinanderfolgende Saisons umfasste.

Ebensowenig wie frühere Studien, in denen keine weiterführende Sequenzierung und Typisierung unternommen wurde (Brunstein *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007), liefert auch die vorliegende Arbeit keine Erklärung für die schlechte Sensitivität von Resplex II beim Nachweis von RSV-RNA. Es ist jedoch am ehesten zu vermuten, dass die RSV-Primer und/oder RSV-Sonden des Resplex II Panels unzureichend optimiert sind. Dieses Problem scheint nicht RSV-Subtyp-abhängig zu sein. Leider stellte die Firma Qiagen keine Informationen über die Sequenzen der verwendeten Primer- und Sonden zur Verfügung. Mit dieser Information wäre es möglich gewesen in den generierten Sequenzdaten nach möglichen Mutationen in den Primer- und Sonden-Bindungsstellen zu forschen und nachweisbare und nicht-nachweisbare RSV-Stämme zu vergleichen. Nach Aussage der Firma Qiagen wurde die RSV-Komponente des Resplex II Panels in einer neuen Testversion überarbeitet. Ob dadurch die Leistungsdaten verbessert wurden, konnte jedoch nicht mehr im Rahmen dieser Studie überprüft werden.

Auf der Suche nach einem geeigneten Screeningtest für respiratorische Infekte verglichen andere Studien das Resplex II Panel sowohl mit Standardmethoden (Kultur, IFT), als auch mit anderen verfügbaren Multiplex-Assays (Balada-Llasat *et al.*, 2011; Gharabaghi *et al.*, 2011). In der Studie von Balada-Llasat *et al.* erkannte das Resplex II Panel verglichen mit dem xTAG-Assay als Referenz nur 75% der RSV-positiven Proben und war damit der alternativen Multiplex-Methode unterlegen. Im Vergleich zur Kultur erkannte das Resplex II Panel 92% aller RSV-positiven Proben dieser Studie. Die Gruppe um Gharabaghi *et al.* testete 750 respiratorische Proben mit verschiedenen Multiplex-Methoden sowie dem IFT als Standardmethode (Gharabaghi *et al.*, 2011). Dabei lag die Sensitivität des Resplex II Panels für RSV bei nur 84%.

Abschließend scheint damit sowohl in vorliegender als auch in anderen Studien das Resplex II Panel zur Detektion von RSV nicht geeignet, weil seine Leistungsdaten weder im Vergleich mit anderen Multiplex-Assays noch im Vergleich mit Standardmethoden überzeugten.

Als alternative Multiplex-Detektionsmethode (siehe auch **Tabelle 3**) beschreiben Gharabaghi *et al.* in ihrer Studie unter anderem den Seeplex RV 15 Assay (Seegene, Inc., Rockville, MD, USA) (Gharabaghi *et al.*, 2011). Dieser zeigt generell gute Leistungsdaten für die durch die meisten IFT Assays detektierten Viren (ADV, RSV, Parainfluenzaviren, Influenza-A- und Influenza-B-Viren), wobei seine Sensitivität für RSV für die 144 getesteten Proben bei 100% lag, während der Resplex-Assay nur 84% der Proben erkannte. Mit Ausnahme von Rhino- und Enteroviren attestiert diese Studie dem Seeplex RV 15 Assay sowohl gegenüber den herkömmlichen Detektionsmethoden als auch gegenüber den anderen Multiplex-PCRs (Resplex Panel, xTAG Assay) Überlegenheit. Somit erscheint der Seeplex RV 15 Assay als mögliche Option eines Screeningtests im vorliegenden Kollektiv.

Als weitere Möglichkeit könnte sich das MultiCode-PLx-Panel (EraGen Bioscience, Madison, Wisconsin, USA) herausstellen, da es generell gute Leistungsdaten in mehreren Studien zeigte, wobei die Sensitivität für RSV jedoch sehr unterschiedlich eingeschätzt wird (vergleiche **Tabelle 3**) (Arens *et al.*, 2010; Marshall *et al.*, 2007; Nolte *et al.*, 2007).

4.3 ADV-Epidemiologie

Die ADV-Infektionen der vorliegenden Studie ereigneten sich im gesamten Jahresverlauf. Die meisten Proben stammten dabei aus den Monaten Oktober bis März (vergleiche **Abbildung 12**). Diese Verteilung bestätigt das bevorzugte Auftreten von respiratorischen ADV-Infektionen im Winterhalbjahr, das in anderen Studien für Breiten gemäßigten Klimas beschrieben worden war. ADV treten dabei generell ganzjährig auf, vermehrt jedoch im Rahmen von Epidemien, die sich zumeist im Winterhalbjahr ereignen (Cherry, 2004b; Mahony, 2008; Modrow, 2003a).

Das Vorkommen von ADV ist ubiquitär, allerdings variieren die Assoziationen unterschiedlicher Subtypen mit entsprechenden Krankheitsbildern, Umweltbedingungen, sowie auch dem Patientenalter (Baum, 2000; Cherry,

2004b). Im untersuchten Kollektiv waren 72% der an ADV erkrankten Patienten jünger als fünf Jahre alt. Darunter befand sich nur ein Säugling unter sechs Monaten (vergleiche **3.1.6.2**). Diese Altersverteilung steht im Einklang mit der internationalen Datenlage, die zeigt, dass Kinder unter fünf Jahren, welche in engem Kontakt zu Gleichaltrigen stehen, prädestiniert für ADV-Infektionen sind. Die niedrige Prävalenz bei Säuglingen im ersten Lebenshalbjahr ist dadurch zu erklären, dass diese noch teilweise durch maternale Antikörper geschützt sind (Cheng *et al.*, 2008; Cherry, 2004b; Hong *et al.*, 2001; Robinson and Echavarria, 2007).

Bei der Typisierung der ADV-positiven Proben wurde im untersuchten Kollektiv nur Spezies B und C gefunden. Dies bestätigt die Daten früherer Arbeiten, in welchen diese beiden Spezies nahezu alle detektierten ADV ausmachten. So identifizierten Yeung *et al.* in 97% ihrer Proben Spezies C (46%) und B1-Typen (51%) (Yeung *et al.*, 2009).

Die im vorliegenden Kollektiv untersuchten Kinder waren dabei am häufigsten (54%) mit ADV 3 infiziert, gefolgt von ADV 2 und ADV 1 (vergleiche **Tabelle 7**). Diese Typen dominierten auch in ähnlichen Kollektiven in anderen Ländern der Welt, wie in Kanada, USA und Taiwan (siehe **Tabelle 16**). Sie sind als häufigste Typen bei Atemwegsinfektionen im Kindesalter bekannt (Hong *et al.*, 2001; Laham *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu anderen Zeiträumen wurde bei den Proben der vorliegenden Studie aus dem Jahr 2006 am häufigsten ADV 2 detektiert (60%; siehe **Tabelle 16**). Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Anzahl der aus diesem Zeitraum getesteten ADV-positiven Proben gering war (n=5). Es ist bekannt, dass die ADV C-Typen 1, 2, 5 und 6 vor allem Kleinkindern infizieren (Baum, 2000; Modrow, 2003a; Robinson and Echavarria, 2007). Die wenigen Proben des Zeitraums 2006 stammten alle von Kindern unter drei Jahren mit einem medianen Alter von 1,14 Jahren. Im restlichen Kollektiv waren die Kinder älter (medianes Alter 2,92 Jahre). Die Unterschiede in der Altersverteilung bei den untersuchten Proben könnte eine Ursache für die Dominanz von ADV 2 bei den Proben aus 2006 sein.

Land Probenanzahl Referenz	ADV Typ	2004	2004 - 05	2005	2006	2006 - 07	2007	2007 - 08	2008
Kanada n=96 (Yeung <i>et al.</i> , 2009)	ADV 1							18%	
	ADV 2							26%	
	ADV 3							46%	
	ADV 14							—	
USA, Houston, Texas n=180 (Laham <i>et al.</i> , 2008)	ADV 1						8%		
	ADV 2						15%		
	ADV 3							54%	
	ADV 14						—		
Taiwan n=172 (Chang <i>et al.</i> , 2008)	ADV 1		4%						
	ADV 2		6%						
	ADV 3		87%						
	ADV 14		—						
Taiwan n=267 (Cheng <i>et al.</i> , 2008)	ADV 1		6%						
	ADV 2		10%						
	ADV 3		81%						
	ADV 14		—						
USA, Connecticut n=183 (Landry <i>et al.</i> , 2009)	ADV 3					78,1%			
Deutschland n=65 (diese Arbeit)	ADV 1	10%		12%	—		15%		14%
	ADV 2	20%		18%	60%		31%		14%
	ADV 3	60%		71%	20%		42%		71%
	ADV 14	—		—	—		—		—

Tabelle 16, Dominierende ADV-Typen in pädiatrischen Kollektiven unterschiedlicher Regionen – Die relativen Zahlen in „%“ beziehen sich dabei jeweils auf die Gesamtzahl (n) an typisierten ADV-Proben im jeweiligen Kollektiv innerhalb der als Spaltenüberschrift angegebenen Zeiträume. Fettgedruckt ist der dominierende Typ. In keinem der Kollektive konnte das im Zusammenhang mit schweren respiratorischen Infekten beschriebene ADV 14 nachgewiesen werden.

Dass jüngere Kinder häufig mit ADV C-Typen infiziert waren, wurde in der vorliegenden Studie auch bei der Gesamtbetrachtung aller typisierten Proben deutlich. Mit zunehmendem Patientenalter wuchs der Anteil der ADV B-positiven Proben (siehe **Abbildung 10**). Zur Analyse des Kollektivs wurden die Kinder in die vier Altersgruppen (siehe **Tabelle 10**) eingeteilt. Für ADV C und ADV B ist die Altersverteilung signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; siehe **Abbildung 11**). Diese unterschiedliche Verteilung beider Spezies in Abhängigkeit vom Alter steht im Einklang mit früheren Studien, bei denen die ADV C infizierten Kinder jünger als Kinder mit ADV B-Infektionen waren (Cheng *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2009).

Des Weiteren wurde beschrieben, dass vor allem Infektionen mit ADV B-Typen 3, 4, 7, 21 in die tiefen Atemwege absteigen können (Baum, 2000; Modrow, 2003a; Robinson and Echavarria, 2007). Dieser Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Studie nicht bestätigt werden. Sowohl für ADV B als auch für ADV C war die URTI gegenüber der ORTI die klinisch dominierende Manifestation. Dabei waren unter allen an URTI erkrankten Patienten mehr mit ADV B infiziert, es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen klinischer Manifestation (URTI bzw. ORTI) und dem Virustyp nachgewiesen werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich bei den selektierten Patienten ausschließlich um hospitalisierte Kinder handelt. Die gewöhnlich leichteren ORTI werden durch diesen Bias zahlenmäßig unterschätzt.

Im vorliegenden Kollektiv konnten keinerlei ungewöhnliche Typen identifiziert werden. Auch in weiteren pädiatrischen Populationen war dieser Nachweis nicht gelungen (siehe **Tabelle 16**) (Laham *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010; Yeung *et al.*, 2009). In anderen Kollektiven zeigte sich jedoch die neubeschriebene Assoziation der bislang für Atemwegsinfektionen untypischen ADV B2-Spezies mit respiratorischen Infekten (CDC, 2007a; Gray and Chorazy, 2009; Gray *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2009; Metzgar *et al.*, 2007; Tate *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009). Gerade schwerwiegende Verläufe machen deutlich, dass ADV als Erreger respiratorischer Infektionen keinesfalls an Bedeutung verloren hat.

4.4 RSV-Epidemiologie

Die RSV-positiven Proben stammten aus zwei saisonalen Abschnitten (vergleiche **3.2.3**), den Monaten 10/2006 – 3/2007 und 1/2008 – 2/2008. Sowohl die Saison 2006/2007 als auch der Winter 2008 wurde von RSV B dominiert, welches bei 66,7% bzw. 82,4% der RSV-positiven Kinder detektiert wurde. Dies steht im Einklang mit zahlreichen anderen Studien, welche die Dominanz eines Subtyps während einer Saison gezeigt hatten (Berner *et al.*, 2001; Mlinaric-Galinovic *et al.*, 2009; Panozzo *et al.*, 2007; Weigl *et al.*, 2000; Weigl *et al.*, 2002b; Zlateva *et al.*, 2007). Es ist bekannt, dass während eines Ausbruches in der Regel sowohl RSV A als auch RSV B zirkulieren. Allerdings variieren deren Verhältnis zueinander, sowie die Häufigkeit der einzelnen Genotypen (Collins and Crowe, 2007; Hall, 2001; Hall, 2004; Hall and McCarthy, 2000; Tang and Crowe, 2007).

Typischerweise alterniert alle ein bis zwei Jahre der Subtyp und auch der regional dominierende Genotyp wechselt, was eine Umgehung der Immunität gegen vorhergehende Stämme vermuten lässt (Collins and Crowe, 2007; Hall, 2004). In Mitteleuropa wurde dabei ein dualer Rhythmus von abwechselnd einer frühen und späten RSV-Saison im Jahresverlauf beschrieben (Mlinaric-Galinovic *et al.*, 2009). Da sich in vorliegender Studie der Untersuchungszeitraum über weniger als zwei Saisons erstreckt, ist es jedoch nicht möglich die Daten auf das Vorliegen eines dualen Rhythmus im Jahresverlauf zu beurteilen. Ein Subtyp-Wechsel zwischen den Zeiträumen 2006/2007 und 2008 hat nicht stattgefunden. Weitergehende Untersuchungen des RSV-Genotyps waren nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Reiche *et al.* typisierten ein großes deutsches Kollektiv von pädiatrischen RSV-Patienten im Zeitraum von 1998 - 2007 (Reiche and Schweiger, 2009). Hier zeigte sich in sieben von neun Saisons eine Dominanz des RSV A-Subtyps, so auch in der Saison 2006/2007 (53% RSV A), was im Gegensatz zur vorliegenden Studie steht, in der diese Saison von RSV B dominiert wurde und RSV A nur in 33,3% der Fälle nachgewiesen wurde (siehe **Tabelle 17**).

Land Probenanzahl Referenz	2001	2001 - 02	2002	2002 - 03	2003	2003 - 04	2004	2004 - 05	2005 - 06	2006 - 07	2008
Argentinien n=353 (Viegas and Mistchenko, 2005)	A 83%		B 71%		A 74%		A 82%				
Kenia n=376 (Scott <i>et al.</i> , 2004)	A 100%		A 98%		B 61%						
Japan n=185 (Sato <i>et al.</i> , 2005)		A 94%		B 83%		A 84%					
Schweden n=216 (Ostlund <i>et al.</i> , 2008)				B 67%							
Belgien n=513 (Zlateva <i>et al.</i> , 2007)		B 85%		A 55%		A 61%		B 76%	A 84%		
Kroatien n=368 (Mlinaric- Galinovic <i>et al.</i> , 2009)										B 73%	
Deutschland n=1426 (Reiche and Schweiger, 2009)		A 67%		B 66%		A 75%		A 80%	A 64%	A 53%	
Deutschland n=68 (diese Arbeit)										B 67%	B 82%

Tabelle 17, Dominierende RSV-Subtypen in pädiatrischen Kollektiven unterschiedlicher Regionen – Untersuchungszeiträume waren respiratorische Saisons der Nordhalbkugel oder Kalenderjahre. Der dominierende Subtyp RSV A bzw. B wird als A bzw. B angegeben. Fettgedruckt sind die mit der vorliegenden Studie vergleichbaren Daten.

Eine mögliche Erklärung liegt in der regionalen Variabilität der zirkulierenden Subtypen, zumal die von Reiche *et al.* beschriebene Dominanz von RSV A in Deutschland in dieser Saison relativ schwach im Vergleich zu den Vorjahren war. Eine große Studie in Kroatien von Mlinaric-Galinovic *et al.* identifizierte im Winterhalbjahr 2006/2007 ebenfalls RSV B als häufigsten Subtyp (73%).

Das saisonale Auftreten, also ein gehäuftes Auftreten der RSV-Infektionen in der kalten Jahreszeit, ist für die gemäßigten Breiten bekannt. Die für RSV typischen Epidemien treten hier von Spätherbst bis Frühling auf. Während dieser Inzidenzpeaks ist RSV für eine beträchtliche Zahl von Krankenhauseinweisungen verantwortlich (Collins and Crowe, 2007; Hall, 2004; Hall and McBride, 2000; Hall and McCarthy, 2000; Iwane *et al.*, 2004; Shay *et al.*, 1999). Für die in vorliegender Arbeit untersuchte Saison 2006/2007 zeichnete sich ein Peak in den Monaten Januar und Februar ab. Zeitgleich war im Großraum Zagreb ein Inzidenzmaximum beschrieben worden (Mlinaric-Galinovic *et al.*, 2009). Auch in der deutschen Studie von Reiche *et. al* ergab sich für die Saison 2006/2007 mit Februar/März ein sehr ähnliches Inzidenzmaximum (Reiche and Schweiger, 2009). **Tabelle 17** fasst jüngere Arbeiten zur RSV-Epidemiologie noch einmal zusammen.

In der vorliegenden Arbeit waren mehr als die Hälfte der Kinder jünger als sechs Monate. Damit ist das mediane Alter des untersuchten Kollektivs mit dem anderer Studien vergleichbar. Es ergibt sich daraus, dass gerade Säuglinge unter einem Jahr häufiger als ältere Kinder von einer symptomatischen RSV-Infektion betroffen sind (Berner *et al.*, 2001; Hall, 2004; Mlinaric-Galinovic *et al.*, 2009; Modrow, 2003b; Ostlund *et al.*, 2008; Terletskaia-Ladwig *et al.*, 2005; Weigl *et al.*, 2002a; Weigl *et al.*, 2002b; Zlateva *et al.*, 2007). RSV verursacht die schwerwiegendsten Infektionen in den ersten Lebenswochen und –monaten, da die mütterlichen Antikörper keinen Schutz vor Infektion gewähren (Hall, 2004; Modrow, 2003b).

Durch das junge mediane Alter und dadurch, dass es sich beim untersuchten Kollektiv ausschließlich um hospitalisierte Kinder handelte, ist der ausgesprochen große Anteil an URTI zu erklären, welcher unter ähnlichen Umständen andernorts ebenfalls beschrieben wurde (Mlinaric-Galinovic *et al.*, 2009; Weigl *et al.*, 2002a) .

Die an RSV erkrankten Kinder des untersuchten Kollektivs wurden im Mittel neun Tage stationär behandelt. Dies steht im Einklang mit der durchschnittlichen Hospitalisierungsdauer von acht bis neun Tagen bei RSV-

assoziierten Atemwegsinfektionen im Kindesalter und der Dauer der stationären Behandlung in anderen deutschen Kliniken (Behrendt *et al.*, 1998; Weigl *et al.*, 2002a). Wie in ähnlichen Kollektiven erhielt die Mehrzahl der Patienten eine Antibiotikatherapie (Weigl *et al.*, 2002a), auch wenn CRP-Wert und Leukozytenzahl durchaus eine virale Ursache der Symptomatik vermuten ließen.

Von den an RSV erkrankten Kindern waren 65% männliche Patienten. Auch in anderen Studien waren überwiegend Jungen an RSV erkrankt (Mlinaric-Galinovic *et al.*, 2009; Ostlund *et al.*, 2008; Weigl *et al.*, 2002a). Die Prädominanz der Jungen unter RSV erkrankten Kindern lässt sich vermutlich auch auf deren generell größere Anfälligkeit für Atemwegsinfekte bei ihren in jüngeren Lebensjahren kleineren Bronchien zurückführen (Mlinaric-Galinovic *et al.*, 2009; Tepper *et al.*, 1986).

4.5 Limitierungen der Studie

Um die Ergebnisse der Studie richtig zu bewerten und einzuordnen, werden im Folgenden einschränkende Aspekte aufgezeigt, welche durch das Studiendesign und die angewandten Methoden bedingt sind.

Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sollte beachtet werden, dass im Rahmen dieser Arbeit ein Kollektiv hospitalisierter pädiatrischer Patienten eines singulären Standorts betrachtet wurde. Für die Studie wurde auf Kinderklinik-Proben der Routinediagnostik zurückgegriffen, welche im Rahmen der Evaluierung des Resplex Panels bereits im Vorfeld der Arbeit getestet worden waren. Es handelt sich also um eine retrospektive Analyse eines nicht eigens für die Studie vorgesehenen Kollektivs. Die Selektion der Proben wurde dadurch getroffen, dass nur solche verwendet wurden, welche bereits im Rahmen der Resplex-Testung ausgewählt worden waren. Dies bedeutet, dass bei der Auswahl der Patientenproben keine Rücksicht auf Vollständigkeit aller verfügbaren Patientenproben des gesamten Beobachtungszeitraums

genommen wurde (vergleiche **Tabelle 4**, sowie **2.1.2**). Daher sind keine belastbaren epidemiologischen Aussagen zu Inzidenz oder Prävalenz möglich.

Es wurden nur hospitalisierte Kinder untersucht, was sich in der hohen Zahl an URTI widerspiegelt, da Kinder mit leichteren Krankheitsverläufen oder gar asymptomatische, ambulant betreute Kinder nicht getestet wurden. Von Erwachsenen wurden keine Proben rekrutiert.

In die Studie wurden nur Proben aufgenommen, welche bereits im IFT positiv auf ADV bzw. RSV getestet worden waren. Daher ist es denkbar, dass Proben mit niedriger Viruslast wegen mangelnder Sensitivität des IFT ausgeschlossen blieben. Es ist anzunehmen, dass bei Anwendung eines sensitiveren Routinediagnostik-Testverfahrens, wie beispielsweise einer Singleplex-PCR, weitere Proben als positiv rekrutiert worden wären, was sich unter Umständen in einer weiter reduzierten Sensitivität des Resplex Panels widerspiegelt hätte.

4.6 Ausblick

Ein Hauptergebnis dieser Studie ist, dass der Resplex-Assay für die Detektion von ADV und RSV im untersuchten Kollektiv wegen mangelnder Sensitivität nicht geeignet ist. Auf der Suche nach einer geeigneten Multiplex-PCR für pädiatrische Kollektive wäre es sicher von Interesse, andere Testsysteme, wie das MultiCode-PLx-Panel oder den Seeplex RV 15 Assay, weiter zu untersuchen und größere Vergleichsstudien mit qualitativer Realtime-PCR und gegebenenfalls Sequenzierung aller detektierten Erreger zu unternehmen.

Weiterhin liefert die Studie epidemiologische Daten über ein vergleichsweise homogenes Kollektiv pädiatrischer Patienten, in dem die zwei dominierenden Typen ADV 3 und ADV 2 für ca. 80% der krankenhauspflchtigen ADV-Erkrankungen verantwortlich sind. Sollte sich diese Konstanz auch über einen längeren Beobachtungszeitraum bestätigen, wäre es relativ einfach neuauftretene Typen zu bemerken. Im untersuchten Zeitraum traten ausschließlich die typischen respiratorischen Spezies B1 und C auf. Es ist

anzunehmen, dass durch eine deutliche Erhöhung der Probenzahl der Nachweis seltener Typen auch im untersuchten Patientenkollektiv gelingen würde. Um allerdings die häufigsten Erreger zu erfassen, würde sich statt der Sequenzierung auch ein Multiplex-Ansatz eignen, der zuverlässig die Typen der Spezies B1 und C differenziert.

Erst die Kenntnis der Typenverteilung definiert die Ziele einer spezifischen Primärprophylaxe in Form einer Impfung. In den USA wurde die jahrelang vom Markt genommene Impfung gegen ADV 4 und ADV 7 für Rekruten wieder aufgenommen. Diese wäre für das untersuchte Kollektiv wegen des hohen Anteils an ADV 3 jedoch ungeeignet. Für die Patienten dieser Studie wäre, wie für Kinder in vielen Regionen der Welt, ein zuverlässiger Impfstoff gegen die Typen der Spezies B1 und C wünschenswert. Dieser könnte die überwiegende Zahl der respiratorischen ADV-Infekte im Kindesalter verhindern.

Trotz jahrelanger Bemühungen gestaltet sich die Entwicklung eines Impfstoffes gegen RSV als schwierig, so dass bis heute keine erfolgreiche Vakzine zur Verfügung steht. Allerdings ist eine konsequente Überwachung der Prävalenz des RSV hilfreich, um die teure Immunglobulin-Prophylaxe bei Risikogruppen rechtzeitig zu Saisonbeginn zu verabreichen.

Wenn die Tendenz zu immer spezifischeren Therapien, wie in vielen Bereichen der Medizin, anhält und gezielte Therapieoptionen gegen ADV und RSV entdeckt werden, könnte eine rasche und regelhafte Typisierung entscheidend an Bedeutung gewinnen. Bei RSV ist bislang noch unklar welche Rolle der Subtyp für den Schweregrad der Erkrankung spielt. Die derzeitige Immunglobulin-Prophylaxe mit Palivizumab richtet sich gegen RSV A und RSV B. Für ADV wurde bereits die Assoziation einzelner Typen mit schwerwiegenden Verläufen beschrieben. Gerade gegen solche Typen wäre eine spezifische Therapie, beispielsweise mit Antikörpern, wünschenswert. Mit deren Verfügbarkeit müsste die Routinediagnostik rasch den ursächlichen Typ identifizieren, um kurzfristig eine Entscheidung für oder gegen den Einsatz des gezielten Therapeutikums zu ermöglichen. Eine rechtzeitige, gezielte Therapie erfordert daher eine schnelle, ebenso präzise Diagnostik. Daher ist es von

entscheidender Bedeutung, zeit- und kosteneffiziente Tests, wie Multiplex-PCRs, zu entwickeln und zu verbessern.

Durch den Einzug der Typisierung in die Routinediagnostik wäre außerdem ein kontinuierliches Monitoring möglich, welches flächendeckende Daten zu räumlicher und zeitlicher Prävalenz der Virustypen dokumentieren könnte. Erst durch repräsentative Daten zur Prävalenz wiederum können häufige Typen als interessantes Ziel für die Entwicklung von Therapeutika identifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: In den letzten Jahren werden in der virologischen Routinediagnostik herkömmliche Methoden, wie der IFT, zunehmend durch neue molekulare Detektionsmethoden ersetzt. Auf der Suche nach einem für das Kinderklinik-Kollektiv geeigneten alternativen Screeningtest war im Vorfeld das Resplex Panel im Vergleich zum aktuellen Standard (IFT) getestet worden. Die Ergebnisse für ADV und RSV waren dabei deutlich diskrepant.

Studiendesign: Zur weiteren Abklärung der diskrepanten Ergebnisse zwischen IFT und Resplex wurden respiratorische Proben aus dem Zeitraum Mai 2004 bis Februar 2008 von Patienten aus Würzburger Kinderkliniken verwendet. Dies umfasste 71 Proben, die im IFT positiv für Adenovirus-Antigen vorgetestet waren, und 68 Proben, die im IFT positiv für RSV-Antigen vorgetestet waren. Für alle Proben lagen Resplex-Ergebnisse vor. Mittels Sequenzierung aus Restmaterial wurden Adenovirus-Typen und RSV-Subtypen bestimmt. IFT-, Resplex- und Typisierungs-Ergebnisse wurden verglichen. Zusätzlich erfolgte eine epidemiologische Auswertung.

Ergebnisse: Das Resplex Panel zeigt sich im vorliegenden pädiatrischen Kollektiv zur Detektion von ADV und RSV aufgrund unterschiedlicher Ursachen als ungeeignet: Für ADV ist sein auf zwei Spezies (ADV B und E) beschränktes Spektrum unzureichend, wodurch es die im Kollektiv häufige ADV C-Spezies (43%) nicht erfasst. Für RSV bedürfen die Primer bzw. Sonden einer Überarbeitung, da das Resplex Panel, verglichen mit dem IFT, wesentlich weniger Proben (41%) als RSV-positiv erkennt.

Bezüglich der Prävalenz der Typen wurde eine für ADV typische Verteilung in Kinderkollektiven (54% ADV 3, 26% ADV 2, 12% ADV 1) nachgewiesen. Betroffen waren vor allem Kinder im Alter von sechs Monaten bis fünf Jahren. Kinder mit ADV C-Infektionen waren signifikant jünger als Kinder mit ADV B-Infektionen. Für RSV zeigte sich in der respiratorischen Saison 2006/2007 und in den Wintermonaten 1 – 2/2008 eine Dominanz von RSV Subtyp B. Betroffen waren vor allem Kinder im ersten Lebensjahr.

Resumé: Die vorliegende Studie bestätigt die unzureichende Detektion von ADV und RSV durch das Resplex Panel, wobei bezüglich ADV ein unzureichendes Spektrum, für RSV unzureichend optimierte Primer und Sonden vermutlich ursächlich sind. Die epidemiologischen Daten stehen mit denen aus anderen Studien an ähnlichen Kollektiven in Einklang.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
A	Ampere
ADV	Adenoviren
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDC	Center for Disease Control and Prevention
cDNA	copy DNA
CRP	C-reaktives Protein
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
Fi	Forward inner Primer
Fo	Forward outer Primer
FSP	Forward Super Primer
fw	forward
H ₂ O	Wasser
IFT	Immunfluoreszenztest
k.A.	keine Angabe
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
n	Anzahl
n.d.	nicht durchgeführt
nm	Nanometer

NRS	Nasenrachensekrete
NS 1/2	Nicht-Struktur-Proteine NS 1 bzw. NS 2 des RSV
NVSN	New Vaccine Surveillance Network
ORTI	Oberer Respirationstrakts-Infektion
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
QCMD	Quality Control for Molecular Diagnostics
rev	reverse
RII	Resplex II Panel
Ri	Reverse inner Primer
RNA	Ribonukleinsäure
Ro	Reverse outer Primer
RSP	Reverse Super Primer
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunden
Seq.	Sequenzierung
SH	small hydrophobic
ss(-)RNA	negative orientierte einzelsträngige Ribonukleinsäure
U	Units
URTI	Untere Respirationstrakts-Infektion
USA	Vereinigten Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
V	Volt

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 , Einteilung der <i>Adenoviridae</i>	2
Abbildung 2 , Hauptstrukturkomponenten eines ADV	3
Abbildung 3 , Einteilung der <i>Paramyxoviridae</i>	11
Abbildung 4 , Hauptstrukturkomponenten eines RSV	13
Abbildung 5 Schematische Darstellung des Resplex-Prinzips.....	21
Abbildung 6 , Flussdiagramm des Schemas zur Typisierung von ADV	31
Abbildung 7 , Foto einer repräsentativen Gelelektrophorese der Produkte der Adhex1_2deg-PCR	41
Abbildung 8 , Verteilung der typisierten ADV-Proben im Zeitraum 2004 bis 2008	47
Abbildung 9 , Absolutes Anzahl der ADV-Spezies in den Jahren 2004 bis 2008	48
Abbildung 10 , Verteilung der ADV-Typen in den vier Altersgruppen	49
Abbildung 11 , Altersverteilung der detektierten ADV-Spezies	50
Abbildung 12 , Verteilung der detektierten ADV-Spezies im Jahresverlauf	51
Abbildung 13 , Assoziation der ADV-Spezies mit Infektionen des oberen Respirationstrakts bzw. des unteren Respirationstraktes	52
Abbildung 14 , Foto einer repräsentativen Gelelektrophorese der Produkte der RSVfw1_rev1-PCR.....	56
Abbildung 15 , Phylogenetischer Baum RSV.....	57
Abbildung 16 , Monatliche Prävalenz der RSV-Subtypen in der Saison 2006 - 2007.	62
Abbildung 17 , Anteile der als RSV A bzw. B typisierten Proben in den vier Altersgruppen.....	63
Abbildung 18 , Dominanz der Infektionen des unteren Respirationstraktes für beide RSV-Subtypen	64

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 , Die verschiedenen ADV-Spezies und deren bevorzugter Gewebetropismus	4
Tabelle 2 , Klinische Manifestationsformen und häufig assoziierte ADV	7
Tabelle 3 , Multiplex-PCRs mit xMAP-Technologie für respiratorische Erreger	24
Tabelle 4 , Zur Typisierung rekrutierte ADV-Proben.	29
Tabelle 5 , Liste der für PCR und Sequenzierung verwendeten Prime	33
Tabelle 6 , Vergleich des ADV-Nachweises mittels IFT, Resplex I Panel, Sequenzierung und Routine-PCR	43
Tabelle 7 , Relative sowie absolute Verteilung der typisierten ADV-Spezies sowie deren Typen in den Jahren 2004 - 2008.	44
Tabelle 8 , Gegenüberstellung der detektierten Spezies im Probenkollektiv mittels Resplex bzw. Sequenzierung.....	45
Tabelle 9 , Untersuchung von Proben zur externen Qualitätskontrolle mit Resplex I Panel	46
Tabelle 10 , Verteilung der an ADV erkrankten Patienten in vier Altersgruppen nach Geschlecht und typisierter ADV-Spezies	49
Tabelle 11 , Vergleich des RSV-Nachweises mittels IFT, Resplex II Panel, Sequenzierung und Routine-PCR	55
Tabelle 12 , Anzahl der typisierten RSV-Proben und deren Zugehörigkeit zum Subtyp RSV A bzw. RSV B in der Saison 2006 bis 2007, sowie in der Saison 2007 bis 2008.....	58
Tabelle 13 , Gegenüberstellung der detektierten RSV-Subtypen im Kinderkollektiv mittels Resplex II bzw. Sequenzierung.....	59
Tabelle 14 , Nachweis von RSV A und RSV B mit dem Resplex II Panel in der Saison 2006/2007 (Oktober bis März) sowie im Winter 2008 (Januar und Februar).....	60
Tabelle 15 , Verteilung der an RSV erkrankten Patienten in den vier Altersgruppen nach Geschlecht und RSV-Subtyp.....	61
Tabelle 16 , Dominierende ADV-Typen in pädiatrischen Kollektiven unterschiedlicher Regionen	74
Tabelle 17 , Dominierende RSV-Subtypen in pädiatrischen Kollektiven unterschiedlicher Regionen	77

9 Literaturverzeichnis

Abbott, 2011. Synagis 100 mg. Abbott Laboratories Ltd, <http://www.fachinfo.de/>, Datum des Seitenaufrufes 2013/03/20.

Adhikary, A.K., Inada, T., Banik, U., Numaga, J., Okabe, N., 2004. Identification of subgenus C adenoviruses by fiber-based multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42, 670-673.

Allard, A., Albinsson, B., Wadell, G., 2001. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 39, 498-505.

Arens, M.Q., Buller, R.S., Rankin, A., Mason, S., Whetsell, A., Agapov, E., Lee, W.M., Storch, G.A., 2010. Comparison of the Eragen Multi-Code Respiratory Virus Panel with conventional viral testing and real-time multiplex PCR assays for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 48, 2387-2395.

Balada-Llasat, J.M., LaRue, H., Kelly, C., Rigali, L., Pancholi, P., 2011. Evaluation of commercial ResPlex II v2.0, MultiCode-PLx, and xTAG respiratory viral panels for the diagnosis of respiratory viral infections in adults. *J Clin Virol* 50, 42-45.

Baum, S.G., 2000. Adenovirus, in: Mandell, G.L. (Ed.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone, pp. 1624-1629.

Behrendt, C.E., Decker, M.D., Burch, D.J., Watson, P.H., 1998. International variation in the management of infants hospitalized with respiratory syncytial virus. International RSV Study Group. *Eur J Pediatr* 157, 215-220.

Berk, A.J., 2007. Adenoviridae: The Viruses and Their Replication, in: Knipe, D.M., Fields, B.N. (Eds.), *Fields' virology*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2355-2382.

Berner, R., Schwoerer, F., Schumacher, R.F., Meder, M., Forster, J., 2001. Community and nosocomially acquired respiratory syncytial virus infection in a German paediatric hospital from 1988 to 1999. *Eur J Pediatr* 160, 541-547.

Binn, L.N., Sanchez, J.L., Gaydos, J.C., 2007. Emergence of adenovirus type 14 in US military recruits--a new challenge. *J Infect Dis* 196, 1436-1437.

Blount, R.E., Jr., Morris, J.A., Savage, R.E., 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 92, 544-549.

Bordley, W.C., Viswanathan, M., King, V.J., Sutton, S.F., Jackman, A.M., Sterling, L., Lohr, K.N., 2004. Diagnosis and testing in bronchiolitis: a systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med* 158, 119-126.

Boyer, K.M., 2004. Nonbacterial Pneumonia, in: Feigin, R.D. (Ed.), *Textbook of pediatric infectious diseases*. Saunders, pp. 286-294.

- Brice, G.T., Drews, S.J., Low, D.E., 2007. Respiratory virus panels for global surveillance of emerging infectious diseases. *J Clin Virol* 40 Suppl 1, S58-60.
- Brunstein, J., Thomas, E., 2006. Direct screening of clinical specimens for multiple respiratory pathogens using the Genaco Respiratory Panels 1 and 2. *Diagn Mol Pathol* 15, 169-173.
- Brunstein, J.D., Cline, C.L., McKinney, S., Thomas, E., 2008. Evidence from multiplex molecular assays for complex multipathogen interactions in acute respiratory infections. *J Clin Microbiol* 46, 97-102.
- Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Black, R.E., 2005. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 365, 1147-1152.
- Caliendo, A.M., 2011. Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 52 Suppl 4, S326-330.
- Cane, P.A., 2001. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 11, 103-116.
- CDC, 2007a. From the Centers for Disease Control and Prevention. Acute respiratory disease associated with adenovirus serotype 14 - four states, 2006-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 56, 1181-1184.
- CDC, C.P., MPH, AL Fowlkes, MPH, E Schneider, MD, LJ Anderson, MD, 2007b. From the Centers for Disease Control and Prevention. Brief report: respiratory syncytial virus activity--United States, July 2006-November 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 56, 1263-1265.
- Chang, S.Y., Lee, C.N., Lin, P.H., Huang, H.H., Chang, L.Y., Ko, W., Chang, S.F., Lee, P.I., Huang, L.M., Kao, C.L., 2008. A community-derived outbreak of adenovirus type 3 in children in Taiwan between 2004 and 2005. *J Med Virol* 80, 102-112.
- Chanock, R., Finberg, L., 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg* 66, 291-300.
- Chapman, R.S., Henderson, F.W., Clyde, W.A., Jr., Collier, A.M., Denny, F.W., 1981. The epidemiology of tracheobronchitis in pediatric practice. *Am J Epidemiol* 114, 786-797.
- Cheng, C.C., Huang, L.M., Kao, C.L., Lee, P.I., Chen, J.M., Lu, C.Y., Lee, C.Y., Chang, S.Y., Chang, L.Y., 2008. Molecular and clinical characteristics of adenoviral infections in Taiwanese children in 2004-2005. *Eur J Pediatr* 167, 633-640.
- Cherry, J.D., 2004a. Acute Bronchitis, in: Feigin, R.D. (Ed.), *Textbook of pediatric infectious diseases*. Saunders, pp. 266-268.

Cherry, J.D., 2004b. Adenoviruses, in: Feigin, R.D. (Ed.), Textbook of pediatric infectious diseases. Saunders, pp. 1843-1856.

Collins, P.L., Crowe, J.E., Jr., 2007. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus, in: Knipe, D.M., Fields, B.N. (Eds.), Fields' virology. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1601-1636.

Dannenber, J., 2007. Präsentation QIAplex Workshop; QIAplex Technology: The Key Feature! Specific Nested PCR and Super Primers.

De Jong, J.C., Osterhaus, A.D., Jones, M.S., Harrach, B., 2008. Human adenovirus type 52: a type 41 in disguise? J Virol 82, 3809; author reply 3809-3810.

Dermody, T.S., Tyler, K.L., 2000. Introduction to Viruses and Viral Diseases, in: Mandell, G.L. (Ed.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, pp. 1536-1548.

Dunbar, S.A., 2006. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. Clin Chim Acta 363, 71-82.

Echavarría, M., 2008. Adenoviruses in immunocompromised hosts. Clin Microbiol Rev 21, 704-715.

Erdman, D.D., Xu, W., Gerber, S.I., Gray, G.C., Schnurr, D., Kajon, A.E., Anderson, L.J., 2002. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. Emerg Infect Dis 8, 269-277.

FDA, 2008. xTAG™ Respiratory Viral Panel (RVP) - K063765, FDA review. Center for Devices and Radiological Health, U.S. Food and Drug Administration, Washington, <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm074349.htm>, Datum des Seitenaufufes 2011/03/08.

FDA, 2011. Approval Letter - Adenovirus Type 4 and Type 7 Vaccine, Live, Oral, <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm247511.htm>, Datum des Seitenaufufes 2011/06/18.

Forster, J., Hager, A., Herting, E., Liese, J., Rose, M.A., Zielen, S., 2012. Leitlinie zur Prophylaxe von schweren Erkrankungen durch Respiratory Syncytial Virus (RSV) bei Risikokindern. AWMF-Leitlinien.

Fox, J.D., 2007. Nucleic acid amplification tests for the detection and analysis of respiratory viruses: the future for diagnostics? Future Microbiol 2, 199-211.

Gadsby, N.J., Hardie, A., Claas, E.C., Templeton, K.E., 2010. Comparison of the Luminex Respiratory Virus Panel fast assay with in-house real-time PCR for respiratory viral infection diagnosis. J Clin Microbiol 48, 2213-2216.

Gharabaghi, F., Hawan, A., Drews, S.J., Richardson, S.E., 2011. Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin Microbiol Infect* 17, 1900-1906.

Glasgow, J.N., Everts, M., Curiel, D.T., 2006. Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 13, 830-844.

Gray, G.C., 2006. Adenovirus transmission - Worthy of our attention. *Journal of Infectious Diseases* 194, 871-873.

Gray, G.C., Chorazy, M.L., 2009. Human adenovirus 14a: a new epidemic threat. *J Infect Dis* 199, 1413-1415.

Gray, G.C., McCarthy, T., Lebeck, M.G., Schnurr, D.P., Russell, K.L., Kajon, A.E., Landry, M.L., Leland, D.S., Storch, G.A., Ginocchio, C.C., Robinson, C.C., Demmler, G.J., Saubolle, M.A., Kehl, S.C., Selvarangan, R., Miller, M.B., Chappell, J.D., Zerr, D.M., Kiska, D.L., Halstead, D.C., Capuano, A.W., Setterquist, S.F., Chorazy, M.L., Dawson, J.D., Erdman, D.D., 2007. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis* 45, 1120-1131.

Gray, G.C., Setterquist, S.F., Jirsa, S.J., DesJardin, L.E., Erdman, D.D., 2005. Emergent strain of human adenovirus endemic in Iowa. *Emerg Infect Dis* 11, 127-128.

Hall, C.B., 2001. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 344, 1917-1928.

Hall, C.B., 2004. Respiratory Syncytial Virus, in: Feigin, R.D. (Ed.), *Textbook of pediatric infectious diseases*. Saunders, pp. 2315-2333.

Hall, C.B., McBride, J.T., 2000. Bronchiolitis, in: Mandell, G.L. (Ed.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone, pp. 710-714.

Hall, C.B., McCarthy, C.A., 2000. Respiratory Syncytial Virus, in: Mandell, G.L. (Ed.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone, pp. 1782-1793.

Hall, C.B., Weinberg, G.A., Iwane, M.K., Blumkin, A.K., Edwards, K.M., Staat, M.A., Auinger, P., Griffin, M.R., Poehling, K.A., Erdman, D., Grijalva, C.G., Zhu, Y., Szilagyi, P., 2009. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 360, 588-598.

Heim, A., Ebnet, C., Harste, G., Pring-Akerblom, P., 2003. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 70, 228-239.

Henkel, J.H., Aberle, S.W., Kundi, M., Popow-Kraupp, T., 1997. Improved detection of respiratory syncytial virus in nasal aspirates by seminested RT-PCR. *Journal of Medical Virology* 53, 366-371.

Hilleman, M.R., Werner, J.H., 1954. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* 85, 183-188.

Hong, J.Y., Lee, H.J., Piedra, P.A., Choi, E.H., Park, K.H., Koh, Y.Y., Kim, W.S., 2001. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 32, 1423-1429.

Hsieh, W.Y., Chiu, N.C., Chi, H., Huang, F.Y., Hung, C.C., 2009. Respiratory adenoviral infections in Taiwanese children: a hospital-based study. *J Microbiol Immunol Infect* 42, 371-377.

Huebner, R.J., Rowe, W.P., Ward, T.G., Parrott, R.H., Bell, J.A., 1954. Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents: a newly recognized group of common viruses of the respiratory system. *N Engl J Med* 251, 1077-1086.

IUBMB, 1984. Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>, Datum des Seitenauftrufes 2013/08/04.

Iwane, M.K., Edwards, K.M., Szilagyi, P.G., Walker, F.J., Griffin, M.R., Weinberg, G.A., Coulen, C., Poehling, K.A., Shone, L.P., Balter, S., Hall, C.B., Erdman, D.D., Wooten, K., Schwartz, B., 2004. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. *Pediatrics* 113, 1758-1764.

Jones, M.S., II, Harrach, B., Ganac, R.D., Gozum, M.M.A., dela Cruz, W.P., Riedel, B., Pan, C., Delwart, E.L., Schnurr, D.P., 2007. New Adenovirus Species Found in a Patient Presenting with Gastroenteritis. *J. Virol.* 81, 5978-5984.

Kim, S.R., Ki, C.S., Lee, N.Y., 2009. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *Journal of virological methods* 156, 111-116.

Kneyber, M.C., Brandenburg, A.H., Rothbarth, P.H., de Groot, R., Ott, A., van Steensel-Moll, H.A., 1996. Relationship between clinical severity of respiratory syncytial virus infection and subtype. *Arch Dis Child* 75, 137-140.

Kusel, M.M., de Klerk, N.H., Holt, P.G., Keadze, T., Johnston, S.L., Sly, P.D., 2006. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J* 25, 680-686.

Laham, F.R., Jewell, A.M., Schoonover, S.L., Demmler, G.J., Piedra, P.A., 2008. The search for adenovirus 14 in children in Houston, Texas. *Pediatr Infect Dis J* 27, 653-654.

- Lambert, S.B., Allen, K.M., Druce, J.D., Birch, C.J., Mackay, I.M., Carlin, J.B., Carapetis, J.R., Sloots, T.P., Nissen, M.D., Nolan, T.M., 2007. Community epidemiology of human metapneumovirus, human coronavirus NL63, and other respiratory viruses in healthy preschool-aged children using parent-collected specimens. *Pediatrics* 120, e929-937.
- Landry, M.L., Lebeck, M.G., Capuano, A.W., McCarthy, T., Gray, G.C., 2009. Adenovirus type 3 outbreak in connecticut associated with a novel variant. *J Med Virol* 81, 1380-1384.
- Lee, J., Choi, E.H., Lee, H.J., 2010. Comprehensive serotyping and epidemiology of human adenovirus isolated from the respiratory tract of Korean children over 17 consecutive years (1991-2007). *J Med Virol* 82, 624-631.
- Lee, J.A., Kim, N.H., Kim, S.J., Choi, E.H., Lee, H.J., 2005. Rapid identification of human adenovirus types 3 and 7 from respiratory specimens via multiplex type-specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5509-5514.
- Lewis, P.F., Schmidt, M.A., Lu, X., Erdman, D.D., Campbell, M., Thomas, A., Cieslak, P.R., Grenz, L.D., Tsaknardis, L., Gleaves, C., Kendall, B., Gilbert, D., 2009. A community-based outbreak of severe respiratory illness caused by human adenovirus serotype 14. *J Infect Dis* 199, 1427-1434.
- Li, H., McCormac, M.A., Estes, R.W., Sefers, S.E., Dare, R.K., Chappell, J.D., Erdman, D.D., Wright, P.F., Tang, Y.W., 2007. Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 45, 2105-2109.
- Liesbeth Lenaerts, E.D.C., Lieve Naesens,, 2008. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Reviews in Medical Virology* 18, 357-374.
- Louie, J.K., Kajon, A.E., Holodniy, M., Guardia-LaBar, L., Lee, B., Petru, A.M., Hacker, J.K., Schnurr, D.P., 2008. Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat? *Clin Infect Dis* 46, 421-425.
- Lu, X., Erdman, D.D., 2006. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Archives of Virology* 151, 1587-1602.
- Madisch, I., Harste, G., Pommer, H., Heim, A., 2005. Phylogenetic analysis of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy. *J Virol* 79, 15265-15276.
- Madisch, I., Wolfel, R., Harste, G., Pommer, H., Heim, A., 2006. Molecular identification of adenovirus sequences: a rapid scheme for early typing of human adenoviruses in diagnostic samples of immunocompetent and immunodeficient patients. *J Med Virol* 78, 1210-1217.

- Mahony, J., Chong, S., Merante, F., Yaghoubian, S., Sinha, T., Lisle, C., Janeczko, R., 2007. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol* 45, 2965-2970.
- Mahony, J.B., 2008. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 21, 716-747.
- Mahony, J.B., Petrich, A., Smieja, M., 2011. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48, 217-249.
- Mansbach, J.M., McAdam, A.J., Clark, S., Hain, P.D., Flood, R.G., Acholonu, U., Camargo, C.A., Jr., 2008. Prospective multicenter study of the viral etiology of bronchiolitis in the emergency department. *Acad Emerg Med* 15, 111-118.
- Marshall, D.J., Reisdorf, E., Harms, G., Beaty, E., Moser, M.J., Lee, W.M., Gern, J.E., Nolte, F.S., Shult, P., Prudent, J.R., 2007. Evaluation of a multiplexed PCR assay for detection of respiratory viral pathogens in a public health laboratory setting. *J Clin Microbiol* 45, 3875-3882.
- Martinello, R.A., Chen, M.D., Weibel, C., Kahn, J.S., 2002. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis* 186, 839-842.
- McCarthy, T., Lebeck, M.G., Capuano, A.W., Schnurr, D.P., Gray, G.C., 2009. Molecular typing of clinical adenovirus specimens by an algorithm which permits detection of adenovirus coinfections and intermediate adenovirus strains. *J Clin Virol*.
- Merante, F., Yaghoubian, S., Janeczko, R., 2007. Principles of the xTAG respiratory viral panel assay (RVP Assay). *J Clin Virol* 40 Suppl 1, S31-35.
- Metzgar, D., Osuna, M., Kajon, A.E., Hawksworth, A.W., Irvine, M., Russell, K.L., 2007. Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers. *J Infect Dis* 196, 1465-1473.
- Miller, M.B., Tang, Y.W., 2009. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 22, 611-633.
- Mlinaric-Galinovic, G., Vojnovic, G., Cepin-Bogovic, J., Bace, A., Bozikov, J., Welliver, R.C., Wahn, U., Cebalo, L., 2009. Does the viral subtype influence the biennial cycle of respiratory syncytial virus? *Virol J* 6, 133.
- Modrow, S., 2003a. Adenoviren, in: Modrow, S. (Ed.), *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 513-539.
- Modrow, S., 2003b. Paramyxoviren, in: Modrow, S. (Ed.), *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 265-298.
- Mufson, M.A., Orvell, C., Rafnar, B., Norrby, E., 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 66 (Pt 10), 2111-2124.

Multimetrix, P.B.-. 2012. Multiplexe Analytik mit Bead-basierten Assays - Das Prinzip der Luminex-xMAP-Technologie. Progen Biotechnik, Vertrieb und Produktmanagement, PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, Datum des Seitenaufrufes 2012/01/02.

Musher, D.M., 2003. How Contagious Are Common Respiratory Tract Infections? *N Engl J Med* 348, 1256-1266.

National Center for Biotechnology Information, U.S.N.L.o.M., 2008. Genbank. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>.

Nolte, F.S., Marshall, D.J., Rasberry, C., Schievelbein, S., Banks, G.G., Storch, G.A., Arens, M.Q., Buller, R.S., Prudent, J.R., 2007. MultiCode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 45, 2779-2786.

Ostlund, M.R., Lindell, A.T., Stenler, S., Riedel, H.M., Wirgart, B.Z., Grillner, L., 2008. Molecular epidemiology and genetic variability of respiratory syncytial virus (RSV) in Stockholm, 2002-2003. *J Med Virol* 80, 159-167.

Ostroff, S.M.L., James W., 2000. Global Epidemiology of Infectious Diseases, in: Mandell, G.L. (Ed.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, pp. 167-169.

Pabbaraju, K., Tokaryk, K.L., Wong, S., Fox, J.D., 2008. Comparison of the Luminex xTAG respiratory viral panel with in-house nucleic acid amplification tests for diagnosis of respiratory virus infections. *J Clin Microbiol* 46, 3056-3062.

Panozzo, C.A., Fowlkes, A.L., Anderson, L.J., 2007. Variation in timing of respiratory syncytial virus outbreaks: lessons from national surveillance. *Pediatr Infect Dis J* 26, S41-45.

Peret, T.C., Hall, C.B., Hammond, G.W., Piedra, P.A., Storch, G.A., Sullender, W.M., Tsou, C., Anderson, L.J., 2000. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis* 181, 1891-1896.

Peret, T.C., Hall, C.B., Schnabel, K.C., Golub, J.A., Anderson, L.J., 1998. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol* 79 (Pt 9), 2221-2229.

Qiagen-Handbook, 2010. ResPlex™ I Handbook Sample & Assay Technologies, Qiagen, <http://www.qiagen.com/products/resplexipanel.aspx#Tabs=t2>, Datum des Seitenaufrufes 2011/03/09.

Quan, P.L., Briese, T., Palacios, G., Ian Lipkin, W., 2008. Rapid sequence-based diagnosis of viral infection. *Antiviral Res* 79, 1-5.

- Reiche, J., Schweiger, B., 2009. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. *J Clin Microbiol* 47, 1800-1810.
- Reinhardt, D., Wirth, S., 2009. RSV-Prophylaxe mit Palivizumab bei Risikokindern, *Monatsschrift Kinderheilkunde*. Springer Berlin / Heidelberg, pp. 61-64.
- Rheem, I., Park, J., Kim, T.H., Kim, J.W., 2012. Evaluation of a multiplex real-time PCR assay for the detection of respiratory viruses in clinical specimens. *Ann Lab Med* 32, 399-406.
- Robinson, C., Echavarria, M., 2007. Adenoviruses, in: Murray, P.R. (Ed.), *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, pp. 1589-1598.
- Robinson, C.M., Singh, G., Henquell, C., Walsh, M.P., Peigue-Lafeuille, H., Seto, D., Jones, M.S., Dyer, D.W., Chodosh, J., 2011. Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality. *Virology* 409, 141-147.
- RoteListe, 2013. Synagis® 50 mg/-100 mg Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung. Rote Liste® Service GmbH, <http://www.rote-liste.de/>, Datum des Seitenaufrufes 2013/03/20.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G., 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84, 570-573.
- Russell, K.L., Broderick, M.P., Franklin, S.E., Blyn, L.B., Freed, N.E., Moradi, E., Ecker, D.J., Kammerer, P.E., Osuna, M.A., Kajon, A.E., Morn, C.B., Ryan, M.A., 2006a. Transmission dynamics and prospective environmental sampling of adenovirus in a military recruit setting. *J Infect Dis* 194, 877-885.
- Russell, K.L., Hawksworth, A.W., Ryan, M.A., Strickler, J., Irvine, M., Hansen, C.J., Gray, G.C., Gaydos, J.C., 2006b. Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits, 1999-2004. *Vaccine* 24, 2835-2842.
- Russell, W.C., 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 90, 1-20.
- Sakthivel, S.K., Whitaker, B., Lu, X., Oliveira, D.B., Stockman, L.J., Kamili, S., Oberste, M.S., Erdman, D.D., 2012. Comparison of fast-track diagnostics respiratory pathogens multiplex real-time RT-PCR assay with in-house singleplex assays for comprehensive detection of human respiratory viruses. *Journal of virological methods* 185, 259-266.
- Salamano, E., Manuskript in Vorbereitung. Evaluierung des ResPlex-Testsystems zur Erregerdiagnostik bei Kindern mit akuten respiratorischen Erkrankungen, Dissertationsarbeit.

- Sarantis, H., Johnson, G., Brown, M., Petric, M., Tellier, R., 2004. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 42, 3963-3969.
- Sato, M., Saito, R., Sakai, T., Sano, Y., Nishikawa, M., Sasaki, A., Shobugawa, Y., Gejyo, F., Suzuki, H., 2005. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J Clin Microbiol* 43, 36-40.
- Schmitt-Grohé, S., 2011. Virale Pneumonie. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 159, 217-223.
- Scott, P.D., Ochola, R., Ngama, M., Okiro, E.A., Nokes, D.J., Medley, G.F., Cane, P.A., 2004. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J Med Virol* 74, 344-354.
- Sefers, S.E., Li, H., Tang, Y.W., 2011. Simultaneous detection and differentiation of respiratory syncytial virus and other respiratory viral pathogens. *Methods Mol Biol* 665, 309-323.
- Shay, D.K., Holman, R.C., Newman, R.D., Liu, L.L., Stout, J.W., Anderson, L.J., 1999. Bronchiolitis-Associated Hospitalizations Among US Children, 1980-1996. *JAMA* 282, 1440-1446.
- Sullender, W.M., 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev* 13, 1-15, table of contents.
- Tang, Y.-W., Crowe, J.E., Jr., 2007. Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus, in: Murray, P.R. (Ed.), *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, pp. 1361-1373.
- Tate, J.E., Bunning, M.L., Lott, L., Lu, X., Su, J., Metzgar, D., Brosch, L., Panozzo, C.A., Marconi, V.C., Faix, D.J., Prill, M., Johnson, B., Erdman, D.D., Fonseca, V., Anderson, L.J., Widdowson, M.A., 2009. Outbreak of Severe Respiratory Disease Associated with Emergent Human Adenovirus Serotype 14 at a US Air Force Training Facility in 2007. *J Infect Dis* 199, 1419-1426.
- Tepper, R.S., Morgan, W.J., Cota, K., Wright, A., Taussig, L.M., 1986. Physiologic growth and development of the lung during the first year of life. *Am Rev Respir Dis* 134, 513-519.
- Terletskaia-Ladwig, E., Enders, G., Schalasta, G., Enders, M., 2005. Defining the timing of respiratory syncytial virus (RSV) outbreaks: an epidemiological study. *BMC Infect Dis* 5, 20.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

- Venter, M., Madhi, S.A., Tiemessen, C.T., Schoub, B.D., 2001. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol* 82, 2117-2124.
- Viegas, M., Mistchenko, A.S., 2005. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999-2004) in Argentina. *J Med Virol* 77, 302-310.
- Walsh, E.E., McConnochie, K.M., Long, C.E., Hall, C.B., 1997. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J Infect Dis* 175, 814-820.
- Walsh, M.P., Chintakuntlawar, A., Robinson, C.M., Madisch, I., Harrach, B., Hudson, N.R., Schnurr, D., Heim, A., Chodosh, J., Seto, D., Jones, M.S., 2009. Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. *PLoS ONE* 4, e5635.
- Walsh, M.P., Seto, J., Jones, M.S., Chodosh, J., Xu, W., Seto, D., 2010. Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen. *Journal of clinical microbiology* 48, 991-993.
- Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J.J., Salemme, F.R., 1989. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* 243, 85-88.
- Weigl, J., Forster, J., Berner, R., Puppe, W., Neumann-Häfelin, D., Meyer, C., Zepp, F., Schmitt, H.J., 2003. Virale Atemwegsinfektionen mit saisonaler Häufung bei Kindern. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 46, 9-19.
- Weigl, J., Schmitt, H.J., 2007. "Pediatric Infectious Disease Network on Acute Respiratory Tract Infections", Web&Warnsystem, <http://www.pid-ari.net>, Datum des Seitenaufufes 2013/02/13.
- Weigl, J.A., Puppe, W., Grondahl, B., Schmitt, H.J., 2000. Epidemiological investigation of nine respiratory pathogens in hospitalized children in Germany using multiplex reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19, 336-343.
- Weigl, J.A., Puppe, W., Rockahr, S., Schmitt, H.J., 2002a. Burden of disease in hospitalized RSV-positive children in Germany. *Klin Padiatr* 214, 334-342.
- Weigl, J.A., Puppe, W., Schmitt, H.J., 2002b. Seasonality of respiratory syncytial virus-positive hospitalizations in children in Kiel, Germany, over a 7-year period. *Infection* 30, 186-192.

Weinberg, G.A., Erdman, D.D., Edwards, K.M., Hall, C.B., Walker, F.J., Griffin, M.R., Schwartz, B., 2004. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis* 189, 706-710.

Welliver, R.C., 2004. Bronchiolitis and Infectious Asthma, in: Feigin, R.D. (Ed.), *Textbook of pediatric infectious diseases*. Saunders, pp. 273-282.

Wold, W.S.M., Horwitz, M.S., 2007. Adenoviruses, in: Knipe, D.M., Fields, B.N. (Eds.), *Fields' virology*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2395-2426.

Xu, W.H., Erdman, D.D., 2001. Type-specific identification of human adenovirus 3, 7, and 21 by a multiplex PCR assay. *Journal of Medical Virology* 64, 537-542.

Yeung, R., Eshaghi, A., Lombos, E., Blair, J., Mazzulli, T., Burton, L., Drews, S.J., 2009. Characterization of culture-positive adenovirus serotypes from respiratory specimens in Toronto, Ontario, Canada: September 2007-June 2008. *Virology* 6, 11.

Zambon, M.C., Stockton, J.D., Clewley, J.P., Fleming, D.M., 2001. Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: an observational study. *Lancet* 358, 1410-1416.

Zhu, Z., Zhang, Y., Xu, S., Yu, P., Tian, X., Wang, L., Liu, Z., Tang, L., Mao, N., Ji, Y., Li, C., Yang, Z., Wang, S., Wang, J., Li, D., Xu, W., 2009. Outbreak of acute respiratory disease in China caused by B2 species of adenovirus type 11. *J Clin Microbiol* 47, 697-703.

Zlateva, K.T., Lemey, P., Moes, E., Vandamme, A.M., Van Ranst, M., 2005. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol* 79, 9157-9167.

Zlateva, K.T., Vijgen, L., Dekeersmaecker, N., Naranjo, C., Van Ranst, M., 2007. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *J Clin Microbiol* 45, 3022-3030.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Zuerst möchte ich Herrn Professor Dr. med. Axel Rethwilm für die Überlassung des interessanten Themas danken. Leider ist er im Juli letzten Jahres unerwartet von uns gegangen. Daher möchte ich diese Gelegenheit nutzen seiner Familie, seinen Vertrauten mein aufrichtiges Beileid auszusprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Michael Klein für die kurzfristige Übernahme des Referates, sowie Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Christoph U. Schoen für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Virusdiagnostik-Labors des Instituts für Virologie und Immunbiologie sei gedankt für die kollegiale Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Dr. Benedikt Weissbrich für die intensive Betreuung, Frau Christiane Prifert für zahlreiche konstruktive fachliche Ratschläge, Frau Sonja Köberlein für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung, Frau Miriam Mildner, Frau Irina Hensel, Frau Barbara Scheiner, Frau Michaela Fleck und Frau Sabine Pohli für die geduldige Einweisung beim Erlernen der Methoden, Frau Karin Sell, Herrn Moritz Ewald und Herrn Eduardo Salamano für die gute Laune und kollegiale Zusammenarbeit.

Meinem langjährigen Kommilitonen und Freund Herrn Stefan Bittner gilt mein ganz besonderer Dank für geduldige und motivierende Unterstützung, die entscheidend zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen hat.

Mein größter Dank gilt meiner Familie: meinen Eltern, die mir es ermöglichten mein Studium vollkommen frei nach meinen Vorstellungen zu gestalten und mir stets mit Verständnis und Respekt liebevoll zur Seite standen und meiner Schwester Anna, die mich in jeder Hinsicht unermüdlich und uneingeschränkt unterstützt hat.